

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450280

研究課題名(和文) 魚類の卵母細胞における油球形成機構の解明

研究課題名(英文) Studies on mechanisms underlying formation of lipid droplets in oocytes of teleost fishes

研究代表者

東藤 孝 (Todo, Takashi)

北海道大学・水産科学研究院・准教授

研究者番号：60303111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の卵母細胞における油球形成機構については、これまでの我々の研究により、油球となる脂質の供給源が血液中の超低密度リポタンパク(VLDL)であることが明らかとなり、さらにVLDLは卵母細胞外で代謝され、それによって生じた遊離脂肪酸のみが卵母細胞に取り込まれることが示唆されている。本研究では、サケ科魚類やメダカ、ヨウジウオ、ゼブラフィッシュを用いて、卵母細胞における油球形成機構について、主にVLDLの代謝酵素であるリポタンパクリパーゼ(LPL)の役割に着目し、種々の解析を行った。その結果、卵濾胞細胞で発現するLPLの存在が、卵母細胞内での油球形成に必須であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown about the mechanisms underlying formation of lipid droplets in teleost oocytes as follows; plasma very low density lipoprotein is the major carrier of neutral lipids to oocyte lipid droplets, and VLDL is metabolized at the outside of oocyte, then free fatty acids derived from the VLDL metabolism are incorporated into oocyte. In this study, we focused on the role of lipoprotein lipase (LPL), a key enzyme of VLDL metabolism, and analyzed its expression pattern in ovarian follicle using salmonids, medaka, pipefish and zebrafish. As the results, it was suggested that the presence of LPL expressed in ovarian follicle cells is indispensable for the formation of lipid droplets in oocytes.

研究分野：魚類繁殖生理学

キーワード：卵形成 卵母細胞 卵成長 中性脂質 油球 卵濾胞 リポタンパク

1. 研究開始当初の背景

魚類の卵内には胚発生や稚仔魚の発達に必要な不可欠な様々な物質が卵黄として貯蔵される。これらの物質のなかで脂質は、卵黄の主要な構成成分であるタンパク質とともに、胚の重要なエネルギー源となっている。特にサケ科魚類など多くの魚種では、脂質が卵内に油球 (lipid droplet) として多量に蓄積される。様々な魚種における解析から、油球は主にトリアシルグリセロール (TAG) などの中性脂肪から成ることが示されている。しかし、油球の元となる脂質が何に由来し、また油球が卵内でどの様にして形成されるかについては殆ど明らかにされていなかった。

魚卵への中性脂肪の供給源としては、脂質運搬タンパクであるリポタンパクが考えられ、その中でも特に超低密度リポタンパク (VLDL) が有力な候補としてみなされてきた。そこで我々は、魚類の卵母細胞における油球形成機構として、VLDL を起点とした次のようなモデルを予想した。1) VLDL が卵母細胞外でリポタンパクリパーゼ (LPL) によって代謝され、それによって生じた遊離脂肪酸 (FA) が卵母細胞膜上の脂肪酸輸送体 (FATP) によって細胞内に取り込まれる。2) VLDL が卵母細胞膜上に存在するリポタンパク受容体 (LR) を介したエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、細胞内で VLDL 中の TAG が FA に分解される。1) と 2) のいずれにおいても、FA は脂肪酸結合タンパク (FABP) によって細胞内小器官に運ばれて中性脂肪に再構成され、油球として蓄積される。そして、我々は、これら 1) と 2) のいずれか、または双方の機構によって卵母細胞内に油球が形成されるのかについて、サケ科魚類のカットスロートトラウト (*Oncorhynchus clarki*) を実験魚に用いて研究を開始した。

その結果、卵母細胞における油球の主要な供給源が VLDL であることが初めて証明されるとともに、VLDL は卵母細胞外で代謝され、そこで生じた脂肪酸が卵内に取り込まれて油球として蓄積されることが明らかとなった。また、代謝された VLDL のタンパク成分は卵内に取り込まれずに、卵母細胞外に留まることも示された。これらの結果をもとに、我々はサケ科魚類の卵母細胞における油球形成機構について次の様なモデルを提唱した (図 1)。すなわち、VLDL の主要な経路は上述の 1) であり、VLDL は主に卵濾胞組織中の顆粒膜細胞で代謝される。しかし、卵母細胞内にも弱いながら LPL が発現していること、さらに VLDL の受容体として機能すると考えられる複数の LR が卵母細胞膜上に発現していることなどから、上述の 2) の経路の存在も完全には否定できない。またこれらの機構に関わる各因子の機能は未だ不明であ

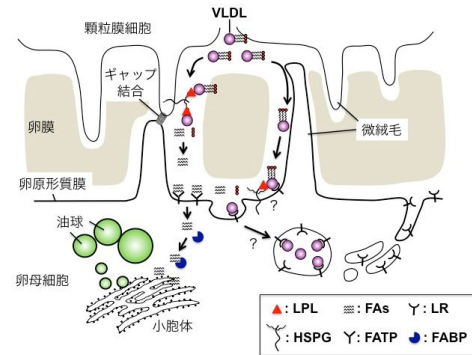


図 1. 魚類の卵母細胞における油球形成機構のモデル
 我々はサケ科魚類以外にメダカ (*Oryzias latipes*) とヨウジウオ (*Syngnathus schlegeli*) においても、VLDL 由来の脂質が卵内の油球に蓄積されることを示したが、これらの魚種における油球形成関連因子の発現部位や機能は未解析である。また、これまでの結果から、VLDL を起点とした卵母細胞内の油球形成機構において、LPL が第一義的な因子であることが示唆されている。一般に LPL はヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) を介して細胞膜上に存在すると考えられるが、卵濾胞中における LPL の存在様式は不明である。さらに、コイ科魚類など卵内に油球を形成しない魚種も多く知られており、それらの魚種においても VLDL は血中に多く存在する。従って、それらの魚種では、卵濾胞中に LPL が存在しないために、卵濾胞での VLDL 代謝が起こらず、その結果として卵内で油球が形成されないものと考えられる。このことが証明されれば、卵内での油球形成における LPL 作用の重要性を間接的にはあるが示すことができる。以上の背景を基に、本研究ではこれまでの研究をさらに発展させることで、魚類の卵母細胞における油球形成の分子機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、未だ未解明な点が多く残されている、魚類の卵母細胞における油球形成機構を明らかにすることを目的に、引き続きサケ科魚類のカットスロートトラウトを主要なモデルとするとともに、メダカやヨウジウオ、そして卵内に油球を形成しない魚種のモデルとしてコイ科魚類のゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用い、以下の項目について検討した。

(1) カットスロートトラウト卵濾胞培養系における VLDL から卵母細胞への脂質取り込みに及ぼす各種 LR 抗体の影響解析。

(2) カットスロートトラウト卵巣における VLDL 受容体の存在のリガンドプロット法による検証。

(3) カットスロートトラウト 2 種 LPL (LPL1 と LPL2) に対する特異抗体の作製とそれら抗体を用いた卵濾胞における LPL の検出。

(4) メダカ卵濾胞における 2 種 *lpl* mRNA の発現解析。

(5) ゼブラフィッシュ卵濾胞における 2 種 *lpl* mRNA の発現解析。

(6) ヨウジウオにおける油球形成関連因子の網羅的遺伝子解析とそれらの卵濾胞における発現解析。

3. 研究の方法

(1) カットスロートトラウト卵濾胞培養系における VLDL から卵母細胞への脂質取り込みに及ぼす各種 LR 抗体の影響解析

油球期もしくは卵黄形成初期のカットスロートトラウト卵巣から卵濾胞を単離し、それらを 24 well のカルチャープレートに分配して、L-15 を基本とした培養液(500 μ l) 中で 15°C にて培養した。緑色蛍光標識された脂肪酸 (BODIPY FL C16) により標識した VLDL と、VLDL 受容体 (VLDLR)、低密度リポタンパク受容体 (LDLR)、LR 関連タンパク 13 (LR13) のそれぞれに対する特異抗体 (a-VLDLR、a-LDLR、a-LR13) を培養液に添加し、24 または 48 時間後に卵濾胞中の蛍光量をマルチラベルカウンターで測定するとともに、卵濾胞の凍結切片を作製して共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

(2) カットスロートトラウト卵巣における VLDL 受容体の存在のリガンドプロット法による検証

カットスロートトラウト雄の血漿から、段階的超遠心法により各種リポタンパク (VLDL、低密度リポタンパク: LDL、高密度リポタンパク: HDL) を精製した。また成熟雌の血清から卵黄前駆タンパクであるピテロジェニン (VtgAs) を、卵抽出液からもう一種の Vtg に由来する卵黄タンパク (YpC) をそれぞれ精製した。精製された各リポタンパク、VtgAs、YpC をジコキシゲニン (DIG) で標識した。卵黄形成期のカットスロートトラウト卵巣から調製した膜抽出画分を SDS-PAGE による電気泳動後、ゲルをナイロン膜に転写し、各標識タンパクを用いたリガンドプロットに供した。プロット後の膜上における DIG の検出は、抗 DIG 抗体を用いたウェスタンブロット法により行った。

(3) カットスロートトラウト 2 種 LPL

(LPL1 と LPL2) に対する特異抗体の作製とそれら抗体を用いた卵濾胞における LPL の検出

2 種 LPL のそれぞれに特異的なアミノ酸配列部分を選択し、大腸菌発現系を用いてそれらの組換えタンパクを作製した。それぞれの組換えタンパクを家兔に免疫し、特異抗体 (a-LPL1 と a-LPL2) を得た。これらの抗体を用いて、卵巣抽出物に対するウエスタンブロットならびに卵巣組織切片に対する免疫組織学的観察を行い、卵濾胞における 2 種 LPL の検出を試みた。

(4) メダカ卵濾胞における 2 種 *lpl* mRNA の発現解析

メダカ卵巣から 2 種 *lpl* (*lpl1* と *lpl2*) cDNA をクローニングし、それらの cDNA から DIG 標識 cRNA プローブを作製した。それらのプローブを用い、メダカの卵巣と腸の組織切片について *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法により 2 種 *lpl* mRNA の発現を解析した。

(5) ゼブラフィッシュ卵濾胞における 2 種 *lpl* mRNA の発現解析

ゼブラフィッシュ卵巣または腸から 2 種 *lpl* (*lpl1* と *lpl2*) cDNA をクローニングし、それらの cDNA から DIG 標識 cRNA プローブを作製した。それらのプローブを用い、ゼブラフィッシュの卵巣と腸の組織切片について ISH 法により 2 種 *lpl* mRNA の発現を解析した。

(6) ヨウジウオにおける油球形成関連因子の網羅的遺伝子解析とそれらの卵濾胞における発現解析

次世代シーケンサーを用いてヨウジウオ卵巣の EST ライブラリーを構築した。この EST ライブラリーより、卵母細胞における油球形成 (卵濾胞における VLDL 代謝) に関与することが予想される各因子 (LPL、FATP/CD36、FABP) の遺伝子を検索した。得られた遺伝子のうち、2 種 *lpl* (*lpl1* と *lpl2*)、脂肪酸輸送体・受容体である *cd36* ならびに *fr-bpl* について、卵巣から cDNA 断片を得た後、それぞれの cRNA プローブを作製し、ISH 法により卵濾胞での各 mRNA の発現を解析した。

4. 研究成果

(1) カットスロートトラウト卵濾胞培養系における VLDL から卵母細胞への脂質取り込みに及ぼす各種 LR 抗体の影響解析

今回調べた 3 種の抗 LR 抗体のいずれにおいても、卵母細胞への VLDL からの脂質取り込みに対しての顕著な影響は、卵濾胞内の蛍光脂質量と組織学的観察の双方において認められなかった。これらの結果から、

卵母細胞へのVLDLからの脂質取り込みにおいて、LRが関与している可能性は低いことが示唆された。

(2) カットスロートトラウト卵巣におけるVLDL受容体の存在のリガンドプロット法による検証

卵巣の膜抽出画分中において、VLDLとLDL、HDLの3種のリポタンパクについてはいずれも受容体の存在を示す結合タンパクが見られなかった。一方、VtgAsについては、VLDLRとLR13と予想されるタンパクの他に250 kDaの不明なタンパクが、YpCについてはVtgAsと同様な250 kDaのタンパクに加えて150 kDaの不明なタンパクがそれぞれの結合タンパクとして検出された。以上の結果から、卵母細胞膜中において、LRはVtg受容体として機能しており、他のリポタンパクに対する受容体は存在しないことが示唆された。

(3) カットスロートトラウト2種LPL(LPL1とLPL2)に対する特異抗体の作製とそれら抗体を用いた卵濾胞におけるLPLの検出

a-LPL1とa-LPL2ともにそれぞれの組換えタンパクを特異的に認識することが確認された。これらの抗体を用いて、卵巣抽出物に対してウェスタンブロット解析を行ったが、双方とも明瞭な陽性バンドは検出できなかった。この結果から、卵濾胞中のLPL含量は極めて少ないか、もしくはLPLのタンパク分子が抗原性を維持するうえで非常に不安定であることが推察された。一方、卵巣の免疫組織学的解析においては、a-LPL1とa-LPL2ともに卵濾胞細胞中に非常に弱いながらも陽性反応が認められ、2種LPLタンパクが卵濾胞細胞に存在することが確かめられた。

(4) メダカ卵濾胞における2種*lpl* mRNAの発現解析

ISH法による解析の結果、油球期から卵黄形成期の卵濾胞細胞において*lpl1* mRNAの発現が観察されたが、*lpl2* mRNAの発現はいずれのステージの卵濾胞においても認められなかった。また、腸の上皮細胞においては両*lpl* mRNAともに発現していた。これらの結果から、メダカにおいては、サケ科魚類とは異なり、2種LPLのうちLPL1のみが卵母細胞での油球形成に関与していることが示唆された。

(5) ゼブラフィッシュ卵濾胞における2種*lpl* mRNAの発現解析

ISH法による解析の結果、2種*lpl1* mRNAともに卵濾胞での発現は見られなかったが、

腸の上皮細胞においては両*lpl* mRNAともに発現していた。これらの結果から、卵母細胞中に油球を形成しないゼブラフィッシュでは、卵濾胞細胞中でLPLが発現していないことが確かめられ、卵母細胞での油球形成におけるLPLの役割の重要性が示された。

(6) ヨウジウオにおける油球形成関連因子の網羅的遺伝子解析とそれらの卵濾胞における発現解析

卵巣のESTライブラリーから種々の油球形成関連因子の遺伝子情報を取得した。それらの遺伝子のうち、2種*lp*(*lpl1*と*lpl2*)、*cd36*、*sr-bp1*についてISH法により卵巣での発現を解析した結果、*lpl* mRNAについては、サケ科魚類と同様に、2種*lpl*ともに油球期から卵黄形成期にかけての卵濾胞細胞で発現が認められた。一方、*cd36* mRNAの発現は見られず、*sr-bl* mRNAのみで卵母細胞中に発現が確認された。これらの結果から、ヨウジウオにおいても、卵母細胞での油球形成において卵濾胞細胞に発現する2種LPLが重要な役割を担っており、またSR-BIが脂肪酸輸送体・受容体として機能していることが示唆された。

以上の結果から、魚類の卵母細胞における油球形成機構において、VLDLは受容体を介さずに卵母細胞外でLPLによって代謝され、それによって生じた脂肪酸のみが卵母細胞内に取り込まれて油球として蓄積されることが示された。また、この機構においては、卵濾胞細胞におけるLPLの存在とその働きが第一義的な要因であることが強く示唆された。しかし、卵母細胞での油球形成における種々の因子の役割については未だ不明であり、今後明らかにしていく必要がある。

魚類の卵母細胞における油球形成機構については、世界でも他に研究例が殆ど見当たらず、本研究の独壇場である。他の動物種を見渡しても、同様の研究が行われているのはほぼ昆虫類に限られている。また近年、哺乳類では、油球が細胞一般に重要なオルガネラの一つとして認識され、油球形成に関する分子レベルでの解析が進められている。魚類の卵母細胞は、他の一般的な細胞と比べて非常に大きいことから、生化学的解析などの実験的解析に利している。従って、本研究の進展は、魚類のみならず広く基礎生物学上に重要な知見を与えるものと確信される。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計7件)

前林衛・稲岡雄平・吉田達哉・萩原聖士・

西宮攻・筵平裕次・原彰彦・東藤孝・平松尚志、アムールチョウザメ *Acipenser schrenckii* の多型ピテロジェニン遺伝子の cDNA クローニング、水産増殖、査読有、64、2016、63-76

DOI: なし

Mushirobira, Y., Mizuta, H., Luo, W., Todo, T., Hara, A., Reading, B.J., Sullivan, C.V., Hiramatsu, N., Molecular cloning and partial characterization of a low-density lipoprotein receptor-related protein 13 (LRP13) involved in vitellogenin uptake in the cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki*), *Mol. Reprod. Dev.*, 査読有, 82, 2015, 986-1000

DOI: 10.1002/mrd.22579

Hiramatsu, N., Todo, T., Sullivan, C.V., Schilling, J., Reading, B.J., Matsubara, T., Ryu, Y.-W., Mizuta, H., Luo, W., Nishimiya, O., Wu, M., Mushirobira, Y., Hara, A., Ovarian yolk formation in fish: Molecular mechanisms underlying formation of lipid droplets and vitellogenin-derived yolk proteins. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 査読有, 221, 2015, 9-15

DOI: 10.1016/j.ygcen.2015.01.025

Reading, B.J., Hiramatsu, N., Schilling, J., Molloy, K., Glassbrook, N., Mizuta, H., Luo, W., Baltzegar, D.A., Williams, V.N., Todo, T., Hara, A., Sullivan, C.V., Lrp13 is a novel vertebrate lipoprotein receptor that binds vitellogenin in teleost fish, *J. Lipid Res.*, 査読有, 55, 2014, 2287-2295

DOI: 10.1194/jlr.M050286

Wu, M., Nishimiya, O., Kanamori, M., Soyano, K., Todo, T., Hara, A., Hiramatsu, N., Molecular cloning and characterization of the expression profiles of vitellogenin transcripts in the Dojo loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) in response to 17 α -estradiol administration, *Zool. Sci.*, 査読有, 31, 2014, 201-212

DOI: 10.2108/zs130223

Nishimiya, O., Kunihiro, Y., Hiramatsu, N., Inagawa, H., Todo, T., Hara, A., Biochemical and immunochemical characterization of two discrete vitellogenin proteins and their derived lipovitellins in the inshore hagfish (*Eptatretus burger*), *Zool. Sci.*, 査読有, 31, 2014, 251-257

DOI: 10.2108/zs130234

Damsteegt, E.L., Mizuta, H., Ozaki, Y., Hiramatsu, N., Todo, T., Hara, A., Ijiri, S., Adachi, S., Lokman, P.M., Development and partial characterization of an antiserum against apolipoprotein B of the short-finned eel, *Anguilla australis*, *J. Comp. Physiol.*,

査読有, 184B, 2014, 589-599

DOI: 101007/s00460-014-0821-4

〔学会発表〕(計5件)

永田淳・筵平裕次・西宮攻・平松尚志・原彰彦・東藤孝、カッツスロートトラウト雌の肝臓におけるエストラジオール 17 β 応答性遺伝子の生殖周期に伴う発現変化、平成 29 年度日本水産学会春季大会、2017 年 3 月 26 日～3 月 30 日、東京海洋大学品川キャンパス(東京都港区)

筵平裕次・西宮攻・永田淳・東藤孝・原彰彦・平松尚志、カッツスロートトラウト (*Oncorhynchus clarki*) における 2 型ピテロジェニンプロモーターの性状解析、平成 28 年度日本水産学会春季大会、2016 年 3 月 26 日～3 月 30 日、東京海洋大学品川キャンパス(東京都港区)

Hiramatsu, N., Todo, T., Sullivan, C.V., Schilling, J., Reading, B.J., Matsubara, T., Ryu, Y.-W., Mizuta, H., Luo, W., Nishimiya, O., Wu, M., Mushirobira, Y., Yilmaz, O., Hara, A., Ovarian yolk formation in fish: Molecular mechanisms underlying formation of lipid droplets and vitellogenin-derived yolk proteins, 10th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, 2014, May 25-30, Olhao, Portugal

Ryu, Y.-W., Todo, T., Hiramatsu, N., Matsubara, T., Sullivan, C.V., Hara, A., Very low-density lipoprotein is primary carrier of neutral lipids to ooplasm lipid droplets in teleosts, 10th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, 2014, May 25-30, Olhao, Portugal

Mushirobira, Y., Mizuta, H., Luo, W., Todo, T., Hara, A., Reading, B.J., Sullivan, C.V., Hiramatsu, N., Ligand binding properties of ovarian lipoprotein receptors in the cutthroat trout, 10th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, 2014, May 25-30, Olhao, Portugal

〔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

<http://www.geocities.jp/hlaboratory/top.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

東藤 孝 (TODO Takashi)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授
研究者番号：60303111

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
原 彰彦 (HARA Akihiko)
北海道大学・大学院水産科学研究院・名誉教授
研究者番号：40091483

平松 尚志 (HIRAMATSU Naoshi)
北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授
研究者番号：10443920