

## 論文の内容の要旨

氏名：喜納 泰斗

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源）

論文題名：アカエイ (*Hemitrygon akajei*) における子宮乳の成分とその合成機構の解明

アカエイは日本沿岸域に広く生息する胎生の板鰓類である。子宮を持ち、その中で孵化した胎仔を育てるが、胎仔がいる期間（以下、妊娠期間）、子宮内に「子宮乳」と呼ばれる栄養物を分泌するという特徴を持つ。このようなタイプの繁殖様式を示す板鰓類は「子宮乳型胎生板鰓類」と呼ばれ、子宮内に「栄養子宮絨毛」を発達させる。発達初期の胎仔は自らもつ外卵黄囊から栄養を吸収して成長するが、それが枯渇する頃になると栄養子宮絨毛から子宮乳が分泌され、これを摂取することで胎仔が急成長すると報告されている。

哺乳類と一部の鳥類が泌乳することはよく知られており、それらの乳成分や泌乳機構などに関する知見は集積されている。一方、子宮乳型板鰓類については、試料確保の困難さなどもあいまって研究が進んでおらず、その成分や泌乳機構の詳細は不明である。

本学位論文では、日本沿岸に生息するため釣獲しやすいアカエイを対象として、妊娠期間を通して①子宮乳成分ならびに②栄養子宮絨毛の組織構造と遺伝子発現の変化をそれぞれ追跡することにより子宮乳の意義とその分泌機構を明らかにするとともに、③泌乳を誘導する機構を解明することを目指した。

### 第一章 子宮乳成分の分析とその変化

アカエイ胎仔は子宮乳を摂取することで急激に成長することが知られている。しかし子宮乳の成分を詳細に分析した知見はなく、その役割については不明な点が多い。本章では、アカエイ子宮乳成分の解明のため、妊娠段階を初期、中期、後期に分け（各 n=3）、粗成分分析を行うとともに、タンパク質および脂質酸の組成を調べた。

粗成分分析の結果、タンパク質と脂質の濃度はともに妊娠初期で低く、妊娠中期に高値を示し、後期にやや減少することが分かった。妊娠中期には胎仔の卵黄が枯渇するため、それを補うように子宮乳のタンパク質と脂質の濃度が高くなり、胎仔に栄養として供給されると考えられた。

各妊娠段階の子宮乳から抽出したタンパク質を LC/MS/MS により解析したところ、全妊娠段階で Transferrin や Aconitase などの鉄関連、Immunoglobulin などの免疫関連タンパク質、エネルギー代謝に関連する酵素群が共通して検出された。妊娠初期には卵黄タンパク質であるビテロジェニンが検出され、中期では軟骨伸長に関わる成長因子が検出された。妊娠後期には細胞代謝系の酵素等が多く検出された。

妊娠初期の子宮乳の脂質含有量が極度に少なかったため、中期と後期の子宮乳から抽出した脂質をガスクロマトグラフィーに供し、脂肪酸を分析した。また、比較のために外卵黄の脂肪酸組成も併せて分析した。その結果、子宮乳の脂肪酸組成は時期による差はなく、一価不飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪酸、飽和脂肪酸の順に多かった。これは卵黄の脂肪酸組成と共通した傾向であったが、子宮乳には卵黄には含まれない C18:2 の脂肪酸が多く含まれていた。C18:2 は淡水硬骨魚で稚魚の発育を著しく促進させる脂肪酸として知られており、子宮乳を摂取したアカエイ胎仔の成長を支える物質である可能性がある。

以上のことから、子宮乳が（1）妊娠期間を通して免疫や鉄制御の機能を胎仔に与えること、（2）妊娠初期には栄養付与の機能は低いものの、卵黄と同じビテロジェニンを含んでおりある程度のサポートをしている可能性があること、および（3）卵黄が枯渇する中期以降には、多くのタンパク質・脂質を分泌して栄養として与え、骨の成長も促進することにより胎仔の成長をサポートすること、が示唆された。

## 第二章 栄養子宮絨毛の組織構造と遺伝子発現様式の変化

子宮乳型板鰓類で特異的に発達する栄養子宮絨毛について、その組織構造から機能が推測されている。しかし、妊娠期間を通した組織構造の変化や分子生物学的な知見はなく、栄養子宮絨毛の機能や乳合成能の有無については未解明である。本章では、妊娠段階に伴う栄養子宮絨毛の組織構造と遺伝子発現の詳細な変化を捉え、その機能を明らかにすることを目指した。

非妊娠期・各妊娠段階のアカエイから採取し（各  $n=3$ ）、固定処理および RNA 分解酵素阻害剤に浸した栄養子宮絨毛を用いて実験をおこなった。まず、絨毛の切片を染色して細胞形態および血管の分布を確かめるとともに、走査型電子顕微鏡で上皮表面の微細構造を観察した。その結果、栄養子宮絨毛の組織構造が妊娠段階に応じてダイナミックに変化することが判明した。非妊娠期では形が扁平で、一層の上皮細胞と繊維芽組織でできた内部構造を持つが、妊娠すると上皮細胞が多層化し、血管の網目構造が発達する。高濃度の乳を分泌する妊娠中期以降になると、血管が絨毛上皮の表面に露出して網目構造が顕著になる。この変化は血管表面積を広げ、ガス交換効率を上げて子宮内へ盛んに酸素供給するためであると考えられる。また陰窩に分泌細胞が発達し、分泌物様の物質が確認されたことから、陰窩から子宮乳が分泌されると示唆された。

各妊娠段階の栄養子宮絨毛から total RNA を抽出して RNA-Seq で遺伝子発現を解析した。得られたデータを主成分分析に供したところ、妊娠初期・中期と妊娠後期・非妊娠期の 2 群間にクラスター化した。この 2 群間での発現比較により妊娠初期・中期群で発現量が有意に多かった 3000 遺伝子をパスウェイ解析した結果、37 個の Pathway が活性化していることが判明した。この中には、アミノ酸とタンパク質合成や鉄輸送、脂質関連の経路が含まれていたことから、妊娠初期・中期には子宮絨毛での酸素供給効率を上げるとともに、子宮乳中の栄養の合成を活発にしていると示唆された。

栄養子宮絨毛で子宮乳含有脂肪酸が合成されるのかを検討するため、子宮乳に含まれる不飽和脂肪酸の合成関連因子の発現量を調べた。脂肪酸合成関連因子 (FASN, FADS1, 2, ELOVL1 および 2, SCD) の発現を定量 PCR 法により比較したところ、ELOVL2 以外の遺伝子が妊娠初期・中期に有意に上昇しており、栄養子宮絨毛が子宮乳含有脂肪酸を合成する機能をもつことが分かった。また、妊娠後期は非妊娠時と同程度の発現量であり、後期には子宮乳の合成が終了すると示唆された。続いて、栄養子宮絨毛での脂質の蓄積や分布を調べるため、脂肪染色を施した。非妊娠時では絨毛の外縁部を覆う一層の上皮細胞にのみ陽性反応が得られた。妊娠初期には多層化した上皮細胞全体に、さらに妊娠中期には組織全体で強い陽性反応がそれぞれ得られた。後期には中央にある血管付近の上皮組織のみで反応が観察された。

以上の結果は、妊娠時の栄養子宮絨毛の機能が妊娠段階により変化することを示唆している。すなわち、妊娠初期には子宮乳合成能が活発化し、脂質を細胞内に蓄積し始める。中期になると子宮乳の分泌・合成を行うとともに、盛んに酸素を子宮内の胎仔に供給するようになる。そして後期には、乳合成能は下がるものの絨毛に蓄積された乳を分泌する、という一連の流れがあると考えられた。

## 第三章 泌乳を誘導する機構の解明

哺乳類の泌乳はプロラクチンなどのホルモンの作用により誘発される。アカエイの栄養子宮絨毛は、子宮組織の一部でありながら泌乳するという、哺乳類でいうところの乳腺と子宮の両方の特徴を持つ組織であり、その発達や泌乳誘発因子は全くの不明である。本章では、アカエイの泌乳を誘発させる因子を特定することを目的とした。

まず、ホルモンによる影響を確かめるため、非妊娠期アカエイから採取した栄養子宮絨毛を培養組織し、これに各種ホルモンを添加した。プロゲステロン ( $P_4$ )、 $17\beta$ -エストラジオール ( $E_2$ )、ならびに妊娠アカエイ血清から抽出した 30kDa 以下のタンパク質のいずれかを添加した群と、これら全てを添加した群の計 4 群を設け、5 日間培養した（各  $n=3$ ）。培養後、それぞれの栄養子宮絨毛の組織観察および遺伝子発現定量 (FADS1 および 2) を行った。なお、FADS1 と 2 は子宮乳脂肪酸の合成に不可欠であり、妊娠初期・中期と非妊娠期で発現が顕著に異なる遺伝子であるため子宮乳合成のマーカー遺伝子として使用した。解析の結果、全ての群で子宮乳の合成の傾向は見られなかった。

次に、胎仔の発達による子宮内の内部圧力増加により、栄養子宮絨毛の発達と乳合成が誘発されるかを検討するための予備的実験をおこなった。非妊娠期の個体から摘出した子宮の両端（卵管側、総排出孔側）

をそれぞれ糸で縛り、子宮が張るまで培養液を注入して圧力をかけた群と、両端を縛らずに子宮内に圧がかからない程度に培養液を入れた Control 群をそれぞれ 5 日間培養した (各 n=2)。培養後、子宮を切開し、子宮壁の組織観察および FADS1 および 2 の発現定量を行った。組織学的には、両群ともに妊娠時のような栄養子宮絨毛の変化は見られなかった。しかし、FADS1 および 2 の発現量は圧力をかけた群で増加し、妊娠時に匹敵するほどの値を示した。このことから子宮内部の圧力が増大することが契機となり、子宮乳含有脂肪酸の合成が誘発されると示唆された。

## **総括**

本研究により、子宮乳型胎生板鰓類では、子宮内部の圧力により乳の合成が促され、妊娠段階によって胎仔の成長に合わせて栄養子宮絨毛の構造と機能が変化させながら胎仔の成長をサポートすることが明らかとなった。