

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18741

研究課題名(和文) 魚類の発生初期における代謝調節因子の探索

研究課題名(英文) Exploring transcription factors regulating embryonic metabolism in teleost fish

研究代表者

古川 史也 (Furukawa, Fumiya)

北里大学・海洋生命科学部・助教

研究者番号：80750281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：水産養殖の中でも、種苗生産過程において、仔魚のへい死が問題となることが多い。発生初期の魚類体内では様々な代謝が起こっていることが想定されるが、今日まで詳細な研究報告は非常に限られている。本研究では、成体の肝臓で発現する様々な転写調節因子に着目し、発生初期のゼブラフィッシュにおいて遺伝子の発現解析を行った。その結果、いくつかの転写調節因子の発現が見られ、さらに低酸素、低温、低pHなどの環境ストレスに応答し発現を変動させるものも存在した。このことより、発生初期の魚類(胚～仔魚)において、体内の代謝を環境ストレスに応じて変動させる能力があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the processes of aquaculture, seedling production often faces mass mortality of developing fish. Although developing fish should metabolize various nutrients, limited knowledge is available regarding this topic. We focused on transcription factors normally found in adult livers and assessed their expression in developing zebrafish. Some of the transcription factor genes were expressed in zebrafish embryos, and their expression levels were changed in response to stressors, such as low oxygen, low temperature, low pH. These results suggest that developing fish embryos and larvae have abilities to adjust their metabolism to cope with external stresses.

研究分野：魚類生理学

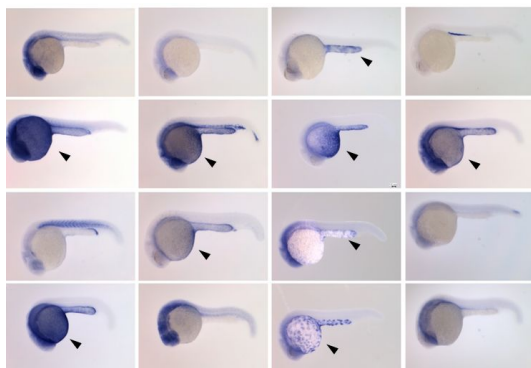
キーワード：発生 代謝 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

近年、特にマグロやウナギなどの水産資源の減少が問題となっている。水産養殖の中でも、親魚から人工的に受精卵を得て稚魚を育てる種苗生産、およびこのようにして得られた人工種苗を利用した完全養殖は、今後の持続可能な水産業の鍵となり得る。しかし、魚類では、受精卵が発生・孵化し、餌を食べ始めるまでの初期段階に大量にへい死（減耗）しやすく、種苗生産の現場で問題視されている。減耗の要因として、発生初期に仔魚の栄養源となる卵黄の質（卵質）が挙げられる。そのため、この問題に対する打開策の一つとして、今日まで卵質の向上を目指した様々な研究が行われてきている。その一方で、実際に仔魚がどのように卵黄を利用しているかについては、実は不明な点が多岐にわたる。魚類では、卵黄の吸収は専ら卵黄多核層 (yolk syncytial layer; YSL) と呼ばれる、ひとつなぎの多核の細胞層によって行われる。YSL の構造や形成過程はこれまでに発生生物学の分野により詳細に報告されているものの、その生理学的役割については不明な点が多い。このような背景のもと、我々は、YSL の機能や生理的役割について明らかにし、魚類発生初期の栄養代謝を理解することを通して、種苗生産の過程で問題となる卵質の向上や、新たな養殖技術の開発に資することを目指している。

まず、YSL における卵黄の吸収と代謝の基盤となる分子機構に着目した。ゼブラフィッシュ胚での代謝関連遺伝子の中から、任意に選択した 76 遺伝子の発現動態を調べ、発現部位を解析した結果、多くの代謝関連遺伝子が YSL に発現することが明らかとなった (図 1)。このことは、YSL は卵黄物質の輸送のみならず、それらの積極的な代謝を行っていることを示唆している。また、YSL に発現する遺伝子の発現パターンは遺伝子ごとに異なり、それらは外環境の温度や pH によって変動することが明らかとなった。

図 1.ゼブラフィッシュ YSL に発現する代謝



関連酵素遺伝子。各パネルは別々の遺伝子の発現シグナル (青紫色) を示す。矢尻は YSL にみられる遺伝子発現。

2. 研究の目的

我々ヒトの体内では、肝臓が代謝の主要な役割を担っているが、その内容はより高次に位置する転写調節因子 (図 2) やホルモンなどにより調節されている。魚類の胚では、前述の結果から、YSL が積極的に卵黄の栄養を代謝しており、更に外環境の変化などに応じてその速度や性質を変化させていることが考えられた。そこで、本研究では魚類 YSL で起こる代謝、およびその外環境の変化への応答は、こうした転写調節因子やホルモンの影響を受けるのか否かを明らかにすることを目的とした。言い換えれば、YSL は卵黄の栄養を吸収するための単なる通過点ではなく、成体における肝臓のように、状況に応じて必要な栄養成分を作り出すための装置として働いている、という可能性を検討するものである。

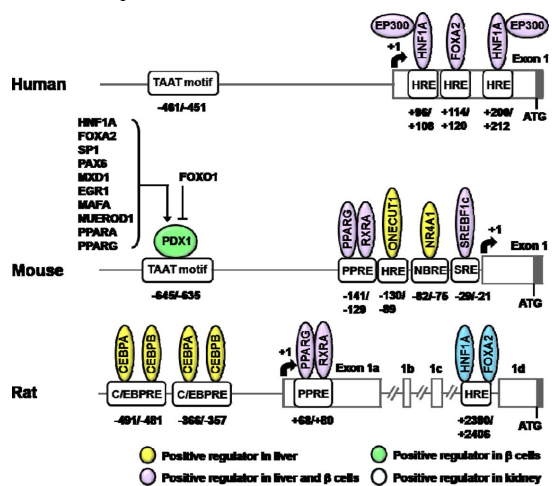


図 2. SLC2A2 (グルコース輸送体) 遺伝子の 5'側近傍に存在する調節領域。ヒト、マウス、ラットの肝臓において、HNF1A や FOXA2、PPARG などの転写調節因子が、HRE、PPRE、C/EBPRE などの部位に結合し、SLC2A2 遺伝子の発現を調節する。

Bae et al. Transcriptional regulation of glucose sensors in pancreatic  $\beta$ -cells and liver: an update. *Sensors* 10: 5031-5053, 2010.

3. 研究の方法

(1) 本研究では、魚類の発生のモデル生物として知られるゼブラフィッシュを用いた。まず、成体の肝臓で発現することが知られる転写調節因子 12 種を選定し、逆転写 PCR 法によりゼブラフィッシュ胚における遺伝子発現を検討した。発現が見られた遺伝子群に対し、*in situ* hybridization 法を用いてその発現部位を特定した。また、リアルタイム PCR 法により、発生過程における遺伝子発現レベルの詳細な変化を検討した。ここまでの結果で、YSL での代謝を調節しうる転写因子の遺伝子群を絞り込んだ。次に、低酸素、低温、低 pH の環境ストレスにゼブラフィッシュ胚を曝露し、これに反応して上記遺伝子群

の発現が変化するか否かを検討した。

(2) YSL に発現し、更に低酸素ストレスに応答する遺伝子が明らかになったため、この遺伝子の機能解析を試みた。遺伝子特異的なモルフォリノオリゴ (MO) を作製し、遺伝子ノックダウンを行った。ここで、スプライシング阻害型の MO がうまく作用しなかったため、翻訳阻害型の MO を使う必要が生じた。そのため、Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)法により非翻訳領域のクローニングを行った。

(3) 転写調節因子の機能解析が難航したため、新たに内分泌因子 (ホルモン) もターゲットに、実験を開始した。代謝を調節することが知られるホルモンの阻害剤をゼブラフィッシュ胚に曝露した後、いくつかの代謝関連遺伝子群の発現量を調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 12 種類の転写調節因子に関して、ゼブラフィッシュ胚の遺伝子発現を検討した結果、11 種類の遺伝子の発現が確認された。これらは、受精 6 時間後と 12-24 時間後に発現量が大きいものに大別された。In situ hybridization 法によりそれらの発現部位を調べたところ、YSL に発現するものが 8 種類あった。更に、低酸素、低温、低 pH 処理の影響を調べた結果、6 種類の遺伝子が低酸素または低 pH 刺激に応答して発現変動を示した (図 3)。これらの遺伝子は環境刺激の種類により異なる挙動を示したことから、各刺激に応答し、異なる役割を果たすと考えられた。

##### 確認された転写調節因子の遺伝子発現

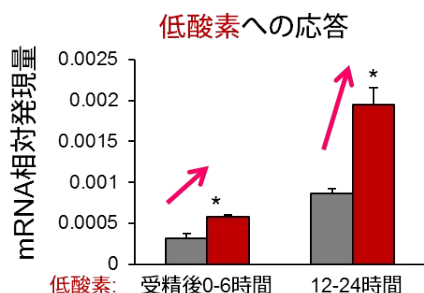
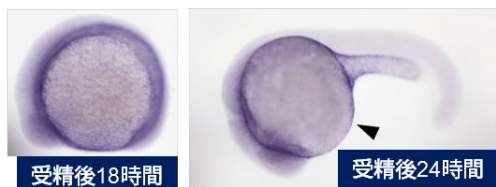


図 3. ゼブラフィッシュ胚に確認された転写調節因子の遺伝子発現。(上)YSLに見られた遺伝子発現シグナル。(下)受精後、それぞれの時間で低酸素処理を受けた胚(赤)は、対照(灰色)に比べて遺伝子発現が上昇していた。

(2) YSL に発現がみられ、且つその発現量が環境変化によって変動する遺伝子をターゲットとして、遺伝子ノックダウンを用いた機能解析を試みた。しかし前述したように、

スプライシング阻害型の MO を使用した実験が難航した。この代替策として、翻訳阻害型の MO を使用する可能性が考えられた。目的の遺伝子は 5'UTR の情報がゲノムデータベース上に登録されておらず、これを明らかにする必要がある。そのため、RACE 法による解析を行った。その結果、5'UTR において 271 塩基、3'UTR において 683 塩基の配列が新たに明らかとなった。今後はこの配列情報を利用して、新たに MO を設計しノックダウンによる機能解析を行う予定である。

(3) 転写調節因子に着目した実験に並行して、内分泌因子にも焦点を当て、YSL における代謝調節の可能性を検討した。成体において代謝を調節することが知られるホルモンについて、この受容体 ~ 細胞内シグナル伝達を阻害する物質をゼブラフィッシュ胚に作用させた後、代謝関連遺伝子の発現を検討した。その結果、受精 24 時間後の胚において代謝関連遺伝子の発現が上昇する傾向が見られた。このことから、多くの組織が未発達である胚において、YSL でおこる代謝がホルモンによる調節を受けている可能性が考えられる。現在、上記阻害剤の投与後に起こる代謝中間産物の解析や、ゼブラフィッシュ胚にこのホルモンを人為的に過剰発現させるための系を立ち上げており、ゼブラフィッシュ YSL における代謝におよぼす内分泌因子の役割について、より詳細に検討している。

#### 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 2 件)

Furukawa E, Watanabe S, Seale AP, Breves JP, Lerner DT, Grau EG, Kaneko T. In vivo and in vitro effects of high- $K^+$  stress on branchial expression of ROMKa in seawater-acclimated Mozambique tilapia, *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, Elsevier, 187 巻, pp. 111-118, 2015. 査読有

Furukawa E, Tseng YC, Liu ST, Chou YL, Lin CC, Sung PH, Uchida K, Lin LY, Hwang PP. Induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) during acute acidosis and its role in acid secretion by V-ATPase-expressing ionocytes, *International Journal of Biological Sciences*, Ivyspring International Publisher, 11 巻, pp. 712-725, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

小山夢玄、古賀由香、吉川史也、森山俊介、奥村誠一。アワビ類の胚発生過程における糖新生とグリコーゲンの代謝に

ついて、平成 30 年度日本水産学会春季大会、2018 年。

**古川史也**、伊良知正太郎、小山夢玄、古賀由香、小倉千佳、木野村茜、Tseng YC、Lin CC、馬場麻人、香川浩彦、内田勝久、森山俊介、奥村誠一、Hwang PP。卵黄代謝とアワビ組織再生に関する研究の進展と今後の妄想。第三回 ユニークな個性派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会。2017 年。伊良知正太郎、**古川史也**、香川浩彦、内田勝久。ゼブラフィッシュ発生初期の YSL における転写調節因子。平成 29 年度日本水産学会春季大会、2017 年。

**Furukawa F**, Tseng YC, Liu ST, Chou YL, Lin CC, Sung PH, Uchida K, Lin LY, Hwang PP. Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)-mediated gluconeogenesis accelerates acid secretion by H<sup>+</sup>-ATPase-expressing ionocytes during acidosis. The 9<sup>th</sup> International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry From molecule to Macrophysiology. 2015.

〔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

<https://www.kitasato-u.ac.jp/mb/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

古川 史也 (FURUKAWA, Fumiya)  
北里大学・海洋生命科学部・助教  
研究者番号：80750281

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

なし