

# 博士論文 (要約)

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

高瀬 麻以

**Studies on phytosterol metabolism  
of zebrafish (*Danio rerio*)**

(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)

A Thesis

submitted to

The Graduate School of Agricultural and Life Sciences

The University of Tokyo

in partial fulfillment of the requirements

for the degree of

**Doctor of philosophy**

in

The Department of Aquatic Bioscience

Mai TAKASE

高瀬 麻以

2017

## **Declaration**

I, Mai TAKASE, hereby declare that this thesis entitled “Studies on phytosterol metabolism of zebrafish (*Danio rerio*)” is an authentic record of my own work and that no part therefore has been presented for the award of any degree, diploma or any other similar title.

August 2017

Mai TAKASE

Laboratory of Marine Biochemistry

Department of Aquatic Bioscience

Graduate School of Agricultural and Life Sciences

The University of Tokyo

## **Acknowledgement**

I would like to give my regards first of all, of course, to Dr. Hideki Ushio for being my supervisor through the Ph.D course. Ph.D course for me was an adventure. Chaining the field of expertise from Ph.D course was very tough and I understand that it took a lot of your patience to deal with me. In addition to that, I was always simultaneously interested in the things happening out side of the lab. Thank you very much for thinking about my LIFE itself, and letting me pursue my interest. I couldn't have gone far in the field of gerontology, clinical research, and entrepreneurship with out your support and understanding. I can never forget the time I came back to the lab after taking a break of absence. Situation at work got a little bit nasty but thank you for trusting me, and bringing me under your cover once again. This is one of the strongest memories that I have with you.

My life in the past three years was definitely not possible with warm support of Dr. Misako Nakaya. Thank you very much for understating me through happy times and hard times. My research could not have progressed with out your support. I cannot recall how many times I had to ask for your support to receive purchased reagents for me when I was working outside. Another key player that cannot be left out is Ms. Hazuki Yoshinaga. The only two machines that I was familiar with when I came to this lab were the weight measure and the incubator. Everything else, you taught me how to use. Every experiment that I know how to do, came from you. Your humbleness, openness to support, fair view, and ability to work with variety of people is definitely your strength. I wish for miles and miles of success ahead of you.

I would also like to thank my dear friends at the lab. Mr. Karim Honein, for always being at my side when I needed the support. Mrs. Alice Wen for treating me like a dear little sister. Mr. Holger Feroudj and Ms Hina Satone for being my mentor. It is my responsibility now to grow as a person and to give my support to other people around me.

## DEDICATION

I would like to dedicate this thesis to all of the following researchers who are interested in fish metabolism. Especially to those who is very open minded and understand that the study about metabolism is not about numbers but about animals as a living being full of detailed and complicated metabolic cascades.

For everything that is published, we can say that that phenomenon was true only under that condition. Nothing is crystal clear and that is what makes the research interesting. This thesis is meant to discover the fundamental basis of metabolic reactions changed by administration of phytosterol. The analysis method is very simple. However, there are tons to be discovered and discussed.

I wish all of you taking time to read my dedication, a best of luck in research. But I also wish for you to keep in mind that everything about research is just an attempt to clarify things around you.

For example, last year, autophagy won a Nobel Prize. As one of researchers dealing with experiments in the lab, I was of course stunned. I also felt extremely honored because I got to interview one of the most upfront researchers of autogaphy, Dr. Mizushima and write an article about it (<https://lne.st/2016/01/28/mizushima-noboru/>).

However, at the same time, I felt the vulnerability of human being. Our cells probably have been performing autophagy ever since they can remember, for a very long time. It happens with in us everyday, every minute, and every second. We humans finally see a glimpse of that, and we celebrate. How small, and tiny can we be.

I love this feeling of science and decided to share it with you today.

Thank you for reading this far and again, best of luck.

# 目次

## 要旨

本研究の背景 . . . . .p. 1

第 1 章 . . . . .p. 4

ゼブラフィッシュ小腸上皮細胞における遺伝子発現の変化

背景 . . . . .p. 5

小腸上皮細胞における、ステロール吸収排泄のメカニズム . . p. 6

目的 . . . . .p. 8

方法 . . . . .p. 9

結果 . . . . .p. 12

考察 . . . . .p. 20

結論 . . . . .p. 23

第 2 章 . . . . .p. 24

ゼブラフィッシュ肝細胞における遺伝子発現の変化

背景 . . . . .p. 25

肝細胞におけるステロール代謝

目的 . . . . .p. 28

方法 . . . . .p. 29

結果 . . . . .p. 30

考察 . . . . .p. 36

結論 . . . . .p. 46

第3章	・・・・・・・・p. 47
ゼブラフィッシュ肝細胞における FXR 代謝系の変化	
背景	・・・・・・・・p. 48
肝細胞における FXR 代謝系	
目的	・・・・・・・・p. 50
方法	
結果	・・・・・・・・p. 51
考察	・・・・・・・・p. 58
結論	・・・・・・・・p. 61
結語・展望	・・・・・・・・p. 62
参考文献	・・・・・・・・p. 63

## 略語

ABCA1: ATP binding cassette from subfamily A member 1

ABCG5: ATP binding cassette subfamily G member 5

ABCG8: ATP binding cassette subfamily G member 8

APOAI: apolipoprotein AI

APOCIII: apolipoprotein CIII

CEH: cholesterol ester hydrolase

CYP7A1: Cytochrome P450 7A1

FXR: farnesoid X receptor

HMGCR: 3-ydroxy-3-methylglutary-CoA reductase

LXR: liver x receptor

MRP2: multidrug resistant associated protein 2

NPC1L1: niemann pick C-1 like protein receptor

RXR: retinoid x receptor

PLTP: phosphoripid transfer protein

SHP: small heterodimer partner

SOAT2: sterol *O*-acyltransferase

SR-B1: scavenger receptor class B, member 1

UGT2b1: UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B1

UGT2b3: UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B3

UGT2b5: UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B5

UGT2b6: UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B6



## 图表

Fig. 0-1 Chronological change of the price of fish mill powder

Fig. 0-2 Epidemiological data of sitosterolemia

Fig. 1-1 Enterocyte and sterol related metabolism diagram

Fig. 1-2 mRNA expression of sterol uptake gene in intestine

Fig. 1-3 mRNA expression of sterol transportation gene in intestine

Fig. 1-4 mRNA expression of sterol excretion gene in intestine

Fig. 2-1 Liver and sterol related metabolism diagram

Fig. 2-2 Expression of sterol uptake genes in liver

Fig. 2-3 Expression of sterol synthesis and primary bile acid synthesis gene

Fig. 2-4 Expression of *fxr*, *lxr*, *rxr* genes in liver

Fig. 2-5 Expression of sterol excretion gene

Fig. 2-6 Expression of bile acid excretion gene

Fig. 3-1 Scheme of FXR controlled gene expression

Fig. 3-2 Gene expression of *pltp* and *shp*

Fig. 3-3 Diagram of UGT2b genes in zebrafish

Fig. 3-4 Amino acid sequence of UGT2b family proteins

Fig. 3-5 Expression of genes of *ugt2b* series

Table 1-1 Fish diet composition

Table 1-2 Primer sequence for the detection of intestinal gene

Table 2-1 Primer sequence for the detection of liver gene

Table 3-1 Primer sequence for the detection of FXR controlled gene expression

論文出版後に開示可能

## 第 1 章

ゼブラフィッシュの小腸上皮細胞における遺伝子発現

## 背景

哺乳類においては、シトステロール血症の治療法を探索するために腸におけるシトステロール吸収機構が研究されている。既存の研究より、コレステロールや植物性ステロールを投与した際の遺伝子発現は、ステロールの種類によって変化することが明らかになっている(Jesch et al., 2009)。餌に含有される成分によって遺伝子発現が変わった場合、腸の中に取り込まれる栄養素の種類や割合も異なると推測することができる。魚類においては筋肉中や臓器中に植物性ステロールが蓄積するケースも報告されており(Ozyurt et al., 2013)、植物性ステロール投与時の腸の遺伝子発現を追跡することは、蓄積機構の解明へと繋がる第一歩とも成り得る。

魚類における植物性ステロールに関する既存研究は、主に 2 つのグループに分類できる。それらは肝臓をターゲットとした網羅的遺伝子発現の解析(Burel et al., 2000; Morais et al., 2009)と、養殖を見据えた成長率や商品としての魚肉の成分の変遷を対象とした研究である(Fournier et al., 2004; Torrecillas et al., 2017)。植物性ステロールと腸というキーワードを組み合わせて行った研究や報告の数はそれらと比較して未だ少ないのが現状である。

魚粉と植物性の原料を置き換えの影響を検討する研究では餌の中に植物性ステロールや植物性の油を混ぜることがある。そのような研究では確かに魚に植物性のステロールを投与していることにはなるが、コレステロールと植物性のステロールが混在している場合が多い。養殖の現場では結果として両種類のステロールが餌の中に混ざることがあるが、植物性ステロールの影響のみに特

化したい研究では 1 つの餌の中に混ぜるステロールの種類を 1 つに限定する必要がある。例えばステロールを細胞の中に移送するタンパク質の中にはコレステロールを識別するためにステロール骨格部位を認識するものがある。コレステロールと植物性ステロールはステロール骨格部位を共通して有するため、見分けがつかないまま同時に移送されてしまう場合がある(Altmann et al., 2004)。以上のことより、植物性ステロールの影響を特異的に検討したい場合には植物性ステロールのみを餌の中に混ぜることが必須となってくる。

## 腸におけるステロール吸収及び排泄機構

ゼブラフィッシュの腸におけるステロールの吸収と排泄は、哺乳類と類似したタンパク質が確認されることから、同様な機構で制御されているものと考えられる。現にゼブラフィッシュを哺乳類の脂質及びステロール代謝のモデル生物として扱っている研究も多数報告されている。餌が腸の中に入ると、ステロールは Niemann pick C-1 like protein receptor, NPC1L1 (Altmann et al., 2004) と scavenger receptor class B, member 1, SR-B1 (Abumrad and Davidson, 2012) によって腸細胞の中に取り込まれる。次に、遊離型のステロールは sterol *O*-acyltransferase 2, SOAT2 (Temel et al., 2003) によって脂肪酸とエステル結合される。SOAT2 によって結合されなかったステロールや過剰なステロールは ATP binding cassette subfamily G member 5 and 8, ABCG5 and ABCG8 (Tsubakio-Yamamoto et al., 2010) によって細胞外に排泄される。ABG5 と ABCG8 と類似した働きを持つ ATP binding cassette from subfamily A, ABCA1 も同様にステロールの排泄に関与する(Santamarina-Fojo et al., 2001)。

哺乳類においては脂肪酸と結合したステロールはカイロミクロンに包  
括された後、腸から肝臓へと輸送される。腸細胞から出たカイロミクロンは low  
density lipoprotein (LDL) へと形を変える。Apolipoprotein A1 (APO-AI) はカイロ  
ミクロンの一部を構成するタンパク質である。ゼブラフィッシュはステロールを  
high density lipoprotein (HDL)の形で輸送すると報告されているが、LDL による輸  
送が皆無ではなく、一部行われていることが示唆されている(Otis et al., 2015;  
Pedroso et al., 2012).

## 第 1 章の目的

本章では 3 種類の餌を用いた (ステロール無、コレステロール、 $\beta$ -シトステロール).それをゼブラフィッシュに投与することにより、植物性ステロールがゼブラフィッシュの腸におけるステロール代謝機構に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした.

5年以内に出版予定



## 第 2 章

# ゼブラフィッシュの肝臓における 植物性ステロール代謝

## 背景

腸壁細胞においてシトステロールに特異的に注目した代謝の研究が少なかったように、肝臓においても類似した研究の傾向が確認できる。2011年には Geary et al が European sea bass を対象としてシトステロールを投与した実験を行ったが、その研究が注目したのは脂肪酸代謝の変化であり、ステロールの代謝に直接的に関連するものではなかった (Geary et al., 2011)。これらの事例より、肝臓におけるシトステロールの代謝機構には未だ明らかになっていない要素があることが示唆される。

## 肝臓におけるステロール代謝

小腸上皮細胞中でエステル化されたステロールは high density lipoprotein (HDL)及び low density lipoprotein (LDL)の形で肝臓へと輸送される。HDL と LDL は肝細胞に吸収され、細胞内において更なる変換を受ける (Fig. 3-1)。

SR-B1 と low density lipoprotein receptor (LDLR)がそれぞれ HDL と LDL を肝臓内に輸送する働きを持つ。例えば LDLR が変異した哺乳類のモデルではの高コレステロール血症が確認される(Lombardi et al., 1995)。LDL の受容体が LDLR、HDL の受容体が SR-B1 である。ゼブラフィッシュは LDL より HDL でステロールを輸送するという報告がある (Pedroso et al., 2012) ものの、LDLR の関する遺伝子が存在することが明らかとなっている。更に *ldlr* 遺伝子を欠損させたゼブラフィッシュを用いた研究から LDLR の機能が未だ重要な役割と果たし

ていることから、HDL でのステロールの輸送割合が高くても、LDLR を視野に入れた検討を行う必要があると考えられる (O'Hare et al., 2014). 肝細胞内に取り込まれたステロールは cholesterol ester hydrolase (CEH)によって遊離型へと変換される.

3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) は肝細胞内でコレステロールの *de novo* 合成を行う律速酵素の一種である(Weber et al., 2004). 体内における 70 % ものコレステロールが HMGCR によるメバロン酸回路によって合成されている. 合成されたコレステロール及び餌から摂取されたコレステロールは胆汁酸の合成回路へと進む.

胆汁酸合成の第一ステップは律速酵素 cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1 (CYP7A1) による反応を受ける. この酵素は cholesterol 7 $\alpha$  hydroxylase としても知られており、コレステロールを 7-hydroxycholesterol へと変換する. 生成された 7-hydroxycholesterol は CYP7A1 に続く胆汁酸合成 酵素によって胆汁酸合成に供される. *Cyp7a1* の発現は liver orphan receptor (LXR) によって誘発され、farnesoid X receptor (FXR) によって抑制されることが知られており、*cyp7a1* の発現は植物性ステロールによって直接的に制御されるのではなく、他の因子との合わせて調整されていると考えられる(Chiang et al., 2001). Retinoid X receptor (RXR) は肝細胞内において多くの役割を担うが、ステロール代謝に関与する一面としては FXR と結合してその下流にある遺伝子発現を調整することが知られている.

肝細胞内における過剰なステロールは、小腸上皮細胞と同様に ABCG5 と ABCG8 によって排泄される (Tsubakio-Yamamoto et al., 2010). 小腸上皮細胞

においてはステロール無群、コレステロール投与群、シトステロール投与群において *abcg5* と *abcg8* の遺伝子発現に有意差が認められた。初期の段階でシトステロールが排泄されている可能性もあるため、肝細胞内にて確認される *abcg5* と *abcg8* 遺伝子の発現の傾向は小腸上皮細胞のものと異なることが予測される。また、ステロールは CYP7A1 の酵素による反応を始め、多様な酵素による化学的反応を受けて胆汁酸へと変換される。生産された胆汁酸は MPR2 によって肝細胞から排泄される。

## 目的

本章ではシトステロールの投与がゼブラフィッシュの肝臓におけるステロール代謝に与える影響を検討することを目的とする。

## 方法

魚の飼育方法、餌の素性、total RNA の抽出、cDNA の合成、リアルタイム PCR の方法は第 1 章のものと同様である。

### 1. サンプルリング

11:00 時に餌の給餌を行い、給餌直前のサンプルリングを 0 としてその後 1 時間、2 時間、5 時間、8 時間後に肝臓の採取を行なった。

5年以内に出版予定

## 第 3 章

ゼブラフィッシュの肝臓における

**FXR 制御機構**の変化



## 本章の背景

前章では植物性ステロール投与時のゼブラフィッシュ肝臓における代謝機構の変化について探索した。その結果、餌由来のシトステロールの摂取は肝臓での遺伝子発現に影響を及ぼすことが明らかとなった。特に *cyp7a1* と *fxr* の遺伝子発現の変化はシトステロールが胆汁酸合成のプロセスへ及ぼす影響を反映するものであると推察できる。FXR の活性の変化は胆汁酸の合成のみならず、その下流にあるタンパク質の遺伝子発現を誘発する。

## FXR によって制御される代謝系

哺乳類における FXR の代謝制御は RXR と胆汁酸に結合することによって進み、主に 5 つの遺伝子発現に関与する。また、遺伝子発現を誘発するだけではなく、代謝を抑制する機能も持ち合わせる。まず前章でも考察された FXR の働きとして、*cyp7a1* の調整がある。RXR と結合し、かつ胆汁酸が十分に供給される場合 small heterodimer partner (SHP) を介して *cyp7a1* の発現を抑制する働きを持つ。逆に捉えると、胆汁酸が本来の量より足りない場合、*cyp7a1* の制御に関わる FXR と RXR が機能を発揮せず、*cyp7a1* の遺伝子発現が行われる可能性がある。その他 FXR と RXR 結合体に制御されるのは Apo-AI と apolipoprotein C III (Apo CIII) の発現である。Apo-AI は小腸上皮細胞において HDL の形成に関与し、肝細胞においてもその量が HDL の目安となっている。HDL は肝細胞にとってコレステロールの供給源でもあり FXR が *apoaia* の働きを抑制することはコレステロールの供給を抑えることにも繋がるとも考えられる。Apo CIII も Apo-AI 同様

に FXR によって発現を抑制される。Apo CIII は very low density lipoprotein (VLDL)の一部であり、機能は肝臓リパーゼの働きを抑えることにある。哺乳類ではその発現が確認されているもの、HDL の形で脂質を輸送し LDL の割合が少ないと考えられているゼブラフィッシュの Apo CIII の遺伝子やタンパク質は現段階において NCBI や Uniprot (<http://www.uniprot.org>) などの主要なデータベースに登録されていない。

FXR が誘発を促すターゲットとなっているのは UDP 一方で、FXR が単独で発現を誘発する系として UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B4 (UGT2b4)と phospholipid transfer protein (PLTP)がある。UGT2b4 はヒオデオキシコール酸、胆汁酸、カテコールエストロゲンのグルクロン酸化に関与する物質である。ゼブラフィッシュにおいて *ugt2b4* は偽遺伝子であり、よって UGT2b4 のタンパク質の発現が認められていない。*Ugt2b1*、*ugt2b3*、*ugt2b5*、*ugt2b6* の遺伝子は確認されているが、FXR の制御によるその発現やさらには餌由来のステロールの影響などは未だ解明されていないのが現状である。FXR と RXR の結合体が誘発する遺伝子は *pltp* である。PLTP は哺乳類においてはリン脂質輸送の役割を果たし、FXR によって発現が誘発される。PLTP に関しては LXR も発現に関与しており、*fxr* 遺伝子の発現量の上昇が直接的に *pltp* の発現に反映されるのかは検討の余地がある。本章では LXR と RXR の発現に関しても合わせて考察する。以上のことより FXR が多方面における代謝制御に関与することが明らかである。

## 本章の目的

本章では *fxr* 遺伝子の発現を基準とし、その後の遺伝子発現の変化を追跡することを基盤とした。FXR 系の代謝は哺乳類では研究されているものの、ゼブラフィッシュにおける知見はまだ少ないと言える。よって本章の目的としてはまずゼブラフィッシュにおける *fxr* 遺伝子の発現の変動がその下流にある遺伝子発現に及ぼす影響を検討することを第一とし、更に餌から投与した植物性ステロールがその予測された代謝経路に変化を及ぼすかを検討することを第二の目的とする。

## 方法

本章の方法は第 1 章及び第 2 章のものに倣う。リアルタイム PCR に使用したプライマーの配列は Table 3-1 に示すとおりである。

5年以内に出版予定

## 参考文献

Abumrad, N.A., Davidson, N.O., 2012. Role of the gut in lipid homeostasis. *Physiol Rev* 92, 1061-1085.

Altmann, S.W., Davis, H.R., Zhu, L.J., Yao, X., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Iyer, S.P., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N., Graziano, M.P., 2004. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 303, 1201-1204.

Berge, K.E., Tian, H., Graf, G.A., Yu, L., Grishin, N.V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R., Hobbs, H.H., 2000. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290, 1771-1775.

Burel, C., Boujard, T., Escaffre, A.M., Kaushik, S.J., Boeuf, G., Mol, K.A., Van der Geyten, S., Kühn, E.R., 2000. Dietary low-glucosinolate rapeseed meal affects thyroid status and nutrient utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br J Nutr* 83, 653-664.

Chiang, J., Kimmel, R., Stroup, D., 2001. Regulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor

(LXRa). Gene 262.

Fournier, V., Huelvan, C., Desbruyeres, E., 2004. Incorporation of a mixture of plant feedstuffs as substitute for fish meal in diets of juvenile turbot ( *Psetta maxima* ). *Aquaculture* 2004, 451-465.

Geay, F., Ferraresso, S., Zambonino-Infante, J.L., Bargelloni, L., Quentel, C., Vandeputte, M., Kaushik, S., Cahu, C.L., Mazurais, D., 2011. Effects of the total replacement of fish-based diet with plant-based diet on the hepatic transcriptome of two European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) half-sibfamilies showing different growth rates with the plant-based diet. *BMC Genomics* 12, 522.

Jesch, E.D., Seo, J.M., Carr, T.P., Lee, J.Y., 2009. Sitosterol reduces messenger RNA and protein expression levels of Niemann-Pick C1-like 1 in FHs 74 Int cells. *Nutr Res* 29, 859-866.

Liang, Y.T., Wong, W.T., Guan, L., Tian, X.Y., Ma, K.Y., Huang, Y., Chen, Z.Y., 2011. Effect of phytosterols and their oxidation products on lipoprotein profiles and vascular function in hamster fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis* 219, 124-133.

Llaverias, G., Escola-Gil, J.C., Lerma, E., Julve, J., Pons, C., Cabre, A., Cofan, M., Ros, E., Sanchez-Quesada, J.L., Blanco-Vaca, F., 2013. Phytosterols inhibit the tumor growth and lipoprotein oxidizability induced by a high-fat diet in mice with inherited breast cancer. *J Nutr Biochem* 24, 39-48.

Lombardi, P., Sijbrands, E.J., van de Giessen, K., Smelt, A.H., Kastelein, J.J., Frants, R.R., Havekes, L.M., 1995. Mutations in the low density lipoprotein receptor gene of familial hypercholesterolemic patients detected by denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing. *J Lipid Res* 36, 860-867.

Morais, S., Monroig, O., Zheng, X., Leaver, M.J., Tocher, D.R., 2009. Highly unsaturated fatty acid synthesis in Atlantic salmon: characterization of ELOVL5- and ELOVL2-like elongases. *Mar Biotechnol* 1.

Nassier, F., Abumrad, N., 2009. CD36 and Intestinal Fatty Acid Absorption. *Immun, Endoc. & Metal. Agents in Med. Chem* 9, 3-10.

O'Hare, E.A., Wang, X., Montasser, M.E., Chang, Y.P., Mitchell, B.D., Zaghloul, N.A., 2014. Disruption of *ldlr* causes increased LDL-c and vascular lipid accumulation in a zebrafish model of hypercholesterolemia. *J Lipid Res*

55, 2242-2253.

Otis, J.P., Zeituni, E.M., Thierer, J.H., Anderson, J.L., Brown, A.C., Boehm, E.D., Cerchione, D.M., Ceasrine, A.M., Avraham-Davidi, I., Tempelhof, H., Yaniv, K., Farber, S.A., 2015. Zebrafish as a model for apolipoprotein biology: comprehensive expression analysis and a role for ApoA-IV in regulating food intake. *Dis Model Mech* 8, 295-309.

Ozyurt, G., Kuley, E., Etyemez, M., Ozoğul, F., 2013. Comparative seasonal sterol profiles in edible parts of Mediterranean fish and shellfish species. *Int J Food Sci Nutr* 64, 476-483.

Pedroso, G., Hammes, T., Escobar, T., Fracasso, L., Forgiarini, L.F., da Silveira, T., 2012. Blood Collection for Biochemical Analysis in Adult Zebrafish. *Journal of Visualized Experiments* 63, 1-3.

Plat, J., Mensink, R.P., 2002. Increased intestinal ABCA1 expression contributes to the decrease in cholesterol absorption after plant stanol consumption. *FASEB J* 16, 1248-1253.

Santamarina-Fojo, S., Remaley, A.T., Neufeld, E.B., Brewer, H.B., Jr., 2001. Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter. *J Lipid Res* 42, 1339-1345.



Temel, R.E., Gebre, A.K., Parks, J.S., Rudel, L.L., 2003. Compared with Acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase (ACAT) 1 and lecithin:cholesterol acyltransferase, ACAT2 displays the greatest capacity to differentiate cholesterol from sitosterol. *J Biol Chem* 278, 47594-47601.

Torrecillas, S., Robaina, L., Caballero, M., Montero, D., Calandra, G., Mompel, D., Karalazos, V., Kaushik, S., Izuquierdo, M.S., 2017. Combined replacement of fishmeal and fish oil in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Production performance, tissue composition and liver morphology. *Aquaculture* 474, 101-112.

Tsubakio-Yamamoto, K., Nishida, M., Nakagawa-Toyama, Y., Masuda, D., Ohama, T., Yamashita, S., 2010. Current therapy for patients with sitosterolemia--effect of ezetimibe on plant sterol metabolism. *J Atheroscler Thromb* 17, 891-900.

Wang, Z., Du, J., Lam, S.H., Mathavan, S., Matsudaira, P., Gong, Z., 2010. Morphological and molecular evidence for functional organization along the rostrocaudal axis of the adult zebrafish intestine. *BMC Genomics* 11, 392.

Weber, L.W., Boll, M., Stampfl, A., 2004. Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins. *World J*

Gastroenterol 10, 3081-3087.

Yang, C., Yu, L., Li, W., Xu, F., Cohen, J.C., Hobbs, H.H., 2004. Disruption of cholesterol homeostasis by plant sterols. *J Clin Invest* 114, 813-822.

Zhao, C., Dahlman-Wright, K., 2010. Liver X receptor in cholesterol metabolism. *J Endocrinol* 204, 233-240.