

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 9 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580434

研究課題名(和文) 孵化前後のニワトリ肝臓におけるエネルギー源脂質変換機構の解明

研究課題名(英文) Studies on the switching mechanism for energy source lipid in the chicken liver around hatching

研究代表者

田中 実 (Tanaka, Minoru)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・教授

研究者番号：90024736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリ肝臓において、コレステロールアシル転移酵素mRNAの発現が孵化前に高く孵化後には減少し、リソソーム酸性リパーゼのmRNAの発現は孵化後一過性に増加することを明らかにした。また、腸管における胆汁酸トランスポーターmRNAの発現、肝臓におけるニューロテンシン受容体およびアセトアセチルCoAチオラーゼ-2のmRNAの発現が孵化後に増加すること、さらにプロラクチン受容体mRNAの発現が孵化前に高く孵化後に減少することを明らかにした。以上の知見により、これらの酵素およびホルモンが肝臓のコレステロールエステルから外餌への、孵化に伴うエネルギー源の変換に働いていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the chicken liver, expression of cholesterol acyltransferase mRNA decreased after the hatching, whereas expression level of mRNA of the lysosomal acid lipase temporarily increased after the hatching. In the intestinal tract, expression level of bile acid transporter mRNA markedly increased after the hatching. In the liver, neurotensin receptor and acetoacetyl-CoA thiolase-2 increased after the hatching. Expression level of prolactin receptor mRNA was high before the hatching and decreased after the hatching. It was suggested that these enzymes and hormones are involved in the conversion of the energy source from the cholesterol ester in the liver to the external diet after the hatching.

研究分野：エネルギー代謝

キーワード：脂質代謝 ニワトリ肝臓 コレステロールエステル 胆汁酸輸送 コレステロール合成 ニューロテンシン受容体 プロラクチン受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) 鳥類のニワトリでは孵化の数日前から孵化後の数日間、脂質に富む卵黄をエネルギー源とするため肝臓にコレステロールエステルが大量に蓄積しているが、孵化後の外餌の摂取とともに減少していく。哺乳類の肝臓でのコレステロールエステルの合成は Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) により、分解は Lysosomal acid lipase (LAL) により触媒されることが知られている。ヒトにおいて、LAL 遺伝子の変異は肝臓へのコレステロールエステル蓄積症であるウォルマン病の原因として知られる。一方、孵化前後のニワトリ肝臓におけるコレステロールエステルの蓄積と消失は卵黄から外餌へのエネルギー源の変換に対応した生理的現象である。しかしこの変換過程に働く酵素および調節因子は不明である。その原因は孵化前後の肝臓におけるポリリソソームへのコレステロールエステルの大量蓄積により酵素等のタンパク質の精製が困難であることによる。そこで我々は、近年明らかにされたニワトリのゲノム配列からのリバースジェネティクスにより ACAT-1 と LAL の部分配列をゲノム配列中に見だし、その配列を基にして両酵素の cDNA をクローニングし、全アミノ酸配列を明らかにした。ニワトリの ACAT-1 と LAL のアミノ酸配列はそれぞれ哺乳類の ACAT-1 および LAL の配列と高い相関性があり、また、それぞれの酵素活性に重要とされるモチーフ配列も有していた。したがって、孵化前後のニワトリ肝臓におけるコレステロールエステルの合成と分解に ACAT-1 と LAL が働いていることを強く示唆する知見がすでに得られている。

(2) ニワトリ肝臓における脂質代謝の調節因子として、消化管機能の調節に働くホルモンのニューロテンシンが注目される。ニューロテンシンの分泌は脂肪酸により促進され、脂質の消化管からの吸収促進に働く他、肝臓におけるトリグリセリド合成および胆汁酸分泌の促進にも働くことが知られている。孵化前後のニワトリ肝臓に蓄積したコレステロールエステルの加水分解によりコレステロールと脂肪酸が生じる。コレステロールからは胆汁酸が合成され、胆汁酸は胆管を経て消化管で分泌され脂質の消化吸収に働き、小腸で吸収され肝臓に戻る。一方、脂肪酸はエネルギー源として代謝されるとともに、孵化後の外餌の摂取により亢進するリポゲネシスによるトリグリセリド合成にも利用される。したがって、ニューロテンシンが孵化前後の肝臓に蓄積したコレステロールエステルの分解により生じたコレステロールからの胆汁酸の合成と脂肪酸からのトリグリセリド合成の調節に関与していることが強く示唆される。

2. 研究の目的

本研究は孵化前後のニワトリの肝臓におけるコレステロールエステルの合成と分解およびトリグリセリド合成に働く酵素および調節因子の解明を行い、コレステロールエステルから外餌へのエネルギー源変換の分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 孵化前後のニワトリ肝臓における ACAT-1 と LAL の mRNA の発現量の定量：孵化前後のニワトリ肝臓より常法により RNA を抽出し、逆転写反応で cDNA に変換後 ACAT-1 と LAL の cDNA の生成量すなわち mRNA 量をリアルタイム PCR により定量する。

(2) ニワトリの胆汁酸輸送タンパク質 (Apical sodium-dependent bile acid transporter: ASBT) の cDNA の PCR による増幅と孵化前後のニワトリ消化管における mRNA の発現量の定量：ニワトリの回腸より RNA を抽出し、逆転写反応で cDNA に変換後、GenBank の ASBT 予想配列を基に作成したプライマーを用いて PCR を行い ASBT の cDNA を増幅し、コードするアミノ酸配列の解析を行なう。ついでリアルタイム PCR により、ASBT mRNA の組織分布および腸管における孵化前後の発現量の変動を調べる。

(3) ニワトリニューロテンシン前駆体 cDNA の PCR による増幅と孵化前後のニワトリ消化管における mRNA の定量および肝臓におけるニューロテンシン受容体 mRNA の定量：ニワトリの十二指腸より RNA を抽出し、逆転写反応で cDNA に変換後、GenBank のニューロテンシン前駆体予想配列を基に作成したプライマーを用いて PCR を行い cDNA を増幅し、コードするアミノ酸配列の解析を行なう。ついでリアルタイム PCR により、ニューロテンシン前駆体 mRNA の腸管における孵化前後の発現量の変動と肝臓におけるニューロテンシン受容体 mRNA の孵化前後の発現量の変動を調べる。

(4) コレステロール合成経路の第一段階の反応を触媒するアセトアセチル CoA チオラーゼ 2 の mRNA およびタンパク質の孵化前後のニワトリ肝臓における発現量の定量：ニワトリの肝臓より RNA を抽出し、逆転写反応で cDNA に変換後、GenBank のニワトリアセトアセチル CoA チオラーゼ 2 の予想配列を基に作成したプライマーを用いて PCR を行い cDNA を増幅し、コードするアミノ酸配列の解析を行なう。さらにその部分アミノ酸配列を有するペプチドを化学合成し、ウサギに免疫して特異抗体を作成する。ついで孵化前後の肝臓における mRNA の発現量をリアルタイム PCR で、また、タンパク質の発現変動を作成した抗体を用いたウエスタンブロット法により調べる。

(5) 孵化前後のニワトリ肝臓および脳下垂体におけるプロラクチン受容体 mRNA の発現量の定量：ニワトリの肝臓および脳下垂体より RNA を抽出し、逆転写反応で cDNA に変換後、すでに明らかにしているニワトリのプロラクチン受容体 cDNA の配列を基に作成したプライマーを用いたリアルタイム PCR により、孵化前後のニワトリ肝臓および脳下垂体におけるプロラクチン受容体 mRNA の発現量の定量を行なう。

4. 研究成果

(1) 孵化前後のニワトリ肝臓における ACAT-1 と LAL の mRNA の発現動態を解析した。ACAT-1 遺伝子の発現は孵化の7日目前から孵化後 5 日目まで高くその後減少していった。一方、LAL の発現は孵化の7日前から孵化後 1 日目までは定常レベルで推移し、孵化後 3 日目から 10 日目まで増加し、14 日目に定常レベルに戻った。これらの知見は孵化前後のニワトリ肝臓におけるコレステロールエステルの合成と分解にはそれぞれ ACAT-1 と LAL が関与していることを示唆するものである。今後、両酵素の酵素活性レベルでの解析が望まれる。

(2) ニワトリ ASBT の cDNA を PCR により増幅し、コードするアミノ酸配列を明らかにした。ニワトリの ASBT は 360 アミノ酸よりなり、その配列は哺乳類の配列と 70% 以上の相同性を有し、7 回膜貫通型の立体構造を取ることが推定された。mRNA の組織分布を調べたところ、回腸および結直腸前部で特異的に多く存在しており、両部位ともに孵化後 1 日目から検出され、7 日目まで増加し、以後成体のレベルに減少していった。こうした発現変動パターンより、ASBT が、孵化前後の肝臓においてコレステロールエステルの分解により生成した遊離コレステロールから合成された胆汁酸の腸への輸送に働いていることが支持された。

(3) ニワトリニューロテンシン前駆体の cDNA を PCR により増幅し、コードされている前駆体タンパク質のアミノ酸配列を明らかにした。前駆体タンパク質の C-末端部に 13 アミノ酸からなるニューロテンシンと 6 アミノ酸からなるニューロテンシン類似ペプチド (LANT6) の配列が存在した。LANT6 の C-末端部の 4 アミノ酸の配列はニューロテンシンの C-末端部の配列と同じであった。さらにニワトリ腸管 (十二指腸、空腸、回腸、結直腸) におけるニューロテンシン前駆体 mRNA の発現動態を調べたところ、いずれの部位においても孵化前後に発現が増加した。また、肝臓におけるニューロテンシン受容体 mRNA の発現が孵化後 3 日目から 5 日目に増加し以後減少していくことが明らかになった。すなわち、消化管で産生分泌されたニューロテンシンが孵化後の肝臓のニューロテンシン受容

体に作用し、脂質および糖質の代謝調節に関与していることを示唆する知見が得られた。今後、ニワトリ肝細胞におけるニューロテンシン受容体を介する作用機構の解明が望まれる。

(4) DNA データベース (GenBank) に見いだされたニワトリのアセトアセチル CoA チオラーゼ 2 の cDNA にコードされているアミノ酸配列を哺乳類のアセトアセチル CoA チオラーゼ 2 のアミノ酸配列と比較解析し、アセトアセチル CoA チオラーゼ活性に必要なアミノ酸残基がニワトリのアセトアセチル CoA チオラーゼ 2 にも保存されていることを明らかにした。ついで塩基配列より PCR プライマーを、また、アミノ酸配列から特異抗体を作成し、mRNA およびタンパク質の組織分布と発現動態を調べた。その結果、成鶏において mRNA およびタンパク質ともに肝臓、腎臓、副腎に多く存在し、肝臓における発現は孵化後に増大した。したがって孵化後の肝臓においては、蓄積したコレステロールエステルの加水分解によるコレステロールの産生から、アセトアセチル CoA チオラーゼ 2 によるアセチル CoA からのコレステロール合成への変換が生じることを示す知見が得られた。

(5) 肝臓において胆汁酸輸送の増強作用を有する脳下垂体ホルモンのプロラクチンの分泌が孵化前に増大し孵化後には減少する。そこで、肝臓におけるプロラクチン受容体遺伝子の孵化前後の発現変動を調べたところ、孵化前に高く孵化後に減少した。したがって、孵化前の肝臓においてコレステロールエステルの分解により生成したコレステロールから合成された胆汁酸の輸送をプロラクチンが促進していることが示唆された。また、脳下垂体においてもプロラクチン受容体遺伝子の発現が孵化前に高く孵化後に減少したことから、プロラクチンの脳下垂体での産生はプロラクチン受容体を介したプロラクチンのオートクライン作用により調節されていることが示唆された。すなわち、プロラクチンも孵化前後のニワトリ肝臓におけるエネルギー源脂質の変換に関与していると考えられた。

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)

Minoru Tanaka, Nobuhiro Nakao, Ichiro Yamamoto, Nobumichi Tsushima, Yoshiyuki Ohta. Changes in expression levels of neurotensin precursor and receptor mRNA in chicken intestinal tissues and liver during late embryonic and posthatching development, *Poultry Science*, 92, 2013, 2765-2771, DOI:10.3382/ps.2012-02939. 査

読有り

Nobuhiro Nakao, Hiromi Kaneda, Nobumichi Tsushima, Yoshiyuki Ohta, Minoru Tanaka. Characterization of primary structure and tissue expression profile of the chicken apical sodium-dependent bile acid transporter mRNA, Poultry Science, 94, 2015, 722-727, DOI:10.3382/ps/pev027. 査読有り

〔学会発表〕(計3件)

西田匡宏、中尾暢宏、對馬宣道、田中実. ニワトリのコレステロールエステル合成および分解酵素の構造と孵化前後の組織における発現変動. 日本家禽学会 2013 年度春期大会 2013 年 3 月 29 日 広島県・広島市

中尾暢宏、對馬宣道、田中実. ニワトリ腸管における胆汁酸輸送タンパク質遺伝子 SLC10A2 の構造と発育に伴う発現変動. 日本家禽学会 2014 年度春期大会 2014 年 3 月 29 日 茨城県・つくば市

Hiromi Kaneda, Masahiro Nishita, Nobuhiro Nakao, Minoru Tanaka. Pituitary-specific transcription of chicken prolactin receptor gene. 27th Congress of European Comparative Endocrinologist. 2014 年 9 月 25-29 日、レンヌ(フランス)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 実

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・教授

研究者番号： 90024736

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

太田能之

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・教授

研究者番号： 00277667

中尾暢宏

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・講師

研究者番号： 60377794