

学位論文題名

Studies on mechanism of lipid droplet formation in oocytes
of a salmonid, cutthroat trout, *Oncorhynchus clarki*

(サケ科魚類カットスロートトラウトの卵母細胞における油球形成機構に関する研究)

学位論文内容の要旨

硬骨魚類の卵内には他の卵生動物と同様に、胚発生や稚仔魚の発達に必要な不可欠な様々な物質が貯蔵される。これらの物質の中で脂質は、卵黄の主要な構成成分であるタンパク質と共に、胚発生の重要なエネルギー源となっている。特に、サケ科魚類やウナギ、マダイ、ブリ、クロマグロなどの水産有用種では、大量の脂質が油球として卵内に蓄積され、その主成分はトリアシルグリセリド (TAG) 等の中性脂質であることが知られている。また、卵内の TAG の供給源としては、血液中のリポタンパク質、特に超低密度リポタンパク質 (Vldl) が推測されている。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ように形成されるかについては、未だほとんどが未解明なままである。

一般に、Vldl 中の TAG は、細胞表面に存在するリポタンパクリパーゼ (Lpl) によって遊離脂肪酸 (FA) とグリセロールに分解され、ここで生じた FA が細胞内に取り込まれた後、中性脂質に再構成される。この様な Vldl を起点とした脂質取り込み機構は、魚類の卵母細胞においても存在する可能性が高い。そこで本研究では、Vldl の取り込みや代謝に着目し、魚類の卵黄形成に関して最も理解が進んでいるサケ科魚類の中から、カットスロートトラウト (*Oncorhynchus clarki*) をモデルに用い、サケ科魚類の卵母細胞における油球形成機構の解明を目的とした。

先ず、Vldl の代謝に関わる主要な酵素である、リポタンパクリパーゼファミリーの役割に着目し、その遺伝子クローニングと卵巣における様々な発現解析を行った。その結果、カットスロートトラウトの卵巣から、2 種の *lpl* cDNA (*ctlpl1*, *ctlpl2*) と 2 種のエンドセリアルリパーゼ cDNA (*ctel1*, *ctel2*) が得られた。リアルタイム定量 PCR と *in situ* hybridization 法を用いて各遺伝子の発現を解析した結果、*ctlpl1* mRNA と *ctlpl2* mRNA とともに、卵巣の他、脂肪組織と筋肉などの脂肪貯蔵組織で高く発現していることから、両 *ctLpl* の脂質取り込みにおける役割の重要性が支持された。また、卵巣では、油球期に高く発現することが認められたことから、*ctLpl* が油球の形成と蓄積に何らかの役割を担っているとともに、その主な作用部位は顆粒膜細胞であることが示唆された。一方、*ctel1* mRNA と *ctel2* mRNA は共に卵巣においてのみ顕著な発現が見られ、それらの発現が卵黄形成開始時においてのみピークを示すこと、さらに卵濾胞内においては主に卵母細胞で発現していることが明らかになった。これらの結果と、E1 は主にホスホリパーゼ活性を有するという知見を考え合わせると、*ctE1* がリン脂質を含有する卵黄前駆タンパク質 (ピテロジェニン) の取り込みや代謝に関与していることが示唆された。

次に、Vldl がサケ科魚類の卵母細胞において主たる中性脂質の供給源であることを実証するため、以下の実験を行った。先ず、カットスロートトラウトの血漿から超遠心分離法を調製された各リポタンパ

ク質 (ctVldl, ctLdl, ctHdl) を蛍光標識脂肪酸 (BODIPY FL C₁₆) と共にガラスビーズ結合方法に供し、その脂質部分へ蛍光標識を行った。得られた各蛍光標識リポタンパク質を、それぞれ卵濾胞培養系に添加し、卵濾胞内への蛍光脂質の取り込みの時間経過に伴う変化を調べた。解析には、卵濾胞中の蛍光量の測定と凍結切片の蛍光観察を用いた。その結果、ctVldl の添加 12 時間後から蛍光量が有意に増加したが、ctLdl と ctHdl の添加では 24 時間後から有意な蛍光量の増加が確認された。また、ctVldl 添加群の蛍光量は、全培養時間において他の添加群に比べて有意に高かった。さらに、組織学的な観察においても、ctVldl 添加群においてのみ卵母細胞内の油球に強い蛍光が観察された。これらの結果から、ctVldl が卵母細胞への中性脂質の主要な供給源であることが示された。続いて、様々な培養条件 (温度、添加濃度、卵濾胞の大きさ) の変化が卵濾胞内への ctVldl 取り込みに及ぼす影響について調べた。その結果、卵濾胞内への脂質取り込み量は 15℃以上の処理群で有意に高くなり、かつ温度が高くなると共に脂質取り込み量も増加した。また、ctVldl の添加量が多くなると共に脂質取り込み量も軒増し、0.5 mg/ml の添加群から有意に高い値が見られた。この結果から、Vldl の濃度依存的に卵濾胞内への脂質取り込み量も増加することが確かめられた。さらに、卵濾胞の大きさと脂質取り込み量との関係では、卵濾胞の大きさが脂質取り込み量の増加と正の相関関係にあることが認められた。

Vldl は構造的に核心部のほとんどが脂質 (主に TAG) で構成されており、その周囲がリン脂質やタンパク質 (主にアポタンパク質) で取り囲まれている。この様な Vldl の構造的な特性に着目して、ctVldl の脂質とタンパク部分をそれぞれ異なる蛍光物質で標識し、卵濾胞培養系に添加することで、卵濾胞内での ctVldl の取り込みや代謝の機構を解析した。その結果、ctVldl の脂質とタンパク部分の取り込み量は、油球期後期と卵黄形成初期の卵濾胞で共に培養時間の増加と共に増加することが確認された。しかし、その量は脂質のほうが顕著に多かった。組織学的な観察では、蛍光脂質が卵母細胞内の油球で強く観察されたのに対し、蛍光タンパク質は濾胞細胞など卵母細胞外のみで見られた。さらに、脂質部分とタンパク質部分を二重標識した ctVldl をメダカに生体内投与し、その卵濾胞内への取り込みを組織学的に観察した結果、カットスロートトラウトの卵濾胞培養系での結果と一致する各蛍光物質の卵濾胞内分布が観察された。これらの結果から、硬骨魚類の卵濾胞において、Vldl は卵母細胞外で代謝され、それにより生じたアポタンパク質は卵母細胞内に取り込まれることなく卵母細胞外に留まるが、FA は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強く示唆された。

最後に、様々なホルモンや Lpl 阻害剤を ctVldl と共に卵濾胞培養系に添加し、それらの卵濾胞への脂質取り込みに及ぼす影響を調べた。その結果、生殖腺刺激ホルモン (Fsh, Lh) やステロイドホルモン (11-KT, E₂)、甲状腺ホルモン (T₃)、脂肪代謝ホルモン (leptin) による有意的な脂質取り込量の増加が観察されたが、インスリン様成長因子 (IGF-I) では脂質取り込み量の減少が見られた。また、Lpl 阻害剤 (Orlistat および ANGPTL3) は有意に卵濾胞への脂質取り込み量を減少させた。

以上、本研究により、サケ科魚類の卵母細胞における主要な中性脂質供給源が Vldl であり、それを起点とした卵母細胞内での油球形成機構の一端が初めて明らかにされた。これらの知見は、今まで未解明であった硬骨魚類の卵内における脂質取り込み機構に関して新たなモデルを提示するものであり、今後の本研究分野の発展に大きく寄与するものと期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	足立伸次
副査	教授	荒井克俊
副査	准教授	東藤孝
副査	准教授	平松尚志

学位論文題名

Studies on mechanism of lipid droplet formation in oocytes of a salmonid, cutthroat trout, *Oncorhynchus clarki*

(サケ科魚類カッツスロートトラウトの卵母細胞における油球形成機構に関する研究)

硬骨魚類の卵内に貯蔵される物質の中で、脂質は卵黄の主要な構成成分であるタンパク質と共に、胚や稚仔魚の重要なエネルギー源となっている。特に、サケ科魚類などの多くの魚種では、多量の脂質が油球として卵内に蓄積され、その主成分は中性脂質であることが知られている。また、卵内の中性脂質の供給源としては、血液中のリポタンパク、特に超低密度リポタンパク (Vldl) が推測されている。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ように形成されるかについては、殆どが未解明であった。そこで本研究では、Vldl の取り込みや代謝に着目し、サケ科魚類のカッツスロートトラウト (*Oncorhynchus clarki*) をモデルに用い、魚類の卵母細胞における油球形成機構の解明を目的として種々の実験を行った。

先ず、Vldl の代謝に関わる主要な酵素である、リポタンパクリパーゼ (Lpl) ファミリー遺伝子をクローニングし、卵巣における様々な発現解析を行った。その結果、卵巣から2種の *lpl* cDNA と2種のエンドセリアルリパーゼ (*el*) cDNA が得られた。2種の *lpl* mRNA は共に、卵巣の他、脂肪組織と筋肉などで高く発現していた。また、卵巣では油球期に高く発現することが認められたことから、Lpl が油球の形成と蓄積に何らかの役割を担っていると同時に、その主な作用部位は顆粒膜細胞であることが示唆された。一方、2種の *el* mRNA は共に卵巣においてのみ顕著な発現が見られ、それらの発現が卵黄形成開始時においてのみピークを示し、さらに卵濾胞内においては主に卵母細胞で発現していた。これらの結果から、El が卵黄前駆タンパク質の取り込みや代謝に関与していることが示唆された。

次に、Vldl がサケ科魚類の卵母細胞において主たる中性脂質の供給源であることを実証するため、以下の実験を行った。先ず、カッツスロートトラウトの血漿から調製した各リポタンパク (Vldl、低密度リポタンパク : Ldl、高密度リポタンパク : Hdl) を蛍光標識脂肪酸で標識した。得られた各蛍光標識リポタンパクを、それぞれ卵濾胞培養系に添加し、卵濾胞内への蛍光脂質の取り込みの時間経過に伴う変化を調べた。その結果、Vldl 添加群の蛍光量は、他の添加群よりも早く増加し始め、また全培養時間において他の添加群よりも有意に高かった。さらに、組織学的な観察では、Vldl 添加群においてのみ卵母細胞内の油球に強い蛍光が観察された。これらの結果から、Vldl が卵母細胞への中性脂質の主要な供給源であることが示された。続いて、様々な培養条件 (培養温度、Vldl 添加濃度、卵濾胞サイズ) の変化が卵濾胞内への Vldl の取り込みに及ぼす影響について調べたところ、各条件が上がると共に卵濾胞内への脂質取り込み量が増加した。

次に、Vldl の脂質とタンパク部分をそれぞれ異なる蛍光物質で標識し、卵濾胞培養系に添加した。その結果、Vldl の脂質とタンパク部分の卵濾胞への取り込み量は、培養時間の経過と共に増加した。しかし、その量は脂質のほうが顕著に多かった。組織学的な観察では、蛍光脂質が卵母細胞内の油球で強く

観察されたのに対し、蛍光タンパクは濾胞細胞や卵膜など卵母細胞外のみで見られた。さらに、脂質部分とタンパク部分を二重標識した Vldl をメダカ (*Oryzias latipes*) に生体内投与し、その卵濾胞内への取り込みを組織学的に観察した結果、カットスロートトラウトの卵濾胞培養系での結果と一致する各蛍光物質の卵濾胞内分布が観察された。これらの結果から、魚類の卵濾胞において、Vldl は卵母細胞外で代謝され、それにより生じたアポタンパクは卵母細胞内に取り込まれることなく卵母細胞外に留まるが、遊離脂肪酸は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強く示唆された。

最後に、様々なホルモンや Lpl 阻害剤を Vldl と共に卵濾胞培養係に添加し、それらの卵濾胞への脂質取り込みに及ぼす影響を調べた。その結果、生殖腺刺激ホルモンやステロイドホルモン、甲状腺ホルモン、レプチンによる脂質取り込量の有意な増加が観察されたが、インスリン様成長因子 I では脂質取り込み量の減少が見られた。また、Lpl 阻害剤は有意に卵濾胞への脂質取り込み量を減少させた。

以上、本研究により、サケ科魚類の卵母細胞における主要な中性脂質の供給源が Vldl であり、それを起点とした卵母細胞内での油球形成機構の一端が初めて明らかにされた。これらの知見は、今まで未解明であった魚類の卵内における脂質取り込み機構に関して新たなモデルを提示するものであり、今後の本研究分野の発展に大きく寄与するものと期待される。よって審査員一同は申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。