

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06744

研究課題名(和文) 肝臓で作られる魚類の強固な卵膜～その形成機構の解明～

研究課題名(英文) Egg envelopes derived from maternal liver in teleost

研究代表者

佐野 香織 (Sano, Kaori)

城西大学・理学部・准教授

研究者番号：70612092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：真骨魚類の卵を覆う構造物である卵膜は、zona pellucida (ZP)タンパク質で構成されている。真骨魚類の進化過程で卵膜形成器官は卵細胞自身から母体の肝臓へと大きく変化したことが知られている。このようなダイナミックな変化を遂げるためには「ZP遺伝子の発現場所の変化」、「肝臓から卵巣へのZPタンパク質の輸送の仕組み」、「卵細胞外から運ばれてきたZPでの卵膜形成の仕組み」など多くの変化を伴う必要があることが予想されるが、本研究において、「ZP遺伝子の発現場所の変化」のみで成し遂げられる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真骨魚類の卵膜だけでなく、哺乳類を含む四肢動物の透明帯、鳥類の卵黄膜、両生類の卵膜もzona pellucida (ZP)タンパク質で構成されている。このように、ZPタンパク質は広く保存されているタンパク質であることから、その詳細な卵膜形成の仕組みを理解することは、重要である。さらに、真骨魚類の進化において卵膜を形成する器官が卵細胞から母体の肝臓へと大きな変化を遂げている。本研究において、非常に複雑な変化に見えるこのような現象が、実は遺伝子の発現場所の転換のみで達成できた可能性を示した。これは生物の進化過程で起きた様々な転換を理解するひとつの例となると考えている。

研究成果の概要(英文)：The egg envelope, the structure that surround the egg of teleost, is composed of the zona pellucida (ZP) protein. It is known that the organ forming the egg envelope has undergone a change from the oocytes themselves to the maternal liver during the evolution of teleost. Such a dynamic change is expected to be accompanied by many changes, such as "a change in the ZP gene expression site," "the mechanism of ZP protein transport from the liver to the ovary," and "the mechanism of egg membrane formation with ZP transported from outside the egg cell. However, the present study suggests the possibility that this can be accomplished only by "a change in the ZP gene expression site.

研究分野：分子生物学 分子進化学 形態学

キーワード：卵膜形成の仕組み ZPタンパク質 コリオン 組換えタンパク質作製

1. 研究開始当初の背景

真骨魚類の卵細胞を覆う卵膜 (コリオン) は、zona pellucida (ZP) 遺伝子がコードする ZP タンパク質と呼ばれる糖タンパク質によって構成されている。ZP タンパク質には特徴的な ZP ドメインがあり、これが重合することで卵膜が形成される。ZP 遺伝子は、真骨魚類の進化で初期に誕生したカライワシ類 (ウナギなど) やアロワナ類では卵細胞自身で発現しているが、その後の進化過程で、肝臓で発現する ZP 遺伝子が獲得され、正真骨類 (メダカ、サケなど) やニシン目では母体の肝臓で合成された ZP タンパク質が血流を介して卵巣に運ばれて、卵膜を形成するという仕組みを獲得したことが知られている (Fig. 1, 2)。肝臓で大量の ZP タンパク質を合成できるようになった結果、正真骨類は産卵場所やその環境によって厚い卵膜を形成することが可能となったと考えられている。

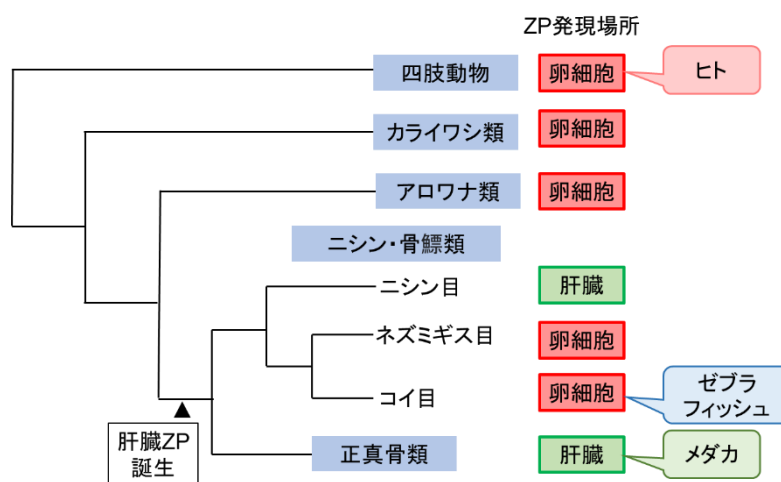


Fig. 1 四肢動物および魚類の進化系統関係と ZP 遺伝子の発現場所

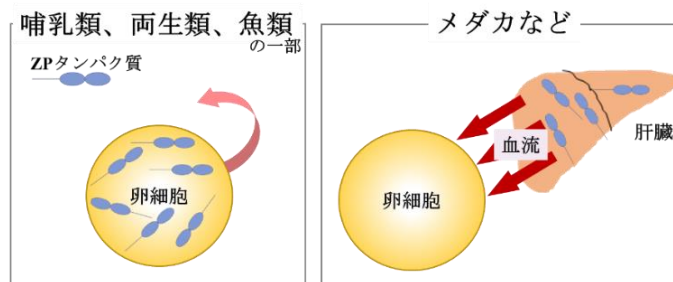


Fig.2 卵膜形成の模式図

2. 研究の目的

卵細胞内で合成された ZP タンパク質は卵細胞外に分泌されて重合する。このような卵膜形成の仕組みから、母体の肝臓において ZP を合成し、それらを用いて卵膜を形成するという新たな仕組みを獲得するためには、「ZP 遺伝子の発現場所の変化」「肝臓から卵巣までの ZP タンパク質の輸送」「卵細胞外から輸送された ZP タンパク質の重合」など、多くの変化を要することが予想される。しかし、我々は卵細胞で ZP タンパク質を合成する種にも、卵細胞外から輸送されて

きた ZP タンパク質で卵膜を形成する機構が潜在的に備わっており、このような複数の複雑な変化を伴わずとも、遺伝子の発現場所の変化のみでこのダイナミックな変化を遂げたのではないかという仮説を立てた。そこで、肝臓で ZP を合成する正真骨類のメダカと、卵細胞で ZP を合成するゼブラフィッシュを用いて、真骨魚類の進化の過程で卵膜タンパク質の合成場所が卵巣から肝臓に移ることができた理由やその経緯などを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュは ZP 遺伝子を卵細胞で発現する種である。そこでまず、肝臓で ZP 遺伝子を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作製した。肝臓発現のエンハンサーとして、メダカの ZP 遺伝子の 1 つである choriogenin L (ChgL) 遺伝子上流配列を用いてその下流に GFP をつないだコンストラクトを作製し、1～2 細胞期のゼブラフィッシュの受精卵にマイクロインジェクションした。孵化後 1, 2 週間の幼魚をエストラジオール(E2)を含む飼育水で飼育し、肝臓を観察した。次に、この ChgL 上流配列に続いてゼブラフィッシュの ZP 遺伝子を配置したコンストラクトを作製して、ゼブラフィッシュにマイクロインジェクションした。成長したメスの成魚の肝臓において ZP 遺伝子が発現し卵膜になるかどうかを解析した。コントロールとして、同様の実験をメダカでも行った。

また、human embryonic kidney (HEK)293A 細胞の発現系で、メダカとゼブラフィッシュのリコンビナント ZP (rZP) タンパク質を作製した。作製した rZP をメダカまたはゼブラフィッシュに投与し、卵膜として用いられるかを解析した。さらに、蛍光タンパク質融合 rZP を作製し、単離した培養卵巣の培地に添加し、卵膜として用いられるかどうかを解析した。

4. 研究成果

メダカの Chg の上流配列に続いて GFP を付加したコンストラクトをマイクロインジェクションしたゼブラフィッシュの幼魚を E2 を含む飼育水で飼育した結果、肝臓で GFP の傾向が観察された。このことから、メダカの ZP を肝臓で発現させるエンハンサーは遠縁のゼブラフィッシュでも働くことが明らかとなった。そこで、この上流配列を用いて、肝臓で ZP 遺伝子を発現するトランスジェニック(Tg)ゼブラフィッシュおよび Tg メダカを作製した。導入した ZP 遺伝子は内因性 ZP と区別するためにエピトープタグ(FLAG タグ)を付加した。FLAG タグが卵膜形成を阻害する可能性を考慮し、まずコントロールとして、ZP (Chg)を肝臓で発現するメダカにおいて、導入した ZP-FLAG が卵膜に取り込まれるかを解析した。成熟した雌の成魚から卵巣を単離し、凍結切片を作製し

て免疫組織化学により FLAG タグの局在を解析した。その結果、ZP-FLAG が卵膜から検出された。このことから、FLAG タグは卵膜の形成を阻害しないことが明らかとなった。次に Tg ゼブラフィッシュの成熟した雌の肝臓における ZP 遺伝子の発現をリアルタイム PCR で解析した。その結果、野生型(WT)では全く発現していない ZP 遺伝子が Tg ゼブラフィッシュの肝臓で発現していた。また、この Tg ゼブラフィッシュを E2 を含む飼育水で 2 日間飼育すると、肝臓での ZP 発現量は 6 倍に上昇した(Fig. 3)。しかし肝臓の切片を作製し、免疫組織化学により ZP-FLAG タンパク質の検出を試みたが、ZP-FLAG は検出できなかった。このことから、肝臓で ZP を発現するゼブラフィッシュを作製できたものの、その発現量は十分ではなく、タンパク質としては検出されないのではないかと考えた。

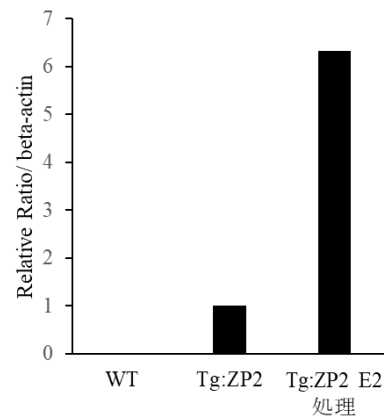


Fig.3 Tg: ZP2-FLAG 肝臓の ZP2 発現量

次に rZP を作製した。ZP タンパク質は糖タンパク質であるため、哺乳類細胞での発現系を用いる必要があるため、HEK293A 細胞の発現系を用いた。メダカの卵膜を構成する主要 ZP である ChgH および ChgL、ゼブラフィッシュの卵膜を構成する主要 ZP である ZP2 および ZP3 について、生体内で合成された時と同様の分子量の糖鎖が付加した rZP の作製に成功した。ゼブラフィッシュのメスの腹腔に作製した rZP2 を複数回投与後、卵巣を解析した結果、投与した rZP が卵膜となっていることが明らかとなった。このことから、卵細胞で ZP タンパク質を合成する種にも卵細胞から輸送された ZP タンパク質で卵膜を形成する機能を潜在的に備わっていると考えられた。さらに rZP2 は卵膜の最内層で検出されたことから、卵膜形成は内側へと肥厚してゆく可能性が示唆された(Fig. 4)。

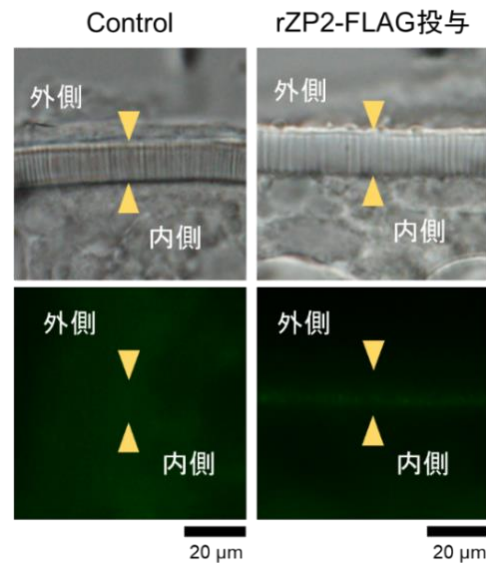


Fig.4 rZP2-FLAG を投与したゼブラフィッシュ卵細胞の免疫組織化学

また、蛍光タンパク質 (mClover3, mRuby3) 融合 rZP を HEK293A 細胞で作製した。単離したメダカやゼブラフィッシュの卵巣の培養液のなかにこの蛍光 rZP を添加し、数時間後に顕微鏡で観察した結果、卵細胞の周りに蛍光タンパク質が観察された。

以上の結果から、卵巣で ZP 遺伝子を発現し、ZP タンパク質を合成して卵膜を形成する種にも、細胞外から輸送された ZP タンパク質で卵膜を形成する機構が潜在的に備わっている可能性が示唆された。つまり、進化の過程で正真骨類などが獲得した、母体の肝臓で卵膜を作る機構は、ZP 遺伝子の発現場所が変化し

たことのみで成し遂げられた可能性がある。さらに、卵巢の単離培養系でも rZP が卵膜となった様子が観察されたことから、卵膜への ZP の取り込みは、非常に単純な仕組みなのではないかと考えられる。この仕組みの解明は今後の研究課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sano Kaori, Shimada Sho, Mibu Hideki, Taguchi Mizuki, Ohsawa Takasumi, Kawaguchi Mari, Yasumasu Shigeki	4. 巻 338
2. 論文標題 Lineage specific evolution of zona pellucida genes in fish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution	6. 最初と最後の頁 181 ~ 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jez.b.23122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iida Atsuo, Sano Kaori, Inokuchi Mayu, Nomura Jumpei, Suzuki Takayuki, Kuriki Mao, Sogabe Maina, Susaki Daichi, Tonosaki Kaoru, Kinoshita Tetsu, Hondo Eiichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Cubam receptor-mediated endocytosis in hindgut-derived pseudoplacenta of a viviparous teleost <i>Xenotoca eiseni</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jeb.242613	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Iida Atsuo, Nakai Risako, Yoshida Junki, Sano Kaori, Hondo Eiichi	4. 巻 118
2. 論文標題 Expression and antimicrobial activity of liver-expressed antimicrobial peptides in the ovaries of the viviparous teleost <i>Xenotoca eiseni</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fish & Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 405 ~ 410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fsi.2021.09.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sano Kaori, Yokoyama Risa, Kitano Takako, Takegaki Takeshi, Kitazawa Nobumasa, Kaneko Toyoji, Nishino Yoshihide, Yasumasu Shigeki, Kawaguchi Mari	4. 巻 332
2. 論文標題 Male parental assistance in embryo hatching of barred chin blenny <i>Rhabdoblennius nitidus</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution	6. 最初と最後の頁 81 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jez.b.22854	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iida Atsuo, Arai Hiroyuki N., Someya Yumiko, Inokuchi Mayu, Onuma Takeshi A., Yokoi Hayato, Suzuki Tohru, Hondo Eiichi, Sano Kaori	4. 巻 116
2. 論文標題 Mother-to-embryo vitellogenin transport in a viviparous teleost <i>Xenotoca eiseni</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 22359 ~ 22365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1913012116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 渡邊花菜、神田真司、佐野香織
2. 発表標題 卵巣由来zona pellucida (ZP)で卵膜を形成するゼブラフィッシュは血中に存在するZPで卵膜を形成する能力も備える
3. 学会等名 第92回日本動物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊花菜、神田真司、佐野香織
2. 発表標題 魚類の卵膜は先に形成されたものほど最外層側になる
3. 学会等名 第7回 ユニーク会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊花菜・高橋希望・神田真司・佐野香織
2. 発表標題 魚類の肝臓由来および卵巣由来ZPによる卵膜形成機構の比較のためのリコンビナントZPの作製とトランスジェニック体の解析
3. 学会等名 第91回日本動物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐野香織・川口眞理・安増茂樹
2. 発表標題 孵化酵素遺伝子と卵膜遺伝子の共進化がもたらした魚類の多様な孵化機構
3. 学会等名 第90回日本動物学会シンポジウム「魚類の繁殖～多様すぎる形態と生理に分子生物学のメスを入れる～」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青柳晶大・古川史也・安元剛・佐野香織・神保充
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ卵黄多核層における糖新生
3. 学会等名 第90回日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野香織・藤本尊任・小林一輝
2. 発表標題 アユ卵の付着糸を構成するタンパク質の同定
3. 学会等名 第5回ユニーク会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊花菜・神田真司・佐野香織
2. 発表標題 メダカとゼブラフィッシュの肝臓由来および卵巣由来リコンビナントZPの作製
3. 学会等名 第72回日本動物学会関東支部
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 財田里梨花・大西洋・長澤竜樹・加用大地・神田真司・安増茂樹・佐野香織
2. 発表標題 下位糸鱈類は真骨魚類よりも両生類に類似した卵膜硬化機構をもつ
3. 学会等名 第72回日本動物学会関東支部
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 神田真司（編者）他14名	4. 発行年 2019年
2. 出版社 一色出版	5. 総ページ数 480
3. 書名 遺伝子から解き明かす魚の不思議な世界	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	神田 真司 (Kanda Shinji) (50634284)	東京大学・大気海洋研究所・准教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------