

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06444

研究課題名(和文)ニワトリ胚の血糖値調節における卵黄囊の役割

研究課題名(英文)The yolk sac membrane's role in regulating chick embryo blood glucose

研究代表者

岩澤 淳(Iwasawa, Atsushi)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：90242742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：鳥類は他の動物群と比較して顕著な高血糖である。本研究ではニワトリ胚が卵の限られた資源を用いて高い血糖値を維持するメカニズムを明らかにしようとした。ニワトリ胚では卵黄囊膜で糖新生が行われており、胚の酸素の得られやすさの変化に伴って、糖新生の原料として乳酸またはグリセロールが用いられていること、卵黄囊膜は糖新生で作られたグルコースを血中に放出する臓器であり、血糖値の増加に寄与すること、一方、グルコースはグリコーゲンに転換されて孵卵後期まで卵黄囊膜に蓄えられ、孵化直前にはグリコーゲンがグルコースに再転換されて血中へ大量に放出され、孵化に伴う大きなエネルギー需要をまかなうことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鳥類の胚期を通じて糖代謝酵素や代謝産物を継続的に測定した初めての研究であり、派生するさまざまな研究課題を提供する結果が得られた。鳥類は高血糖でありながら長寿を維持できる動物群であり、これらの研究を通じてヒトの健康寿命の延伸にも寄与しうる。

研究成果の概要(英文)：Birds are markedly hyperglycemic compared to other animal groups. This study investigated how the chick embryo maintains high blood glucose levels using the limited resources of the egg. In the chick embryo, glyconeogenesis occurs in the yolk sac membrane. In response to changes in oxygen availability in the embryo, lactate or glycerol is used as a raw material for glyconeogenesis. The yolk sac membrane is the organ that releases glucose produced by glyconeogenesis into the blood, contributing to the increase in blood glucose levels. On the other hand, glucose is converted to glycogen and stored in the yolk sac membrane until late in the incubation period, and just before hatching, glycogen is reconverted to glucose and released into the blood in large amounts to meet the enormous energy demand associated with hatching.

研究分野：動物生理化学

キーワード：ニワトリ 卵黄囊 糖新生

1. 研究開始当初の背景

胎盤を通じて母親から栄養が供給される哺乳類と異なり、鳥類の胚は、卵黄と卵白だけを栄養源として育つ。鳥類の卵黄を包む卵黄嚢が、胚が孵化するまでの栄養を入れる袋というだけではなく、その栄養分を利用可能な形に転換して胚に供給するための多くの酵素を持った代謝臓器でもあることは、あまり注目されてこなかった。一方、顕著な高血糖動物である鳥類は、すでに胚期から血糖値が高いが、産卵された卵内の糖質は卵重の約1%と少ないので、高い血糖値の維持には糖新生が不可欠と考えられる。本研究は、代表的な代謝臓器である肝臓よりも孵卵期間を通じてはるかに大きい臓器である、鶏胚の卵黄嚢における糖代謝を調査した。孵化に備えたエネルギー源として糖を貯蓄する一方で糖を血中に放出して血糖値を高めるという資源の巧妙なやりくりの際して卵黄嚢が果たす生化学的な役割を、酵素活性と酵素遺伝子発現の定量や代謝産物の分析などを通じて解明したいと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ニワトリ胚の高い血糖値の維持における卵黄嚢の代謝臓器としての役割の解明であり、これを明らかにすることで主として以下の疑問に答えようとした。

- ・卵黄嚢と肝臓は代謝に関してどのような役割分担をしているか。たとえば、胚の全身の糖新生への寄与度の高い臓器は孵卵中のいつ頃に卵黄嚢から肝臓へと交代するのか。また、主に働く糖代謝の酵素は2つの臓器で異なるのか。
- ・卵黄嚢と肝臓とで糖新生の原料は異なるか。とくに、卵黄嚢は肝臓と異なってアミノ酸からの糖新生ができるか。これらは胚の発生段階に照らして合理的な違いか。
- ・卵黄嚢では、孵化のためのエネルギー源となるグルコースの蓄積が孵卵期間を通じて増えていくと考えられる。一方でグルコースが血中に放出されて血糖値が高まっていく。この相反する代謝はどのように調節されるのか。ホルモンは代謝の方向性を制御しているか。

3. 研究の方法

研究開始時には下記の測定等を予定し、さらに、研究の進展状況や研究期間中に発表された種々の研究論文をふまえて、必要に応じて測定項目を追加した。

<糖代謝の「鍵酵素」の遺伝子発現と酵素活性の定量>

対象とする主な酵素など(カッコ内は関与する主な機能):

- ・ glucose-6-phosphatase (細胞内のグルコースを細胞外に放出)
- ・ fructose-1,6-bisphosphatase (グリセロールやアミノ酸からの糖新生)
- ・ glycogen synthase (グリコーゲンの合成)
- ・ glycogen phosphorylase (グリコーゲンの分解)
- ・ glucose transporters (GLUT; 細胞膜のグルコース輸送体) ほか

<代謝産物の解析>

主にメタボローム解析により代謝産物を同定し、孵卵期間中の糖新生の全貌の解明を目指す。

<血中ホルモン測定>

代謝を制御するホルモン(インスリン, グルカゴン, 甲状腺ホルモン)の胚の血中濃度を測定し、他の各解析結果と対応させてその作用の推定を目指す。

<卵黄嚢の組織培養・細胞培養>

上記3つの解析は「正常に発生している胚における代謝の観察」と位置づけられる。さらに、発生の様々な時期の卵黄嚢と、分離した卵黄嚢の上皮細胞を初代培養して、代謝を制御するホルモンや代謝の原料(アミノ酸, グリセロール等), 酵素活性の阻害剤等を添加した際の代謝の変化について実験的に知ることを目指す。

4. 研究成果

ニワトリをはじめとする鳥類(鳥綱)は他の動物群と比較して顕著な高血糖動物である。鳥類の中では血糖値が低めのニワトリでも健康なヒトの約2~2.5倍で、日本糖尿病学会の基準では「糖尿病」と診断される値である。冬眠中に血糖値を高めて血液の凍結を防ぐなど、血糖値の高い生物は他にも存在するが、動物群全体として季節にかかわらず血糖値が高いのは鳥類しか知られていない。「なぜ鳥類の血糖値は高いのか」(生物学的意義)は、いまだに明らかにされていない。他に「どのようにして血糖値を高く維持しているのか」「ヒトの糖尿病合併症のような高血糖に伴う障害がなぜ起こらないのか」という疑問もある。本研究では2つめの疑問(高血糖値の維持機構)を解決するため、ニワトリが胚の段階から高血糖である(図1)ことに着目し、卵の中の限られた資源を用いて、胚の発生や孵化の準備を進めつつ高い血糖値を維持するための、

生化学的なメカニズムを明らかにすることを試みた。

胎盤を通じて母親とつながっている哺乳類と異なり、鳥類の胚が孵化までに使える資源は、卵殻外から供給される酸素を除けば、卵殻内にしかない。しかし、産卵直後の卵に含まれる糖質は卵の重量のわずか1%程度(図1)なので、糖以外の栄養素(タンパク質由来のアミノ酸、脂質由来のグリセロールなど)から糖を生産する「糖新生」によって糖質不足をまかなっていると考えられている。ところが、ニワトリ胚の臓器(肝臓・腎臓・骨格筋)ではアミノ酸からの糖新生を行っていないことが、私たちの過去の研究からわかっている。アミノ酸は胚の形態形成(タンパク質合成)の原料として重要ではあるが、それだけではなく、成鶏では糖新生の主原料でもある。ニワトリ胚がアミノ酸を糖新生の原料として使えないのは胚の高い血糖値の維持に不都合なのではないかと考えて、卵黄嚢の代謝機能に注目した。

鳥胚において、卵黄嚢は発生期間を通じて最も重い臓器である。たとえば、ニワトリ胚の21日間の孵卵期間の17日目における卵黄嚢の湿重量(約4g; 卵黄重量は含まない)は、同じ日の肝臓の湿重量の約9倍も重い(図2)。卵黄嚢は卵黄を包む袋というだけではなく、卵黄の栄養分を吸収し、胚に利用できる形に転換して、血管を通じて胚へ送る代謝臓器でもある。たとえば甲状腺ホルモンはとくに脳の正常な発生に不可欠だが、胚自身の甲状腺は孵卵期間の半分に達する頃までほとんど機能していないので、その間、卵黄嚢は卵黄に含まれる甲状腺ホルモンを胚に向けて供給するという重要な役割を担っている。成鳥の代表的な代謝臓器である肝臓は、ニワトリでは孵卵中期からようやく大きくなっていく(図2)。卵黄嚢はそれ以前から十分な大きさがある。そこで、卵黄嚢は肝臓が機能を始めるまでの間、あるいはその後も、アミノ酸を原料にした糖新生を行って糖を胚に供給することで、胚期の重要な糖代謝臓器として働くのではないかという仮説を立てた。

本研究の結果、図1および図2の内容に加え、主に以下のことが新たに明らかになった(図3)。

(1) 胚の酸素の得られやすさは孵卵期間中を通じて変化する。孵卵第1週から第2週半ばまでを第1期、孵卵第2週半ばから第3週半ばまでを第2期、第3週半ばから孵化までを第3期とすると、第1期と第3期の胚は酸素不足の傾向がある。これに対応して、第1期と第3期には解糖系の産物である乳酸を原料とする糖新生が卵黄嚢膜で行われる。哺乳類や鳥類の成体では肝臓と骨格筋の間で「Cori回路」と呼ばれる代謝が知られている。これは骨格筋の収縮で生じた乳酸を肝臓での糖新生でグルコースに転換し、これをエネルギー源として骨格筋が収縮するというサイクルである。これと同様の機能を卵黄嚢膜が果たしていることが示唆され、「臓器内 Cori回路」と位置づけられた。

(2) 孵卵第2期の糖新生の原料としてトリグリセリドが重要である。第2期には卵黄嚢膜のトリグリセリドおよび脂肪酸含量が有意に増加する。先行研究をふまえると、この時期の胚は酸素が得られやすいためクエン酸回路・酸化リン酸化によるエネルギー生産が行われている。卵黄の乾燥重量の50%以上を占めるトリグリセリドが分解されて生じた脂肪酸が胚のエネルギー源として使われるとともに、同様に分解産物であるグリセロールは糖新生によってグルコースに転換されることが示唆された。研究当初に想定していたアミノ酸は、むしろ貴重な窒素源として胚の形態形成に利用されることが考えられた。

(3) 卵黄嚢膜は成体の肝臓と同様、糖新生で作られたグルコースを血中に放出することのできる臓器であり、この放出は孵卵期間を通じて行われる。孵卵第1期～第2期の卵黄嚢膜では糖新生で得られたグルコースがグリコーゲンに転換され、グリコーゲンの貯蔵量は増加する。とくに第2期にはグリコーゲンへの転換が増加するのに伴って血中へのグルコースの放出はやや節約されることが示唆された。孵卵第3期には卵黄嚢膜での糖新生の活性は低下するが、貯蔵されていたグリコーゲンがグルコースに転換されて血中へ放出され、血糖値の急激な増加をもたらす。このグルコースは胚の孵化に際しての大きなエネルギー需要(先行研究によると孵卵期間全体のエネルギー需要の10%)を満たすと考えられる。

(4) 糖新生の生化学の分野でかねてから大きな興味の対象であったホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PEPCK)の細胞内局在に関して、卵黄嚢膜においては成鶏および胚の肝臓と異なって、細胞質およびミトコンドリアのどちらにも存在することが示唆された。とくに細胞質型酵素の発現が細胞内の乳酸濃度に関連するような結果が得られ、卵黄嚢膜細胞のpHセンサー等を介した転写調節の存在が予想された。

以上の結果から、卵黄嚢膜は卵黄と発生中の鶏胚の間の卵黄物質の移動のための重要な「中継点」となっていると考えた。何(ホルモン、代謝因子、細胞内シグナル伝達分子など)が中継のスイッチングを制御しているのか、スイッチングはいつ起こるのか、それぞれの代謝トラフィックはどの程度大きいのか、という疑問が本研究を通じて未解明の重要な課題として提起された。これらの点については本研究に引き続き研究を続けている。

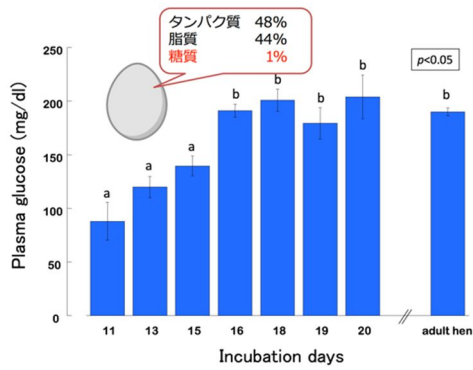


図 1
ニワトリ胚の血糖値。孵卵期間中、血糖値は次第に高まり、孵卵 13 日でヒトの血糖値を超える。

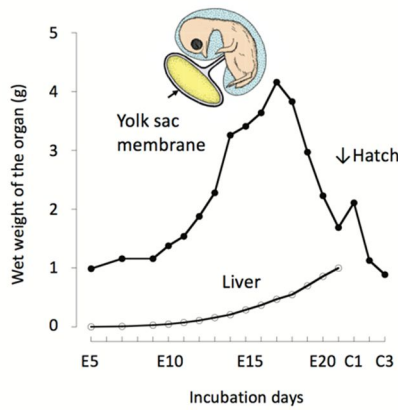


図 2
ニワトリ胚の発生に伴う卵黄嚢と肝臓の重量変化。卵黄嚢は孵卵期間中最大の臓器である。

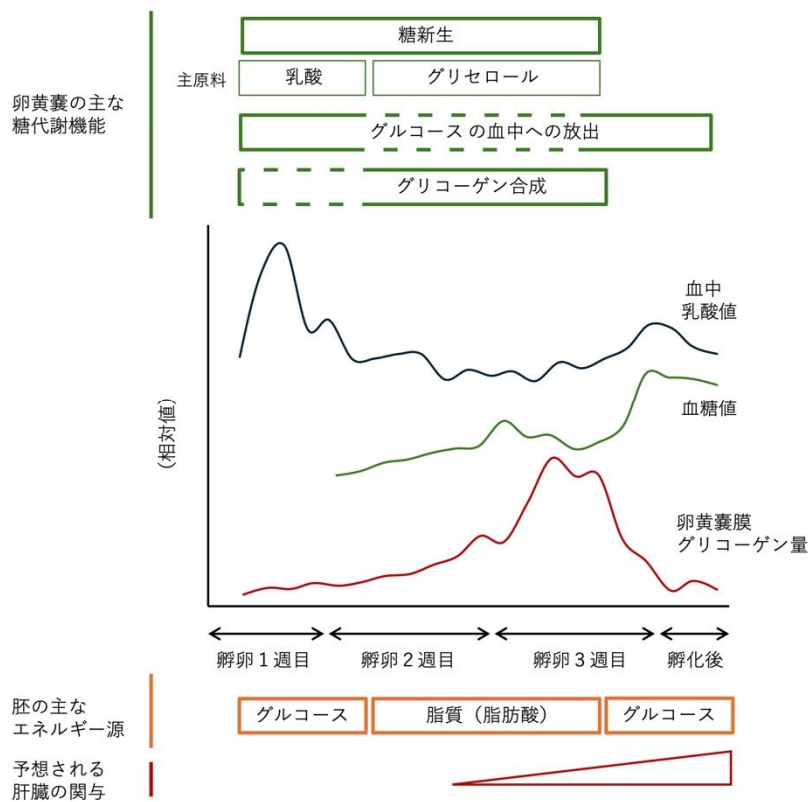


図 3
本研究で明らかになったニワトリ卵黄嚢膜における糖代謝の変化の概要。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 岩澤 淳, 村井篤嗣	4. 巻 75
2. 論文標題 ニワトリ卵の生物化学 --ヒヨコを生み出し, 支える栄養成分	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 遺伝	6. 最初と最後の頁 93-98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Shibata Mitsuhiro, Iwasawa Atsushi, Yayota Masato	4. 巻 60
2. 論文標題 Gluconeogenesis in the Yolk Sac Membrane: Enzyme Activity, Gene Expression, and Metabolites During Layer Chicken Development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2141/jpsa.2023020	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 Shibata Mitsuhiro, Makihara Nanako, Iwasawa Atsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 The Yolk Sac 's Essential Role in Embryonic Development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Reviews in Agricultural Science	6. 最初と最後の頁 243 ~ 258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7831/ras.11.0_243	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 牧原菜々子, 岩澤淳
2. 発表標題 ウズラにおける糖代謝酵素関連遺伝子の解析
3. 学会等名 令和5年度日本動物学会中部支部大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------