

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14920

研究課題名（和文）卵成熟過程に着目した二枚貝類の成熟段階評価方法の再定義

研究課題名（英文）Redefinition of the reproductive stage in bivalve based on the oocyte maturation process

研究代表者

前田 雪（MAEDA, YUKI）

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(廿日市)・研究員

研究者番号：10756521

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：二枚貝類の成熟段階の評価方法として、従来は生殖巣の切片観察による定性的な方法が用いられているが、本課題では卵成熟過程に着目して新規の分子指標を探索することで、定量的な指標の導入を検討した。大型二枚貝類タイラギを用いた人工受精の成績に基づいて卵の成熟段階を分類し、各成熟段階で異なる発現量を示す遺伝子およびタンパク質を調べたところ、複数の分子が発現変動することが明らかになった。特に、ミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素と26Sプロテアソームという2つの分子が卵成熟の進行に伴って発現量が増加する傾向が示され、成熟段階を評価する新規指標として有力である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では、大型二枚貝類タイラギを用いた人工受精で得られた卵細胞の網羅的発現解析を行って、卵成熟に伴って発現量が増加する分子を複数特定した。これらの分子を成熟段階評価の指標として用いることで、種苗生産に用いる親貝の選択が定量的に実施でき、安定的な種苗生産を可能にすると考えられる。また、長い領域の塩基配列を解読するロングリードシーケンスという手法を取り入れて発現遺伝子のカタログを作成し、それを基に演繹アミノ酸配列データベースを構築することで、遺伝子情報が不足している二枚貝類において効率的に分子指標探索を実施する解析手順を提案した。

研究成果の概要（英文）：Although the qualitative method based on the observation of gonad sections has been conventionally used to evaluate the maturation stages of bivalves, this project focused on the egg maturation process and explored new molecular indicators to introduce quantitative indices. Based on the results of artificial fertilization using pen shell *Atrina pectinata*, the egg maturation stages were classified, and genes and proteins that were differentially expressed at each maturation stage were examined. The results revealed that several molecules showed significant expression variation at different egg maturation stages. In particular, the expression levels of two molecules, mitochondrial aldehyde dehydrogenase and 26S proteasome, tended to increase as egg maturation progressed, indicating that they may be useful as novel indicators to evaluate maturation stages of bivalves.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：タイラギ 二枚貝類 卵成熟 ロングリードシーケンス

1. 研究開始当初の背景

日本では、マガキとホタテガイを除くほぼすべての貝種を天然資源から直接消費している。しかし、近年は複数の貝種で国内漁獲量が最盛期の数十分の一となるほどに天然資源が激減しており、水産業界に深刻な打撃を与えている。このような現状で、二枚貝類養殖を試みる取り組みが全国で活発化しており、とりわけ種苗生産技術の開発が急務である。

二枚貝類の種苗生産では、親貝に人為的な刺激を与えて配偶子の放出を促して受精卵を得る「産卵誘発法」と、生殖巣を切り出して得た配偶子を人工受精させて受精卵を得る「切開法」が用いられる。切開法はマガキやアコヤガイなど数少ない特定の種類のみで可能であるため、多くの二枚貝類では水温上昇などの外部刺激による産卵誘発法が採用されている。このいずれの方法でも、十分成熟した卵を持つ親貝を用いることが、十分量の受精卵を確保する必要条件となっている。しかし、卵の成熟状態を評価する方法は、生殖巣の組織学的観察による定性的な評価に限られており、種苗生産の成否を不安定にしている。

二枚貝類を含めた多くの生物において、卵は次の過程を経て成熟する。生殖巣に存在する卵母細胞は第一減数分裂前期とよばれる時期で減数分裂を一旦停止して、卵黄タンパク質などの栄養を細胞に蓄積していく。栄養の蓄積が完了しても、卵母細胞はまだ受精できる状態ではない。環境刺激に応答して分泌された内分泌因子の刺激により、減数分裂が再開して卵核胞崩壊 (Germinal Vesicle Break Down: GVBD) が起こることで、受精可能な状態になる。この一連の過程を卵成熟と呼ぶ (Tosti *et al.*, Syst. Biol. Reprod. Med., 59, 61, 2013)。

近年の脊椎動物における研究では、卵成熟において栄養が蓄積される過程で「核成熟」に次いで「細胞質成熟」が生じることが示されている (Sánchez and Smitz, Biochim. Biophys. Acta, 1822, 1896, 2012)。核成熟は減数分裂の再開能を獲得した状態であり、細胞質成熟は正常な受精および胚発育能を獲得した状態である。各々の成熟が完了するには、様々な遺伝子やタンパク質の合成と蓄積が必須であることが示されている。また、核成熟が完了しても、細胞質成熟が完了していない卵は、受精可能であるが正常発生には至らない。すなわち、正常発生する健全な受精卵を得るには、卵が細胞質成熟を完了していることが必要条件となる。

二枚貝類においては、卵成熟の過程を核成熟と細胞質成熟に分けて理解しようと試みた例はない。一方、種苗生産現場の経験則として、正常発生率の高い卵は「良質な卵」と表現され、卵の質(卵質)の良い受精卵を安定的かつ大量に確保することが最重要課題である。以上の背景に基づいて、本研究の目的を次のように設定した。

2. 研究の目的

本研究では、二枚貝類の卵成熟過程を核成熟と細胞質成熟に分けて、各々の段階における遺伝子およびタンパク質を網羅的に解析することで、核成熟および細胞質成熟が完了するために必要となる遺伝子およびタンパク質の種類と量を明らかにし、二枚貝類の成熟段階の評価方法を再定義することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)GVBD 率および正常発生率に基づくタイラギ卵の成熟段階の決定

成熟が進行する4月から7月にかけて複数回タイラギの卵を単離した。核成熟の指標として、レチノイン酸によるGVBD誘導(RAアッセイ)を行ってGVBD率を、細胞質成熟の指標として、人

工受精を行って得た受精卵を D 型幼生まで飼育して正常発生率を、それぞれ調べた。RA アッセイには、3 段階の濃度 (1 μ M、0.1 μ M、0.01 μ M) を設定した。これらの率を比較して、①核成熟前 (GVBD 率と正常発生率がどちらも低い段階) ②核成熟後かつ細胞質成熟前 (GVBD 率は高いが正常発生率が低い段階) ③細胞質成熟後 (GVBD 率と正常発生率がどちらも高い段階) に成熟段階を分けて卵の試料を確保した。なお、各個体について生殖巣を採取して切片を作成したのちヘマトキシリン・エオシン染色を行って、組織学的観察により卵の放出が見られず産卵していないと考えられる個体の試料を以降の解析に用いた。

(2) 遺伝子カタログおよび質量分析データベースの構築

卵試料から RNA を抽出してロングリードシーケンスに供し、全長転写産物の配列データを取得して遺伝子カタログを作成した。また、この塩基配列を基に全転写産物の演繹アミノ酸配列を推定して質量分析データベースを構築した。これらの情報を基に配列相同性検索を行い、各配列に対してアノテーションを付与し、卵で発現している遺伝子およびタンパク質の種類を明らかにした。

(3) 卵成熟過程における遺伝子・タンパク質の網羅的発現解析

(1) で採取した各成熟段階の卵試料および D 型幼生試料から RNA およびタンパク質を抽出し、RNA-seq および質量分析に供して、(2) で作成した遺伝子および演繹アミノ酸配列データベースを基に、遺伝子・タンパク質それぞれの網羅的な発現量データを得た。得られたデータを用いて発現解析を実施し、異なる成熟段階で有意に発現量が変化する遺伝子およびタンパク質を特定した。以上の解析により、核成熟および細胞質成熟の完了に関与すると考えられる遺伝子・タンパク質の種類と量を調べた。

4. 研究成果

(1) GVBD 率および正常発生率に基づくタイラギ卵の成熟段階の決定

2021 年と 2022 年の 4 月から 7 月にかけて、合計 52 個体のタイラギを解剖して単離卵を得た。このうち、組織学的観察により卵の放出が見られなかった 36 個体について、3 段階の濃度で RA アッセイを実施して得られた GVBD 率と、人工受精により得られた正常発生率に基づいて階層的クラスタリング解析を行った。その結果、3 つのクラスター (クラスター A、B、C) に分けられた。クラスターごとの各数値の平均値を表 1 に示した。この結果から、クラスター A、B、C はそれぞれ①核成熟前、②核成熟後かつ細胞質成熟前、③細胞質成熟後に該当すると考えられ、タイラギにおいても脊椎動物と同様に卵成熟過程を核成熟と細胞質成熟に分けられる可能性が示された。

表 1. クラスターごとの GVBD 率および正常発生率 (平均値 \pm 標準偏差)

クラスター	BSS	GVBD率(%)			正常発生率(%) (正常幼生数/ 孵化幼生数)
		RA(μ M)			
		0.01	0.1	1.0	
A	3.3 \pm 1.6	42.1 \pm 9.7	3.6 \pm 3.1	3.0 \pm 2.0	53.9 \pm 13.3
B	3.2 \pm 1.5	74.8 \pm 14.3	17.2 \pm 16.7	6.7 \pm 8.1	50.0 \pm 21.7
C	4.4 \pm 2.9	85.7 \pm 9.0	72.4 \pm 14.1	14.2 \pm 16.0	79.0 \pm 15.5

(2) 遺伝子カタログおよび質量分析データベースの構築

ロングリードシーケンスにより、卵で発現している遺伝子のうち、23313 個の全長遺伝子配列カタログを得た。配列類似性検索の結果、得られた配列の 95%にアノテーションが付与された。タイラギのゲノム配列を併用してアイソフォーム検索を行った結果、本カタログは 6649 個の遺伝子から生じるスプライシングバリエーションによって構成されることがわかった。この塩基配列情報を基に演繹アミノ酸配列を推定して、質量分析データベースを構築した。

(3) 卵成熟過程における遺伝子・タンパク質の網羅的発現解析

(2) で構築した遺伝子カタログおよび質量分析データベースを用いて RNA-seq および質量分析を実施し、発現解析を行って (1) で分けたクラスター間で有意に発現変動する遺伝子およびタンパク質を明らかにした。各クラスター間で差のある遺伝子および分子の個数を図 1 に示した。

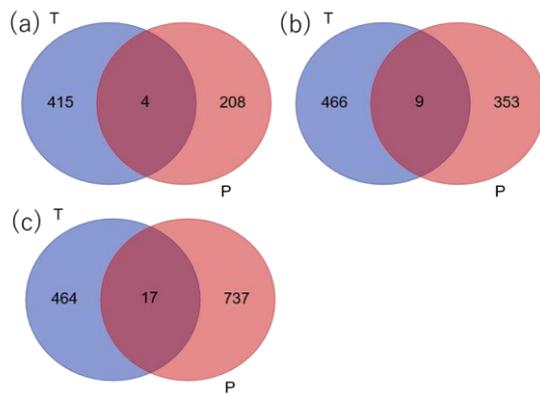


図 1. RNA-seq(T)および質量分析(P)で有意に発現変動が見られた遺伝子の個数
(a) クラスターA vs クラスターB
(b) クラスターB vs クラスターC
(c) クラスターA vs クラスターC

各クラスター間で有意に変動があったもの

のうち、遺伝子とタンパク質両方で共通の増減

を示した分子として、核成熟完了前後(A vs B)

では2つの分子が、細胞質成熟前後(B vs C)

では9つの分子が、核成熟完了前と細胞質成熟完

了後(A vs C)では8つの分子が見出された。こ

れらの分子には機能未知のものも含まれてい

たが、細胞骨格を構成する分子、細胞周期を調

節する分子、タンパク質分解に関与する分子、

および脂質代謝関連分子が含まれていた。特に、

核成熟完了前から細胞質成熟完了後にかけて

増加する分子として、ミトコンドリア型アルデ

ヒド脱水素酵素と 26S プロテアソームが特定さ

れた。前者は酸化ストレスに関与する分子であ

り、後者はユビキチン化されたタンパク質の分解酵素である。これらの分子のタンパク質量は D 型幼生になると減少する傾向にあり (図 2)、卵細胞に蓄積されたこれらの分子が幼生の発生に必要なである可能性が示唆された。

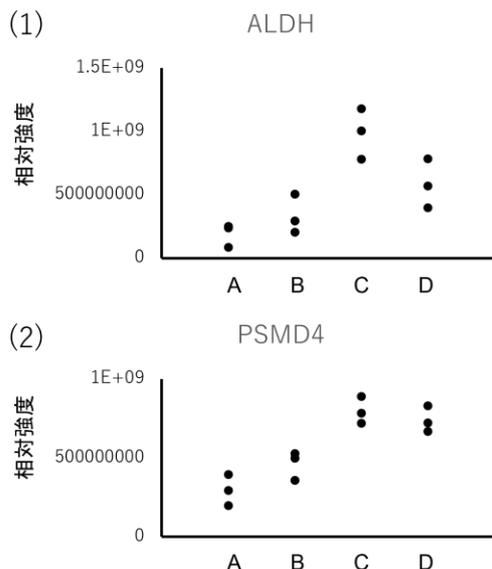


図 2. 質量分析で得られた各タンパク質の相対強度。(1) ミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素 (ALDH) (2) 26S プロテアソーム (PSMD4)。A: クラスターA、B: クラスターB、C: クラスターC、D: D 型幼生 (n = 3)

以上の結果から、本課題によりタイラギの卵の成熟段階を区別する指標となる分子が複数見出され、従来は生殖巣の切片観察のみで評価されていた成熟段階の評価方法に、新規の指標が導入できる可能性を示した。今後は本課題で特定された分子の成熟段階評価指標としての信頼性を確保するために、調査個体数を増やす必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirano-Maeda Yuki, Ojima Daisuke, Kanematsu Masaei	4. 巻 263
2. 論文標題 Molecular characterization of Vasa homolog in the pen shell <i>Atrina pectinata</i> : cDNA cloning and expression analysis during gonadal development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 110798 ~ 110798
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cbpb.2022.110798	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 舩山 翔平、前田 雪、淡路 雅彦、松本 才絵
2. 発表標題 タイラギのレチノイン酸合成酵素遺伝子の同定と発現解析
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------