

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450373

研究課題名(和文)ニワトリ卵胞におけるアンジオポエチン様タンパク質の機能解析 - 鶏卵生産効率化基盤 -

研究課題名(英文)Characterization of Angiopoietin like proteins in chicken ovary

研究代表者

佐藤 幹 (Sato, Kan)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20250730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ニワトリ卵胞の急速成長期に発現するAngiopoietin like protein (ANGPTL)を同定し、卵生産の効率化を行う基礎的な知見を明らかにした。まず、ANGPTL5が急速成長期の卵胞に多く発現していることを見出し、その機能はリポタンパクリパーゼ活性を阻害する因子であることを明らかにした。次に、ANGPTL5は、卵胞への卵黄前駆物質の取り込みに関与していることを証明した。よって、ニワトリにおける卵生産効率化のターゲットの一つの候補が本因子であることを明示した。

研究成果の概要(英文)：The present study was identified Angiopoietin like proteins (ANGPTLs), which were involved in the follicle development during rapid growth stage of chicken ovarian follicles. ANGPTL5 mRNA expression was high level in the follicles at the rapid growth stage, and the function was clarified to play the role of the inhibitor on lipoprotein lipase activity. The injection of ANGPTL5 protein into laying hens enhanced the uptake of the egg yolk precursor to a follicle. Thus, the present results provide that ANGPTL5 is a novel target for efficient egg production in chickens.

研究分野：動物栄養生化学

キーワード：ニワトリ 卵生産 リポタンパク代謝

## 1. 研究開始当初の背景

(1)21世紀における世界人口の増加と食生活の多様化が進む中、高品質の畜産食品（特に食肉）を安全、効率的、かつ家畜を健康に生産する技術体系の確立が要請されている。特に、近年における穀物価格の高騰に対応するためには、少ない飼料資源を有効に活用し、より効率的に生産性を向上させなければいけない。この要請に応じて、飼料エネルギーの損失となる無駄な脂肪（廃棄脂肪）の蓄積を抑制するために、家畜・家禽の脂質代謝調節を担う遺伝子群の機能解析をベースとした生産技術の科学的基盤を構築することは「畜産学」の重大な使命である。

(2)本研究の主題であるangiopoietin like protein (ANGPTL)は、約10年前に哺乳動物で脂質代謝に重要な役割をしていることが発見され (Konishi et al., Nature,2002)、我々がニワトリの肝臓でその存在を同定した分子である (Sato et al., GEC, 2008)。ヒトでは、現在、次世代の高脂血症治療薬のターゲットとして非常に注目を浴びている。我々のこれまでの積み重ねてきた成果から、ANGPTLが鶏卵生産における脂質代謝の制御点であるリポ蛋白輸送と卵胞への卵黄蓄積を制御すると推測した分子であり、これを解析することが卵生産の効率化を行う鍵を担うものであると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、ANGPTL、特に卵胞に多く発現するANGPTL-5に着目し、本分子の機能と代謝的意義をin vivoおよびin vitroの両面から実証する。すなわち、ANGPTL-5分子を遺伝子と蛋白質の両面から同定し、その発現解析を行い、ニワトリから分離した卵胞膜あるいは顆粒膜細胞を用いて性ホルモンに対する応答を明らかにするとともに、作成したリコン

ビナントタンパク質のin vivo投与によるその代謝的意義を立証し、本遺伝子発現調節機構をプロモーター解析と栄養応答からその制御法を探る。本申請の研究が完遂することにより、鶏卵生産を効率化する生産手法および脂質代謝異常に起因する疾病予防の基盤となる。

## 3. 研究の方法

### (1)遺伝子の同定

ニワトリゲノムから推定された配列を用いて、ANGPTL-5の全長配列をPCRで増幅し、その全長推定配列のPCR産物を得る。

### (2)遺伝子の発現コンストラクトと抗体の作成

同定した全長配列をpIND-V5(CMVプロモーター)の哺乳動物発現ベクターにコンストラクトする。次に、リコンビナント蛋白質をCHOK-1などの哺乳動物の発現細胞で調整する。

### (3)ANGPTLタンパク質の機能解析

#### ①in vitroにおける機能解析試験

ニワトリANGPTLタンパク質は、哺乳類ANGPTLの構造から推測するとリポ蛋白質リパーゼ(LPL)の阻害因子として働き、血中トリグリセリド濃度上昇因子として機能している可能性が推測される。そこで、申請者が確立したリポ蛋白リパーゼ精製法(Sato et al., 1995)により精製したLPLとVLDLあるいはトリオレインエマルジョンの酵素反応液中に鶏ANGPTL-5リコンビナント蛋白質を添加し、LPLによるトリグリセリド分解能をANGPTL-5が抑制するかを明らかにする。

#### ②in vivoにおける機能解析試験

ANGPTL-5リコンビナント蛋白質を1週齢・ブロイラー雛あるいは産卵鶏に静脈投与し、経時的に血中トリグリセリド濃度を測定し、

ニワトリでもANGPTL が血中トリグリセリド上昇因子として機能するかを検討する。

#### (4)in vivoにおける発現解析試験

##### ① ANGPTL の組織分布

本分子が他の臓器に高発現していれば、代謝的意義も推定とは異なってくる。そこで、他組織における組織分布を明らかにする

##### ②ニワトリ卵胞発達における発現変動

白色レグホーン(ジュリア)の雄雌を成長期から産卵期まで飼育し、LRP12 の発現を定量PCRにより測定し、産卵に対する本分子の重要性を明らかにする。

ニワトリ卵胞膜あるいは顆粒膜細胞を用いた

##### (5)ANGPTLのin vitro解析

ニワトリの卵胞の組織免疫染色でANGPTLの局在性を明らかにした後、ニワトリ卵胞より分離した細胞を用いて、性ホルモンに対する発現を、定量PCRで解析し、急速成長とANGPTLの関係を実証する。

蛍光ラベルVLDLを用いた卵黄蓄積に対する

##### (6)ANGPTLの代謝機能解析

リポ蛋白質をDIIで蛍光ラベルして、ANGPTLリコンビナントタンパク質と同時に投与することにより、卵黄蓄積とANGPTLの関係を明示する。

##### (7)ANGPTL promoterの栄養・ホルモン応答性解析

pGL4.10 (Luciferaseがレポーター, Promega)に promoter をコンストラクトし、卵胞の細胞に導入して、各種栄養素(アミノ酸やビタミン)および性ホルモンに対する応答性を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1)遺伝子の同定

ゲノム情報より 3'および 5'non-coding region を含む primer を作成し、ニワトリ ANGPTL-5

の全長配列を決定した。ニワトリ ANGPTL-5 は 390 アミノ酸で構成されるタンパク質で、アミノ酸配列の相同性はヒトと 68%であった。

### (2)遺伝子の発現コンストラクトと抗体の作成

分離した全長配列を pIND-V5 の哺乳動物発現ベクターにコンストラクトし、CHOK-1 でリコンビナントタンパク質を調整した。発現したリコンビナントタンパク質は、分泌蛋白であり、培地中に分泌されていた。また、分泌されたニワトリリコンビナント ANGPTL-5 は二量体を形成していた(Fig.1)。また、既存のマウス ANGPTL-5 に対する抗体がニワトリ ANGPTL-5 にも交差することが明らかになり、抗体を新たに作成する必要がないことが明らかとなった。

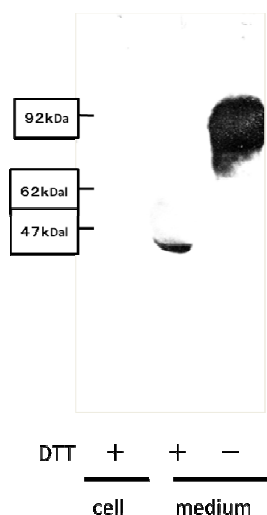


Fig.1

ニワトリ ANGPTL-5 リコンビナントタンパク質のウエスタンブロット解析

### (3)ANGPTLタンパク質の機能解析

ニワトリ ANGPTL タンパク質は、リポ蛋白質リパーゼ(LPL)の阻害因子として機能していることを in vitro で明らかにした。また、ANGPTL-5 リコンビナント蛋白質を鶏に投与したところ、投与後 1h の血中トリグリセリド濃度が上昇し、生体内においても ANGPTL-5 は LPL の阻害因子として機能していることが明らかとなった(Fig.2)。

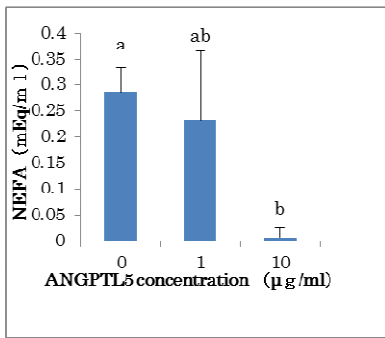


Fig.2

ニワトリ  
ANGPTL-5 の  
リポタンパク  
リパーゼ阻害  
作用

#### (4)in vivoにおける発現解析試験

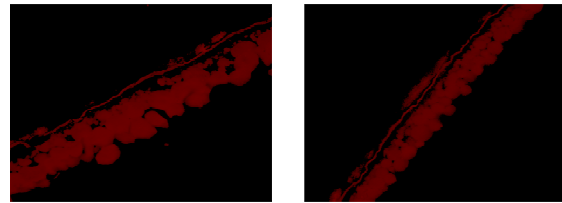
ANGPTL-5 遺伝子発現を卵胞の発達ステージで検証したところ、急速成長期、特に F3 で大きく発現が上昇していることが明らかとなった。よって、ANGPTL-5 は卵胞の急速成長期において高く発現し、卵胞の卵黄取り込みを促進している可能性が示唆された。

#### (5)ANGPTL の in vitro 解析

ANGPTL-5 抗体を用いて、ニワトリ卵胞の F3 を組織染色したところ、卵胞膜細胞(Theca cell)に局在していた。すなわち、リポタンパクリパーゼが存在する血管系が発達している部分に ANGPTL-5 は局在し、脂質の分解を抑制している可能性、そして血液に分泌されて機能している可能性が示唆された。

#### (6)ANGPTLの代謝機能解析

採卵鶏の血漿より超遠心法で分離した VLDLy を DiI で蛍光ラベルし、ANGPTL-5 のリコンビナントタンパク質と同時に採卵鶏の静脈より投与して、卵胞への卵黄前駆物質の蓄積に対する ANGPTL-5 の代謝機能を明らかにすることを試みた。その結果、ANGPTL-5 投与区では、卵黄前駆物質の蓄積が対照区とした生理食塩水投与区に比べ増加した(Fig.3)。すなわち、ANGPTL-5 は卵胞前物質の卵胞への取り込みを促進する機能があることが明らかになった。



ANGPTL-5 injection

Saline injection

Fig.3 ANGPTL-5 の卵黄前駆物質取り込みに対する影響

#### (7)ANGPTL promoterの栄養・ホルモン応答性解析

性ホルモンである FSH や LH およびエストロジェンを分離した卵胞膜細胞に添加しても、ANGPTL-5 遺伝子発現は影響を受けなかった。よって、それ以外の因子によって発現が制御されていることが推察された。プロモーター領域をゲノム配列から抽出し、転写因子結合推定配列を検索したが、有効な制御因子は見いだせなかった。そこで、卵胞膜細胞を培養し、各種栄養素を添加した時の ANGPTL-5 遺伝子発現を測定したところ、グリシンとリノール酸(0.5mM 添加)で発現が上昇した。その応答を確認するために、ANGPTL-5 のプロモーター領域(-1,500~+32)を調整し、pGL4.10 にコンストラクトして、COS-7 にトランスフェクションしたところ、グリシン添加で高いリシフェラーゼ活性を見出すことができた。

以上の結果から、ニワトリ ANGPTL-5 は、卵胞への卵黄前駆物質取り込みを促進する卵胞膜細胞で産生される因子であり、この発現をグリシンなどの栄養素で亢進することにより、効率的な卵生産を実現できる可能性が示唆された。

なお、本研究の成果は、すでに発表している論文に加え、現在、以下の論文を執筆中である。

Angiotensin like-5 inhibits lipoprotein lipase activity and associates with the rapid

accumulation of yolk lipid during rapid growth stage of follicles in laying hens  
Natsumi Maki, Kazuhiro Yamada, Tonami Endo, Kan Sato\*

## 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 3 件)

①Cacao bean husk: an applicable bedding material in dairy free-stall barns. Yajima A, Ohwada H, Kobayashi S, Komatsu N, Takehara K, Ito M, Matsuda K, Sato K, Itabashi H, Sugimura S, Kanda S. Asian-Australas J Anim Sci. 2016 Dec 17. doi: 10.5713/ajas.16.0877. [査読有](#)

②Molecular nutrition: Interaction of nutrients, gene regulations and performances. Sato K. Anim Sci J. 2016 Jul;87(7):857-62. doi: 10.1111/asj.12414. [査読有](#)

③Potential of a smartphone as a stress-free sensor of daily human behavior. Mimura K, Kishino H, Karino G, Nitta E, Senoo A, Ikegami K, Kunikata T, Yamanouchi H, Nakamura S, Sato K, Koshihara M. Behav Brain Res. 2015 Jan 1;276:181-9. doi: 10.1016/j.bbr.2014.06.007. Epub 2014 Jun 13. [査読有](#)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 幹 (Sato, Kan)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：20250730