

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580192

研究課題名(和文) 魚類の卵母細胞における脂質取り込み機構の解析

研究課題名(英文) Studies on mechanism of lipid uptake into 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

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機構について分子レベルで解明することを目的に行われた。その結果、脂質の取り込みに関わる様々な因子の存在が遺伝子レベルで明らかにされ、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 amounts 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 identified various factors involved in the lipid uptake into fish oocytes, and proposed a new model for the oocyte lipidation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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、サケ科魚類

## 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、中性脂質が卵内に油球として多量に蓄積される。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ように形成されるかについては殆ど明らかにされていない。

卵内への中性脂質の供給源としては、血液中のリポタンパク、特に超低密度リポタンパク(VLDL)が有力な候補とみなされてきた。しかし、その証明はなされておらず、VLDLから卵内へ脂質が輸送される経路も全く不明であった。

VLDLを起点とした卵内への脂質輸送機構

については以下のモデルが考えられた。即ち、①卵母細胞外で VLDL が代謝されて生じた脂肪酸 (FA) が卵母細胞に取り込まれる機構と、②VLDL が受容体を介して卵母細胞に取り込まれ、卵母細胞内で VLDL が代謝されて FA を生ずる機構のいずれか、または双方によって脂質が蓄積される。そこで、これらの仮説を検証することにより、魚類の卵母細胞における脂質取り込み機構が解明できるものと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでほとんど未解明であった、魚類の卵母細胞における脂質取り込み機構を明らかにすることを目的とし、同機構における各種の脂質代謝関連因子、即ちリポタンパクやリポタンパク受容体、リポタンパクリパーゼ (LPL)、脂肪酸輸送体 (FAT)、脂肪酸結合タンパク (FABP) などの役割について、主に分子生物学的・生化学的手法を用いて解析した。

## 3. 研究の方法

本研究では、卵黄形成機構についての理解が最も進んでいるサケ科魚類のうち、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) に近縁なカットスロートトラウト (*O. clarki*) をモデルに用い、以下の項目について解析した。

(1) リポタンパク代謝に関わる因子の cDNA クローニングと発現解析：カットスロート卵巣から、LPL、FAT、FABP、リポタンパク受容体の各ファミリーについて cDNA をクローニングし、一次構造を解析した。また、各遺伝子の発現について、PCR 法やリアルタイム定量 PCR (q-PCR) 法、*in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法を用い、各組織や卵濾胞における発現を調べた。

(2) 各種リポタンパク代謝関連因子に対する特異抗体の作製：(1) でクローニングされた各因子について、大腸菌発現系を用いて組み換えタンパク質を合成し、これらをウサギに免疫してポリクローナル抗体を作製した。作製された抗体を用いて、各因子の卵濾胞組織における発現を、ウェスタン・ブロット法や免疫組織化学 (IHC) 法により解析した。

(3) アポリポタンパクに対する特異抗体の作製：VLDL や低密度リポタンパク (LDL) の構成アポリポタンパクである、apoB および apoE について、カットスロート肝臓から cDNA 断片をそれぞれクローニングした。これらの cDNA 断片より、大腸菌発現系を用いて組み換えタンパク質を合成後、ウサギに免疫してそれぞれに特異的なポリクローナル抗体を作製した。作製された抗体を用いて、

各種の免疫生化学的手法により卵内に apoB や apoE が存在するか、換言すると VLDL 等のリポタンパクが卵内に取り込まれるか否か検討した。

## 4. 研究成果

(1) LPL ファミリーの cDNA クローニングと発現解析：カットスロートトラウト卵巣から LPL ファミリーの cDNA クローニングを試みた結果、2 種の LPL cDNA (LPL1、LPL2) と 2 種のエンドセリアルリパーゼ cDNA (EL;EL1、EL2) が得られた。まず、LPL1 mRNA と LPL2 mRNA の様々な体組織における発現局在性を調べたところ、双方ともに脂肪組織や脳、筋肉、卵巣での発現が確認された。このことから LPL が脂肪蓄積に重要な役割を担っていることが支持された。次に卵濾胞組織における発現部位を解析した結果、双方の mRNA とともに主に顆粒膜細胞で発現していることが明らかとなった。さらに、卵形成過程に伴う卵巣での両 mRNA の発現変化を調べたところ、双方とも油球期の卵巣で高く発現していた。これらの結果から、LPL が顆粒膜細胞にてリポタンパクの代謝を行うことで卵母細胞への脂質取り込み機構に関与していることが示唆された。一方で、EL は 2 種とも卵黄形成の開始期に発現ピークを示し、かつ卵濾胞組織での主な発現部位は卵母細胞であった。これらのことから、EL は卵母細胞での卵黄タンパクの代謝に関与していることが示唆された。

(2) FAT ファミリーの cDNA クローニングと発現解析：細胞膜上に存在する 2 種の FAT、即ち scavenger receptor type B-1 (SR-BI) と CD36 の cDNA を卵巣よりクローニングして発現解析を行った結果、双方とも卵母細胞で発現していることが確認された。

(3) FABP ファミリーの cDNA クローニングと発現解析：硬骨魚では 7 つのタイプが存在することが知られている細胞内 FABP (FABP1、2、3、6、7、10、11) のうち、FABP1 と 7、11 の 3 つが卵巣で発現していることが明らかとなった。さらにこれら 3 タイプの FABP のうち、FABP1 と 11 が前卵黄形成期の卵母細胞で発現していることが示された。

(4) リポタンパク受容体の cDNA クローニングと発現解析：LDL 受容体 (LDLR) と VLDL・ビテロジェニン受容体 (VLDL/VTGR)、新規リポタンパク受容体 (LR8) の cDNA クローニングを行い、卵巣での発現を解析したところ、いずれも油球期に高い発現を示すとともに、卵濾胞組織での主な発現部位は卵母

細胞であることが分かった。これらの結果から、脂質供給源としてのリポタンパクが、受容体を介して卵母細胞内へ取り込まれる経路の存在が示唆された。

(5) 各種リポタンパク代謝関連因子に対する特異抗体の作製：上記の各因子のうち、LPL1、LDLR、VLDL/VTGR の3つについて組み換えタンパク質を合成し、それらを抗原に用いて特異抗体を作製した。

(6) アポリポタンパクの特異抗体作製：VLDL や LDL の構成アポタンパクである apoB と apoE について、それぞれの部分 cDNA 配列を得たのち、大腸菌発現系を用いて組み換えタンパクを合成し、それらを抗原として特異抗体を作製した。カットスロート血漿より精製した各種リポタンパクを用いてウェスタン・ブロット解析を行ったところ、apoB は VLDL と LDL の双方で存在している一方、apoE は VLDL にのみ存在していることが示された。また、カットスロートの排卵々中には apoB と apoE の双方とも検出されなかった。このことから、VLDL が卵内に取り込まれ蓄積される可能性は極めて低いことが示された。

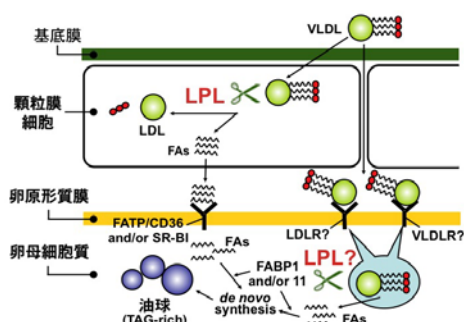


図1. 魚類の卵母細胞における脂質取り込み機構のモデル

以上の結果から、魚類の卵母細胞における脂質取り込み（油球形成）機構について次のような新たなモデルが考えられた（図1）。血液中のVLDLが卵濾胞の顆粒膜細胞でLPLの作用により代謝され、VLDL中のトリアシルグリセロールから遊離FAが生ずる。生じたFAは、卵母細胞膜上のSR-BIもしくはCD36によって卵母細胞内に取り込まれる。取り込まれたFAは、FABP1もしくはFABP11によって粗面小胞体に運ばれ、そこで中性脂質が合成されて油球として卵母細胞に蓄積される。

上記の経路が主要なものと考えられるが、新規のタイプを含めて複数のリポタンパク受容体が卵母細胞で発現していること、また予備的実験からLDLRのリガンドがVLDLである可能性が示されていること、さらに弱いながらもLPLが卵母細胞で発現しているこ

となどから、VLDLが受容体を介して卵内に取り込まれた後に代謝されてFAを生ずる経路の存在も示唆される。いずれにせよ、魚類の卵母細胞における脂質取り込み機構は、様々な因子が関与して複雑かつ厳密に制御されていることが示された。

本研究のように、魚類の卵母細胞における脂質取り込み機構について分子レベルでの解析を行った例は、国内外でほとんど見当たらず、本研究の独壇場である。さらに、本研究によりこの機構を解析するための分子プローブがほぼ全て得られたため、今後のさらなる研究の進展が期待される。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可能性を有しているものと確信される。

#### 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）

〔雑誌論文〕（計5件）

- ①. Taku Endo, Takashi Todo, P. Mark Lokman, Hideaki Kudo, Shigeho Ijiri, Shinji Adachi, Kohei Yamauchi, Androgens and very low density lipoprotein are essential for the growth of previtellogenic oocytes from Japanese eel, *Anguilla japonica*, in vitro, *Biology of Reproduction*, Vol. 84, 2011, 816-825, 査読有り
- ②. Sean L. Divers, H. James McQuillan, Hajime Matsubara, Takashi Todo, P. Mark Lokman, Effects of reproductive stage and 11-ketotestosterone on LPL mRNA levels in the ovary of the shortfinned eel, *Journal of Lipid Research*, Vol. 51, 2010, 3250-3258, 査読有り

〔学会発表〕（計11件）

- ①. 柳蓉芸、カットスロートトラウト卵巣におけるリポタンパクリパーゼファミリー遺伝子の発現解析、平成22年度日本水産学会春季大会、2010年3月27日、日本大学（藤沢市）
- ②. 水田紘子、カットスロート卵巣におけるピテロジェニン受容体蛋白質の性状解析、平成22年度日本水産学会春季大会、2010年3月27日、日本大学（藤沢市）
- ③. 東藤孝、カットスロートトラウト卵巣におけるリポタンパクリパーゼのcDNAクローニングと発現解析、平成

21年度日本水産学会春季大会、2009年3月28日、東京海洋大学（東京都品川区）

- ④. 伊東優太、カットスロートトラウト低密度リポ蛋白受容体（LDLR）遺伝子の発現解析、平成21年度日本水産学会春季大会、2009年3月28日、東京海洋大学（東京都品川区）
- ⑤. Naoshi Hiramatsu、Yolk assembly in teleost: recent findings on the deposition of ovarian lipids and proteins、World Aquaculture、2008年5月23日、大韓民国・釜山

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.geocities.co.jp/hlaboratory/>

## 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

なし

### (3) 連携研究者

原 彰彦 (HARA AKIHIKO)

北海道大学・大学院水産科学研究院・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・助教  
研究者番号：10443920