

Development of mRNA knock-down system via dsRNA-mediated RNA interference in oocytes and early embryos of Pacific abalone *Haliotis discus hannai*

学位名	博士(海洋科学)
学位授与機関	東京海洋大学
学位授与年度	2017
学位授与番号	12614博甲第485号
URL	http://id.nii.ac.jp/1342/00001585/

〔課程博士〕 (博士論文審査及び最終試験の結果要旨)

学生氏名：于 凌云 (ウ リョウウン)

博士論文題目：Development of mRNA knock-down system via dsRNA-mediated RNA interference in oocytes and early embryos of Pacific abalone *Haliotis discus hannai*
(エゾアワビ卵母細胞および初期胚における母性mRNAノックダウン法の開発)

博士論文審査：

学生から提出された博士論文について、公開発表会が平成30年2月14日に行われ、審査委員と学生の間で質疑応答が繰り返され、誤記の訂正や表現の修正等が施された。

本研究は、アワビ類の養殖において成長の低下や斃死を招く原因となる性成熟を抑制し、より生産性の高いアワビ養殖を可能にするため、RNA干渉法を用いたアワビ類の不妊化種苗生産技術の開発を行ったものである。RNA干渉には、人工合成したdouble strand RNA (dsRNA)を用い、アワビ受精卵中で生殖細胞の発生に必要な遺伝子を一時的に翻訳阻害する技術を開発した。まず、クロアワビの生殖腺および未受精卵を用いたRNA-seqを実施し、生殖腺あるいは受精卵で発現する遺伝子群を特定することで、RNA干渉実験に際しての標的遺伝子を探索した。その結果、*vitelline envelope zona pellucida domain protein 12* 遺伝子が、クロアワビの卵母細胞および未受精卵で特異的に発現しており、特に、非産卵期の生殖腺内では、生殖原細胞のみで発現していることを明らかにした。次に、アワビ類ではRNA干渉実験の知見が全く存在しないことから、世界最大の養殖生産種であるエゾアワビを用いてRNA干渉実験系の構築を行った。エゾアワビの卵原細胞および卵母細胞で発現する*vasa* 遺伝子を標的として、*vasa* 遺伝子に対して設計したdsRNAを成熟卵巣へ直接注射したところ、それらが注射後3時間以降に卵母細胞内へ移行し、卵母細胞内の*vasa* mRNA量を減少させること、その後、産卵誘発を行うことで、*vasa* mRNA量が減少したアワビ受精卵を生産できることを明らかにした。

これらの成果は、産卵誘発前の成熟したアワビ卵巣へdsRNAの注入を行うことで、排卵卵内の標的mRNA量を減少させることが可能な母性RNAノックダウン法をアワビ類で初めて開発した点で優れており、実際に得られた種苗の表現型を追跡調査していくなどの課題があるものの、今後水産学分野のみならず、基礎生物学の発展にも大きく貢献する優れた研究といえる。

以上の内容から、学生から提出された博士論文は、国内外の研究の水準に照らし、水産増養殖分野における学術的意義、新規性、独創性及び応用的価値を有しており、博士の学位に値することを審査委員一同確認した。

最終試験の結果要旨：

最終試験は平成30年2月14日に行われた。審査委員一同出席の下、学生に対して、博士論文の内容について最終確認のための質疑応答を行い、その内容は十分であった。一方、専門知識については公開発表会当日の質疑応答時や予備審査時でのディスカッションを含め十分であると審査委員一同確認した。

学術論文は平成30年2月14日時点で受理されていなかったが、これまでに1編が第一著者として公表済み ([Lingyun Yu, Dongdong Xu, Huan Ye, Huamei Yue, Shioh Ooka, Hidehiro Kondo, Ryosuke Yazawa, Yutaka Takeuchi. Gonadal Transcriptome Analysis of Pacific Abalone *Haliotis discus discus*: Identification of Genes Involved in Germ Cell Development. Marine Biotechnology, 2018. https://doi.org/10.1007/s10126-018-9809-5](https://doi.org/10.1007/s10126-018-9809-5))であることを平成30年8月13日に開催された最終審査委員会にて確認した。学術論文は英語で書かれており、かつ、国際会議において英語で発表しており、外国語の学力については問題ないと判断した。

また、講演発表は国際会議1回、国内学会1回を行っていることを確認した。合同セミナーについて、規定の学習時間および出席回数を満たしていることを確認した。大学院海洋科学技術研究科が指定した研究者倫理教育を修了していることを確認した。以上から、学生について博士論文審査、最終試験とも合格と判定した。