

2019 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	水産資源を守る卵膜の構造進化の理解
キーワード	①魚卵、②卵膜の厚さ、③魚類の卵膜合成器官の進化

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	サノ カオリ 佐野 香織	所属等	城西大学 理学部化学科 助教
プロフィール	2006年に城西大学理学部化学科を卒業後、上智大学理工学研究科生物学専攻に進学し、2011年、同研究科で博士（理学）を取得。博士研究のテーマは魚類の孵化時に卵膜を分解するために胚が分泌する孵化酵素の機能進化について。その後、上智大学にて特別研究員を経て、2013年より城西大学理学部化学科助手、2015年度より助教として、生物学関連の講義と実習を担当しながら、魚類の卵および孵化に関する研究を継続している。		

1. 研究の概要

魚類の卵を覆う卵膜は主に zona pellucida (ZP) タンパク質によって構成されている。魚類の進化過程で ZP タンパク質を卵細胞で合成するグループと母体の肝臓で合成するグループが誕生したことが知られている。それぞれの卵膜合成機構を解明するために、卵細胞で合成するゼブラフィッシュと母体の肝臓で合成するメダカを研究材料とし、培養細胞を用いたリコンビナント ZP タンパク質の作製および生体への投与実験、またトランスジェニック体を用いた、卵膜形成機構の解析を行った。

2. 研究の動機、目的

魚類の胚は孵化までの期間、卵膜（コリオン）に覆われて外部環境から保護されている。この卵膜は、哺乳類の透明帯やニワトリの卵黄膜と相同な ZP (zona pellucida) タンパク質により構成されている。しかし四肢動物と異なる大きな点として、**①産卵場所や稚魚が孵化する環境によってその厚さや性質が様々であること**、そして、**②ZP タンパク質の合成場所が種によって異なり、大きく分けて母体の肝臓で卵膜を合成するグループと卵細胞自身が合成するグループに大別されることがあ**

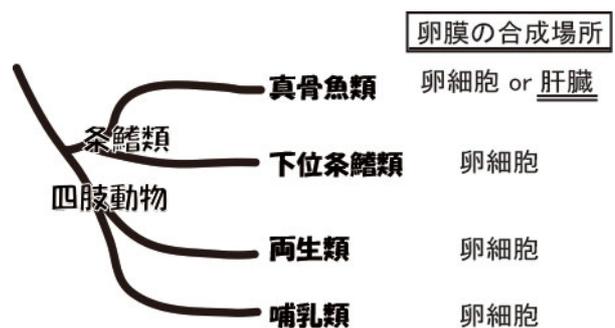


図1. 脊椎動物の卵膜の合成場所

げられる (図1)。申請者はこれまでに真骨魚類全体を網羅するようにさまざまな魚種の ZP 遺伝子の発現解析およびタンパク質レベルの局在解析をしてきてきた。その結果、遺伝子の発現場所が卵細胞から母体の肝臓へと変化したタイミングや、それにとまなう胚の孵化機構の変化など、**真骨魚類の進化過程における ZP タンパク質の進化の全貌を把握している**。さらに申請者らの研究によって興味深いことに、**卵膜の厚さと、受精から孵化までにかかる時間には相関関係がある**ことも明らかとなっている (Sano et al., 2017)。

卵膜は胚の保護のみならず、精子の認識や結合など受精にも重要な役割を果たしていることから長く研究されている。しかし、卵膜形成機構についてはマウスを用いた哺乳類でいくつか

の知見があるものの、魚類ではよく分かっていない。しかも魚類の ZP タンパク質には**哺乳類で卵膜形成に必須であるドメイン (transmembrane domain: TMD) が失われていることから、魚類には独自の卵膜形成機構が存在すると考えられる。**

一方、魚類の卵膜、特に肝臓で合成される ZP の発現はエストロジェンにより誘導されることから、同じくエストロジェンに応答して発現する卵黄物質 (ビテロジェニン) と並んで、**水質汚染や内分泌攪乱化学物質の有無の指標**として用いられている。(エストロジェン様物質の存在により雄でも簡単に発現するため。) しかも ZP 遺伝子はビテロジェニンよりも低濃度のエストロジェンに応答するため、希薄な汚染物質等の有無のマーカーとしても有用である。

このように種苗および環境汚染への応用にまで用いられている ZP タンパク質/ Chg にもかかわらず、肝臓で合成されて血流によって卵巣へ運ばれたのち、どのように卵膜を形成するかはよく分かっていない。

魚類の ZP タンパク質がどのように卵膜になるのか、その形成機構を明らかとしたい。

肝臓で ZP を合成する種では、卵巣にたどり着いた後どのように卵細胞の周りに沈着して卵膜となるのか。前述のビテロジェニンは、卵細胞内に取り込まれるための受容体の存在が明らかとなっているが、**卵細胞の外側にとどまる ZP に関しては未知である**。また卵細胞で ZP タンパク質を合成する種においても TMD をもたずにどのように卵細胞の周りにとどまっているのか。これらはどちらも四肢動物とは異なるメカニズムであると考えられるためその解明を目指したい。

3. 研究の結果

培養細胞 HEK293A (human embryonic kidney 239A) にゼブラフィッシュおよびメダカの ZP 遺伝子を導入し、発現させて**リコンビナント ZP タンパク質を作製することに成功した**。ZP タンパク質は糖鎖が付加した糖タンパク質であり、生体内で卵膜を形成するためにはこの糖鎖付加まで含めて、リコンビナントタンパク質を作製する必要があった。原核細胞 (大腸菌) や昆虫細胞 (sf9) による発現系が他にもよく知られているが、脊椎動物のタンパク質に本来の糖鎖を付加できるのは哺乳類細胞のみであるといわれている。このことから HEK293A の発現系を用いたところ、本来ゼブラフィッシュ及びメダカの生体内で作られた ZP タンパク質と同等の糖鎖が付加したリコンビナントを作製することに成功した。

作製したリコンビナント ZP を生体に投与したが、これらを卵膜として検出することはできなかった。その原因として考えられることは、HEK293A で作製できるリコンビナント ZP の量が十分でないことが考えられた。HEK の発現系では、正確な糖鎖付加が可能な代わりに、大腸菌や sf9 を用いた場合と比べて、収量が非常に少ないことが知られている。収量を増やす工夫、もしくは糖鎖付加が正確でなくても、多量にリコンビナント ZP を作製できる他の系を検討してゆく。

また、本来 ZP タンパク質を卵巣で合成するゼブラフィッシュにおいて、肝臓で ZP を強制的に発現させるトランスジェニックゼブラフィッシュを作成中である。肝臓で発現するプロモーターを付けた ZP 遺伝子を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することによって作製している (図 2)。この ZP 遺伝子には後で解析しやすいようにタグをつけてある。このタグが卵膜形成を阻害しないことを確認するために、まずはもともと肝臓で ZP を合成するメダカにおいても、タグ付き ZP が発現するようなトランスジェニックを作製した。メダカの卵巣を解析した結果、タグ付き ZP が卵膜として検出されたため、**タグが卵膜形成を阻害しないことが明らかとなった**。今後作成中のトランスジェニックゼブラフィッシュが成長したら、解析を進めてゆく予定である。



図2. マイクロインジェクションの様子

4. 研究者としてのこれからの展望

様々な生き物の生体内で起こっている現象には、明らかにされていない不思議なことがまだまだたくさんあります。私は基礎科学の分野でそのような未知の現象を解明してゆきたいです。そのために、古くから使われている実験手法である、形態の観察や遺伝子発現の解析など、そこにあるものを観察・解析することと、比較的新しい手法であるゲノム編集や遺伝子操作などの両方をバランスよく取り入れて、様々な方向からのアプローチができる研究者になりたいと考えています。基礎研究で明らかにしたメカニズムは応用して社会に還元することも研究者の大切な仕事です。応用を見据えた、研究方針をしっかりと立てられるよう心がけていきたいです。また、若い研究者を育ててゆくこと、さらに、女性研究者として、理系の女子学生が増え、生物が好きな子供たちを増やすことにも貢献出来たらと思います。研究が好きであることと、生物のさまざまな現象に興味を持ち続け、これからも日々精進してゆきます。

5. 社会に対するメッセージ

女性研究者奨励金をいただけたことによって、これまで頭の中で構想していた研究に実際に踏み出すことができました。1年間の研究で、明らかになった結果はごく一部ではありますが、本助成金が本研究テーマを進める推進力となったことは間違いありません。得られた研究結果をもとに、今後もこのテーマを継続してゆくつもりです。

魚類の卵という、日本人にはなじみ深いテーマを扱っていることから、例えば、イクラや数の子などをちょうどよい食感にする事や、卵膜の厚さと孵化までの時間には相関があることから、早く孵化する卵の作成など、水産や食品業界への応用もできればと考えています。その一方で、昨今、基礎科学も応用研究と同じくらい重要であることも再認識されてきています。卵膜形成機構についても分子レベルでメカニズムを解明することがとても重要であると考えています。基礎研究を対象とした研究費はなかなか獲得が難しいですが、本奨励金はそのような研究をさせてもらえる貴重な奨励金だと思います。寄付をいただいた企業や個人の方々に還元するために、今後も研究に精進し、様々な形で社会に貢献してゆきたいです。また、大学教員という立場でもありますので、若い世代の教育にも力を注いでゆきたいです。