

## 論文審査の結果の要旨

氏名：喜納 泰斗

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

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

審査委員：（主査） 教授 鈴木 美和

（副査） 教授 恒川 直樹

（副査） 教授 川井 泰

本学位論文は、未だ理解が進んでいない子宮乳型板鰓類の繁殖機構を解明するため、日本各地の沿岸で釣獲できるアカエイをモデル生物として選定し、子宮乳の成分を詳細に調べることによりその機能を推定し、栄養子宮絨毛が子宮乳を合成することを証明するとともに、子宮乳合成を促す因子を特定することを目指し、遂行された研究の成果をまとめたものである。

第1章では、子宮乳の機能を明らかにするために、妊娠したアカエイを①外卵黄嚢を有する胎仔をもつ妊娠初期、②外鰓や卵黄が退縮するが、体色が薄く、毒針が発達していない胎仔をもつ妊娠中期、③成体と同じ形態を呈する胎仔をもつ妊娠後期の3段階に分け、子宮乳の粗成分、タンパク質、脂肪酸組成を分析した。粗成分分析の結果、タンパク質と脂質の含量は初期に少なく、中期で最も高値を示し、後期でやや減少することが判明した。全固形分は後期で最も多く、乳糖は子宮乳に含まれないことも明らかとなった。子宮乳のタンパク質をLC-MS/MSにより網羅解析した結果、全妊娠段階に共通して抗菌作用や鉄の輸送、免疫に関わる物質と卵黄栄養物質が検出されたことから、基本的に胎仔の呼吸補助、免疫強化や栄養供給などの機能をもつと推測された。また、中期以降の子宮乳には脂質やコンドロイチンを輸送するタンパク質が含まれており、胎仔の成長や骨格形成を助けると示唆された。後期になると代謝系の酵素が多く含まれていたことから、子宮壁から脱落・崩壊した栄養子宮絨毛の細胞が子宮乳に含まれると考えられた。組成分析で脂質が検出された中期と後期の子宮乳に加えて、初期の胎仔がもつ外卵黄嚢中の卵黄を用いて、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸組成を解析した結果、中期と後期の子宮乳では組成が類似しており、卵黄とは異なることが判明した。すなわち、卵黄は胎仔の初期発達を、子宮乳は胎仔の急速な成長をそれぞれサポートすると推測される脂肪酸が多く含まれていた。以上のことから、妊娠初期の子宮乳は栄養的には乏しいものの、胎仔の発生、呼吸、免疫系の強化を促す役割をもち、中期以降になるとそれらの働きに加えて、豊富な脂質とタンパク質で胎仔の急成長と骨格形成を促進する役割を担うと示唆された。

第2章では、栄養子宮絨毛の子宮乳合成能の有無を確かめることを目指した。まず、非妊娠期、妊娠初期、中期、後期の栄養子宮絨毛を走査型電子顕微鏡下および各種染色を施した組織切片で観察し

たところ、非妊娠期では扁平な形をしており、組織は不定形な上皮細胞で構成されていた。また、わずかに脂質を蓄積し、粘液分泌が盛んであると推測された。妊娠初期になると、組織全体が肥厚し、陰窩が形成されて表面が網目状に見えるように変化した。末梢血管が絨毛表面に向かって伸長し、血管を基底として脂質を含む円柱上皮細胞が多く観察されるようになった。妊娠中期になると、絨毛全体がやや収縮し、末梢血管の先端では上皮細胞が消失し、血管が露出した。陰窩は初期より浅くなるが、脂質を含む円柱上皮細胞がさらに肥厚し、顆粒状の物質が細胞内外に出現した。後期には絨毛組織全体が収縮し、上皮細胞が崩壊している様子が観察された。次に、各段階の栄養子宮絨毛を用いてRNA-seqを行い、遺伝子発現動態を調べた。発現遺伝子の類似性を分析したところ、妊娠初期・中期と妊娠後期・非妊娠期の2群にクラスター化された。この2群間で発現量に差がある遺伝子に対してパスウェイ解析をした結果、妊娠初期・中期の栄養子宮絨毛では、輸送因子を含む抗生物質合成経路、ならびに、アミノ酸、タンパク質、脂質の各合成経路が強化されていたことから、栄養子宮絨毛が子宮内への酸素供給や子宮乳の合成を担っていることが示唆された。さらに、子宮乳に含まれている脂肪酸合成や不飽和脂肪酸の代謝などに関連すると考えられる遺伝子群の発現を定量PCRにより解析した結果、妊娠初期と中期で有意に上昇していたことから、栄養子宮絨毛が子宮乳中の脂肪酸も合成すると推測された。妊娠後期では、これらの遺伝子の発現量が非妊娠期と同程度まで減少したため、後期には子宮乳合成が停止すると示唆された。以上の結果から、栄養子宮絨毛は、非妊娠時には粘液のみを分泌し、妊娠初期になると子宮乳合成を開始して細胞内に脂質を蓄積し始め、妊娠中期には子宮乳を盛んに合成してそれを分泌するようになり、後期になると子宮乳合成を停止し、上皮細胞を脱落させて子宮乳として与えると示唆された。また、妊娠時に見られた栄養子宮絨毛での末梢血管の伸長や露出、鉄関連遺伝子の発現上昇は、妊娠時に絨毛を介して子宮内への酸素供給が強化されることを示唆している。

第3章では、栄養子宮絨毛での子宮乳合成を誘導する因子を解明するため、(1) 泌乳ホルモンにより子宮乳合成が誘導される、および(2) 排卵により子宮内の圧力が増加することによって子宮乳合成が誘導される、という2つの仮説を立て、これらの真偽を検証した。まず泌乳ホルモンによる誘導仮説を検証するため、子宮乳合成が開始される妊娠初期に血中濃度が有意に上昇するホルモンを探索したが、該当するものは確認できなかった。また、妊娠初期に栄養子宮絨毛で有意に発現上昇するホルモン受容体も探索したが、同じく確認できなかった。さらに、栄養子宮絨毛での子宮乳合成に対するホルモンの影響を確かめるために、非妊娠期の栄養子宮絨毛に哺乳類の泌乳に関与する各種ホルモンを添加して組織培養したが、組織構造や子宮乳合成に関連すると考えられる遺伝子群の発現量に変化は認められなかった。続いて、子宮内圧力による子宮乳合成誘導仮説を立証するために、非妊娠時の子宮を摘出し、卵管側と総排出孔側を糸で縛り、子宮が張るまで培養液を注入した状態で器官培養を行った結果、第2章で妊娠時の栄養子宮絨毛に見られたものと似た組織学的な変化に加えて、妊娠および泌乳のマーカー遺伝子の有意な上昇が観察された。これらのことから、アカエイにおける泌乳は、ホルモンでなく、おそらく排卵による子宮内の内部圧力の増加により誘導される可能性が高いと結論づけた。

以上の通り、本研究において、アカエイの子宮乳について、合成の誘導機構、栄養子宮絨毛での合成およびその機能について、新しい知見が得られた。子宮乳型板鰓類にはアカエイ科、トビエイ科、ウスエイ科が属し、彼らは板鰓類のなかでも繁殖戦略的に成功しているグループであると言われている。本研究で得られた知見から、彼らは子宮乳を合成、分泌して胎仔を急成長させることで、出生後の稚魚の生存率を高めることに成功したと考えられる。また近年、卵食型に分類されている胎生板鰓類であるホホジロザメ (*Carcharodon carcharias*) が、妊娠初期に子宮乳を分泌して胎仔に与えることが新たに発見された。この知見は、現在は子宮乳型に分類されていない種においても、胎仔が母体から子宮乳を

受け取る段階をもつことを示唆している。本研究で得られた知見は、子宮乳型板鰓類のみならず、他の繁殖様式を持つ板鰓類の繁殖機構の解明にも役立つものとなると考える。

世界中で板鰓類の資源量は減少しており、そのうちの多くの種が絶滅の危機にある。そのため、板鰓類の保全を目指して、国内外の水族館や研究者が繁殖や研究に力を注いでいる。板鰓類には卵生種と胎生種が存在するが、胎生種は胎仔が子宮内で成長するため、人工的な繁殖は困難である。また、水族館において、早期出産により胎仔が死亡するケースも見られている。胎生板鰓類の保護・繁殖を目的として人工子宮装置も作製されたが、卵黄依存型の胎生板鰓類 1 種のみで発育に成功したにとどまっており、母体栄養依存型の胎生板鰓類には適用できていない。彼らの人工繁殖が困難な理由のひとつとして、胎仔の成長に必要な栄養成分が不明であることが挙げられる。今後、胎仔が子宮乳を摂取する方法や、子宮乳中のタンパク質や脂質をどの程度利用しているのかという点について明らかにする必要があるが、本研究において、母体栄養依存型の胎生板鰓類における子宮乳成分の詳細が明らかにされ、胎仔の成長に必要な栄養に関する情報が得られた。この知見は板鰓類の保全に繋がるものと期待される。また、栄養子宮絨毛で子宮乳を合成していることや、その合成開始が排卵に伴う物理的な刺激によって誘導されることなど、価値のある新知見を提示した本研究は、古い時代に出現し、今なお繁栄を続けている板鰓類が進化の過程で獲得した繁殖機構について、基礎知見の集積に貢献し、新たな研究展開をもたらすものと判断する。

よって本論文は、博士（生物資源科学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和 4 年 2 月 22 日