

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

生物資源科学研究科

喜納 泰斗

2021

目次

緒言	1p
第1章 子宮乳成分の分析とその変化	4p
第2章 栄養子宮絨毛の組織構造と遺伝子発現様式の変化	33p
第3章 泌乳を誘導する機構の解明	80p
総合考察	100p
参考文献	105p

緒言

IUCN (International Union for Conservation of Nature)に登録された1200種の板鰐類(サメ・エイ)のうち、約37%にあたる446種はレッドリストに記載されており(<https://www.iucnredlist.org/ja>)、絶滅が危ぶまれている。板鰐類の保全を目指して、多くの国内外の水族館は繁殖や研究に力を入れている。

胎生種型の板鰐類の繁殖様式は、胎仔が自らの外卵黄嚢の栄養のみで成長する「卵黄依存型胎生」と、外卵黄嚢に加えて母体から供給される栄養を吸収し成長する「母体依存型胎生」とに大別される(Hamlett et al. 2005)。後者については、母体からの栄養供給方法によってさらに胎盤型、卵食・共食い型、子宮乳型(脂質組織栄養型)の3タイプに分けられ、胎仔が卵黄の栄養を吸収し終わった後の発育の仕方がタイプごとに異なる。すなわち、胎盤型にはメジロザメ(*Carcharhinus plumbeus*)などの種が含まれ、外卵黄嚢が母体に接着し、哺乳類のように胎盤を形成して母体から栄養が供給される。卵食・共食い型にはホホジロザメ(*Carcharodon carcharias*)などが知られており、胎仔が母体から供給される栄養卵、もしくは子宮内の他の胎仔を食す。子宮乳型としてはアカエイ(*Hemitrygon akajei*)などの種が挙げられ、母体の子宮内壁から供給される乳様物質を胎仔が摂取する、という方法でそれぞれ発育する(Hamlett et al. 2005)。

子宮乳型板鰐類の子宮壁は「栄養子宮絨毛」と呼ばれる特徴的な組織で

覆われている (Wood-Mason and Alcock 1891)). 栄養子宮絨毛は直径約 1.5cm で基部は細く、先端はへら状の糸状突起である (Hamlett et al. 1996)

組織学的研究により無数の脂肪滴のような像が観察されたことから、子宮乳は栄養子宮絨毛から分泌されると示唆された (Hamlett et al 1996)。胎生板鰓類の妊娠期間が一般的には約 1 年であるのに対して (Hamlett et al. 1993, Carrier et al. 2004)、子宮乳型の場合は約 3 カ月と非常に短く、この妊娠期間の短さは、胎仔が子宮乳を摂取して急成長することに関連しているとされている (Ranzi 1934, Hurumitsu et al. 2020)。しかし、子宮乳の成分や機能についての知見は少なく、また、子宮乳が栄養子宮絨毛で合成されることを分子学的に追求した知見もなく、どのような機構で合成が開始されるのかも明らかにはされていない。

また近年、卵食型の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、胎仔に付与することが新たに発見された (Sato et al. 2016)。この知見は、子宮乳型に分類されていない種においても、卵黄と次の栄養転換の間などに母体から子宮乳を受け取っている可能性を示すものである。さらに、子宮乳型板鰓類は、他のタイプの繁殖様式をもつグループと比べて出生率が高く、繁殖戦略的に成功した群であると認識されている (Hamlett et al. 1996, Hurumitsu et al. 2020)。実際に、IUCN に登録された 1200 種の胎生板鰓類のうち、半数以上は胎仔が母親から栄養供給を受けて成長する母体依存型胎生である。

以上を踏まえると、母体依存型胎生種の繁殖機構の理解は、板鰓類の保全の観点からも重要な役割をもつものであると考える

本研究は、日本沿岸に広く分布しており、比較的容易に釣獲できるアカエイを子宮型板鰓類のモデルとして、その繁殖機構を詳細かつ包括的に解明することを目指した。具体的には、子宮乳の成分を妊娠段階ごとに分けて分析することで子宮乳の機能とその変遷を推測するとともに、栄養子宮絨毛における子宮乳の合成の有無やその他の機能を明らかにし、さらには泌乳を誘導する仕組みを明らかにするための研究に取り組んだ。

第 1 章

子宮乳成分の分析とその変化

緒言

板鰓類の繁殖様式は多様であり、まず卵生種と胎生種に別れ、胎生種はさらに卵黄依存型と母体依存型に別れる。卵黄依存型の胎生種は、卵黄の栄養吸収のみで成長するのに対し、母体依存型の胎生種は卵黄吸収後に追加で母体から供給される栄養を吸収し成長する。母体依存型は母体からの栄養供給方法によりさらに繁殖様式が別れる。母体依存型に属す子宮乳型は子宮内に子宮乳を分泌し胎子を育てる

子宮乳型板鰓類の外卵黄嚢と外鰓を持った発達初期の胎子は、子宮乳を外鰓を介して吸収し (Hamlett et al.1985)、卵黄がなくなった発達後期の胎子は子宮乳を経口摂取する可能性がある (Ranzi 1934, Hamlett et al.1996a)。子宮乳型胎生種において、子宮乳を摂取すると胎子の体重が飛躍的に増加することが知られている。例えば、出産直前の胎子の体重は、*Rhinoptera bonasus* と *Hypanus americanus* では、それぞれ卵黄を含む初期胎子の体重の 30 倍と 37.5 倍になる (Babel 1934, Hamlett et al. 1985b, 1996a)。また、子宮乳型胎生種の妊娠期間は一般的に非常に短い (Ranzi 1934)。例えば、*Myliobatis bovina* の妊娠期間は 4 ヶ月、*Urolophus halleri* では 3 ヶ月、*Pteroplatytrygon violacea* ではわずか 2 ヶ月である (Babel 1967)。逆に、他のタイプの胎生板鰓類では妊娠期間は通常 10~12 ヶ月間

である (Hamlett et al. 1993, Carrier et al. 2004). 妊娠期間の長さは母親のエネルギー投資の兼ね合いを反映していることにも留意すべきであり (Hamlett et al. 2005), ナンヨウマンタ (*Manta alfredi*) のような大型の子宮乳型板鰐類のように期間が例外的に長い種もいるが (Marshall & Bennett 2010, Murakumo et al. 2020), 子宮乳型において、短い妊娠期間で胎児が急成長するのは主に乳の利用によるものであると考えられる.

哺乳類では母乳は初乳と成乳に区別される。初乳は授乳のごく初期に分泌される乳と定義され、タンパク質や免疫物質が豊富に含まれている (Macy 1949)。成乳は、タンパク質に加えて脂質が豊富で、新生児の成長を促す作用をもつ (Hamosh 2001, Ballard & Morrow 2013)。一方、胎生板鰐類の子宮乳の成分や役割が妊娠中に同様に変化するかどうかは不明である。

子宮乳にはタンパク質と脂質が豊富に含まれていることが知られているが含まれていることが知られ (Hamlett et al. 1996a, Colonello et al. 2013, Soma et al. 2013)、子宮乳の組成に関する知見としては、Jenness (1974a) が *P. violacea* の子宮乳から有機物質を検出したことや Hamlette et al. 2005 が *H. americanus*、*R. bonasus*、*urobatis jamaicensis* の子宮乳中のタンパク質濃度がそれぞれ 20.6 mg/mL、103.2 mg/mL、1.2 mg/mL であったことをそれぞれ報告しているに留まっている。また、妊娠期間を通した成分の変化に関する知見はない。子宮乳の役割を明らかにするため

には、子宮乳成分について、包括的かつ長期的な分析が必要である。

本研究では、胎仔の成長における子宮乳の役割を推定するために、妊娠期間中のアカエイの子宮乳の組成とタンパク質および脂肪酸プロファイルの詳細を分析した。

材料と方法

試料

神奈川県藤沢市の境川で、2018~2021年の6~8月に釣獲した妊娠したメスのアカエイ (*Hemistrygon akajei*) 9匹について、苦痛を受ける時間をできるかぎり短くするために延髄を切断して即殺した後、子宮を摘出して切開し、子宮乳と胎仔を採取した。胎仔の体長と体盤幅をその場で測定した。栄養子宮絨毛から滲み出た子宮乳を、シリンジ（テルモ、東京、日本）を用いてすくい取った。マイクロチューブに分注し、分析まで-80℃で保存した。

妊娠段階の決定

発達初期、中期、後期のいずれかの胎仔を持つ、母体をそれぞれ妊娠段階とした。胎仔の成長段階は、体盤幅、卵黄囊、尾棘、体色などの形態的特徴によって、3つの段階（初期、中期、後期）に分けられた（[図1](#)）。

発達初期の胎仔は、体盤幅が5cm以下で、体色は半透明か白色を呈す。直径が体盤幅の半径以下の大きさの外卵黄囊を持ち、鰓孔から糸状突起

(外鰓)が出る。また、尾部に棘は無い。中期の胎仔は、体盤幅が 5~9cm で、白または灰色がかかった体色を持つ。外卵黄嚢は体盤幅の半分以下に縮小しており、外鰓も持たない。尾部には発達過程にある棘を持つ。

後期になると、体盤幅は 10cm 以上になる。胎仔の形態や体色は成体と同様になり、尾部の棘が発達する。これらの初期、中期、後期の胎仔の成長段階は古満ら (2019) が定義したアカエイに関するカテゴリーでは、それぞれ e-f、g-h、i 段階に相当する。

粗成分分析

妊娠期間中の子宮乳の粗成分とその変化を明らかにするために、全タンパク質、全脂質、全固形分、水、乳糖の含有量を分析した (n=3)。

子宮乳の各サンプルの総タンパク質濃度は、Bradford protein assay (Bradford, 1976) を用いて標準的な方法で測定した (Ernst & Zor, 2010)。タンパク質濃度の測定には、Protein assay dye reagent (BioRad, Hercules, CA, USA) を使用した。

子宮乳中の総脂質量を分析するために、Bligh-Dyer 抽出法 (Bligh, 1959) を用いて、1ml の子宮乳から脂質を抽出した。その後、エーテルを気化させ、乾固物を秤量して総脂質量を算出した。

全固形分は、凍結乾燥した子宮体液 1ml を秤量して全固形分とし、水分量は、1ml の子宮乳の乾燥前の重量から全固形分を差し引くことで算出した。子宮乳中の全ラクトースは、F-kit Lactose/D-galactose (J.K.

International, Tokyo, 日本) を用いて測定した。

子宮乳含有タンパク質の解析

子宮乳のタンパク質の特性を明らかにするために、SDS-PAGE と LC/MS/MS を用いたプロテオミクス解析を行った。希釈した妊娠初期、中期、後期の子宮乳を、20%DTT を含む 4×Laemmli SDS サンプルバッファー (Bio-Rad) と混合し、100℃で 5 分間加熱した。

得られた試料をタンパク質濃度 3μg になるよう、5-20%ポリアクリルアミドゲル (和光、大阪、日本) の各レーンにアプライし、20mA で 40 分間電気泳動した。その後、Silver Stain MS Kit (和光) を用いて、ゲルを銀染色した。サンプルは SDS-PAGE を行ったところ、すべての期間で非常によく似たバンドパターンが観察された (図 2)。

LC/MS/MS によるプロテオーム解析は、主に Miyabe et al. (2015) に従った。染色によって可視化された、各試料をアプライしたレーンをそれぞれ、清潔な刃(フェザー、大阪、日本) を用いて切り出し、その後、上から 6 mm 間隔でさらに切り分けた。各ゲル片を 1.5 ml チューブに移し、脱色液 (15 mM K3 (Fe)) を入れ、ゲルが透明になるまでインキュベートした。その後、25mM NH₄HCO₃ (Ambic) に溶解した 10mM DTT とゲル片を 56℃で 1 時間インキュベートし、ジスルフィド結合を解離させた。その後、2-ヨードアセトアミド (25mM Ambic) を用いて、室温で 45 分間、遮光しながらアルキル化を行った。50%アセトニトリルで洗浄した後、ゲル片を真

空乾燥機 (Taitec, Saitama, Japan) で乾燥させた。次に、ゲル内消化として $30\ \mu\text{l}$ のトリプシン溶液 ($10\ \mu\text{g/ml}$, $50\ \text{mM}$ Ambic) を乾燥したゲルに加え、 37°C で一晩インキュベートした。ペプチド抽出液 (50%アセトニトリル、5%トリフルオロ酢酸) を用いてペプチドを抽出し、真空乾燥機で乾燥させた。ペプチド残渣を 0.1%ギ酸に溶解し、LC/MS/MS 分析に供した。

Exactive™質量分析計 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) は、キャプティブ・スプレー・イオン化を備え、Avance UHPLC システム (Michrom Biorources, Auburn) とオンラインで接続されている。これを用いて分析した。ペプチド溶液はオートサンプラー (HTCPAL system, CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) を用いて、分析カラムにロードした。1 マイクロリットルのペプチド抽出サンプル 1 マイクロリットルを C8 カートリッジ (Peptide Captrap, Michrom Bioresources 社) に移し、溶出したペプチドを分析カラム (L-column) に移した。分析カラム (L-column 2 Micro C18, $0.2\ \text{mm} \times 50\ \text{mm}$, 独立行政法人化学物質評価研究機構, 東京, 日本) に切り替えバルブを用いて分析カラム (L-column 2 Micro C18, $0.2\ \text{mm} \times 50\ \text{mm}$, Chemical Evaluation and Research Institute, Tokyo, Japan) に移した。0.1%のギ酸で最初の洗浄を行った後、ペプチドを溶出した。アセトニトリル (5~65%) の直線的な勾配で 30 分かけて溶出した。溶出液は直接イオン化され、質量分析計にかけられた。自動ピーク認識、ダイナミックエクスクルージョン Xcalibur ソフトウェア (Thermo Fisher

Scientific) を用いて、最も強い 10 個のイオンの自動ピーク認識、ダイナミックエクスクルージョン、ドーターイオンスキャンを行った。スペクトルは、350-2000 質量単位のスペクトル範囲で収集された。取得したスペクトルデータは、Proteome Discoverer 2.5 (Thermo Fisher Scientific) の SequestHT および percolator を用いて解析し、ペプチド配列を決定した。得られたすべての配列はアカエイ (*Hemitrygon akajei*) のゲノムデータベースのアミノ酸配列で検索した。

子宮乳含有脂肪酸の分析

妊娠中期、後期の子宮乳および卵黄の脂肪酸組成を測定した（各期とも $n=3$ ）。妊娠初期の子宮乳の脂肪酸組成は、脂質含有量が非常に少なく、分析できなかった。全脂質の抽出は Bligh and Dyer 法 (Bligh, 1959) を用いて、各子宮乳サンプル 1ml から全脂質を抽出した。

抽出された脂質は、市販のキット (Shinwa DS-TG, Shinwa Chemical Industries, Kyoto, Japan) を用いてメチルエステル化した。得られた生成物 $5\mu\text{l}$ をガスクロマトグラフィーのシリコーンカラム (Shinchrom E71, 島津製作所, 日本, 京都) に $5\mu\text{l}$ を投入した。キャリアガスには窒素を用い、 $40\text{ml}/\text{min}$ の流量で行った。カラムの初期温度は 230°C 、注入温度は 250°C 、検出器温度は 250°C であった。検出された各脂肪酸は、標準脂肪酸 (GL science, Tokyo, Japan) の保持時間と比較して同定し、ピーク面積から濃度を算出した。ピーク面積から算出した各脂肪酸濃度の差を、妊

娠中期と後期で統計的に検定した。スチューデントの t-テストにより、妊娠中期と妊娠後期の間で統計的に検定した。

結果

粗成分分析

子宮乳の粘度と色は、妊娠期間中に変化した (図 3)。妊娠初期の子宮乳は非粘性、半透明、黄色であった。中期の子宮乳は乳白色～黄色になり、粘性が増した。妊娠後期になると、子宮体液の粘度はさらに高まり、乳白色となった。

各妊娠期間における子宮乳の粗成分を表 1 に示す。子宮乳に含まれる成分の比率は、妊娠段階とともに変化した。平均タンパク質濃度は、 $2.4 \pm 0.4\%$ (平均 \pm S.E.、 $n=3$) から $6.1 \pm 3.3\%$ までの範囲で、妊娠中期に最も高い比率となった。

脂質は $0.9 \pm 0.2\%$ から $11.7 \pm 0.9\%$ と大きく変化し、妊娠中期に最も高い値を示した。乳糖は全段階で検出されなかった。全固形分は $7.3 \pm 2.0\%$ から $24.0 \pm 5.9\%$ まで変化し、中期と後期で比較的高い比率を示した。水分量は、妊娠初期に最も多く $76.0 \pm 1.6\%$ から $92.7 \pm 2.0\%$ の範囲であった (表 1)。

子宮乳含有のタンパク質の解析

図 2 に示すように、SDS-PAGE で可視化した子宮乳から検出されたバンドのパターンは、妊娠期間によって異なっていた。

各妊娠段階の子宮乳の可視化されたバンドを、それぞれレーン毎に LC/MS/MS で分析したところ、アカエイゲノムに登録されたタンパク質と相同的な配列を持つタンパク質が妊娠初期子宮乳から 806 種、中期から 1523 種、後期から 2076 種検出された。妊娠初期で検出されたタンパク質は 806 種すべてが中期と、759 種が後期と共通しており、中期と後期では 1265 種が共通していた。また、すべての妊娠段階を通して共通して検出されたタンパク質は 706 種あった (図 4)。検出されたタンパク質の中で胎仔の成長に関わりを持ちそうなものを、代表的なタンパク質として表 2 および、3 に記載した。

全妊娠段階で共通するタンパク質としては、抗菌作用のある Serotransferrin A、細胞質の鉄分濃度を調整する Cytoplasmic aconitate hydratase、脂質代謝を促す perilipin-3 isoform 1、卵黄タンパク質として知られる Vitellogenin や、ATP synthase subunit beta, mitochondrial, NADP-dependent malic enzyme, mitochondrial, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform, pyruvate carboxylase, mitochondrial, malate dehydrogenase, mitochondrial isoform 1 などの中枢代謝に関わる酵素が多数検出された (表 2)。

妊娠中期には、脂質を輸送する Apolipoprotein E や抗菌作用を持つ

Lysozyme g-like protein 2 が検出された。妊娠後期には、Dehydrogenase/reductase, , DNA polymerase beta, Ras-related protein Rab-11A isoform 1, NADH-cytochrome b5 reductase 1, Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4 など他の段階より多くの細胞内代謝酵素が検出された。中期と後期で共通するタンパク質としては、他の妊娠段階で検出されたのとは異なる型の Apolipoprotein B や SerotransferrinB やコンドロイチン硫酸を輸送・蓄積をする Chondroitin sulfate proteoglycan 4 が検出された(表 3)。

子宮乳含有脂肪酸の分析

脂肪酸分析は、初期胎仔から採取した卵黄、妊娠中期および後期の子宮乳のみで行われた (各 n=3)。子宮乳中の脂肪酸組成比は、これらの妊娠期間の間に明瞭な違いは見られなかった (表 4)。飽和脂肪酸 (SFA) として C12:0、C14:0、C16:0、C18:0、C20:0 が検出された。一価不飽和脂肪酸 (MUFA) は C16:1 と C18:1 が検出され、多価不飽和脂肪酸 (PUFA) として C16:2、C18:2、C18:3、C20:4、C20:5、C22:6 検出された。これらのうち、C16:0、C16:1、C18:1、C18:2 が比較的多く検出された。妊娠中期と後期の平均値では、SFA、MUFA、PUFA が子宮乳中の全脂肪酸の約 25%、44%、28%を占めた。また、妊娠中期と後期では、各脂肪酸濃度に有意な差はなかった。

卵黄の脂肪酸は、PUFA (42%)、SFA (34%)、MUFA(24%)の順で多く検出

された。また、子宮乳と同様の脂肪酸が検出されたが、それらのうち C22:6 が特に多く含まれていた。

考察

本研究では、アカエイの子宮乳の詳細な組成と妊娠期間中の変化を包括的に明らかにした。子宮乳は、後述するように、子宮内での胎仔の迅速かつ健康的な成長を促進・サポートする可能性を示唆している。

子宮乳を分泌する板鰓類の仲間には、これまでもいくつかの分泌パターンが観察されている。アカエイは妊娠期間を通して子宮乳を分泌しているが、lamniform shark は妊娠期間の初期のみに分泌する (Sato et al. 2016)。しかしながら、妊娠期間中の子宮乳成分の変化に着目した研究はこれまでになかった。本研究で明らかになったように、アカエイの子宮乳の成分は妊娠期間に応じて変化していた。妊娠初期の子宮乳は、脂質の含有量が少なく、タンパク質や全固形分の濃度も低いため、発達初期の胎仔の主な栄養源になるとは考えにくい。発達初期の胎仔は、まだ卵黄嚢を持っているため、他の板鰓類と同様にそちらの栄養に依存していると考えられる。それにもかかわらず、タンパク質の含有量は 2.4%あり、授乳初期のヒトの乳汁に匹敵するものであった。(Macy, 1949, Jenness, 1974b)。 *P. violacea*, *Rhizoprionodon terraenovae*, *Myliobato* sp. では、発達初期の胎仔が外鰓を介して子宮乳中のタンパク質を吸収する可能性がある (Gudger 1912, Ranzi 1934, Hamlett et al. 1985a, Hamlett et al. 1996b)。このことから、発達初期のアカエイの胎仔も子宮乳中のタンパク質／ペプチドを外鰓から吸収することも充分考えられる。しかし、この可能性を検証するにはさらなる研究が必要である。この可能性を検証するには、例え

ば、蛍光標識タンパク質を投与して標識したタンパク質を母体外で人工的に飼育した初期胎仔に投与した後、外鰓を蛍光顕微鏡で観察するなどして、この可能性を検証する必要がある。

子宮乳の成分は、妊娠中期から後期にかけて劇的に変化し、たんぱく質、脂質、全固形分の含有量が増加する。中期の子宮乳は、油滴のような挙動を示したが、これは脂質が多く含まれているためであり、委縮した卵黄嚢を持つ中期胎仔の主な栄養源になると考えられる。そのため、子宮乳中のタンパク質と脂質の含有量は妊娠中期に最も多く、これらの含有量はアカエイにとって胎仔の形態形成に必要な成分であることが示唆された。胎盤型胎生板鰓類では、胎盤の形成は卵黄嚢の萎縮に続いて起こる (Mahadevan 1940, Duncan & Holland 2006)。したがって、卵黄嚢の萎縮は、母体から胎仔への栄養供給方法を切り替えるきっかけになる可能性がある。これらのタンパク質と脂質の含有量は妊娠後期になっても、比較的豊富である。板鰓類の胎仔は、生後数日間は餌を食べないとされており、肝臓に蓄積された栄養分に依存している可能性がある (Gudger 1912, Hussey et al. 2010)。実際、出産直後の *R. bonasus* の仔魚は、体内で激しい栄養の異化作用を示す。これは、急速な成長を可能にするために体内の蓄えを最初に使用したことを裏付けている (De Sousa Rangel et al. 2020)。したがって、後期のアカエイ胎仔は、母乳から栄養分を吸収して肝臓に備蓄している可能性がある。これらの戦略は、アカエイの仔魚が、多くの胎仔の安定した急速な成長と、生存の成功を実現する可能性がある。

子宮乳のタンパク質含有量は妊娠中期と後期でそれぞれ 6.1%と 4.7%、脂質含有量は 11.7%と 2.1%であった。これらの含有量は、一般的な陸生哺乳類の乳汁よりも高く、例えば、タンパク質と脂質の濃度は、ヒトの母乳では 1.0 と 3.0%、ウシの母乳では 3.3 と 3.8%である。(Jenness 1970, 1974a)。またアカエイの妊娠中期の子宮乳の総カロリーは 129 kcal に達する。これは、ヒトやウシのミルクの 2 倍以上であり、成長の早いラットや犬の母乳と比べても遜色ない(Thiels et al. 1990, Dobenecker et al. 2013)。タンパク質と脂質の豊富さは、板鰓類の子宮乳に関する限られたデータからも示唆されていた(Ranzi 1932, 1934, Needham 1942)。しかし、多くの熱量を持つのににもかかわらず、アカエイの妊娠期間中の子宮乳には乳糖が検出されなかった。この結果は、*Urobatis* と *Jamaicensis* を対象とした過去の研究結果と一致した (Hamlett et al. 2005)。海生脊椎動物はエネルギー生産に糖分を必要とせず(Polakof et al. 2011)、板鰓類は筋のエネルギー源としてケトン体を主に使用していることから (Speers-Roesch & Treberg 2010)、アカエイの発育中の胎仔では糖分への依存度が低いのかかもしれない。同様に、海生哺乳類は、海中で糖分を手に入れることがまれであるため、糖分に依存しない。そのためアカエイの乳も糖分をほとんど含まず、タンパク質と脂質に富んでいると考える (Jenness 1974a)。

子宮乳タンパク質組成としては、50~85kDa の顕著なタンパク質バンドが見られたが、バンドパターンは妊娠期間によって異なり、妊娠中期と後

期では若干の類似性が見られた。このパターンは、*Hypanus* 属、*Rhinoptera* 属、*Urobatis* 属の過去のデータ (Hamlett et al. 2005)。と一致している。

本研究では、LC/MS/MS 分析により、妊娠初期に 807 種、中期に 1523 種、後期で 2076 種が同定された。妊娠初期のタンパク質が中期と全て一致していることから、妊娠初期の子宮乳タンパク質の機能は、中期にも受け継がれることが示唆された。また、初期と後期では、完全に一致していないことから、後期には何らかの機能が失われることが示唆された。

代表的な乳たんぱく質であるカゼインとホエイたんぱく質は、全妊娠段階の子宮乳から検出されなかった。特にカゼインは、牛乳タンパク質の約 80% を占め (Jenness 1974a)、リン酸カルシウムと結合する「カゼインミセル」を形成し、新生児へのカルシウム供給に貢献している。(ホルト、1982)。アカエイを含む板鰓類は脊椎骨を骨化せず、カゼイン遺伝子を持たない (Hara et al. 2018) ことから、子宮乳にカゼインが含まれないと考えられる。

子宮乳からは、多くの細胞内代謝酵素が検出された。哺乳類の乳にも細胞由来の酵素は多少含まれており、新生児の成長と免疫に機能している (Hamosh 2001, Khaldi et al. 2014)。*H. americanus* の胎仔では、子宮乳から経口摂取された栄養素は、おそらく、腸内でのエンドサイトーシスによって吸収されると考えられている (Hamlett et al. 1993, Hamlett et al. 1996b)。真骨魚の一部では、経口投与された酵素を含むタンパク質は、消化管を経由して循環に運ばれ、局所的に機能を発揮する (Suzuki et al.

1988, Bessho-Uehara et al. 2020) ことが知られている。そのため、アカエイの胎仔でも同様に、経口摂取されたタンパク質が消化されずに体内の細胞に到達する可能性が示唆された。しかしこの可能性を確認するには、胎仔に外部からたんぱく質を与え、その生理的変化を追跡するなど、さらなる研究が必要である。そして子宮乳に含まれるタンパク質や酵素が、胎仔の体内で機能するとしたら。検出されたタンパク質は、それぞれの場所で胎仔の成長を支えている可能性がある。

妊娠期間を通して子宮乳で検出された、Serotransferrin A は抗菌活性を持ち (Liu et al. 2010, Yin et al. 2019)、Immunoglobulin lambda-like は、抗体として機能する。板鰓類の子宮は、総排出孔に直結していることから、外部からの細菌にさらされる可能性がある。このことから、これらのタンパク質は、胎仔と母親の両方の細菌感染を恒常的に防ぐ効果があると示唆された。

また、Cytoplasmic aconitate hydratase も全段階で観察された。これは、細胞質内の鉄イオンレベルを調節する (Philpott et al. Matasova & Popova 2008)、Serotransferrin A は鉄結合の輸送タンパク質である (Perera et al. 2017) したがって、これらのタンパク質も鉄イオンの挙動を制御することで胎仔の呼吸をサポートする。または、胎仔の神経系および／または筋肉を含む組織の発達のための鉄イオンの輸送を行っていると考えられる (Levin et al. 1984) 検出された多くの細胞内代謝酵素は、卵黄を持たない胎仔が高いエネルギー生産を行うために必要なものと考え

えられる。また、perilipin-3 isoform 1 は、脂肪酸合成を促す機能を持ち (Takahashi et al. 2013)、胎仔の体内に影響する可能性もある。

中期の子宮乳からは Apolipoprotein E、Lysozyme g-like protein 2、中期以降からは、Apolipoprotein B、SerotransferrinB、Chondroitin sulfate proteoglycan 4、が検出された。Apolipoprotein E は、脂質結合タンパク質であるが、脂肪酸異化の誘導因子である (Van Eck et al.1997)。Lysozyme は、抗菌作用を持つタンパク質として有名な物質であるが、その活性はリンパ球の活性化、炎症性サイトカイン産生の抑制による抗炎症作用や、抗体産生の促進といった機能を持つ (Sugahara et al. 2000)

中期・後期に含まれる Apolipoprotein B は脂質の輸送、SerotransferrinB は、板鰓類においてその機能は明らかでないが、子宮乳に恒常的に含まれる SerotransferrinA とは異なる型であるため、何か特別な機能を持つ可能性が示唆された。Chondroitin sulfate proteoglycan 4 は、板鰓類の骨格である軟骨の主成分であるコンドロイチン硫酸を輸送・蓄積する (Knudson & Knudson, 2001)。これらのことから、妊娠中期には胎仔の更なる免疫強化と脂質の代謝の活性を促し、後期にかけて骨格の形成をサポートすることが示唆された。また、後期では、多数の酵素群が検出されたが、細胞内代謝に関与するものが多かった。子宮乳を分泌するという栄養子宮絨毛は、妊娠後期になると崩壊する (Collonelo et al. 2013) という報告があり、子宮乳にそれが含まれたため、多く検出された可能性がある

る。

脂肪酸分析の結果から、子宮乳は外卵黄嚢が萎縮している、あるいは消失した胎仔の栄養を支え、脂質代謝の制御に影響を与えている可能性がある。

妊娠中期および後期のアカエイの子宮乳中の脂肪酸は MUFA (44%) が最も多く、次いで PUFA (28%)、SFA (25%) であった。卵黄に含まれる脂肪酸は PUFA, MUFA, SFA の順で多く、子宮乳とは異なった。

卵黄の栄養のみで出産されるまで成長する卵黄依存型胎生板鰓類において、卵黄中の脂肪酸組成は、*Etmopterus princeps*、*Centroscymnus crepidater*、*Centroscymnus coelolepis* で分析されている (Paiva et al. 2012)。この研究の結果では子宮乳に関する本研究の結果と同様に、卵黄中の脂質含有量は、MUFA が最も多く、次いで PUFA であったことから、子宮乳脂肪酸は、一般的な板鰓類の卵黄に類似していることが分かった。このことから、子宮乳は板鰓類の胎仔を成長させるのに適した組成であることが推測される。しかし、一般的に真骨魚の稚魚の成長においては、PUFA が最も重要な脂肪酸である (石崎ら 1997)。発達初期のアカエイ胎仔が硬骨魚の稚魚に相当する期間であった場合、PUFA の供給が必要不可欠である。アカエイ卵黄には、PUFA が豊富に含まれていることから、発達初期の胎仔の成育にのみ優れた機能を持つことが示唆される。また、卵黄を吸収し終えた胎仔は、体色が無く、尾部の棘も発達しないことから、卵黄の栄養は、初期胎仔を中期までしか成長させられないことを裏付けた。

さらに脂肪酸組成を詳細に見ても、アカエイの子宮乳と卵黄および他種の卵黄では、その組成が異なることが明らかとなった。アカエイ卵黄は C16 :0, C18:1, C22:6 が最も多く、これは他種のバードピークドッグフィッシュ (*Deania calcea*) の卵黄の脂肪酸組成と一致した (Paiva et al. 2012)。これら 3 種類の脂肪酸に加えて、数種類のサメの卵黄には C20:1 と C20:1 および C20:4 が豊富に含まれていた (Pethybridge et al. 2011)。アカエイの子宮乳には卵黄と同様に C16:0, C18:1, C20:4, C22:6 が含まれていたが、そこにはあまり含まれない C16:1 や C18:2 や C18:3 が豊富に含まれていた。

C18:2 と C18:3 は、一般的に胚の成長や発達、細胞機能に必要とされ (Le et al. 2009)、これらの PUFA は、母親の捕食対象種に含まれている (Ugoala et al, 2008)。また、淡水魚では C18:2 や C18:3 が幼生の成長を促進することが報告されている (Yu & Sinnhuber 1975, Bautista & De La Cruz 1988) ことから、アカエイにおいても同様の機能を有す可能性を持つ。また、板鰓類の場合は PUFA と HUFA の変換酵素 (ELOVL2, ELOVL5, FADS1 および FADS2) を持つ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=rhincodon%20typus>)。したがって、C22:6 (ドコサヘキサエン酸 : DHA)、C20:5 (エイコサペンタエン酸 : EPA)、C20:4 (アラキドン酸) に変換され、脳の発達に寄与する可能性がある。これらの脂肪酸は神経系の調節に必須である (Pickova et al. 1999, Stokneset al. 2004, Remme et al. 2006, Kuratko & Salem Jr 2009)。

アカエイの子宮乳に最も多く含まれる脂肪酸は C16:1 であった。C16:1 は、炎症抑制効果、インスリン感受性向上効果、リポカインとしての脂質代謝制御による肝臓への脂質沈着抑制効果など、様々な機能を持つ。(Cao et al. 2008). したがって、子宮乳に含まれる脂肪酸は、様々な方法で胎仔をサポートしている可能性がある。以上のことから、アカエイの胎仔がこのような脂肪酸組成の子宮乳を摂取できれば、卵黄吸収後の成長が促進される可能性がある。ある種の飽和脂肪酸や不飽和脂肪酸は、細胞膜に組み込まれ、飽和および不飽和脂肪酸の一部は、細胞膜に組み込まれてその流動性を高めている可能性がある。C18:2(n-2), C18:2(n-3), EPA, DHA は、脂質メディエーターとして変換される可能性がある (Miyata & Arita 2015, Endo & Arita 2016)、しかし、これらの機能に関する板鰓類での研究はほとんどない。

結論として、本研究は、板鰓類・アカエイの子宮乳の組成と、その胎仔の成長段階に応じたその変遷を明らかにした初めての研究である。

胎仔の形態学的特徴と子宮乳の外見的特徴によって定義され、妊娠期間に応じて変化することがわかった。この種の子宮乳では、糖分は含まれないが、豊富なタンパク質と脂質を含む。

妊娠期間を通して、Serotransferrin A、そして Cytoplasmic aconitate hydratase、Immunoglobulin lambda-like が検出されたことから抗体・抗生物質の作用や胎仔の鉄イオンの調節に関与している可能性が示唆された。また、Vitellogenin が含まれたことから、初期胎仔の卵黄からの栄

養供給をサポートし、卵黄萎縮後の中期以降の胎仔にも絶えず、卵黄の栄養を供給することが分かった。 perilipin-3 isoform 1 によって胎仔体内における脂肪酸合成も促すことが示唆された。

妊娠中期以降では、子宮乳は栄養強化され、卵黄が萎縮した胎仔に高いカロリーを持ち、脂質代謝の促進剤、軟骨の形成因子を供給する。子宮乳は抗菌剤、栄養剤、成長促進剤としてアカエイの胎仔の成長を支える子宮乳の役割について多くの示唆を与えた。

表 1.アカエイの妊娠段階ごとの子宮乳粗成分（平均±SE, %）

成分	妊娠初期	妊娠中期	妊娠後期
タンパク質	2.4±0.4	6.1±3.3	4.7±0.9
脂質	0.9±0.2	11.7±0.9	2.1±0.7
乳糖	n.d.	n.d.	n.d.
全固形分	7.3±2.0	21.2±2.4	24.0±5.9
水分	92.7±2.0	78.8.0±2.0	76.0±1.6

n.d.: 非検出

表 2.全妊娠段階のアカエイ子宮乳から検出された代表的なタンパク質

種類	タンパク質 Symbol	代表的タンパク質名	Mw (kDa)	Coverage (%)	検出数
タンパク質	TF	Serotransferrin A	77.4	48	704
	ACO1	Cytoplasmic aconitate hydratase	104.5	37	
	IGLL1	Immunoglobulin lambda-like	25.9	37	
	PLIN	Perilipin-3 isoform 1	55.7	39	
	VTG1	Vitellogenin	121.1	9	
酵素	ATP5F1B	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	56	64	
	ME3	NADP-dependent malic enzyme, mitochondrial	64.9	76	
	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform 2	22.2	37	
	PC	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	46.9	43	
	MDH2	Malate dehydrogenase, mitochondrial isoform 1	35.7	73	

表 3. 妊娠中期・後期のアカエイ子宮乳から検出された代表的なタンパク質

段階	タンパク質 Symbol	代表的タンパク質名	Mw (kDa)	Coverage (%)	検出数
妊娠中期	APOE	Apolipoprotein E	33.5	17	258
特異的	LYZL1	Lysozyme g-like protein 2	20.4	11	
妊娠後期 特異的	DHRS1	Dehydrogenase/reductase	8	77	757
	RAB11A	Ras-related protein Rab-11A isoform 1	24.4	56	
	POLB	DNA polymerase beta	13.8	42	
	CYB5RY	NADH-cytochrome b5 reductase 1	19.9	57	
	NDUA4	Cytochrome c oxidase subunit NDUF4	10.08	45	
中期/後期 共通	APOB	Apolipoprotein B-100	513	11	1265
	TF	Serotransferrin B	90.7	42	
	CSPG4	Chondroitin sulfate proteoglycan 4	219	1	

表 4. アカエイにおける各妊娠段階の子宮乳と卵黄の脂肪酸組成 (%±SE)

脂肪酸	卵黄	妊娠中期 子宮乳	妊娠後期 子宮乳	子宮乳 平均
C12:0	0.19±0.11	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01
C14:0	1.83±0.43	0.64±0.64	0.53±0.08	0.58±0.04
C16:0	22.47±0.96	18.44±3.62	26.22±13.09	22.33±6.32
C16:1	7.86±1.73	30.51±4.19	23.51±12.29	27.01±6.01
C16:2	1.14±0.31	3.04±1.35	1.02±0.83	2.03±0.84
C18:0	6.31±0.20	2.59±1.01	0.38±0.38	1.49±0.69
C18:1	16.20±1.70	21.14±3.24	13.58±5.62	17.36±3.36
C18:2	2.99±0.64	16.68±3.88	22.86±2.78	19.77±2.54
C18:3	1.05±0.38	0.72±0.42	5.31±3.95	3.01±2.05
C20:0	3.18±2.47	1.25±0.61	1.1±0.16	1.18±0.29
C20:4	6.60±1.56	1.37±0.68	1.24±0.32	1.30±0.34
C20:5	6.30±0.97	1.77±0.78	2.06±1.05	1.92±0.59
C22:6	23.88±0.75	1.81±0.55	2.16±0.97	1.98±0.51
飽和脂肪酸 (SFA)	33.97±0.90	22.96±4.62	28.27±12.84	25.61±6.22
一価不飽和脂肪酸 (MUFA)	24.06±3.41	51.66±1.88	37.09±10.55	44.37±5.80
多価不飽和脂肪酸 (PUFA)	41.96±2.54	22.35±4.92	33.62±5.51	27.99±4.15

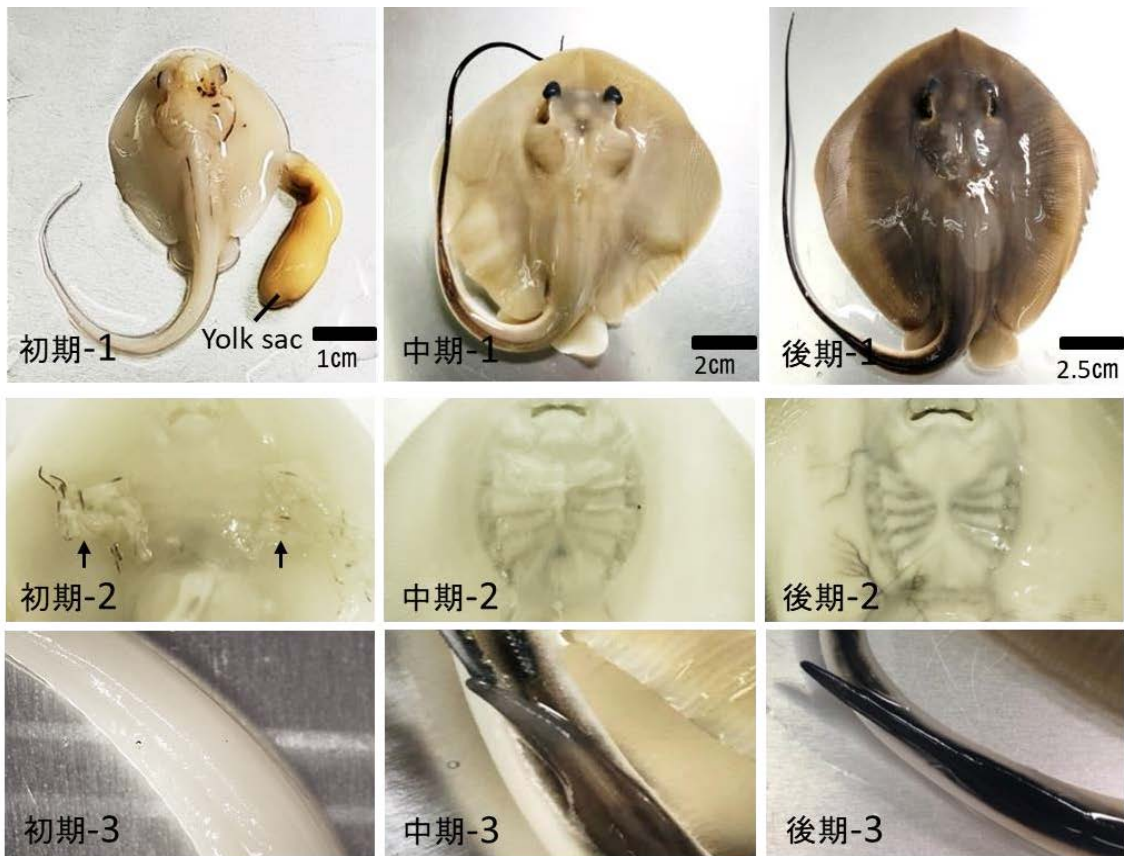


図1. アカエイにおける胎仔の形態による妊娠段階の決定

初期-1：妊娠初期胎仔の外観的観察。体色は透明～白で外卵黄嚢を持つ。初期-2：外鰓の有無を示す。(矢印)は外鰓を示す。初期-3：尾部に棘がない。中期-1：妊娠中期胎仔の外観的観察。白～灰色の体色を持つ中期-3 外卵黄は萎縮、もしくは消失。尾部に軟性の未発達な棘を持つ。後期-1, 2, 3：妊娠後期胎仔の外観的観察。形態は母体と同様になり、外卵黄嚢は消失、尾部に骨化した棘を持つ。

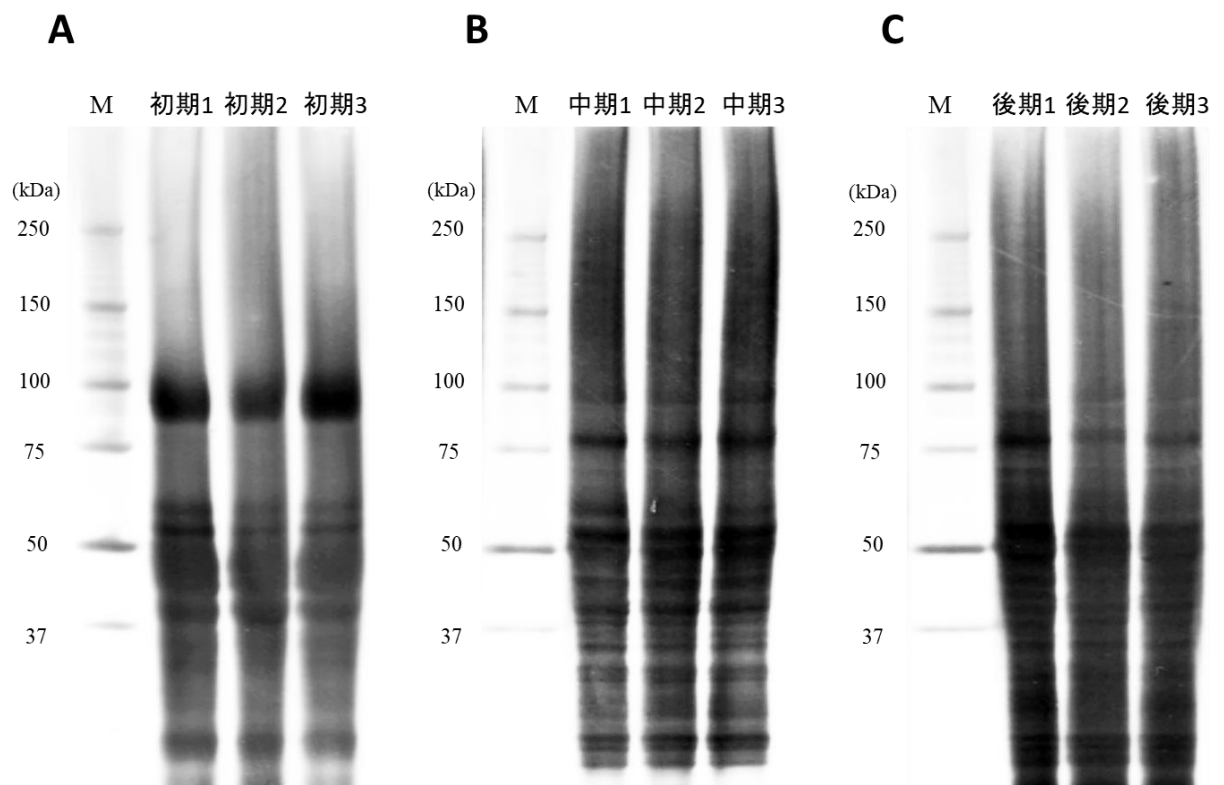


図 2.銀染色により可視化された SDS-Page による各妊娠段階のアカエイの子宮乳タンパク質の分画

A : 妊娠初期の子宮乳、B : 妊娠中期の子宮乳、C : 妊娠後期の子宮乳。それぞれタンパク質総量 $3\mu\text{g}$ を各レーンにアプライした。M : マーカー (All blue,)

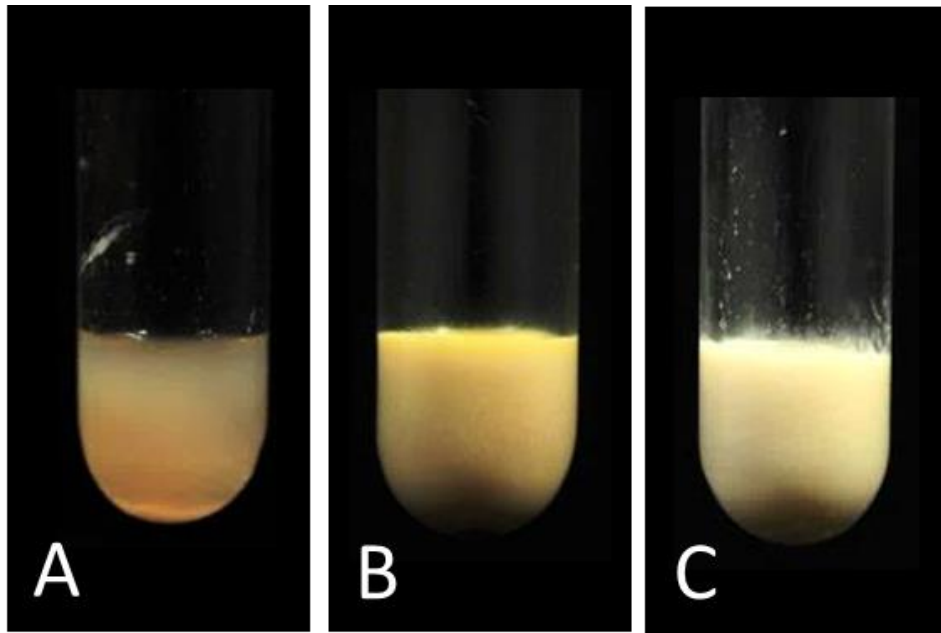


図 3. 妊娠段階に伴うアカエイ子宮乳の形状および色の
変化

A : 妊娠初期、B:妊娠中期、C 妊娠後期

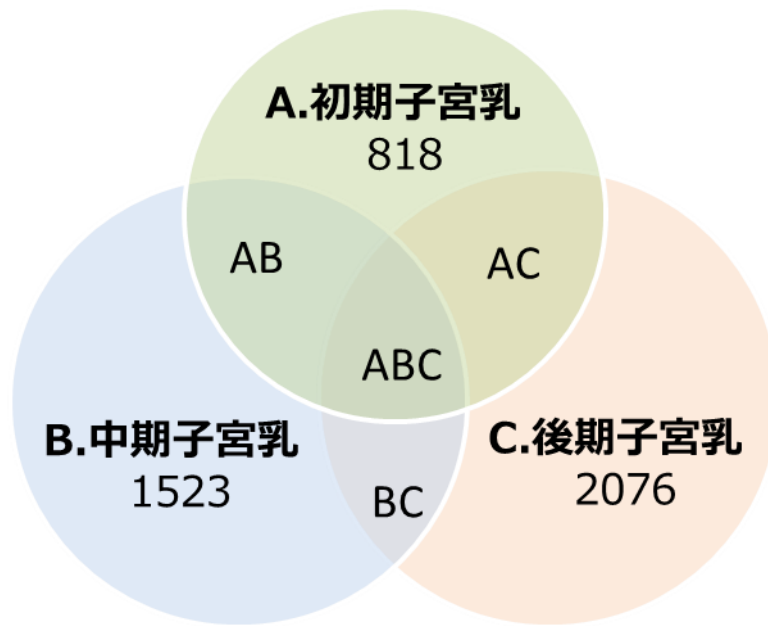


図 4. 子宮乳から検出されたタンパク質の各妊娠段階との関係

ABC : 全妊娠段階で共通する 708 種のタンパク質 AB : 妊娠初期と中期で共通して検出されたタンパク質。初期の 818 種が全て中期と一致した。

BC : 中期と後期で共通検出されたタンパク質。中期の 1265 種が後期と一致した。 AC : 初期と後期で共通検出されたタンパク質。初期の 759 種が後期と一致した。

2 章

栄養子宮絨毛の組織構造と遺伝子発現様式の変化

緒言

哺乳類は乳腺で乳を合成する。非妊娠期の乳腺は主に脂肪細胞で構成されており (Richert et al. 2000)、妊娠とともに上皮細胞が発達し、脂肪細胞に対する上皮細胞の比率が増加する。また、乳腺胞が形成され、それを囲む結合組織内に毛細血管が見られる (Richert et al. 2000)。乳腺胞は立方上皮細胞で構成され、乳タンパク質や乳脂質の合成因子が発現する (Molenaar et al.1996, Suburu et al. 2014)。分娩時には乳腺胞の発達が完了し、実際に乳を合成・分泌する (Nandi 1958)。授乳を終えた乾乳期の乳腺では、上皮細胞はアポトーシスにより崩壊する (Strange et al. 1992)。

ハトやフラミンゴなどの鳥類は素囊と呼ばれる組織で素囊乳を合成・分泌することで知られる。素囊乳は素囊上皮細胞で合成され、その上皮細胞を脱落させ、素囊乳として子供に与える (Davies 1939)。産卵前の鳥類において素囊の上皮細胞は扁平で目立たないが、産卵後にプロラクチンの作用で上皮細胞が肥大化する。素囊上皮細胞はエンドサイトーシスによる脂質の蓄積によって乳を合成するため (Horseman and will 1984, Horseman and Buntin 1995)、脂質合成因子を持たず、脂質の生合成は行わない (Gillespie et al. 2011)。

子宮乳型板鰓類の子宮内壁は、栄養子宮絨毛と呼ばれる組織で覆われている (Hamlett et al. 1996)。子宮乳型板鰓類である *Hypanus americanus* において栄養子宮絨毛の組織構造は、非妊娠期には線維芽細胞と未分化細胞からできており、血管はほとんど発達しない。妊娠期になると線維芽細胞から立方体上皮細胞へと変化し、血管が発達する。また、栄養子宮絨毛はガス交換に適した構造であるとされており、*Hypanus americanus*, *Charcharias carcharodon*, *Myliobatis goodie* の妊娠期には、上皮細胞が薄くなり、血管と外部（子宮内）の距離を短くすることで子宮内への酸素供給を行うことが示唆されている (Hamlett et al. 1996, Collonelo et al. 2013, Sato et al. 2016)。さらに Hamlett et al. 1996 の報告では、*Hypanus americanus* の栄養子宮絨毛の超微細構造の観察により、上皮細胞内に脂質様物質および細胞小器官が多数観察されたことから、栄養子宮絨毛の子宮乳合成・分泌の可能性が示唆された。

しかし、栄養子宮絨毛に焦点を当てたこれまでの報告では、妊娠期に伴う組織構造の変化についての報告は少なく、胎仔の成育環境水である子宮内液（羊水）の溶存酸素量と栄養子宮絨毛の血管発達についての報告もない。また分子生物学的な知見は一切存在しないため、子宮乳合成の有無も明らかでない。

本研究では、子宮乳型板鰓類アカエイ (*Hemitrygon akajei*) における妊娠段階に伴う栄養子宮絨毛の組織構造の変化を詳細に捉え、子宮内液の溶存酸素量の測定により、子宮内の溶存酸素濃度と栄養子宮絨毛における

血管の発達に関係を明らかにする。さらに RNA-Seq により非妊娠期、および各妊娠期（初期・中期・後期）の栄養子宮絨毛で発現する遺伝子を網羅的に解析することで、栄養子宮絨毛の機能や子宮乳合成の有無を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

試料

神奈川県藤沢市の境川で、2018~2021 年の 6~8 月に釣獲した妊娠したメスのアカエイ (*Hemistrygon akajei*) と非妊娠期のアカエイを各 3 匹ずつ、計 12 匹について苦痛を受ける時間をできるかぎり短くするために延髄を切断して即殺した後、子宮内液を採取後した。また、栄養子宮絨毛を、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、腸管、卵巣、エピゴナル器官採取した。その後、栄養子宮絨毛は。ブアン固定液、パラホルムアルデヒド、RNAlater (Thermo fisher scientific, massachusetts, USA) に浸潤し、それぞれ室温、4°C、-20°C で保存した。他の組織は RNAlater にのみ浸潤し、-20°C で保存した。

方法

走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

4%パラホルムアルデヒドで固定した組織から子宮絨毛を切り出し、イオン交換水に 1 晩浸けた。両面テープを用いて試料台に組織を固定し、超

低温フリーザー（MDF-C8V1-PJ、Panasonic, Japan）に入れ、-80℃で1時間凍結させた。凍結した試料を凍結乾燥機（Eyela FDU-1200、東京理科機械、東京、日本）のチャンバー内に移し、一晩乾燥させた。その後、イオンスパッター（E-1010,HITACHI、東京、日本）のチャンバーを外し、試料台に乾燥した試料を置いた。チャンバーを元の位置に戻し、イオンスパッターの電源を入れた。VOLTAGE モードを「HIGH」に設定した。VACUUM ADJUST つまみを「HIGH」方向に回し、チャンバー内の気圧が10Pa以下になったのを確認したら、DISCHARGE キーを「ON」にし、120秒間金属コーティングを行った。金属コーティング終了後、イオンスパッターの電源を切り、チャンバー内に空気が流入するのを待ち、試料を取り出して走査型電子顕微鏡（S-3500N, HITACHI）で観察した。

AZAN 染色

ブアン液で固定した組織を70%エタノールで洗い、子宮絨毛を切り出し、70%エタノールに120分、90%エタノール、100%エタノール、無水エタノールⅠにそれぞれ60分、無水エタノールⅡに90分浸けて脱水した。次にGNOXエタノール（GNOX：エタノール=1：1）に60分、GNOXⅠ、Ⅱ（GenoStaff, Tokyo, Japan）にそれぞれ90分ずつ浸けて透徹した。次に低融点パラフィンⅠ、Ⅱ、Ⅲに（融点46～48℃）にそれぞれ90分、高融点パラフィン（融点56～58℃）Ⅰ、Ⅱにそれぞれ10分間つけた後、高融点パラフィンで包埋した。

組織を包埋したパラフィンブロックを台木に固定し、半自動回転マイクローム（RM2245, Leica, Wetzlar, German）を用いて 5 μ m の厚さで組織を薄切し、卵白グリセリンを塗布したスライドガラス上で一晚、伸展・乾燥させた。

定法に従い脱パラフィンした切片をイオン交換水に通し、アゾカーミン液に 5 分間浸した。イオン交換水で過剰の色素を落とし、アニリンアルコールで分別した。酢酸アルコールで軽く洗い、分別の進行を止め、5%リタングステン酸水溶液で 40 分間媒染した。水道水で軽く洗い、余分の色素を落としてから、アニリンブルー・オレンジ G 混合液で 40 分間染色した。水道水に通して余分の色素を落とし、96%エタノールで分別した後、100%エタノールに移した。染色カゴを 2~3 回上下させた後、無水エタノールに 3 分間浸した。キシレン I、II にそれぞれ 5 分間浸し、脱水した。

脱水した組織の上に、封入剤（Mount-Quick、Daido Sangyo、埼玉、日本）を適量滴下し、気泡が生じないように注意してカバーガラスをかぶせ、十分に乾燥させた後、光学顕微鏡（OLYMPAS BX41、東京、日本）を用いて観察した。

PAS 染色

AZAN 染色と同様の手順で組織を脱水、包埋、薄切した。組織を UPW で洗浄後、0.5%過ヨウ素酸水溶液に 5 分間浸し、水道水で洗浄した。Schiff 試薬で 15 分間染色し、SO₂ で洗浄した。流水でさらに洗浄し、ヘマトキ

シリン液で核染色を行った。試料を定法に従い脱水した後、封入剤 (Mount-Quick、Daido Sangyo) を適量滴下し、気泡が生じないように注意してカバーガラスをかぶせ、十分に乾燥させた後、光学顕微鏡 (OLYMPUS BX41) を用いて観察した。

脂肪染色

4%パラホルムアルデヒドで固定した組織から子宮絨毛を切り出し、イオン交換水に2時間浸けた。その後、凍結切片用コンパウンド (サクラフアインテックジャパン、東京、日本) に試料を一晩浸潤した。浸潤した試料を凍結切片用コンパウンドに包埋し、 -80°C で凍結した。凍結した組織をクライオスタット (Leica biosystems、東京、日本) で $5\mu\text{m}$ に薄切し、スライドグラス上で進展させた。

十分に乾かした切片を2分間60%イソプロパノールに浸け、Oil-Red-O染色液 (Wako、大阪、日本) で15分間、染色した。UPWに曝すことで染色液の凝縮物を取り除き、60%イソプロパノールで余分な染色を落とした。その後、組織の上に、封入剤 (Aquatic mount、Daido Sangyo) を適量滴下し、気泡が生じないように注意してカバーガラスをかぶせ、光学顕微鏡 (OLYMPUS BX41) を用いて観察した。

TUNEL法によるアポトーシスの検出

DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega、WI、USA) に従

った。定法に従い、組織の脱水、包埋、薄切を行った。PBS で 5 分間試料を洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで組織切片を固定した。PBS で 5 分間洗浄し、これを 2 回繰り返した。組織から液体を拭き取り。PBS で希釈した 20 μ g/mL Proteinase K を 100 μ L をスライドに加え、8~10 分間インキュベートした。5 分間 PBS で試料を洗浄し、再度 4%パラホルムアルデヒドで組織を固定した。5 分間 PBS で試料を洗浄した後、スライド上の過剰な水分を全て取り除き、キットに付属の平衡化 Buffer を 100 μ L 加え 5 分間インキュベートした。スライド上の平衡化 Buffer を拭き取り、rTdT incubation buffer (12-dUTPn フルオレセインを含む) を 50 μ L 加えた。組織の乾燥を防ぐため、組織大に切ったパラフィルムを組織に被せ湿箱に入れ、tailing reaction を起こすために 37 $^{\circ}$ C で 60 分間インキュベートした。パラフィルムを取り除き、2 \times SSC に 15 分間浸すことで反応を終了させた。5 分間 PBS で試料を洗浄し、これを 3 回繰り返した。Fluoroshield Mounting Medium with DAPI (Abcam, Cambridge, UK) で DAPI 染色とマウントを行い、カバーガラスをスライドに取り付けた。520 \pm 20nm の波長でフルオレセインの緑の傾向を確認するため、蛍光顕微鏡で試料を観察した。

子宮内液における溶存酸素量の比色定量

溶存酸素 (DO) キット (共立理化学研究所、東京、日本) を用いてインジゴカルミンの比色法による子宮内液 (羊水) の溶存酸素量 (mg/mL)

をもとめた。非妊娠個体と妊娠後期の各 2 匹、妊娠初期と中期の各 3 匹のから採取した子宮の切開後、迅速にスナッパーに差し込んだアンプルを子宮内に入れ、子宮内でアンプルの先端を割ることで、アンプル内に子宮内液を取り込んだ。転倒混和し、2 分後に変色したアンプル内の試薬と標準色表を比べ、溶存酸素量を測定した。

RNA 抽出

各組織を 1 mm 角にはさみで切り、1 ml の Isogen (ニッポン・ジーン、東京、日本) に入れた。ホモジェナイザーで組織をさらに細かく破碎し、クロロホルムを 200 μ L 加え 5 分静置した。その後 12000rpm \times 15 分遠心し、上澄みを回収した別のチューブに移した。回収した上澄みにイソプロパノールを 500 μ L 加え、15000rpm \times 10 分間遠心し、上澄みを捨てた。そこに 70%エタノールを加え 7500g \times 10 分間遠心した。上澄みを全てすて 100%エタノールを加え上記と同条件で遠心、その後上澄みを全て捨て、風乾した。その後 DEPC 水に溶解し、これを RNA 溶液とした。

RNA-Seq

各妊娠段階の栄養子宮絨毛から抽出した全 RNA の RIN (RNA integrity number) を Tape Station (Agilent, California, USA) で測定し、RIN が 7.0 以上の RNA を株式会社 BGI JAPAN (東京、日本) に委託受注し、リード数は PE150bp、4 GB で RNA-Seq に供した。

RNAseq 後、CLC ゲノミックワークベンチ (CLC Bio, Aarhus, Denmark) のアプリケーション NGS ツールを用いて、得られた配列のトリミング、クオリティチェック、マッピング、遺伝子発現定量 (RPKM) を行い、1 元配置分散分析 (ANOVA)、Bonferroni の検定を行った。マッピングのリファレンスデータとして *Amblyraja radiata* のゲノムデータを使用した。

各段階の栄養子宮絨毛における発現遺伝子の類似性分析

RNA-Seq により得られた栄養子宮絨毛の全遺伝子発現量データ (RPKM) を principal component analysis (PCA) 分析に供し、各段階 (非妊娠期・妊娠初期・中期・後期) の栄養子宮絨毛における遺伝子発現動態の類似度をもとめた。さらにクラスター解析として、ウォード法によるユークリッド距離を用いたクラスター化を行った。

KEGG-Pathway 解析

各妊娠段階の栄養子宮絨毛の RNA-Seq で得たデータを DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>) の KEGG Pathway analysis に供した。PCA 解析によってクラスター化された妊娠初期・中期で発現量が有意に上昇した 1266 遺伝子をゾウギンザメ *Callorhinchus milli* Pathway をリファレンスデータにし、ID に変換した。変換に成功した 825 の遺伝子のうち 373 遺伝子で生体内 Pathway を構築した。

cDNA 合成

High Capacity RNA-to-cDNA kit (Thermo fisher scientific) を用いてプロトコルに従い、cDNA 合成を行った。cDNA の合成には、1000ng/ μ L の RNA を用いた。

RT-PCR

PCR 反応液 (4 本分組成 : 10 \times Hi fi-buffer 8 μ L, MgSo₄ 3.2 μ L, DNTP 1.6 μ L, Fw Primer 1.6 μ L, Rv Primer 1.6 μ L, UPW 63 μ L, Platinum taq 0.32 μ L) を PCR tube (0.2mL tube) に cDNA を 1 μ L 加え、サーマルサイクラーで、熱変性 95 $^{\circ}$ C で 2 分後、熱変性 95 $^{\circ}$ C で 30 秒、アニーリング温度としてそれぞれのプライマーの温度設定で熱を加え、伸長反応として 68 $^{\circ}$ C で 1 分間反応させ、2 度目の熱変性からここまでのステップを 35 回繰り返した。最後にもう一度、伸長反応として 68 $^{\circ}$ C で 5 分間熱を加えた。用いたプライマーは表 1 に記した。

ゲル精製

Wizard R SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega、WI、USA) を用いて行った。RT-PCR 後、反応物 1%アガロースゲルにアプライし、電気泳動 (100V、23 分) を行った。ゲルに LED を当て、目的の大きさに出現したバンドをカミソリの刃で切り出した。切り出したゲルを 1.5mL チューブに入れ、重量を測定した。ゲル 10mg に対し 10 μ L の Membrane

Binding Solution を添加し、ボルテックスで攪拌後、65°Cで 10 分間溶解させた。Collection tube に SV minicolumn を挿入し、調製したゲル溶解液を添加した。室温で 1 分間放置し、16,000×g,室温,遠心。SV minicolumn を取り外し、Collection tube 内の液体を除去し、SV minicolumn を Collection tube に挿入した。カラムに Membrane wash solution を 700 μL 添加し、16,000×g,1 分間,室温で遠心した後、Collection tube 内の液体を除去し、SV minicolumn を Collection tube に戻した。カラムに Membrane wash solution を 500 μL 添加し、16,000×g,5 分間,室温で遠心し、SV minicolumn を新しい 1.5ml チューブに移した。これに nuclease-free water を 50 μL 添加して室温、1 分間放置した後、10,000×g, 1 分間,室温で遠心した。SV minicolumn を廃棄し、チューブ内に溶出した PCR 産物をライゲーションに用いた。

ライゲーション

pGEM-T Easy Vector System (Promega) を使用した。組成液 (2× Rpid Ligation buffer 2.5 μL, pGEM-T Easy Vector 0.5 μL, T4 DNA Ligase 0.5 μL, PCR 産物 0.5 μL, 全量 5 μL) を 0.2mL チューブに調整し、ピペッティングにより、混和した。4°C,Overnight で反応させ、PCR 産物をベクターにライゲーションした。

トランスフォーメーション

-80°Cで保管されていた、*E. coli* Competent Cell JM109 (Wako、大阪、日本)を氷上に置いて又は手で溶かしてすぐに氷上に置いた。Competent Cellを氷冷したチューブに分注し、ライゲーションした溶液全て(5 μL)を分注した Competent Cell 液 50 μL に添加し、タッピングにより混合した。素早く氷上に戻して 10 分間置いた後、42°Cで 30 秒間ヒートショックを行った。氷上に戻して 2 分以上置き、冷えた SOC 培地を混合液 55 μL に対して 450 μL 添加した。培地を加えた混合液を 37°Cで 65 分間震盪し、震盪が終わる 30 分前に 2×YT プレート培地に X-gal (5-Bromo-4-Choro-β-Galactoside) (タカラバイオ、滋賀、日本)を 100 μL 撒いたものを 37°C恒温槽に入れて温めた。温めた 2×YT プレート培地に培養液 100 μL 巻きコンラージ棒で伸ばし、37°C恒温槽内にプレートに戻し、24 時間培養させた。

インサートチェック

培養したプレートから白コロニー8つと青コロニー2つを爪楊枝で選取り、新しい 2×YT プレート培地に接種した後、0.2mL チューブにこすり取った。2×YT プレート培地を 37°Cで 5~6 時間培養し、シングルコロニーを得た。同時に PCR 反応液 (10 本分 : Go Taq 0.5 μL, dNTP Mixture 2 μL, 5×Go-Taq buffer 20 μL, M13 Fw Primer 5 μL, M13 Rv Primer 5 μL, SDW 67.5 μL) を、コロニーを接種した 0.2mL チューブに 10 μL ずつ添加し、熱変性として 95°Cを 3 分、熱変性として 95°Cを

30 秒、アニーリング温度 50°C を 30 秒、伸長反応として 72°C を 1 分 30 秒、2 回目の熱変性からここまでのステップを 25 回繰り返した後、伸長反応として 72°C で 3 分間の PCR を行った。PCR 後の反応液を 1% アガロースゲルにアプライし、電気泳動 (100V, 20 分) を行い、PCR 産物の大きさからインサートの有無を確認した。

プラスミドの少量調整

試験管 2 本に 2×YT 培地を 2ml ずつ分注した。DNA 断片がインサートされていることが確認したコロニーを VII で得たシングルコロニーをプレートから爪楊枝で取り、試験管内の培地に接種した。ウォーターバスに試験管を傾けてセットし 37°C で 24 時間培養した。

プラスミド精製

Wizard Plus SV Minipreps (Promega) を使用し、プラスミド精製を行った。震盪させておいた培養液を 1.5mL チューブに移し替えた。15,000rpm、室温 1 分間遠心をし、上清を除去し、Cell Resuspension Solution を 250 μ L 加え、ピペッティングにより大腸菌のペレットを完全に溶解させた。Cell Lysis Solution を 250 μ L 加え、4 転倒混和した。細胞溶解液が透明になるまで 3 分間室温で放置した。Alkalinic Protease Solution を 10 μ L 加え、4 回転倒混和し、室温で 5 分間静置した。Neutralization Solution を 350 μ L 加え、すぐに 4 回転倒混和した。15,000

×g、室温、10 分間遠心し、得られた上清 Collection tube に差し込んだ Spin column に静かに移した。15,000×g、室温、1 分間遠心を行い、Collection tube 内の溶液を捨てた後、Spin column を戻し、これに Column wash solution を 750 μL 加えた。15,000×g、室温、1 分間遠心を行い、Collection tube 内の溶液を捨て、Column wash solution を 250 μL 加えた。15,000×g、室温、1 分間遠心を行い、Collection tube 内の溶液を捨てた。Spin column を戻し、15,000×g、4°C、2 分間遠心し、Spin column を 1.5mL チューブに差し替えた。Nuclease-Free Water を 50 μL 加え、15,000×g、室温、1 分間遠心してプラスミドを溶出した。精製プラスミド溶液を分注し、濃度を測定した後、-20°C で保存した。

ラベリング PCR

Big Dye terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, massachusetts, USA) を使用してラベリング PCR を行った。精製した DNA 溶液の量が 150~300ng になるように調整し、T7 反応液 (T7: T7 Primer 3.2 μL, Big Dye Terminator 3.2 μL, Ready Reaction Mix 2 μL, Ready Reaction Mix 2 μL, SDW - μL, 計 20μ) と、SP6 反応液 (SP6: SP6 Primer 3.2 μL, Big Dye Terminator 3.2 μL, Ready Reaction Mix 2 μL, Ready Reaction Mix 2 μL, SDW - μL, 計 20μL) を調整後、ラベリング PCR (96°C で 3 分, 96°C で 10 秒, 50°C で 5 秒, 60°C 4 分を 2 回目の 96°C ステップから 35 回繰り返した) を行った。

ラベリング産物の精製（エタノール/EDTA 精製）

1.5mL チューブに 125mM の EDTA を 5 μ L 入れ、ラベリング PCR 後の反応液を全量（20 μ L）これに添加した。100%エタノールを 60 μ L 添加後、4 回転倒混和した。15 分間室温で放置し、15,000rpm、4°C、20 分間遠心した。上清を除去し、70%エタノール 60 μ L 添加した。15,000rpm、4°C、10 分間遠心後、上清を完全に除去し風乾した。

シーケンス解析

上記で精製したラベリング産物について塩基配列を日本大学生物資源科学部総合研究所において、DNA シーケンサー（AB13100, Applied BioSystem)により解析した。得られた配列は Nucleotide BLASTにより、類似する塩基配列を検索し、目的物質が増幅されたか、または目的遺伝子と相同性を確認した

制限酵素処理によるプラスミドの直鎖化

NEB Cutter により、目的物質の配列を途中で切断せずに、精製したプラスミドを直鎖化できる制限酵素を検索した。制限酵素処理を行うために、反応組成液（Sph I 等の制限酵素 3 μ L, 10 \times H Buffer 10 μ L, プラスミド DNA 濃度 5~10 μ g 分, フィルター滅菌水で 100 μ L にメスアップ, 計 100 μ L) を 1.5mL チューブに入れ、ピペッティングを行った後、37°C、

Overnight でゆっくり震盪して反応させた。反応後、氷上で冷やし、酢酸 Na (ニッポンジーン) 3.3 μ L 加え、20 秒間激しくボルテックスした。そこにエタチンメイト (ニッポンジーン) を 1 μ L 加え、再び 20 秒間ボルテックスした。1 分間室温で静置後、12,000 \times g、室温、5 分間遠心し、上澄みを捨てて風乾した。ペレットに 10 μ L のフィルター滅菌 UPW を加え、溶解した。これに 10 \times ローディングバッファー (タカラバイオ) 1 μ L 加え、全量を 1% アガロースゲルにアプライした。(泳動には高分子マーカーを使用する。)

電気泳動 (100V、20 分) 後、イメージングアナライザーにより泳動像を確認し、ゲル精製を行い、制限酵素処理後の直鎖化させたプラスミド溶液を得た。溶液の DNA 濃度を測定後、DNA 濃度が 1 ng/ μ L になるようにフィルター滅菌 UPW で希釈した後、-20 $^{\circ}$ C で保存した。

アカエイの各組織における FASN 発現量の定量

非妊娠期・妊娠期のアカエイ各 3 匹ずつから採取した栄養子宮絨毛、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、腸管、卵巣、エピゴナル器官の FASN 発現量を比較するために定量 PCR に供した。

直鎖化したプラスミドを 10^{-1} ~ 10^{-8} になるようにフィルター滅菌 UPW で段階希釈し、標準物質とした。標準液、QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany)、cDNA を用いて以下の反応液を調整し、PCR (Roter-Gene Q) として Hold Stage 95 $^{\circ}$ C で 15 分, Cycling Stage

95°Cで20秒, Cycling Stage -°C (アニーリング温度) で30秒, Cycling Stage 72°C で20秒, これら3つの Cycling Stage を40回繰り返す、Melt Curve Stage 72°Cで5分間インキュベートした。使用した Primer は表 1 に記載した。妊娠、非妊娠段階の各器官の濃度を GAPDH の濃度で割り、妊娠段階の各器官と非妊娠段階における各器官の平均値を算出した後、それらの値を用いて Turkey-Kramer の有意差検定を行った。

In situ hybridization

Template (鋳型) DNA 作成として目的遺伝子のプラスミド (p-GEM T easy vector) および M13 プライマーを用いて、目的遺伝子鋳型の増幅を行った。PCR 後に電気泳動し、目的遺伝子の bp+230bp のシングルバンドを確認、および切り出し、ゲル抽出を行い、カラムからは 30 μ L の UPW で溶出した。In vitro 転写反応として、上記で作成した目的遺伝子鋳型と T7 RNA ポリメラーゼまたは SP6 RNA ポリメラーゼ (Merck, Darmstadt, Germany)、Dig RNA Labeling Mix (Merck) を用いて、蛍光物質 (Dig-11-UTP) が付与された蛍光 RNA プローブを作成した。反応液は、Template DNA 0.1 μ g、10 \times Buffer 2 μ L、10 \times Dig Labeling Mix 2 μ L、Enzyme (T7 or SP6) 2 μ L、RNase inhibitor 1 μ L、全量 20 μ L なるよう、UPW を加えた。以上を 1.5ml チューブに入れ、タッピング。37°Cで2時間インキュベートし、RNase inhibitor を 2 μ L 加え、再び 37°Cで15分インキュベートし、EDTA (pH8.0) を加えた。10 \times Loading dye と上記の

反応物を混ぜて電気泳動する。得られたバンドを切り出し、ゲル抽出した。

In situ hybridization として組織切片を 4%ホルマリンで 3 時間、4°C で保存。TBS で 3 回洗浄した。細胞膜を弱くするために 0.5%トリトン - TBS で 15 分間震盪したアセチル化させるためにアセチル化バッファー (全量 50ml、Tri-metanol amine 0.67ml、6N HCL 0.16ml、無水酢酸 0.15ml、RNase inhibitor 0.1ml、UPW 49.15ml) で 10 分震盪し、その後 TBS で 10 分間洗浄した。Hybridization 前処理として、pre-hybridization mix (20×SSC 0.2ml、ホルムアミド 0.4ml、DSS (デキストラン硫酸ナトリウム) 0.1ml、Denhards (×50) 0.04ml, UPW 0.26ml) を 150μL 組織切片に添加し、10 分間震盪、その後 TBS で洗浄する。Pre-hybridization mix を全て取り除いた。Hybridization として染色液 (0.5μg/mL HLprobe) を 150μL 加え、パラフィルムでカバーする。その後湿箱に入れ、60°C で 24 時間インキュベートした。2×SSC-50%ホルムアミドを加え 50°C で 20 分洗浄し、1×SSC で 50°C インキュベートした後、TBS で 5 分間 3 回洗浄した。1%ブロッキング液 TBS (2%BSA) を加え 50 分間震盪させた。過酸化水素 1 滴を添加し、内在性ペルオキシダーゼを不活性化し、TBS で洗浄した。抗 Dig 抗体-ペルオキシダーゼ (×50~200) を 200μL 添加、24 時間インキュベートした。TBS で洗浄後に TSA 反応として 2 滴の SA-HRP (発色剤) を滴下し TSA 反応は約 2 分間行った。その後 PBS で 2 回洗浄する。停止液を入れて再び洗浄後に封入剤 (Aquatic mount、Daido Sangyo) を適量滴下し、カバーガラスをかぶ

せ、ただちに光学顕微鏡（OLYMPAS BX41）を用いて観察した。

子宮乳脂肪酸合成因子の発現定量

非妊娠、各妊娠段階（初期・中期・後期）（各 n=3）の栄養子宮絨毛において、RNA-Seq で得られた脂質関連因子の発現量（RPKM）を比較し、その中で子宮乳脂肪酸の合成に関わる脂肪酸合成因子の FASN、SREBF-1、脂肪酸不飽和化因子の FADS 1/2、脂肪酸伸長因子の ELOVL1/2、ノーマライゼーション因子として GAPDH の発現量を定量 PCR で定量した。得られたデータは GAPDH の濃度で割り、各段階でそれぞれの平均値を算出した後、それらの値を用いて Turkey-Kramer の有意差検定を行った。

結果

走査型電子顕微鏡観察

走査型電子顕微鏡を用いて、各段階（非妊娠期・妊娠初期・中期・後期）のアカエイ栄養子宮絨毛の上皮構造を観察した。非妊娠期の栄養子宮絨毛は扁平であり、滑らかな表面構造を持つ（図 1-A）。妊娠初期になると上皮表面に網目状の構造ができ、陰窩が確認された。また、沿岸部に沿って血管様の管が走行する像が確認された（図 1-B）。中期は、初期と同様な特徴を示すが、網目構造が肥大しスポンジ状になった。また、より深い陰窩が観察された（図 1-C）。後期は、中期と比べて組織全体が少し萎縮し

た。しかし、上皮の網目が太くなったような像が得られた（図 1-D）。

妊娠中期と後期では陰窩内から分泌物様のものが確認された。さらに後期では、陰窩内が分泌物で満たされた像が観察された（図 2）。

AZAN 染色

非妊娠期の栄養子宮絨毛は中央に血管が走行しており、上皮に向かって伸びる毛細血管が観察された（図 3-A）。組織は繊維芽細胞で構成され、楕円の核が観察された（図 3-B）。妊娠初期では組織・細胞が肥厚し、陰窩が形成された（図 4-A）。毛細血管は上皮に向かって伸長し、毛細血管を基底とした立方上皮細胞が多数見られ、核は肥大化していた（図 4-B）。妊娠中期になると、上皮は少し萎縮した（図 5-A）。妊娠初期で観察された立方上皮細胞が消失したことで、毛細血管が上皮から露出し、陰窩基底に円柱上皮細胞が観察された（図 5-B）。後期では組織が萎縮し、細くなった（図 6-A）。上皮細胞は崩壊、脱落し、毛細血管の上皮からの露出が顕著になった（図 6-B）。

PAS 染色

非妊娠期の栄養子宮絨毛では、上皮に強い PAS 染色が見られた（図 7-A）。妊娠初期と中期は微弱な染色が見られ（図 7-B,C）。妊娠後期には、陰窩内部に PAS 染色は見られた（図 7-D）。

脂肪染色

非妊娠期では上皮にのみ脂肪染色が見られた (図 8-A)。妊娠初期では上皮細胞全体で脂肪染色が見られた (図 8-B)。中期には上皮細胞全体で強い脂肪染色が見られ、陰窩も染色された (図 8-C)。後期になると中央血管に隣接された上皮細胞にのみ脂肪染色が見られた (図 8-D)。

TUNEL 法によるアポトーシスの検出

非妊娠期の栄養子宮絨毛では組織内で微弱な DNA 断片化が見られた (図 9-A)。妊娠初期の栄養子宮絨毛では外縁部の上皮細胞で DNA の断片化が見られた (図 9-B)。妊娠中期の栄養子宮絨毛。DNA の断片化は見られなかった (図 9-C)。妊娠後期の栄養子宮絨毛。上皮細胞全体で DNA の断片化が見られた (図 9-D)。

子宮内液における溶存酸素量の比色定量

非妊娠期の子宮内液の溶存酸素量 (mg/mL \pm SE) は、 2.0 ± 1.0 であり、妊娠初期、中期、後期ではそれぞれ、 6.3 ± 1.3 、 5.7 ± 1.2 、 7.5 ± 1.5 であった。各段階で統計的処理はできなかったものの、妊娠期で溶存酸素量の上昇が見られた (図 10)。

各段階の栄養子宮絨毛における発現遺伝子の類似性分析

各妊娠段階の栄養子宮絨毛を RNA-seq に供し、PCA 解析をした結果。

PC1 (64.5%) では分けられなかったが、PC2 (25.1%) で妊娠初期・中期と妊娠後期・非妊娠期の2群に分かれた。さらにワード法によるクラスター解析によって、妊娠初期・中期の群と妊娠後期・非妊娠期の群でクラスターを形成した。

遺伝子発現定量解析

2群にクラスター化した妊娠初期・中期と妊娠後期・非妊娠期の栄養子宮絨毛における発現遺伝子を Student の t 検定に供した結果、妊娠初期・中期の群で 1265 遺伝子が有意に上昇した。

Pathway 解析

妊娠初期・中期群で有意に上昇した遺伝子を KEGG Pathway 解析をしたところ、36 経路を得た。中には、鉄の制御因子を含む Biosynthesis of antibiotics、タンパク質・アミノ酸生合成に関与する、Protein processing in endoplasmic reticulum pathway、Protein export pathway、Biosynthesis of amino acids pathway、Selenocompound metabolism、Arginine and proline metabolism pathway の 6 経路、脂質の合成に関与する Carbon metabolism、Fatty acid metabolism、Fatty acid degradation、Propanoate metabolism、2-Oxocarboxylic acid metabolism、Butanoate metabolism、Pyruvate metabolism、Steroid biosynthesis、beta-Alanine metabolism、PPAR signaling pathway、Fatty acid

elongation、Fatty acid biosynthesis、Biosynthesis of unsaturated fatty acids の 13 経路等が検出された (図 12)。

栄養子宮絨毛における脂質関連因子の発現定量

RNA-Seq により得られた栄養子宮絨毛で発現遺伝子のうち、脂質関連因子の発現量を妊娠初期・中期群と妊娠後期・非妊娠群で比較した (図 13)。その結果、PPAR- γ や SREBF-1、FASN、ACACA、SCD、FADS 1/2、ELOVL1/6、LDLR 発現量が妊娠初期・中期群で上昇した。

アカエイの各組織における FASN 発現量の定量

妊娠期 (初期・中期) と非妊娠期の栄養子宮絨毛、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、腸管、卵巣、エピゴナル器官の FASN 発現量を比較したところ、妊娠時の栄養子宮絨毛で発現量が有意に上昇した (図 13)

非妊娠、各妊娠段階の栄養子宮絨毛で FASN、SREBF-1、FADS 1/2、ELOVL1/2 の発現量を比較したところ、FASN、SREBF-1、ELOVL1 は妊娠中期に、FADS1/2 は妊娠初期に発現量が有意に上昇した (図 14)。

In situ hybridization

各妊娠段階の栄養子宮絨毛の FASN 発現分布を確かめたところ、非妊娠期では一層の上皮にのみ FASN 発現が示され (図 16-A)、妊娠初期・中期では、上皮全体から FASN 発現が示された (図 16-B, C)。また、後期に

なると中央血管に隣接された上皮細胞にのみ FASN 発現が見られた (図 16-D)。これらの発現は、脂肪染色に結果と一致した。

子宮乳脂肪酸合成因子の発現定量

非妊娠、各妊娠段階の栄養子宮絨毛で FASN、SREBF-1、FADS1/2、ELOVL1/2 の発現量を比較したところ、FASN、SREBF-1、ELOVL1 は妊娠中期に、FADS1/2 は妊娠初期に発現量が有意に上昇した (図 17)。

考察

本研究によって、後述するようにアカエイ栄養子宮絨毛は、妊娠に伴い組織構造と、その機能を大幅に変化させることが明らかとなった。

非妊娠期の栄養子宮絨毛は繊維芽細胞で構成され、扁平で滑らかな上皮を持つことが明らかとなった。これは、*Myliobatis goobei* の報告と一致した (Collonelo et al. 2013)。しかし、PAS 染色で陽性反応を示すことから、ムコ多糖類の分泌能を持つことが推測される。哺乳類において子宮内の上皮細胞は常にムコ多糖類を分泌し、その中を湿潤させることから (<https://www.naro.go.jp/laboratory/nilgs/breeding/science/066581.html>)、非妊娠期のアカエイ栄養子宮絨毛においても同様の機能を持つことが推測された。また、脂肪染色により上皮細胞に微弱な脂肪染色が見られたことから、哺乳類の乳腺ほどではないが、非妊娠期においても多少の脂質蓄積を有することが示唆された。

妊娠初期は上皮に向かい伸長した毛細血管を基底とした立方上皮細胞に覆われており、組織が肥厚し、陰窩が形成される。SEMにより観察された上皮の網目構造は、組織構造変化によるものと推測される。これらの報告は、*Hypanus americanus* と *Myliobatis goodie*、*Manta alfredi* の知見に一致した (Hamlett, et al. 1996, Collonelo et al. 2013 Soma et al. 2013)。また妊娠初期の子宮乳は脂質をほとんど含まないが、栄養子宮絨毛の上皮細胞全体で脂肪染色が確認された。これと同様の機能は、哺乳類の乳腺や鳥類の素嚢に含まれる立方体上皮細胞や円柱上皮細胞で確認されている (Horseman.1995, Richert et al.2000)。哺乳類の泌乳初期では母乳の脂質含量は低く、新生児の成長に合わせて高栄養価の成乳を分泌することが報告されている (Macy 1949, Hamosh 2001, Ballard & Morrow 2013)。

妊娠初期の栄養子宮絨毛が脂質を蓄積する理由として、初期発達の胎仔は、卵黄からの栄養供給を受けるため、高栄養価な脂質を分泌する必要がないことが挙げられる。また、哺乳類の泌乳初期では母乳の脂質含量は低く、栄養よりも抗体や抗菌物質等の健康をサポートする機能をもつことが知られており (Macy 1949, Hamosh 2001, Ballard & Morrow 2013)、アカエイにおいても立方上皮細胞に栄養を蓄積することにより、乳成分を調節することが示唆された。一方、Collonelo et al. 2013での *Myliobatis goodie* の組織学的な研究では、栄養子宮絨毛の立方上皮細胞が分泌型であるという報告なされている。アカエイの場合は多少のタンパク質は分泌するもの

の、*Myliobatis goodie*とは異なった機能を持つことが示唆された。

妊娠に伴う栄養子宮絨毛における毛細血管の伸長は、*Hypanus americanus*や*Myliobatis goodie*、*Charcharias carcharodon*等の知見と一致した。このことから血管と外界（子宮内）の距離を縮めることで子宮内への酸素供給能を高める（Hamlett et al. 1996, Collonelo et al. 2013, Sato et al. 2016）可能性が示唆された。また、これは多種を含めた栄養子宮絨毛に共通する機能である可能性が示唆された。

妊娠中期では、組織上皮の網目状構造が顕著になり、陰窩が深くなった。これは妊娠初期で確認された毛細血管を基底とした立方上皮細胞が消失したことにより、網目が薄くなったことが起因すると考えられる。妊娠初期において、TUNEL法により外縁部の上皮細胞にのみDNAの断片化が見られたことから、妊娠中期の立方上皮細胞の消失はアポトーシスによって、引き起こされることが示唆された。また、陰窩基底には円柱上皮細胞が観察された。円柱上皮細胞は様々な生物において分泌組織に存在し、蓄えた物質の外分泌を行う。そこに脂肪染色が示されことから、栄養子宮絨毛における子宮乳の分泌が示唆された。このことからSEM観察による陰窩内から確認された分泌物も子宮乳である可能性が高まった。

毛細血管の外界（子宮内）への露出は、*Hypanus americanus*や*Myliobatis goodie*、*Charcharias carcharodon*との報告とは異なった（Hamlett et al. 1996, Collonelo et al. 2013, Soma et al. 2013, Sato et al. 2016）。一般的な胎生板鰓類の胎仔は卵膜に包まれ1匹ずつ子宮内で区切

られた小部屋に隔離されて育つが、子宮乳型板鰓類の場合、胎仔は卵膜に包まれず、全胎仔が同じ子宮空間で育つ (Hamlett et al. 2005)。また、アカエイの場合は、他の子宮乳型板鰓類と比べて産仔数が多いため (Furumitsu et al. 2020)、子宮内への酸素要求量は高いことが推測される。そのため、栄養子宮絨毛における血管の露出は、子宮内へのより効率の良い酸素供給に適応であると示唆された。また、胎仔は成長に伴い酸素要求量は上昇するが、子宮内の溶存酸素量は常に一般的な海洋環境と同様に維持されていたことは、この示唆を強く支持した。

妊娠後期では組織上皮の網目は太くなったが、組織は委縮した。陰窩内の上皮細胞は崩壊していたが、脂肪染色が陽性であった。また、TUNEL法により、上皮細胞全体から DNA の断片化が検出されたことから、細胞の崩壊を裏付けた。哺乳類の場合、死滅した細胞は、再び乳腺細胞に再吸収されるが (Strange et al. 1992)、乳を分泌する一部の鳥類は、素囊にある乳を合成する上皮細胞を脱落させ、乳として分泌する (Davies 1939)。

後期の子宮乳は全固形分が高く、多くの細胞内代謝酵素が含まれ (第一章を参照)、栄養子宮絨毛の陰窩に多量の分泌物が確認されたことから、後期子宮乳は鳥類の素囊乳のように、栄養子宮絨毛の脱落した細胞を含むことが示唆された。この泌乳方法の利点は明らかでないが、おそらく出産間際の胎仔に、最後の栄養供給をするため、細胞内代謝物質や全固形分を増やした高栄養の子宮乳を与えるのかもしれない。

分子生物学的解析では、まず、各段階の発現遺伝子の動態を探るため、

RNA-Seq で発現定量した分子を PCA 解析とクラスター解析に供した。妊娠初期・中期と妊娠後期・非妊娠期の二群にクラスター化されたことは、前者は妊娠に伴う機能を獲得し、後者は非活性状態にあることが考えられる。妊娠後期も子宮乳を分泌することが確認されているが、*Myliobatis goodie* と同様に組織の萎縮が始まることから (Collocelo et al. 2013)、その機能は衰退し、非妊娠時と同様の遺伝子動態になると示唆される。

Pathway 解析の結果、妊娠時に有効になる発現遺伝子の 36 経路には、妊娠時の乳合成に有効であると生合成経路が複数確認された。このことから鳥類の素囊は、栄養物質の生合成経路を持たないため (Gillespie et al. 2011)、アカエイの栄養子宮絨毛は、素囊より、様々な栄養物質を生合成する乳腺に近い機能をもつことが推測される。

妊娠初期・中期の栄養子宮絨毛は、まず、ATP 関連経路の上昇から細胞内代謝が上昇すると推測される。また、哺乳類の乳腺では、タンパク質と脂肪酸合成の際に多くの ATP が消費される (Anderson et al. 2007) ことが明らかとなっている。

アミノ酸・タンパク質に関連する 6 経路の活性化は、アミノ酸の生合成やタンパク質合成の活性化や輸送機能の向上を示唆した。とくに Protein processing in endoplasmic reticulum 経路は、乳腺上皮細胞においてもみられるもので、エキソサイトシスによる乳タンパク質の分泌に関与する (Jenness 1974, Honvo-Houéto et al. 2016)。

Biosynthesis of antibiotics 経路は、抗生物質を合成する Pathway であ

るが、細胞内の鉄制御因子である ACO 1 が含まれる。ACO1 の発現は、ヘモグロビンに活性を与え (Oskarsson et al. 2020) 、細胞内において、酸素と結合した鉄の動態に影響することによって、栄養子宮絨毛の酸素供給機能をサポートする可能性がある。また、ACO1 発現量の増加は脂肪細胞の成長や脂質合成を促進させることから (Moreno et al. 2015)、細胞内での脂質生合成の活性化が示唆された。妊娠初期・中期の栄養子宮絨毛では実際に 13 種の脂質関連経路の活性が確認されている。硬骨魚類は脂肪細胞を持つものの (Oku et al. 2000, 2002, 2006ab)、板鰓類は脂肪細胞を持たないことが知られている (Ballantyne 1997)。しかし、栄養子宮絨毛の上皮細胞における脂質関連経路と、遺伝子の動態は脂肪組織を彷彿させた。脂質関連因子の発現量を詳細に見てみると、妊娠初期・中期で脂質 PPAR- γ の発現量上昇が見られた。PPAR- γ は肝臓や脂肪細胞に発現し、脂肪酸合成のマスターレギュレーターとして機能する (König et al. 2009)。硬骨魚類の脂肪細胞では PPAR- γ は、脂肪酸生合成や不飽和化遺伝子の発現上昇や、LPL の発現量の低下を誘導することが明らかとなっており (Oku et al. 2002, 2006a,b)、アカエイにおいても SREBF-1、FASN、ACACA、SCD、FADS 1/2、ELOVL1/6、LDLR の発現が PPAR- γ によって誘導された可能性が示唆された。これらの遺伝子発現経路は、タンパク質・脂質の生合成に関与するものであり、栄養子宮絨毛での子宮乳合成を示唆させた。

栄養子宮絨毛での子宮乳合成を検証するために、泌乳期の乳腺で遺伝子

発現量が飛躍的に上昇する遺伝子 FASN (Suburu et al. 2014) の発現量を妊娠・非妊娠期の栄養子宮絨毛と他 7 組織で比較したところ、妊娠時の栄養子宮絨毛で発現量が有意に上昇した。また、FASN は脂肪酸合成に最も密接に関わる分子であり、栄養子宮絨毛におけるその発現分布は、およそ脂質の分布と一致していた。また、定量 PCR により、子宮乳に含まれる脂肪酸群や乳脂肪球被膜を構成する超長鎖脂肪酸を合成する因子の発現量は、妊娠初期・中期いずれかで有意に上昇することから栄養子宮絨毛での子宮乳の合成が強く示唆された。また、ELOVL2 の遺伝子発現量が妊娠時に上昇しないことから、子宮乳に含まれる DHA や EPA は食物由来であることが推測される。

結論として、本章はアカエイ栄養子宮絨毛の妊娠に伴う組織構造と遺伝子発現の変化を詳細に捉えた初めての研究である。

妊娠初期の栄養子宮絨毛は、上皮に網目状構造を発達させ、子宮乳の合成・蓄積や子宮内への酸素供給を始める。中期では、網目状構造が顕著になり、子宮内への酸素供給効率を上げ、子宮乳合成能を維持したまま、分泌細胞を発達させ、子宮乳の分泌を行う。後期には、子宮乳の合成は終るが、上皮細胞を脱落させ、それを含んだ高栄養価の乳を分泌することが示唆された。

表 1 .RT-PCR に用いたプライマー対

遺伝子名	Fw/Rv	配列	長さ(bp)	Tm 値(°C)
FASN	FW	ttgctgccactgragracttg	20	51
	RV	acctcagagagtykgtaatctcc	21	52
SREBF1	FW	tgagtgcttttgacagtccag	21	52
	RV	ttgctgaatgtgctggagatg	21	52
FADS1	FW	agcaaataccaagtgaaccatc	22	53
	RV	tggaagcttctttccaagac	21	52
FADS2	FW	agcggatgtagtacgttgttg	21	52
	RV	aggaccagatgtgaacatgc	21	54
ELOVL1	FW	tcagaartacctctggtgga	20	50
	RV	atcacctccccattttccas	20	50
ELOVL2	FW	tcctatttaccacactcttcc	22	53
	RV	agcactgtgaagattctgacac	22	53
GAPDH	FW	agaaggcttcggctcatctgaag	23	57
	RV	taggcgtggactgtcgtcatc	21	56

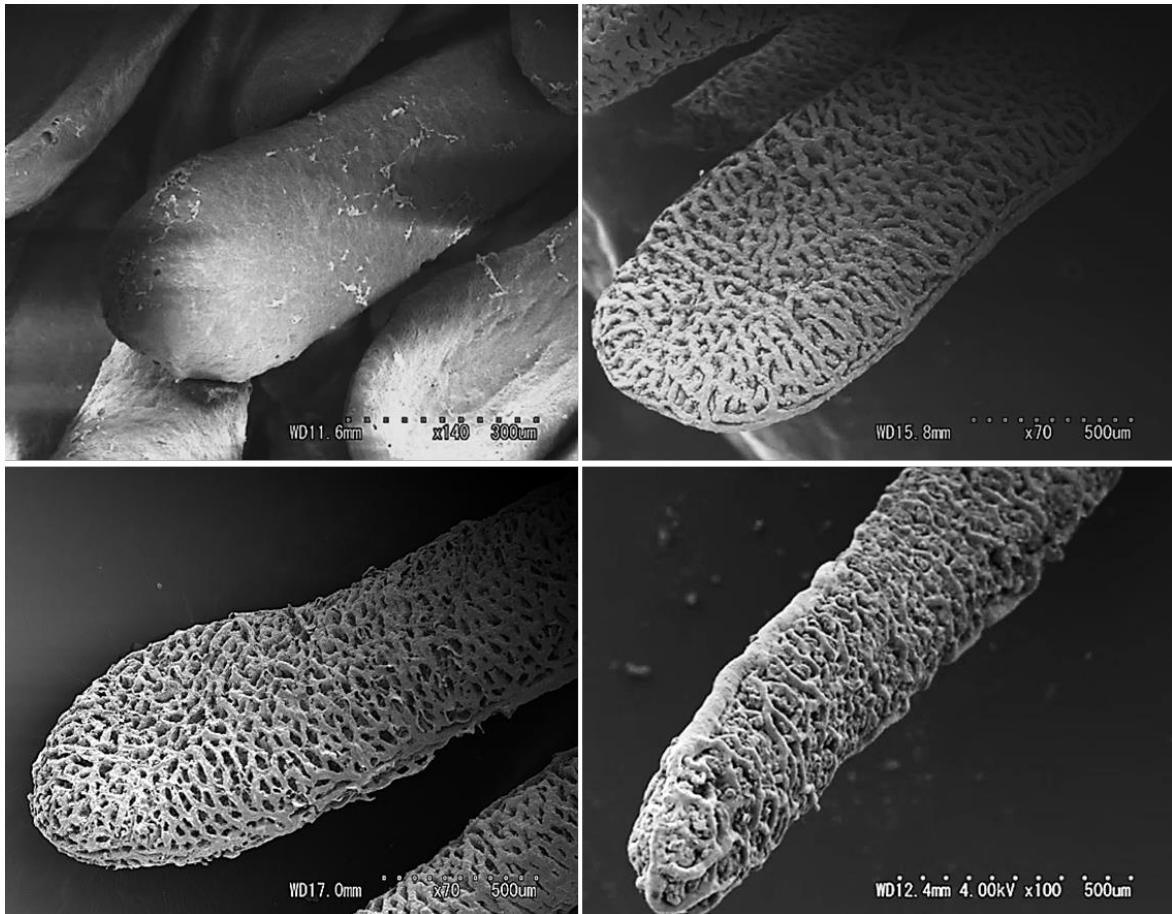


図1. 走査型電子顕微鏡による各段階のアカエイ栄養子宮絨毛の上皮構造の観察

A: 非妊娠期の栄養子宮絨毛。扁平で滑らかな上皮を持つ。B: 妊娠初期の栄養子宮絨毛。上皮に網目状構造が形成される。組織沿岸部に血管が走行する。C: 妊娠中期の栄養子宮絨毛。網状構造が顕著になり、スポンジ状になる。D: 妊娠後期の栄養子宮絨毛。組織沿岸部に走行する血管が肥大する。

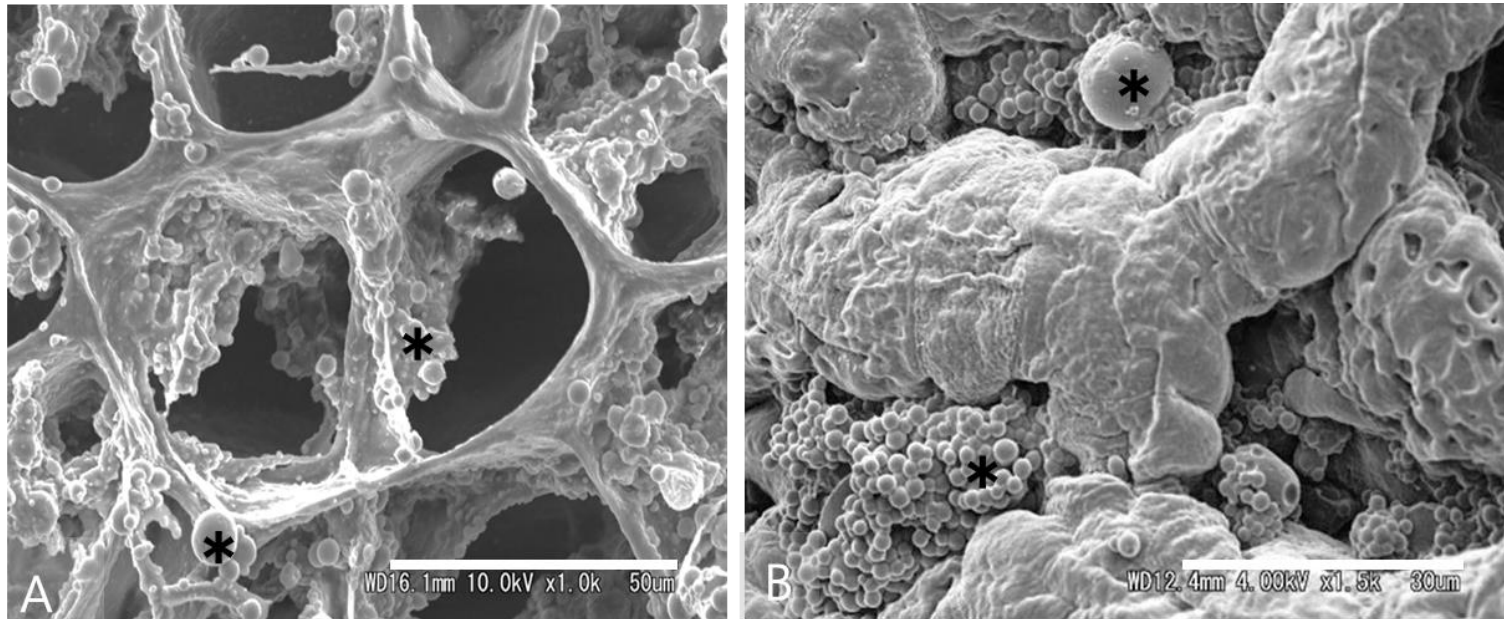


図 2. 走査型電子顕微鏡による、妊娠中期・後期のアカエイ栄養子宮絨毛の陰窩内の観察

A：妊娠中期の栄養子宮絨毛の陰窩。分泌物様物質（*）が観察される。B：妊娠後期の栄養子宮絨毛の陰窩。陰窩内は分泌物様物質（*）が詰まっていた。

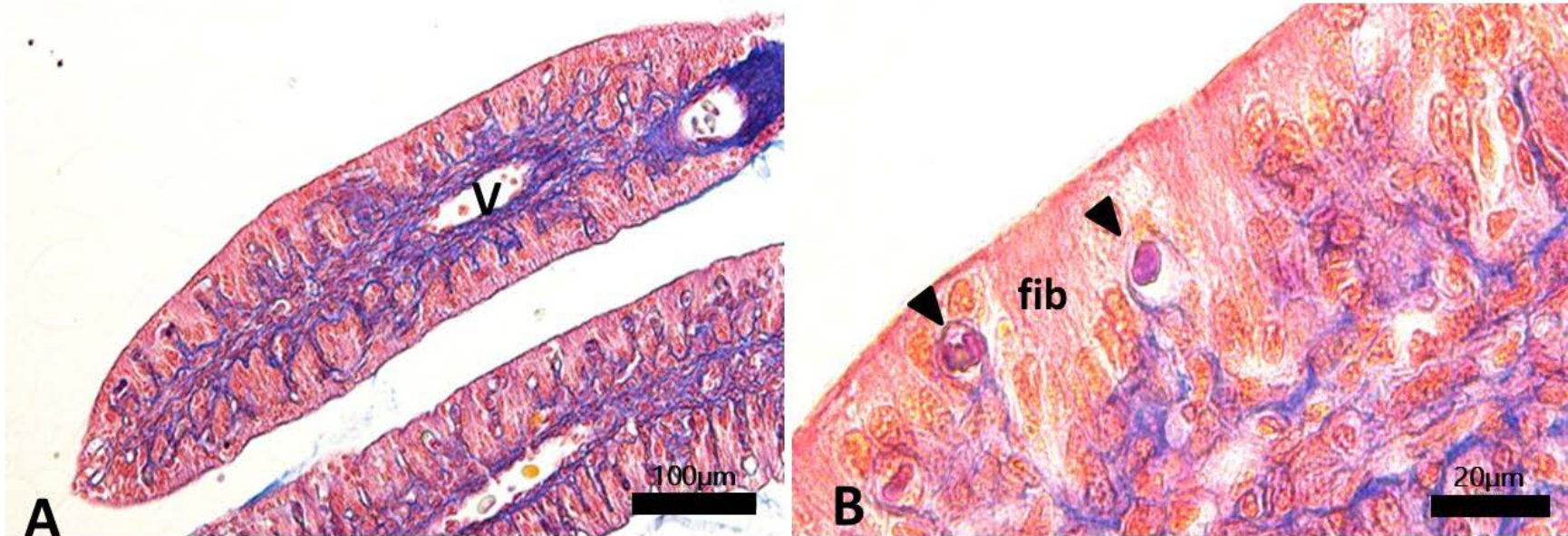


図 3. AZAN 染色による非妊娠期のアカエイ栄養子宮絨毛の組織構造の観察

A : 組織中央に血管 (V) が走行し、上皮は扁平である (×200)。B : 組織は繊維芽細胞 (fib) によって構成され、楕円形の核が見られる。上皮に向かって毛細血管 (矢印) が伸長している (矢印) (×1000)。

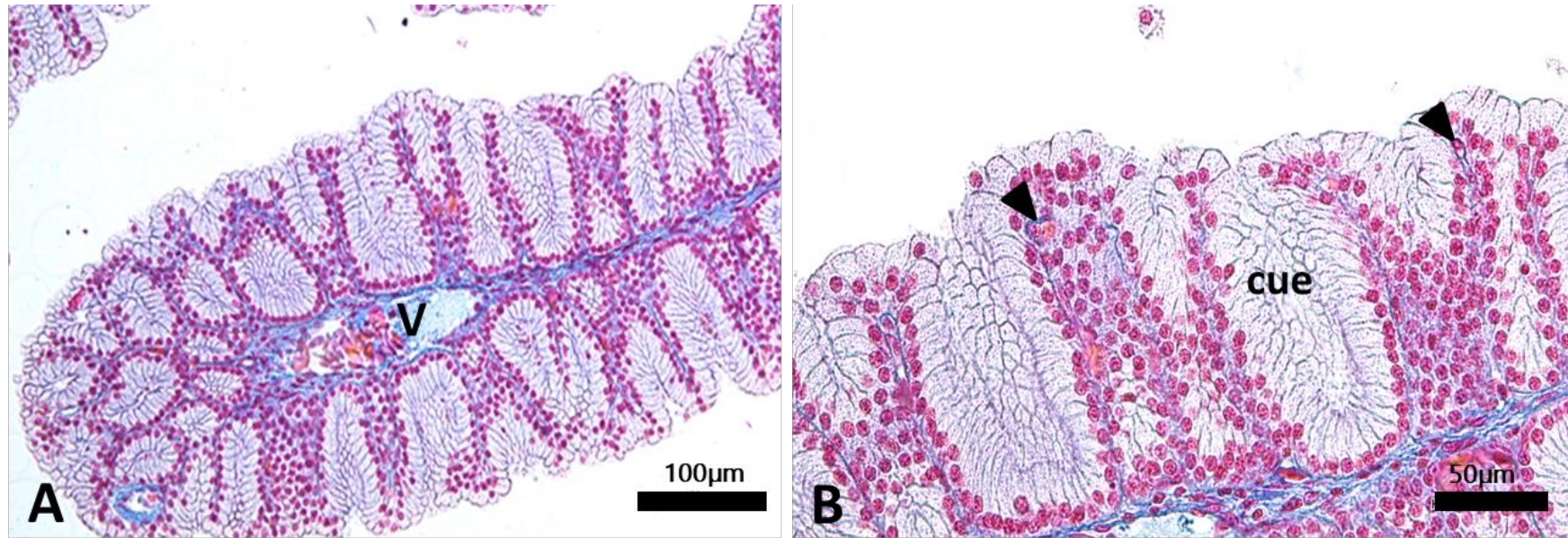


図 4. AZAN 染色による妊娠初期のアカエイ栄養子宮絨毛の組織構造の観察

A: 組織中央に血管 (V) が走行し、上皮は肥厚した ($\times 200$)。B: 毛細血管 (矢印) がさらに伸長し、それに沿って立方上皮細胞 (cue) が見られた ($\times 400$)。

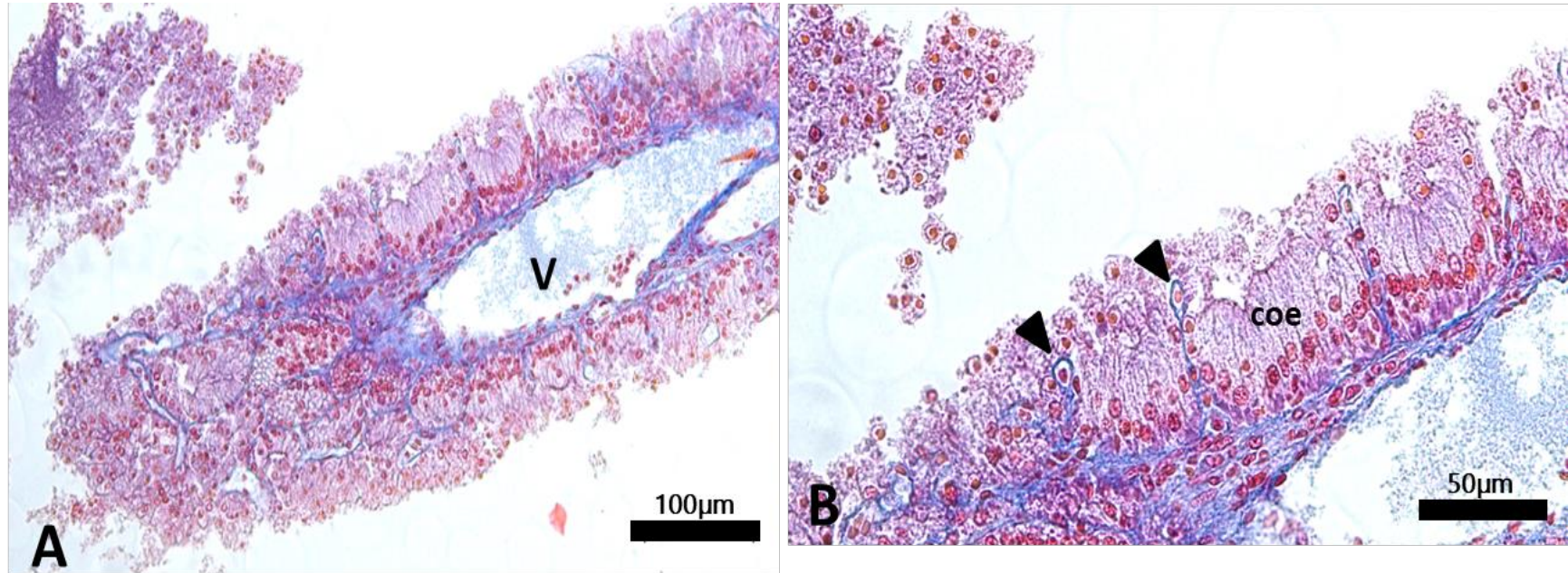


図 5. AZAN 染色による妊娠中期のアカエイ栄養子宮絨毛の組織構造の観察

A: 組織中央に血管 (V) が走行し、上皮は少し萎縮した ($\times 200$)。B: 毛細血管 (矢印) がさらに伸長し、組織外に露出した。妊娠初期に見られた立方上皮細胞が消失し、円柱上皮細胞 (coe) が観察された ($\times 400$)

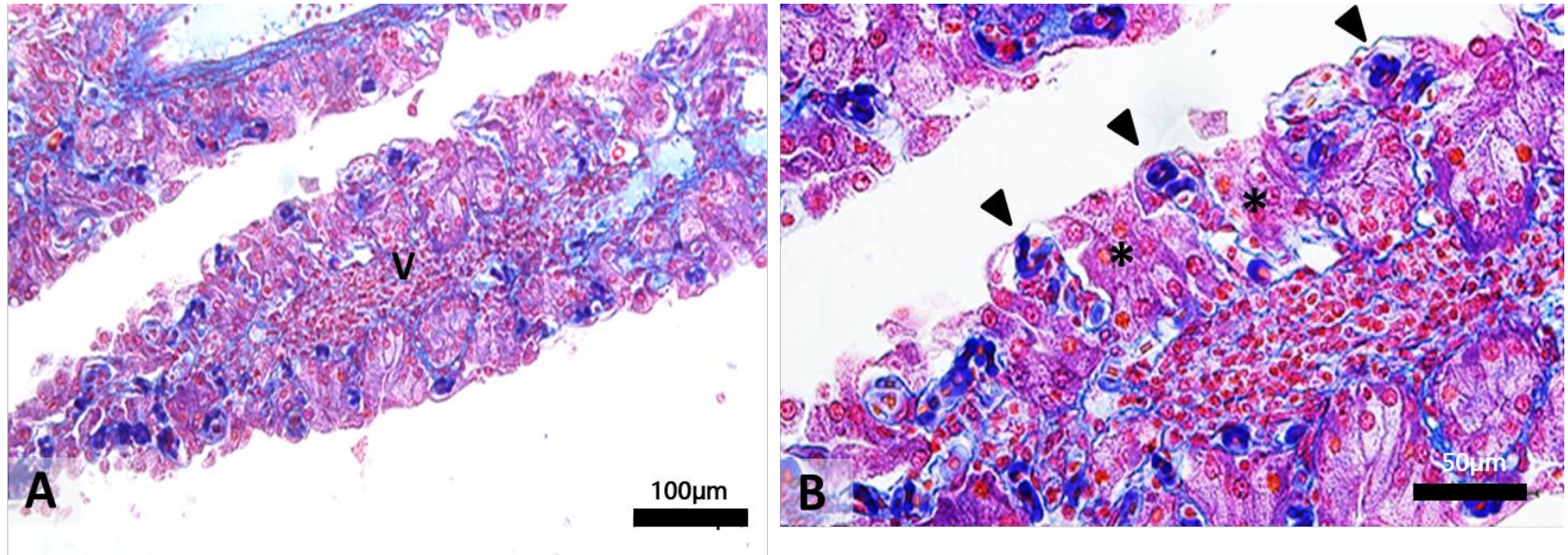


図 6. AZAN 染色による妊娠後期のアカエイ栄養子宮絨毛の組織構造の観察

A : 組織中央に血管が走行し (V)、組織は中期の栄養子宮絨毛よりも萎縮した (×200)。B : 毛細血管 (矢印) の組織外への露出が顕著になった。また、毛細血管の間に見られた上皮細胞が崩壊しているような像が得られた (*) (×40)

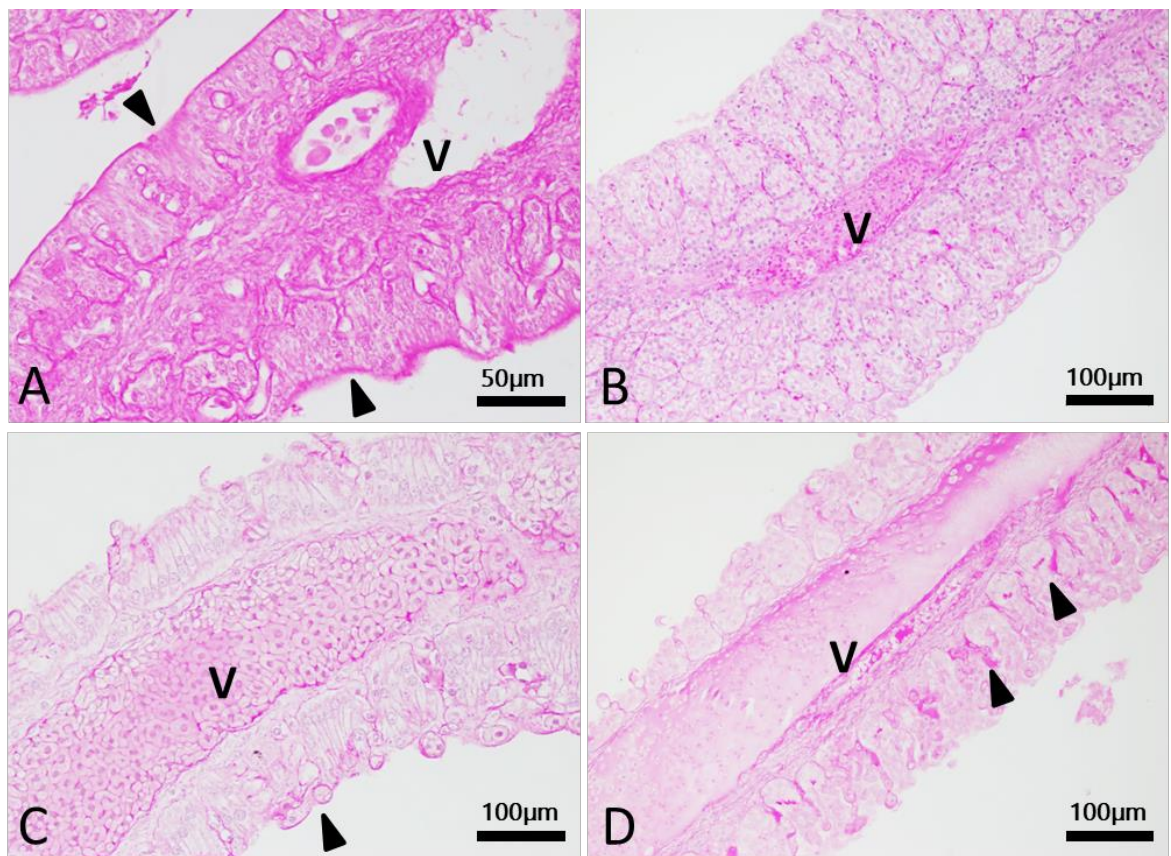


図 7. PAS 染色による各段階のアカエイ栄養子宮絨毛のムコ多糖類の検出
 A：非妊娠期の栄養子宮絨毛。組織全体および上皮外縁部に強い染色が認められた（×400）。B：妊娠初期の栄養子宮絨毛。PAS 染色は認められなかった（×200）。C：妊娠中期の栄養子宮絨毛。組織外縁部に染色が微弱的な染色が認められた（×200）。D：妊娠後期の栄養子宮絨毛。陰窩内部に染色が認められた（×200）。V：中央血管、矢印：PAS 染色陽性

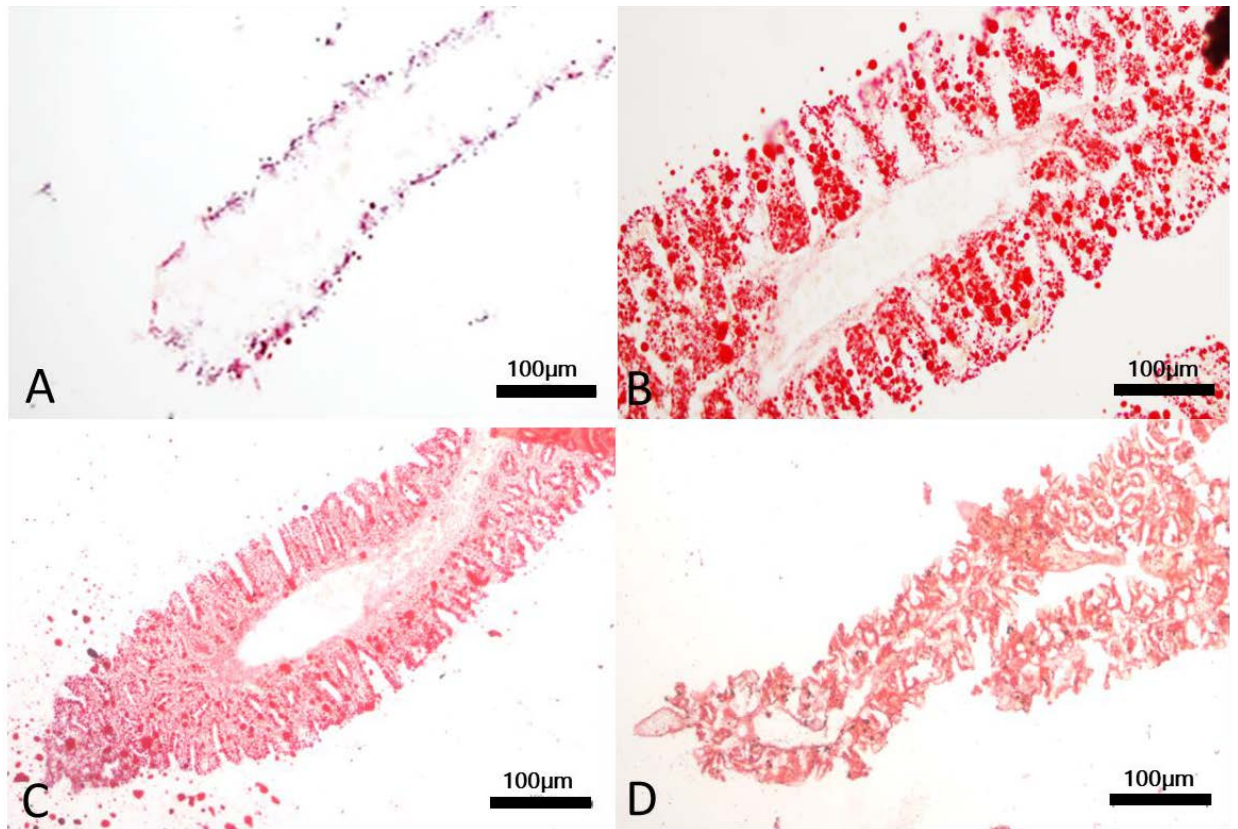


図 8. 脂肪染色による各段階のアカエイ栄養子宮絨毛の脂質の検出

Oil-red-O 染色によって、脂質が赤く染まる。A：非妊娠期の栄養子宮絨毛。上皮外縁部にのみ脂肪染色が認められた。B：妊娠初期の栄養子宮絨毛。上皮細胞内に脂肪染色が見られた。C：妊娠中期の栄養子宮絨毛。組織全体に強い脂肪染色に見られた。また、陰窩内も染色された。D：妊娠後期の栄養子宮絨毛。中央血管に隣接した上皮細胞にのみ脂肪染色が見られた。

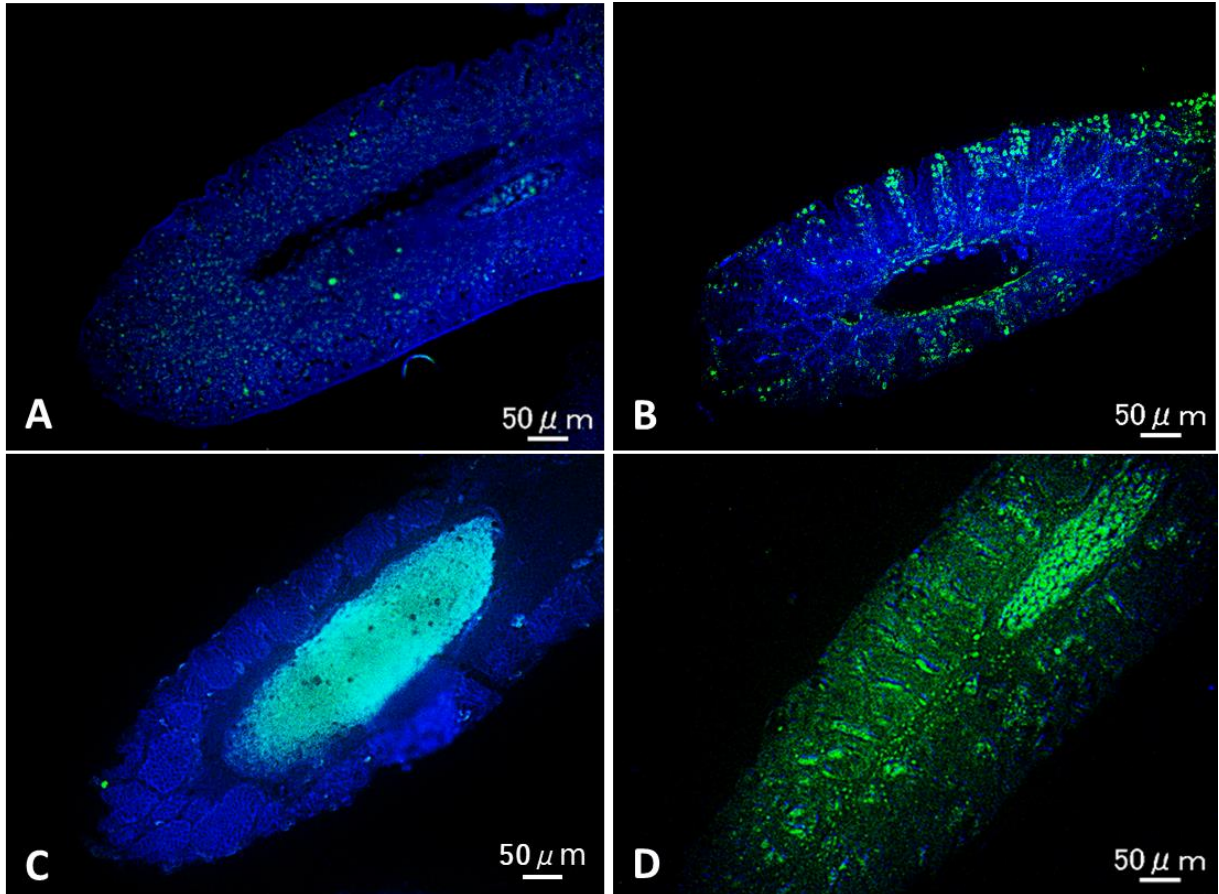


図 9. TUNEL 法によるアポトーシスの検出

A : 非妊娠期の栄養子宮絨毛。組織内で微弱な DNA 断片化が見られた。B : 妊娠初期の栄養子宮絨毛。外縁部の上皮細胞で DNA の断片化が見られた。C : 妊娠中期の栄養子宮絨毛。DNA の断片化は見られなかった。D : 妊娠後期の栄養子宮絨毛。上皮細胞全体で DNA の断片化が見られた。緑 : DNA の断片化、アポトーシス、(12-dUTPn フルオレセイン)、青 : 正常な遺伝子、核 (DAPI)。

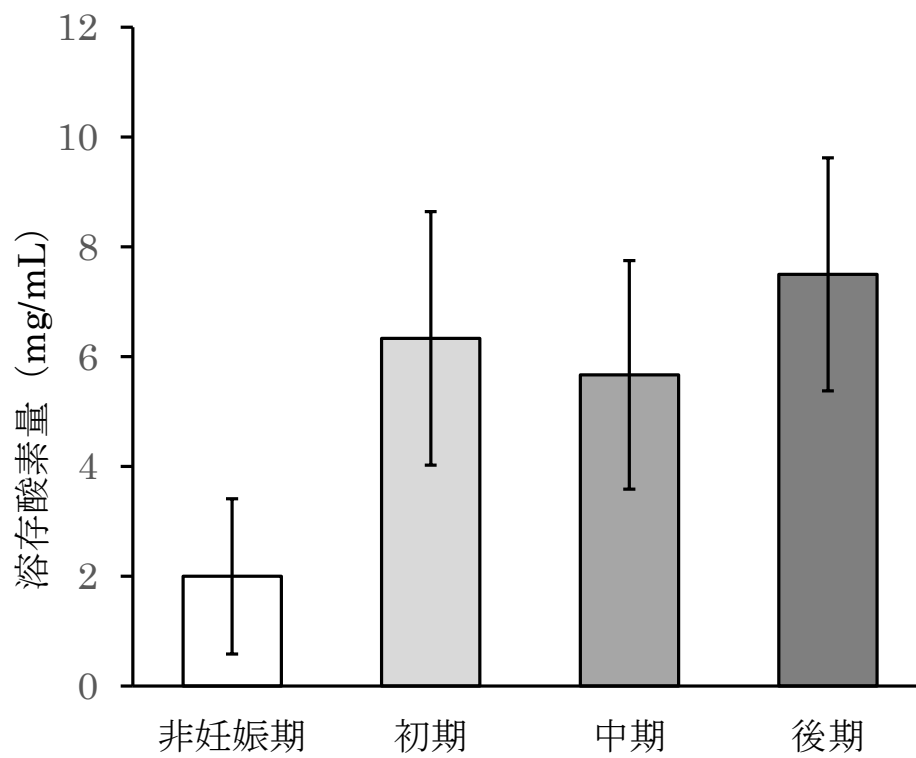


図 10. 各段階のアカエイ子宮内液の溶存酸素量 (mg/mL)

非妊娠期・妊娠後期 (n=2) と妊娠初期・中期 (n=3) の子宮内液の溶存酸素量を測定した。

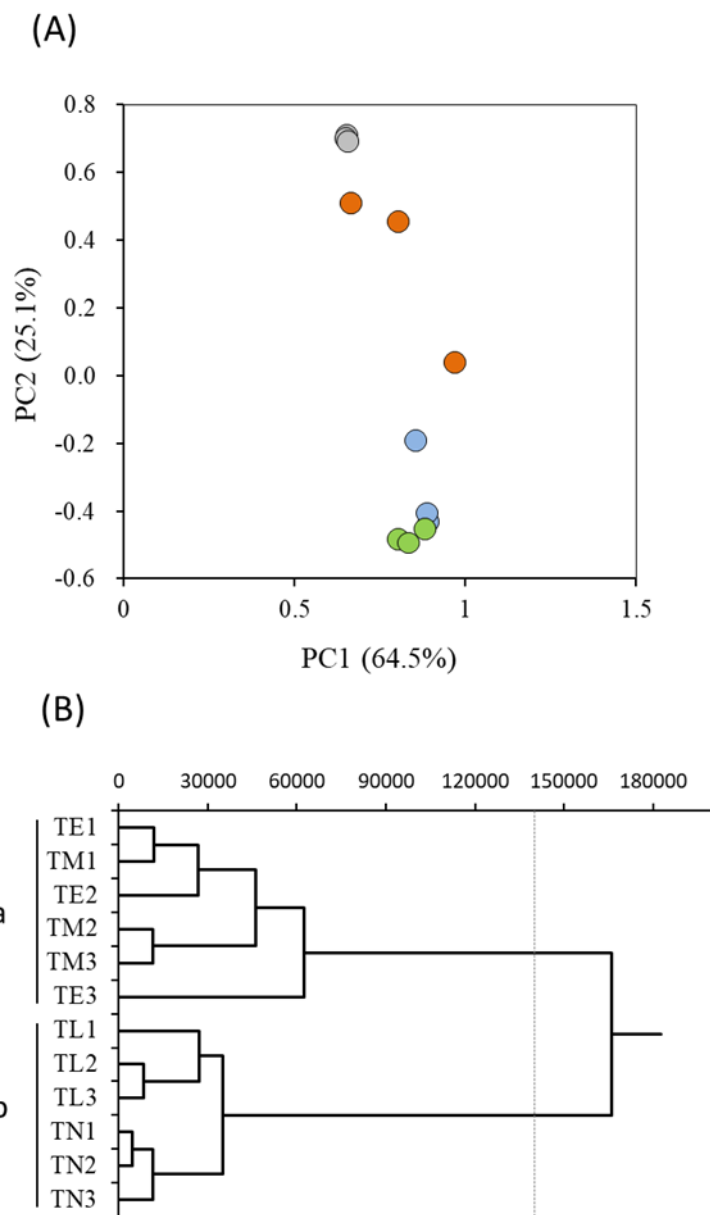


図 11. 各段階のアカエイ栄養子宮絨毛の発現遺伝子の類似性分析

(A) 栄養子宮絨毛の発現遺伝子の主成分分析スコアのプロット。 青色：妊娠初期、緑色：妊娠中期、橙色：妊娠後期、灰色：非妊娠期 (n = 3)。(B) 栄養子宮絨毛における、ウォード法を用いたクラスター解析。a:は妊娠初期・中期群で b:は妊娠後期・非妊娠期群。

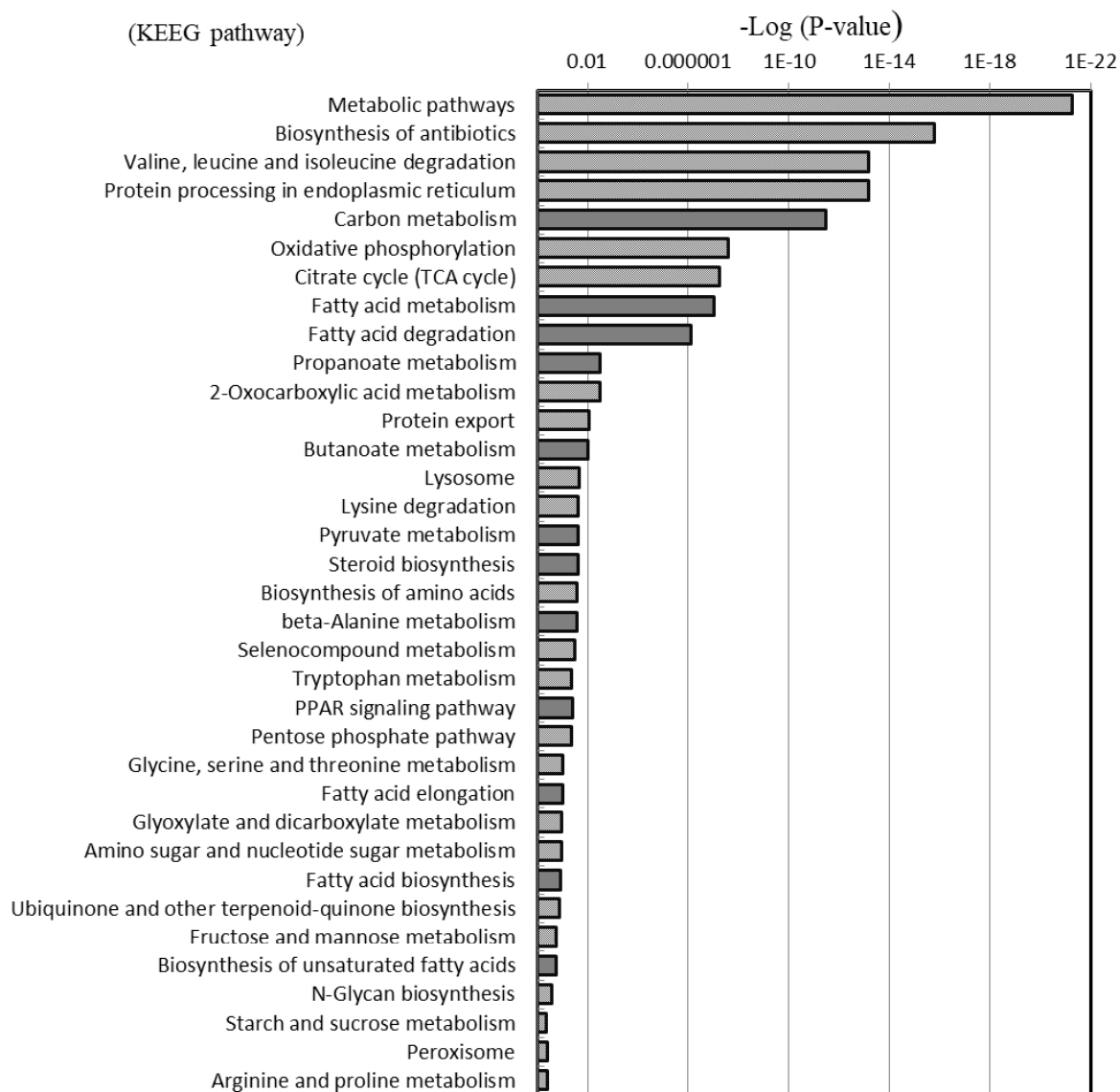


図 12. 妊娠初期・中期の栄養子宮絨毛で発現量が上昇する遺伝子を用いた Pathway 解析

Callorhinchus milli のリファレンスデータにヒットした 373 遺伝子で 36 個の生体内 Pathway が得られた。ここに示された経路は全て、妊娠初期・中期に有効になる経路である。

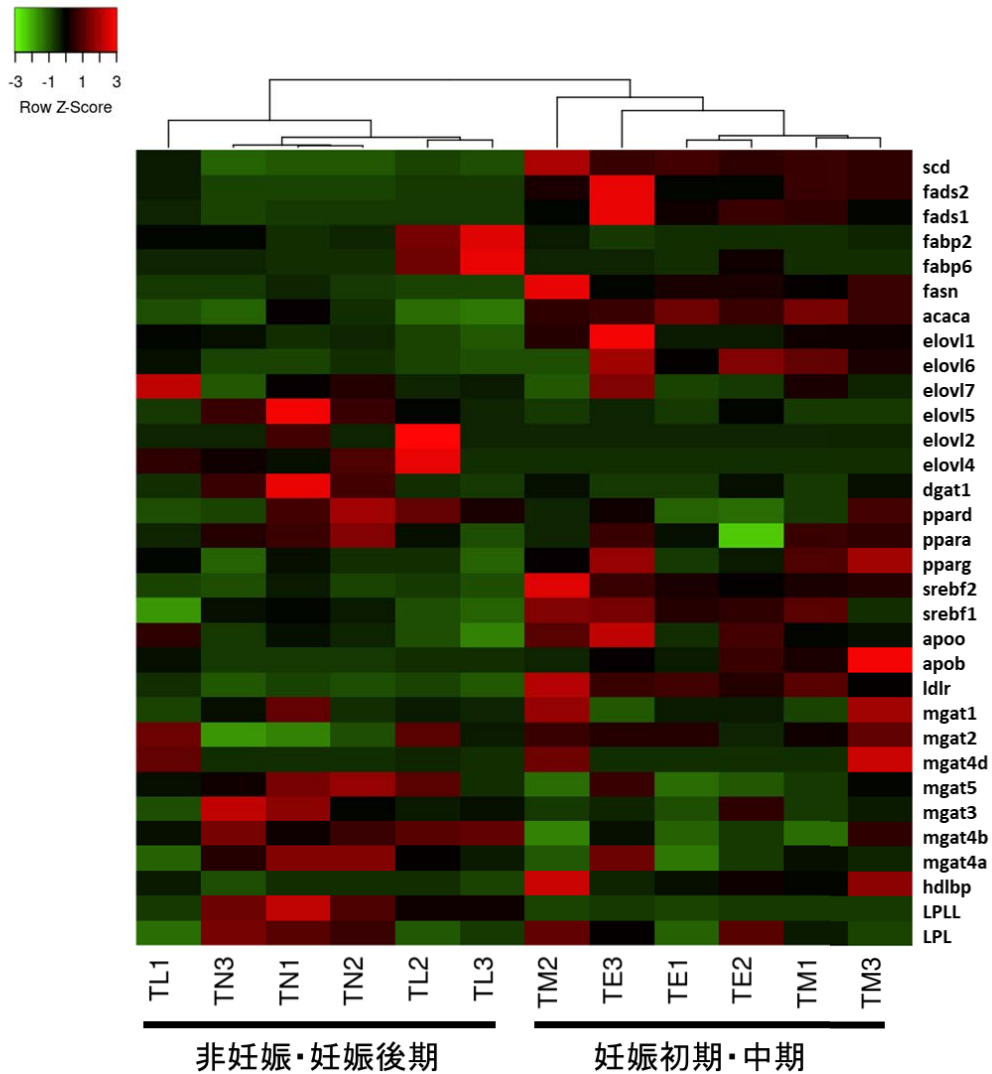


図 13. 各段階にアカエイ栄養子宮絨毛における脂質関連因子の発現量 (RPKM) のヒートマップ

TE: 妊娠初期、TM: 妊娠中期、TL: 妊娠後期、TN: 非妊娠期。行は遺伝子を、列は各サンプルを表す。濃い緑は各遺伝子発現のレベルが平均よりも低いことを、濃い赤は平均よりも高いことを示す。

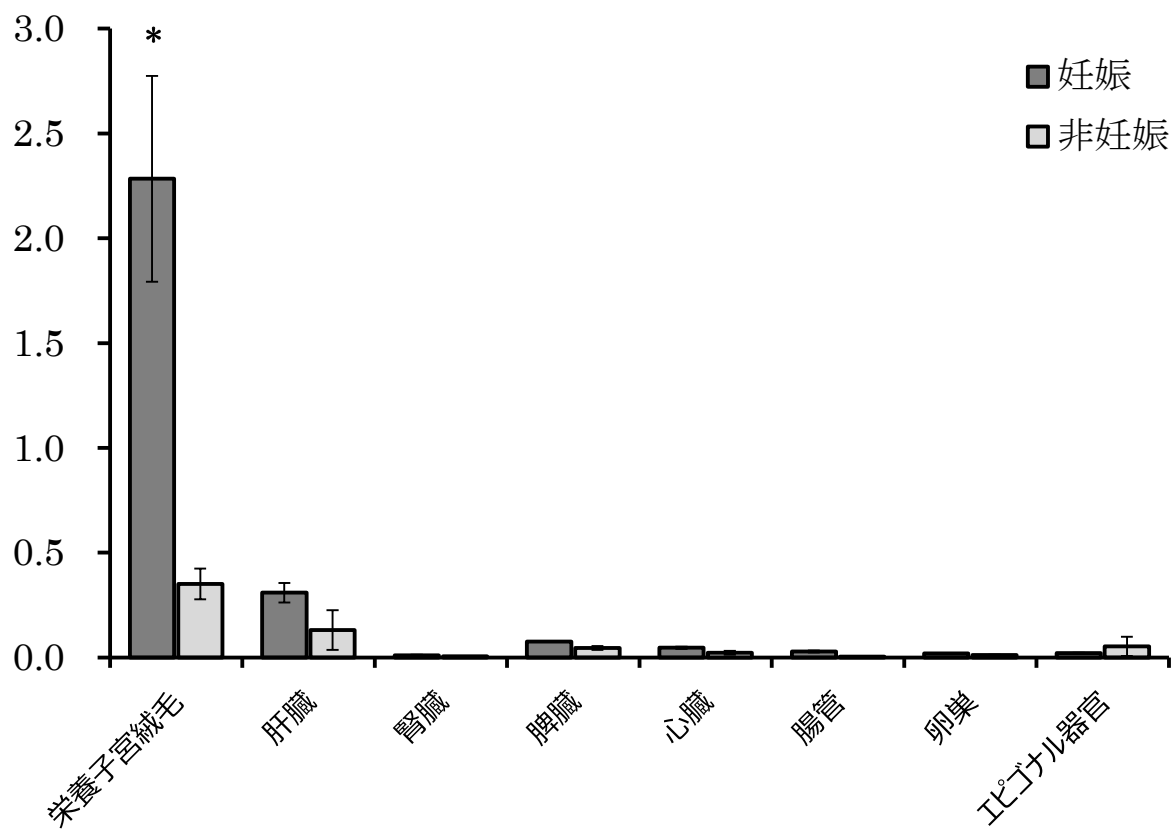


図 14. アカエイの 8 組織間における FASN 発現量比較

非妊娠・妊娠時のアカエイから採取した栄養子宮絨毛、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、腸管、エピゴナル器官（各 n=3）の脂肪酸合成酵素（FASN）の発現量を定量 PCR で定量比較した。

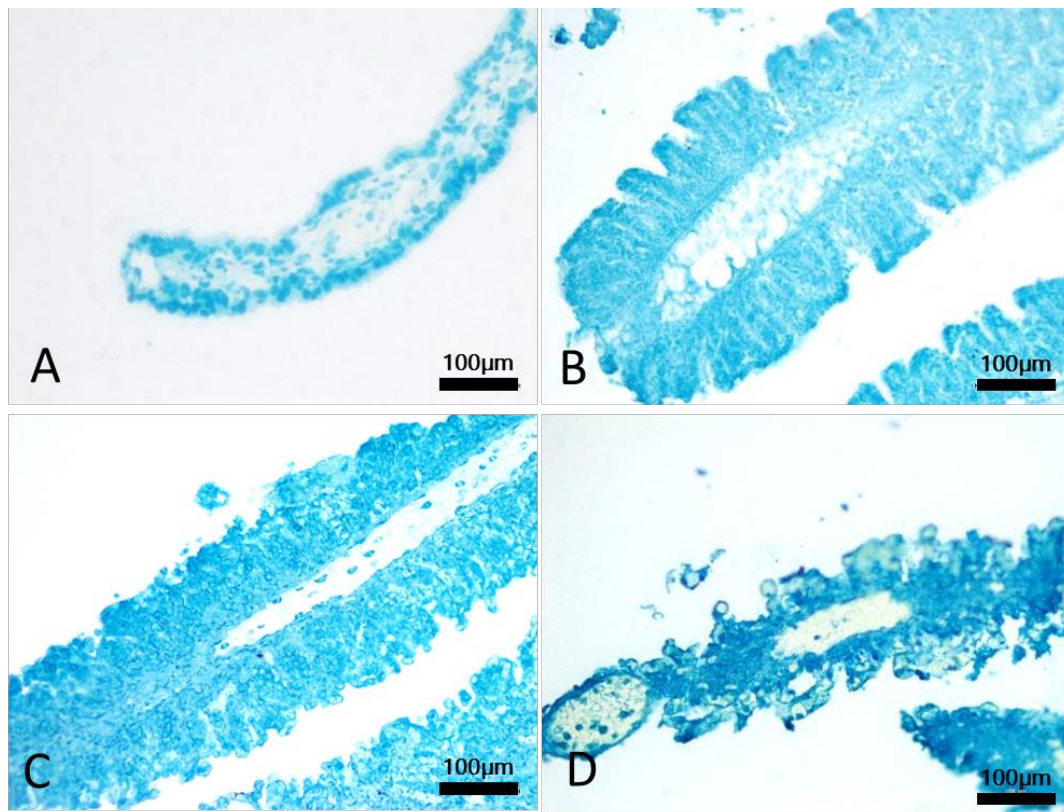


図. 15 各段階のアカエイ栄養子宮絨毛における脂肪酸合成酵素 FASN の発現分布

A : 非妊娠期では一層の上皮にのみ FASN 発現が示された (×200)。B : 妊娠初期中期では、上皮全体から FASN 発現が示され、上皮沿岸部で染色が強まった (×200)。C : 中期では、上皮全体から FASN 発現が示された (×200)。D : 後期になると中央血管に隣接された上皮細胞にのみ FASN 発現が見られた (×200)

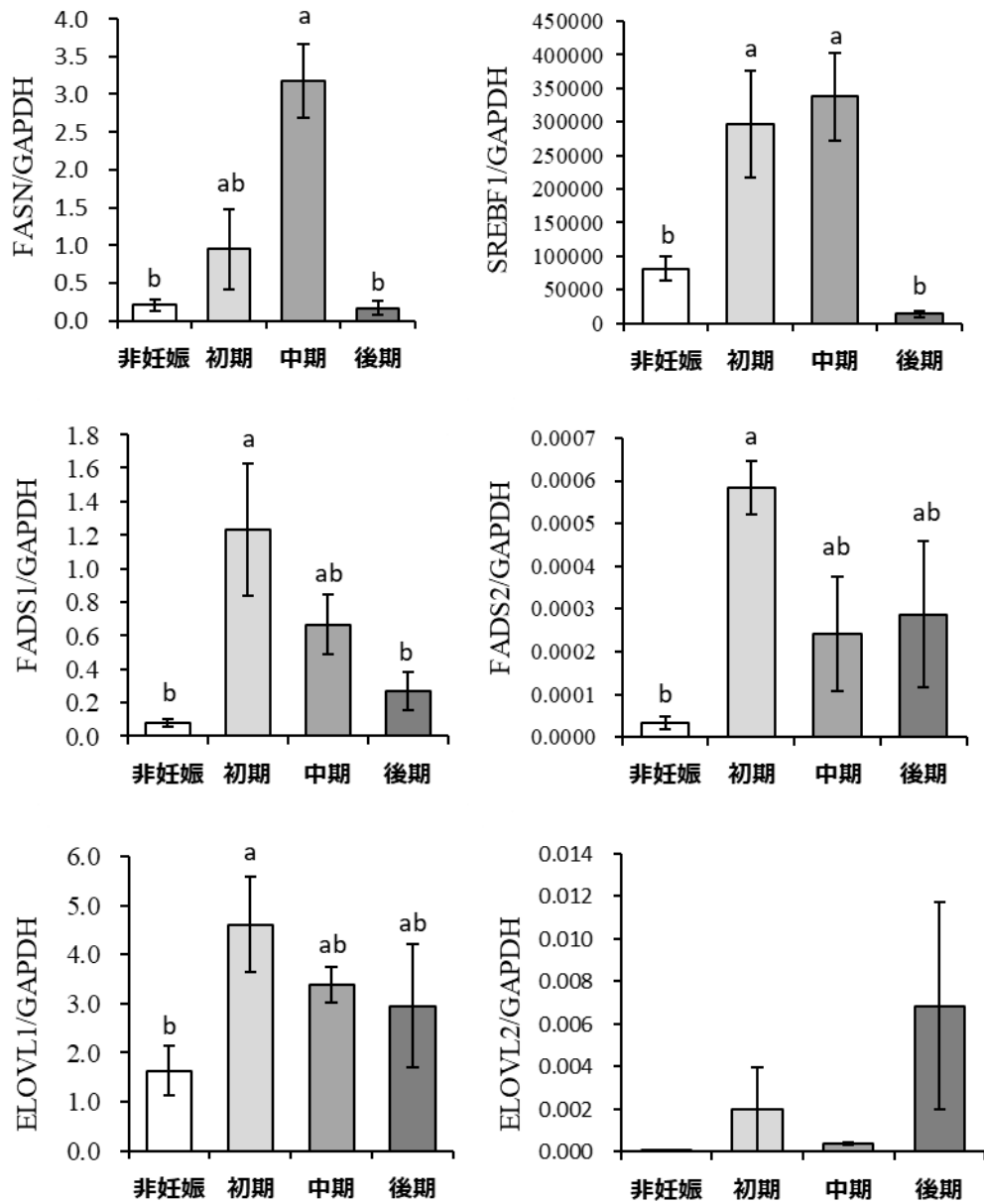


図 17. 各段階にアカエイ栄養子宮絨毛における子宮乳脂質の合成関連因子の発現定量 (各 n=3)

各段階の栄養子宮絨毛の各遺伝子発現量を Turkey-Kramer の有意差検定をした結果、有意差を持つものは別のアルファベットが記されている

第3章

泌乳を誘導する機構の解明

緒言

哺乳類や一部の鳥類はプロラクチンの作用によって泌乳・乳合成が促される (Horseman and will 1984, Suburu et al. 2014)。プロラクチンは哺乳類の乳腺や鳥類の素囊の上皮細胞の受容体に結合することで組織の分化・発達や、乳タンパク質および脂質の合成・蓄積を誘発する。

哺乳類において乳腺の初期発達には 17β -エストラジオールやプロゲステロンが作用し乳管形成、乳腺胞が形成される (Brisken et al. 1998)。初期発達を終えた乳腺はプロラクチンの作用を受けることで、乳腺上皮細胞の増加が起きる (Horseman 1999)。妊娠中はプロラクチン、 17β -エストラジオール、プロゲステロンの血中濃度は高く保たれるが、プロゲステロンが脳下垂体におけるプロラクチンの分泌と受容体への結合を阻害することで乳の合成を抑制する (Djiane and Durand 1977, Brann et al. 1988)。分娩後は血中 17β エストラジオールとプロゲステロンは減少し、乳腺上皮細胞でプロラクチン受容体が高発現する (酒井 1992)。そして、血中で高濃度に保たれたプロラクチンが乳腺上皮細胞のプロラクチン受容体に結合することで乳腺組織の発達が完了し、乳の合成経路を活性化させる (Suburu et al. 2014)。

哺乳類の子宮はミューラー管の発達により形成される (Cunha et al. 2018)。また、 17β -エストラジオールが子宮内膜を肥厚させ、プロゲステロンは子宮腺の

発達を促す (Franco et al. 2012, Cunha et al. 2018) ことで子宮が発達し、妊娠が可能となる。

子宮乳型板鰓類アカエイは、子宮内壁を覆う栄養子宮絨毛から子宮乳を分泌することが知られる。従って栄養子宮絨毛は、子宮組織の一部でありながら哺乳類の乳腺のような特性を持つ組織である。板鰓類もミューラー管を持つことが知られており (菊池ら 2021)、卵が卵管に排卵されることで子宮が発達することが明らかとなっている (Hamlett et al. 1993)。

哺乳類の泌乳機構については上記で記した通り様々な研究が為されている。しかし子宮乳型板鰓類の場合、栄養子宮絨毛の発達や泌乳誘導機構に関する研究は存在しない。そのため、板鰓類における泌乳や栄養子宮絨毛の発達が哺乳類の乳腺のようにホルモンにより誘導されるのか、子宮の発達の延長線上で誘導されるのかさえ定かではない。

本研究は、乳腺の泌乳機構と子宮の発達機構を考慮し2つの仮説を立てアカエイの泌乳誘導機構の解明を目指した。まず、板鰓類においても泌乳ホルモンにより泌乳が誘導される」と仮定し、妊娠時に血中濃度が上昇するペプチドホルモン同定・定量し、血中プロゲステロン濃度の測定および栄養子宮絨毛におけるその受容体を探索した。さらに非妊娠期の栄養子宮絨毛の培養組織を用いたホルモン添加実験によってその反応を確かめた。次に、栄養子宮絨毛は子宮組織の一部であり、その特性も持つことから排卵等で引き起こされる「子宮内の圧力増加により泌乳が誘導される」と仮定して器官培養法を用いた子宮内部加圧実験を行った。

材料と方法

試料

神奈川県藤沢市の境川で、2018~2021年の6~8月に釣獲した妊娠したメスのアカエイ (*Hemitrygon akajei*) 3匹と非妊娠期のメス9匹について、ヘパリンを通したシリンジで心臓から血液を採取した。苦痛を受ける時間をできるかぎり短くするために延髄を切断して即殺した後、非妊娠個体の腹部を切開し子宮を摘出した。血液は遠心分離後、上澄みのみを回収し、血漿試料とした

方法

泌乳に関わる血中ペプチドホルモンの同定および定量

アカエイの泌乳に関わるペプチドホルモンを同定し定量するため、非妊娠期と乳合成が開始する妊娠初期のアカエイ (各 n=3) の血漿を LC/MS/MS を用いたプロテオーム解析に供した。方法は、第二章を参照にし、*Amblyraja radiata* のゲノムをリファレンスデータとして Sequest HT によるタンパク質・ペプチドの同定を行った。また、両群間で共通なペプチドのスペクトルを比較し、そのペプチド (タンパク質) の存在比を解析するラベルフリー定量を行った。得られた非妊娠と妊娠初期の血漿ペプチド/タンパク質の存在比を Student の t 検定により統計的に検定した。

血中プロゲステロン濃度の測定

非妊娠期から妊娠段階の経過に伴う血中プロゲステロン濃度の動態を明らか

にするべく、時間分解蛍光免疫測定法で血中プロゲステロン濃度を測定した。

血中ステロイドの抽出として、非妊娠期、妊娠初期、中期、後期の血漿（各 n=3）を 100 μ L を入れた試験管にジエチルエーテルを 1000 μ L を加え、1 分間ボルテックスした。-80 $^{\circ}$ C で水層のみを凍結させ上澄みを回収し、これを 2 回繰り返した。得られた上清を遠心エバポレータで揮発させ、400 μ L の TRF buffer（50mM Tris-HCl buffer, 0.6% NaCl, 0.1% BSA, 0.05% NaN₃, 0.01% Tween, pH7.5）を加えたものをステロイド抽出液とした。

プロゲステロン抗原を 0.005%/wel で固相化させた 99 穴マイクロタイタープレート（Nunk-ImmunoModule, Nunk, Roskilde, Denmark）の各ウェルに標準液（100ng/mL, 20ng/mL, 4ng/mL, 0.8ng/mL, 0.16ng/mL, 0.032ng/mL）と非妊娠、妊娠初期、中期、後期のステロイド抽出液（各 n=3）を duplicate で 25 μ L アプライした。標準液と各試料をアプライしたそれぞれのウェルに 12 万倍希釈されたプロゲステロン抗体を 50 μ L 加え、2 時間インキュベートした。プレートを洗浄液（50mM Tris-HCl buffer, 9% NaCl, 0.5% Tween, 0.5% NaN₃, pH7.5）で洗浄し、全ての溶液を取り除いた各ウェルに Eu 標識第二抗体を 100 μ L 加え 1 時間インキュベートした。プレートを洗浄液で洗浄し、増強試薬を 100 μ L 加え、5 分間震盪後、分光高度計で蛍光度を検出し、検量線を用いて各血漿試料のプロゲステロン濃度をもとめた。得られた血中プロゲステロン濃度を非妊娠、妊娠初期、中期、後期で比較し Turkey-Kramer の有意差検定を行った。

栄養子宮絨毛におけるホルモン受容体遺伝子の発現定量

泌乳に関与するホルモンを探索するために、妊娠期の栄養子宮絨毛で発現量が上昇するホルモン受容体遺伝子を探索した。第二章で行った妊娠初期・中期と妊娠後期・非妊娠期の栄養子宮絨毛の RNA-seq データを用いて、(各 n=3) *Amblyraja radiata* のゲノム上で確認されているホルモン受容体である糖質コルチコイド受容体遺伝子 *gr*、バソプレシン受容体遺伝子 *avpr1a*、プロラクチン受容体遺伝子 *prlr*、プロラクチン受容体に付随する酵素遺伝子 *jak2*、甲状腺刺激ホルモン受容体遺伝子 *tshr*、レプチン受容体遺伝子 *lepr*、成長ホルモン受容体遺伝子 *ghr*、エストロゲン受容体遺伝子 *esr1/2*、プロゲステロン受容体遺伝子 *pgr* について発現定量 (RPKM) 解析を行った。

培養組織を用いたホルモン添加による泌乳誘導実験

アカエイ栄養子宮絨毛において、ホルモンの受容により泌乳が誘導されるのかを明らかにするため、非妊娠期アカエイから摘出した子宮から栄養子宮絨毛がついた子宮壁を 5mm 角に切り取り 12 穴プレートに入れ、各ウェルに培養液を 3ml 加えた。培養液は、Uno et al. 2020 で使用された培地に改良を加え、D-MEM high glucose (Wako、大阪、日本) に 12% 非妊娠アカエイの血漿、1% ペニシリン - ストレプトマイシン、333 mM 尿素、188 mM NaCl、および 54 mM トリメチルアミン N-オキシドを加え pH7.5、浸透圧 950 mOsmol に調整した。

培養液に、哺乳類で泌乳を促すプロゲステロン (P_4) や 17β -エストラジオール (E_2)、さらに妊娠アカエイ血清から抽出した 30kDa 以下の血中タンパク

質のいずれかを培地に添加した 3 群と、これら全てを培地に添加した 1 群、培地に何にも添加しない 1 群 (Control 群) の計 5 群を 20°C で 5 日間培養した (各 n=3)。培養液は 2 日に 1 回取り替えた。P₄ は 10⁻⁷mol になるよう、E₂ は 10⁻⁶mol になるように、30kDa 以下の血中タンパク質は 10mL の血液から 30kDa 以下の分子量分画フィルター (Millipore, Massachusetts, USA) によって 30kDa 以下のタンパク質を回収し、凍結乾燥機 (Eyela FDU-1200、東京理科機械、東京、日本) で乾固し 1mL の PBS に溶出後、終濃度 10% になるようにそれぞれの培地に添加した。

培養後に栄養子宮絨毛をブアン固定液および RNAlater に浸潤した。ブアン固定した試料は定法に従い脱水、包埋、薄切を行い、HE 染色後に組織構造観察を行った。RNAlater に浸潤した試料から totalRNA を抽出し cDNA 合成を行った。FADS 1/2 と GAPDH について全群間の cDNA を定量 PCR に供し、GAPDH と FADS 1/2 の比をそれぞれ FADS 1、FADS 2 発現量とした。全群間における FADS 1、FADS 2 発現量を用いて Turkey-Kramer の有意差検定を行った。GAPDH はノーマライゼーション因子として、子宮乳合成に関わる FADS1/2 は、子宮乳合成マーカーとして選定した。定量 PCR に用いたプライマー配列は表 1 に記載した。

培養器官を用いた子宮内加圧による泌乳誘導実験

排卵や子宮内液の増加、胎仔の発達による「子宮内の圧力増加により栄養子宮絨毛の発達と泌乳が誘導される」という仮説を証明するために、アカエイ子

宮の器官培養法を用いた泌乳誘導実験を行った。

非妊娠アカエイから摘出した子宮の輸卵管側と総排出孔側の両端をそれぞれ糸で縛り、子宮が膨張するまで培養液をシリンジで注入し子宮内部に圧力をかけた Pressure 群と、両端を縛らずに子宮内部に圧がかからない程度に培養液をシリンジで注入した Control 群（図 1）をそれぞれ高温加圧殺菌した蓋つきガラス瓶に入れた。子宮全てが満たされるまでガラス瓶に培養液を加え、20°Cで 5 日間培養した（各 n=3）。培養液は「培養組織を用いたホルモン添加による泌乳誘導実験」と同様のものを使用した。

培養後に栄養子宮絨毛を 4%パラホルムアルデヒド組織固定液および、RNAlater に浸潤した。組織固定した試料を走査型電子顕微鏡（SEM）による上皮の観察および、光学顕微鏡による HE 染色、脂肪染色を施した組織切片の観察を行った。

遺伝子発現解析として RNAlater に浸潤した試料から totalRNA を抽出し、cDNA 合成を行った。両群の FADS 1/2 と FTH1、および GAPDH 発現量を定量 PCR で定量し、GAPDH と FADS 1/2 および FTH1 の比をそれぞれ FADS 1、FADS 2、FTH1 発現量とした。全群間における FADS 1/2 と FTH1 発現量を用いてそれぞれ Turkey-Kramer の有意差検定を行った。GAPDH はノーマライゼーション因子として、子宮乳合成に関わる FADS1/2 は子宮乳合成マーカーとして選定した。FTH1 は妊娠時の栄養子宮絨毛において最も発現量が上昇する遺伝子の 1 つであり、これを妊娠マーカーとした。定量 PCR に用いたプライマー配列は表 1 に記載した。

結果

泌乳に関わる血中ペプチドホルモンの同定および定量

アカエイ血清のプロテオーム解析の結果、妊娠時のアカエイ血漿において 112 種のタンパク質の上昇が見られた (図 2)。しかし、その中からペプチドホルモンと相同的な配列を持つペプチド/タンパク質は同定されなかった。

血中プロゲステロン濃度の測定

非妊娠期と各妊娠期 (初期・中期・後期) アカエイの血中プロゲステロン濃度を比較した結果、有意差は得られなかったものの、妊娠中期・後期で血中プロゲステロン濃度の上昇傾向が見られた (図 3)。しかし、子宮乳の合成が開始することが示唆された妊娠初期には、血中プロゲステロン濃度の上昇は見られなかった。

栄養子宮絨毛におけるホルモン受容体遺伝子の発現定量

非妊娠期と各妊娠期 (初期・中期・後期) の栄養子宮絨毛において、糖質コルチコイド受容体遺伝子である *gr*、バソプレシン受容体遺伝子である *avpr1a*、およびプロラクチン受容体遺伝子である *prlr* の発現は認められなかった。

乳合成能を持つことが示唆される妊娠初期・中期の栄養子宮絨毛において、プロラクチン受容体に付随する酵素遺伝子である *jak2*、甲状腺刺激ホルモン受容体遺伝子である *tshr*、レプチン受容体遺伝子である *lepr*、成長ホルモン受容体遺伝子である *ghr*、エストロゲン受容体 1 と 2 の遺伝子である *esr1* と 2、プ

ロゲステロン受容体遺伝子である *pgr* の発現量の上昇は見られなかった (図 4)。

培養組織を用いたホルモン添加による泌乳誘導実験

5 日間の組織培養を実施したプロゲステロン (P_4) 添加群、 17β -エストラジオール (E_2) 添加群、妊娠アカエイ血清から抽出した 30kDa 以下のタンパク質の添加群、全てを培地に添加した群、培地に何も添加しない Control 群の計 5 群において組織学的な変化は見られなかった (図 5-A)。また、FADS 1/2 の遺伝子発現量においても全ての群で変化がなかった (図 5-B)。

培養器官を用いた子宮内加圧による泌乳誘導実験

5 日間培養した Pressure 群と Control 群の子宮を切開し、その外観を目視で確認したところ、両群において妊娠期の子宮で見られる子宮乳の分泌は認められなかった (図 6-a, b)。SEM による栄養子宮絨毛の上皮の観察では Control 群の上皮で多少の凹凸と穴が認められたが、Pressure 群では上皮の凹凸が顕著になり、多数の孔が観察された (図 6-c, d)。HE 染色による組織構造観察では、Control 群で組織内に空胞が見られ上皮の凹凸が確認された、Pressure 群では多数の空胞が観察され上皮の凹凸も確認された (図 6-e, f)。脂肪染色では Control 群で組織沿岸部の上皮でのみ脂肪染色が見られた (図 6-g)。Pressure 群では組織沿岸部の上皮に加え、組織内にも脂肪染色が見られた (図 6-h)。しかし、両群においていずれの組織観察においても、妊娠初期・中期の栄養子宮絨毛に見

られるような網目状構造や上皮細胞の発達、および上皮細胞全体での強い脂肪染色は見られなかった。

遺伝子発現解析として子宮乳合成マーカーである FADS1/2 と妊娠マーカーである FTH1 の発現量を Pressure 群と Control 群で比較した結果、Pressure 群において FADS1 と FTH1 の発現量の有意な上昇が見られた。FADS2 は Pressure 群で発現量の有意な上昇が認められなかったものの、上昇傾向が見られた (図 7)。

考察

本研究により子宮乳型板鰓類アカエイはホルモンを介さず、胎仔の成長等による子宮内部圧力で誘導される新たな泌乳機構をもつことが示唆された。

哺乳類および一部の鳥類は血中プロラクチンが乳腺および素囊の上皮細胞に結合することで乳合成が開始するが (Horseman and will 1984, Horseman and Buntin 1995, Suburu et al. 2014)、アカエイにおいては乳合成が開始される妊娠初期の血漿からプロラクチンやその他ペプチドホルモンは検出されなかった。その要因として板鰓類は脳下垂体におけるプロラクチンの発現量が極めて低いことが挙げられる (Hara et al. 2020)。実際に栄養子宮絨毛におけるプロラクチン受容体の発現は確認されなかった。元来、板鰓類が持つプロラクチンの機能は皮膚への着色促進、低浸透圧環境への適応である (de Vlaming, et al. 1975, Visconti, et al. 1999)。また、プロラクチンは全脊椎動物種で 2 種類存在が確認されており、板鰓類の持つプロラクチンは進化上、哺乳類や鳥類が持つ泌乳型

のプロラクチンとは異なることが明らかとなっている (Browning. 1969, 山口と兵藤 2016)。このことから板鰓類においてプロラクチンが泌乳に関わる可能性は低いと示唆された。

プロゲステロンは哺乳類の乳腺においては乳管や乳腺胞の形成、子宮においては粘膜固有層の肥厚や粘液線の発達に寄与するが (Franco et al. 2012)、アカエイにおいて子宮乳合成が始まる妊娠初期には、血中プロゲステロン濃度の上昇も見られず、栄養子宮絨毛におけるプロゲステロン受容体の発現量も低値を示した。このことからプロゲステロンの泌乳への関与の可能性は低いと考えた。また、Halperin et al. 2013 は 17β エストラジオール、プロゲステロン プロラクチンは哺乳類の乳腺の発達や泌乳に欠かせないホルモンであると述べているが、これらを含むホルモンを培地に添加して行った栄養子宮絨毛の組織培養実験においても、泌乳の誘導は見られなかった。さらに、アカエイ栄養子宮絨毛では様々なホルモンの受容体発現の発現量は低く、妊娠時に有意な上昇も見られなかったことにより、栄養子宮絨毛の発達および泌乳はホルモン制御を介さないことが示唆された。

子宮内部への加圧実験では Pressure 群において多少の組織構造の変化が見られた。妊娠時の栄養子宮絨毛のような上皮に現れる網目状構造は見られなかったが、Pressure 群で上皮の凹凸と無数の孔が確認された。また、非妊娠期の栄養子宮絨毛は外縁部の一層の上皮細胞でしか脂肪染色が認められなかったが、Pressure 群では上皮のくぼみや組織内からも脂肪染色が認められた。このことから Pressure 群の孔は脂質を分泌する可能性が示唆された。しかし、Control

群においても栄養子宮絨毛の上皮で多少同様な特徴が見られたため、器官培養実験をする上での栄養や酸素不足が組織構造に変化を与えた可能性も考えなければならぬ。

遺伝子発現解析では Pressure 群で FADS1 および FTH1 発現量が有意に上昇し、FADS2 発現量も上昇傾向を示した。FADS1/2 は脂肪酸の不飽和化因子であり (Castro et al. 2012)、子宮乳に含まれる不飽和脂肪酸の合成が示唆されていることから、子宮内部圧力は子宮乳の合成を誘導する可能性が示唆された。FTH1 は細胞内に鉄を蓄積する機能を有す (Funauchi et al. 2015)。栄養子宮絨毛での鉄の移動は子宮内への酸素供給をサポートする可能性があることから、子宮の内部圧力は子宮内への酸素供給能のトリガーになる可能性が示唆された。

子宮乳型板鰓類の子宮は非妊娠期に小さく、妊娠時に膨張し肥大化する (Collonelo et al. 2013)。子宮の膨張には排卵や子宮内液量の増加、胎仔の成長など様々な要因が考えられ、非妊娠期から妊娠期への栄養子宮絨毛の機能転換のトリガーになると推測される。また、子宮内で成育する板鰓類の胎仔は哺乳類のように胎盤で母体と繋がっていないため、子宮内への酸素供給不足や栄養供給不足は胎仔の死に直結する。そのため胎仔の成長を子宮が感知し子宮乳合成や子宮内への酸素供給が行われる場合、子宮が胎仔の成育を直接サポートすることで酸素や栄養供給の誤作動を防いでいる可能性が示唆された。

表 1. 定量 PCR に用いたプライマー対

遺伝子名	FW/RV	配列	長さ(bp)	T _m 値(°C)
FADS1	FW	5'-AGCAAATCCAAGTGGAACCATC-3'	22	53
	RV	3'-TGGAAGCTTCTTTCCCAAGAC-5'	21	52
FADS2	FW	5'-AGCGGATGTAGTACGTTGTTG-3'	21	52
	RV	3'-AGGACCCAGATGTGAACATGC-5'	21	54
FTH1	FW	5'-ACAGTGCTATGAGCAGCAAGGG-3'	22	57
	RV	3'-TGGCTTGGATGCAATGGTATGC-5'	22	56

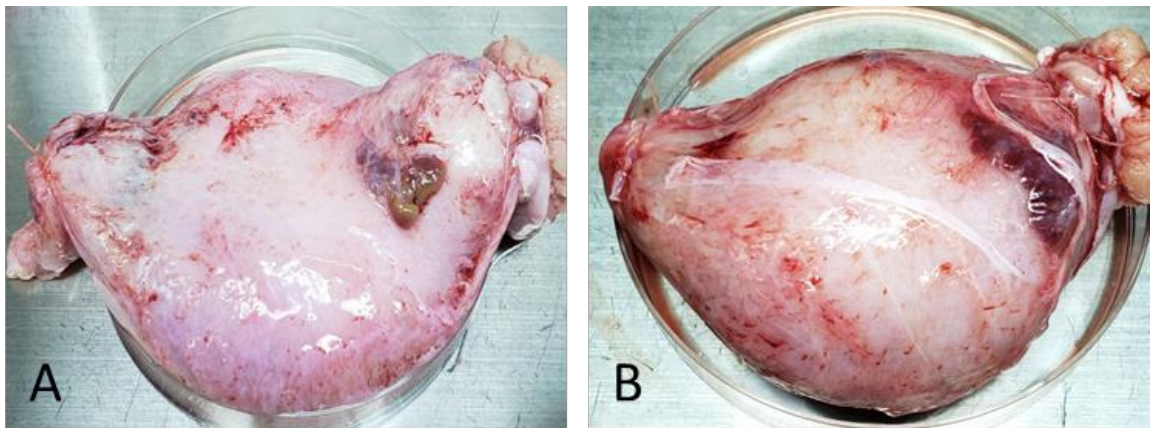


図 1. 器官培養に用いた非妊娠期のアカエイの子宮

A : 子宮内に圧がかからない程度に培養液をシリンジで注入した Control 群。

B : 子宮内に圧がかかるまで培養液をシリンジで注入した Pressure 群。

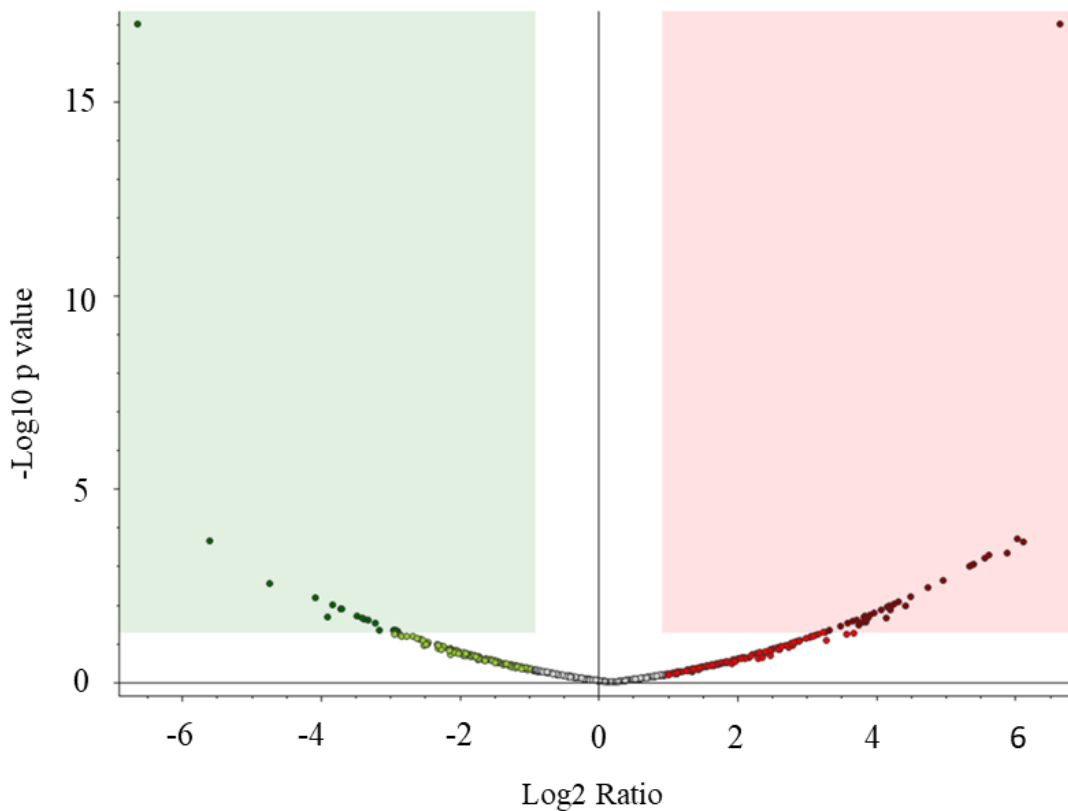


図 2. 非妊娠期、妊娠期アカエイ血漿のプロテオーム解析

妊娠初期と非妊娠期のアカエイ血漿を LC/MS/MS に供し、ラベルフリーの相対定量を行った (各 n=3)。得られたスペクトルピークを両群で比較し、相対値を用いて Student の t 検定を行った。緑枠：非妊娠期で有意に多い血中タンパク質 ($p < 0.05$)、赤枠：妊娠初期で有意に多い血中タンパク質 ($p < 0.05$)。

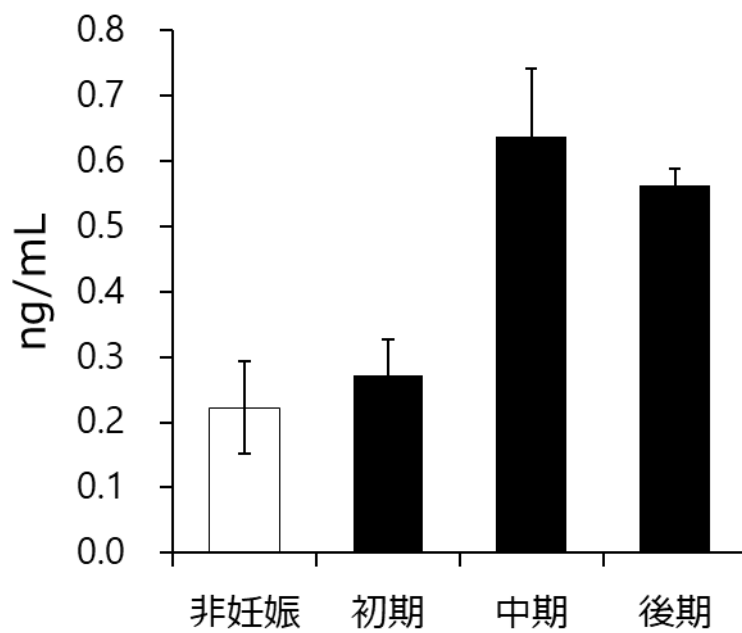


図 3. 各段階のアカエイ血漿のプロゲステロン濃度測定

非妊娠期と各段階（妊娠初期・中期・後期）のアカエイ血漿（各 n=3）からステロイドを抽出し、時間分解蛍光免疫測定法群でプロゲステロン濃度を測定した。得られた測定値を Tukey - Kramer の検定に供したが各群で有意差は得られなかった。

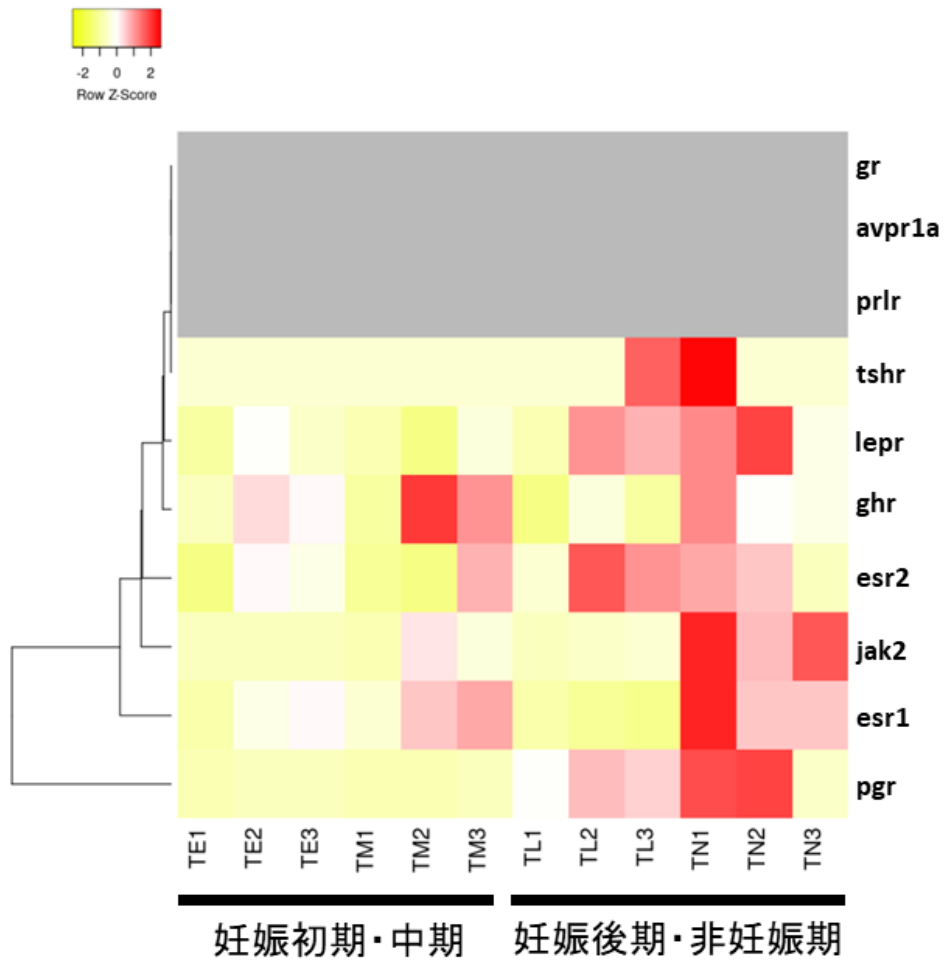
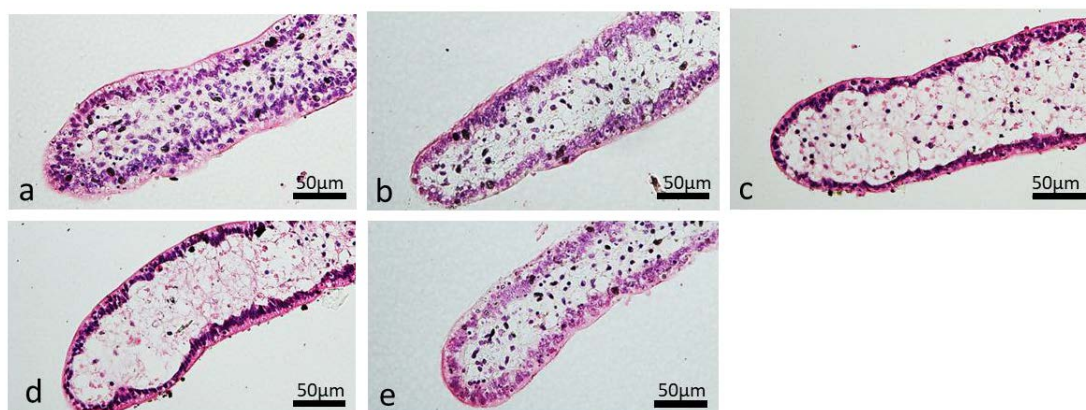


図 4. 各段階のアカエイ栄養子宮絨毛におけるホルモン受容体遺伝子の発現定量

非妊娠期と各段階（妊娠初期・中期・後期）（各 n=3）の栄養子宮絨毛におけるホルモン受容体の発現量を定量し、比較した（RPKM）。

黄色は各遺伝子発現のレベルが平均よりも低いことを、濃い赤は平均よりも高いことを示す。灰色は発現が示されなかったことを示す。

(A)



(B)

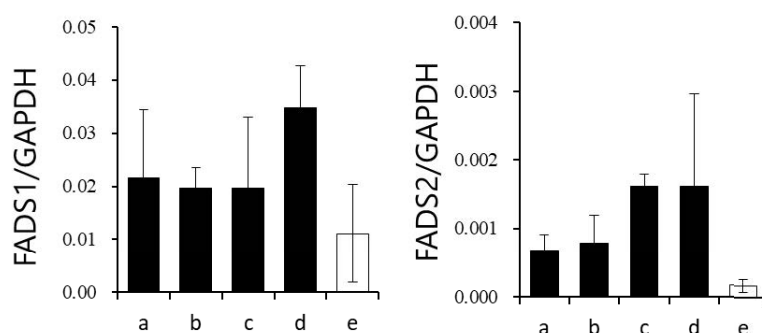


図 5. ホルモン添加後の 5 日間組織培養を行った非妊娠期のアカエイ栄養子宮絨毛における、ホルモン添加後の組織観察および遺伝子発現解析

(A) 5 日間培養した非妊娠期アカエイから採取した栄養子宮絨毛の組織学的観察 ($\times 400$)。a~e の 5 群に分け、それぞれ 5 日間 20°C で培養した。(a) は 17β -エストラジオール (E_2) を培地に添加した群、(b) はプロゲステロン (P_4) を培地に添加した群、(c) は 30kDa 以下のタンパク質を培地に添加群、(d) は abc 全てを培地に添加した群、(e) は何も添加しない Control 群。

(B) 上記の a, b, c, d, e と対応した組織から RNA を抽出し、cDNA 合成後、FADS1/2 および GAPDH の発現量を定量 PCR で定量した (各 $n=3$)。目的遺伝子と GAPDH の比をそれぞれ発現量とした。得られた発現量を Tukey-Kramer 検定に供した。

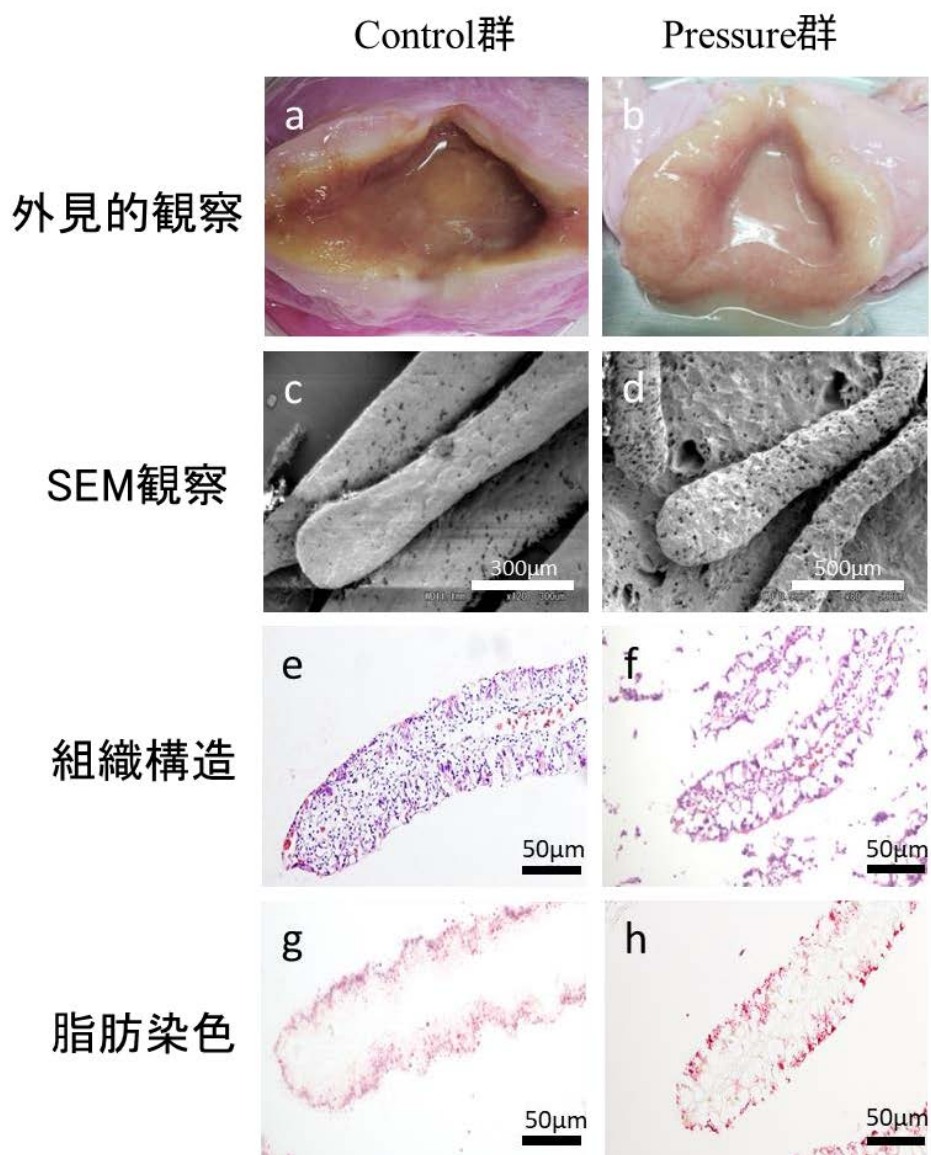


図 6. 内部圧力をかけ 5 日間器官培養を行った非妊娠期アカエイの子宮における組織の観察

(a) Control 群の子宮切開時の外観、(b) Pressure 群の子宮切開時の外観、(c) 走査型電子顕微鏡により観察した Control 群の栄養子宮絨毛 (×120)、(d) 走査型電子顕微鏡により観察した Pressure 群の栄養子宮絨毛 (×80)、(e) HE 染色した Control 群の栄養子宮絨毛 (×400)、(f) HE 染色した Pressure 群の栄養子宮絨毛 (×400)、(g) Oil-red-O により脂肪染色した Control 群の栄養子宮絨毛 (×400)、(h) Oil-red-O により脂肪染色した Pressure 群の栄養子宮絨毛 (×400)。

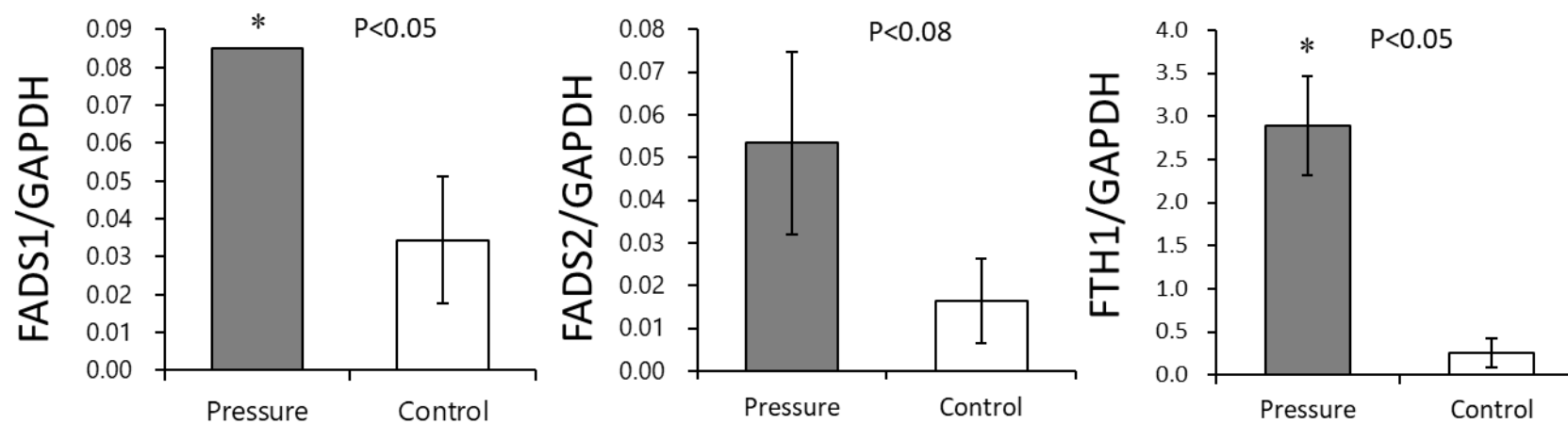


図 7. 内部圧力をかけ 5 日間器官培養を行った非妊娠期アカエイの子宮における組織観察

Control 群および Pressure 群から採取した栄養子宮絨毛から RNA を抽出し、cDNA 合成後、FADS1/2、FTH1 および GAPDH の発現量を定量 PCR で定量し、目的遺伝子と GAPDH の比をそれぞれ発現量とした (各 n=3)。得られた発現量を Tukey-Kramer 検定に供し

総合考察

本研究は、子宮内で乳を分泌して胎仔を育てる子宮乳板鰓類の繁殖機構を明らかにするべく、アカエイ (*Hemitrygon akajei*) をモデル生物として子宮乳の成分から機能を推測し、その合成機構の解明に迫った。第1章では、外卵黄嚢を持つ発達初期胎仔、委縮した卵黄を持つ中期胎仔、外卵黄嚢を持たず母体と同様の形態を持つ後期胎仔に対して、子宮乳の成分がどのような機能を持つのかを明らかにするために、粗成分分析、タンパク質、脂肪酸組成の分析を行った。また、子宮乳の摂取と発達中期以降の胎仔の急激な成長への関与も検討した。まず粗成分分析として妊娠初期、中期、後期の子宮乳に含まれるタンパク質、脂質、乳糖、全固形分、水分量 (%) をそれぞれ調べたところ、全妊娠段階で乳糖の含有は確認されなかったが、タンパク質と脂質含量は初期に少なく、中期で高値を示し、後期で多少の減少を示した。妊娠中期以降のタンパク質、脂質含量の高い子宮乳は、卵黄が枯渇した発達中期以降の胎仔の成長をサポートすることが示唆された。次に各妊娠段階の子宮乳にそれぞれ含まれるタンパク質をプロテオーム解析で網羅的に同定したところ、全妊娠段階で共通するタンパク質のうち有用なタンパク質として抗菌作用や鉄の輸送機能を持つトランスフェリンや抗体であるイムノグロブリン、卵黄栄養物質であるビテロジェニンが検出された。妊娠中期以降の子宮乳からは、軟骨の主成分であるコンドロイチン硫酸を輸送するプロテオグリカンや脂肪酸と結合し輸送するアポリポタンパク質が検出された。後期では多くの細胞内代謝酵素が検出された。以上の結果から子宮乳に含まれるタンパク質は、一般的な機能として胎仔に卵黄栄養物質を追加で供給するとともに、抗体・抗菌剤でその成長をサポートすることが示唆された。また、中期以降の胎仔には栄養物質の中で最も優れる脂質の供給を促すとともに、板鰓類の骨格を形成する軟骨の発達に寄与することが示唆された。脂肪酸組成分析においては、高い脂質濃度を持つ中期と後期の子宮乳、ならびに比較対象として卵黄の脂肪酸をガスクロマトグラフィーで分析した。子宮乳の脂肪酸組成は中期と後

期で差異はなく、両試料ともに C16:0 と C16:1、C18:1 と C18:2 の脂肪酸が最も多く含まれた。子宮乳と卵黄の脂肪酸を比較したところ子宮乳で C16:1 と C18:2 が特に多く含まれていた。このことから卵黄とは異なった成分である C16:1 と C18:2 は中期以降の急激な成長に關与する可能性が示唆された。第 2 章では、子宮乳型板鰓類の子宮内を覆う栄養子宮絨毛の機能を明らかにするために、まず組織学的観察を行った。各段階(非妊娠期、妊娠初期、中期、後期)を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察したところ、妊娠期には非妊娠時の栄養子宮絨毛の上皮に見られない網目状構造や陰窩が観察された。この構造は妊娠後期になるにつれ顕著になった。また、妊娠中期、後期において陰窩内から分泌物様の物質が確認された。栄養子宮絨毛の組織切片を AZAN 染色して観察すると非妊娠時には繊維芽細胞に覆われるが、妊娠初期には立方上皮細胞が観察され陰窩が形成されていた。中期には立方上皮細胞は見られないが、陰窩基底で円柱上皮細胞が確認された。後期では上皮細胞が崩壊した像が確認された。また、妊娠後期になるにつれ上皮内の毛細血管が外部に向かって伸長した。このことから SEM 観察で見られた網目状構造と陰窩の形成は、外部に向けた血管の伸長と上皮細胞の変化によるものだと推測された。PAS 染色では、非妊娠期の栄養子宮絨毛でのみ強い染色が見られた。脂肪染色では、非妊娠期は上皮の外縁部でのみ染色が見られたが、妊娠初期と中期では、上皮全体で強い染色が見られた。妊娠後期では中央を走行する血管に隣接する上皮細胞でのみ染色が見られた。妊娠期では陰窩の染色も確認された。以上のことから栄養子宮絨毛は、非妊娠期では組織は非活発的であるが粘液を分泌し、妊娠初期では立方上皮細胞に脂質を蓄積する。妊娠中期では脂質を蓄積しつつ陰窩内の円柱上皮細胞から脂質を分泌し、後期では細胞の崩壊とともに脂質を分泌する可能性が示唆された。また、全妊娠期で見られた上皮へ向けた毛細血管の伸長は血管と外界(子宮内)の距離を縮めることはガス交換能の上昇を意味する。そのため毛細血管伸長は子宮内で成育する胎仔への酸素供給に役立つことが示唆された。次に栄養子宮絨毛の機能をさらに追及するために、各段階の栄養子宮絨毛で発現する RNA を網羅的に解析し、遺伝子の発現や発現量のプロファイルを得た。それをクラスター解

析に供したところ妊娠初期・中期の群と妊娠後期・非妊娠期の群の 2 群でクラスター化された。両群の遺伝子発現量を比較し統計的処理を行った結果、妊娠初期・中期の群で 1000 遺伝子以上の有意な発現量の上昇が見られ、栄養子宮絨毛におけるそれら遺伝子群の役割を知るために Pathway 解析に供した。その結果、妊娠初期・中期の栄養子宮絨毛からは、抗生物質やアミノ酸・タンパク質、脂質の合成に関わる多くの経路が得られた。子宮乳の成分や機能を念頭に置くと、これら経路は子宮乳の合成を示唆させた。また、抗生物質合成経路には鉄関連遺伝子が含まれており、酸素と結合する鉄に関連した遺伝子の発現上昇は、子宮内への酸素供給能に関与する可能性が示唆された。栄養子宮絨毛における子宮乳の合成の有無をさらに追及するため、子宮乳に最も多く含まれる栄養である脂質の合成遺伝子の発現を確かめたところ、脂肪酸の合成遺伝子や子宮乳に多く含まれる不飽和脂肪酸の合成に関連する遺伝子の発現が妊娠初期・中期で有意に上昇した。このことから栄養子宮絨毛が子宮乳に含まれる脂肪酸を合成することが強く示唆された。また、妊娠後期では脂質関連因子の発現量は非妊娠期と同程度に減少したため、子宮乳合成を持たないことが示唆された。これまでの結果をまとめると栄養子宮絨毛は、非妊娠時には粘液を分泌する非活発的な組織であるが、妊娠初期になると子宮乳を合成し始めるが脂質の分泌はせず細胞内に蓄積する。妊娠中期になると子宮乳の合成能を維持したまま、分泌を行う。後期になると子宮乳合成は終了するが脱落した上皮細胞を含んだ子宮乳を分泌することが示唆された。また、第 1 章の結果から妊娠初期子宮乳は脂質をほとんど含まないこと、妊娠後期の子宮乳が多くの細胞代謝酵素を含むことは、栄養子宮絨毛において妊娠初期の脂質分泌能を持たないこと、妊娠後期に脱落した細胞が含まれることをそれぞれ強く支持した。妊娠時における栄養子宮絨毛の網目構造と毛細血管の伸長は子宮内への酸素供給能の向上を示唆したが、鉄関連遺伝子の発現の活発化はその示唆を支持した。第 3 章では子宮組織の一部でありながら哺乳類の乳腺のように乳の合成能を持栄養子宮絨毛の泌乳誘導因子を解明するべく、哺乳類の乳腺で知られる「泌乳ホルモンにより泌乳が誘導される」と、板鰓類の子宮発達のトリガーとなる排卵等による「子宮内の圧力

増加により泌乳が誘導される」という 2 つの仮説を立てた。まず 1 つ目の仮説を立証するために、泌乳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、同定には至らなかった。また、妊娠時の栄養子宮絨毛で有意に発現上昇するホルモン受容体も確認されなかった。実際に栄養子宮絨毛におけ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と考えられる 17β -エストラジオール、プロゲステロン、妊娠初期から抽出した 30kDa 以下のタンパク質をペプチドホルモンとしてそれぞれ、および全てを添加した培地でそれぞれ 5 日間組織培養を行い、組織構造観察および妊娠期に高発現する遺伝子を泌乳マーカーとして用いた遺伝子発現解析を行ったが、粗組織学的および遺伝子発現に変化を示さなかった。2 つ目の仮説を立証するために、非妊娠時の子宮の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て 5 日間培養した結果、多少の組織学的変化と有意な泌乳マーカー遺伝子の上昇が見られた。このことから、アカエイにおける泌乳の誘導はホルモンでなく子宮内の内部圧力が関与することが示唆された。

本研究から、アカエイの繁殖機構について、泌乳誘導から子宮乳の合成分泌機構、子宮乳の機能までが明らかとなった。アカエイを含む子宮乳型板鰓類にはアカエイ科、トビエイ科、ウスエイ科の板鰓類が属し (Hamlett et al. 2005) 彼らの繁殖機構を理解する上で、本研究は子宮乳型板鰓類の繁殖モデルとして機能することが推測される。

また、近年、卵食型の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、胎仔に付与することが新たに発見された (Sato et al. 2016)。この知見は、子宮乳型に分類されていない種においても、卵黄と次の栄養転換の間などに母体から子宮乳を受け取っている可能性を示すものであり、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だと考える。

世界中で板鰓類の資源量は減少しており絶滅が危ぶまれている。そのため、水族館等では板鰓類の保護活動として繁殖に力を入れている。板鰓類は卵生種と胎生種が存在する (Hamlett et al. 2005)。板鰓類の繁殖活動をする上で、卵生種は卵を保護するだけで仔魚を孵すことができる。しか

し胎生種は子宮内で胎仔が成長するため、繁殖の手助けは困難である。また、早期出産により胎仔が死亡するケースも多い（文献）。そのため胎生板鰓類の保護・繁殖を目的として、沖縄美ら海水族館で人工子宮装置が作製された（<https://churaumi.okinawa/topics/1616482929/>）。胎生板鰓類は胎仔が外卵黄囊の栄養だけで成長する卵黄依存型胎生とアカエイやホジロザメのように胎仔の成長には母体から付与された栄養が欠かせない母体依存型胎生に別れる（Hamlett et al. 2005）。人工子宮装置では卵黄依存型胎生板鰓類のヒレダカフジクジラ（*Etmopterus molleri*）という種での発育にしか成功しておらず、母体依存型胎生板鰓類には対応できていない。従って、多様な繁殖様式をもつ板鰓類の保護の観点では、未だ実用的でないのが現状だ。これら人工繁殖が困難な理由として、板鰓類の繁殖学的知見が少なく、胎仔の成長に必要な栄養成分も不明であることが挙げられる。本研究の第1章では子宮乳成分を明らかにしたことにより、母体依存型板鰓類の胎仔が成長に必要な栄養を知るカギとなることが期待される。しかしながら、本研究では子宮乳による実際の胎仔への影響を調べられておらず、消化吸收の機構や子宮乳に含まれるタンパク質や脂質の利用の有無についても不明である。そのため今後は、培養器官の技術を活用し、胎仔の腸管における子宮乳を与えた時の反応や消化吸收機構の解明が望まれる。そして可能であれば胎仔を育成し、子宮乳摂取による実際の成長と成分の利用のについて明らかにしなければならない。なお、本研究の2章と3章においても、子宮乳の合成やその誘導を実際に確認できてないため、今後は培養手法の改変や生体のアカエイを用いた *in vivo* 実験を行う必要があると考える。

参考文献

- Babel, J. S. (1967). Reproduction, life history and ecology of the round stingray, *Urolophous halleri*. California Department of Fish and Game. Fish Bulletin, 137, 1–104.
- Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics*, 60(1), 49–74.
- Bautista, M. N., & De la Cruz, M. C. (1988). Linoleic (ω 6) and linolenic (ω 3) acids in the diet of fingerling milkfish (*Chanos chanos* Forsskal). *Aquaculture*, 71(4), 347–358.
- Bessho-Uehara, M., Yamamoto, N., Shigenobu, S., Mori, H., Kuwata, K., & Oba, Y. (2020). Kleptoprotein bioluminescence: *Parapriacanthus* fish obtain luciferase from ostracod prey. *Science Advances*, 6(2), eaax4942.
- Bligh, E. G. (1959). Extraction of lipids in solution by the method of Bligh & Dyer. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Cao, H., Gerhold, K., Mayers, J. R., Wiest, M. M., Watkins, S. M., & Hotamisligil, G. S. (2008). Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell*, 134(6), 933–944.
- Carrier, J. C., Pratt, H. L., & Castro, J. I. (2004). Reproductive biology

of elasmobranchs. In *Biology of sharks and their relatives* (pp. 269–286). Boca Raton, FL: CRC Press.

Colonello, J. H., Christiansen, H. E., Cousseau, M. B., & Macchi, G. J. (2013). Uterine dynamics of the southern eagle ray *Myliobatis goodie* (Chondrichthyes: myliobatidae) from the Southwest Atlantic Ocean. *Italian Journal of Zoology*, 80(2), 187–194.

Compagno, L. J. (1990). Alternative life-history styles of cartilaginous fishes in time and space. *Environmental Biology of Fishes*, 28(1–4), 33–75.

De Sousa Rangel, B., Hussey, N. E., Niella, Y., Martinelli, L. A., Gomes, A. D. O., & Moreira, R. G. (2020). Neonatal nutritional strategy of a viviparous elasmobranch with extremely low reproductive output. *Marine Ecology Progress Series*, 638, 107–121.

Dobenecker, B., Endres, V., & Kienzle, E. (2013). Energy requirements of puppies of two different breeds for ideal growth from weaning to 28 weeks of age. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97(1), 190–196.

Duncan, K. M., & Holland, K. N. (2006). Habitat use, growth rates and dispersal patterns of juvenile scalloped hammerhead sharks *Sphyrna lewini* in a nursery habitat. *Marine Ecology Progress Series*, 312, 211–221.

Endo, J., & Arita, M. (2016). Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Cardiology*, 67(1), 22–27.

Ernst, O., & Zor, T. (2010). Linearization of the Bradford protein assay. *Journal of Visualized Experiments*, 38, 1–5.

Furumitsu, K., Wyffels, J. T., & Yamaguchi, A. (2019). Reproduction and embryonic development of the red stingray *Hemitrygon akajei* from Ariake Bay, Japan. *Ichthyological Research*, 66(4), 419–436.

Gudger, E. W. (1912). Natural history of some Beaufort, N.C. fishes, 1910-1911. No. I. Elasmobranchii—with special reference to uterogestation. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 25, 141–156.

Hamlett, W. C., Allen, D. J., Stribling, M. D., Schwartz, F. J., & Didio, L. J. (1985a). Permeability of external gill filaments in the embryonic shark. Electron microscopic observations using horseradish peroxidase as a macromolecular tracer. *Journal of Submicroscopic Cytology*, 17(1), 31–40.

Hamlett, W. C., Eulitt, A. M., Jarrell, R. L., & Kelly, M. A. (1993). Uterogestation and placentation in elasmobranchs. *Journal of Experimental Zoology*, 266(5), 347–367.

Hamlett, W. C., Kormanik, G., Storrie, M., Stevens, B., & Walker, T. I. (2005). Chondrichthyan parity, lecithotrophy and matrotrophy. In *Reproductive biology and phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, batoids, and chimaeras* (Vol. 3, pp. 395–434). Boca Raton, FL: CRC Press.

Hamlett, W. C., Musick, J. A., Eulitt, A. M., Jarrell, R. L., & Kelly, M. A. (1996a). Ultrastructure of uterine trophonemata, accommodation for

uterolactation, and gas exchange in the southern stingray, *Dasyatis americana*. *Canadian Journal of Zoology*, 74, 1417–1430.

Hamlett, W. C., Musick, J. A., Eulitt, A. M., Jarrell, R. L., & Kelly, M. A. (1996b). Ultrastructure of fetal alimentary organs: Stomach and spiral intestine in the southern stingray, *Dasyatis americana*. *Canadian Journal of Zoology*, 74(8), 1431–1443.

Hamlett, W. C., Wourms, J. P., & Smith, J. W. (1985b). Stingray placental analogues: Structure of trophonemata in *Rhinoptera bonasus*. *Journal of Submicroscopic Cytology*, 17(4), 541–550.

Hamosh, M. (2001). Bioactive factors in human milk. *Pediatric Clinics of North America*, 48(1), 69–86.

Hara, Y., Yamaguchi, K., Onimaru, K., Kadota, M., Koyanagi, M., Keeley, S. D., ... Kuraku, S. (2018). Shark genomes provide insights into elasmobranch evolution and the origin of vertebrates. *Nature Ecology & Evolution*, 2(11), 1761–1771.

Holt, C. (1982). Inorganic constituents of milk III. The colloidal calcium phosphate of cow's milk. *Journal of Dairy Research*, 49(1), 29–38.

Hussey, N. E., Wintner, S. P., Dudley, S. F., Cliff, G., Cocks, D. T., & MacNeil, M. A. (2010). Maternal investment and size-specific reproductive output in carcharhinid sharks. *Journal of Animal Ecology*, 79(1), 184–193.

Jenness, R. (1970). The composition of milks of various species: A

review. In Dairy science abstracts (pp. 599–612). Wallingford: CABI.

Jenness, R. (1974a). The composition of milk. In R. Larson & W. Smith (Eds.), *Lactation* (pp. 3–107). New York, NY: Academic Press.

Jenness, R. (1974b). Biosynthesis and composition of milk. *Journal of Investigative Dermatology*, 63(1), 109–118.

.

Khaldi, N., Vijayakumar, V., Dallas, D. C., Guerrero, A., Wickramasinghe, S., Smilowitz, J. T., ... German, J. B. (2014). Predicting the important enzymes in human breast milk digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29), 7225–7232.

Knudson, C. B., & Knudson, W. (2001). Cartilage proteoglycans. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 12, No. 2, pp., pp. 69–78). Cambridge, MA: Academic Press.

Kuratko, C. N., & Salem, N., Jr. (2009). Biomarkers of DHA status. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81(2–3), 111–118.

Le, H. D., Meisel, J. A., de Meijer, V. E., Gura, K. M., & Puder, M. (2009). The essentiality of arachidonic acid and docosahexaenoic acid. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81(2–3), 165–170.

Levin, M. J., Tuil, D., Uzan, G., Dreyfus, J. C., & Kahn, A. (1984). Expression of the transferrin gene during development of non-hepatic tissues: High level of transferrin mRNA in fetal muscle and adult brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 122(1), 212–

217.

Liu, H., Takano, T., Abernathy, J., Wang, S., Sha, Z., Jiang, Y., ... Liu, Z. (2010). Structure and expression of transferrin gene of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(1), 159–166.

Macy, I. G. (1949). Composition of human colostrum and milk. *American Journal of Diseases of Children*, 78(4), 589–603.

Mahadevan, G. (1940). Preliminary observations on the structure of the uterus and the placenta of a few Indian elasmobranchs. In *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B* (Vol. 11, No. 1, pp. 1–44). Berlin: Springer.

Marshall, A. D., & Bennett, M. B. (2010). Reproductive ecology of the reef manta ray *Manta alfredi* in southern Mozambique. *Journal of Fish Biology*, 77(1), 169–190.

Matasova, L. V., & Popova, T. N. (2008). Aconitate hydratase of mammals under oxidative stress. *Biochemistry (Moscow)*, 73(9), 957–964.

Meyer, A. M., Reed, J. J., Neville, T. L., Thorson, J. F., MaddockCarlin, K. R., Taylor, J. B., ... Caton, J. S. (2011). Nutritional plane and selenium supply during gestation affect yield and nutrient composition of colostrum and milk in primiparous ewes. *Journal of Animal Science*, 89(5), 1627–1639.

Miyabe, R., Takahashi, Y., Matsufuji, H., Ogihara, J., Itou, K., Kawai, Y., ... Oda, M. (2015). Purification and partial characterization of an

X-prolyldipeptidyl Aminopeptidase from *Lactobacillus gasseri* ME-284. *FoodScience and Technology Research*, 21(3), 445–451.

Miyata, J., & Arita, M. (2015). Role of omega-3 fatty acids and their metabolites in asthma and allergic diseases. *Allergology International*, 64(1), 27–34.

Monroig, Ó., Lopes-Marques, M., Navarro, J. C., Hontoria, F., Ruivo, R., Santos, M. M., ... Castro, L. F. C. (2016). Evolutionary functional elaboration of the *Elovl2/5* gene family in chordates. *Scientific Reports*, 6(1), 1–10.

Murakumo, K., Matsumoto, R., Tomita, T., Matsumoto, Y., & Ueda, K. (2020). The power of ultrasound: Observation of nearly the entire gestation and embryonic developmental process of captive reef mantarays (*Mobula alfredi*). *Fishery Bulletin*, 118(1), 1–7.

Musick, J. A., Ellis, J. K., & Hamlett, W. C. (2005). Reproductive evolution of chondrichthyans. In W. C. Hamlett (Ed.), *Reproductive biology and phylogeny of chondrichthyes, sharks, batoids and chimaeras* (pp. 45–71). Boca Raton, FL: CRC Press.

Needham, J. (1942). *Biochemistry and morphogenesis*. Cambridge: Cambridge University Press.

Paiva, R. B., Neves, A., Sequeira, V., Nunes, M. L., Gordo, L. S., & Bandarra, N. (2012). Reproductive strategy of the female deep-water shark birdbeak dogfish, *Deania calcea*: Lecithotrophy or matrotrophy?. *Marine Biological Association of the United Kingdom. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 92(2), 387–394.

Perera, N. C. N., Godahewa, G. I., Hwang, J. Y., Kwon, M. G., Hwang, S. D., & Lee, J. (2017). Molecular, structural, and functional comparison of N lobe and C lobe of the transferrin from rock bream, *Oplegnathus fasciatus*, with respect to its immune response. *Fish & Shellfish Immunology*, 68,

Pethybridge, H., Daley, R., Virtue, P., & Nichols, P. D. (2011). Lipid (energy) reserves, utilisation and provisioning during oocyte maturation and early embryonic development of Deepwater chondrichthyans. *Marine Biology*, 158(12), 2741–2754.

Philpott, C. C., Klausner, R. D., & Rouault, T. A. (1994). The bifunctional iron-responsive element binding protein/cytosolic aconitase: The role of active-site residues in ligand binding and regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15), 7321–7325.

Pickova, J., Kiessling, A., Pettersson, A., & Dutta, P. C. (1999). Fatty acid and carotenoid composition of eggs from two nonanadromous Atlantic salmon stocks of cultured and wild origin. *Fish Physiology and Biochemistry*, 21(2), 147–156.

Polakof, S., Mommsen, T. P., & Soengas, J. L. (2011). Glucosensing and glucose homeostasis: From fish to mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 160(4), 123–149.

Ranzi, S. (1932). Le basi fisio-morfologiche dello sviluppo embrionale dei Selaci. Parte I. *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli*, 13,

209–290.

Ranzi, S. (1934). Le basi fisio-morfologiche dello sviluppo embrionale dei Selaci. Parti I e II. Pubblicazioni Della Stazione Zoologica di Napoli, 13, 331–437.

Remme, J. F., Larssen, W. E., Bruheim, I., Sæbø, P. C., Sæbø, A., & Stoknes, I. S. (2006). Lipid content and fatty acid distribution in tissues from Portuguese dogfish, leafscale gulper shark and black dogfish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 143(4), 459–464.

Sato, K., Nakamura, M., Tomita, T., Toda, M., Miyamoto, K., & Nozu, R. (2016). How great white sharks nourish their embryos to a large size: Evidence of lipid histotrophy in lamnoid shark reproduction. *Biology Open*, 5(9), 1211–1215.

Soma, H., Murai, N., Tanaka, K., Oguro, T., Kokuba, H., Yoshihama, I., ... Mogoe, T. (2013). Exploration of placentation from human beings to ocean-living species. *Placenta*, 34, S17–S23.

Speers-Roesch, B., & Treberg, J. R. (2010). The unusual energy metabolism of elasmobranch fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 155(4), 417–434.

Stoknes, I. S., Økland, H. M., Falch, E., & Synnes, M. (2004). Fatty acid and lipid class composition in eyes and brain from teleosts and elasmobranchs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B:*

Biochemistry and Molecular Biology, 138(2), 183–191.

Sugahara, T., Murakami, F., Yamada, Y., & Sasaki, T. (2000). The mode of actions of lysozyme as an immunoglobulin production stimulating factor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1475(1), 27-34.

Suzuki, Y., Kobayashi, M., Aida, K., & Hanyu, I. (1988). Transport of physiologically active salmon gonadotropin into the circulation in goldfish, following oral administration of salmon pituitary extract. *Journal of Comparative Physiology B*, 157(6), 753–758.

Takahashi, Y., Shinoda, A., Furuya, N., Harada, E., Arimura, N., Ichi, I., ... & Sato, R. (2013). Perilipin-mediated lipid droplet formation in adipocytes promotes sterol regulatory element-binding protein-1 processing and triacylglyceride accumulation. *PloS one*, 8(5), e64605.

Thiels, E., Alberts, J. R., & Cramer, C. P. (1990). Weaning in rats: II. Pupbehavior patterns. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, 23(6), 495–510.

Ugoala, C., Ndukwe, G. I., & Audu, T. O. (2008). Comparison of fatty acids profile of some freshwater and marine fishes. *Internet Journal of Food Safety*, 10, 9–17.

Van Eck, M., Herijgers, N., Yates, J., Pearce, N. J., Hoogerbrugge, P. M., Groot, P. H., & Van Berkel, T. J. (1997). Bone Marrow Transplantation in Apolipoprotein E-Deficient Mice: Effect of ApoE Gene Dosage on Serum Lipid Concentrations, (β) VLDL Catabolism, and Atherosclerosis.

Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 17(11), 3117-3126.

Wourms, J. P. (1977). Reproduction and development in chondrichthyan fishes. *American Zoologist*, 17(2), 379–410.

Yin, X., Yang, Y., Han, K., Wu, L., Wu, H., Bian, X., ... Ye, J. (2019). Purification and functional characterization of serum transferrin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 88, 36–46.

Yu, T. C., & Sinnhuber, R. O. (1975). Effect of dietary linolenic and linoleic acids upon growth and lipid metabolism of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Lipids*, 10(2), 63–66.

Wood-Mason, J., and Alcock, A. 1891. On the uterine villiform papillae of *Pteroplatea micrura*, and their relation to the embryo. *Proc. R. Soc. Lond.* 49: 359-367.

石崎靖朗, 竹内俊郎, 清水健, 有元操, & 渡邊武. (1997). アルテミア給餌期のブリ仔稚魚の活力に対する EPA の DHA 代替効果. *日本水産学会誌*, 63(5), 765-772.

Anderson, S. M., Rudolph, M. C., McManaman, J. L., & Neville, M. C. (2007) . Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis. *Breast Cancer Research*, 9 (1) , 1-14.

Ballantyne JS (1997) Jaws: The inside story. The metabolism of elasmobranch fishes. *Comp Biochem Physiol, Part B Biochem Mol Biol* 118:703–742

Davies, W. L. (1939) . The composition of the crop milk of pigeons. *Biochemical Journal*, 33 (6) , 898.

Gillespie, M. J., Haring, V. R., McColl, K. A., Monaghan, P., Donald, J. A., Nicholas, K. R., ... & Crowley, T. M. (2011) . Histological and global gene expression analysis of the 'lactating' pigeon crop. *BMC genomics*, 12 (1) , 1-9.

Honvo-Houéto, E., Henry, C., Chat, S., Layani, S., & Truchet, S. (2016) . The endoplasmic reticulum and casein-containing vesicles contribute to milk fat globule membrane. *Molecular biology of the cell*, 27 (19) , 2946-2964.

Horseman, N. D., & Buntin, J. D. (1995) . Regulation of pigeon cropmilk secretion and parental behaviors by prolactin. *Annual review of nutrition*, 15 (1) , 213-238.

Horseman, N. D., & Will, C. L. (1984) . Characterization of lipid storage associated proteins induced in crop tissue by prolactin. *Journal of Comparative Physiology B*, 154 (3) , 237-242.

Jenness, R. (1974) . Biosynthesis and composition of milk. *Journal of Investigative Dermatology*, 63 (1) , 109-118.

Kim, S. L., & Koch, P. L. (2012) . Methods to collect, preserve, and prepare elasmobranch tissues for stable isotope analysis. *Environmental Biology of Fishes*, 95 (1) , 53-63.

Lin, K. C., Sun, P. C., & Lin, P. L. (2011) . Production of reactive

oxygen species and induction of signaling pathways for the ACO gene expressions in tomato plants triggered by the volatile organic compound ether. *Plant cell reports*, 30 (4) , 599-611.

Molenaar, A. J., Kuys, Y. M., Davis, S. R., Wilkins, R. J., Mead, P. E., & Tweedie, J. W. (1996) . Elevation of lactoferrin gene expression in developing, ductal, resting, and regressing parenchymal epithelium of the ruminant mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 79 (7) , 1198-1208.

Moreno, M., Ortega, F., Xifra, G., Ricart, W., Fernández - Real, J. M., & Moreno - Navarrete, J. M. (2015) . Cytosolic aconitase activity sustains adipogenic capacity of adipose tissue connecting iron metabolism and adipogenesis. *The FASEB Journal*, 29 (4) , 1529-1539.

Nandi, S. (1958) . Endocrine control of mammary-gland development and function in the C3H/He Crgl mouse. *Journal of the National Cancer Institute*, 21 (6) , 1039-1063.

Oku H., Ogata H. Y. and Liang X. F., 2002: Organization of the lipoprotein lipase of red sea bream *Pagrus major*. *Comp. Biochem. Physiol . 131B*, 775-785.

OkuH. and Ogata H. Y., 2000: Body lipid deposition in juvenile of red sea bream *Pagrus major*, yellowtail *Seriola quinqueradiata*, and Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci . 66*, 25-31.

OkuH., Koizumi N., Okumura T., Kobayashi T. and Umino T., 2006a: Molecular characterization of lipoprotein lipase, hepatic lipase and pancreatic lipase: Effects of fasting and refeeding on their expression

in red sea bream *Pagrus major*. *Comp. Biochem. Physiol.* 145B, 168-178.

Oku H., Tokuda M., Okumura T., Umino T., 2006b: Effects of insulin, triiodothyronine and fat soluble vitamins on adipocyte differentiation and LPL gene expression in the stromal-vascular cells of red sea bream, *Pagrus major*. *Comp. Biochem. Physiol.* 144B, 326-333.

Oskarsson, G. R., Oddsson, A., Magnusson, M. K., Kristjansson, R. P., Halldorsson, G. H., Ferkingstad, E., ... & Stefansson, K. (2020). Predicted loss and gain of function mutations in *ACO1* are associated with erythropoiesis. *Communications biology*, 3 (1), 1-10.

Richert, M. M., Schwertfeger, K. L., Ryder, J. W., & Anderson, S. M. (2000). An atlas of mouse mammary gland development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 5 (2), 227-241.

Strange, R., Li, F., Saurer, S., Burkhardt, A., & Friis, R. R. (1992). Apoptotic cell death and tissue remodelling during mouse mammary gland involution. *Development*, 115 (1), 49-58.

Strange, R., Li, F., Saurer, S., Burkhardt, A., & Friis, R. R. (1992). Apoptotic cell death and tissue remodelling during mouse mammary gland involution. *Development*, 115 (1), 49-58.

Suburu, J., Shi, L., Wu, J., Wang, S., Samuel, M., Thomas, M. J., ... & Chen, Y. Q. (2014). Fatty acid synthase is required for mammary gland development and milk production during lactation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 306 (10), E1132-E1143.

König, B., Koch, A., Spielmann, J., Hilgenfeld, C., Hirche, F., Stangl, G. I., & Eder, K. (2009). Activation of PPAR α and PPAR γ reduces triacylglycerol synthesis in rat hepatoma cells by reduction of nuclear SREBP-1. *European journal of pharmacology*, 605(1-3), 23-30.

Brann, D. W., Rao, I. M., & Mahesh, V. B. (1988) . Antagonism of estrogen-induced prolactin release by progesterone. *Biology of reproduction*, 39(5) , 1067-1073.

Brisken, C., Park, S., Vass, T., Lydon, J. P., O'Malley, B. W., & Weinberg, R. A. (1998) . A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(9) , 5076-5081.

Browning, H. C. (1969) . Role of prolactin in regulation of reproductive cycles. *General and Comparative Endocrinology*, 2, 42-54.

Castro, L. F. C., Monroig, O., Leaver, M. J., Wilson, J., Cunha, I., & Tocher, D. R. (2012) . Functional desaturase Fads1 ($\Delta 5$) and Fads2 ($\Delta 6$) orthologues evolved before the origin of jawed vertebrates. *PloS one*, 7(2) , e31950.

Cunha, G. R., Robboy, S. J., Kurita, T., Isaacson, D., Shen, J., Cao, M., & Baskin, L. S. (2018) . Development of the human female reproductive tract. *Differentiation*, 103, 46-65.

Djiane, J., & Durand, P. (1977) . Prolactin–progesterone antagonism in self regulation of prolactin receptors in the mammary gland. *Nature*, 266(5603) , 641-643.

Franco, H. L., Rubel, C. A., Large, M. J., Wetendorf, M., Fernandez -

Valdivia, R., Jeong, J. W., ... & DeMayo, F. J. (2012) . Epithelial progesterone receptor exhibits pleiotropic roles in uterine development and function. *The FASEB Journal*, 26(3) , 1218-1227.

Funauchi, Y., Tanikawa, C., Lo, P. H. Y., Mori, J., Daigo, Y., Takano, A., ... & Matsuda, K. (2015) . Regulation of iron homeostasis by the p53-ISCU pathway. *Scientific reports*, 5(1) , 1-14.

Halperin, J., Dorfman, V. B., Fraunhoffer, N., & Vitullo, A. D. (2013) . Estradiol, progesterone and prolactin modulate mammary gland morphogenesis in adult female plains vizcacha (*Lagostomus maximus*) . *Journal of molecular histology*, 44(3) , 299-310.

Halperin, J., Dorfman, V. B., Fraunhoffer, N., & Vitullo, A. D. (2013) . Estradiol, progesterone and prolactin modulate mammary gland morphogenesis in adult female plains vizcacha (*Lagostomus maximus*) . *Journal of molecular histology*, 44(3) , 299-310.

Halperin, J., Dorfman, V. B., Fraunhoffer, N., & Vitullo, A. D. (2013) . Estradiol, progesterone and prolactin modulate mammary gland morphogenesis in adult female plains vizcacha (*Lagostomus maximus*) . *Journal of molecular histology*, 44(3) , 299-310.

Hamlett, W. C., Eulitt, A. M., Jarrell, R. L., & Kelly, M. A. (1993) . Uterogestation and placentation in elasmobranchs. *Journal of Experimental Zoology*, 266(5) , 347-367.

Horseman, N. D. (1999) . Prolactin and mammary gland development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 4(1) , 79-88.

Li, Q., Kannan, A., Wang, W., DeMayo, F. J., Taylor, R. N., Bagchi, M. K., & Bagchi, I. C. (2007) . Bone morphogenetic protein 2 functions via a conserved signaling pathway involving Wnt4 to regulate uterine decidualization in the mouse and the human. *Journal of Biological Chemistry*, 282(43) , 31725-31732.

Riddle, O. (1963b) . Prolactin or progesterone as key to parental behaviour: A review. *Animal Behaviour* 11, 419-432.

Riddle, O. (1983a) . Prolactin in vertebrate function and organisation. *J. Nat. Cancer Inst.* 31, 1034-1110.

Uno, Y., Nozu, R., Kiyatake, I., Higashiguchi, N., Sodeyama, S., Murakumo, K., ... & Kuraku, S. (2020) . Cell culture-based shark karyotyping as a resource for chromosome-scale genome analysis. *bioRxiv*.

Visconti, M. A., Ramanzini, G. C., Camargo, C. R., & Castrucci, A. M. L. (1999) . Elasmobranch color change: a short review and novel data on hormone regulation. *Journal of experimental zoology*, 284(5) , 485-491.

de Vlaming, V. L., Sage, M., & Beitz, B. (1975) . Pituitary, adrenal and thyroid influences on osmoregulation in the euryhaline elasmobranch, *Dasyatis sabina*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 52(3) , 505-513.

山口陽子, & 兵藤晋. (2016) . プロラクチンの分子進化に関する新事実. *比較内分泌学*, 42(157) , 12-14.

酒井仙吉. (1992) . プロラクチン受容体による乳腺機能の調節 受容体遺

伝子の構造. 日本畜産学会報, 63(11) , 1203-1208.

菊池 潔, 井尻 成保, 北野 健(2020) .魚類の性決定・性分化・性転換
-これまでとこれから. 恒星社厚生閣, p57-59