

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：82708

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20601

研究課題名（和文）ウナギの卵形成における性成熟誘導ホルモンの機能解析：ホルモン特異的な作用の解明

研究課題名（英文）Functional analysis of sexual maturation-inducing hormones in oogenesis of Japanese eel

研究代表者

鈴木 博史（Suzuki, Hiroshi）

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(南勢)・任期付研究員

研究者番号：40909636

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ニホンウナギの性成熟誘導方法の違いが卵質と卵形成の進行速度に及ぼす影響を明らかにするため、異なる催熟方法で得られた異なる卵質の排卵卵と各発達段階の卵濾胞を解析した。排卵卵のメタボローム解析とトランスクリプトーム解析の結果、卵成熟過程において黄体形成ホルモンは、アミノ酸や糖の代謝経路と減数分裂やスプライソームに関わる遺伝子の発現を制御していると示唆された。加えて、これらの代謝経路と遺伝子発現は、卵質にも影響すると示唆された。また、性成熟誘導に用いるホルモンの種類に関わらず、卵形成の各発達段階で卵黄・油球取り込み関連遺伝子の発現に変動が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異なる催熟方法で得られた異なる卵質の排卵卵を解析した結果、卵成熟過程において黄体形成ホルモンは、アミノ酸や糖の代謝経路と卵母細胞の減数分裂やスプライソームに関わる遺伝子の発現を制御し、これらの代謝経路と遺伝子発現は卵質に関連することが示唆された。本研究で、卵質に関連した黄体形成ホルモンの作用を明らかにしたことは、学術的にも意義は大きい。また、これらの結果をもとに、ニホンウナギの性成熟誘導方法を最適化することで、ニホンウナギ人工種苗生産技術の確立に貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, ovulated eggs of different quality and follicles at each stage of oogenesis obtained by different maturation methods were analyzed to determine the effects of different methods of inducing sexual maturation in Japanese eels on egg quality and the progression of oogenesis. The results of metabolomic and transcriptomic analyses of eggs suggested that luteinizing hormone affects several metabolic pathways and the expression of genes involved in meiosis and spliceosomes, thereby affecting egg quality. Regardless of the hormones used to induce sexual maturation, the expression of genes related to yolk and oil globule uptake changed at each stage of oogenesis.

研究分野：魚類生殖生理

キーワード：ニホンウナギ 卵成長 卵成熟 生殖腺刺激ホルモン

1. 研究開始当初の背景

一般に魚類の卵形成は、脳下垂体から分泌される2種の生殖腺刺激ホルモン（Gths）である濾胞刺激ホルモン（Fsh）及び黄体形成ホルモン（Lh）によって制御されている。Fshは配偶子形成の初期に、Lhは最終成熟期に血中量が高まることが示されているが、2種Gthsの明確な作用の違いは分かっていない。

ニホンウナギ（*Anguilla japonica*）は、水産養殖業において重要な魚種であるが、天然資源の枯渇が危惧されており、安定した種苗生産技術の確立が望まれている。本種は飼育環境下では自然に生殖腺が発達しないため、サケ脳下垂体抽出物などに含まれる外因性のGthsを人為的に投与することで、性成熟を促すための研究が古くから展開されてきた。近年、ニホンウナギの組換えGthsとして、組換えFshとLhの作製に成功したことで、この2種組換えGthsを用いた人為催熟が可能となった。現在の人為催熟方法は、組換えFshを週1回複数回投与した個体に、黄体形成ホルモン放出ホルモンアナログ（LHRHa）およびピモジド（P：ドパミンD2受容体拮抗薬）を投与することにより内因性のLhの分泌を促し、24時間後に排卵を誘発するため17 α -ヒドロキシプロゲステロン（OHP）を投与することを基本としている（図1の方法）。しかし、採卵の成否や卵質（受精率・ふ化率・生残率）は安定しておらず、任意の雌から安定的に良質卵を確保できないことが課題となっている。

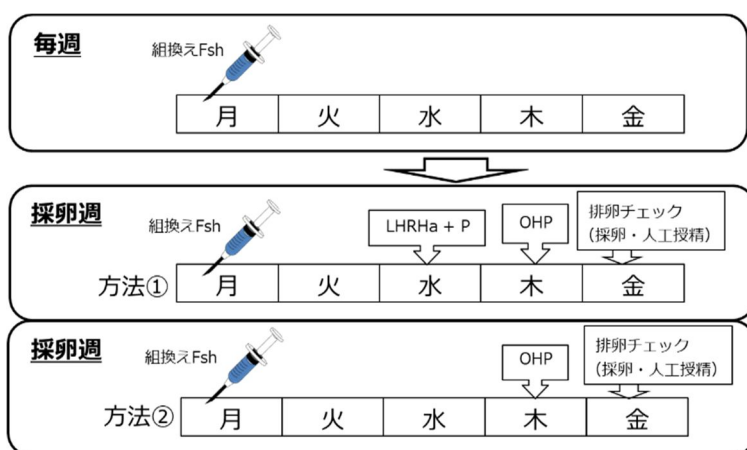


図1. 人為催熟方法

2. 研究の目的

これまでの研究成果より、組換えFshを投与した個体に、OHPのみを投与し、排卵させ（図1の方法）人工授精した卵のふ化率・生残率は、上記の組換えFsh、LHRHa + P、およびOHPを投与（図1の方法）により排卵させ、人工授精した卵よりも、有意に低い値を示すことが明らかとなっている。このことは、LHRHa + Pにより放出が誘導されるLhの特異的な作用が、受精後の発生や生残率に影響を及ぼしていることを示唆している。さらに、組換えLh投与個体の卵形成は、組換えFsh投与個体と比較し、概ね半分の投与期間で各発達段階に達し、組換えLhを投与することでおよそ倍の速さで性成熟を誘導できると明らかになった。したがって、卵形成過程においても組換えFshとLhの異なる作用が存在する可能性が高い。そこで本研究は、ニホンウナギの卵形成における組換えFshとLhの機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 卵内蓄積物の網羅解析

組換えFsh（0.5mg/kg-BW）を週1回、複数回投与することで雌ウナギを催熟した。組換えFsh投与の2日後（水曜日）卵母細胞の発達ステージを生検で確認し、卵母細胞が核移動期に達した個体を実験に使用した。この個体にLHRHa + P投与もしくは偽薬（コレステロールとジメチルスルホキシド）を投与し、翌日に排卵を誘発するためにOHPを投与した。OHP投与から14-22時間後に、腹部を圧迫することで、排卵卵を入手し、ガスクロマトグラフィー質量分析法によるメタボローム解析と次世代シーケンサーを用いたmRNAseq解析に供した。

一部の排卵卵を人工授精し、48穴マイクロプレートに受精卵を個別に収容し、卵質を評価した。

(2)卵形成過程における卵黄・油球取り込み関連遺伝子とステロイド合成酵素遺伝子の解析 卵形成過程における卵黄・油球取り込み関連遺伝子

組換え Fsh (0.5mg/kg-BW) もしくは組換え Lh (0.5mg/kg-BW) を週 1 回、複数回投与することで雌ウナギを催熟し、各発達過程 (前卵黄形成期、卵黄形成期初期・中期・後期、核移動期) の卵濾胞を生検にて単離した。この卵濾胞から RNA 抽出、続いて、逆転写を行い、cDNA を調整した。これらのサンプルで卵黄・油球取り込み関連遺伝子である、リポプロテインリパーゼ (*lpl*)、低密度リポプロテイン受容体 (*ldlr*)、ピテロジェニン受容体 (*vgr*) およびリポタンパク質関連タンパク 13 (*lrp13*) 遺伝子を単離し、各遺伝子の発現量をリアルタイム定量 PCR (qPCR) で測定した。

卵形成過程におけるステロイド合成酵素遺伝子

卵形成に重要なステロイドホルモンであるエストラジオール-17 β の合成に必要なステロイド合成酵素である 17 β -水酸基脱水素酵素タイプ 1 (*hsd17b1*)、タイプ 7 (*hsd17b7*)、タイプ 12 (*hsd17b12*) 遺伝子の各発達段階の卵濾胞における発現量を qPCR で測定した。続いて、各遺伝子の 5'隣接領域を単離し、転写制御因子の予測を行った。

4. 研究成果

(1)卵内蓄積物の網羅解析

卵質

図 1 の方法 で得られた卵の受精率、ふ化率、6 日齢仔魚生残率、6 日齢正常仔魚生残率は、図 1 の方法 で得られた卵の値と比較して、有意な低値を示した。従って、LHRHa + P により放出が誘導される Lh の特異的な作用が、受精と発生に重要であることが改めて確認できた。

異なる方法で得られた排卵卵の網羅解析

図 1 の方法 と方法 で得られた排卵卵をガスクロマトグラフ質量分析に供した結果、95 個の代謝物が検出され、方法 の群でピーク強度の高い代謝物が 3 個 ($p < 0.05$)、方法 の群でピーク強度の高い代謝物が 21 個であった ($p < 0.05$)。得られたデータをエンリッチメント解析に供したところ、ペントースリン酸経路、グルコース-アラニン回路およびグルタミン酸代謝経路が同定された ($p < 0.05$, FDR < 0.1)。このことから Lh は、これらの代謝経路に影響を及ぼすことが示唆された。

続いて、これら排卵卵から RNA を抽出し、mRNA 解析した結果、発現変動遺伝子として、方法 の排卵卵で発現量が多い遺伝子が 744 個 ($p < 0.05$, FDR < 0.1)、方法 の排卵卵で発現量が多い遺伝子が 232 個 ($p < 0.05$, FDR < 0.1) 同定された。本データを用いて京都遺伝子ゲノム百科事典解析に供したところ、方法 で得られた排卵卵では、方法 と比較し、細胞周期、卵母細胞減数分裂、スプライソームに関わる遺伝子の発現量が増加しており、これらの経路が活性化していることが示唆された。従って、方法 で生じる卵質低下の要因の 1 つとして、減数分裂やスプライソームに関わる遺伝子の発現が促進されてないことが影響していると示唆された。

(2)卵形成過程における卵黄・油球取り込み関連遺伝子とステロイド合成酵素遺伝子の解析

卵形成過程における卵黄・油球取り込み関連遺伝子

ニホンウナギ卵巣から *lpl type1* (*lpl1*)、*lpl type2* (*lpl2*)、*ldlr*、*vgr*、*lrp13* 遺伝子のコーディング領域を単離し、分子系統解析した結果、他の脊椎動物と同一のクラスターを形成したことから、それぞれニホンウナギ *lpl1*、*lpl2*、*ldlr*、*vgr*、*lrp13* 遺伝子であると示唆された。

組換え Fsh と Lh で催熟した個体の各発達過程の卵濾胞から cDNA を調整し、各遺伝子の発現量を qPCR で測定した結果、*lpl1* と *lpl2* 遺伝子の発現量は、卵黄形成期後期でピークを示した後、減少した。また、卵黄形成期後期と核移動期において、組換え Fsh 群の *lpl1* と *lpl2* 遺伝子の発現量は、組換え Lh 群と比較し、有意に高値を示した。*ldlr* 遺伝子の発現量は、卵黄形成期中期でピークを示し、*vgr* 遺伝子の発現量は、卵黄形成期初期に発現が若干高まり、減少する傾向を示した。一方、*lrp13* 遺伝子の発現量は、卵濾胞の発達に伴って減少した。以上の結果、組換え Fsh と組換え Lh は、*lpl1*、*lpl2*、*ldlr*、*vgr*、*lrp13* 遺伝子の発現を制御し、卵形成過程における油球と卵黄取り込みを制御していることが示唆された。

卵形成過程におけるステロイド合成酵素遺伝子

組換え Fsh と Lh で催熟した個体の各発達過程の卵濾胞から cDNA を調整し、各遺伝子の発現量を qPCR で測定した結果、*hsd17b1* 遺伝子は、卵巣発達に伴って発現量が変化した。一方で、*hsd17b7* と *hsd17b12a* 遺伝子は、各発達過程で一定の発現量を示した。3 種類の遺伝子の 5'隣接領域の転写制御因子の予測を行った結果、3 種類共にサイクリック AMP 応答配列、ステロイド産生因子 1 応答配列、アンドロゲン応答配列が認められた。以上の結果、ニホンウナギ卵巣において、組換え Fsh と Lh により誘導された卵濾胞の発達に伴って、*hsd17b1* 遺伝子の発現量が変化したことから、本酵素は卵巣発達の進行に関与していると示唆された。加えて、*Hsd17b7* と *Hsd17b12a* 遺伝子もまた、性ホルモン合成に関わる酵素であると示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 鈴木博史、尾崎雄一、風藤行紀
2. 発表標題 ニホンウナギ卵巣発達に伴う17 -水酸基脱水酵素遺伝子の発現変化
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022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
---------	---------