

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18733

研究課題名(和文)海産魚の卵内における脂質蓄積機構に関する比較研究

研究課題名(英文)Comparative study on oocyte lipids accumulation in marine teleost

研究代表者

柳 蓉うん (Ryu, Yong-Woon)

愛媛大学・南予水産研究センター・助教(特定教員)

研究者番号：10643249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の卵内には、大量の脂質が胚や仔稚魚のエネルギー源および細胞膜の構成物質として蓄積される。しかし、その卵内における代謝や蓄積機構に関しては、まだ多くの部分が未解明のままである。本研究では、その学術的および産業的な重要性に注目し、海産魚の卵脂質蓄積機構の究明を目的とした。海産魚卵の比較モデルとして、カタクチイワシとスマを選択し、申請者により確立された実験系を用いて解析を行った結果、それぞれの卵および脂質輸送体の特徴や構成は異なるものの、主要脂質輸送体である超低密度リポタンパク質を中心とした魚類一般的中性脂質の運搬・代謝経路の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Large amounts of lipids are stored in oocyte of teleost fishes as essential energy and nutrient resources for developing embryos and larvae. However, little is known about the mechanisms underlying their accumulation and utilization in the oocytes. This study demonstrated that lipidic features of the oocytes and composition of lipoproteins, which is a principle carrier of neutral lipids, in Japanese anchovy and Black skipjack tuna as comparative models for marine teleost. Also, this study revealed that neutral lipids transport pathway into oocytes via very low density lipoprotein can be universal way to any teleost fishes.

研究分野：魚類繁殖生理学

キーワード：卵脂質

1. 研究開始当初の背景

脂質は、ほとんどの動物細胞において、エネルギー源および細胞膜などの構成成分、または細胞間のメッセンジャーとして重要な役割を果たす。魚類の卵母細胞においても脂質は、タンパク質と共に卵の発達過程に大量に蓄積され、胚と仔稚魚の発達に重要な原材料として使用される。また、様々な魚種での解析から、魚卵中の脂質は主に中性脂質およびリン脂質から成っていることが知られており、前者はエネルギー源として、また後者は細胞構造の構成物質として使用されると考えられている。すなわち、その構成や成分は卵質を決める非常に重要な要因であるが、これら脂質の魚類卵内における取り込み経路や蓄積メカニズムについては、まだ多くのところが未解明のままである。

申請者はこれまでに、代表的な淡水魚であるサケ科魚類をモデルとして、中性脂質源の主たる輸送体であるリポタンパク質およびその分解酵素であるリポタンパクリパーゼの役割に注目し、それらを中心とした油球形成機構について重要な知見を得てきた。しかし、多様な生息戦略を持つ海産魚の卵内における同機構の存在の有無は、まだほとんどが明らかになっていないことから、海産魚卵の脂質蓄積機構を理解するために、卵内に大量の油球を形成するマグロ類の一種であるスマ (*Euthynnus lineatus*) を中性脂質優勢モデルとして、油球は形成せず代わりに大量の卵黄球を形成するイワシ類の一種であるカタクチイワシ (*Engraulis japonicus*) をリン脂質優勢モデルとして想定し、それぞれの卵内における脂質取り込み経路を調査・比較することに着想した。

2. 研究の目的

本研究では、まだ知られていない海産魚の卵内における同機構の存在の有無を確認すると共に、二種類の異なる海産魚卵を用いて、その脂質代謝や蓄積機構の違いを比較解析することで、将来の水産有用魚種の卵質を高める技術開発につながる基盤データを蓄積することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 卵構成脂質の確認

海産魚卵の比較モデルとして用いるカタクチイワシとスマの卵を構成する脂質の特性を明らかにするために、それぞれの卵に蓄積されている中性脂質を特異的に染める蛍光標識物と反応させ、そのタイプを確認した。採取した卵巣は PFA に 48 時間固定した後、凍結切片用のコンパウンド (FSC 22, Leica 社) で包埋した。包埋した卵巣は、10 ~ 15 μ m の凍結切片を作製してスライド上で乾燥した後、LipidTOX neutral lipid (Molecular probe 社) と 1 時間・室温で反応させ、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 710, Carl Zeiss 社) に供するこ

とで、卵脂質の蓄積を観察した。

(2) リポタンパク質の分離

卵構成脂質の主要輸送体であるリポタンパク質を得るために、当センターで飼育されているカタクチイワシとスマを用いた。採血は各々の発達過程において定期的に行った。採取した血液から血漿を抽出した後、段階的な超遠心分離方法を用いて各リポタンパク質 (Vldl: 超低密度リポタンパク質、Ldl: 低密度リポタンパク質、Hdl: 高密度リポタンパク質) の分離を試みた。得られた画分は、SDS-および Native-gradient PAGE に供し、それぞれの特異的な発現パターンを確認・比較することで、各リポタンパク質を同定した。

(3) 蛍光追跡リポタンパク質の作製

得られた二魚種の Vldl は、卵内におけるその代謝・蓄積特性を確認するために、申請者により確立された蛍光追跡リポタンパク質の作製法に沿って蛍光標識された。まず、緑色の蛍光脂肪酸 (パルミチン酸) である BODIPY FL C16 (Molecular probe 社) をガラスビーズにコーティングした後、各 Vldl と 3 時間攪拌することでその脂質の部分に蛍光を標識した。標識された Vldl は、ゲル濾過クロマトグラフィー (Sephadex G-25, GE Healthcare 社) に供して精製した後、また赤色の蛍光物質 Alexa 594 Succinimidyl Ester (Molecular probe 社) と上記同様な方法で標識・精製することで、その脂質部分とタンパク質部分に二重で蛍光を標識した。作製された蛍光追跡 Vldl は、NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific 社) にて各蛍光物質の特異波長を確認することで、標識の成否を判断した。

(4) 卵濾胞培養系を用いた脂質取り込み過程の確認

得られたカタクチイワシとスマの蛍光追跡 Vldl と卵濾胞は、各々生体外で培養することで、その脂質取り込み経路や代謝特性を観察した。卵巣から単離された卵濾胞は、二重蛍光標識の Vldl と Leibovitz L-15 medium (Gibco 社) にて 12 時間培養した後、上記同様な方法で凍結組織切片を作製し、卵濾胞内における Vldl の取り込みや代謝挙動をそれぞれモニタリングした。

4. 研究成果

(1) 卵脂質の構成特徴

それぞれ異なる特性を持つカタクチイワシとスマの卵を中性脂質蛍光標識反応に供した結果、カタクチイワシでは卵黄球にて、スマでは油球にて、強い蛍光反応が観察された (図 1)。この結果から、主に中性脂質から成る油球が形成されないカタクチイワシの卵内では、ほとんどの中性脂質が、一般に大量のリン脂質から構成されると考えられている卵黄球に含まれていることが確認された。一方、スマ

の卵内には、大量の中性脂質が油球として形成されていることが明らかとなった。

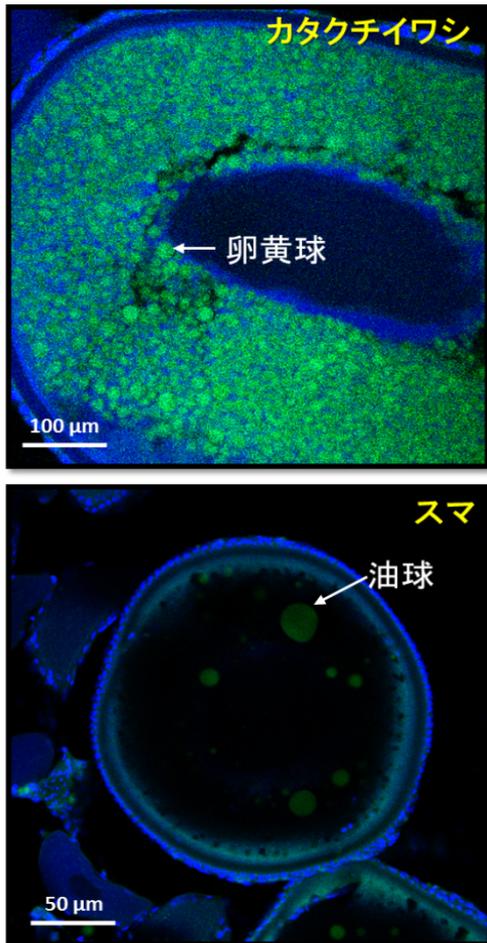


図1. 中性脂質を選択的に染める蛍光物質 LipidTox に反応させたカタクチイワシとスマの卵濾胞細胞

(2) 各リポタンパク質の同定

サケ科で確立された超遠心分離法を用いてカタクチイワシとスマの血漿から各リポタンパク質の分離を試みた結果、カタクチイワシの血漿画分からは、サケ類のそれと似たパタン各リポタンパク質が確認されたが、スマの画分からは、多少異なるパタンのリポタンパク質が確認できた。二魚種共に V1d1 と Hd1 の画分では、サケやウナギ科の魚類や異種から報告された各リポタンパク質に結合している特異的なアポリポタンパク質 (V1d1: apo C, Hd1: apo AI-II) の存在および Native な発現パタンが認められたが、スマの Ld1 画分では、約 250kDA の apo B が観察されなかった。また、その密度も他魚種との差があったことから、マグロ類の種特的なリポタンパク質の構成や作用機構の存在が示唆された。

(3) 海産魚卵における脂質取り込み機構の比較・解析

海産魚の卵内における脂質取り込み機構を理解するために、選択された二種の海産魚卵

と蛍光標識された脂質輸送体 (df-jaV1d1 および df-bstV1d1) を確立された培養系に供した後、その動態 (代謝・蓄積) を組織学的に観察した。まず、カタクチイワシとスマの V1d1 に上記の方法を用いて、その脂質部分とタンパク質部分に二重の蛍光標識を行なった結果、いずれの V1d1 においても標識された蛍光物質の吸光度 (脂質: 512nm, タンパク質: 594nm) が検出され、対象の海産魚モデルにおいてもサケ科魚類と同様な方法で、蛍光追跡リポタンパク質を作製できることが確認された。

作製された蛍光追跡 V1d1 を卵濾胞との培養系に用いた結果、多くの油球を形成するスマの卵内には予想の通り、脂質部分 (緑色) が大量の油球として卵母細胞内に蓄積されていた。しかし、タンパク質部分 (赤色) は、卵母細胞外の卵膜や濾胞細胞のみで観察され、申請者によって確認されたサケ科魚類のそれと同様に、主たる脂質輸送体 (主に中性脂質) である V1d1 が卵母細胞外で代謝され、そこで遊離された脂肪酸が卵母細胞内に取り込まれ蓄積されるものの、分離されたタンパク質の部分 (主にアポリポタンパク質) は卵母細胞内に取り込まれないことが示された。一方、卵内に油球を形成しないカタクチイワシにおいても、V1d1 が卵母細胞外で代謝されそこで生じたタンパク質の部分が卵膜や濾胞細胞に残ることが観察され、その構成や特徴は違うものの、V1d1 を中心とした脂質の運搬・代謝経路は魚類一般的に存在している可能性が示唆された (図2)。

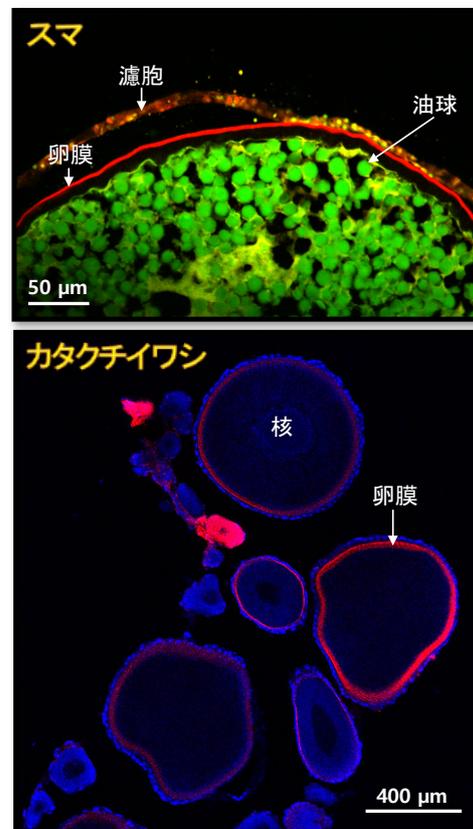


図2. カタクチイワシとスマの卵内における蛍光追跡 V1d1 の代謝・蓄積経路

以上、異なる生態習性を持つカタクチイワシとスマにおいて、その卵脂質の構成特徴および各リポタンパク質の同定、またそれらを用いた培養系の構築による主要脂質輸送体の代謝・蓄積経路など、海産魚の卵内における脂質取り込み機構を理解するための基礎的な知見が得られた。一方、リポタンパク質の運搬や代謝に重要な役割を果たすアポリポタンパク質の構成が異種間において異なる理由やその作用機構の差、また遊離された様々な脂肪酸が異なるタイプの卵内においてどのように使用されるかなど、まだ多い部分が解決すべき課題として残った。今後、本研究により海産魚卵の脂質取り込み機構の比較研究モデルとしてそのポテンシャルが認められたカタクチイワシとスマを用いて、さらなる解析を進めていくことで、将来の有用な水産増養殖技術開発の基盤を構築する。

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3件)

- ①. Pandey, D., Ryu, Y.-W., Matsubara, T. (2017) Features of sperm motility and the circadian rhythm in Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*). Fish. Aqua. J., 8: 203. DOI:10.4172/2150-3508.1000203. 査読あり
- ②. Pandey, D., Ryu, Y.-W., Goto, R., Matsubara, T. (2017) Morphological and biochemical changes of oocytes during final oocyte maturation in Japanese anchovy (*Engraulis Japonicus*). Aquacult. Sci. 65 (1), 29-40. 査読あり
- ③. Hiramatsu, N., Todo, T., Sullivan, C.V., Schilling, J., Reading, B.J., Matsubara, T., Ryu, Y.-W., Mizuta, H., Luo, W., Nishimiya, O., Wu, M., Mushiobira, M., Yilmaz, O., Hara, A. (2015) Ovarian yolk formation in fishes: molecular mechanisms underlying formation of lipid droplets and vitellogenin-derived yolk proteins. Gen. Comp. Endocrinol. 221, 9-15. 査読あり

[学会発表] (計3件)

- ①. Pandey, D., Ryu, Y.-W., Matsubara, T., Goto, R. Proteolytic degradation of multiple vitellogenin and derived yolk proteins during final oocyte maturation in Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*). 4th

International Conference on Fisheries and Aquaculture. November 2016. San Antonio, USA.

- ②. 早川嵩人・河田遼子・Dipak Pandey・斎藤大樹・後藤理恵・柳 蓉芸・太田耕平・山内皓平・長濱嘉孝・松原孝博. 平成28年度日本水産学会春季大会プログラム. 2016年3月27日. 東京海洋大学(東京都・品川区).
- ③. Dipak Pandey・Takahiro Matsubara・Yong-Woon Ryu・Rie Goto. Morphological and biochemical changes of oocytes during final oocyte maturation in Japanese anchovy (*Engraulis japonica*). 平成28年度日本水産学会春季大会プログラム. 2016年3月27日. 東京海洋大学(東京都・品川区).

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
柳 蓉芸 (Ryu, Yong-Woon)
愛媛大学・南予水産研究センター・
助教 (特定教員)
研究者番号：10643249

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者