

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Dipak Pandey
審査委員	主査 松原 孝博 副査 深田 陽久 副査 後藤 理恵 副査 松本 由樹 副査 高木 基裕

論文名 Studies of Egg Formation and Egg-Sperm Interaction in Teleost
Spawn Pelagic Eggs (浮遊性卵を産む硬骨魚類における卵形成および卵—精子相互作用に関する研究)

審査結果の要旨

硬骨魚類の生殖様式には、卵生と胎生があり、ほとんどの硬骨魚類は前者に属する。さらに、卵生魚の卵はその物理的性質から、浮遊性卵と沈性卵の2つのタイプに大別できる。浮遊性卵は産卵された環境水中で浮く性質をもち、ほとんどの養殖魚を含む海産魚がこちらのタイプに属する。海産魚の浮遊性卵では、卵の浮遊性は最終成熟期の短期間に獲得される。そのメカニズムには卵黄タンパクの限定的分解が関与し、生じた遊離アミノ酸による浸透圧の上昇によって、母体から水が導入されると考えられている。しかしながら、詳細に調べられた例は進化の進んだ魚種に限られ、古いタイプの魚種に関する情報はない。最終成熟期に起こる浮遊性獲得に関する事象は、卵の質を左右すると考えられており、種苗生産現場で求められる生残率が高く、健康な種苗を得るための良質卵の獲得につながる。

本論文では、進化的に古いタイプの硬骨魚に属し、且つ国内において重要な水産資源であるカタクチイワシ (*Engraulis japonicas*) を主な研究対象として、ビテロジェニン遺伝子の cDNA 解析を行い、3型のビテロジェニン遺伝子を見出した。また、遺伝子発現量の解析から、そのうちの2種が本種の主要なビテロジェニンであることを示した。相同性の解析からそれら2種の主要ビテロジェニンは、これまでに報告されている進化の進んだタイプのそれとは異なることを示した。また、最終成熟期の卵母細胞の観察と分析では、最終成熟に要する時間、その間の水分含量の変化などを示し、その間に卵黄タンパクの分解と遊離アミノ酸の増加が起こることを明らかにした。さらに、ビデオ画像解析を用いた精子の運動活性の解析結果では、産卵時間に運動活性が最大となる概日リズムがあることを、魚類で初めて発見した。これらにより、カタクチイワシの産卵に関して、卵形成と精子運動能獲得の間に雌雄間の相互作用が存在することを明らかにした。

以下、論文を構成するテーマごとに、その内容と評価できる点を整理し、審査結果を記述する。

1. カタクチイワシの多型ビテロジェニン遺伝子の解析と発現量の変化

このテーマではカタクチイワシのビテロジェニン遺伝子3型を見出し、それらをクローニングして全長の配列を決定した。既知の魚類ビテロジェニン遺伝子との相同性解析から、2つは卵黄タンパクのドメイン構造を全て含んだ VgA タイプ、もう一つは卵黄タンパクドメインを一部欠損した

VgC タイプであること、また、VgA タイプの 2 種（本論文で VgA α 、VgA β と仮称）は棘鱗上目の場合と異なり、相同性が非常に高いことを明らかにし、さらにスマの 3 型ビテロジェニンをクローニングしてその違いを示した。遺伝子発現の定量解析からは、カタクチイワシの主要なビテロジェニンは VgA α 、VgA β であることを明らかにした。3 型ビテロジェニン全てをクローニングした例は、進化的に古いタイプの硬骨魚では初めてとなり、硬骨魚類の卵の浮遊性獲得メカニズムの「進化」を考える重要な情報が得られており、科学的観点から高く評価できる。

2. カタクチイワシの最終成熟期における卵母細胞の形態及び生化学的変化

産卵期のカタクチイワシを 6 月に屋内飼育し、1 尾の雌の産卵周期は約 3 日であることと、産卵時刻が正確に午後 9 時～10 時ごろであることを明らかにした。午後 1 時から 2 時間間隔で雌魚のサンプリングを行い、最終成熟期の卵母細胞の形態変化を追跡した。その結果、卵母細胞は最終成熟開始から排卵までに約 8 時間を要することを示した。その間に卵母細胞はそのサイズを増すと共に、卵核胞の崩壊、卵黄球の融合による透明化など、順次起こる形態的特徴からステージ区分を提案した。形態的变化に伴い、水分含量は約 75% から 93% に増加することを示すと共に、生化学的な分析から、その間に卵黄タンパクの分解が引き起こっていることを明らかにした。さらに遊離アミノ酸の分析から、卵黄タンパクの分解に伴って、卵母細胞内の遊離アミノ酸が増加することを示し、進化的に古いタイプの硬骨魚とされる本種においても卵黄タンパクを利用した浮遊性獲得機構が存在することを明らかにした。また、異なるビテロジェニン遺伝子に由来する卵黄タンパクの分解様式に関して、進化の進んだタイプの硬骨魚での研究結果とは異なる可能性を見出した。こうした成果は浮遊性卵を生む硬骨魚類に共通する卵浮遊性獲得機構を明らかにし、種苗生産現場で求められる良質な受精卵の獲得技術の基盤となる。

3. カタクチイワシの精子活性に見られる概日リズム

カタクチイワシの雌では、排卵時刻が一定であり、卵母細胞の最終成熟の進行は個体間で揃って進み、群れで産卵する本種の特徴が浮き彫りにされた。本テーマでは、さらに雄における精子の運動活性についても検討した。これまで、一般的に精子の運動活性は産卵期に高まることは知られていたが、1 産卵期に多数回にわたって産卵を繰り返す種で詳細に検討された例はない。当該学位申請者はカタクチイワシ雌の規則正しい卵母細胞の最終成熟及び排卵リズムに着目し、雄においてもそうした産卵リズムに合わせた生理的メカニズムが存在するのではないかという仮説に基づいて研究を進めた。客観的な解析を行うため、高速 CCD カメラによる顕微鏡画像を解析し、海水中で運動可能な精子の割合が 1 日のうち産卵時刻に向けて増加する「概日リズム」の存在を世界で初めて明らかにした。併せて、可動精子の運動速度には大きな変化が起こらないこと、本種精子の運動継続時間が他の硬骨魚類のそれと比べて著しく長いことを明らかにした。こうした先駆的な研究成果は高い評価に値する。

以上のように本論文は新たに明らかになった科学的成果を多く含み、また、提示した成果は、今後の当該分野の研究の進展と種苗生産の効率化等、水産増殖、魚類養殖現場の技術向上に貢献していくと考えられる。

本論文に関する公開審査会は、平成 29 年 8 月 5 日に高知大学において開催され、論文発表と質疑応答が行われた。引き続き開催された学位審査委員会で本論文を慎重に審査し、審査委員全員一致して博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。