

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450298

研究課題名(和文) マダイの卵成熟能獲得を巡る分子機構の解明

研究課題名(英文) Studies on molecular mechanisms in the acquisition of maturational competence of red seabream, *Pagrus major*

研究代表者

奥澤 公一 (Okuzawa, Koichi)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・センター長

研究者番号：00211813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：性成熟したマダイ卵巣から分離した卵濾胞の培養系を用い、卵濾胞の比較トランスクリプトームを実施した。卵成熟能獲得前後の比較(別個体)では、獲得後の個体で、黄体形成ホルモン受容体遺伝子の発現が6倍、プロゲステロン受容体遺伝子の発現が8倍高かった。また、人為的に成熟能を付与するために卵濾胞をヒト胎盤性性腺刺激ホルモン(hCG)で刺激し、12時間後に遺伝子発現を対照区と比較したところ、hCG区で発現が多い遺伝子は、性ステロイドホルモン合成酵素、tight junctionタンパクなどであった。この内、約900倍発現が上昇していた遺伝子が卵成熟誘起ステロイドの合成を制御する酵素をコードする可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：Transcriptomes were compared between maturationally competent and incompetent ovarian follicles of red seabream, *Pagrus major*. Gene expressions of luteinizing hormone receptor and progesterone receptors of competent follicles were 8 and 6 times higher than incompetent ones, respectively. An artificial induction of the competency by human chorionic gonadotropin (hCG) resulted in up-regulations of the genes encoding enzymes catalyzing sex steroid hormone syntheses, tight junction protein, etc. Among them, a putative gene with enhanced gene expression of around 900-fold by hCG is estimated as the key enzyme catalyzing production of maturation-inducing steroid.

研究分野：魚類繁殖生理学

キーワード：卵成熟 卵成熟能 マダイ トランスクリプトーム 卵濾胞

1. 研究開始当初の背景

魚類の卵巣における卵形成過程は、成長期（卵黄を蓄積して大きくなる期間）と成熟期（受精可能な状態への準備期間）に二分される。これまでの研究により、卵黄を十分に蓄積して成長し、必要十分な大きさになることで卵成熟のための準備が整うことが分かっている。この準備が整うことを卵成熟能の獲得と呼ぶ。卵成熟能の獲得は二種類ある生殖腺刺激ホルモンのうち、黄体形成ホルモン（LH）の支配下であり、卵細胞膜における卵成熟誘起ステロイド（MIS）受容体の発現を伴うことが知られている。しかし LH がどのようなメカニズムにより卵に成熟能を付与するのかは全く解明されていなかった。特に注目すべきは卵を取り囲んでいる濾胞細胞が卵成熟能獲得前後でその役割を大きく変え、卵を成長させる女性ホルモン（エストラジオール、 E_2 ）産生から卵成熟、排卵を誘導する MIS 産生に変化することである（図 1）。

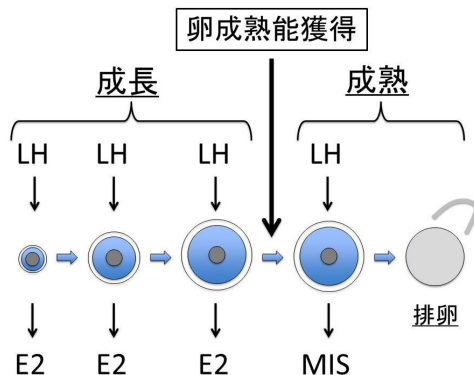


図 1. マダイの卵成熟能獲得模式図

すなわち濾胞細胞における性ステロイドホルモン合成経路に大きな変化が生じるものと推察されている。このことは以前より注目されており様々な解明の試みがなされてきたが、適当な解析手法がなく大きな謎のままであった。

研究代表者らは、日本の代表的な海産養殖魚であるマダイについて、雌においては二種類ある生殖腺刺激ホルモン(GTH)のうち LH の遺伝子発現量（文献）と産生量（文献）が、もう一方の GTH である濾胞刺激ホルモン（FSH）に比べて常に圧倒的に多いことを明らかにした。このことから、マダイでは LH のみが卵の成長と成熟の両方を制御していると考えられる。そのためマダイは、魚類では例外的に生殖線刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）の投与によりごく未熟な若齢魚の卵巣を発達させ、排卵を誘起することが可能である（文献）。また、マダイは産卵期にほぼ毎日決まった時刻に産卵するので、卵成熟能を獲得する前後の卵濾胞（卵細胞と濾胞細胞から構成される）を計画的に入手できる。このようにマダイは本研究の材料として最適であると考えられた。

近年、大量の塩基配列データを一度に取得できる次世代シーケンサー（NGS）が登場

し、非モデル生物の全ゲノム塩基配列解読や各種組織で発現している遺伝子の塩基配列を網羅的に調べることが格段に容易になり、今ではコスト面でも多くの研究者が手の出しやすい範囲にある。これまでは cDNA サブトラクション（引き算）やディファレンシャルディスプレイ PCR などの手法により発現に差のある遺伝子を特定し、その後特定した遺伝子について定量 PCR 等の手法でその遺伝子発現量を調べる研究が主流であった。近年 NGS を使って発現遺伝子の種類と発現量を同時に調べる網羅的遺伝子解析手法（RNA-seq）が開発され急速に普及している。この方法を使えばホルモン刺激によって発現してくる遺伝子の種類や量を刺激後の時間を追って詳しく調べることが出来る。ただし、この RNA-seq を実施するためには対象種の参照配列（ゲノム情報）があることが望ましいが、マダイでは整備されていなかった。

われわれは上述のように、卵成熟能の獲得についての最適な材料であるマダイを用いて、比較的容易に実現可能となったゲノム情報の整備を実施した上で、これまでに蓄積した研究成果と最新の研究手法である RNA-seq を組み合わせれば長年の大きな謎である卵成熟能獲得の分子機構を解明することができるとの着想に至り本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、マダイにおいて RNA-seq を実行するために有益となるマダイ全ゲノム塩基配列の解読を第一の目的とした。次に、マダイ卵巣中の卵濾胞を対象として、卵成熟能獲得前後での遺伝子発現の相違を明らかにすることを第 2 の目的とした。さらに、卵濾胞培養実験系を用い、LH 作用による卵成熟能獲得過程で発現する遺伝子の種類と量を網羅的に RNA-seq で調べることを第 3 の目的とした。得られた結果を統合し、マダイの卵成熟能獲得を裏打ちする分子機構、特に濾胞細胞における性ステロイドホルモン合成に関与する遺伝子発現の変化を解明することを最終目的とした。

3. 研究の方法

(1) 網羅的遺伝子解析に必要な参照配列（リファレンス）を得るため、マダイ全ゲノム NGS で解読した。

ゲノム解読を容易にすることを目的として、母親由来のゲノムのみを持つ個体を得るため、マダイの半数体または雌性発生二倍体の作出を試みた。産卵期（4月下旬から5月上旬）の雌雄のマダイから成熟した卵と精子を得て、得られた精子に紫外線を照射し、雄由来のゲノムを破壊してから受精させた。紫外線の照射量については照射後の精子の運動活性を指標として最適量を決定した。受精後、そのまま発生させて仔魚を得た。得られた仔魚についてプロイディーアナライザーを用いて DNA 量を測定し半数体であることを

確認した。

半数体個体は致死であるため、解析用の DNA が十分には得られない。そこで、紫外線照射精子で受精させた後、圧力処理を行って第一卵割を阻止して染色体を倍化させ、母親由来のゲノムを 2 セット持ち生存可能である雌性発生二倍体個体を得ることを試みた。

半数体 1 個体からゲノム DNA を調整し、Ion Proton シーケンサー (Thermo Fisher) で塩基配列を取得、Newbler ver.3 ソフトウェアを用いてアセンブルを行った。

(2)卵成熟能獲得前後の卵濾胞で発現している遺伝子(メッセンジャーRNA)を NGS で網羅的に読み、発現遺伝子の種類と量の相違を調べた。

平成 27 年 12 月から増養殖研究所南勢庁舎の 30kl 閉鎖循環式水槽で水温と日長を制御してマダイ(5 歳)を飼育し、産卵を誘起・継続させた。平成 28 年 3 月に 2 回、5 月に 1 回、合計 3 回の実験を実施した。実験に用いた各雌個体が卵成熟能を獲得済みであるかを判定するために卵濾胞をホルモンとともに培養して確認した。

各回とも、午前 9 時前後にマダイ 1 尾を水槽から釣り上げて麻酔したのち、卵巣を取り出し、培養液(L-15, pH7.4)中で解剖用ハサミを用いて細切した。細切した卵巣片に対して駒込ピペットによる吸引と吐出を繰り返し卵濾胞を分離した。分離した卵濾胞はステンレス製篩でサイズ選別し、さらに実体顕微鏡下で直径が 500 μ m 前後のものを選別して培養した。24 穴培養プレートの各 well に培養液を 0.5 または 1ml 入れ、選別した卵濾胞を 30 個/well 収容した。また別途 30 個を処理前の試料としてキアゾル(キアゲン)1ml 中で破碎し、-80 で RNA 抽出まで保存した。

組換えマダイ黄体形成ホルモン(rLH, 10 μ g/ml)、ヒト胎盤性性腺刺激ホルモン(hCG, 10 IU/ml)、卵成熟誘起ステロイド(17 β , 20 α -dihydroxy-4-pregnen-3-one, DHP, 10 ng/ml)および対照区(培養液のみ)の 4 実験区を設定し、20 で 24 時間培養して卵成熟(吸水、透明化)するか否かを経時的に実体顕微鏡で確認した。

卵成熟した個体の卵濾胞(卵成熟能あり、competent)としなかった個体の卵濾胞(卵成熟能なし、incompetent)の実験開始時の卵濾胞サンプルから RNA を抽出、逆転写した後、NGS (Illumina HiSeq4000)により塩基配列を決定し De novo トランスクリプトーム解析を BGI 社に依頼して実施した。

(3)ホルモン刺激により卵成熟能獲得過程で発現する遺伝子を解析した。

増養殖研究所南勢庁舎の海面網生け簀において自然条件下で飼育していたマダイ成魚を平成 27 年 5 月にとりあげ、卵巣内に透明化した成熟卵を持つ雌マダイ 1 個体を材料として実験を行った。卵巣を取り出し、上述

の方法で卵濾胞を分離した。24 穴培養プレートの各 well に培養液 1ml を入れ、選別した卵母細胞を 100 個ずつ収容した。また別に 60 個を処理前の試料として RNAlater 中に保存した。実験区として hCG(10 IU/ml)区、hCG(10 IU) + DHP(10ng/ml)区および対照区(培養液のみ)を設け 20 で 12 時間ないし 24 時間培養した。

平成 28 年 2 月に hCG 存在下 12 時間培養したホルモン処理区とその対照区(培養液のみで 12 時間培養)および培養前の卵濾胞の 3 サンプルを比較トランスクリプトームの材料とした。全サンプルから RNA を抽出、逆転写した後、NGS (Illumina HiSeq4000)により塩基配列を決定した。逆転写以降の解析は BGI 社に依頼して実施した。

4. 研究成果

(1)半数体および雌性発生二倍体を作成するため、精子のゲノムを破壊(不活化)するための紫外線照射条件の検討を行い、3,000 erg/mm²が最適であることを明らかにした。次に不活化精子を用いて人工授精を行い、半数体仔魚を作成した。半数体仔魚は極端な形態異常でありふ化後 2 日間ほど生存した。さらに不活化した精子を媒精した受精卵を高圧処理することで第一卵割阻止型の雌性発生二倍体(ダブルハプロイド)の作成を試みた。種々の条件下でゲノムの倍化を試みたが、正常な形態の孵化仔魚の割合は最高でも 0.12%であり、ほとんどは半数体症候群と思われる形態異常であり雌性発生二倍体は得られなかった。

半数体仔魚由来ゲノム DNA から得られた配列をアセンブルしたところ、145,954 コンティグ(平均 7kb、最長 200kb)が得られた。

(2) 3 回の実験のうち、3 月に実施した 1 回の実験において、DHP 区のみで培養開始から 18 時間後に生体外卵成熟が観察され、この個体の卵濾胞は competent と判定された。一方、それ以外の 2 回の実験では、いずれの実験区でも卵成熟は起こらず incompetent と判定された。

competent と incompetent 間の卵濾胞の比較トランスクリプトーム解析では、全サンプルから得られた塩基配列から 44,400 種の遺伝子候補が得られ、その平均長は 1,503 塩基対(bp)であり、その 80%に注釈付けが可能であった。competent で、LH 受容体遺伝子の発現が 6 倍、プロゲステロン受容体遺伝子の発現が 8 倍高かった。また、ステロイドホルモン合成に関する遺伝子に着目すると、competent では incompetent に比べ、steroid 21-hydroxylase (CYP21A) の発現が上昇、エストラジオールの代謝に關与する酵素の発現が低下していた。

(3)卵濾胞の培養実験において、培養 12 時間後に hCG+DHP 区で卵成熟(透明化)が観察さ

れたが、同時刻において hCG のみの区はその徴候のみが観察された。開始 24 時間後には hCG 区でも卵成熟が観察された (図 2)。

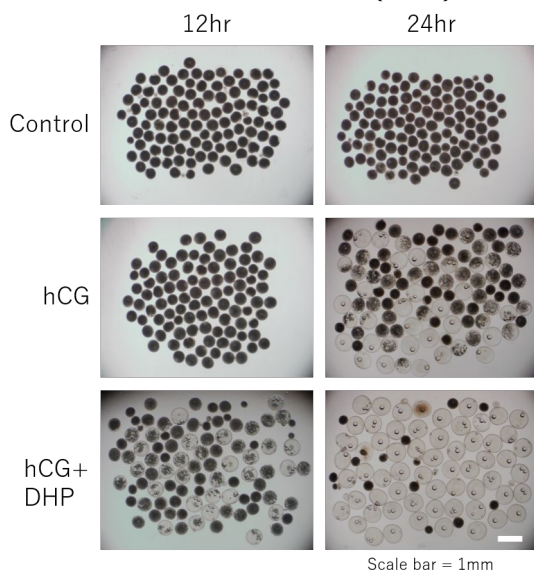


図 2. マダイ卵濾胞の培養実験

比較トランスクリプトーム解析では、得られた塩基配列から 39,424 種の遺伝子候補が得られ、その平均長は 1,404bp であり、その 83% に注釈付けが可能であった。各サンプル間で発現の異なる遺伝子は 2,000 個から 2,500 個であった。hCG 区と対照区を比較したところ、hCG 区で発現が 2 倍以上多い遺伝子が 1,630 個、2 倍以上少ない遺伝子が 951 個見つかった。

発現が上昇した遺伝子の上位は、性ステロイドホルモン合成経路の遺伝子、tight junction タンパク、ヒストン修飾関連タンパクなどであり、低下した遺伝子として、膜タンパク質、ヒストン修飾関連タンパク、がん転移抑止因子などが認められた。この内、1,115bp の遺伝子候補 (Unigene30041) は hCG 区で対照区との比較、処理前の卵濾胞との比較のいずれにおいても約 900 倍発現が上昇していた。この Unigene30041 の塩基配列を公共データベースで同源性検索すると、カンパチの very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase-like、ティラピアの 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type12 遺伝子などとの塩基配列の同源性が 80~90% であった。本研究で得たマダイのゲノム情報を利用して Unigene30041 がコードするタンパクを推定したところ、最近サクラマスで決定された MIS の合成を制御する酵素 (文献) と近縁と思われる、このタンパク質は、マダイの MIS 合成を支配する酵素である可能性が強く示唆され、マダイ卵成熟過程の遺伝子的背景の一端が解明された。今後、この遺伝子の発現部位、発現動態、発現調節などをさらに詳細に明らかにする必要がある。

また、卵成熟能をもつ個体 (卵濾胞) の条件として LH 受容体が重要である可能性がある。この点についても例数を増やして確認す

る必要がある。

< 引用文献 >

- Gen, K., et al. (2000). "Unique expression of gonadotropin-I and -II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation." *Biology of Reproduction* 63(1): 308-319.
- Okuzawa, K., et al. (2016). "Development of a homologous radioimmunoassay for red seabream follicle stimulating hormone and regulation of gonadotropins by GnRH in red seabream, *Pagrus major*." *General and Comparative Endocrinology* 239: 4-12.
- Kumakura, N., et al. (2003). "Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist and dopamine antagonist on hypothalamus-pituitary-gonadal axis of pre-pubertal female red seabream (*Pagrus major*)." *General and Comparative Endocrinology* 131(3): 264-273.
- Ijiri, S., et al. (2017). "17beta-HSD Type 12-Like is responsible for maturation-inducing hormone synthesis during oocyte maturation in masu salmon." *Endocrinology* 158(3): 627-639.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥澤 公一 (OKUZAWA, Koichi)
 国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・センター長
 研究者番号: 0 0 2 1 1 8 1 3

(2) 研究分担者

宇治 督 (UJI, Susumu)
 国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・主任研究員
 研究者番号: 4 0 3 7 2 0 4 9

風藤 行紀 (KAZETO, Yukinori)
 国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・グループ長
 研究者番号: 6 0 3 9 9 9 9 6

藤原 篤志 (FUJIWARA, Atsushi)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・中
央水産研究所・主幹研究員
研究者番号：30443352

(3)研究協力者

佐藤 茉菜 (SATO, Mana)

入路 光雄 (NYUJI, Mitsuo)

山口 寿哉 (YAMAGUCHI, Toshiya)