

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580242

研究課題名(和文) 魚類の卵母細胞における油球形成の分子機構の解明

研究課題名(英文) Studies on molecular mechanism of lipid droplet formation in teleost oocytes

研究代表者

東藤 孝 (TODO, TAKASHI)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号：60303111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の卵には、その成長過程で脂質やタンパク質が卵外から多量に取り込まれて蓄えられ、これらの物質は胚や稚仔魚の重要な栄養・エネルギー源として利用される。本研究はこれまで殆ど不明であった、魚類の卵における脂質の取り込み・蓄積機構を分子レベルで解明することを目的に行われた。その結果、卵への脂質の供給源が血液中のリポタンパク質、特に超低密度リポタンパク質であることを初めて実証し、この機構についての新しいモデルが提出された。

研究成果の概要(英文)：In teleost fishes, high amount of lipids and proteins are accumulated in oocytes during their growth phase; they are later utilized as energy and nutrient resources by developing embryos and larvae. However, little is known about the origin of such lipids and the mechanisms underlying their accumulation into oocytes. In the present study, we aimed to clarify the mechanisms at the molecular levels. As the results, we confirmed that, for the first time, plasma very low density lipoprotein is the major carrier of neutral lipid to oocyte lipid droplets, and updated the model for the oocyte lipidation.

研究分野：魚類生殖生理学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：卵形成 卵成長 卵母細胞 油球 脂質 リポタンパク質 卵黄

1. 研究開始当初の背景

魚類の卵内には胚発生や稚仔魚の発達に必要な不可欠な様々な物質が卵黄として貯蔵される。これらの物質のなかで脂質は、卵黄の主要な構成成分であるタンパク質とともに、胚の重要なエネルギー源となっている。特にサケ科魚類など多くの魚種では、脂質が卵内に油球 (lipid droplet) として多量に蓄積される。様々な魚種における解析から、油球は主にトリアシルグリセロール (TAG) などの中性脂肪から成ることが示されている。しかし、油球の元となる脂質が何に由来し、また油球が卵内でどの様にして形成されるかについては殆ど明らかにされていなかった。

魚卵への中性脂肪の供給源としては、脂質運搬タンパクであるリポタンパクが考えられ、その中でも特に超低密度リポタンパク (VLDL) が有力な候補としてみなされてきた。実際に我々は、ウナギ卵巣の器官培養系を用いた解析において、培養液に VLDL と雄性ステロイドホルモン (アンドロジェン) を添加することにより卵母細胞内に顕著な油球蓄積が起こることを見出し、VLDL が油球のもととなる脂質の供給源であり、アンドロジェンが VLDL から卵母細胞への脂質取り込みを促進することを示した。

そこで、魚類の卵母細胞における油球形成機構として、VLDL を起点とした次のようなモデルが予想された。1) VLDL が卵母細胞外で LPL によって代謝され、それによって生じた遊離脂肪酸 (FA) が卵母細胞膜上の FATP によって細胞内に取り込まれる。2) VLDL が卵母細胞膜上に存在する VLDL 受容体 (VLDLR) を介したエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、細胞内で VLDL 中の TAG が FA に分解される。1) と 2) のいずれにおいても、FA は FABP によって細胞内小器官に運ばれて中性脂肪に再構成され、油球として蓄積される。そして、ウナギでは、アンドロジェンがこれら因子のいずれかの発現もしくは機能を調節しているものと推察された。

我々は、これら 1) と 2) のいずれか、または双方の機構によって卵母細胞内に油球が形成されるのかについて、サケ科魚類のカットスロートトラウト (*Oncorhynchus clarkii*) を実験魚に用いて研究を開始した。これまでに、リポタンパク代謝に関わる種々の因子、リポタンパク受容体 [VLDLR、低密度リポタンパク受容体 (LDLR)]、LPL、endothelial lipase (EL)、FATP/CD36、FABP について、cDNA クローニングによる一次構造解析と卵濾胞における発現解析を行った。また、VLDLR と LDLR、LPL については抗体を作製してタンパクレベルでの解析を行うとともに、VLDL の構成アポタンパクである apoB と apoE に対する抗体を作製し、卵内に VLDL

が蓄積されか否か検証した。その結果、LPL は主に卵濾胞の顆粒膜細胞で発現しており、油球形成が活発になる時期にその発現がピークを示すことが明らかとなった。さらに、抗アポタンパク抗体を用いた解析から、VLDL が卵内に蓄積される可能性は低いことが示された。

以上の様な結果をもとに、我々はサケ科魚類の卵母細胞における油球形成機構について次の様なモデルを提唱した。すなわち、VLDL の主要な経路は上述の 1) であり、VLDL は卵濾胞組織中の顆粒膜細胞で代謝される。しかし、卵母細胞内にも弱いながら LPL が発現していること、さらに LDLR が VLDL の受容体として機能することを示唆する結果が得られており、LDLR が卵母細胞膜上に発現していることから、上述の 2) の経路の存在も示唆された。しかし、これらの機構に関わる各因子の機能や発現調節機構は未だ不明であり、VLDL が油球の供給源であるという直接的な証拠も得られていない。本研究では、これまでの研究をさらに発展させることで、魚類の卵母細胞における油球形成の分子機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、未だ未解明な点が多く残されている、魚類の卵母細胞における油球形成機構を明らかにすることを目的に、引き続きサケ科魚類のカットスロートトラウトを主要なモデルとして、以下の項目について検討した。

- (1) 卵母細胞での油球形成機構を解析するための *in vitro* 実験系の開発。
- (2) VLDL が油球の構成脂質の供給源であることの証明。
- (3) 各因子の発現・機能に影響を及ぼす内分泌因子の解明。
- (4) 油球形成における各因子 (LPL、FATP/CD36、FABP 等) の役割の解析。
- (5) メダカ (*Oryzias latipes*) とヨウジウオ (*Syngnathus schlegeli*) を用いた油球形成機構の普遍性の検証。

3. 研究の方法

- (1) 血漿リポタンパク質の蛍光標識法の確立

カットスロートトラウトの血漿から、段階的超遠心法により各リポタンパク質 (VLDL、LDL、HDL) を精製した。各リポタンパク質に、緑色蛍光標識された脂肪酸 (BODIPY FL C16) をガラスビーズ法により取り込ませることで、各リポタンパク質の脂質部分を蛍光標識した。また、タンパク質部分は、市販のキットを用いて赤色蛍光物質 (Alexa 594) で標識した。

(2) カットスロートトラウト卵濾胞の生体外培養系の確立

前卵黄形成期(油球期)のカットスロートトラウト卵巣からピンセットを用いて卵濾胞を単離し、それらを生体外で長時間維持できる培養条件を検討した。

(3) カットスロートトラウトの培養卵濾胞における蛍光標識リポタンパク質の代謝過程の解析

カットスロートトラウトの卵濾胞培養系に、蛍光標識されたリポタンパク質を添加して一定時間後に、卵濾胞中の蛍光量をマルチラベルカウンターで測定するとともに、卵濾胞の凍結切片を作製して蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

各種リポタンパク質の代謝

脂質部分を蛍光標識された VLDL、LDL、HDL をそれぞれ卵濾胞培養系に添加し、卵濾胞への蛍光標識脂肪酸の取り込みの相違を解析した。

VLDL から卵濾胞への脂質取り込みに及ぼす各種条件の検討

種々の培養温度や VLDL 添加量の違い、卵濾胞のサイズが、標識 VLDL からの標識脂肪酸の卵濾胞内への取り込みに及ぼす影響について解析した。

卵濾胞内における VLDL の代謝過程

脂質部分とタンパク質部分をそれぞれ蛍光標識された VLDL を同時に卵濾胞培養系に添加し、卵濾胞内における VLDL 中の脂質とタンパク質の挙動をそれぞれモニタリングした。

(4) VLDL からの卵濾胞への脂質取り込みに及ぼす各種ホルモンの影響

各種ホルモンや LPL 阻害剤が、VLDL からの卵濾胞への脂質取り込みに及ぼす影響について予備試験的に調べた。ホルモンには、生殖腺刺激ホルモンである濾胞刺激ホルモン(FSH)と黄体形成ホルモン(LH)、性ステロイドホルモンである estradiol-17 β (E2) と 11-ketotestosterone (11KT)、甲状腺ホルモンであるトリヨードサイロニン(T3)、脂肪代謝ホルモンである leptin、そしてインスリン様成長因子(IGF-I)を用いた。また、LPL 阻害剤として Orlistat と ANGPTL3 を用いた。それぞれのホルモンや阻害剤を添加して卵濾胞を 24 時間培養後、標識 VLDL を添加してさらに 48 時間培養し、卵濾胞中の蛍光脂肪酸量を測定した。

(5) 卵巣における油球形成関連因子の発現解析

卵母細胞における油球形成(卵濾胞における VLDL 代謝)に関与することが予想される各因子(LPL、FATP/CD36、FABP)について、カットスロートトラウトの卵形成過程に伴う卵巣での各 mRNA 発現量の変化をリアルタイム定量 PCR (q-PCR) 法と in situ ハイブリダイゼーション(ISH)法により解析した。

(6) 卵巣での油球形成関連因子の発現に及ぼす各種ホルモンの影響

カットスロートトラウト卵巣の器官培養系を用いて、各種ホルモン(FSH、LH、E2、11KT、T3、IGF-I)が各種油球形成関連因子(LPL、FATP/CD36、FABP)の mRNA 発現に及ぼす影響について調べた。前卵黄形成期の卵巣片を各種ホルモンと共に 24 時間培養し、培養後の卵巣片中の各 mRNA 発現量を q-PCR 法により測定した。

(7) メダカとヨウジウオにおける蛍光標識 VLDL 投与実験

メダカ雌とヨウジウオ雌に、脂質部分とタンパク質部分をそれぞれ異なる蛍光物質で二重標識された VLDL を生体内投与し、卵巣における VLDL の代謝を体内と卵巣の蛍光実体顕微鏡による観察ならびに卵巣切片の共焦点レーザー顕微鏡による観察から解析した。

4. 研究成果

(1) 血漿リポタンパク質の蛍光標識法の確立

各種の精製リポタンパク質を、蛍光標識脂肪酸(BODIPY FL C16)を吸着させたガラスビーズと反応させることにより、リポタンパク質の分解は殆ど無く、かつ高効率で標識できた。また、市販のキットにより、リポタンパク質のタンパク質部分も Alexa 594 により高効率で標識できることが確かめられた。さらに、収量は低下するものの、脂質部分とタンパク質部分をそれぞれ順に標識することにより、二重標識リポタンパク質を作製できることが確認された。

(2) カットスロートトラウト卵濾胞の生体外培養系の確立

油球期の卵濾胞を、市販の L-15 を基本とした培地(0.5%ウシ血清アルブミン、各種抗生物質含有、pH 7.4)中で 15°C にて培養したところ、少なくとも 48 時間までは卵濾胞の形態と機能を維持できることが確認された。

(3) カットスロートトラウトの培養卵濾胞における蛍光標識リポタンパク質の代謝過程の解析

各種リポタンパク質の代謝

蛍光標識脂肪酸で標識された VLDL、LDL、HDL をそれぞれ卵濾胞培養系に添加したところ、全てのリポタンパク質で卵濾胞中への蛍光標識脂肪酸の取り込みが認められたが、その取り込み量は VLDL において最も高かった。さらに、凍結切片の観察から、VLDL においてのみ油球への顕著な蛍光脂肪酸の蓄積が見られた。これらの結果から、VLDL が卵母細胞中の油球への脂質の主要な供給源であることが明らかとなった。

VLDL から卵濾胞への脂質取り込みに及ぼす各種条件の検討

標識 VLDL からの蛍光標識脂肪酸の培養卵濾胞内への取り込み量は、少なくとも培養 48 時間後まで増加し、さらに培養温度が高くなる、また VLDL 添加量が多くなると共に増加した。さらに様々な発達段階（油球期～卵黄形成期）にある卵濾胞における脂肪酸取り込み量の違いを調べた結果、卵濾胞のサイズと脂肪酸の取り込み量は正の相関を示し、卵濾胞が発達するにつれて脂肪酸の取り込み量が増加することが示された。

卵濾胞内における VLDL の代謝過程

脂質部分とタンパク質部分をそれぞれ異なる蛍光物質で標識された VLDL の培養卵濾胞における取り込みを調べた結果、脂質とタンパク質の双方とも培養時間の経過と共に卵濾胞への取り込み量が増加した。さらに、凍結切片による観察から、標識 VLDL 中の脂質部分は卵母細胞中の油球に蓄積されるが、タンパク質部分は卵膜や濾胞細胞などの卵母細胞外に留まることが示された。これらの結果から、VLDL が濾胞細胞などの卵母細胞外で何らかの代謝を受け、その結果生じた脂肪酸のみが卵母細胞内に取り込まれるが、アポリポタンパク質は卵母細胞内に取り込まれずに卵母細胞外に留まることが明らかとなった。

(4) VLDL からの卵濾胞への脂質取り込みに及ぼす各種ホルモンの影響

各種ホルモンが標識 VLDL からの培養卵濾胞への脂肪酸取り込みに及ぼす影響を調べた結果、FSH や LH、E2、11KT、T3、leptin による脂肪酸取り込み量の有意な増加が観察されたが、IGF-I ではその減少が見られた。また、LPL 阻害剤は卵濾胞への脂肪酸取り込み量を有意に減少させたことから、VLDL からの卵濾胞への脂質取り込みには LPL が重要な役割を担っていることが示唆された。

(5) 卵巣における油球形成関連因子の発現

解析

カットスロートトラウトの卵形成過程に伴う卵巣での油球形成関連因子（LPL、FATP/CD36、FABP）の各 mRNA 発現量の変化を調べた結果、油球期で高く発現している因子群と、卵黄形成の進行と共に増加する因子群が見られた。これらの結果から、各因子群は異なる機構で油球形成に関与していることが示唆された。

(6) 卵巣での油球形成関連因子の発現に及ぼす各種ホルモンの影響

カットスロートトラウト卵巣の器官培養系を用いて、各種ホルモン（FSH、LH、E2、11KT、T3、IGF-I）が各種油球形成関連因子（LPL、FATP/CD36、FABP）の mRNA 発現に及ぼす影響について調べた。その結果、LPL mRNA においてのみ IGF-I による濃度依存的な発現誘導が認められ、IGF-I が LPL の発現調節を介して卵母細胞での油球形成に関与していることが示唆された。

(6) 卵巣での油球形成関連因子の発現に及ぼす各種ホルモンの影響

カットスロートトラウト卵巣の器官培養系を用いて、各種ホルモン（FSH、LH、E2、11KT、T3、IGF-I）が各種油球形成関連因子（LPL、FATP/CD36、FABP）の mRNA 発現に及ぼす影響について調べた。

(7) メダカとヨウジウオにおける蛍光標識 VLDL 投与実験

メダカ雌とヨウジウオ雌に、脂質部分とタンパク質部分の二重標識 VLDL を生体内投与した結果、双方とも同様の結果が得られ、VLDL の脂質部分は卵母細胞内の油球に蓄積されるが、タンパク質部分は卵母細胞外に留まることが示された。この結果はカットスロートトラウトの培養卵濾胞で得られた結果と殆ど一致した。従って、VLDL が卵母細胞外で代謝され、それにより生じた脂肪酸が卵母細胞内に取り込まれて油球として蓄積されるという機構の魚類における普遍性が示唆された。

以上の結果から、魚類の卵母細胞における油球の主要な供給源が VLDL であることが初めて証明されるとともに、VLDL は主に卵母細胞外で代謝され、そこで生じた脂肪酸が卵内に取り込まれて油球として蓄積されることが明らかとなった。これらの知見を基に、魚類の卵母細胞における油球形成機構について図 1 の様なモデルが提唱された。即ち、VLDL の主要な経路は上述の 1) であり、VLDL は主に卵濾胞組織中の顆粒膜細胞で LPL の作用によって代謝されると考えられる。

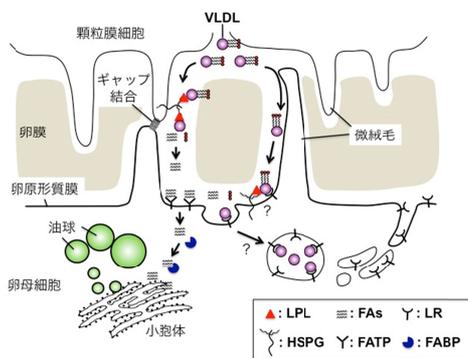


図1. 魚類の卵母細胞における油球形成機構のモデル

しかし、卵母細胞内にも弱いながら LPL が発現していること、VLDL の受容体として機能すると考えられる複数のリポタンパク質受容体が卵母細胞膜上に発現していること、さらに二重標識 VLDL の取り込み実験において極弱いながらも卵母細胞内にタンパク部分の蛍光が認められることなどから、上述の2)の経路の存在も示唆される。

また、これらの機構に関わる各因子の機能や発現調節機構の詳細は未だ不明である。また、一般に LPL はヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) を介して細胞膜上に存在すると考えられるが、卵濾胞中における LPL の存在様式は全く分かっていない。これらの問題については、今後明らかにする必要がある。

魚類の卵母細胞における油球形成機構については、世界でも他に研究例が殆ど見当たらず、本研究の独壇場である。特に卵母細胞中の油球が VLDL を起点として形成されることを実証したのは世界で初めてであり、非常に意義深い成果であると考えられる。他の動物種を見渡しても、同様の研究が行われているのはほぼ昆虫類に限られている。また近年、哺乳類では、油球が細胞一般に重要なオルガネラの一つとして認識され、油球形成に関する分子レベルでの解析が進められている。魚類の卵母細胞は、他の一般的な細胞と比べて非常に大きいことから、生化学的解析などの実験的解析に利している。従って、本研究の進展は、魚類のみならず広く基礎生物学上に重要な知見を与えるものと確信される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Wenshu Luo, Yuta Ito, Hiroko Mizuta, Kiyohiro Massaki, Naoshi Hiramatsu, Takashi Todo, Benjamin J. Reading, Craig V. Sullivan, Akihiko Hara, Molecular cloning and characterization of an ovarian receptor with seven ligand binding repeats, an orthologue of low-density lipoprotein

receptor in the cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki*), Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 査読有, 166(2), 2013, 263-271

DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.06.026

Hiroko Mizuta, Wenshu Luo, Yuta Ito, Yuji Mushiobira, Takashi Todo, Akihiko Hara, Benjamin J. Reading, Craig V. Sullivan, Naoshi Hiramatsu, Ovarian expression and localization of a vitellogenin receptor with eight ligand binding repeats in the cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki*), Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 査読有, 166(1), 2013, 81-91

DOI: 10.1016/j.cbpb.2013.07.005

Naoshi Hiramatsu, Wenshu Luo, Benjamin J. Reading, Craig V. Sullivan, Hiroko Mizuta, Yong-Woon Ryu, Osamu Nishimiya, Takashi Todo, Akihiko Hara, Multiple ovarian lipoprotein receptors in teleosts, Fish Physiology and Biochemistry, 査読有, 39, 2013, 29-32

DOI: 10.1007/s10695-012-9612-6

筵平裕次、水田紘子、羅ブンシュ、盛田祐加、澤口小有美、松原孝博、平松尚志、東藤孝、原彰彦、カッツスロートトラウト *Oncorhynchus clarki* における2型ピテロジェニン転写産物および蛋白質の卵発達に伴う発現変化、日本水産学会誌、査読有、79(2)、2013、175-189

DOI: 10.2331/suisan.79.175

Yong-Woon Ryu, Ricako Tanaka, Ayumi Kasahara, Yuta Ito, Naoshi Hiramatsu, Takashi Todo, Craig V. Sullivan, Akihiko Hara, Molecular cloning and transcript expression of genes encoding two types of lipoprotein lipase in the ovary of cutthroat trout, *Oncorhynchus clarki*, Zoological Science, 査読有, 30, 2013, 224-237

DOI: 10.2108/zsj.30.224

〔学会発表〕(計9件)

筵平裕次、カッツスロートトラウト (*Oncorhynchus clarki*) における血漿リポ蛋白質の分離とアポリポ蛋白質Eの検出、平成26年度日本水産学会春季大会、2014年3月27日~3月31日、北海道大学函館キャンパス(北海道函館市)

Yuji Mushiobira, Ligand binding properties of ovarian lipoprotein receptors in the cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki*), The 10th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea, 2013, November 18-20, Jeju National University, Jeju, Korea

Naoshi Hiramatsu, Yolk formation in fish:

Multiple vitellogenins and their receptors, Diversification in Inland Finfish Aquaculture II (DIFAIL), 2013, September 24-26, University of South Bohemia, Vodnany, Czech Republic

筵平裕次、サケ科魚類のピテロジェニンに結合するリポ蛋白質受容体の探索と性状解析、平成 25 年度日本水産学会春季大会、2013 年 3 月 26 日～3 月 30 日、東京海洋大学（東京都品川区）

水田紘子、カットスロートトラウト卵巣におけるクラスリン重鎖転写産物および同翻訳産物の局在に関する組織学的解析、平成 25 年度日本水産学会春季大会、2013 年 3 月 26 日～3 月 30 日、東京海洋大学（東京都品川区）

水田紘子、カットスロートトラウト卵巣における常染色体劣勢高コレステロール血症原因蛋白質（ARH）の cDNA クローニング及び遺伝子発現解析、平成 24 年度日本水産学会春季大会、2012 年 3 月 27 日～3 月 31 日、東京海洋大学（東京都品川区）

Yong-Woon Ryu, Expression of genes involved in oocyte lipidation in cutthroat trout, *Oncorhynchus clarki*, 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, 2011, August 9-14, Lulu Convention Centre, Cochin, India

Hiroko Mizuta, Molecular cloning and localization of two classical ovarian lipoprotein receptors in cutthroat trout, *Oncorhynchus clarki*, 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, 2011, August 9-14, Lulu Convention Centre, Cochin, India

Naoshi Hiramatsu, Multiple ovarian lipoprotein receptors in teleosts, 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, 2011, August 9-14, Lulu Convention Centre, Cochin, India

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.geocities.jp/hlaboratory/top.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

東藤 孝 (TODO TAKASHI)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号 : 60303111

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

原 彰彦 (HARA AKIHIKO)

北海道大学・・・名誉教授

研究者番号 : 40091483

平松 尚志 (HIRAMATSU NAOSHI)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号 : 10443920