

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05764

研究課題名（和文）ゲノム編集技術を用いた魚類の卵黄形成機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of vitellogenesis in fish using genome editing technology

研究代表者

東藤 孝 (Todo, Takashi)

北海道大学・水産科学研究院・教授

研究者番号：60303111

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）：本研究は、魚類の卵母細胞中に卵黄物質として貯蔵される中性脂質（油球）と卵黄タンパク質（卵黄球）の蓄積機構を分子レベルで解明することを目的とした。メダカを研究モデルとし、それぞれの蓄積に関与する分子群について、種々の発現解析やゲノム編集技術を用いた機能解析を行った。その結果、油球蓄積については、中性脂質のキャリアーである超低密度リポタンパク質の代謝酵素であるリポタンパクリパーゼが、卵濾胞細胞において重要な役割を担っていることが示唆された。また、卵黄球蓄積については、複数のリポタンパク質受容体が、複数の卵黄タンパク前駆物質の卵母細胞内への取り込みにおいて異なる役割を担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、魚類の卵成長や胚発生、仔稚魚の成長に必要な魚類の卵黄形成機構について、中性脂質と卵黄タンパク質の双方の蓄積機構を解析し、種々の重要な知見を得た。それらの中でも、ゲノム編集技術を用いて、種々の卵黄形成関連因子の機能を直接的に解析する基盤を確立し、特にリポタンパク質受容体の1種について、卵黄タンパク質の取り込みにおける機能を脊椎動物で初めて明らかにできた点は、学術的意義が極めて高い。本研究で得られた成果は、脂質やタンパク質の卵内への蓄積を人為的に制御できる技術の開発に繋がるものであり、これまでにない画期的な卵質改善法の開発を可能とする点で、その社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to clarify the molecular mechanisms underlying accumulation of neutral lipids (lipid droplets) and yolk proteins (yolk granules) into teleost oocytes as yolk materials. Japanese medaka was selected as the research model, and the functions of several factors which are expected to be involved in the accumulation of yolk materials, was examined through the analyses of their expression patterns in ovarian follicles and the gene-editing technology. As the results, it was shown that lipoprotein lipase expressed in the ovarian follicle cells, a key enzyme of very low density lipoprotein which is the major carrier of neutral lipids to oocyte lipid droplets, plays an important role on the formation of lipid droplets in oocytes. In addition, for the accumulation of yolk proteins, it was suggested that multiple types of lipoprotein receptors have each different and specific role on the uptake of the multiple types of yolk protein precursors.

研究分野：魚類繁殖生理学

キーワード：卵形成 卵成長 卵黄形成 メダカ 中性脂質 タンパク質 リポタンパク質 ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の水産増養殖を支える基礎研究の重要なテーマの一つに「卵質」が挙げられる。種苗生産を行っている水産増養殖の現場においては、良い卵質を有する卵を得ることが第一義的な課題である。卵質には、タンパク質や脂質などの卵内に蓄えられる様々な物質が影響するものと考えられている。しかし、卵質に影響を及ぼす決定的な要因は未だ明らかにされておらず、これらの物質が卵内に蓄積される機構についても不明な点が多く残されている。

魚類の卵成長過程は、第一次成長期と第二次成長期に分けられ、特に第二次成長期は、後の胚や仔稚魚の発達に必要な脂質やタンパク質を母体から卵内に多量に取り込み、「卵黄」として蓄積しながら急速に成長する重要な過程である。卵黄は、生み出された卵の細胞質の容量の殆どを占め、胚や仔稚魚に吸収され利用されることから、卵黄の質が卵質を決定付けるとも言え、その形成過程を正しく知ることは、卵質を理解する上で極めて重要である。

魚類の卵母細胞における第二次成長期は、前卵黄形成期と卵黄形成期に大別される。サケ科魚類やウナギ類、マダイ (*Pagrus major*)、ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*)、メダカなどの多くの魚種においては、前卵黄形成期の卵母細胞内で中性脂質が「油球」として蓄積され始める。油球は卵母細胞の成長と共に増加し、卵黄形成期間を通してその蓄積は継続される。油球の元となる中性脂質の主要な供給源は、主に肝臓で産生される超低密度リポタンパク質 (Vldl) である。Vldl は卵母細胞外、特に卵濾胞細胞の顆粒膜細胞でリポタンパクリパーゼ (Lpl) の作用により代謝され、それによって生じた遊離脂肪酸が卵原形質膜上に存在する脂肪酸交換輸送体や脂肪酸輸送タンパクによって卵内に取り込まれた後に、中性脂質に再構成され油球として蓄積されると考えられている (図1)。しかし、この油球形成機構はまだ仮説の域を出ておらず、油球形成に関わると予想される各因子の働きは実証されていない。

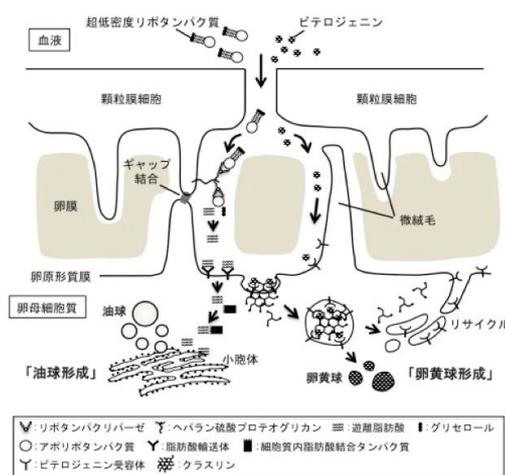


図1. 魚類の卵母細胞における油球および卵黄球の形成機構

一方で、全ての魚種において、卵黄形成期の開始とともに卵内には主要な卵黄成分である「卵黄球」が蓄積され始める。卵黄球の蓄積とともに卵母細胞は大きく成長し、最終的に卵黄球は卵母細胞質の大部分を占めるようになる。卵黄球の主成分はリン脂質や糖を含む卵黄タンパク質であり、このタンパク質は雌性ホルモン (エストロジェン) の作用により肝臓で産生される卵黄タンパク前駆物質 (ビテロジェニン: Vtg) に由来する。Vtg は血流を介して卵濾胞に到達した後、卵原形質膜上に存在する特異的な Vtg 受容体を介したエンドサイトーシスにより卵内に取り込まれ、酵素の働きによって限定的な分解を受け、リポビテリンやホスビチンなどの卵黄タンパク質として蓄積される (図1)。近年、魚類の Vtg には 2~3 種類のサブタイプが存在することが明らかとなり、これら Vtg サブタイプ間では、構造や卵内の蓄積量が異なることが示されており、さらにはそれぞれに由来する卵黄タンパク質の機能も異なっていることが示唆されている。また、Vtg 受容体は当初、リポタンパク質受容体ファミリーに属する Vldl 受容体 (Lr8) ホモログのみであると考えられていたが、最近の研究から魚類の卵膜中には Lr8 以外にも低密度リポタンパク質受容体 (Lr7) や魚類で新規のリポタンパク質受容体として発見された Lr13 も存在することが明らかとなり、これら 3 種の Lr が Vtgr として機能しているものと考えられている。さらには、Vtg サブタイプ間で 3 種 Lr に対する結合性が異なることも示唆されている。しかし、3 種リポタンパク質受容体の Vtg 受容体としての機能は未だに実証されておらず、解決すべき重要な課題として残されている。

2. 研究の目的

本研究では、魚類の卵母細胞における広義の卵黄物質である、中性脂質 (油球) と卵黄タンパク質 (卵黄球) の蓄積機構について、それらに関わる重要な分子群の機能を明らかにすることを目的とした。ミナミメダカ (*Oryzias latipes*, 以下メダカ) を研究モデルとし、「課題1: 油球形成機構の解析」と「課題2: 卵黄球形成機構の解析」の2課題を設定して、各遺伝子の発現解析を

行うと共に、ゲノム編集技術により各遺伝子欠損 (KO) メダカを作出し、それらの表現型解析により、各遺伝子の機能の検証を目指すべく、以下の項目について解析した。

課題 1：油球形成機構の解析

(1) 2 種 *lpl* (*lpl1* および *lpl2*) の cDNA クローニングと発現解析。

(2) *lpl1*-KO 魚の作出と表現型解析。

課題 2：卵黄球形成機構の解析

(3) 4 種リポタンパク質受容体 (*lr7a*, *lr7b*, *lr8*, *lr13*) の cDNA クローニングと発現解析。

(4) 2 種リポタンパク質受容体 (*lr8* および *lr13*) -KO 魚の作出と表現型解析。

3. 研究の方法

(1) 2 種 *lpl* (*lpl1* および *lpl2*) の cDNA クローニングと発現解析

メダカ卵巣から PCR 法により 2 種 *lpl* (*lpl1* および *lpl2*) cDNA をクローニングし、それぞれについてリアルタイム定量 PCR 法 (qPCR) を確立した。メダカの各組織 (脳、鰓、肝臓、卵巣、肝臓、脂肪組織、腸など) における 2 種 *lpl* mRNA 発現量を qPCR により測定した。また、メダカ卵巣から、卵濾胞を分離し、前卵黄形成期・卵黄形成初期・卵黄形成中期・卵黄形成後期・成熟期に分け、卵濾胞の発達段階に伴う 2 種 *lpl* mRNA 発現量の変化を qPCR により調べた。

(2) *lpl1*-KO 魚の作出と表現型解析

(1) の結果から、*Lpl1* が主要な *Lpl* として機能している可能性が示されたことから、*lpl1* について KO 魚の作出を進めた。ゲノム編集による KO 魚の作出は CRISPER/Cas9 システムを用いた。*lpl1* の機能性の高い部分に、変異とともに終始コドンが含まれるようガイド RNA (gRNA) を設計した。1 細胞期のメダカ胚に、gRNA をマイクロインジェクション法により注入した。変異導入 F0 魚の確認は、仔魚や成魚の鱗の一部からゲノム DNA を抽出し、PCR 法とヘテロ 2 本鎖移動度分析 (HMA) により行った。変異が認められたものについては、シーケンス解析により変異配列を明らかにした。変異導入が確認された F0 と野生型 (+/+) を交配し、F1 世代を得た。次に、ヘテロ型変異 F1 (+/-) 同士を交配して、F2 世代を作出・育成し、それらの中からホモ型変異 F2 (-/-) を HMA とシーケンス解析により選定した。

(3) 4 種リポタンパク質受容体 (*lr7a*, *lr7b*, *lr8*, *lr13*) の cDNA クローニングと発現解析

メダカ卵巣から PCR 法により 3 種リポタンパク質受容体 (*lr7*, *lr8*, *lr13*) の cDNA をクローニングし、それぞれについてリアルタイム qPCR を確立した。(1) と同様に、メダカ各組織における各 mRNA の発現分布および卵濾胞の発達段階に伴う mRNA 発現量変化を、3 種リポタンパク質受容体のそれぞれについて調べた。

(4) 2 種リポタンパク質受容体 (*lr8* および *lr13*) -KO 魚の作出と表現型解析

(3) の結果から、*lr8* と *lr13* が主要な Vtg 受容体として機能している可能性が示されたことから、この 2 つについて KO 魚の作出を進めた。KO 魚の作出と選抜は (2) と同様の方法で行った。このうち *lr8* については、KO 系統 (*lr8*-KO) の作出に成功したため、種々の表現型解析を実施した。まず、*lr8*-KO 魚と野生型から得られた卵から卵黄タンパク質を抽出し、LC-MS/MS を用いたラベルフリー・ショットガン解析に供して、4 種 Vtg (*VtgAa1*, *VtgAa2*, *VtgAb*, *VtgC*) に由来する卵黄タンパク成分の量比を比較した。また、*lr8*-KO 魚と野生型の間で、孵化仔魚の生存率を比較した。

4. 研究成果

(1) 2 種 *lpl* (*lpl1* および *lpl2*) の cDNA クローニングと発現解析

メダカ各組織における 2 種 *lpl* mRNA の発現量を調べた結果、2 種とも脂肪組織においてのみ他の組織に比べて有意に高い発現が認められた。また、調べた全ての組織において、*lpl2* mRNA 発現量は *lpl1* のそれに比べて非常に低かったことから、*Lpl1* が主要な *Lpl* として機能していることが示された。

卵濾胞の発達段階に伴う 2 種 *lpl* mRNA 発現量の変化を解析した結果、2 種とも卵黄形成の進行に伴って発現量が増加し、卵黄形成後期においては発現量の有意な増加が見られた一方、成熟期では有意に減少した。

(2) *lpl1*-KO 魚の作出と表現型解析

lpl1 遺伝子に対する複数の gRNA 候補を設計して検討した結果、フレームシフトを伴う変異導入に有効な gRNA の組み合わせが見出された。それらの gRNA を用いた CRISPER/Cas9 システムにより、メダカゲノム上の *lpl1* 遺伝子への変異導入 F0 を作出した。これらと野生型の交配で得られた F1 から、*lpl1* 遺伝子のフレームシフトを伴うヘテロ接合型変異導入個体 (-/+) を選抜し、さらにそれらを交配することにより、ホモ接合型変異導入個体 (-/-) を含む F2 の作出および遺伝子型の決定までを完了した。しかし、それらの表現型解析までには至らなかった。

(3) 4 種リポタンパク質受容体 (*lr7a*, *lr7b*, *lr8*, *lr13*) の cDNA クローニングと発現解析

メダカ各組織における 4 種リポタンパク質受容体 mRNA の発現分布を調べた。2 種 *lr7* について、*lr7a* においては肝臓において有意な高発現が見られた。一方、*lr7b* は腸や鰓で他の組織に比べ高い発現が認められたが、その発現量は *lr7a* に比べて非常に低く、*lr7a* が主要な *Lr7* として機能していることが示唆された。また両 *lr7* mRNA とともに卵巣における特異的な高発現は見られなかった。*lr8* mRNA と *lr13* mRNA においては、卵巣に特異的な高発現が認められ、これら 2 種が Vtg 受容体として主に機能していることが示唆された。

卵濾胞の発達段階に伴う *lr8* mRNA および *lr13* mRNA の発現量の変化を解析した結果、2 種ともに前卵黄形成期に発現のピークが見られ、卵黄形成の進行とともに発現量が減少する傾向が認められた。

(4) 2 種リポタンパク質受容体 (*lr8* および *lr13*)-KO 魚の作出と表現型解析

lr8 および *lr13* 遺伝子のそれぞれに対する複数の gRNA 候補を設計して検討した結果、変異導入に有効な gRNA の組み合わせが見出された。それらの gRNA を用いた CRISPER/Cas9 システムにより、メダカゲノム上の両遺伝子への変異導入 F0 をそれぞれ作出した。*lr13* 遺伝子については、フレームシフトを伴う変異導入個体の作出には至らなかった。*lr8* については、フレームシフトを伴う *lr8* 遺伝子のホモ接合型変異導入系統 (-/-) である *lr8*-KO の作出に成功し、種々の表現型解析を実施した。その結果、*lr8*-KO 系統メダカの孵化仔魚の生残率が野生型のそれよりも低下することが示された。さらに *lr8*-KO 系統メダカにおいては、4 種の Vtg (VtgAa1、VtgAa2、VtgAb、VtgC) のうち、VtgAb 由来の卵黄タンパク成分が野生型と比べて相対的に低下していた。このことから、*Lr8* が VtgAb タイプの主要な受容体として機能していることが明らかとなった。

以上、本研究は、魚類の卵成長や胚発生、仔稚魚の成長に必要な不可欠な魚類の卵黄形成機構について、中性脂質 (油球) と卵黄タンパク質 (卵黄球) の双方の蓄積機構を解析し、種々の重要な知見を得た。それらの中でも、ゲノム編集技術を用いて、種々の卵黄形成関連因子の機能を直接的に解析する基盤を確立し、特にリポタンパク質受容体の 1 種 (*Lr8*) について、卵黄タンパク質の取り込みにおける機能を脊椎動物で初めて明らかにできた点は、学術的意義が極めて高く、特筆すべき成果である。本研究で得られた成果は、脂質やタンパク質の卵内への蓄積を人為的に制御できる技術の開発に繋がるものであり、これまでになかった画期的な卵質改善法の開発が可能となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Nangung Jin, Mizuta Hiroko, Yamaguchi Yo, Nagata Jun, Todo Takashi, Yilmaz Ozlem, Hiramatsu Naoshi	4. 巻 257
2. 論文標題 Knock out of a major vitellogenin receptor gene with eight ligand binding repeats in medaka (<i>Oryzias latipes</i>) using the CRISPR/Cas9 system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology	6. 最初と最後の頁 110967 ~ 110967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpa.2021.110967	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 Nagata Jun, Mushirobira Yuji, Nishimiya Osamu, Yamaguchi You, Fujita Toshiaki, Hiramatsu Naoshi, Hara Akihiko, Todo Takashi	4. 巻 310
2. 論文標題 Hepatic estrogen-responsive genes relating to oogenesis in cutthroat trout (<i>Oncorhynchus clarki</i>): The transcriptional induction in primary cultured hepatocytes and the in vitro promoter transactivation in responses to estradiol-17	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 113812 ~ 113812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2021.113812	査読の有無 無
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0件

〔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
研究 分担者	平松 尚志 (Hiramatsu Naoshi) (10443920)	北海道大学・水産科学研究院・准教授 (10101)	

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
---------	---------