

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：31103

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580262

研究課題名(和文) 魚類卵膜の多様性を反映した新たな卵膜形成モデルの構築

研究課題名(英文) Generation of new model for egg chorion formation in fish

研究代表者

藤田 敏明 (FUJITA, TOSHIAKI)

八戸工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30396311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の卵膜形成機構は魚種によって異なり、肝臓で前駆蛋白(Chg)を合成する種(肝臓タイプ)と卵巣で卵膜蛋白(ZP)を合成する種(卵巣タイプ)に大別される。しかし、両器官由来の蛋白を視野に入れ魚類一般に適応できる卵膜形成モデルは構築されていない。本研究では両タイプの魚種からそれぞれ解析されていない器官由来の卵膜蛋白もしくは遺伝子を観察し、肝臓タイプ魚種におけるZP蛋白の発現動態を明らかにすると共に卵巣タイプ魚種の肝臓で発現するChg様遺伝子を見出した。以上の結果から、魚類卵膜形成には一般に両器官由来の蛋白が関わるというモデルを構築した。

研究成果の概要(英文)：In teleost fishes, an origin of egg chorion proteins was considered to be species-specific. Egg chorion formation (choriogenesis) could be divided into following two types; the fish synthesize egg chorion precursors (choriogenin; Chg) in the maternal liver (liver-type) and the fish constructing chorion with ovary-derived zona pellucida (ZP) proteins (ovary-type). Although Chgs in liver-type fish as well as ZPs in ovary-type fish were observed in several fish species, it has not been investigated that ZP in liver-type fish or Chg in ovary-type fish. In the present study, a gene expression and protein localization of ZP in liver-type fish (Salmonid) was observed, while Chg genes in ovary-type fish (Cyprinid) was identified. These results could propose the new hypothesis that both Chg and ZP were required in teleost choriogenesis.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：魚類 卵形成 卵膜形成 コリオジェニン ZP

1. 研究開始当初の背景

魚類の卵は比較的厚い膜(卵膜)に覆われ外界からの衝撃から保護されている。卵膜を構成する蛋白の合成過程は魚種によって異なるとされ、サケ科などでは肝臓(肝臓タイプ)で、コイ科などでは卵巣(卵巣タイプ)で卵膜の主要蛋白が合成されることが知られている。しかし、メダカやヨーロッパヘダイにおける近年の報告では、卵巣と肝臓の両器官で卵膜蛋白が合成されることが明らかになった。これらの報告に続き、主に肝臓由来の卵膜前駆蛋白(コリオジェニン: Chg)から卵膜を構築するとされていたサケ科魚類において、卵巣で発現する卵膜蛋白(zona pellucida protein: ZP)遺伝子がクローニングされた。このことは、魚類卵膜形成は、2つの器官由来の蛋白が関わる複雑な過程であることを示唆している。それにも関わらず、上記2器官由来の成分を視野に入れ、魚類一般に適応できる卵膜形成モデルは構築されていない。これは魚類卵膜蛋白の一次構造に関する知見が乏しいことが一因となっている。これまで、サブタイプを含めた卵膜蛋白を同定し、それらの一次構造を明らかにした魚種は、いくつかのサケ科魚類、メダカ、マミチョグ、ヨーロッパヘダイ、数種のコイ科魚類に限られ、1魚種で肝臓および卵巣の両器官に由来する卵膜蛋白の全てを解明した例はメダカとヨーロッパヘダイに限られている。今後、脊椎動物の中でも特に多様性に富んでいる魚類の卵膜形成機構を解明するためには、新たな卵膜形成モデルの構築とより多くの魚種を対象とした一次構造の比較が重要であると思われる。

2. 研究の目的

本研究では、魚類一般に適用できる新たな卵膜形成モデルを構築するため以下の3つ目的で実験を行った。

(1)「肝臓タイプ」の典型種としてサケ科魚類を選定し、卵巣におけるZP遺伝子と蛋白の局在を明らかにする。(2)「卵巣タイプ」の典型種としてコイ科魚類を選定し、肝臓で発現する卵膜前駆蛋白Chgを検索・同定する。(3)これまで報告されていない魚種からChgおよびZP遺伝子をクローニングし、一次構造に関する知見を集積する。

3. 研究の方法

本研究では上記3つの目的に従って以下の項目に関する解析を実施した。

(1)サケ科魚類におけるZP遺伝子ならびに蛋白の局在解明: サクラマス1年魚雌から摘出した卵巣片は、常法に従ってパラフィン包埋し、6 μ m切片を作製した。サクラマス卵巣で発現する2種類の卵膜蛋白(ZPB、ZPC)遺伝子の配列を基にDIG標識RNAプローブを作製し、in situ hybridizationにより発現の局在を観察した。一方、上述の組織切片と組換

えZP蛋白に対する抗体を用いて卵巣を観察し、ZP蛋白の局在を免疫組織学的に明らかにした。

(2)コイ科魚類におけるChg遺伝子のクローニング: 供試魚には青森県小河原湖で採捕し畜養されていたコイの雌魚(体長47cm、体重1,200g、卵巣重量157g)を用いた。既存の魚類ChgもしくはZP遺伝子の塩基配列を参考に縮重プライマーを作製し、供試魚の肝臓臓片から調整したcDNAを用いたRT-PCRを行った。得られた特異的増幅産物はTAクローニングによって配列を決定した。次いで、遺伝子特異的プライマーを設計し、RACE法により5'末端までの塩基配列を決定した。

(3)新規魚種におけるChg遺伝子のクローニング: これまで報告例の少ない海産魚から、沿岸で容易に捕獲できるマハゼを選定し、縮重プライマーを用いたRT-PCR、TAクローニングおよびRACE法により全長を含むChg遺伝子をクローニングした。

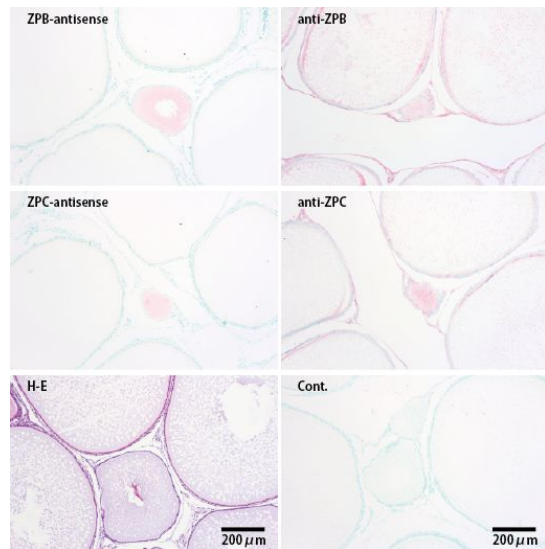


図1. サクラマス卵巣の組織像

左: ZP遺伝子に対するin situハイブリダイゼーションおよびヘマトキシリン-エオシン染色(H-E)
右: 抗ZP蛋白抗体を用いた免疫組織化学(Cont.は正常兔血清を用いた対照染色像)

4. 研究成果

(1)サケ科魚類におけるZP遺伝子ならびに蛋白の局在: 観察に用いた1年魚雌の卵巣には後期卵黄胞期もしくは初期卵黄形成期の卵母細胞と初期卵黄胞期と思われる大きさの異なる2種類の卵母細胞が含まれていた(図1)。本種ZPB遺伝子に対するDIG標識プローブを用いたin situ hybridization(ZPB-antisense)では初期卵黄胞期と思われる卵母細胞の細胞質が陽性反応を示して赤色を呈し、発達の進んだ卵母細胞ならびに体細胞(濾胞細胞・結合組織)は全く染色されなかった。同様にZPC遺伝子に対するDIG標識プローブを用いた場合にも、比較的未熟な卵母細胞の細胞質のみに陽性反応が観察

された。これらの発現タイミングはコイ科魚類での報告と一致しており、卵巣で発現する ZP 遺伝子に共通する特徴であることが示唆された。一方、ZP 蛋白に対する抗体(anti-ZPB および anti-ZPC)を用いた免疫組織学的観察では、卵巣組織全体にわたる非特異と思われる弱い染色性が認められた。しかし、初期卵黄胞期の卵母細胞の細胞質は、anti-ZPB および anti-ZPC 両者に対して比較的強い免疫陽性反応を示した。以上のことから、サクラマス ZP 遺伝子は、活発な卵黄蓄積と卵膜肥厚が起きる卵黄形成期以前の卵母細胞特異的に発現し、直ちに蛋白に翻訳されていることが明らかになった。

(2) コイ科魚類における Chg 遺伝子のクローニング：魚類 Chg H および L 遺伝子に対する縮重プライマーを用いた RT-PCR を行ったところ、それぞれ 609bp および 304bp の cDNA 断片が得られた。これらの断片はそれぞれ 203 残基および 100 残基のアミノ酸をコードしており、前者は Chg H が属する ZPB ファミリー、後者は Chg L が属する ZPC ファミリーの遺伝子であることが明らかとなった。次いで、それぞれの遺伝子特異的プライマーを設計して 5' RACE を行い 5' 末端までの配列を明らかにした。引き続き 3' RACE によって全長を含む遺伝子の単離を試みたがプライマーの非特異反応により特異的増幅が認められなかったため、5' 末端側の部分配列を用いて一次構造を解析した。TA クローニングおよび 5' RACE の結果 Chg H の部分配列と思われる 1,092bp の断片 (H-H) と 657bp の断片 (H-L) ならびに Chg L の部分配列と思われる 935bp の断片が得られた。コイ Chg H-H および H-L 遺伝子はそれぞれ、シグナルペプチドを含む 360 残基および 218 残基のアミノ酸をコードしており、ZPB ファミリーに特徴的な TFF ドメインならびに ZP ドメインの N 末端側の一部を有していた。相同検索の結果、H-H および H-L はそれぞれコイの ZP2 蛋白と 62.7% および 35.7%、ゼブラフィッシュの ZP2 蛋白と 57.6% および 48.0% の比較的高い相同性を示した。一方、H-H と H-L の相同性は 50.3% であった。両蛋白はコイ ZP2 の N 末端側に見られる PQ リッチなリピート配列を有しているものの、その領域の長さに違いが観察され、他の TFF ドメインおよび ZP ドメインの一部はコイおよびゼブラフィッシュ ZP2 と比較的高度に保存されていた。このことから、比較した蛋白の相同性の違いは PQ リッチリピート領域の長さに帰因するものと推測された。一方、コイ Chg L 遺伝子断片はシグナルペプチドを含む 311 残基をコードしており、シグナルペプチドに近接して ZP ドメインが存在するという ZPC ファミリーの特徴を有していた。また、そのアミノ酸配列はコイ ZP3 およびゼブラフィッシュ ZP3 とそれぞれ 77.1% および 59.9% の相同性を示した。以上、成熟期雌のコイ肝臓から ZPB な

らびに ZPC ファミリーに属する遺伝子を単離した。このことから「卵巣タイプ」に分類されるコイにおいても肝臓で卵膜蛋白が合成されていることが強く示唆された。

(3) 新規魚種における Chg 遺伝子のクローニング：(2)の項目と同様に Chg 各サブタイプに対する縮重プライマーを用いて RT-PCR を行い、マハゼ雌肝臓から調整した cDNA から特異的増幅産物を得た。これらの塩基配列を基に遺伝子特異的プライマーを設計し、5' RACE により 5' 末端までの塩基配列を決定した。次いで、得られた各遺伝子断片の 5' 末端部位の配列を基に特異的プライマーを設計し、これを用いた 3' RACE を行うことで各遺伝子の全長を含むクローンを単離した。その結果、本種 Chg H と思われる 2 つの遺伝子および Chg L と思われる 2 つの遺伝子が得られた。マハゼにおける 2 型 Chg H 遺伝子の全長は poly A を含む 1,724bp および 1,687bp でありそれぞれ 550 および 461 残基のアミノ酸をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) を有していた。ORF のサイズより前者を Chg H1、後者を Chg H2 とした。一方、Chg L では 471 残基をコードする 1,630bp の遺伝子ならびにそのスプライシングバリエーションと思われるやや短い遺伝子 (1,541bp、455 残基) が単離された。得られた 2 型 Chg H 遺伝子の演繹アミノ酸配列には両者ともに N 末端側から PQ リッチリピート領域、TFF ドメイン、ZP ドメインが存在し、魚類 ZPB ファミリー蛋白の特徴が観察された。さらに、ZP ドメイン内およびその直後に存在する 2 カ所の疎水性パッチならびに Furin 認識配列なども全て高度に保存されていた。一方、マハゼ Chg L でも、配列のほとんどを占める ZP ドメイン、2 カ所の疎水性パッチ、1 カ所の Furin 認識

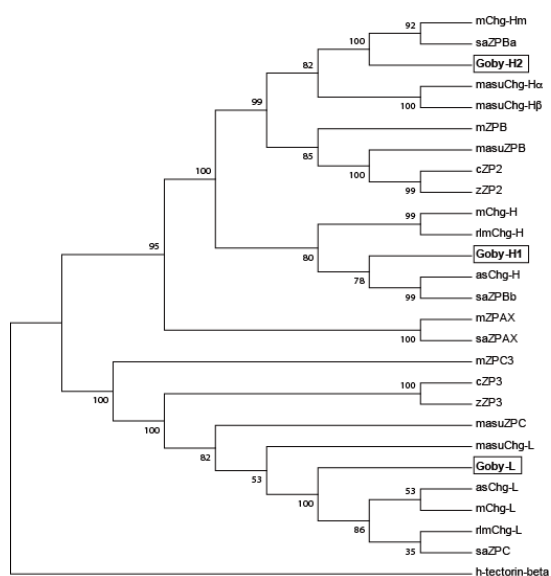


図 2. 卵膜蛋白の系統解析

m: メダカ, sa: ヨーロッパヘダイ, masu: サクラマス, c: コイ, z: ゼブラフィッシュ, rlm: メナダ, as: クサウオ, h-tectorin-beta: ヒトテクトリンβはアウトグループ

部位、1カ所のNリンク型糖鎖付加部位など Chg L の特徴が高度に保存されていた。系統解析の結果、マハゼ Chg H1 はヨーロッパヘダイ ZPBb、メダカ Chg H およびメナダ Chg H を含むクラスターに分類され、これらの相同蛋白であることが明らかになった(図2)。一方、マハゼ Chg H2 はヨーロッパヘダイ ZPBa およびメダカ Chg Hm(minor)と同じクラスターに分類された。Chg H サブタイプの名義については、現在まで統一的命名法が存在しないため非常に理解しにくい形となっている。例えばヨーロッパヘダイ ZPB (saZPB) には a と b の2型が報告されているが、サブタイプの名義はクローニングされた順であり、蛋白のサイズで比較すると saZPBb (621 残基) が saZPBa (476 残基) よりも大きい。そのため ORF のサイズによって名義を決めたマハゼ Chg H との関係性は Chg H1 = saZPBb、Chg H2 = saZPBa となり統一性に欠ける。今後、より蛋白の構造を反映したサブタイプの名義を設定するためにも Chg の一次構造に関する知見を集積する必要があると思われる。一方、系統解析の結果から、マハゼ Chg L が海産魚の Chg L の相同蛋白であることが明らかにされた。本研究では同様に卵巣を用いて実験を行い ZP 遺伝子の単離を試みたが、特異的増幅が認められなかった。今後、発達段階の異なる卵巣を用いた再解析が必要であると思われる。

以上本研究の結果より、魚類卵膜形成モデルに新たな仮説が追加された。

サクラマスなどの典型的「肝臓タイプ」の卵巣においてマイナー成分として発現する ZP 遺伝子の発現動態はコイなどの「卵巣タイプ」魚類と一致しており、前卵黄形成期の卵母細胞において活発である。従って、これまで肝臓タイプと卵巣タイプに分けられていた魚種の多くでは、タイプに関わらず、同様の生理的制御の下で ZP 遺伝子が発現する可能性が高いことが示唆された。また、「卵巣タイプ」魚類の肝臓でも Chg 様の蛋白が合成されるが、その一次構造は Chg よりも ZP に近く、肝臓で別の卵膜蛋白を合成するという特性を獲得する過渡期もしくはその特性が退行している結果である可能性が示唆された。従ってこれまで「卵巣タイプ」もしくは「肝臓タイプ」とされていた個々の魚種の卵膜形成機構は発現器官が分離した結果ではなく、主要な蛋白の発現部位の差である可能性が非常に高い。さらに、これら仮説を検証するためにも、より多くの魚種における卵膜蛋白の合成部位や一次構造に関する知見の集積が必要であると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 2件)

三浦修一・藤田敏明、コイの肝臓で発現する卵膜蛋白遺伝子の検索、平成25年度日本水産学会春季大会、2013年3月29日、東京海洋大学(東京都品川区)
川井満博・藤田敏明、サクラマス卵巣で発現する卵膜蛋白遺伝子の局在、平成24年度日本水産学会春季大会、2012年3月27日、東京海洋大学(東京都品川区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 敏明 (FUJITA TOSHIAKI)
八戸工業大学・バイオ環境工学科・准教授
研究者番号: 30396311

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし