

論文審査および最終試験結果報告書

論文提出者氏名：船山 翔平

論文題目：エゾアワビの生殖腺刺激ホルモン放出ペプチドの同定と機能に関する研究

審査の概要：

エゾアワビ, *Haliotis discus hannai*, は三陸沿岸域の地場産業を支える重要な水産資源の一つであるが、資源増産に及ぼす人工稚貝放流の効果は限定的である。アワビ種苗生産における問題点として、浮遊幼生期の低生存性や着底初期の激しい減耗などが挙げられ、その要因が母貝の栄養状態や成熟度、または卵質などにあると考えられている。したがって、健康で成長の良い稚貝を効率よく育成するためには、効率良く正確に、採卵に適した母貝および成熟度を評価する技術を開発する必要がある。そのためには、アワビの成熟を統御するメカニズムに関する情報は重要であるが、学術的知見はごく限られている。このような背景の下、本論文は、アワビの成熟を統御する生理活性ペプチドの同定とその機能を明らかにするための研究を行ったものである。

第一章では、上足組織を切除したアワビの脳神経節 cDNA ライブラリーから、EST 解析により、軟体動物の性成熟に関与する生殖腺刺激ホルモン放出ペプチド(GnRH-LP) に構造が類似する前駆体をコードする GnRH-LP (abGnRH-LP) ホモログ cDNA を発見している。

第二章では、アワビ脳神経節から abGnRH-LP cDNA を RT-PCR によりクローン化し、全塩基配列を決定している。abGnRH-LP cDNA は 869 塩基からなり 101 アミノ酸残基からなる前駆体 (シグナルペプチド、abGnRH-LP と GnRH-associated peptide) をコードすること明らかにしている。また、脳神経節の 34 mM 塩酸/96%アセトン抽出物から LC-MS/MS 分析により、C 末端部の構造のみが異なる abGnRH-11amide、abGnRH-11OH および abGnRH-12OH を同定している。さらに、abGnRH-LP mRNA が生殖腺でも発現し、精巣と卵巣から脳神経節由来の abGnRH-LP と塩基配列が一致する cDNA をクローン化するとともに、卵巣の塩酸/アセトン抽出物から abGnRH-11amide と構造が一致するペプチドを同定している。これらのことより、abGnRH-LP は脳神経節のみならず生殖腺において産生され、性成熟や生殖行動などに関与すると考察している。

第三章では abGnRH-LP mRNA レベルを定量するためのリアルタイム定量 PCR 系を確立し、 2.42×10^4 から 10^7 copies の範囲において abGnRH-LP を定量できるとしている。一方、脳神経節に含まれる abGnRH-LP 量は安定同位体で標識した合成ペプチド

(SI-abGnRH) との面積比を LC-MS で算出する手法による定量系を確立し、abGnRH-LP の検出限界濃度は 1.0 fmol (1 µg 抽出物) であること、脳神経節において、abGnRH-11amide 含有量が最も高く、次いで abGnRH-11OH、abGnRH-12OH の順であることを明らかにしている。

第四章では、アワビの生殖腺の発達過程における脳神経節の abGnRH-LP mRNA レベルおよび abGnRH-11amide の産生レベルを定量し、メス・オスともに abGnRH-LP が生殖腺の発達に関与することを明らかにしている。さらに、abGnRH-11amide を成熟アワビの頭部付近の筋肉内に注射すると、紫外線照射海水で刺激をしなくても、注射濃度に依存して放卵と放精を誘起させることを認め、少なくとも abGnRH-11amide は、アワビの放卵・放精にも関与していることを明らかにしている。

以上、船山翔平による本論文は、アワビの脳神経節から GnRH-LP cDNA の全塩基配列を決定するとともに、軟体動物において、初めて 3 種類の GnRH-LP が産生されていることを明らかにしたものである。さらに、少なくとも、abGnRH-11amide はアワビの生殖腺の発達に関わっているのみならず、放卵・放精活性を有することを軟体動物で初めて明らかにしたものである。本研究において得られた成果は、水産資源として重要なアワビの増養殖に貢献することが期待できるなど、博士論文にふさわしいものと判断できる。

また、平成 31 年 1 月 28 日に実施した最終試験において、論文の内容ならびに関連分野について、本人が学位を受けるのに必要十分な学識を持つことを認め、合格と判定した。

以上の結果から、審査員一同はこれを北里大学・博士（水産学）の学位を授与するのに値するものと判定した。

論文審査担当者：

主 査 北 里 大 学 教 授 奥 村 誠 一 

副 査 北 里 大 学 教 授 小 寺 義 男 

 宮 崎 大 学 教 授 内 田 勝 久 

 北 里 大 学 准 教 授 吉 永 龍 起 

 北 里 大 学 教 授 森 山 俊 介 