

魚類における体脂肪蓄積機構の解明

奥 宏海*

Molecular and cellular mechanisms of body lipid accumulation in fish

Hiromi OKU

Abstract Lipid is a main component of fish body, which affects flesh quality of cultured fish. In lipid accumulation process in fish body, the activation of various adipogenic genes and the enlargement of lipid storing tissues are postulated to be involved. In this study, we investigated the molecular and cellular aspects of body lipid accumulation process in red sea bream *Pagrus major*. Firstly, to investigate molecular mechanism of lipid accumulation in fish, various adipogenic genes including lipoprotein lipase (LPL1, LPL2), fatty acid synthetase (FAS) and fatty acid desaturase (d6DES, SCDa, SCDb) were characterized in red sea bream. The expression of identified adipogenic genes were, different from those of mammals, detected in various tissues including adipose tissue, hepatopancreas and muscle in red sea bream, suggesting the mechanism of body lipid deposition in fish contains different features from that in mammals. Subsequently, to investigate the cellular aspects of lipid accumulation in fish, the differentiation process of adipocyte, a main site of lipid storage, was analyzed *in vitro* by using primary culture system. In cultured red sea bream adipocytes, the differentiation was enhanced by insulin and the adipogenic gene expression including LPL, FAS, d6DES were activated in differentiation-dependent manner. Furthermore, their expression could be modified by Br-palmitate, a non-metabolic fatty acid. These results provide information on the molecular and cellular mechanisms of lipid accumulation process in fish body.

Key words : lipid metabolism, lipid accumulation, gene, adipocyte, cell culture

飼料より摂取した脂質は生体内でエネルギーとして利用される一方、その余剰分は体脂肪として蓄積される。魚体への脂肪蓄積機構を解明し、適切に体脂肪蓄積をコントロールすることは、品質向上など養殖魚の飼養技術を考える上で重要である。魚体脂肪蓄積にはさまざまな要因が関係すると考えられるが、とりわけ飼料の影響は大きく、これまでも養殖魚を対象とした体脂肪蓄積に関する研究は飼料の影響を中心に数多く報告されている。我々の研究室においても飼料脂質含量と魚体脂肪蓄積の関係を検討し (Oku and Ogata, 2000)、飼料脂質含量、すなわち摂取脂質量が増加すると、それに応じて体脂肪含量は増加することを明らかにした (Fig.1)。こうした飼育試験や体成分分析による魚体脂肪蓄積に関する研究と比べ、細胞や分子レベルでの脂質蓄積機構に関しては研究が端緒についたばかりでもあり報告は少ない。我々の研究室では、養殖魚における体脂肪蓄積機構を解明する目的で、代表的な養殖魚マダイを中心に分子・細胞レベルでの解析を行った。

代謝酵素から見た脂質の蓄積機構

代謝酵素から見た脂質の蓄積機構

食餌より摂取した脂質は消化・吸収後、リポタンパク質として血中を輸送され、末梢組織に取り込まれる。リポタンパク質中の脂質は血管上に存在するリポタンパク質リパーゼ (LPL) の働きにより分解され脂肪組織など様々な組織に取り込まれる。

本研究では、まずクローニング解析により、マダイ LPL 遺伝子の構造的特徴や組織分布を明らかにした (Oku et al. 2002, Oku et al. 2006a)。マダイ脂肪組

織から構造的に類似した2種類のLPL様遺伝子(LPL1, LPL2)が単離され、肝性リパーゼ(HL)や膵リパーゼ(PL)とともに組織分布を調べると、2種のLPLはいずれも魚体内各組織に広範に分布することが明らかとなった (Fig.2)。2種類の遺伝子は発現量が異なり、脂肪組織、肝臓、筋肉の組織においてLPL1の方が約10倍程度高いことのほか、明確な違いが見られず現時点ではその機能的な差異は明らかとなっていない (Oku et al. 2006a)。しかし、いずれの遺伝子も一次構造や組織分布に哺乳類LPLとの間に類似が見られることから、血中リポタンパク質代謝と組織への脂肪取

り込みに関与するものと考えられた。

魚体に蓄積される脂肪は食餌に由来するもの他に糖などを基質として新規合成されるものも含まれる。食餌由来の脂質や新規合成された脂質は生体内で不飽和化などの生変換過程を経て蓄積される。脂肪酸合成、糖利用および脂肪酸不飽和化に関与する遺伝子についてもマダイよりクローニングし、組織分布を決定したところ、高度不飽和脂肪酸生成に関与するd6-不飽和化酵素を除き明瞭な組織特異性は見られず、これらの酵素は魚体内各組織に広く分布するものと考えられる (Fig.2)。

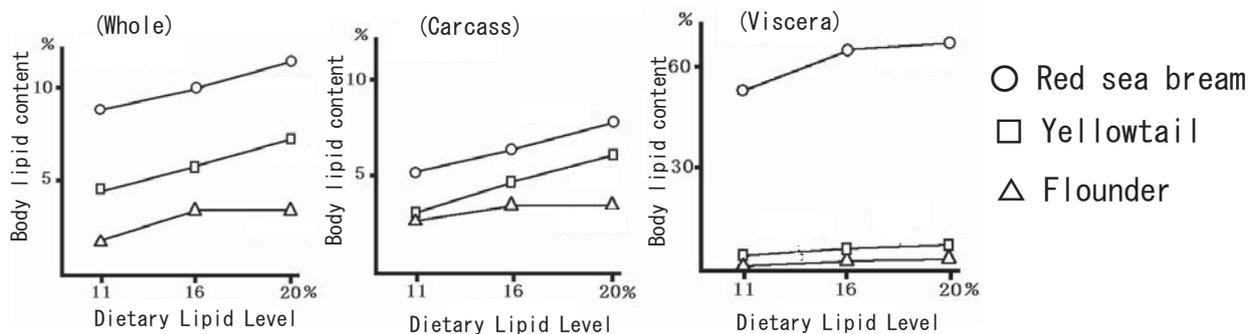


Fig.1. The relationship between dietary lipid levels and body lipid contents. The three diets which has different dietary lipid level (11, 16 and 20%) were fed to the juveniles of red sea bream (○), yellowtail (□) and Japanese flounder (△), and the lipid contents of whole body, carcass and viscera parts were analyzed. The feeding periods are 6weeks (red sea bream and Japanese flounder) or 4 weeks (yellowtail).

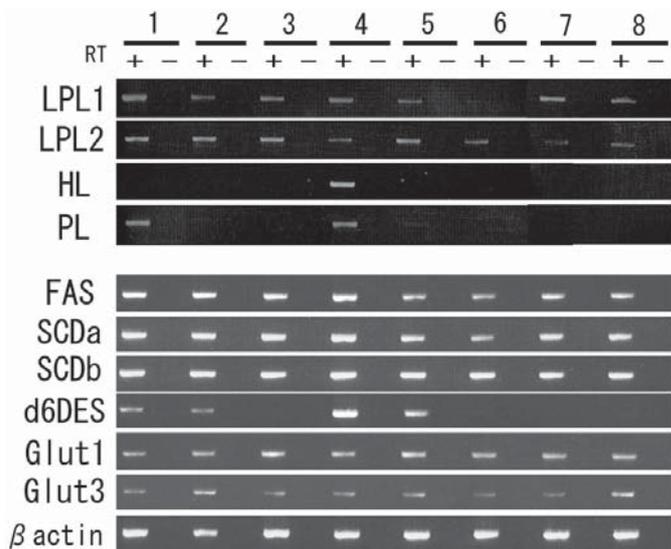


Fig.2. The tissue specificities of the adipogenic gene expression in red sea bream. The tissue specificities were determined by RT-PCR analyses. The gene expression of two lipoprotein lipases (LPL1, LPL2), hepatic lipase (HL) and pancreatic lipase (PL) were detected by 30 cycle amplifications whereas those of fatty acid synthetase (FAS), two stearoyl-CoA desaturases (SCDa and SCDb), delta-6-desaturase (d6DES), two glucose transporters (Glut1, Glut3) and beta actin were detected by 40cycle amplifications. The examined tissues were 1) adipose tissue, 2) gill, 3) heart, 4) hepatopancreas, 5) gonad of young fish, 6) muscle, 7) ovary and 8) testis.

魚類脂肪細胞の初代培養系の確立

魚体への脂肪蓄積を考える上で魚体内の主要な蓄積器官である脂肪組織の発達機構を解明することも重要である。マダイの場合、脂肪組織は腹腔内脂肪組織として存在する他、皮下や筋肉間にも分布する。脂肪組織を構成する脂肪細胞を解析する場合、個体を用いた解析では個体の生理状態や内分泌環境の影響を受けるため、その特性を把握することは困難である。そこで我々はまず、生体から切り離した初代培養系の確立を行った (Oku et al. 2006b)。

Fig.3 にマダイ前駆脂肪細胞の初代培養の概略を示す。マダイ腹腔内脂肪組織から調整した前駆脂肪細胞は比較的容易に培養系に移すことができ、細胞接着後、ウシインスリンおよびヒドロコルチゾン含有無血清培地で培養することにより分化時の特徴である細胞内への脂肪蓄積が確認された。脂肪細胞分化はインスリン濃度依存的に促進され、これらのことから、マダイ初代培養前駆脂肪細胞は培養条件下においても脂肪蓄積能やホルモンへの応答性を保持していることがわかった (Fig.4)。

マダイ脂肪細胞における機能発現とその制御

確立した初代培養系を用い、これまでにマダイより同定した代謝関連遺伝子の発現と脂肪細胞分化の関係について検討した。Table 1 に示したように、マダイ脂肪細胞分化に伴い、様々な遺伝子発現の変動が見られた。分化誘導後の時間経過に応じて LPL や FAS などの脂質代謝に関与する遺伝子の発現は上昇し、脂肪細胞分化に依存して、脂質代謝機能が発現してくるものと考えられる。また、グルコース輸送担体 (Glut) や細胞骨格系 (β actin) の遺伝子発現にも変動が見られることから、糖代謝や細胞形態に関しても脂肪細胞分化に伴い機能変化が起こることが示唆された。

多くの脂質代謝関連遺伝子はリガンド依存型転写因子 PPAR の制御下にあることが知られており、哺乳類においてはプロスタグランジンなどの脂肪酸代謝物やフィブラート系化合物等が PPAR リガンドとして知られている。マダイ脂肪細胞においても PPAR 作動薬の一つである非代謝性脂肪酸・臭化パルミチン酸を添加することにより機能遺伝子発現への影響が認められた (Fig.5)。脂肪酸合成酵素 (FAS) や脂肪酸不飽和化酵

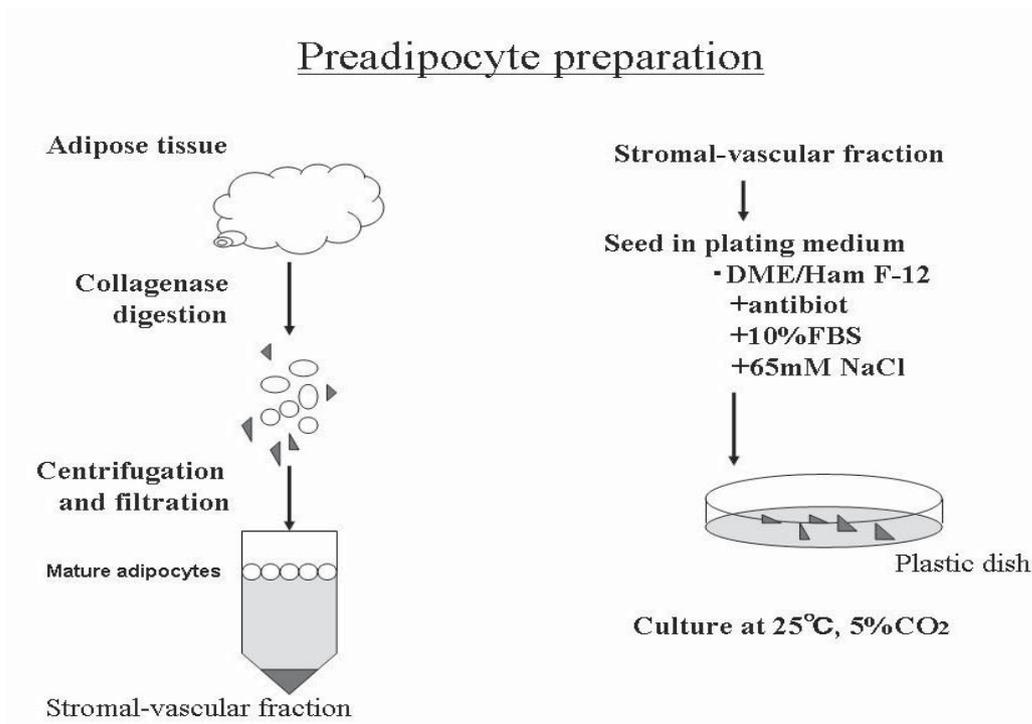


Fig.3. The outline of the preparation procedure for red sea bream preadipocytes. The primary cultured preadipocytes were prepared from visceral adipose tissue of red sea bream. The adipose tissue were minced and digested with collagenase. After purification by filtration and centrifugation, stromal-vascular fraction was seeded in serum-containing culture medium. The attached preadipocytes were cultured at 25°C under the 5%CO₂-95% air condition.

素 (d6DES, SCDa, SCDb) などの発現上昇が認められる一方、2種類のLPLに関しては、LPL1は発現上昇するがLPL2は影響されず、それぞれ異なる発現制御を受けていることが示唆された。これらは培養条件下での結果であるが、今後解析が進むとともに、個体レベルにおいても各遺伝子の発現制御の特性を利用した選択的な機能発現の制御が可能になるものと期待される。

おわりに

この研究では養殖魚マダイを用い、魚類における体脂肪蓄積機構を解明することを目的とした。LPLはじめ

多くの代謝酵素が同定されたが、その組織分布は哺乳類のものとは異なり、魚類における脂質代謝機構が必ずしも哺乳類と一致しないことを示唆する。また、魚類脂肪細胞の初代培養系が確立されたことにより、今後細胞レベルでの魚類脂質代謝機構の解明やその人為的制御への研究の発展が期待される。脂肪組織は脂質の蓄積・代謝を行う場であるとともに内分泌臓器としても個体の恒常性維持に重要な働きをすることが知られる。脂肪組織の発達や機能発現機構を解明し、適切な利用を図ることは今後新しい視点から見た飼養技術の高度化につながるものと考えられる。

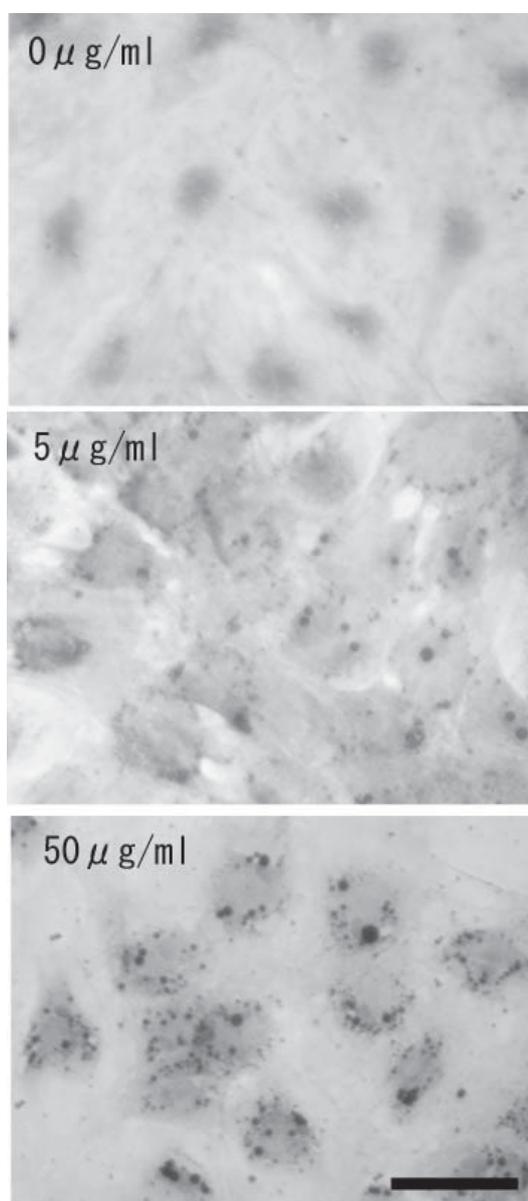


Fig.4. The cellular lipid accumulation by insulin in red sea bream adipocytes. The primary cultured preadipocytes were cultured in a serum-free differentiation medium containing 50ng/ml hydrocortisone and the indicated amounts of bovine insulin for 2 weeks. The cells were stained with sudan black B and nuclear fast red. The bar indicates 50 μ m.

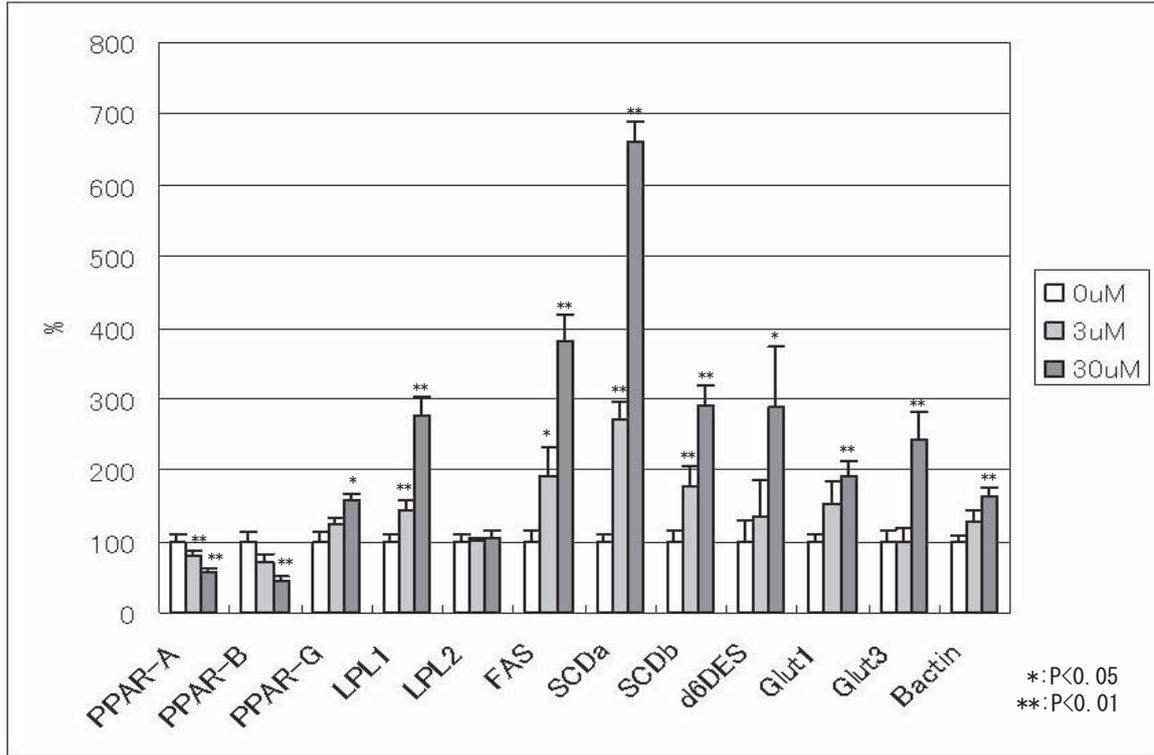


Fig.5. The effects of bromo-palmitate on the adipogenic gene expression in the differentiating adipocytes of red sea bream *in vitro*. The effects of bromo-palmitate on the early process of adipocyte differentiation were investigated. The primary cultured red sea bream preadipocytes were cultured in a differentiation medium for 3days in the presence of the indicated amounts of bromo-palmitate and the relative expression levels of adipogenic genes were analyzed.

Table.1.

The changes in the expression levels of adipogenic genes during adipocyte differentiation of red sea bream *in vitro*

Transcription factor	Fatty acid desaturation
PPAR a ↑ ↓	SCD a ↑
PPAR b ↑	SCD b ↑
PPAR g →	d6DES ↑
Cellular lipid uptake	Glucose transport
LPL1 ↑	Glut1 ↓
LPL2 ↑	Glut3 →
Lipid synthesis	Cytoskelton
FAS ↑	Beta actin ↓

The arrows indicates, respectively, transient increase (↑ ↓), up-regulated (↑), down-regulated (↓) and preserved (→).

文 献

- Oku H. and Ogata H. Y., 2000: Body lipid deposition in juvenile of red sea bream *Pagrus major*, yellowtail *Seriola quinqueradiata*, and Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.* **66**, 25-31.
- Oku H., Ogata H. Y. and Liang X. F., 2002: Organization of the lipoprotein lipase of red sea bream *Pagrus major*. *Comp. Biochem. Physiol.* **131B**, 775-785.
- Oku H., Koizumi N., Okumura T., Kobayashi T. and Umino T., 2006a: Molecular characterization of lipoprotein lipase, hepatic lipase and pancreatic lipase: Effects of fasting and refeeding on their expression in red sea bream *Pagrus major*. *Comp. Biochem. Physiol.* **145B**, 168-178.
- Oku H., Tokuda M., Okumura T., Umino T., 2006b: Effects of insulin, triiodothyronine and fat soluble vitamins on adipocyte differentiation and LPL gene expression in the stromal-vascular cells of red sea bream, *Pagrus major*. *Comp. Biochem. Physiol.* **144B**, 326-333.