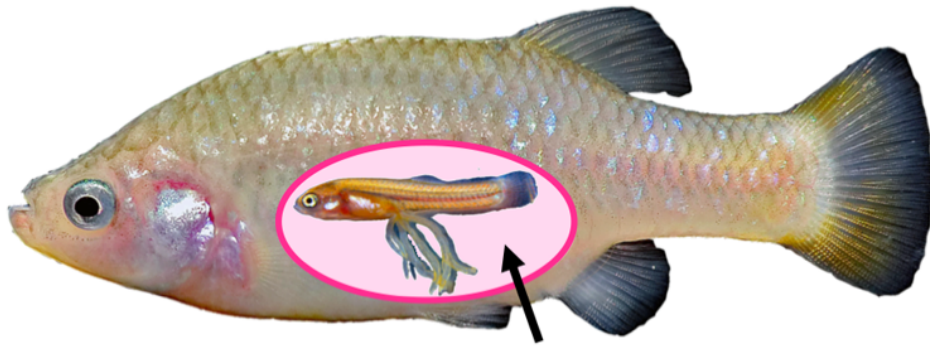


グーデア科胎生魚 *Xenotoca eiseni*



抗菌ペプチドLEAP1a因子

胎生魚類の卵巣は抗菌ペプチドを産生している ～卵巣内での雑菌の繁殖を防ぎ、卵や胎仔を保護する役割か～

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学大学院生命農学研究科の飯田 敦夫 助教、仲井 理佐子 博士前期課程学生、吉田 純生 博士後期課程学生、本道 栄一 教授らの研究グループは、城西大学との共同研究で、グーデア科胎生魚の卵巣が抗菌ペプチド遺伝子^{注1)}を発現していることを発見しました。

グーデア科胎生魚 *Xenotoca eiseni* の胎仔は、1ヶ月強の期間を親の卵巣内で栄養供給を受けて成長します。その間、母子間での栄養授受や老廃物の代謝など、卵生魚には無い様々な機構が胎生魚には必要となります。我々のグループはこれまで、栄養授受機構に関する発見を報告してきました。

本研究では新たに抗菌ペプチド遺伝子に注目し、卵巣で妊娠する胎生魚類が、卵や胎仔を雑菌から保護する機構の一端が見えてきました。一連の研究は、魚類で妊娠を成立させている胎生魚特有の生理機構の理解に貢献します。

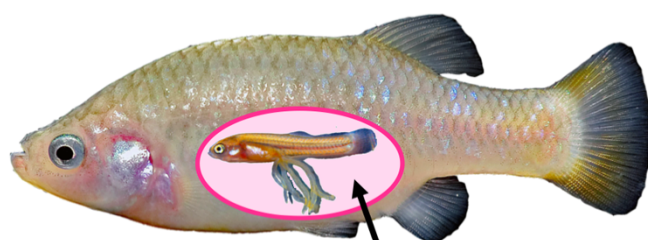
本研究成果は、令和3年9月25日付オランダの出版社エルゼビアが発行する専門学術誌「Fish and Shellfish Immunology」の電子版に掲載されました。

この研究は、一般財団法人 伊藤忠兵衛基金、一般財団法人中辻創智社、公益財団法人 大幸財団からの支援のもとで行われたものです。

【ポイント】

- ・胎生魚が卵巣内で胎仔を育てるにあたり、雑菌の侵入や繁殖を防ぐ必要がある。
- ・卵巣の RNA-Seq 解析^{注2)}により、抗菌ペプチドをコードする *leap* 遺伝子の一つが高く発現することが分かった。
- ・大腸菌への遺伝子形質転換を用いた簡易的な解析により、*leap1a* 遺伝子が強い抗菌活性を持つことが明らかになった。
- ・ゲーデア科胎生魚は抗菌ペプチド LEAP1a 因子を使うことで、卵巣内の環境悪化を防ぎ、長期間の妊娠を可能にしていると考えた。

ゲーデア科胎生魚 *Xenotoca eiseni*



抗菌ペプチドLEAP1a因子

図 1. 研究成果の要点

ゲーデア科胎生魚 *X. eiseni* は、卵巣で抗菌ペプチド因子をたくさん産生している。これは妊娠中に卵巣で育つ胎仔を細菌の増殖から保護する仕組みかも知れない。

【研究背景と内容】

「胎生」に残された謎は多い

「胎生」とは母親のお腹の中で赤ちゃんを育て、出産により個体数を増やす繁殖方法です。妊娠中に母親から子供へと栄養供給を伴うものは「真胎生^{注3)}」とも呼びます。ヒトを含む多くの哺乳類は「真胎生」であり、胎盤やヘソの緒を通じて母子間の栄養授受を行います。一方で、哺乳類以外の（魚類、爬虫類、両生類でも見られる）「胎生」については、形態に関する報告の豊富さに比べて、分子機構や遺伝子機能に言及した報告は少なく、謎が多くあります。

ゲーデア科魚類で「胎生」の謎を紐解いていく

本研究グループは、カダヤシ目ゲーデア科に属する胎生硬骨魚であるハイランドカープ（学名：*Xenotoca eiseni*）を用いた研究を行なっています。ゲーデア科では1ヶ月強の妊娠期間に、卵巣内の胎仔（たいし）が母体からの栄養分を受け取って成長します。我々は2019年と2021年に、母子間の栄養授受機構についての研究成果を発表しました（名古屋大学HP「研究教育成果情報」2019年10月9日付「魚類がお腹の子供に与える栄養素を解明！ ～哺乳類が失った遺伝子を利用して胎生機構を獲得～」及

び2021年6月30日付「サカナは消化管から胎盤を作った？ ～グーデア科胎生魚で母子間物質運搬の仕組みを探る～」参照)。一方で、卵巣内が母体由来の栄養分で満たされ、それを吸収して胎仔が成長することから、別の「学術的な問い」が新たに生じました。それは「母体由来の物質あるいは胎仔の代謝物を養分として、卵巣内で雑菌が繁殖してしまう可能性はないのか？」ということです。

卵巣で発現する抗菌ペプチド遺伝子を発見した

我々は *X. eiseni* の卵巣から遺伝子転写産物である RNA を抽出し、次世代シーケンサー^{注4)}により配列を解読し、発現量の多い遺伝子を探索しました (RNA-Seq 解析)。その結果、未妊娠及び妊娠卵巣の双方において、抗菌ペプチド因子 LEAP^{注5)} (lever-expressed antimicrobial peptides) のひとつをコードする *leap1a* 遺伝子に相当する転写産物が特徴的に多い (約 25,000 転写産物中 60 位前後) と予測されました。最終的に我々は *X. eiseni* から4つの *leap* 相同遺伝子 (*leap1a*, *leap1b*, *leap2a*, *leap2b*) を同定し、塩基配列と転写量を予測しました。RT-PCR 法^{注6)}による遺伝子発現解析においても RNA-Seq 解析と同様の結果が得られ、*leap1a* は卵巣で強く発現する抗菌ペプチド遺伝子であると考えました (図2)。

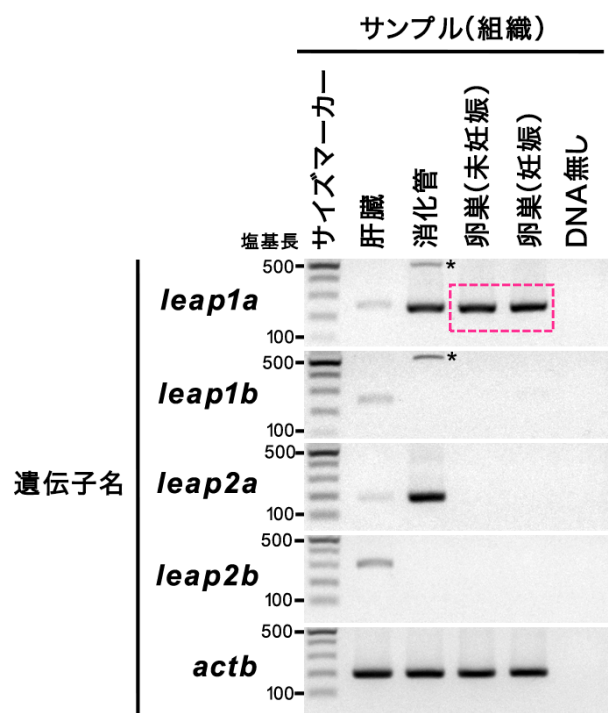


図2. *leap* 遺伝子の発現解析

黒いバンドが *X. eiseni* の組織における *leap* 遺伝子の発現量 (RNA 量) を示す。*leap1a* のみが卵巣で強い発現を示した (桃色枠)。*actb* は全ての組織で強く発現するポジティブコントロールとして使用した。*は RNA に由来しないバンド。

4つの *leap* 遺伝子の中で *leap1a* が最も抗菌活性が高い

今回同定した *X. eiseni* の *leap* 遺伝子から翻訳されるペプチドの抗菌能力を調査する目的で、*leap* 遺伝子を強制発現させた大腸菌の増殖を観察する簡易的な活性評価を行いました。その結果、*leap2a* では抗菌能力が認められない一方、*leap1a* が最も強い

抗菌能力を持つというデータが取得できました（図 3）。以上の解析から、遺伝子発現の場所・量・翻訳産物の抗菌能力から類推して、LEAP1a 因子がグーデア科胎生魚 *X. eiseni* において、卵巣内での雑菌増殖の抑制に貢献していると考えました。

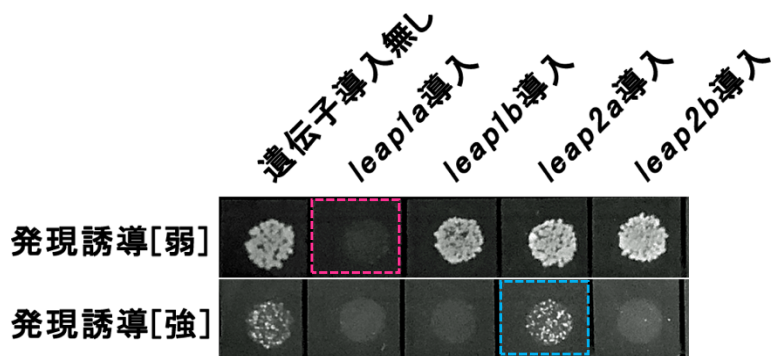


図 3. 大腸菌の増殖を指標とした抗菌能力の検証

leap1a においては、弱い発現誘導下でも大腸菌の増殖が抑制された（桃色枠）。一方、*leap2a* は強い発現誘導下でも大腸菌が増殖は抑制されなかった（水色枠）。

【成果の意義】

基礎研究としての視点

本研究により、魚類で胎生を成立させている形質が、またひとつ見えてきました。胎生は哺乳類と魚類以外に爬虫類と両生類でも報告があり、脊椎動物で独立に複数回獲得されている形質です。つまり「子供を産む」という外見は同じでも、体内で起こる構造的・生理的な変化や、それを規定する遺伝子の働きには多様性があると考えられます。それらをひとつずつ紐解いていくことで、地球上で生物が繁栄する鍵となっている仕組みが明らかにできる可能性があると考えています。

応用に繋げるならば

また今回、想定外の棚ぼたではあるものの、カダヤシ目グーデア科の LEAP1a 因子が高い抗菌能力を持つことが示唆されました。この抗菌ペプチドが本当に高い活性を持つならば、何かしらの応用への可能性が広がります。それを主張するには「合成ペプチドを用いた活性評価」「大腸菌以外への菌種を用いた評価」「他分類群（例えば哺乳類）の LEAP1 因子との比較」などの追加実験が必要となります。

「意外な発見」の醍醐味

今回、胎生魚の生理的特徴に抗菌ペプチドをはめ込んだシナリオは、ある意味で予想できた結果でした。一方で LEAP1a 因子の抗菌能力の高さは、全くもって「意外な発見」でした。この意外性こそ、基礎研究の醍醐味のひとつではなかろうかと、私は考えています。

【用語説明】

注 1) 抗菌ペプチド遺伝子 :

抗菌ペプチドとは、アミノ酸が約十～数十個連なったポリペプチドのうち菌を破壊、あるいは増殖を抑制する活性を持つ因子の総称である。ヒトを含めた哺乳類や植物、昆虫などあらゆる多細胞生物で見つかっている。

注 2) RNA-Seq 解析 :

細胞内に存在する RNA の塩基配列を網羅的に解読し、その種類と数を整理することで、特定の遺伝子の発現量を推定する手法。

注 3) 真胎生 :

母体内で母親からの栄養供給を受けて子が成長する様式。子の成長が自身の卵黄栄養のみに依存するものを対比的に「卵胎生」と呼ぶ。

注 4) 次世代シーケンサー :

数千から数百万もの核酸分子を高速で配列決定できる実験ツールを指す。膨大な情報量を取得することができ、ビッグデータを扱う大規模解析や網羅的解析において力を発揮する。

注 5) LEAP :

哺乳類では肝臓で主に産生され、血中に放出されて全身に送られる抗菌因子のひとつ。内部に複数のジスルフィド結合を持ち、微生物の細胞膜を破壊することで抗菌活性を持つ。

注 6) RT-PCR 法 :

細胞内でタンパク質合成の設計図となる mRNA を、あらかじめ逆転写酵素により DNA に変換して、PCR 法により遺伝子発現の有無および量を検証する方法。RT は「Reverse Transcription」の略。

【論文情報】

雑誌名 : Fish and Shellfish Immunology

論文タイトル : Expression and antimicrobial activity of liver-expressed antimicrobial peptides in the ovaries of the viviparous teleost *Xenotoca eiseni*.

著者 : Atsuo Iida, Risako Nakai, Junki Yoshida, Kaori Sano, Eiichi Hondo.

DOI:10.1016/j.fsi.2021.09.029

URL:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464821002953?via%3Dihub>