

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19276

研究課題名（和文）脊椎動物の胚における卵黄代謝機構の進化

研究課題名（英文）The evolution of yolk metabolism in vertebrate embryos

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：卵生動物の多くは、卵黄の栄養のみをもっぱら使用して発生しなければならない。しかし、多くの動物の卵黄には、糖質、とりわけ最も重要な単糖であるグルコースがほとんど含まれていない。本研究では、様々な分類群にまたがる卵生脊椎動物を用いて、これらの胚がどのようにグルコースを得ているかを調べた。その結果、コチヨウザメおよびネッタイツメガエルにおいては内胚葉で、トラザメは卵黄多核層様組織で、それぞれ糖新生を行っていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、発生過程で生じる様々な形態が進化の過程でどのように変化してきたか、という点について多くの比較研究が行われている。一方で、代謝などの目に見えない現象に着目し、その機能を担う組織の進化について検討した研究は少ない。本研究では、様々な卵生脊椎動物を比較、検討した結果より、彼らの多くが発生過程において糖新生によりグルコースを得ているであろう、という事が示唆された。また、進化の過程で生じた発生様式の変化に対応するように、糖新生を起こす組織は系統により様々に異なっていた。これらの結果は、発生過程での糖新生によるグルコースの補給は脊椎動物の発生のごく初期から起こっていることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：Most oviparous animals must develop by consuming the nutrition of the egg yolk. However, the yolks of many animals contain very little carbohydrate, especially glucose, the most important monosaccharide. In this study, we investigated how these embryos obtain glucose using oviparous animals of several vertebrate taxa. The results showed that gluconeogenesis occurs in the endodermis of the sterlet and the clawed frog, and in the yolk syncytial layer-like tissue of the cloudy catshark.

研究分野：魚類生理学

キーワード：グルコース 糖新生 脊椎動物 発生 進化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々が普段目にする多くの魚類は「真骨魚類」に属する。この分類群は発生過程で「盤割」と呼ばれる卵割様式を呈し、その過程で胚盤葉の一部が卵黄表層の細胞質と融合して「卵黄多核層」を形成する。本研究の開始時点では、我々の研究グループにおいて「真骨魚類ゼブラフィッシュの卵黄多核層が糖新生を行う」ということが明らかになりつつあるタイミングであった。真骨魚類も、私たち哺乳類と同様に、成体になると肝臓や腎臓で糖新生を行うことが知られている。しかし、発生過程ではこれらの臓器が存在しない時期があり、発生に必要なグルコースを得る他の手段が必要であると考えられる。その空白の時間を支えるために卵黄多核層が糖新生をしているものとみられた。

しかし、同じ脊椎動物に属する他の分類群、すなわち、真骨魚類に属さない魚類(例: チョウザメ)や、両生類(カエル)などの四肢動物、さらに軟骨魚類(サメ)においては、発生過程で見られる真骨魚類のような肝臓や腎臓以外での糖新生の有無は不明であった。また先述の通り、真骨魚類は発生過程で卵黄多核層を持つが、カエルやチョウザメにはこれが無い。一部のサメには「卵黄多核層様組織」が認められているが、その機能は不明な点が多かった。更に、鳥類でもごくわずかに卵黄多核層の存在が報告されているが、やはりその機能等の詳細な点は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、真骨魚類ゼブラフィッシュの卵黄多核層で見つかった糖新生が、真骨魚類に特有な現象なのか、それとも他の分類群においても(形を変えながら)保存されているのかを明らかにすることを目的とした。これを達成するために、(1)コチョウザメ、(2)ネツタイツメガエル、(3)ウズラ、および(4)トラザメを用いて、発生過程の糖新生を比較検討することで、脊椎動物の進化の過程で生じた卵黄代謝の変遷を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

様々な発生段階のコチョウザメ、ネツタイツメガエル、ウズラ、およびトラザメから代謝物を抽出し、液体クロマトグラフー質量分析(LC-MS)に供し、代謝物の分析を行った。また、同様のサンプルから全RNAを抽出して逆転写し、得られたcDNAを元に糖新生やグリコーゲン代謝に関連する遺伝子発現の時空間的な変動をリアルタイムPCRおよびin situ hybridizationにより検討した。トラザメおよびネツタイツメガエルにおいては、安定同位体炭素 ^{13}C 標識代謝物をトレーサーとして導入して培養し、その後のサンプルから代謝物を抽出してLC-MSに供することで、実際の糖新生活性の検出を試みた。また、研究の途中でカワヤツメおよびクサフグのサンプルが入手可能となったため、これらのサンプルも併用し、より幅広い生物種を対象に比較検討を行った。

4. 研究成果

- (1) コチョウザメにおいては、発生過程で孵化前におけるグルコースの増加が検出された。また、この時に糖新生に関与する複数の酵素の遺伝子発現も検出された。In situ hybridizationの結果、これらの遺伝子は内胚葉に発現していることが明らかとなった。
- (2) ネツタイツメガエルにおいては、孵化後にグルコースの増加が確認された。このとき、グリコーゲンも同様に増加していたことから、少なくとも糖新生が行われていることが想定された。遺伝子発現解析の結果、やはり糖新生関連遺伝子が発現しており、コチョウザメと同様に内胚葉組織での発現が観察された。一方で、表皮における糖新生関連遺伝子の発現も顕著であった。表皮での発現の意義については現在も調査中である。次に、ツメガエル幼生を麻酔後、剪断し、 ^{13}C 標識代謝物を含む複数の異なる培養液に入れ、3時間の培養を行った。その結果、 ^{13}C 標識グリセロールまたは ^{13}C 標識乳酸の存在下で培養したサンプルにおいて ^{13}C 標識グルコースが検出された。これらの結果から、ネツタイツメガエルの幼生は糖新生を行う事が明らかとなり、この糖新生は内胚葉および表皮の両方で行われていることが示唆された。
- (3) ウズラを用いた研究は、発生過程で糖新生関連遺伝子が発現することを確認した段階である。今後も継続する予定である。
- (4) トラザメの発生過程は近縁種であるイヌザメの発生ステージをもとに判断し、サンプリング等を行った。トラザメでは31期以降で成体での主要な糖新生器官である肝臓が発生するが、それより前の27期においてグルコースが増加していることが明らかとなった。また、この

グルコースの増加は卵黄嚢で見つかった。そこで、胚体および卵黄嚢における糖新生関連遺伝子群の発現を検討した。その結果、やはり 31 期までのサンプルで卵黄嚢におけるこれらの遺伝子発現が確認された。In situ hybridization の結果、卵黄多核層様組織においてこれらの遺伝子が発現しており(図1) その後、発生が進むとともに新たに形成された内胚葉層にも発現が検出された。実際の糖新生活性を検出するために、¹³C 標識代謝物を使用して卵黄嚢を包む膜(卵黄多核層様組織や内胚葉層を含む)を培養したところ、グリセロールやアラニンをもとにグルコースが合成されていることが明らかとなった。これらの結果から、トラザメの発生過程においてもやはり糖新生が起こっており、またこれが卵黄多核層様組織や内胚葉層によるものであることが分かった。



図1. In situ hybridization によりトラザメ卵黄多核層様組織(YSL-L)における糖新生関連遺伝子の発現が明らかになった。スケールバーは 50 μm。

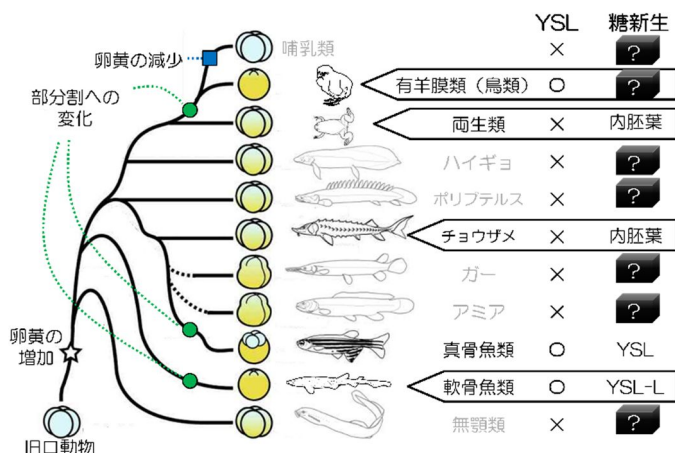
カワヤツメにおいては、現在、予備的なデータを集めている段階である。しかし、やはり孵化のタイミングに合わせてグルコースが増加する現象が確認されており、糖新生の存在が疑われている。

ゼブラフィッシュと同じ真骨魚類に属するクサフグにおいて、「真骨魚類の卵黄多核層における糖新生は保存されているのか否か」を検討した。その結果、クサフグの場合、ゼブラフィッシュではグルコースが増加したタイミングで、グリコーゲンのみが増加することが分かった。一方で、孵化と同時期にグルコースが増加し、同時にグリコーゲンも再度増加することが分かった。糖新生やグリコーゲン代謝に関する遺伝子発現を確認したところ、最初のグリコーゲン合成のタイミングで糖新生関連遺伝子が卵黄多核層で発現しており、孵化期においては卵黄多核層と肝臓の両方が糖新生関連遺伝子を発現していた。これらの結果から、クサフグにおいては卵黄多核層と肝臓の両方が糖新生に寄与していることが考えられる。

研究開始当初は、発生過程で肝臓や腎臓以外の組織を使って糖新生を行うのは真骨魚類に特有である可能性を考えていたが、結果として調べた全ての分類群において類似の現象が確認された。生体で糖新生を担う肝臓は内胚葉由来の組織であることから、肝臓が発達する以前において内胚葉が肝臓の働きを代行に行う事は、ある意味で当然のように思われる。内胚葉組織等を用いた糖新生は発生過程のグルコース補給手段として進化のごく初期から存在しており、発生様式の変化とともに、形を変えながら現在まで保存されている現象なのかもしれない。

一方で、ネツタイツメガエルでは表皮において糖新生関連遺伝子の多くが発現していた。また、トラザメにおいては卵黄多核層様組織が糖新生を行い、ゼブラフィッシュやクサフグの卵黄多核層との機能的な類似性を呈した。トラザメを含む板鰓類における卵黄多核層様組織の形成過程は不明な点が多く、真骨魚類や鳥類で報告がある卵黄多核層との関係は不明である。こうした点は非常に興味深く、研究期間内で完了できなかったウズラやカワヤツメの調査と並行して、今後も研究を継続する予定である。

図2. 本研究を通して明らかになった、脊椎動物の様々な系統における卵黄多核層(YSL)、卵黄多核層様組織(YSL-L) および内胚葉での糖新生。ウズラおよびカワヤツメでの調査は継続する予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Furukawa Fumiya, Aoyagi Akihiro, Sano Kaori, Sameshima Keita, Goto Miku, Tseng Yung-Che, Ikeda Daisuke, Lin Ching-Chun, Uchida Katsuhisa, Okumura Sei-ichi, Yasumoto Ko, Jimbo Mitsuru, Hwang Pung-Pung	4. 巻 3
2. 論文標題 Gluconeogenesis in the extraembryonic yolk syncytial layer of the zebrafish embryo	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 pgae125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pnasnexus/pgae125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kodama Takafumi, Watanabe Seiya, Kayanuma Isana, Sasaki Akira, Kurokawa Daisuke, Baba Otto, Jimbo Mitsuru, Furukawa Fumiya	4. 巻 295
2. 論文標題 Gluconeogenesis during development of the grass puffer (Takifugu niphobles)	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology	6. 最初と最後の頁 111663 ~ 111663
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cbpa.2024.111663	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 -

1. 著者名 Marino Shimizu, Wataru Takagi, Yuki Sakai, Isana Kayanuma, Fumiya Furukawa	4. 巻 12
2. 論文標題 Gluconeogenesis in the yolk syncytial layer-like tissue of cloudy catshark (Scyliorhinus torazame)	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e16088
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.16088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Fumiya Furukawa, Akihiro Aoyagi, Kaori Sano, Keita Sameshima, Miku Goto, Yung-Che Tseng, Daisuke Ikeda, Ching-Chun Lin, Katsuhisa Uchida, Sei-ichi Okumura, Ko Yasumoto, Mitsuru Jimbo, Pung-Pung Hwang
2. 発表標題 Gluconeogenesis in the extraembryonic yolk syncytial layer of the zebrafish embryo
3. 学会等名 International Symposium on Aquatic Animal Physiology（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fumiya Furukawa, Akihiro Aoyagi, Kaori Sano, Keita Sameshima, Miku Goto, Yung-Che Tseng, Daisuke Ikeda, Ching-Chun Lin, Katsuhisa Uchida, Sei-ichi Okumura, Ko Yasumoto, Mitsuru Jimbo, Pung-Pung Hwang
2. 発表標題 Gluconeogenesis in the extraembryonic yolk syncytial layer of the zebrafish embryo
3. 学会等名 15th International Congress on the Biology of Fish (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Marino Shimizu, Wataru Takagi, Isana Kayanuma, Yuki Sakai, Kotaro Tokunaga, Susumu Hyodo, Fumiya Furukawa
2. 発表標題 Expression of gluconeogenic genes in the yolk sac of cloudy catshark
3. 学会等名 International Symposium on Aquatic Animal Physiology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Marino Shimizu, Wataru Takagi, Isana Kayanuma, Yuki Sakai, Kotaro Tokunaga, Susumu Hyodo, Fumiya Furukawa
2. 発表標題 Gluconeogenesis in the YSL-like tissue of cloudy catshark (Scyliorhinus torazame)
3. 学会等名 15th International Congress on the Biology of Fish (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 土田彩果、田村啓、古川史也
2. 発表標題 ネットアイツメガエルの発生過程における代謝の解析
3. 学会等名 第7回ユニーク会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Marino Shimizu, Wataru Takagi, Isana Kayanuma, Yuki Sakai, Kotaro Tokunaga, Susumu Hyodo, Fumiya Furukawa
2. 発表標題 Expression of gluconeogenic genes in the yolk sac of cloudy catshark (<i>Scyliorhinus torazame</i>)
3. 学会等名 International Symposium on Aquatic Animal Physiology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青木一永、土田彩果、田村啓、古川史也
2. 発表標題 ネッタイツメガエルの糖新生と塩類細胞に関する研究
3. 学会等名 第8回ユニーク会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水茉莉乃、高木互、栢沼勇魚、酒井勇氣、徳永幸太郎、兵藤晋、古川史也
2. 発表標題 脊椎動物における卵黄代謝と卵黄多核層の変遷に関する研究
3. 学会等名 第8回ユニーク会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 児玉孝文、渡辺晟也、栢沼勇魚、佐々木麟、黒川大輔、古川史也
2. 発表標題 クサフグ胚における糖新生関連遺伝子の発現
3. 学会等名 令和6年度 日本水産学会大会春季大会
4. 発表年 2024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
研究 分担 者	高木 互 (Takagi Wataru) (90755307)	東京大学・大気海洋研究所・助教 (12601)	

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