

論文の内容の要旨

水圏生物学専攻
平成 26 年度博士課程入学

氏名 高瀬 麻以
指導教員 潮 秀樹

論文題名：

ゼブラフィッシュにおける植物性ステロール代謝機構に関する研究

研究の背景： 養殖魚用飼料では主原料として魚粉が用いられ、成長や可食部の主体である筋肉の増大にとって重要なタンパク質源および脂質源となっている。しかしながら魚粉の価格の高騰により、代替原料の探索が活発に行われるようになった。中でも注目を集めているのは大豆油粕などの植物性の原料であり、これまで代替飼料を投与した際の成長、体タンパク質組成や脂質組成への影響などが頻繁に研究されている。一方で、植物性原料代替飼料の使用ではタンパク質や脂質のみならず、ステロール類の代替にも注意しなければならない。植物性の原料に含有される植物性ステロールの構造はコレステロールと類似し、本来のステロール代謝に影響を及ぼし得る。しかしながら、ステロール類の代謝に注目した研究例は少ない。

脊椎動物では、飼料由来のコレステロールは他の栄養素と同様に小腸において吸収される。Niemann pick C-1 like protein receptor (NPC1L1) と scavenger receptor class B, member 1 (SR-B1) が小腸上皮細胞内へとコレステロールを取り込む。細胞内に取り込まれたコレステロールは sterol *O*-acyltransferase (SOAT2) によって脂肪酸とエステル結合され、その後 apolipoprotein A1 (APOA1) を含みリポ蛋白質に包括されて肝臓へ向けて移送さ

れる。小腸上皮細胞内に残存した遊離型のコレステロールは ATP binding cassette subfamily G member 5 and 9 (ABCG5/ABCG8)と ATP binding cassette subfamily A (ABCA1) によって細胞外に排泄される。肝臓に運ばれたコレステロールは、3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR)などによって *de novo* 合成されたコレステロールとともに胆汁酸の原料とされ、胆汁酸合成の第一段階として cytochrome P450 7A1 (CYP7A1)によって 7-hydroxycholesterol へと変換される。合成された胆汁酸は ATP binding cassette subfamily C member 2 (MRP2)を介して、また過剰なコレステロールは腸と同様に ABCG5/ABCG8 によって対外へ排泄される。胆汁酸は排泄されるだけでなく、 farnesoid X receptor (FXR)によって総括される脂質代謝を制御するメディエーターとしての役割も果たす。FXR は CYP7A1 を抑制して胆汁酸の合成を抑制し、phospholipid transfer protein (PLTP)や UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B (UGT2b)の発現を亢進する。哺乳類においては UGT2b4 の遺伝子発現が FXR によって誘発されることが報告されているが、ゼブラフィッシュの *ugt2b4* は偽遺伝子であり、*ugt2b* 系の遺伝子発現に関しては不明な部分が多い。

そこで本研究ではステロールを含まない飼料、コレステロールと植物性ステロールの一種である β -シトステロールをそれぞれ含む飼料を実験魚に投与し、小腸上皮と肝臓におけるコレステロール代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響を調べることにした。

ステロール不含飼料、3%のコレステロール含有飼料、3%の β -シトステロール含有飼料を作製した。飼料作製に用いる脂質にはカラムクロマトグラフィーにてステロール類を除去したコーンオイルを使用した。全腸を摂餌後6時間に、肝臓を摂餌直前と1、2、5、8時間後に採取した。組織から全RNAを抽出し、cDNAとしてリアルタイムPCRを行った。内部標準には ribosomal protein L8 を使用した。

結果・考察：本研究は、ステロール代謝系に関連する主な遺伝子の動向を追跡することによって、シトステロール投与時の遺伝子発現の変遷を広い視点で追跡することを目的とした。シトステロール投与群とコレステロール投与群の遺伝子発現を比較したところ、*npc111*、*apoa1a*、*abca1* の有意に高い発現が認められた (Steel-Dwass test)。このことからゼブラフィッシュではシトステロール投与時にステロール吸収に関する遺伝子の発現が誘導されることが明らかとなった。同様な傾向が *apoa1a* においても確認でき、

シトステロールが積極的に肝臓へと移送される可能性が示された。一方で *abca1* はリン脂質などの細胞外への輸送にも関わるものの、その発現がシトステロール投与群にて上がっていたことから、*npc1l1* の発現はシトステロールを小腸上皮細胞内に多く取り込み、結果として排泄対象となるステロール類の量が増え、排泄量も増える可能性が示唆された。

ゼブラフィッシュは low density lipoprotein (LDL)ではなく、high density lipoprotein (HDL)の形でステロールを輸送するという報告があるが、ステロール投与群において *ldlr* の発現が増加した。HMGCR の遺伝子発現はステロール投与群間で類似した増加傾向を示したが、発現量はコレステロール投与群で高かった。哺乳類の場合、副腎中のコレステロール量の減少と *hmgcr* 発現量の減少が同時に認められており、ゼブラフィッシュの *hmgcr* でも同様な機構が存在すると考えられる。また、コレステロール投与群と比較してシトステロール投与群において *cyp7a1* の高い発現が確認された。この変化より *de novo* 合成されたコレステロール、ないしは胆汁酸の元となるコレステロール量の供給が少ない場合、*cyp7a1* は胆汁酸の合成量を保つために発現量を調整する可能性が示唆された。

シトステロール投与群における *fxr* の発現はコレステロール投与群と比較して低くかった。コレステロール投与群およびシトステロール投与群の *cyp7a1* と *fxr* の遺伝子発現を経時的に追跡すると、*fxr* の発現が高い時に *cyp7a1* の発現が低く、逆に *fxr* の発現が低い時に *cyp7a1* の発現が高いことが分かった。CYP7A1 による 7-hydroxycholesterol の合成量が低い場合には既に肝臓内に存在している FXR が *cyp7a1* の発現量を上げることによって胆汁酸量を調整し、胆汁酸の十分な供給の後、*fxr* 遺伝子の発現を増大し、PLTP や UGT2b の遺伝子発現を促進する可能性が示された。一方で、*pltp* の遺伝子発現は摂餌後 1 時間の時点で最も高かったが、コレステロールおよびシトステロール投与群の間で有意な発現量の差は認められなかった。シトステロールを投与した群では遺伝子の発現量は少ないが、経時間的に発現量の増加が認められることから、*hmgcr* によるコレステロールの *de novo* 合成が行われていることが示唆される。このことより、コレステロール投与群と比較して少量であるが、初期の段階で合成された胆汁酸が FXR の機能を活性化し、*pltp* の発現を上げたものとも考えることもできる。しかしながら、*pltp* の発現

量には経時的な統計学的有意差はなく、哺乳類において確認されている FXR による *pltp* 遺伝子の顕著な発現は見受けられなかった。このことより、魚類の *pltp* 遺伝子の発現は FXR 以外の代謝制御系によって誘発される可能性もある。

Ugt2b 系の遺伝子発現に関しては、コレステロール投与群において *ugt2b1*、*ugt2b3*、*ugt2b5*、*ugt2b6* 全ての遺伝子において類似した経時変化が確認された。1 回目のサンプルリングから摂餌後 5 時間まで遺伝子発現が減少し、8 時間の時点で少し増加する傾向にあったが、統計学的有意差はなかった。これらのことから、ゼブラフィッシュの FXR は摂餌後 8 時間では *ugt2b* 系の遺伝子発現を有意に誘発しないものと推定された。

次いで、シトステロール投与群の *ugt2b* 系の遺伝子発現を確認したところ、コレステロール群の発現と比較して随所に突発的な遺伝子発現の変化が認められた。特に *ugt2b1* と *ugt2b3* においては摂餌後 5 時間、*ugt2b6* においては摂餌後 2 時間において変化があった。誤差の範囲が大きく、変化の差は有意ではないが、これらの現象はコレステロール投与群のものとは異なるため、シトステロール摂取が遺伝子発現に何らかの影響を及ぼす可能性もある。肝臓にシトステロールが取り込まれた時点では *cyp7a1* の発現が誘発され、それが摂餌後 1 時間から 5 時間の間で胆汁酸の量を増大させ、FXR の活性化を介して *ugt2b* 遺伝子の発現に繋がった可能性もある。

本研究により、主に 3 つのことが分かった。まず、小腸上皮細胞にて認められた *npc111* と *apoai* の発現量の変化よりシトステロールが細胞内に取り込まれ、さらに肝臓へ輸送されている可能性が示唆された。続いて、シトステロール投与時には肝臓において *hmgcr* 遺伝子の発現が抑制され、その後の *cyp7a1* と *fxr* の発現に影響することが示唆された。さらに、シトステロール投与時には *ugt2b* 系の遺伝子発現が突発的に変化することが明らかとなった。実際に代謝系の変化を総合的に判断するには、さらにタンパク質発現や転写因子の転写活性などまでを綿密に調べる必要があると考える。今後の研究のさらなる展開に期待する。

本研究によって明らかになった知見は、植物性原料代替飼料を魚に与えた際の魚体内における代謝変化のモデルの一つとなり、魚粉と植物性原料の置き換えを検討する際の基礎的知見の集積に資するものと考えられる。