

ニホンウナギの卵質改善に向けた採卵適期推定の分子指標の同定

北海道大学大学院水産科学研究院

駿河谷 諒平

【概要】

ニホンウナギはホルモン注射により卵を得ているが、注射タイミングを誤ると、良質卵が得られない。現在、注射タイミングは、雌親魚の比体重、卵母細胞の卵径、油球融合の進行度、透明帯の幅などの指標をもとに決めるが、それでも安定的な採卵は難しい。排卵誘導の成功には、卵濾胞が「排卵能」を獲得していることが不可欠である。本研究では、最近注目されている多検体を低コストでRNA-Seq解析が可能なLow cost and easy RNA-Seq (Lasy-Seq)を用いて、排卵能獲得前後の卵濾胞における遺伝子発現を網羅的に解析し、採卵適期を推定可能な分子マーカーを同定する。また、排卵関連遺伝子の発現変化や、その転写制御機構を明らかにすることで、本種の排卵の分子メカニズムの理解を深める。これにより、ニホンウナギにおける高精度な採卵適期推定法の確立を目指す。

【結果】

① 採卵適期推定に利用できる分子マーカーの網羅的探索

まず、ニホンウナギ雌親魚10個体を人為催熟により排卵誘導を行ない、受精率、胚体形成率、孵化率、生残率(孵化後5日、14日、32日、60日)、奇形率を算出した。また各個体から、プライミング注射直前に8粒、プライミング注射24時間後に4粒をカニューレにより採取し、Total RNAを抽出した。計120サンプルのRNAを正確に同濃度に調製し、特異的なバーコーディングを付加したcDNAライブラリを作成した。その後、Lasy-Seq解析を行ない、卵濾胞120粒分のリードデータを得た。その後、これらリードデータをリファレンスにマッピングする予定であったが、我々が有するトランスクリプトームはマッピングするために必要な各転写産物の3'UTRの配列を大幅に欠いていることがわかった。そのため、新たにニホンウナギから、頭腎、精巢、卵巣、未分化生殖腺を採取し、これらのcDNAライブラリをSMART-Seq® mRNA Long Readキットにより構築した。今後は、Oxford Nanopore Technologies社のPromethIONによるロングリードシーケンスを行ない、このトランスクリプトームに対してLasy-Seq解析で得たリードデータをマッピングし、遺伝子の定量化を行う予定である。その結果をもとに、プライミング注射前後の卵濾胞における遺伝子発現が、受精後にどのような影響を与えるか調べ、採卵適期を正確に推定できる分子マーカーを同定する。

② ニホンウナギ卵濾胞における排卵関連遺伝子の発現解析

1. 核内プロゲスチン受容体 *pgr* の発現動態

脊椎動物では、核内プロゲスチン受容体 *pgr* がゲノミックな反応を引き起こし、排卵を誘起する。本研究では、排卵期のニホンウナギ卵濾胞における *pgr* の発現動態を調べた。まず、ニホンウナギ *pgr* をcDNAクローニングしたところ、他魚種とは異なり、2タイプの *pgr* を得た。そのうち、*pgr2*

はプライミング注射により発現が誘導された。また、組換え LH を添加して、卵濾胞を生体外培養すると、やはり *pgr2* の発現は亢進された。一方で、*in vivo* および *in vitro* ともに、*pgr1* では有意な発現消長はみられなかった。また、これら 2 種の *pgr* の 5' flanking region を単離し、レポーターベクターを構築した。このベクターを用いて、異種細胞培養系によるデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイを行なった。その結果、LH シグナルにより *pgr1* の転写活性は上昇しなかったが、*pgr2* の転写活性は上昇した。したがって、ニホンウナギにおいても、他の脊椎動物と同様に *pgr* が排卵を誘起することが示唆され、2 種の *pgr* のうち特に *pgr2* がその機能を担うことが推測された。

2. プロスタグランジン合成・受容系に関連する遺伝子の発現動態

脊椎動物では、プロスタグランジン (PG) が排卵誘起能を有することが古くから知られている。チヨウザメ類では、プロスタグランジン (PG) 合成酵素遺伝子 *ptgs2* が排卵能の獲得タイミングで発現量が増加し (Surugaya et al., 2022)、その後 PG 受容体の発現が高まることで排卵が成立することを明らかにしている。本研究では、ニホンウナギにおいても *ptgs2* および PG 受容体遺伝子の発現動態を調べた。その結果、*ptgs2* は個体によって発現するタイミングがさまざまであり、卵濾胞の多くが排卵能を獲得した個体では、*ptgs2* がプライミング注射により発現が高まった。一方で、排卵能を獲得した卵濾胞の割合が少ない個体では、*ptgs2* の発現は低調であった。また、PG 受容体のうち *ptger4b* は、排卵直前に発現が顕著に誘導された。また、生体外培養では、卵成熟誘起ステロイドである 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) 添加により、*ptger4b* の発現が増加することもわかった。また、異種細胞培養を用いた強制発現系により、*Ptger4b* のレポーターアッセイを行なったところ、PG のうち PGE₂ が最も受容体活性を上昇させることも明らかにした。以上より、ニホンウナギの排卵は、チヨウザメ類同様、PG 合成に始まり、その後 DHP の刺激により PG の受容系が活性化されることで排卵に至ると示唆された。一方で、PG 合成に関わる *ptgs2* の発現量やタイミングは、個体間で大きくバラついており、これが本種の排卵誘導の難しさを裏付けていると思われる。

【総括】

本研究では、ニホンウナギにおける採卵適期推定に資する分子基盤の解明を目的として解析を行った。トランスクリプトーム解析から、参照配列の不備が明らかとなり、ロングリード解析による再構築の必要性が示された。そのため、分子マーカーの同定には至らなかったが、現在は順調に解析を進めており、マーカー同定は目前である。また、核内プロゲスチン受容体 *pgr* のうち *pgr2* が LH に応答して発現し、排卵誘起に関与することが示唆された。さらに、*ptgs2* および *ptger4b* の発現解析から、PG 合成と DHP による PG 受容系の活性化が段階的に排卵を制御する可能性が示された。一方で、*ptgs2* の発現量およびタイミングは極めて個体差が大きく、排卵誘導の不安定性の要因と考えられた。以上より、ニホンウナギの排卵メカニズムの理解が大きく進展し、本種の安定的な大量種苗生産技術の確立への貢献することが期待される。