

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14524

研究課題名（和文）魚類の胚によるグリコーゲン利用機構の解明と環境ストレス耐性卵の作製

研究課題名（英文）Mechanisms of glycogen utilization in fish embryos and production of stress-resistant eggs

研究代表者

古川 史也（Furukawa, Fumiya）

北里大学・海洋生命科学部・講師

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）：本研究では、主にゼブラフィッシュを用い、発生過程におけるグリコーゲン代謝の様子とその役割を検討した。雌の卵母細胞内ではグリコーゲン合成の様子が、受精後の胚においてはグリコーゲン分解の様子が確認された。低酸素下では胚発生が遅延し、これと同時にグリコーゲンの分解が抑制された。現在、グリコーゲンの役割を調べるため、CRISPR/Cas9を用いたグリコーゲン合成酵素欠損ゼブラフィッシュの作出を試みている。比較対象としてサクラマスとエゾアワビの発生過程におけるグリコーゲン代謝を調べた結果、こちらでは受精後に胚がグリコーゲンを合成し、それぞれ孵化前と着底前に利用していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

持続可能な水産業の推進のためにも、完全養殖のカギを握る種苗生産過程における胚や仔魚のへい死を減らす必要がある。これまで、卵質に関わる物質が様々に研究されているが、実際に胚や仔魚の体内で起こる生理的な現象を理解する試みに乏しい。本研究では、細胞内貯蔵糖質として働くグリコーゲンについて検討した。グリコーゲンは卵内に貯蔵されることから、母親の飼育環境の調節により卵への貯蔵量を人為的に調節でき、卵質に影響を与えることができると推察される。本研究でグリコーゲンの蓄積・利用過程がある程度見えてきたので、今後は種苗生産への応用を見据え、グリコーゲンの生理的な役割を決定していく必要がある。

研究成果の概要（英文）：We studied glycogen metabolism in developing zebrafish and other animals. In the zebrafish, glycogen was synthesized in the oocytes, and after fertilization, this polysaccharide was degraded by the embryos. Under hypoxic conditions, the embryogenesis and glycogen consumption were inhibited. To clarify the role of glycogen, we are trying to produce glycogen synthase-deficient zebrafish by the CRISPR/Cas9 system. Masu salmon and Pacific abalone were also studied for comparison. These animals synthesized glycogen during early development, and then consumed the glycogen during hatching and settling, respectively.

研究分野：生理学

キーワード：グリコーゲン 発生 糖質 代謝

1. 研究開始当初の背景

世界的に水産資源の持続可能な利用が重要視されている。このような状況にあり、今後ますます水産養殖の効率化・高度化の需要が高まっていくことが推察される。日本国内では既に様々な魚種において完全養殖が実現されているが、中でも受精卵を稚魚まで育成する段階の「種苗生産」の過程で受精卵や胚、仔魚のへい死が問題となることが多い。この原因が明らかでない場合、「卵質が悪かった」とされ、親の生育環境を改善する等の対策がとられる。「卵質」に影響を及ぼす卵内の物質は様々なものが想定され、現在も活発に調査されている。一方で、実際に胚が発生する過程でどのような生理学的現象が起こっているのかは不明な点が多い。また、卵の中でも卵黄タンパク質や脂質に着目した研究は多いが、それ以外のマイナーな構成成分に関する知見も限られている。

本研究の代表者は、魚類の中でも発生学のモデル生物として広く扱われているゼブラフィッシュを用いて、発生過程における卵黄の吸収・代謝に着目して研究を行っており、この過程で、ゼブラフィッシュ胚が活発にグルコースの合成(糖新生)を行っていることを見出した。さらに、産卵前の雌卵巢内では、卵母細胞が貯蔵糖質であるグリコーゲンを蓄えている様子が明らかになった。グリコーゲンやグルコース等の糖質は解糖系を通してエネルギーを産生するが、このときに酸素を必要としないのが脂肪酸を使った好機呼吸との大きな違いである。したがって、嫌気的環境下における需要が大きいと想定される。また、グリア細胞や血球などの細胞においては、糖質がエネルギー源としてもっぱら利用されている。これらの事実から、糖質が胚発生の過程で重要な役割を担っている可能性は高いが、タンパク質や脂質の代謝に比べ、知見が少ないのが現状である。

2. 研究の目的

上記の背景から、本研究では受精後のゼブラフィッシュにおけるグリコーゲン代謝の様子やその役割を明らかにすることを第一の目的とした。また、魚種の違いによって発生過程でのグリコーゲン代謝が異なる可能性がある。そこで、サケ科魚類のサクラマスも使い、ゼブラフィッシュの結果と比較する。さらに、ゼブラフィッシュにおいては卵母細胞内でグリコーゲンの蓄積が加速する条件を検討し、人為的にグリコーゲン強化卵を作製することで、低酸素等の環境変化に強い卵を作製することを目指した。

3. 研究の方法

無給餌で飼育した様々な発生過程のゼブラフィッシュをサンプリングし、抗グリコーゲン抗体を用いたドットプロット法¹によりグリコーゲン含有量の変化を、Milligan²を参考に比色定量法によりグリコーゲン代謝酵素の活性を測定した。また、グリコーゲン代謝酵素(グリコーゲンシンターゼ Gys1/2、グリコーゲンホスホリラーゼ Pyl1、Pygm、Pygb)に対する抗体を作成し、蛍光免疫染色により胚におけるグリコーゲンやグリコーゲン代謝酵素の局在を明らかにした。また、雌の卵巢より様々なサイズの卵母細胞を摘出し、これらを用いて同様の実験を行った。また、ゼブラフィッシュ胚を低酸素水で飼育し、グリコーゲン含有量およびグリコーゲン代謝酵素の活性を検討した。

グリコーゲンの役割を明らかにするため、グリコーゲンのないゼブラフィッシュを作成することを目指した。CRISPR/Cas9 システムを使用し、グリコーゲン合成酵素をノックアウトしたゼブラフィッシュの作出を試みた。

無給餌で飼育した様々な発生段階のサクラマスをサンプリングし、抗グリコーゲン抗体を用いたグリコーゲンの定量と蛍光免疫染色を行った。また、グリコーゲン代謝を担う遺伝子群を特定し、リアルタイム PCR による発現定量および *in situ* ハイブリダイゼーション法による発現局在の探索を行った。また、同時期に軟体動物門エゾアワビの発生過程を調査していたが、比較対象としてこちらのグリコーゲン代謝も調べるようになった。抗体を用いたグリコーゲンの定量と蛍光免疫染色、さらにグリコーゲン代謝遺伝子の発現解析を行った。

4. 研究成果

ドットプロット法によるグリコーゲン定量の結果、ゼブラフィッシュ卵母細胞内でグリコーゲンが蓄積する過程を確認することができた。特に、卵径 500 μm 超から最終成熟に向かう段階で 2 度にわたるグリコーゲンの増加が起こっていた。この時、グリコーゲンホスホリラーゼ(分解酵素)の活性が一過的に減少したが、これがグリコーゲン増加に関与している可能性がある。受精後、胚発生とともにグリコーゲンが 3 日間かけて減少し、その後一定に保たれた。酵素活性測定の結果から、受精後 12~24 時間の間にグリコーゲンホスホリラーゼの活性が増加することがグリコーゲンの分解を加速させている原因と思われた。低酸素環境下で飼育したゼブラフィッシュ胚では発生が遅延し、このときグリコーゲンの分解は停滞した。したがって、グリコーゲンの利用は低酸素下ではむしろ抑えられ、酸素が利用できるようになるまで保存されていると考えられる。抗グリコーゲン抗体を使った免疫染色の結果、グリコーゲンははじめ卵の表層に局在し、受精後は卵黄内よりもむしろ胚体を形成する細胞内に多く存在した。また、グリコーゲンシンターゼも同様の局在を示した。一方、グリコーゲンホスホリラーゼはごく早い時期の卵母細胞、および胚の内胚葉と思われる部位に局在した。今後は他の代謝経路とあわせ、卵母細胞と胚におけるグリコーゲン代謝を総合的に理解する必要がある。

グリコーゲンの役割を明らかにするため、CRISPR/Cas9 を用いたノックアウトゼブラフィッシュを作成中だが、死亡個体が多くなかなかホモ変異体を作成できないでいる。今後もチャレンジを続けるが、別のアプローチも検討する必要がある。

発生過程のサクラマスを用いた実験の結果、ゼブラフィッシュとは全く異なる結果が得られた。すなわち、卵内にははじめグリコーゲンはほとんどなく、検出限界以下であった。受精後 30 日からグリコーゲンが検出され、40 日まで増加し、60 日(孵化直後)に再度減少した後、増加に転じた。遺伝子発現解析の結果、肝臓と筋肉においてグリコーゲン代謝酵素が発現していた。これらの結果から、サクラマスにおいては、グリコーゲンは孵化前後に利用するための貯蔵として胚により積極的に合成されている可能性が考えられた。軟体動物エゾアワビにおいても、サクラマスと類似したグリコーゲンの利用形態が確認された。すなわち、受精後、徐々にグリコーゲンが増加し、その後減少するというものである。エゾアワビの場合、孵化後にグリコーゲンが増加し、浮遊幼生期を過ぎた後、着底に向かってグリコーゲンが減少する様子が確認できた。この結果から、着底に関わるエネルギー源としてグリコーゲンが利用されている可能性が示唆された。実際に、解糖系の阻害剤である 2-deoxyglucose を使用した飼育実験では、着底期間において生存率の低下が確認された。

本研究の結果から、いくつかの水生動物の発生過程におけるグリコーゲン代謝が見えてきた。今後も研究を継続し、発生過程におけるグリコーゲンの役割を追求したい。

(文献)

1. Baba O. Kokubyo Gakkai Zasshi 60, 264-287, 1993.
2. Milligan CL. J Exp Biol 206: 3167-3173, 2003.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koyama Mugen, Furukawa Fumiya, Koga Yuka, Funayama Shohei, Furukawa Suehiro, Baba Otto, Lin Ching-Chun, Hwang Pung-Pung, Moriyama Shunsuke, Okumura Sei-ichi	4. 巻 318
2. 論文標題 Gluconeogenesis and glycogen metabolism during development of Pacific abalone, <i>Haliotis discus hannai</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology	6. 最初と最後の頁 R619 ~ R633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpregu.00211.2019	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Fumiya Furukawa, Shotaro Irachi, Mugen Koyama, Otto Baba, Hajime Akimoto, Sei-ichi Okumura, Hirohiko Kagawa, Katsuhisa Uchida	4. 巻 225
2. 論文標題 Changes in glycogen concentration and gene expression levels of glycogen-metabolizing enzymes in muscle and liver of developing masu salmon	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Comparative Biochemistry and Physiology, Part A	6. 最初と最後の頁 74-82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpa.2018.07.003	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 青柳晶大、古川史也、安元剛、佐野香織、神保充、Tseng YC, Lin CC, 内田勝久、Hwang PP
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ卵黄多核層における糖新生
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumiya Furukawa, Shotaro Irachi, Mugen Koyama, Otto Baba, Hajime Akimoto, Sei-ichi Okumura, Hirohiko Kagawa, Katsuhisa Uchida
2. 発表標題 Glycogen metabolism in the liver and muscle of developing salmonid fish, <i>Oncorhynchus masou masou</i>
3. 学会等名 13th International Congress on the Biology of Fish (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mugen Koyama, Fumiya Furukawa, Yuka Koga, Shunsuke Moriyama, Sei-ichi Okumura
2. 発表標題 Glucose and glycogen metabolism in developing Pacific abalone, <i>Haliotis discus hannai</i>
3. 学会等名 13th International Congress on the Biology of Fish (国際学会)
4. 発表年 2018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