

博士論文

マダイ脂肪細胞の分化と機能発現機構に関する研究

平成 21 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物資源科学専攻

奥 宏海

## 目次

要旨 (和文) . . . . .	1
要旨 (英文) . . . . .	4
略記一覧 . . . . .	8
序論 . . . . .	9
第 1 章 脂肪組織における脂質代謝関連遺伝子の同定 . . . . .	11
材料と方法 . . . . .	12
結果 . . . . .	15
考察 . . . . .	16
第 2 章 脂肪細胞分化誘導系の確立 . . . . .	26
材料と方法 . . . . .	27
結果 . . . . .	29
考察 . . . . .	30
第 3 章 脂肪細胞分化の分子機構と転写因子 PPAR の役割 . . . . .	37
材料と方法 . . . . .	38
結果 . . . . .	41
考察 . . . . .	43
第 4 章 2-bromopalmitate を用いた脂肪細胞における機能改変の試み . . . . .	56
材料と方法 . . . . .	57
結果 . . . . .	59
考察 . . . . .	60
総合考察 . . . . .	76
謝辞 . . . . .	80
引用文献 . . . . .	81

## 要旨 (和文)

魚類における脂肪組織は脂質蓄積や代謝の中心臓器であり、また養殖魚においては産物の品質を決定する一因である。それゆえ脂肪細胞の分化や機能発現機構を解明し、適切に制御することは今後新しい視点から見た飼養技術の確立に有用である。しかしながら、哺乳類や鳥類においては株化した前駆脂肪細胞や生体から分離した初代培養細胞を用い、脂肪細胞の分化・機能発現とその制御機構に関して多くの成果が報告されている一方、魚類においては培養法に関する数例の報告はあるものの脂肪細胞分化の研究は端緒にすぎたばかりであるため、知見は少ない。そこで本研究では魚類脂肪細胞の分化や機能発現機構を解明することを目的に、海産魚マダイを用い、初代細胞培養系を中心に脂肪細胞分化の分子機構、機能発現機構およびその制御機構について解析を行った。第 1 章および第 2 章では分子指標の単離・同定と初代培養法による前駆脂肪細胞の分化誘導系の確立を行った。第 3 章では脂肪細胞分化と機能発現の分子機構を解析し、第 4 章では外部因子による機能発現制御の可能性について検討した。

### 第 1 章 脂肪細胞における脂質代謝関連遺伝子の同定

第 1 章ではマダイ脂肪細胞分化や機能発現解析における分子指標を得るため、脂質蓄積関連遺伝子の同定を中心に行った。脂肪蓄積系の遺伝子として、まず細胞への脂肪酸取り込みに関与するリポタンパク質リパーゼ (LPL) 遺伝子を単離した。マダイではこれまで 1 種の LPL 様の遺伝子 (LPL2) がすでに報告されていたが、新たに LPL1 種 (LPL1) を同定し、肝性リパーゼ (HL)、腓リパーゼ (PL) と併せて、リパーゼ遺伝子族の全体構成を含めてその特性を明らかにした。また発現解析により 4 種類のマダイリパーゼのうち 2 種類の LPL 様遺伝子が脂肪細胞で発現されることを確認した。その他に脂肪酸合成 (FAS)、デルタ 6 脂肪酸不飽和化酵素 (d6DES)、デルタ 9 脂肪酸不飽和化酵素 2 種 (SCDa および SCDb) および糖輸送担体 2 種 (Glut1 および Glut3) の遺伝子を PCR 法により脂肪組織から単離した。腹腔内脂肪組織においてこれらの遺伝子発現が確認されたことから、脂肪組織は脂肪酸生合成や不飽和化などの生変換機能を有すると考えられた。第 1 章で同定した脂質代謝関連遺伝子はいずれも脂肪蓄積での主要経路に関与するものであり、以降の解析において分子指標として使用した。

### 第 2 章 脂肪細胞分化誘導系の確立

脂肪細胞は元々繊維芽様の前駆脂肪細胞に由来し、その分化過程において細胞内への脂肪蓄積とともに脂質代謝など様々な機能を発現する。しかし個体を用いた解析では、生理状態や複雑な内分泌環境の影響を受けるため、その特性を把握するのは困難である。そこで第 2 章では、マダイ脂肪細胞の分化過程を生体から切り離して解析するための実験系として初代培養細胞による分化誘導系を確立し、ホルモン等の脂肪細胞分化に及ぼす影響を

調べた。マダイ腹腔内脂肪組織より調整した初代培養前駆脂肪細胞を無血清、インスリン存在下において培養すると1-2週間で脂肪酸合成による脂肪蓄積が観察された。また、細胞への脂肪蓄積はインスリンにより濃度依存的に促進された。これによりマダイ脂肪細胞はホルモン等への応答性を保持した状態で培養系に移すことができ、その分化過程を培養条件下で再現することが可能となった。培養マダイ脂肪細胞において LPL 遺伝子 (LPL1) は分化依存的発現を示した。これを指標としてインスリン、 $T_3$  および脂溶性ビタミン (all-*trans*-retinoic acid, retinyl acetate および  $1,25(OH)_2D_3$ ) の脂肪細胞分化への影響を検討したところ、インスリンは濃度依存的に分化を促進し、 $T_3$  はインスリンとの併用により促進効果を示した。哺乳類の場合と異なりマダイでは脂溶性ビタミン類については効果を示さず、脂肪細胞の分化機構に違いがあることが示唆された。

### 第3章 脂肪細胞分化の分子機構と転写因子 PPAR の役割

脂質代謝関連遺伝子の多くはリガンド依存型転写因子であるペルオキシゾーム増殖因子受容体 (PPAR) によって転写レベルで制御されることが知られる。第3章ではマダイ PPAR が脂肪細胞分化と機能発現に果たす役割を中心に脂肪細胞分化の分子機構について検討した。はじめにマダイ脂肪組織から PPAR 遺伝子3種 ( $\alpha$ 、 $\beta$  および  $\gamma$ ) をクローニングし、構造的特徴を明らかにした。全体的な一次構造は各サブタイプとも哺乳類のものと同じ性を示したがマダイ PPAR $\gamma$  ではヒト PPAR $\gamma$  と比べリガンド結合部位に24個のアミノ酸付加が存在し、リガンド特性に差異があることが示唆された。初代培養系を用い、脂肪細胞分化における脂質蓄積関連遺伝子発現の経時変化を調べたところ、脂肪取り込み (LPL1、LPL2)、脂肪酸合成 (FAS) および脂肪酸不飽和化 (d6DES、SCDa、SCDb) の遺伝子発現は分化依存的に発現が上昇し、脂肪細胞分化に伴いそれらの機能が伴ってくることを示された。その過程で3種の PPAR 遺伝子はそれぞれ異なる発現動態を示し、 $\alpha$  サブタイプは一過性の上昇、 $\beta$  サブタイプは増加傾向を示したが  $\gamma$  サブタイプの発現レベルに変化は見られなかった。これらの発現動態から各サブタイプは脂肪細胞分化において異なる役割を持つことが示唆された。哺乳類 PPAR 作動薬を用いて PPAR および下流の脂質代謝遺伝子への影響を調べたところ、15d-PGJ<sub>2</sub>、Ciglitazone、および Fenofibrate は明瞭な効果は示さなかったが、非代謝性脂肪酸 2-bromopalmitate はマダイ脂肪細胞 PPAR $\gamma$  および脂質蓄積関連遺伝子の遺伝子発現を増加させた。このことから、マダイ脂肪細胞における機能発現には  $\gamma$  サブタイプが関与することが示唆されるとともに、脂肪酸代謝物による人為的な機能発現制御の可能性が示唆された。

### 第4章 2-bromopalmitate を用いた脂肪細胞における機能改変の試み

第4章では前章での 2-bromopalmitate による脂肪蓄積関連遺伝子の作動が実際に細胞の形質に影響を及ぼすかどうかを調べた。この章では脂肪酸合成と脂肪酸生変換機能についてその特性と 2-bromopalmitate の及ぼす影響を解析し、外部因子を用いた脂肪細胞の機能

発現における人為的制御の可能性について検討した。分化時のマダイ脂肪細胞における脂肪酸合成過程では細胞内へのグルコース取り込みの増加や脂肪酸 16:1 の含量増加が見られ、こうした特徴から、脂肪酸新規合成の特徴は哺乳類のものと類似していると考えられた。脂肪酸合成過程では 2-bromopalmitate 添加により PPAR $\gamma$ 、FAS および SCDa の発現上昇が見られたが、その感受性は遺伝子ごとに異なり、最も高い SCDa では約 6 倍の発現上昇を示した。その過程で 2-bromopalmitate は細胞への脂肪蓄積（トリグリセリド含量）には影響を示さなかったが、SCDa 産物である脂肪酸 16:1 の含量増加を促進した。蓄積脂肪酸の生変換機構を解析するためマダイ脂肪細胞に脂肪酸 18:3n-3 または 18:2n-6 を取り込ませると、それに応じて取り込んだ脂肪酸含量が増加するが、デルタ 6 不飽和化（それぞれ 18:4n-3 または 18:3n-6）および C18-20 鎖長延長（それぞれ 20:3n-3 または 20:2n-6）産物の生成が認められ、脂肪酸生変換能力を有していることが確認された。2-bromopalmitate 添加はデルタ 6 不飽和化および C18-20 鎖長延長に対して効果はなかったが、18:3n-3 を取り込ませた細胞では SCDa の遺伝子発現上昇とその産物である 16:1 および 18:1 の含量が増加した。一方 18:2n-6 を取り込ませた細胞では 2-bromopalmitate 添加は脂肪蓄積系の遺伝子発現に顕著な影響を与えず、2-bromopalmitate による遺伝子作動効果は共存する脂肪酸により影響されることが示唆された。本章の結果は、投与条件等に検討の余地があるものの、外部因子による機能発現制御が可能であることを示している。

本研究を通して脂肪細胞分化や機能発現の分子機構について、その一端が明らかになった。マダイ脂肪細胞分化に関して、脂肪酸合成・取り込みなど脂肪蓄積の全体的特徴は哺乳類と類似することが明らかになったほか、2 種類の LPL 様遺伝子の発現、脂溶性ビタミンへの応答性や PPAR のリガンド特性などいくつかの相違点を示唆する結果も得られており、今後の解析が期待される。現在、養殖魚において脂質代謝機能の強化・改変は品質向上技術や代替飼料原料開発の観点から、脂肪酸やその代謝物・修飾物などを用いた代謝制御研究が主に飼育試験を通して試みられているのが現状である。様々な物質を候補としてスクリーニングする場合、本研究で開発した手法は代謝メディエーターの効率的開発への一つの道筋をつけたものと位置づけられる。すなわち、培養系を用い、遺伝子発現や形質評価などを小スケールで行い、ある程度結果の予測をもって飼育試験などの実証研究をおこなうことが可能となった。本研究は将来的な、養殖魚における有用形質の機能発現制御とその応用研究に貢献するものと考えている。

## 要旨 (英文)

### ***In vitro* study on adipocyte differentiation and expression of adipogenic functions in red sea bream (*Pagrus major*) adipocytes.**

#### **Abstract**

Adipocytes play a central role in lipid metabolism in fish as a major site of body lipid deposition. Moreover, the number and distribution of adipocytes in fish body are critical factors to determine the meat quality of aquaculture products. The eventual control of adipocyte development in fish and the utilization of their adipogenic function will contribute to the development of new farming technologies. Although adipocyte differentiation has been extensively investigated in mammals, so far, only limited information is available in fish. In this study, the molecular mechanisms of adipocyte differentiation and the expression of adipogenic functions in red sea bream adipocytes were investigated by using a primary culture system.

#### **1. Identification of adipogenic genes**

In chapter 1, to obtain molecular probes for investigation of adipocyte differentiation, we identified adipogenic genes in red sea bream. Firstly, we characterized the lipoprotein lipase (LPL) gene which is involved in cellular lipid uptake in adipocytes. While a LPL-like gene (LPL2) has been already identified in this species, in this study, we cloned another type of LPL gene (LPL1). Furthermore, by characterizing hepatic (HL) and pancreatic lipases (PL) in addition to LPL genes, the phylogenetic relationship of the lipase gene family and the tissue specificities of each gene were determined. The RT-PCR analyses revealed that both LPL1 and LPL2 genes were expressed in the red sea bream adipocytes. Subsequently, the adipogenic genes for fatty acid synthesis (FAS), delta-6- (d6DES) and delta-9-desaturation (SCDa and SCDB) of fatty acids and glucose transport (Glut1 and Glut3) were cloned by PCR from red sea bream adipose tissue. The expression of these genes in adipose tissue indicates that the adipose tissue has an ability of biosynthesis and bioconversion of fatty acids. The adipogenic genes identified herein were used for subsequent analyses.

#### **2. Adipocyte differentiation *in vitro***

Adipocytes are derived from fibroblast-like preadipocytes. Accompanying with the differentiation, adipocytes accumulate cellular lipid and express their adipogenic functions. For the investigation of adipocyte differentiation process in fish, the

development of an *in vitro* experimental system will be useful since it can be eliminate the *in vivo* influences of physiological and endocrine factors. In chapter 2, we developed a serum-free culture system of stromal-vascular cells (preadipocytes) of red sea bream visceral adipose tissue and examined the effects of hormones and fat-soluble vitamins on the adipocyte differentiation. In the presence of bovine insulin, the lipid accumulation in the cytoplasm by cellular lipid synthesis was observed in red sea bream preadipocytes within 1-2 weeks. During 2 week cultivation, bovine insulin promoted lipid accumulation in differentiating adipocytes dose-dependently. These results indicate that the red sea bream preadipocytes can undergo adipocyte differentiation *in vitro* in response to hormonal treatment. By using primary cultured red sea bream preadipocytes, the effects of insulin, T<sub>3</sub>, and fat-soluble vitamins (all-*trans* retinoic acid, retinyl acetate and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>) on the differentiation-linked expression of the lipoprotein lipase (LPL1) gene were investigated. As assessed by the increase in LPL gene expression level, like in mammalian adipocytes, insulin enhanced the adipocyte differentiation in a concentration-dependent manner. T<sub>3</sub> alone had no effect but enhanced the differentiation-linked LPL gene expression in the presence of insulin. Fat-soluble vitamins, unlike in mammalian adipocytes, did not show any significant effects, suggesting the regulation of fish adipocyte differentiation by fat-soluble vitamins may differ from that of mammals.

### **3. Roles of PPARs in the adipocyte differentiation**

Adipogenic gene expression is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at a transcriptional level. In chapter 3, the roles of PPARs in red sea bream adipocyte differentiation and in the expression of adipogenic function were investigated. The three subtypes of PPAR genes ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) were identified in red sea bream. The structure analyses revealed that red sea bream PPARs exhibited high degrees of similarities with their mammalian counterparts. In comparison with human PPAR $\gamma$ , red sea bream PPAR $\gamma$  contains an additional 24 amino acid residues in the ligand binding region, suggesting the ligand-binding property may differ from that of mammals. During the differentiation of primary cultured red sea bream adipocytes, the genes for cellular lipid uptake (LPL1 and LPL2), fatty acid synthesis (FAS) and fatty acid desaturation (d6DES, SCDa and SCDB) showed a differentiation-linked expression, indicating the adipogenic functions were expressed in association with adipocyte differentiation. In this process, the three PPARs showed distinct expression patterns: the  $\alpha$  subtype showed a transient increase and the  $\beta$  gene expression tended to increase during adipocyte differentiation whereas the gene expression level of PPAR $\gamma$  did not

change. These results suggest that they play distinct roles in adipocyte differentiation in red sea bream. In the differentiating red sea bream adipocytes, mammalian PPAR agonists, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub>, ciglitazone and fenofibrate did not show clear effects on the adipogenic gene expression. However, 2-bromopalmitate, a non-metabolic fatty acid, increased the PPAR $\gamma$  and related adipogenic gene expression levels, suggesting the  $\gamma$  subtype plays a central role in red sea bream adipocyte differentiation and, in addition, fatty acid metabolites can be used as modulators of adipocyte function.

#### **4. Effects of 2-bromopalmitate on the adipogenic function in the differentiating adipocytes**

In chapter 4, to determine whether external factors affect the adipogenic function of fish adipocytes, the effects of 2-bromopalmitate (a PPAR agonist) on the biosynthesis and bioconversion of fatty acids in differentiating adipocytes of red sea bream were investigated *in vitro*. Firstly, we analyzed the fatty acid synthesis in differentiating adipocytes of red sea bream. During the adipocyte differentiation in a medium without lipid supplementation, the primary cultured red sea bream stromal-vascular cells accumulated lipid within 2 weeks by fatty acid synthesis. In the differentiating adipocytes of red sea bream, like in mammalian adipocytes, the cellular glucose uptake and the relative amounts of fatty acid 16:1 increased. With the level of 2-bromopalmitate, the 16:1 content increased in association with the increase in the stearoyl CoA desaturase (SCDa) gene expression level while the triglyceride accumulation was not affected. Subsequently, the bioconversion of stored fatty acids was examined. In the presence of 300  $\mu$ M of 18:3n-3 or 18:2n-6, red sea bream stromal-vascular cells accumulated the lipid in the cytoplasm within 3 days by fatty acid uptake with the increase of corresponding fatty acid contents. In the 18:3n-3 accumulated cells, the SCDa gene expression level and the 16:1 and 18:1 contents increased with the level of 2-bromopalmitate but the production of n-3 metabolites, such as 18:4n-3 and 20:3n-3, was not stimulated. Differently, in the 18:2n-6 accumulated cells, the adipogenic gene expression was not affected by 2-bromopalmitate, suggesting that the effects of 2-bromopalmitate were affected by the stored fatty acid species. Taken together, the results indicate that the adipocyte function in fish, e.g. adipogenic gene expression and fatty acid composition, can be modified by external factors.

#### **Conclusion**

In this study, we provided molecular information on the mechanisms of adipocyte differentiation and the expression of adipogenic function in red sea bream adipocytes. The results indicates that the overall mechanism of red sea bream adipocyte differentiation is similar to that of mammals but differs in several respects, such as the expression of two LPL genes, sensitivity to fat soluble vitamins and ligand binding property of PPARs. Recently, studies on the modification of metabolic function by external factors have been extensively conducted in fish for the development of new dietary ingredients and improvement of the meat quality of aquaculture products. For these researches, our strategy will be useful as a pilot experimental system; prior to *in vivo* evaluation by long-term feeding experiments, we can predict the effects of a possible mediator by small scale and short term *in vitro* experiments. Our study will facilitate further study for the eventual control of useful functions of adipocytes in cultured fish.

## 略記一覧

- TG : triglyceride (トリグリセリド)
- LPL : lipoprotein lipase (リポタンパク質リパーゼ)
- HL : hepatic lipase (肝性リパーゼ)
- PL : pancreatic lipase (膵リパーゼ)
- EL : endothelial lipase (内皮由来リパーゼ)
- FAS : fatty acid synthetase (脂肪酸合成酵素)
- d6DES : delta-6 desaturase (デルタ 6 不飽和化酵素)
- SCD : stearoyl-CoA desaturase (ステアロイル CoA 不飽和化酵素)
- Glut : Glucose transporter (糖輸送担体)
- PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor (ペルオキシゾーム増殖因子受容体)

## 序論

魚類にとっての脂肪組織は主要な脂質蓄積・代謝器官であり、個体の恒常性維持に重要な働きをする。また、脂肪組織は皮下や筋肉間など魚体各部に分布し、養殖魚にとっては産物の品質を決定する一因となっている (Yamada and Nakamura 1964, Zhou et al. 1996)。したがって魚類における脂肪組織の生理機能やその発達機構を解明し、適切に脂肪組織の発達や機能発現を制御することは今後新しい視点からみた飼養技術開発に資するものと期待される。

脂肪組織を構成する主要な細胞は脂肪細胞(adipocyte)である。成熟した脂肪細胞は細胞容積の大半を脂肪滴が占め、脂肪蓄積のために特化した形態をしているが、元々は繊維芽様の前駆脂肪細胞に由来する (Hausman et al. 1980, Ailhaud et al. 1990)。脂肪細胞が分化・成長していく過程を解析するためには、生体内の実験系では個体の生理状態や内分泌の影響を受け、その詳細な機構を解析するのは困難である。そのため、前駆脂肪細胞が分化・成長していく過程は哺乳類においては3T3-L1など、株化した前駆脂肪細胞や脂肪組織より調製した初代細胞培養系を用いて詳細に解析されている (Dani et al. 1990, Gregoire et al. 1998)。これらのアッセイ系の確立により哺乳類脂肪細胞の分化はインスリンや甲状腺ホルモンなど様々なホルモン、サイトカインによって制御されていることや (Hausman et al. 1980, Symonds et al. 2003)、その過程では細胞内への脂肪滴の蓄積とともに、脂肪の取り込みや脂肪酸合成などの特異的な代謝酵素の活性化や特徴的遺伝子発現を伴うことが明らかにされている (Gaskins et al. 1989, Ramsay 1996)。脂肪組織や脂肪細胞に関する研究は、これまで主に肥満対策の観点から医学・薬学の分野主導で行われてきた。従来、脂肪組織は第一義的には脂肪の蓄積・動員を行う場であると認識されてきたが、摂餌調節ペプチドであるレプチンに代表されるように、内分泌臓器としての役割も近年注目されており、脂肪組織の生理機能やその発達の分子機構に関する研究が「アディポサイエンス (Adipo-Science)」と称される研究分野へと発展している (Kadowaki 1996, Kawada 1996)。

魚類においては、古くから「旬の魚は脂がのって」と表現されるように脂質は産物の品質を決定する重要な因子である。特にマダイなどの生産量の多い養殖魚にとっては、単純に供給量だけでなく、その品質も消費者に問われるため、品質向上のための魚体脂肪蓄積制御は重要である。そのため、主要な養殖魚種においては、飼料脂質含量や運動条件などの飼育手法改善による体脂肪含量への影響が検討されてきた (Oku and Ogata 2000, Ogata and Oku 2000a, Ogata and Oku 2000b, Nakagawa 2002)。しかし、これらの研究では主に脂質含量の化学的分析値が指標として用いられており、魚体への脂肪蓄積を、蓄積器官である脂肪組織の発達と捉えた細胞レベルの研究に関しては、報告は極めて少ない。脂肪組織の発達については、マダイ仔稚魚において、発生段階における脂肪細胞の出現時期を組織学的に特定した研究例がある (Umino et al. 1996) が、脂肪細胞の発達機構やその制御まで検討されておらず、今後、養殖魚において人為的に魚体脂肪蓄積制御を行うために

は、基盤となる脂肪組織発達の分子機構の解明が必要である。

哺乳類においては培養系を用いた研究により、脂肪細胞の発達機構が細胞・分子レベルで解明されつつあるが、それとともに、*in vitro* の知見を *in vivo* の研究、あるいは産業技術として活用する試みもなされている。たとえば、ビタミン A は  $10^{-6}$ M 以上の濃度でウシ培養脂肪細胞分化を抑制するが (Kamei et al. 1994)、*in vivo* においても和牛の霜降り形成度 (マーブリング指数) と血清ビタミン A 濃度は逆相関することが明らかにされている

(Kawada et al. 1996)。また、培養脂肪細胞の分化依存的機能発現を促進するチアゾリジン化合物は、ヒトやラットの脂肪組織発達を促進し、ブタにおいては筋肉脂肪酸組成を改変することが報告され (Hausman et al. 2008)、こうした知見は畜産分野での新しい肉質改良技術として期待されている。一方、魚類においては、現在までに利用できる株化した前駆脂肪細胞は樹立されておらず、細胞レベルでの研究としては、生体より分離した脂肪組織片や単離した成熟脂肪細胞による短期浮遊培養を用いた代謝機構や内分泌応答の研究が行われている (Sheridan and Harmon 1994, Albalat et al. 2005)。これらの研究と前後して 2003 年に大西洋サケにおいて最初の前駆脂肪細胞の初代培養と分化誘導が報告され

(Vegusdal et al. 2003)、魚類脂肪細胞においても培養条件下での分化機構の解析が可能となった。しかし、魚類脂肪細胞分化については研究が端緒についたばかりであり、その分子機構、内分泌制御、機能発現機構など知見は十分には得られていない。

そこで本研究では、魚類脂肪細胞分化の分子機構および機能発現機構を明らかにするため、海産養殖魚として重要品種であるマダイを用いて解析を行った。第 1 章では脂肪蓄積に関与する遺伝子の単離・同定を行い、マダイ脂質代謝の特徴を明らかにするとともに第 2 章以降での分化・機能発現の指標として用いた。第 2 章では、実験系としての脂肪細胞の初代培養系および無血清培養による分化誘導系を確立し、内分泌等の影響を調べた。第 3 章および第 4 章では、脂肪細胞における機能発現機構を中心に解析した。脂肪細胞の分化過程において、脂質代謝関連をはじめ様々な特徴的遺伝子発現を伴うことは先に述べたが、その機能遺伝子発現を司るのは転写因子 PPAR (peroxisome proliferator -activated receptor) である (Morrison and Farmer 1999, Rosen et al. 2007)。PPAR はリガンド依存型転写因子であり、主要な脂質の吸収・蓄積・動員に関与する遺伝子発現を転写レベルで制御することが知られる (Schoonjans et al. 1996a, 1996b, Qi et al. 2000)。第 3 章では魚類脂肪細胞における PPAR の特徴と脂肪細胞分化における役割を検討し、また併せて、PPAR リガンドの分化依存的遺伝子発現への影響を調べた。特に第 4 章では脂肪細胞の機能発現 (脂肪酸生合成および生変換) を中心に、PPAR リガンドがマダイ脂肪細胞の形質に及ぼす影響を明らかにし、外部因子を用いた魚類脂肪細胞における機能発現の人為的制御の可能性について検討した。

## 第1章 脂肪組織における脂質代謝関連遺伝子の同定

生物にとっての脂肪組織は第一義的には脂肪の代謝・蓄積の中心臓器であり、個体の恒常性維持に大きな役割を果たす。飼料中の脂質の多くはトリグリセリド (TG) であるが、それらはモノグリセリドと遊離脂肪酸となって腸管に取り込まれ、さらに TG へ再合成されたのちキロミクロンや VLDL などのリポタンパク質として血流を運ばれる (Nilsson-Ehle et al. 1980)。リポタンパク質中の TG に含まれる脂肪酸は末梢組織でエネルギーとして利用される一方、脂肪組織に取り込まれて体脂肪として蓄積される (Nilsson-Ehle et al. 1980)。また、生体内に蓄積される脂肪酸は単純に飼料に由来するもののほかに、糖質などから新たに合成されるものも含まれる (Volpe and Vagelos 1976, Wakil et al. 1983)。これら飼料由来および生合成に由来する脂肪酸のいずれも必要に応じて不飽和化などの生変換を受けた後、TG に再合成されて蓄積される (Cook 1991)。こうした機能を果たすため、脂肪組織においては脂肪酸の取り込み、生合成および生変換など脂質蓄積に関わる代謝酵素や特徴的遺伝子の発現が多く認められる (Ramsay 1996)。

脂肪組織への飼料由来脂質の取り込みに中心的な役割を果たすのがリポタンパク質リパーゼ (LPL) である。LPL は構造的には肝性リパーゼ (HL)、膵リパーゼ (PL)、内皮由来リパーゼ (EL) とともにリパーゼ遺伝子族に属し、TG から脂肪酸を遊離させる加水分解酵素である (Hide et al. 1992, Wong and Schotz 2002)。LPL は特に脂肪組織において多く活性分布が認められ、脂肪組織で合成・分泌された LPL はキロミクロンや VLDL 中の TG を加水分解し、脂肪組織に蓄積のための遊離脂肪酸を供給する (Nilsson-Ehle et al. 1980, Eckel 1987)。そのため LPL 活性は脂肪組織への脂肪酸流入量を決定することとなり、脂肪組織発達の重要な要因である。魚類においても LPL は生化学的、分子生物学的手法を用いた様々な研究が報告されている (Albalat et al. 2006, Lindberg and Olivecrona 2002)。本研究で用いたマダイにおいても LPL 様の遺伝子 1 種が既に同定されており、その遺伝子構造や個体の栄養状態と発現の関係などが既に報告されている (Liang et al. 2002a, 2002b, Oku et al. 2002)。

LPL による外来脂質の取り込みとともに、脂肪酸合成、脂肪酸不飽和化、糖輸送などの脂肪酸生合成・生変換機構も脂肪蓄積の重要な一面である。グルコースなどから合成されたマロニル CoA は脂肪酸合成酵素 (fatty acid synthetase: FAS) の働きで飽和脂肪酸であるパルミチン酸へと合成される (Volpe and Vagelos 1976, Wakil et al. 1983)。生合成された飽和脂肪酸は飼料由来のものと同様に、炭素鎖延長や不飽和結合の挿入などの生変換を受ける (Cook 1991)。いくつかの魚種で脂肪酸合成酵素 (FAS)、デルタ 6 やデルタ 9 (ステアロイル CoA) などの不飽和化酵素 (delta-6 desaturase: d6DES および stearoyl-CoA desaturase: SCD) および糖の取り込みに関わる糖輸送担体 (glucose transporter: Glut) の生化学的特徴や遺伝子構造が明らかにされている (Wilson and williamson 1970, Planas et al. 2000, Polley et al. 2003, Seilliez et al. 2003, Capilla et al. 2004)。しかしながら、魚

類におけるこれらの研究の多くは個体の栄養・生理状態との関係や肝機能における役割を検討したものであり、脂肪組織発達との関連についての知見は少ない。

魚類における脂肪組織・脂肪細胞の生理機能を明らかにし、その機能発現機構を解析する上でこれら脂質代謝関連遺伝子の同定は不可欠である。本章では魚類における脂肪細胞の分化と機能発現機構に関する研究を行うための第一歩として、海産魚マダイより脂肪蓄積に関わる代謝遺伝子のクローニングを行った。類似遺伝子の多い LPL については区別を明確にするため HL、PL 遺伝子についても併せて同定し、魚類におけるリパーゼ遺伝子族の全体像を含めて解析した。これまでにマダイでは既に 1 種類の LPL 様遺伝子が報告されているが、再度クローニングを行い、新たにもう一種の LPL 様遺伝子を同定した。また、FAS、d6DES、SCD、Glut 遺伝子については PCR により部分配列を決定し、脂肪組織を含め、各遺伝子の組織分布を明らかにすることを目的とした。

## 材料と方法

### 1. 試験魚

実験に使用したマダイは日清マリンテック（愛知県田原市）より購入し養殖研究所（三重県南伊勢町）において使用時まで飼育した。リパーゼクローニング、RACE および RT-PCR に使用した個体はそれぞれ 290 g、80 g、166 g であった。FAS、d6DES、SCD および Glut のクローニングには RT-PCR と同一の個体を使用した。RT-PCR において卵巣および精巣採取に使用した成魚（約 1.8 kg）は南勢水産（三重県南伊勢町）より購入し、使用時まで養殖研究所において市販飼料を給餌して飼育した。また、細胞培養に使用した約 1kg のマダイは日清マリンテック（愛知県田原市）より購入し養殖研究所（三重県南伊勢町）において使用時までマダイ用市販飼料（日清丸紅、東京都中央区）を給餌して飼育した。

### 2. リパーゼ遺伝子の網羅的クローニングと部分塩基配列の決定

マダイ肝臓より RNA を調整し、PCR の鋳型とした。総 RNA は AGPC 法 (Chomczynski and Sacchi 1987) により抽出し、抽出した総 RNA のうち 1  $\mu$ g を用いて cDNA を合成した。cDNA 合成は 15  $\mu$ L 反応系で行い、Oligo-dT を用いた逆転写反応は First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham, Buckinghamshire, UK) を使用した。Oligo-dT は Amersham 社のものを使用した。このプライマーにはアダプター配列が付加されており (Table 1-1)、後述する 3'RACE にも使用した。

リパーゼ遺伝子のクローニングは縮重プライマーを用いた PCR (Degenerated PCR) により行い、3 セットの縮重プライマーを使用した (LP1: LPL01F b と LPL06Ra、LP2: LPL02Fa と LPL06Ra、および LP3: RSPL2S と RSPL2A)。使用したプライマーの塩基配列は Table 1-1 に示す。PCR には合成した 15  $\mu$ L の cDNA のうち 0.5  $\mu$ L を 25  $\mu$ L 反応系に供した。PCR 反応液の組成は 0.5U Taq polymerase (Takara, Tokyo, Japan)、200  $\mu$ M

dNTP、10 mM Tris-HCl pH8.3、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、および 20 pmole のプライマーとした。増幅は 40 サイクル行い、各サイクルは熱変性 94 °C 0.5 分間、対合反応 50°C 0.5 分間、伸長反応 72°C 0.5 分間の条件で行い、終了時には 72 °C で 3 分間伸長反応を行った。増幅断片はプラスミドベクター (pCR2.1, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) にクローニングし、塩基配列を決定した。あわせて、マダイから β アクチンの cDNA 断片のクローニングおよび塩基配列を決定した。方法は上記に準じて行い、使用したプライマーの塩基配列 (BACT01F および BACT02R) は Table 1-1 に記載した。

### 3. 3'および5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

同定したリパーゼ遺伝子は 3'および 5'RACE 法により完全長の塩基配列を決定した。3'RACE にはアダプター配列付加 Oligo-dT で逆転写した肝臓由来 cDNA (上記のものと同じ) を鋳型として使用した。5'RACE には 5'末端にアダプター配列を付加した cDNA を調整した。5'RACE 用の肝臓由来のアダプター付加 cDNA 作成には Quick Prep Micro mRNA Purification Kit (Amersham) および SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA) を使用した。

RACE は Nested PCR 法による 2 回増幅で行った。各 PCR に用いたアダプターおよび遺伝子特異的プライマーの塩基配列は Table 1-1 に示す。一回目の PCR の条件はクローニングの際と同条件とした。PCR 終了後、増幅産物を 100 倍希釈し、Nested PCR の鋳型とした。Nested PCR は対合反応を 55°C で行った以外は一回目と同条件で行った。なお、LP2 の 3'RACE および LP3 の 5'RACE については、一回目の PCR で増幅断片が得られたため、Nested PCR は行わなかった。RACE 法により得られた増幅断片はプラスミドベクター pCR2.1 (Invitrogen) にクローニングし、塩基配列を決定した。

### 4. 分子系統解析

マダイリパーゼ遺伝子は他の生物種のものとともにアミノ酸配列比較による分子系統解析を行った。遺伝距離は近隣接合法 (NJ 法) により決定し、解析には DNASIS Pro Ver.2.06 (Hitachi, Tokyo, Japan) を使用した。

### 5. 脂肪蓄積に関わる代謝関連遺伝子のクローニングと部分塩基配列の決定

脂肪酸合成酵素 (FAS)、ステアロイル CoA 不飽和化酵素 (SCD)、デルタ 6 不飽和化酵素 (d6DES) および糖輸送担体 (Glut) 遺伝子のクローニングは縮重プライマーを用いた PCR により行った。FAS、d6DES、Glut にはそれぞれ 1 組の縮重プライマーを、SCD は 2 組 (SCDa および SCDb) のプライマーを使用し、用いたプライマーの塩基配列は Table 1-2 に示した。

鋳型には脂肪組織由来 cDNA を使用した。腹腔内脂肪組織からの総 RNA 抽出は AGPC 法 (Chomczynski and Sacchi 1987) で行い、総 RNA 各 1 μg を cDNA 合成に使用した。

cDNA 合成は 15  $\mu$ L 反応系で行い、random hexamer プライマーおよび First Strand cDNA synthesis Kit (Amersham) を使用した。PCR には合成した 15  $\mu$ L の cDNA のうち 0.5  $\mu$ L を 25  $\mu$ L 反応系に使用し、反応液の組成は 0.5 U Taq polymerase (Takara, Tokyo, Japan)、200  $\mu$ M dNTP、10 mM Tris-HCl pH8.3、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、および 20 pmole のプライマーとした。増幅は 40 サイクル行い、各サイクルは熱変性 94°C 0.5 分間、対合反応 50°C 0.5 分間、伸長反応 72°C 1 分間の条件で行い、終了時には 72°C で 3 分間伸長反応を行った。増幅断片はプラスミドベクター (pCR2.1, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) にクローニングし、塩基配列を決定した。

## 6. RT-PCR

同定したマダイリパーゼ遺伝子発現の組織分布は RT-PCR 法で決定した。RNA は腹腔内脂肪組織、鰓、心臓、肝臓、筋肉 (背側白色筋)、生殖線 (幼魚)、卵巣および精巢 (成魚) より抽出した。総 RNA 抽出は AGPC 法 (Chomczynski and Sacchi 1987) で行い、総 RNA 各 1  $\mu$ g を cDNA 合成に使用した。cDNA 合成は 15  $\mu$ L 反応系で行い、random hexamer プライマーおよび First Strand cDNA synthesis Kit (Amersham) を使用した。合成した cDNA のうち、各 0.5  $\mu$ L を 25  $\mu$ L 反応系の PCR に用いた。また、反応液の組成はクローニングの際と同様とした。PCR による増幅は、リパーゼ遺伝子は 30 サイクルとし、各サイクルは熱変性 94°C 0.5 分間、対合反応 55°C 0.5 分間、伸長反応 72°C 0.5 分間の条件で行い、終了時には 72°C で 3 分間伸長反応を行った。増幅産物のうち 5  $\mu$ L を、エチジウムブロマイドを含む 3% アガロースゲル電気泳動を行い、遺伝子発現を検出した。各リパーゼ遺伝子特異的 RT-PCR に使用したプライマーの塩基配列は Table 1-1 に示した。

FAS、d6DES、SCD および Glut 遺伝子の検出については、増幅を 40 サイクルとした以外は上記と同条件で行った。各遺伝子特異的プライマーの塩基配列は Table 1-3 に示した。

## 7. 初代培養 SV(stromal-vascular)細胞の調製と RT-PCR

前駆脂肪細胞を含むマダイ SV 細胞は腹腔内脂肪組織から酵素消化法により調製した。採取した脂肪組織は 5% ウシ血清アルブミンを含む PBS 中で細切し、その後終濃度 1 mg/mL の Type I コラゲナーゼ (Invitrogen) を加え、室温にて一時間消化した。消化液は 200  $\mu$ m のナイロンメッシュで濾過した後、800  $\times$  g で 3 分間遠心分離し、成熟脂肪細胞 (上層) と SV 画分 (沈殿) を分離した。回収した SV 画分は培養用培地に懸濁し、約 80% コンフルエント ( $4.3 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup>) の条件で 35mm のプラスチック培養皿で培養した。培養用培地は DME/F12 (1 : 1, v/v) 培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) に 65 mM NaCl、10% ウシ胎児血清 (Invitrogen)、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシンおよび 100 U/mL ペニシリンを添加したものを使用した。2 日後に SV 細胞は血清不含の培地で 3 回洗浄し、非接着の細胞を除いた後、さらに 2 日間培養し、RT-PCR に使用した。総 RNA 抽出、cDNA 合成および 30 サイクルの RT-PCR は上記と同様の方法で行った。

## 結果

### 1. マダイにおける LPL 遺伝子およびリパーゼ遺伝子族の解析

縮重プライマーを用いた PCR により 3 種のリパーゼ遺伝子 (LP1, LP2 および LP3) がマダイから新たに同定され、それぞれ RACE 法により全長の塩基配列を決定した。分子系統解析により 3 種のリパーゼ遺伝子はそれぞれ LPL、HL および PL と予測された (Fig. 1-1)。これまで既にマダイで報告されている LPL 様遺伝子 (Genbank Accession No. AB054062, Oku et al. 2002) は系統上、他種リパーゼよりも LPL に類似しているため、暫定的に LPL の派生遺伝子 (LPL2) とし、今回同定された 3 種をそれぞれ LPL1、HL および PL とした (Fig. 1-1)。なお、今回単離した遺伝子はマダイ LPL1 (AB243791)、HL (AB252855) および PL (AB252856) としてデータベース GenBank に登録した。

2,256bp のマダイ LPL1 遺伝子は 5'側に 142bp、3'側に 542bp の非翻訳領域を含んでおり、1,569bp の ORF には 523 個のアミノ酸をコードしていた (Fig. 1-2)。2,261bp の HL 遺伝子は 5'側に 170bp、3'側に 597bp の非翻訳領域を含んでおり、1,491bp の ORF には 497 個のアミノ酸をコードしていた (Fig. 1-2)。また、1,500bp の PL 遺伝子は 72bp および 69bp の非翻訳領域を 3'および 5'側に含み、1,356bp の ORF は 452 個のアミノ酸をコードしていた (Fig. 1-2)。マダイで同定されているリパーゼ 4 種のアミノ酸配列を比較すると、相互に 18-41% の相同性を示し、触媒残基 (catalytic triads) や基質結合領域 (lipid binding region) などの機能ドメインは保存されていた (Fig. 1-2)。

LPL2 を含め、4 種類のリパーゼ遺伝子発現の組織分布を RT-PCR 法で調べたところ、LPL1 の筋肉での発現は弱かったが、2 種類の LPL 様遺伝子 (LPL1 および LPL2) は脂肪組織をはじめ、検討したいずれの組織でも発現が確認された (Fig. 1-3)。また、HL は肝臓特異的に発現し、PL は肝臓および脂肪組織で発現が確認された (Fig. 1-3)。

腹腔内脂肪組織より初代培養法を用いて調整した前駆脂肪細胞を含む SV 細胞において、各リパーゼ遺伝子の発現を確認したところ、LPL1 および LPL2 は発現が確認されたが、HL および PL については、遺伝子発現は見られなかった (Fig. 1-4)。

### 2. 脂肪酸合成酵素、不飽和化酵素および糖輸送担体遺伝子の同定

縮重プライマーを用いた PCR により FAS、SCD2 種 (SCDa および SCDb)、d6DES の各遺伝子の部分断片をクローニングし、塩基配列を決定した。Glut は 1 セットの縮重プライマーにより増幅した PCR 断片をプラスミドにクローニングし、10 クローンの塩基配列を決定したところ、哺乳類 Glut1 および Glut3 に相当する 2 種類の遺伝子断片が含まれていた。決定したマダイ FAS、SCDa、SCDb、d6DES、Glut1 および Glut3 の部分塩基配列はいずれもデータベース Genbank に登録した。各遺伝子の Genbank Accession 番号は Table 1-3 に示した。

RT-PCRにより、同定した遺伝子の組織分布を調べたところ、d6DESの発現は脂肪組織、鰓、肝臓および幼魚（未成熟）の生殖線に局在していた（Fig. 1-5）。一方、FAS、SCDa、SCDb、Glut1 および Glut3 の遺伝子発現は検討したいずれの組織においても認められた（Fig. 1-5）。

## 考察

本章では脂肪細胞の分化と機能発現機構を解析するための分子指標を得るため、脂質蓄積関連遺伝子をマダイにおいて同定した。RT-PCRにより、マダイ脂肪組織において少なくとも2種類のLPL様遺伝子、脂肪酸合成酵素（FAS）、3種の脂肪酸不飽和化酵素（SCDa、SCDb および d6DES）に加え、2種類の糖輸送担体（Glut1 および Glut3）の遺伝子が発現することが明らかとなった。

マダイにおいて、これまでに報告されているLPL様遺伝子（Oku et al. 2002）を含め、2種類のLPL遺伝子が同定された。マダイLPL1はLPL2と比較して分子系統解析から他生物LPLにより近縁であることが示され（Fig. 1-1）、主要なタイプのLPL遺伝子であると考えられる。本研究においてマダイELに相当する遺伝子を同定することはできなかった（Fig. 1-1）。哺乳類で同定されたELはホスホリパーゼA1様の活性を示し、LPLとは相補的な組織分布を示すことが知られる（Jaye et al. 1999, Hirata et al. 1999）。すなわち、LPLの発現が低い部位である肝臓、肺、腎臓および胎盤でEL遺伝子は発現する（Jaye et al. 1999, Hirata et al. 1999）。LPL2はLPL1との間に遺伝子発現の組織分布の差異は見られなかった（Fig. 1-3）が、構造的な類似性から哺乳類ELに相当する可能性もあり、今後マダイリパーゼ遺伝子族の全体像を考える上でも更なる解析が必要である。

2種類のマダイLPLは検討した全ての組織で発現が認められ（Fig. 1-3）、様々な組織で脂質代謝に関与することがうかがわれる。ニジマスやヨーロッパヘダイでも報告されているように、哺乳類の場合と異なり、肝臓（肝臓）においてもLPL発現は認められており（Lindberg and Olivecrona 2002, Saera-Vila et al. 2005）、LPLの組織分布は魚類と哺乳類で異なるものと考えられる。HL遺伝子発現は哺乳類同様肝臓に局在したが、PLは肝臓の他、脂肪組織においても確認された（Fig. 1-3）。マダイでは膵臓は単一の臓器（膵臓）を成さず肝臓など他組織中に散在し、また初期発育時における観察では、腹腔内脂肪組織は膵臓を取り囲むように発達することが知られる（Umino et al. 1996）。RT-PCRによる脂肪組織でのPL遺伝子発現検出は、脂肪組織中に混在する膵細胞に由来した可能性もある。実際に初代培養系を用いて、膵細胞を含まないSV細胞（前駆脂肪細胞や幼若脂肪細胞を含む）の状態においては、PL遺伝子発現は検出されず（Fig. 1-4）、PL遺伝子は脂肪細胞では発現しないものと考えられる。

また、本章では脂肪酸合成（FAS）、不飽和化（SCDa、SCDb および d6DES）および糖の取り込み（Glut1 および Glut3）に関与する遺伝子もPCR法により部分的にクローニン

グシ、RT-PCRによりその組織分布を決定した (Fig. 1-5)。FAS 遺伝子は哺乳類、鳥類および魚類においても同定され、その特性が解析されている (Paulauskis and Sul 1988, Jayakumar et al. 1995, Yen et al. 2005, Plagnes-Juan et al. 2008)。哺乳類では主要な発現部位として肝臓や脂肪組織が知られるが、その他にも肺、脳、筋肉など広範に遺伝子発現は認められる (Paulauskis and Sul 1988, Jayakumar et al. 1995)。マダイにおいても、FAS 遺伝子発現は検討したすべての組織において検出され (Fig. 1-5)、魚体内に広く分布するものと考えられる。SCD は脂肪酸のデルタ 9 位に二重結合を挿入する酵素であり、魚類では低温ストレスへの応答遺伝子としても知られる (Tiku et al. 1996, Cossins et al. 2002)。これまでにマウスおよびコイにおいてそれぞれ 2 種類の SCD 遺伝子が同定されている (Kaestner et al. 1989, Polley et al. 2003)。今回マダイにおいてもクローニングにより 2 種類の SCD 遺伝子 (SCDa および SCDB) が同定されたが、両者の間に組織分布の違いは見られず (Fig. 1-5)、機能的な差異は現時点では不明である。脂肪酸のデルタ 6 位に二重結合を挿入する d6DES は高度不飽和脂肪酸 (HUFA) 合成に関与する酵素である (Horrobin 1993)。d6DES 遺伝子は近縁種ヨーロッパヘダイにおいても同定され、その稚魚においては内臓 (肝臓・脂肪組織および消化管を含む) に多く発現することが報告されている (Seiliez et al. 2003)。マダイにおいても肝臓や脂肪組織で発現が見られ、類似した発現分布をするものと考えられる。哺乳類での研究において糖輸送担体は主要なものとして 4 つのサブタイプ (Glut1-4) が知られ、そのうち Glut4 が脂肪組織での糖取り込みに中心的な役割を果たす (Mueckler 1994, Olson and Pessin 1996)。本研究において Glut1 と Glut3 の 2 種類の同定に成功したが、Glut4 をクローニングすることはできなかった。

本章におけるクローニング解析により、マダイ脂肪組織における脂質蓄積関連遺伝子を 8 種類同定することができた。これらは細胞の脂質蓄積における主要経路、すなわち脂質の取り込み、脂肪酸生合成、脂肪酸不飽和化および糖輸送に関与するもので、こうした遺伝子の発現を組み合わせることで解析することにより包括的かつ定量的に脂肪細胞の発達や機能発現過程を評価できるものと考えられる。

**Table 1-1 Oligonucleotide sequences used for partial cloning, RACE, RT-PCR and real time PCR of red sea bream lipase genes**

**Partial cloning of lipase genes**

(Oligo-dT, Amersham)	5' -AACTGGAATTGGCGGCCGAGAA (T) <sub>18</sub>	
LPL01Fb	5' - TCCAAAACCTTGTGGTCATACACGGGTGG-3'	(res. 46-55 in human LPL numbering)
LPL02Fa	5' - GATAGCAACGTIAT (TCA) GTIGTIGA (TC) TGG-3'	(res. 77-86 in human LPL numbering)
LPL06Ra	5' -GGTGTGAAGGACGTGACAAAAGTCAGCGTCGTC-3'	(res. 206-216 in human LPL numbering)
RSPL2S	5' - TTAAGTGCATAGTTGCGA (TC) TGG-3'	(res. 100-107 in human PL numbering)
RSPL2A	5' -AAACCTGTCTGCATAATGGCCAT-3'	(res. 308-315 in human PL numbering)
BACT01F	5' -CTGCGTGGCCTTGGACTTGGAGCA (AG) GA (GA) ATG-3'	(res. 220-227 in human beta actin numbering)
BACT02R	5' -CTGCTGTACTCTGCTTGGG (GAT) ATCCACAT-3'	(res. 355-362 in human beta actin numbering)

**3' and 5' RACE**

**3' RACE**

Antisense	(First PCR)	NotI-01	5' -AACTGGAAGAATTGGCG-3	
	(Nested PCR)	NotI-02	5' -AATTGGCGGCCGAGAA-3	

**Sense (gene specific)**

LP1 (LPL1)	(First PCR)	PMHL05F	5' -TCCCACCTTCGAGAAGC-3'	(res. 213-219)
	(Nested PCR)	PMHL06F	5' -CAGACAACCAGAACAC-3'	(res. 219-224)
LP2 (HL)		PMPL01F	5' -GTCAACGTGGTGATTACA-3'	(res. 107-112)
LP3 (PL)	(First PCR)	PanL01F	5' -CGCCAGGTTGTGGC-3'	(res. 121-126)
	(Nested PCR)	PanL05F	5' -AACTACAAGCAGAAGGC-3'	(res. 139-144)

**5' RACE**

5' Adaptor (SMART IV, Clontech) 5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGG-3'

Sense	(First PCR)	5' R-A3	5' -GCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCA-3'
	(Nested PCR)	5' R-B3	5' -GGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACG-3'

**Antisense (gene specific)**

LP1 (LPL1)	(First PCR)	PMHL04R	5' -GTGGCCACGGGTCT-3'	(res. 252-256)
	(Nested PCR)	PMHL03R	5' -GGGGAGCCTCTGGTGT-3'	(res. 239-244)
LP2 (HL)	(First PCR)	PMPL04R	5' -TGAGGCCATACGTTTCA-3'	(res. 217-223)
	(Nested PCR)	PMPL03R	5' -CAGTCTATCCGTGGGAG-3'	(res. 196-201)
LP3 (PL)		PanL03R	5' -AGCCTTGGGGTTAACCAT-3'	(res. 273-279)

**RT-PCR and Real time PCR**

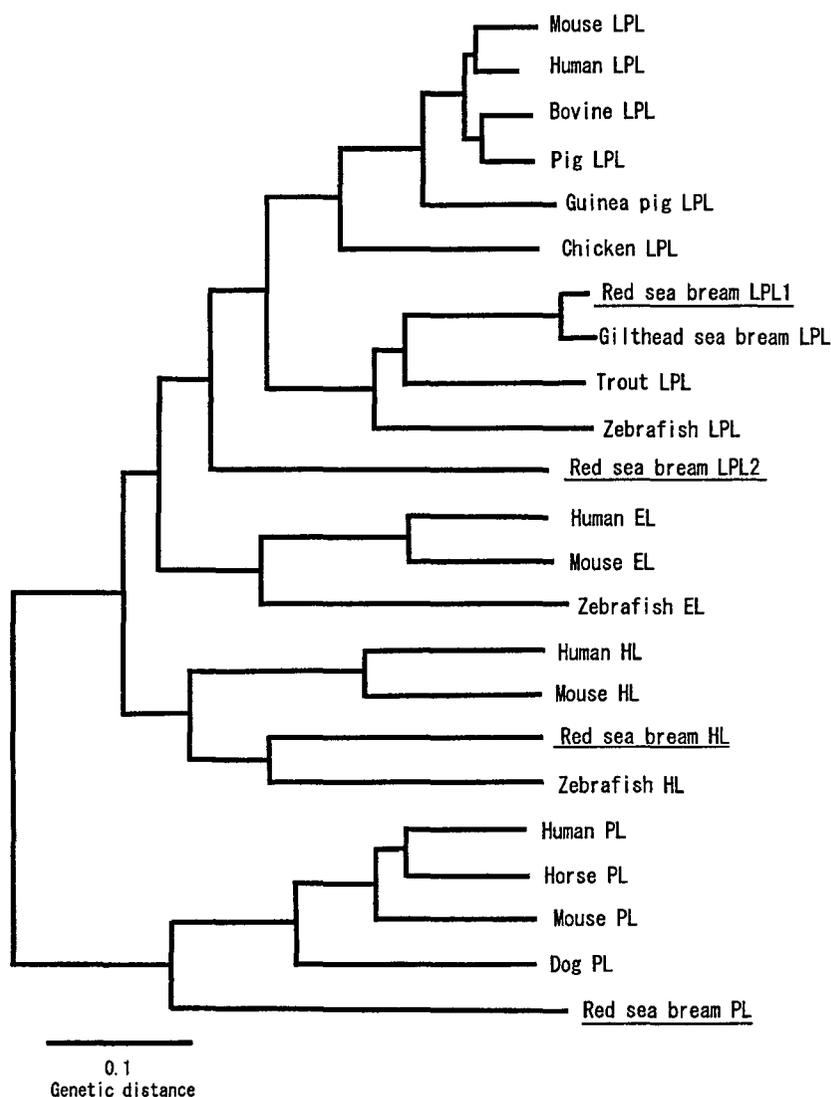
LP1 (LPL1)	PMHL07F	5' -CTCAAGACCCGGGAGAT-3'	(res. 360-365)
	PMHL10R	5' -AAGCGTCGCTCTGACC-3'	(res. 519-524)
LP2 (HL)	PMPL12F	5' -ACAGTCCCTGAAACAATTTG-3'	(res. 380-354)
	PMPL10R	5' -GACTAAGGCTCCCTCAC-3'	(res. 494-499)
LP3 (PL)	PMPanL07F	5' -GCTGGCCCAATCCAGG-3'	(res. 349-354)
	PMPanL11R	5' -TTAAACTTGGCATGGTAGTAC-3'	(res. 447-453)
(LPL2)	PMPL18F	5' -ATTATTCTGCTGGTGAC-3'	(res. 406-412)
	PMPL05R	5' -TCAGTGTCTCTCCAGATTAC-3'	(res. 506-512)
Beta actin	PMBACT01F	5' -GGCACTGTGCCTCCTC-3'	(res. 228-233 in human beta actin numbering)
	PMBACT02R	5' -GCCAGATGGAGCCTCC-3'	(res. 342-347 in human beta actin numbering)

**Table 1-2 The oligonucleotide sequences for degenerated PCR**

Target Genes	(Forward) (Reverse) sequences	Approximate position of human counterparts
Fatty acid synthetase (FAS)	5' -GGGAAGTTACTTTGGAAGGACAAYTGGGT-3' 5' -TCCCACGCTCCATCCCGGTANACRTTCAT-3'	(res. 1018-1027) (res. 1503-1512)
Stearoyl CoA desaturase a (SCDa)	5' -TGGTCGCGAGATCACCGAGTGCAAYCAAA-3' 5' -CGCAAAGGTGTGGTGGTARTTRTGRAA-3'	(res. 153-162) (res. 297-305)
Stearoyl CoA desaturase b (SCDb)	5' -TCCGAGACAGATGCCGAYCCICAYAA-3' 5' -CGCAAAGGTGTGGTGGTARTTRTGRAA-3'	(res. 164-172) (res. 297-305)
Delta-6-desaturase (d6DES)	5' -CTCAAGGGTGCATCGGCCAACTGGTGGAA-3' 5' -ATGGCTCATCTGGGTAACCCANACRAACCA-3'	(res. 206-215) (res. 334-343)
Glucose transporter 1 and 3 (Glut1 and 3)	5' -GGGTATAATATCGGGTAATCAAYGCC-3' 5' -ACTAAAGAGCTCTGCGACAATRAACCA-3'	(res. 27-36) (res. 387-396)

**Table 1-3 The oligonucleotide sequences for RT-PCR**

Target gene	GenBank accession No.	(Forward) (Reverse) Sequences	Amplified fragment length
Fatty acid synthetase (FAS)	AB298550	5' -AGCTGTTTCATCTGGGGAT-3' 5' -CTGGGAAGAGGGCCATC-3'	(345bp)
StearoylCoA desaturase a (SCDa)	AB298551	5' -CTTCGCCACATTGGTTG-3' 5' -CACTCAAAGCAACCATTGC-3'	(342bp)
StearoylCoA desaturase b (SCDb)	AB298552	5' -CTTTGCTCACATCGGCTG-3' 5' -CGCTGAACGTGACAAACTT-3'	(342bp)
Delta-6-desaturase (d6DES)	AB298553	5' -GCACTTCCAGCATCACGC-3' 5' -ACGAAGCTGATGAGCGC-3'	(330bp)
Glucose transporter 1 (Glut1)	AB298554	5' -TTGTCTTGGGCATCCTTATT-3' 5' -AGAGCTGCAGGACGACG-3'	(351bp)
Glucose transporter 3 (Glut3)	AB298555	5' -AGTTATTGGCATCCTGGTG-3' 5' -AGAGAGCTGGAGGATGATA-3'	(351bp)
<i>β</i> actin	AB252854	5' -GGCACTGCTGCCTCCTC-3' 5' -GCCAGGATGGAGCCTCC-3'	(309bp)



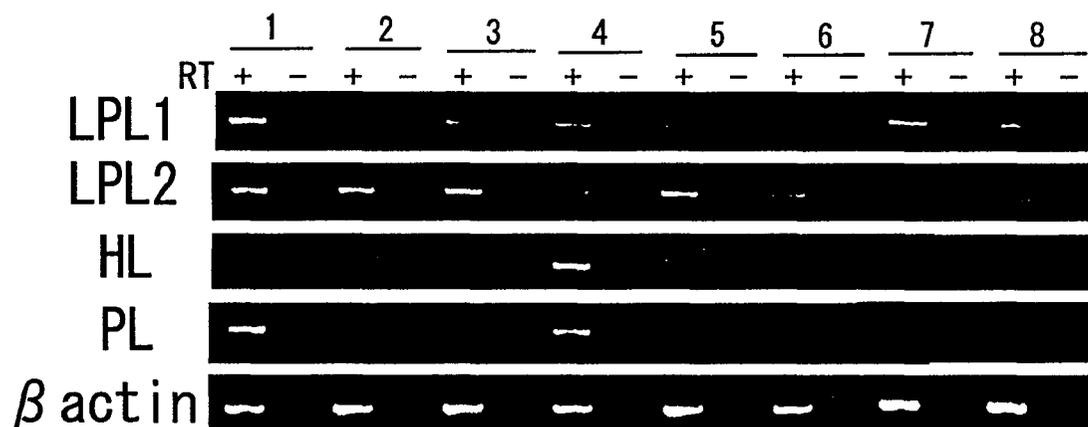
**Fig. 1-1 Phylogenetic analysis of LPL, EL, HL and PL**

The phylogenetic tree was constructed using DNASIS Pro version 2.06 software (Hitachi, Tokyo, Japan). The sequences of red sea bream lipases are underlined. The GenBank accession numbers used in this analysis were as follows: red sea bream LPL1(AB243791), red sea bream LPL2(AB054062), red sea bream HL(AB252855), red sea bream PL(AB252856), mouse LPL(NM008509), human LPL(NM000237), bovine LPL(XM616349), pig LPL(X62984), guinea pig LPL(M15483), chicken LPL(NM205282), gilthead sea bream LPL(AY495672), zebrafish LPL(BC064296), rainbow trout LPL(AJ224693), human EL(NM006033), mouse EL(NM010720), zebrafish EL(BC044146), human HL(NM000236), mouse HL(NM008280), zebrafish HL(NM000936), human PL(000936), mouse PL(NM026925), horse PL(X66218), and dog PL(M35302).

LPL1	-----MG	KENISFLTVW	IILGKIFATF	SSDPEPTTTS	SSSSSSTVTV	NTTITATPLP	TTTEWITDYT	62
LPL2	-----M	KAWRVVFLYF	LVLNAVVOHV	TSLEEELSDS	IFGNFLDPLK	DLIEHKDDAN		51
HL	-----	-----	-----MSVVKI	LCYLLLYTHL	NEAKKTKGSR	AADEEQRGVL		36
PL	MRLRSVLM	MSW AALMTCLPWG	GTAQRPASVL	PWHLLEEIGTR	FLLFTQKNRY	YOEIKTDQNI	OASNYSGMRK	70
*								
LPL1	DI--VSKFSL	RTADIPDDDM	CYIVAGSPDT	IEDCEFPNET	QTFIVIHGWT	VTGMFESWVP	KLVSALYERE	130
LPL2	QT--VAKFSL	RKPSHPDDDL	CYIVPGKPSD	LAACFTFNSSS	KTFLVIHGWT	LSGMFESWVA	KLVSALYERE	119
HL	KP--HVSSSV	FGLFVEGEEN	CALDPLQLHT	LTSCGFNSSN	PLIIITHGWS	VDGMMESWVH	RLATTLKTHL	104
PL	TRFIIPGYLE	KGDEDWPGDM	C-KVMLK-WE	NVNG-----	-----	-----	-----	102
* * * * *								
LPL1	PSANVIIVDW	LTRANQHYPY	SAAYTKLVGR	DVAKFVTWIQ	KELHLPWDRI	HLLIGYSLGAH	VAGIAGDLTE	200
LPL2	QIANVIIVDW	LTSAGNHVYV	AAQNTKAVGQ	EIARFIDWIE	ETTNNPLENI	HLIGYSLGAH	VAGFAGSHAT	189
HL	IDVNVVITDW	LLLAHQHYPT	AAQSTRIVGK	DIAPLLQSLQ	VHYRFQLRKA	HLIGYSLGAH	ISGFAGSYLE	174
PL	-----IAVEV	KKGVKTYQAQ	AANNARVVA	QVASMITFLM	GNVYKQKADKF	<u>HLIGYSLGAH</u>	AAGDTGSRIP	167
* * * * *								
LPL1	H--KISRITG	<u>LD</u> PAGPTFFEN	ADNQNTLSPD	DAQFVDVLHT	NTRGS-PDRS	IGIQRPVGH	DIYPNGGTFQ	267
LPL2	N--KVGRITG	<u>LD</u> PAGPDEFEG	MHAHRRRLSPD	DAHFDVVLHT	FTRGS-LGLS	IGIQRPVGHV	DIYPNGGSFQ	256
HL	GSEKIGRITG	<u>LD</u> PAGPLFEG	MSPTDRLSPD	DAEFVDAIHT	FOTHER-MGLS	VGIKQAVAHY	DFYPNGGDFQ	243
PL	G--LARITG	<u>LD</u> PEVPYFOD	TDASVRLDTN	DAIFVDVIHT	DGLPFDKSLG	LGMHSHVGH	DFYPNGGELM	234
* * * * *								
LPL1	PGCDIQSTLL	GIALEGIKGL	QNMDQLVKCS	<u>H</u> ERSIHFLFID	SLLNTEQGS	AYRCSKEAF	NKGLCLSCRK	337
LPL2	PGCNLRGALE	KIANFGIFA-	--ITDAVKCE	<u>H</u> ERSIHFLFID	SLLNEQEA	AYRCSSDMF	NRGMCLSCRK	323
HL	PGCDLQNIYE	HIAQYGLLG-	--FEQTVKCA	<u>H</u> ERSVHLFID	SLLNEDKGS	AYRCSDNSAF	VKGVCLDCRK	310
PL	PGCSTNRGPP	TDLDAIWEG-	--TKKFDACN	<u>H</u> VRAYQYSE	S-MVKPQGFV	GFPCSDKGSF	AAGKGFPAH	300
* * * * *								
LPL1	NRCNKLGYNI	NKVRTRSTK	MYLKTREMP	YKVFHYQVKV	HFFSKDPLSF	TQPMKISLY	GTHGEKEDIP	407
LPL2	GRCNTVGYDI	SKVRKARNVQ	MYTKTRASMP	FRVYHYQLKI	HFFSKVNRSE	MEPSLTVSLY	GTNGEAEENLE	393
HL	NRCNTLGYNI	RKVRSGASKR	LYLKTRSRMP	YKLHYYQFRI	QFV--NQMES	IEPSLTISLS	GTKEESGDLS	378
PL	DNCPLMGHDA	DRFTVTDVVL	KMKYFLNTGR	SEPFGRYSYR	VTVTLDGPSW	PNP--GFLY	VALAGDND--	365
* * * * *								
LPL1	HVL--PVMKGN	TTLFLITTD	VDIGDLMIVK	LRWEKDTIIS	WS-----	-DWWGSSKFH	IRKLRK--	464
LPL2	LKLKEKIATN	KTHSFLLYTE	KDIGDLMMLK	FKWE-ETNG-	WSTSNMLKMW	SSWWSGSDG	ANMEVHKIRI	461
HL	ITVPETIIGN	KTFITLITLD	KDLGDLMLLK	LHWE--GSAM	WKNVWNRVQT	IIPWGSRRMK	PLLSVYKISV	446
PL	-----NT	EEYQLHVGTL	MPGRTYELL	DAEVNVGS--	-----VTEVKFR	WNNHILNPLN	PKYGASKVAL	422
* * * * *								
LPL1	-SGETOSKVI	FSAKEGEFVY	LVRGGEDGVF	VKSKEDNLSR	KEKLMHKLKK	QGSFLGQSDA		523
LPL2	RAGETQQKMV	FCVKDPESQK	L--TQEVTF	VKCKDANRTN	SKQTPKRVTL	EKH		511
HL	KAGETQERTS	FCAMTNEQQ	VEVSQDKV-Y	VRCKEETQKQ	RRRKHNRVLR	EP		497
PL	QRGDKMIF	FC--GTQ	KVEENEIQSV	LPCQV				452

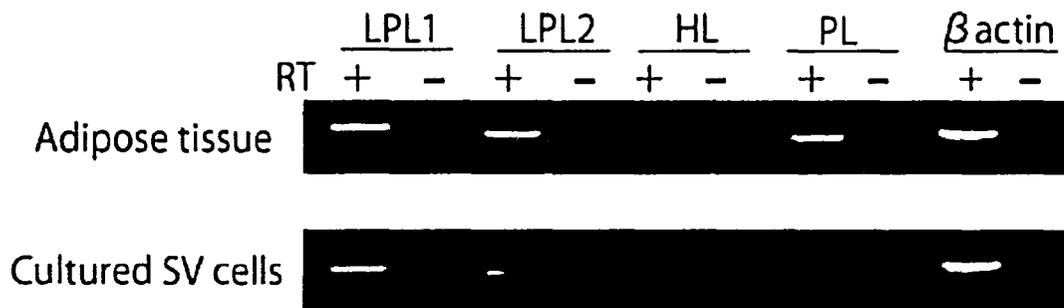
**Fig. 1-2 Comparison of the deduced amino acid sequences of red sea bream LPL1, LPL2, HL and PL**

Gaps (-) were introduced to maximize sequence identities. Catalytic triads are boxed and lipid binding region is underlined. Asterisks (\*) indicate conserved amino acid residues.



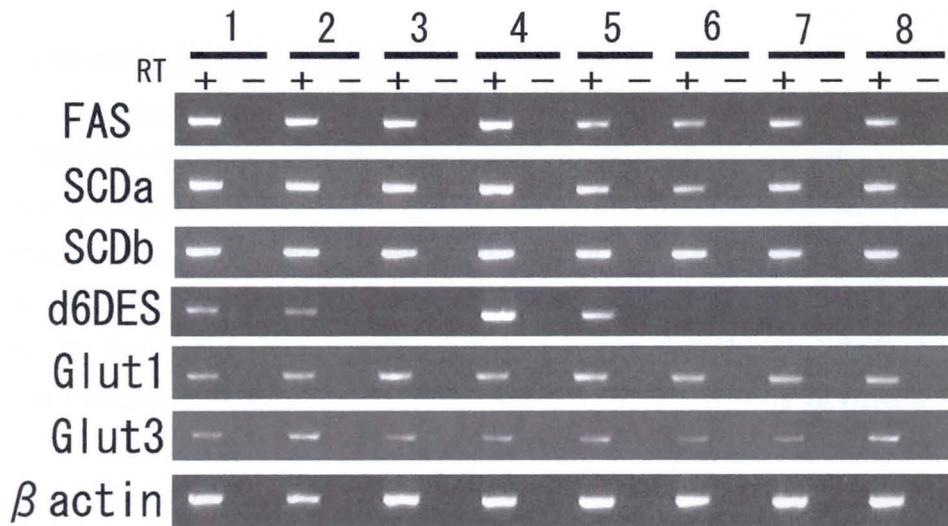
**Fig. 1-3 Tissue-specificities of red sea bream LPL1, LPL2, HL and PL**

The expression of each gene was detected by RT-PCR. The RNA samples were extracted from 1) adipose tissue, 2) gill, 3) heart, 4) hepatopancreas, 5) gonad, 6) muscle, 7) ovary, and 8) testis. The cDNA samples were prepared with reverse transcription (RT+) and negative controls for contamination of genomic DNA were run without reverse transcription (RT-).



**Fig. 1-4 The gene expression of lipases in red sea bream adipose tissue and cultured SV cells**

The expression of each gene was detected by RT-PCR. The RNA samples were extracted from visceral adipose tissue and cultured SV cells of red sea bream. The cDNA samples were prepared with reverse transcription (RT+) and negative controls for contamination of genomic DNA were run without reverse transcription (RT-).



**Fig. 1-5 Tissue specificities of red sea bream FAS, d6DES, SCDa, SCDb, Glut1 and Glut3**

The expression of each gene was detected by RT-PCR. The RNA samples were extracted from 1) adipose tissue, 2) gill, 3) heart, 4) hepatopancreas, 5) gonad, 6) muscle, 7) ovary, and 8) testis. The cDNA samples were prepared with reverse transcription (RT+) and negative controls for contamination of genomic DNA were run without reverse transcription (RT-).

## 第2章 脂肪細胞分化誘導系の確立

脂肪細胞は繊維芽細胞様の前駆脂肪細胞に由来し、その分化に伴い細胞質内に脂肪を蓄積する (Hausman et al. 1980)。よって脂肪細胞の分化は生体内への脂肪蓄積を決定する重要な要因の一つである。哺乳類における研究から脂肪細胞の分化に際しては様々な特徴的遺伝子発現を伴い、その機能を発現していくことが知られている (Gaskins et al. 1989, Ntambi and Kim 2000)。例えばそのうちのひとつ、リポタンパク質リパーゼ (LPL) は初期マーカー遺伝子であることが認められている (Dani et al. 1990)。LPLは脂肪細胞においては血中からの脂肪取り込みに関与し、細胞への脂肪蓄積に中心的な役割を果たす (Nilsson-Ehle et al. 1980)。そのため LPL 遺伝子発現や酵素活性は *in vitro* および *in vivo* において、脂肪細胞の分化指標としても汎用されている (Vu et al. 1996, McNeel et al. 2000, Ding and Mersmann 2001)。

脂肪細胞分化は様々なホルモンなど外部因子による制御を受ける (Gregoire et al. 1998, Boone et al. 2000)。たとえば、インスリンは哺乳類や鳥類において脂肪細胞分化に必須であることが報告されている (Dani et al. 1986, Suryawan et al. 1997, Ramsay and Rosebrough 2003)。また甲状腺ホルモン  $T_3$  も株化脂肪細胞 Ob17 の分化を促進することが知られている (Gharbi-Chihi et al. 1981)。さらに脂溶性ビタミンであるビタミン A や D も脂肪細胞分化に作用することがよく知られており、*all-trans* レチノイン酸 (RA) や 1,25-ジヒドロキシビタミン  $D_3$  ( $1,25(OH)_2D_3$ ) は生理的濃度においては脂肪細胞分化を阻害する (Sato and Hiragun 1988, Kawada et al. 1990, 1996, Suryawan and Hu 1997)。一方、ごく低濃度、例えば 1 pM-10 nM の RA が分化を促進することも報告され (Safonova et al. 1994)、さらに Vu (1996) は 1 nM-0.1  $\mu$ M の  $1,25(OH)_2D_3$  により分化時の LPL 遺伝子発現が促進されることを報告している。

魚類においても脂肪細胞は生体内の主要な脂肪蓄積部位であり、その生体内での分布や細胞数は脂質含量や肉質を決定する要因であると考えられる (Yamada and Nakamura 1964, Yamada 1981, Shindo et al. 1986, Zhou et al. 1996)。近年、初代培養法を用いた脂肪細胞の増殖や分化の解析手法が大西洋サケにおいて報告された (Vegusdal et al. 2003)。初代培養前駆脂肪細胞を用い、血清存在下で培地中に高濃度の脂質を添加することにより細胞質への脂肪蓄積が誘導され、それとともに脂肪細胞に特徴的とされる転写因子 C/EBP $\alpha$  (CCAAT enhancer binding protein  $\alpha$ ) や PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) のタンパク質が発現することが報告されている (Vegusdal et al. 2003)。

養殖魚における体脂肪蓄積制御を考えた場合、脂肪細胞の発達機構の解明とともにホルモン制御など脂肪細胞分化にかかわる外部要因を明らかにすることも重要である。本章では、マダイにおいて、脂肪細胞分化機構の解明に重要となる前駆脂肪細胞の初代培養系および分化誘導系を確立し、それを用いてインスリン、 $T_3$ 、および脂肪細胞分化への影響を調べた。本章における実験では、厳密に培養液組成などの実験条件を決定することができ

るよう、分化誘導は無血清培養条件下において行った。はじめに脂肪蓄積を指標としてインスリンの終末分化への影響を調べ、培養下での分化能・ホルモンへの応答能の保持を確認した。本実験においては外来脂肪酸の影響を避けるため、脂肪酸無添加の培地 (DME / Ham F12K nutrient 1:1, v/v) を基礎培地として使用し、脂肪酸新規合成による細胞内脂肪蓄積を解析した。次により高感度な指標として初期マーカーである LPL 遺伝子発現を用い、インスリン、 $T_3$ 、および脂溶性ビタミンの影響を調べた。本章ではホルモン等の脂肪細胞分化への影響を明らかにするとともに、魚類脂肪細胞における脂肪蓄積過程の解析や遺伝子発現を用いた迅速・高感度なスクリーニング手法の確立を行った。

## 材料と方法

### 1. 試験魚

マダイ稚魚は日清マリンテック (愛知県田原市) より購入し、養殖研究所 (三重県南伊勢町) においてマダイ用市販飼料 (日清丸紅、東京都中央区) を給餌して、800-1200 g となるまで飼育し試験に供した。

### 2. 細胞培養用培地の調製

植え込み用培地には DME /F12 (1 : 1, v/v) 培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用し、65 mM NaCl、10% ウシ胎児血清 (Invitrogen)、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン、100 U/mL ペニシリンを添加して使用した。

脂肪細胞の分化能・脂肪蓄積能を確認する試験では、外来脂肪酸の影響を避けるため、脂肪酸の含まれていない Ham F12K nutrient (Invitrogen) を用いて分化誘導培地を調整した。分化誘導培地 (FA(-)分化誘導培地) は DME (Invitrogen) と Ham F12K nutrient を 1 : 1 (v/v) で混和した培地に 65 mM NaCl、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン、100 U/mL ペニシリン、50  $\mu$ g/mL トランスフェリン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、5 ng/mL 亜セレン酸ナトリウムおよび 50 ng/mL ハイドロコルチゾン を添加したものを使用した。

また、LPL を用いた分化指標への影響解析においては、基礎培地としては哺乳類脂肪細胞培養に汎用される DME /F12 (1:1, v/v)培地 (Invitrogen)を用いて分化誘導培地を調整した。この培地には FA(-)分化誘導培地と異なり、0.042 mg/L のリノール酸 (linoleic acid) が含まれている。DME /F12 (1:1, v/v)培地に 65 mM NaCl、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン、100 U/mL ペニシリン、50  $\mu$ g/mL トランスフェリン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、5 ng/mL 亜セレン酸ナトリウムおよび 50 ng/mL ハイドロコルチゾン を添加したものを分化誘導培地として使用した。ウシインスリン、Triiodothyronine ( $T_3$ )、all-*trans* retinoic acid (RA)、retinylacetate および 1,25 dihydroxyvitamin  $D_3$  (1,25(OH) $_2D_3$ )はいずれも Sigma-Aldrich 社から購入し、ウシインスリンは酢酸添加水溶液、 $T_3$ は PBS 溶液、脂溶性ビタミン類はエタノール溶液として調整した。

### 3. 脂肪組織からの Stromal-vascular 細胞 (SV 細胞) の調製

前駆脂肪細胞を含むマダイ SV 細胞は腹腔内脂肪組織から酵素消化法により調製した。採取した脂肪組織は 5%ウシ血清アルブミンを含む PBS 中で細切し、その後 1 mg/mL の Type I コラゲナーゼ (Invitrogen) を加え、室温にて一時間消化した。消化液は 200  $\mu$ m のナイロンメッシュで濾過した後、800  $\times$  g で 3 分間遠心分離し、成熟脂肪細胞 (上層) と SV 画分 (沈殿) を分離した。回収した SV 画分は植え込み用培地に懸濁し、約 80%コンフルエント (4.3 $\times$ 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>) の条件で 35 mm のプラスチック培養皿で培養した。2 日後に SV 細胞は血清不含の植え込み用培地で 3 回洗浄し、非接着の細胞を除いた後、さらに 2 日間培養し、コンフルエントの状態での分化誘導実験に使用した。

### 4. 脂肪細胞の分化誘導

脂肪細胞の分化誘導は培地を分化誘導培地に交換することによって誘導した。細胞は血清不含の植え込み用培地で 2 回洗浄し、血清培地を除去したのちに分化誘導培地に交換した。培養は 25°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で行い、培地は 2 日または 3 日ごとに交換した。各実験における培養期間およびホルモン添加については本文または図中に示した。

### 5. 細胞観察

マダイ培養脂肪細胞は 10%ホルマリンで固定したのち Sudan black B および nuclear fast red 染色に供し、脂肪蓄積を観察した。

### 6. トリグリセリド、タンパクおよび DNA の定量

脂肪蓄積の指標としてトリグリセリド (TG) を、細胞の活力の指標として可溶性タンパクを、また細胞数の指標として DNA 含量を測定した。SV 細胞は 25 mM Tris-HCl pH7.5 -1 mM EDTA 中に回収、ホモジナイズし、測定に供した。可溶性タンパクは DC Protein assay kit (Bio rad, Hercules, CA, USA) を用い Lowry 法 (Lowry et al. 1951) により測定し、DNA 含量は Labarca と Paigen (1980) の方法により Hoechst33258 を用いた蛍光法にて測定した。また、総脂質をクロロホルム - メタノール (2 : 1, v/v) で抽出したのち TG の分析に用いた。TG 含量の測定は市販キット TG Test Wako (Wako, Osaka, Japan) を用いた酵素法により行った。

### 7. RNA 抽出、cDNA 合成および LPL 遺伝子発現の定量

総 RNA 抽出は市販キット SV total RNA isolation system (Promega, Madison, WI, USA) を用いて行い、抽出した RNA 量は紫外吸光 260 nm を用いて定量した。逆転写反応は random hexamer をプライマーとして行い、cDNA 合成は Omniscript RT PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用した。市販キット類はいずれも仕様書に従って使用し

た。なお合成反応は1 µgの総RNAを10 µLの反応系で行った。

LPL 遺伝子発現の定量はリアルタイム PCR 法で行い、定量と検出には iCycler iQ real-time PCR detection system (Biorad)を使用した。PCR反応は20 µL反応系で行い、反応液はiQ SYBR Green Supermix (Biorad)を用いて調製した。プライマーは各1 µMで使用し、493 bpのマダイ LPL (LPL1: GenBank accession No. AB243791)のcDNA断片を増幅し、定量した。プライマーの塩基配列は5'-CTCAAGACCCGCGAGAT-3' (正鎖側) および5'-AAGCGTCGCTCTGACC-3' (逆鎖側) とした。PCRの温度条件は、はじめに3分間95°C熱変性したのち、熱変性95°C 0.5分間、対合反応50°C 0.5分間、伸長反応72°C 0.5分間のサイクルで40回増幅した。各サンプルの測定値は3回反復の平均値とし、遺伝子発現量は(コピー数/ µg RNA)として算出した。得られた数値は対照区との相対値として表示した。また検量線は濃度既知のマダイ LPL cDNA断片を用いて作成した。

## 8. 統計処理

検定は分散分析および Fisher's Protected Least Significant Difference 法により行った。解析には Stat View 4.51 (Abacus Concept, Berkeley, CA, USA)を使用し、有意水準5% ( $P < 0.05$ ) で有意差と判定した。

## 結果

### 1. 脂肪細胞の終末分化におけるインスリンの効果

マダイ腹腔内脂肪組織から調製したSV細胞は、分化誘導処理を行うと哺乳類培養脂肪細胞の場合と同様な形態変化が観察された。5 µg/mL ウシインスリン存在下で2週間分化誘導処理を行うと Sudan black B 染色により細胞質内への脂肪滴の蓄積が認められた(Fig. 2-1a)。また、それに伴い、SV細胞中のTG含量 (TG /DNA) も3.8倍の上昇が見られた (Fig. 2-1b)。

ウシインスリンを0、0.5、5、50 µg/mLの濃度で添加し、2週間培養すると5 µg/mL と50 µg/mL区において細胞内への脂肪蓄積が認められ (Fig. 2-2a)、細胞のTG濃度はインスリン濃度に応じて上昇する傾向を示した (Fig. 2-2b)。

これらの結果から、マダイSV細胞は培養条件下において分化能を有することおよびホルモン等への応答能を保持していることが確認された。

### 2. ホルモンが LPL 遺伝子の分化依存的発現に及ぼす影響

マダイ脂肪細胞の分化過程において、LPL 遺伝子 (LPL1) の発現は分化依存的に上昇した。分化誘導前と比較し、分化誘導後3日目には発現レベルは3.6倍上昇し、その後平衡状態に達した (Fig. 2-3)。発現動態からマダイ LPLは哺乳類の場合と同様、分化の初期マーカーになりうると考えられた。

LPL 遺伝子発現を指標としてマダイ培養 SV 細胞においてホルモン（インスリンおよび T<sub>3</sub>）および脂溶性ビタミン（RA、retinyl acetate および 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>）が脂肪細胞分化に及ぼす影響を調べた。T<sub>3</sub> および脂溶性ビタミンについては単独での効果とあわせてウシインスリン（5 μg/mL）との併用効果についても検討した（Fig. 2-4, 2-5）。インスリンは LPL 遺伝子発現に対して正の効果を示し、無添加区（0 μg/mL）と比較し、ウシインスリン 50 μg/mL 添加区では 4.7 倍の上昇が見られた（Fig. 2-4）。T<sub>3</sub> は単独では、効果は見られなかった（Fig. 2-4）が、インスリンとの併用により促進効果が見られ、5 μg/mL ウシインスリン存在下では無添加区（0 nM）と比較し 20 nM T<sub>3</sub> 区では LPL 遺伝子発現に 3.3 倍の上昇が見られた（Fig. 2-5）。また、インスリンの有無にかかわらず脂溶性ビタミンにおいては LPL 遺伝子発現に影響は見られなかった（Fig. 2-4, 2-5）。

### 考察

本章では魚類脂肪細胞の分化過程を解析する実験モデルとしてマダイ SV 細胞の初代培養系を用いた分化誘導系を確立し、ホルモン等外部因子の細胞分化への影響を解析した。哺乳類の株化脂肪細胞における研究で報告されているが、脂肪細胞分化の過程では、増殖停止、クローン増殖、特異的遺伝子およびタンパク質の発現、細胞質への脂肪滴の蓄積、という特徴的な現象が観察される（Alihaud 1996, Gregoire et al. 1998）。同様に、マダイ SV 細胞でも脂肪細胞への分化誘導により脂肪滴の蓄積や特徴的遺伝子発現の上昇が観察された（Fig. 2-1, 2-3）。また本研究で用いた培養条件下においてホルモン添加に対する応答性の保持も確認された（Fig. 2-2, 2-4, 2-5）。汎用される前駆脂肪細胞の分化誘導法としては、マウス由来 3T3-L1 前駆脂肪細胞などに用いられる血清存在下においてデキサメタゾンおよび 1-メチル 3-イソブチルキサンチン処理することにより分化誘導する方法（Rubin et al. 1978）と、ブタやウシの前駆脂肪細胞に用いられる無血清培養法（Suryawan et al. 1997, Ohyama et al. 1998）に大別される。マダイの場合、血清存在下では明瞭な分化（脂肪滴の蓄積）は確認されず、そのため本研究ではブタ SV 細胞に用いられる無血清培養法を改良して使用した。これまで大西洋サケにおいても血清存在下での魚類 SV 細胞培養法が報告されているが（Vegusdal et al. 2003）、本研究では無血清培養法を用いたため、より厳密な実験条件の設定が可能になった。本法は魚類脂肪細胞の分化機構、とりわけホルモン等の分化制御因子の作用を解析する上で有用であると考えられる。

培養マダイ SV 細胞を用いて、インスリンおよび T<sub>3</sub> の脂肪細胞分化への効果を調べた結果、いずれも正の効果を示した。ウシインスリンは脂肪酸合成による脂肪蓄積（Fig. 2-2）および LPL 遺伝子の分化依存的発現（Fig. 2-4）を促進した。また、T<sub>3</sub> は単独では顕著な効果を示さなかったが（Fig. 2-4）、ウシインスリンとの併用では LPL 遺伝子発現を促進した（Fig. 2-5）。インスリン、T<sub>3</sub> とも哺乳類においては脂肪細胞分化の促進因子として知られており（Dani et al. 1986, Gharbi-Chihi et al. 1981）、マダイでも促進効果が認められた

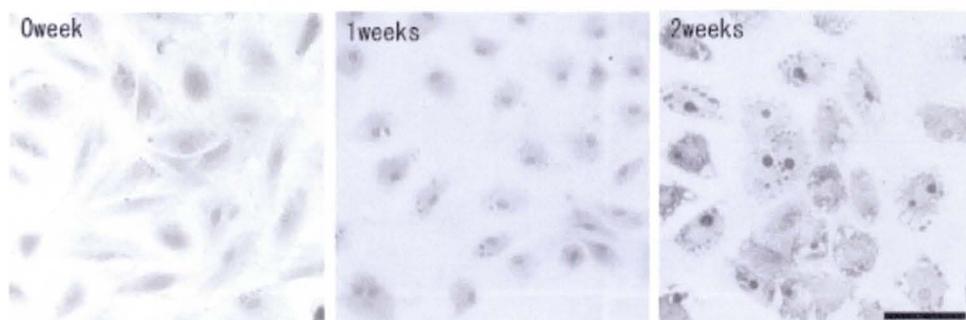
ことから、この両ホルモンによる脂肪細胞制御機構は哺乳類のものと類似していることが示唆される。

脂溶性ビタミンが脂肪細胞分化を制御することは哺乳類においてはよく知られていることである。ビタミンA代謝物である *all-trans* レチノイン酸 (RA) は生理的濃度以上 (0.1-10  $\mu\text{M}$ ) においては分化抑制効果を、極低濃度 (1 pM-10 nM) においては促進効果を示す (Safonova et al. 1994)。また、ビタミンD代謝物である  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  は 0.64 nM から 2 nM の範囲で株化前駆脂肪細胞 ST13 や 3T3-L1 の分化を促進する (Sato and Hiragun 1988)。また、Vu は 3T3-L1 において 1 nM から 0.1  $\mu\text{M}$  の範囲で  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  は LPL 遺伝子の分化依存的発現を誘導することを報告している (Vu et al. 1996)。本研究においては RA および  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  は LPL 遺伝子発現で見ると、マダイ脂肪細胞分化への影響は示さず、脂溶性ビタミンによる制御機構に差異があることを示唆する。しかし、脂溶性ビタミン類には培養条件によってはその生理活性を低下させる可能性もあるため、今後さらに詳細な検討が必要である。

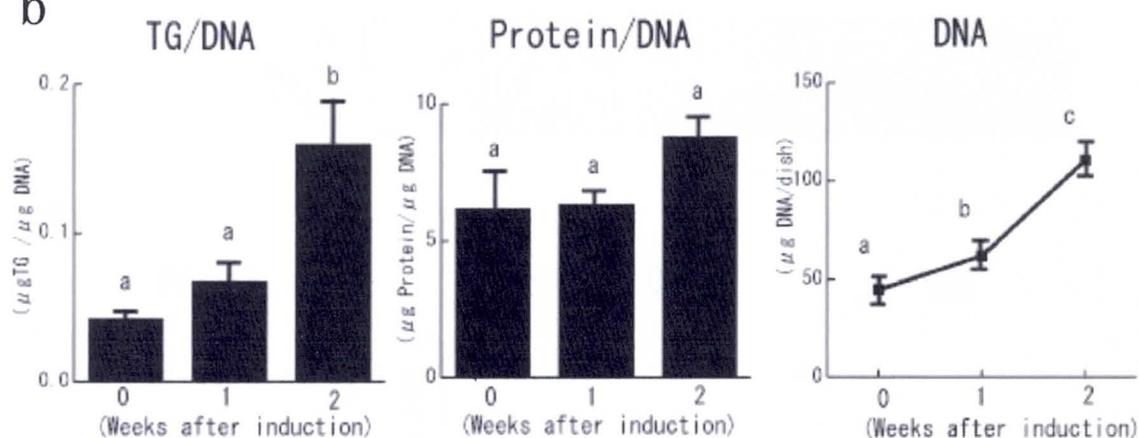
本研究においてはレチノイン酸および *retinyl acetate* はマダイ脂肪細胞分化に対して影響を示さなかったが、マダイにおいては飼料中に添加したレチノイン酸や *retinyl acetate* が腹腔内の脂肪組織の発達を促進する (Ogata and Oku 2001)。脂肪組織の発達には前駆脂肪細胞からの分化だけでなく、細胞増殖や分化後の成長など様々な現象が関わっているため、マダイにおける飼料中の脂溶性ビタミンによる脂肪組織発達の促進効果は、分化ではなく細胞増殖や成長に対して作用した結果である可能性も考えられる。

また本研究において、分化指標として LPL 遺伝子 (LPL1) を使用し、分化時の LPL 遺伝子発現の経時的変化や内分泌制御において知見が得られた。第1章において2種類の LPL 様遺伝子 (LPL1 および LPL2) がマダイにおいて同定されているが、本実験では発現量が高く、典型的な LPL に類似性の高い LPL1 を指標として使用した (Oku et al. 2006a)。魚類において LPL はいくつかの魚種で同定され、個体の生理状態を測る指標として用いられている (Liang et al. 2002a, Oku et al. 2002, Saera-Vila et al. 2005) が、本研究では LPL 遺伝子が脂肪細胞分化とリンクした形で発現制御されることが示され、脂肪細胞分化の分子機構を解明する上でも今後有用な解析モデルとなるものと考えられる。

a

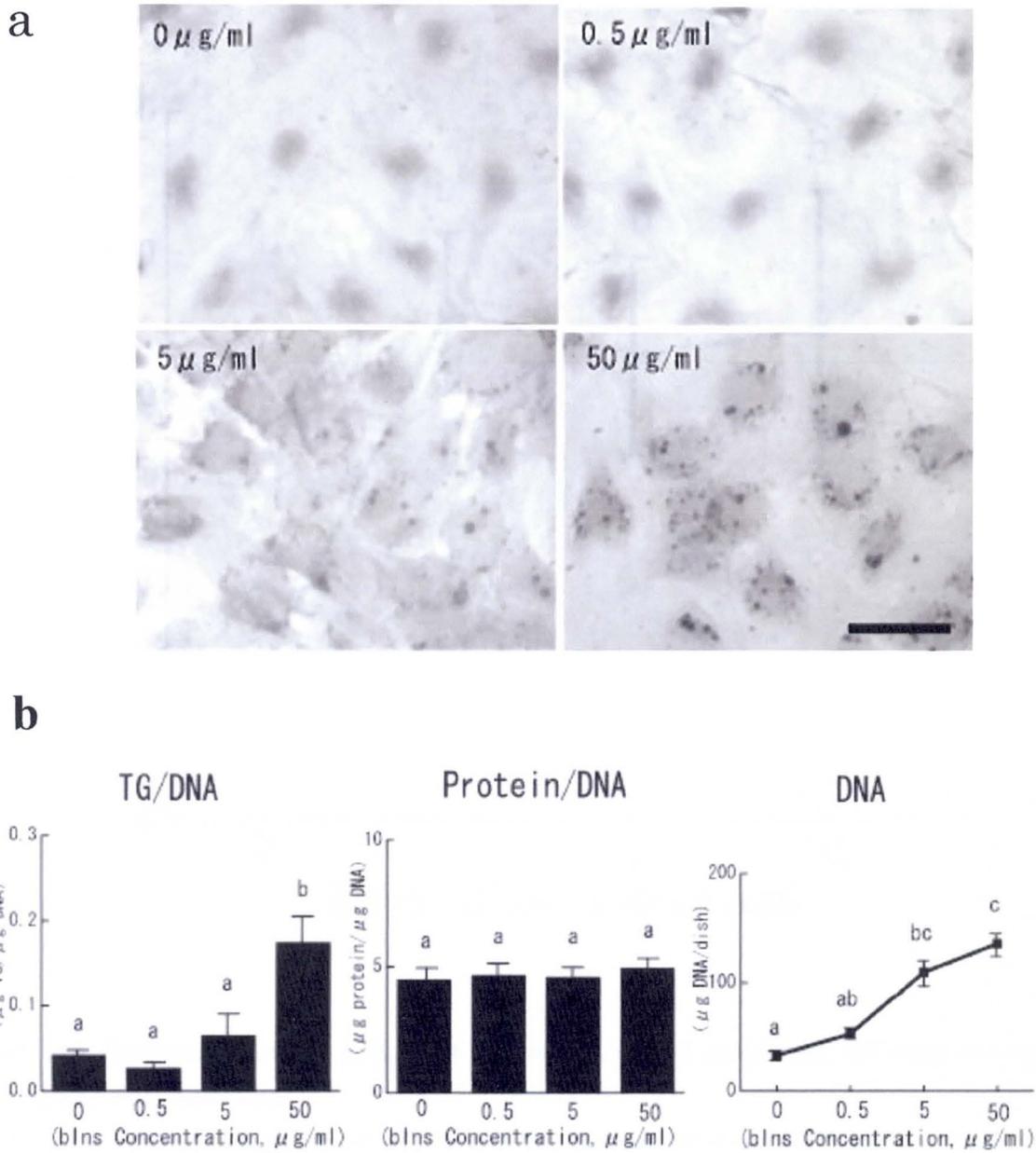


b



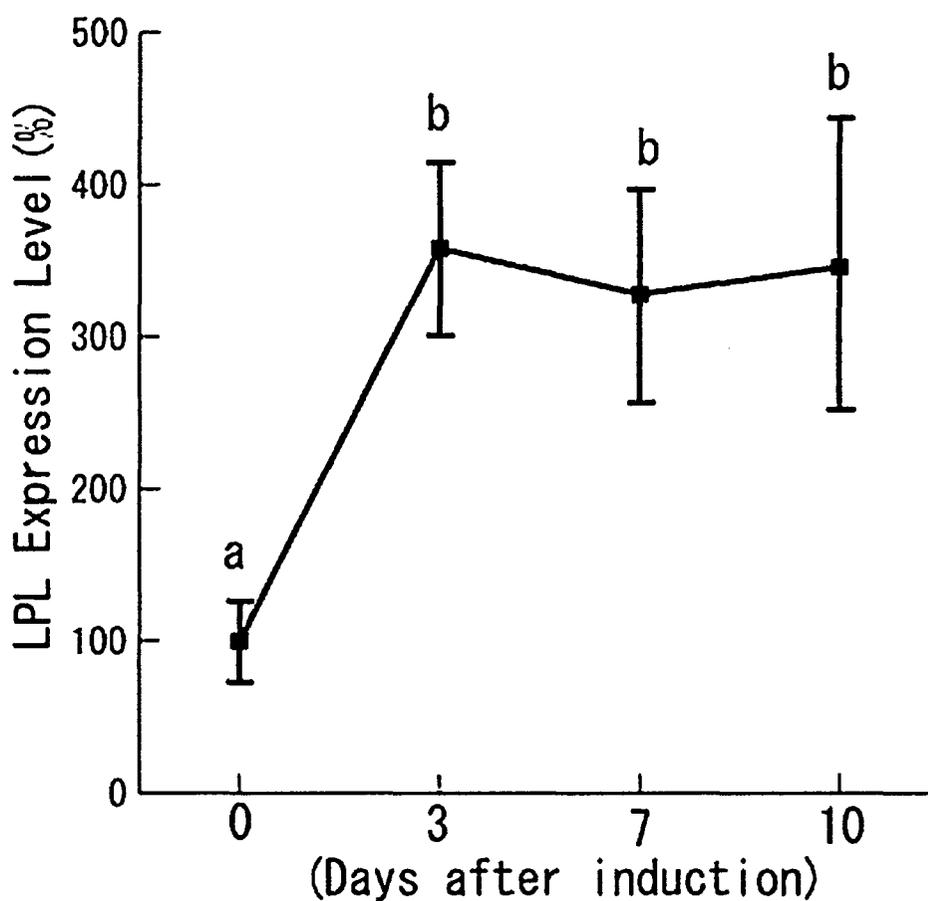
**Fig. 2-1 The lipid accumulation in the cytoplasm (a) and changes in the amounts of triglyceride, protein and DNA (b) during the terminal differentiation of red sea bream SV cells**

The red sea bream SV cells were cultured for 2 weeks in the FA(-) induction medium containing 5 $\mu\text{g/ml}$  bovine insulin. (a) The cells were fixed in 10% formaldehyde and stained with Sudan black B and Nuclear fast red. The bar indicates 50  $\mu\text{m}$ . (b) The experiment was repeated six times with isolated cell cultures derived from six different fish. Means (mean $\pm$ SEM) not sharing a common superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ).



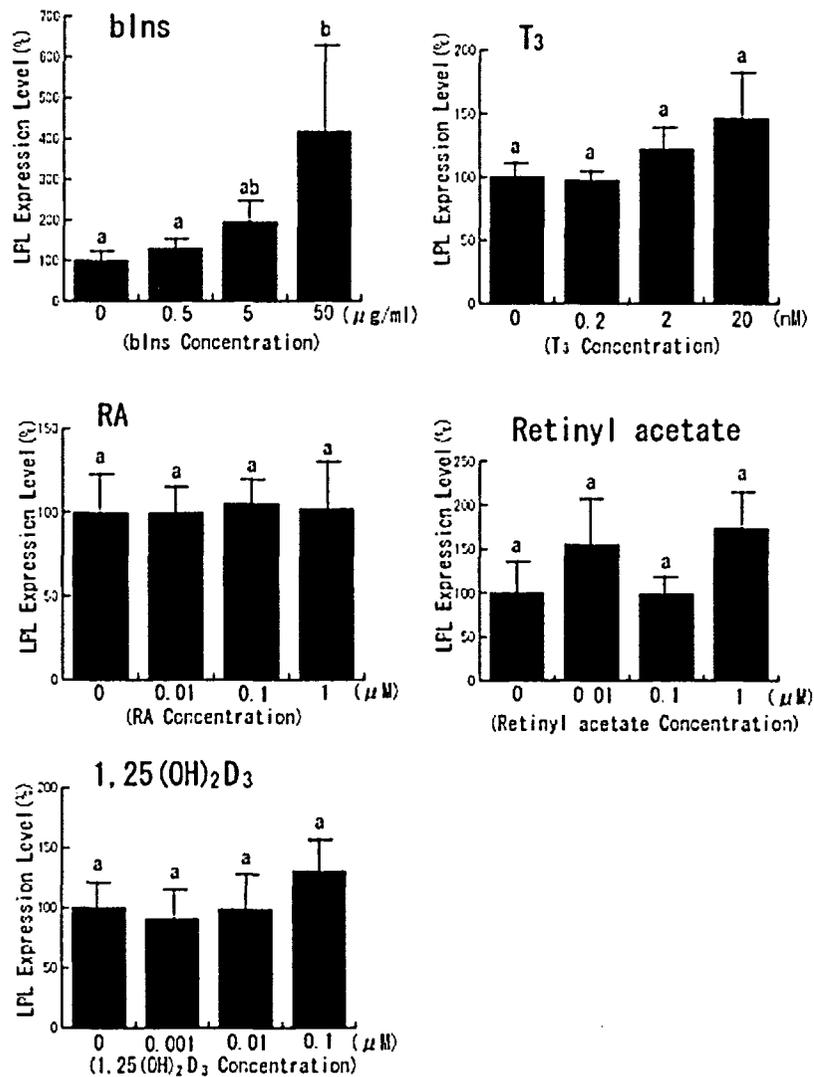
**Fig. 2-2 Effects of insulin on the lipid accumulation in the cytoplasm (a) and the amounts of triglyceride, protein and DNA (b) in the differentiated red sea bream SV cells**

The red sea bream SV cells were cultured for 2 weeks in the FA(-) induction medium containing various concentrations of bovine insulin (bIns). (a) The cells were fixed in 10% formaldehyde and stained with Sudan black B and Nuclear fast red. The bar indicates 50  $\mu\text{m}$ . (b) The experiment was repeated six times with isolated cell cultures derived from six different fish. Means not sharing a common superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ).



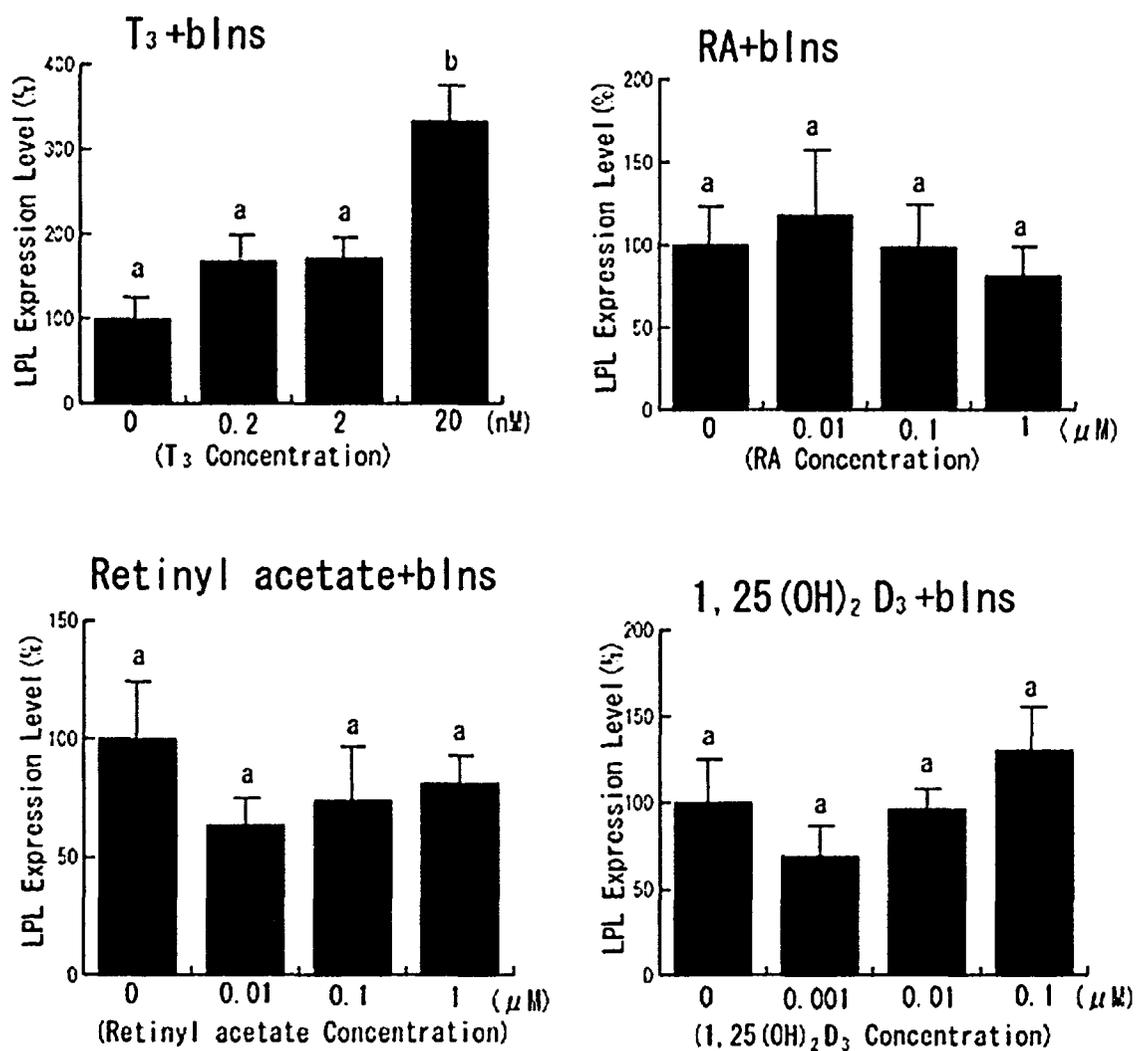
**Fig. 2-3 Time-course of the LPL gene expression in red sea bream SV cells during adipocyte differentiation.**

The red sea bream SV cells were cultured for 10 days in the standard induction medium containing 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bovine insulin. The experiment was repeated six times with isolated cell cultures derived from six different fish. Values (mean  $\pm$  SEM) are reported as percentage to the mean value of the control (0 day) and taken as 100 %. Means not sharing a common superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 2-4 Effects of various concentrations of hormones on the differentiation-linked LPL gene expression in red sea bream SV cells**

The red sea bream SV cells were cultured for 3 days in the presence of various concentrations of bovine insulin (bIns), triiodothyronine (T<sub>3</sub>), all-*trans*-retinoic acid (RA), retinyl acetate, or 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). The hormones were added to the standard induction medium. The experiment was repeated six times with isolated cell cultures derived from six different fish. Values (mean  $\pm$  SEM) are reported as percentage to the mean value of the control taken as 100 %. Means not sharing a common superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 2-5 Effects of concomitant addition of insulin and various concentrations of hormones on the differentiation-linked LPL gene expression in red sea bream SV cells**  
 The red sea bream SV cells were cultured for 3 days in the presence of 5µg/ml of bovine insulin (bIns) and various concentrations of triiodothyronine (T<sub>3</sub>), all-*trans*-retinoic acid (RA), retinyl acetate, or 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). The hormones were added to the standard induction medium. The experiment was repeated six times with isolated cell cultures derived from six different fish. Values (mean±SEM) are reported as percentage of the mean value obtained for the control and taken as 100 %. Means not sharing a common superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ).

### 第3章 マダイ脂肪細胞分化の分子機構と転写因子 PPAR の役割

PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) はリガンド依存型転写因子であり、多くの脂質代謝遺伝子を制御することが知られる (Qi et al. 2000, Kliewer et al. 2001, Lee et al. 2003)。PPAR は DNA 結合部位やリガンド結合部位を有しており、その構造的な特徴から核内レセプター遺伝子族に分類される (Escriva et al. 1997, Chawla et al. 2001)。哺乳類において PPAR は  $\alpha$ 、 $\beta$  (または  $\delta$  と呼ばれる) および  $\gamma$  の 3 つのサブタイプが同定され、それぞれ脂質代謝において特徴的な役割を果たす。PPAR $\alpha$  は主に肝臓で発現し脂肪酸  $\beta$  酸化など脂質の異化を制御する (Kliewer et al. 2001, Lee et al. 2003)。 $\beta$  サブタイプは体内の様々な組織で発現が普遍的に認められ、脂質代謝のほか、脳や皮膚の機能発現への関与も示唆されている (Kliewer et al. 2001, Lee et al. 2003)。PPAR $\gamma$  は脂肪組織で多く発現し、LPL などの脂質蓄積関連遺伝子のプロモーター領域に結合することにより転写を制御する (Auwerx et al. 1996, Schoonjans et al. 1996a, 1996b)。哺乳類においてはこれまでの研究から、特異的なリガンドを用いてそれぞれのサブタイプを活性化することが可能であることが知られている。例えば、フィブラート化合物 (Fibrate) は  $\alpha$  サブタイプの特異リガンドであり (Kersten and Wahli 2000, Guo et al. 2001)、プロスタグランジンやチアゾリジン (グリタゾン) 化合物は PPAR $\gamma$  を特異的に活性化することが知られている (Kersten and Wahli 2000, Houseknecht et al. 2002)。

PPAR は脂肪細胞の分化にも関与する。多くの研究報告から、特に  $\gamma$  サブタイプが脂肪細胞分化に中心的な役割を果たすと考えられている。脂肪細胞分化に際して PPAR $\gamma$  は、脂質取り込み、脂肪酸合成、糖輸送など脂質蓄積に関わる遺伝子発現を分化依存的に制御することが知られる (Gregoire et al. 1998, Morrison and Farmer 1999)。例えば、レトロウイルスを用いた発現実験では、脂肪細胞への分化能をもたない株化繊維芽細胞 3T3 において PPAR $\gamma$  を強制発現させると脂肪細胞に分化することから、PPAR $\gamma$  が脂肪細胞分化への決定的な要因であることが示されている (Tontonoz et al. 1994)。また、フィブラート化合物が脂肪細胞分化の初期過程を誘導することから、 $\alpha$  サブタイプの関与も示されている (Brandes et al. 1986, Pasquali et al. 2004)。その他に、前駆脂肪細胞において、非代謝性脂肪酸である 2-bromopalmitate により活性化された  $\beta$  サブタイプが、PPAR $\gamma$  を作動し、結果的に脂肪細胞を分化誘導することが報告されており (Amri et al. 1994, Bastie et al. 1999)、こうした研究例から間接的ながらも PPAR $\beta$  が脂肪細胞分化を誘導することが示されている。

魚類においても脂質代謝における重要性から PPAR の同定や機能解析が進められており、これまでの報告によると、魚類 PPAR は一次構造、組織分布、リガンド特異性などは哺乳類のものと同様であると考えられるが、いくつかの点で異なる特徴も有していることが明らかとなっている (Andersen et al. 2000, Ibabe et al. 2002, Boukouvala et al. 2004, Batista-Pinto et al. 2005, Leaver et al. 2005)。例えば、ゼブラフィッシュ、ヨーロッパス

ズキ、ブラウントラウトにおいては遺伝子発現の組織分布は哺乳類と類似しているとされるものの、大西洋サケ、プレイス（ツノガレイ属）、ヨーロッパヘダイでは $\gamma$ サブタイプは哺乳類と比べ、より広範に遺伝子発現が認められることが報告されている（Andersen et al. 2000, Leaver et al. 2005）。また遺伝子の構造解析から、いくつかの魚種において PPAR $\alpha$  および  $\gamma$  では哺乳類のものと比較して、リガンド結合部位に数個のアミノ酸残基が付加されていることが明らかになっている。例として、ヨーロッパヘダイ PPAR $\gamma$  では 23 個、プレイスの PPAR $\gamma$  では 35 個のアミノ酸付加がヒト PPAR $\gamma$  と比較して認められ（Andersen et al. 2000, Leaver et al. 2005, Kondo et al. 2007）、こうしたことから魚類 PPAR のリガンド結合特性は哺乳類のものとは異なることが示唆されている。魚類 PPAR のリガンド特性に関して、散発的ではあるが、いくつかの研究例により知見が得られている。初代培養ゼブラフィッシュ肝細胞においては PPAR $\gamma$  作動薬である 15deoxy- $\Delta^{12,14}$ -プロスタグランジン J<sub>2</sub> (0.3  $\mu$ M) は PPAR $\alpha$  および  $\gamma$  のタンパク質発現を誘導する（Ibabe et al. 2005）。大西洋サケの培養肝細胞では、フィブラート化合物 (0.5 mM) が PPAR $\gamma$  発現と脂質代謝関連酵素の活性を誘導する（Ruyter et al. 1997）。トラフグ PPAR $\alpha$  は哺乳類 PPAR $\alpha$  の特異的リガンドである Wy14643 (10  $\mu$ M) や ETYA (5,8,11,14-eicosatetraynoic acid, 1  $\mu$ M) および DHA、EPA のような多価不飽和脂肪酸により活性化されるものの、それらのリガンドは  $\beta$  および  $\gamma$  サブタイプには作用しないことが報告されている（Kondo et al. 2007）。大西洋サケ PPAR $\beta$  は 100  $\mu$ M の一価不飽和脂肪酸や非代謝性脂肪酸である 2-bromopalmitate (50  $\mu$ M) および哺乳類  $\beta$  サブタイプのリガンドである GW501516 (10  $\mu$ M) によって活性化される（Leaver et al. 2007）。さらにプレイスやヨーロッパヘダイにおいては PPAR $\alpha$  および PPAR $\beta$  は哺乳類の  $\alpha$ 、 $\beta$  リガンドによりそれぞれ活性化されるが、PPAR $\gamma$  は哺乳類の  $\gamma$  サブタイプのリガンドを用いても活性化されないことが報告されている（Leaver et al. 2005）。

このように、近年、魚類 PPAR に関して様々な報告がなされているが、魚類脂肪細胞の分化における PPAR の役割についての知見は少ない。PPAR は脂質代謝における重要性和リガンド依存性転写因子であることを考えると、魚類においてその特性や制御機構を明らかにすることは、分子・細胞レベルでの養殖魚の体脂肪蓄積の制御を考える上で必須である。本章ではマダイ脂肪細胞分化および機能発現の分子機構を調べるため、マダイより 3 種類の PPAR 遺伝子 ( $\alpha$ 、 $\beta$  および  $\gamma$ ) をクローニングし、各サブタイプが脂肪細胞分化に果たす役割を検討した。はじめに、マダイ脂肪組織より 3 種類の PPAR の cDNA をクローニングし、その一次構造と組織分布を決定した。次に、初代培養系を用いた解析により、脂肪細胞分化過程での発現変動をサブタイプ毎に調べ、さらに哺乳類 PPAR 作動薬が脂肪細胞分化に及ぼす影響について解析した。

## 材料と方法

### 1. 試験魚

クローニングおよび RT-PCR に使用したマダイ稚魚は日清マリンテック (愛知県田原市) より購入し、体重約 100 g まで養殖研究所 (三重県南伊勢町) において飼育したものを使用した。RT-PCR における卵巣および精巣採取に使用したマダイ成魚 (約 1.8 kg) は南勢水産 (三重県南伊勢町) より購入した。また、細胞培養に使用したマダイ (800-1,200 g) は南勢水産 (三重県南伊勢町) より購入し、使用時まで養殖研究所 (三重県南伊勢町) にてマダイ用市販飼料 (日清丸紅、東京都中央区) を給餌して飼育した。

## 2. PPAR 遺伝子の cDNA 部分断片の単離

PPAR 遺伝子のクローニングは縮重プライマーを用いた RT-PCR 法 (Degenerated PCR) で行った。総 RNA は AGPC 法 (Chomczynski and Sacchi 1987) によりマダイ腹腔内脂肪組織より抽出した。Oligo-dT プライマーによる cDNA 合成には 1  $\mu$ g の総 RNA を用い、合成は 15  $\mu$ L 反応系で行った。逆転写反応には First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE healthcare, Buckinghamshire, UK) を使用し、cDNA 合成産物 15  $\mu$ L のうち 0.5  $\mu$ L を 25  $\mu$ L の PCR に使用した。

PPAR cDNA 断片の増幅には Table 3-1 に示した 3 組の縮重プライマーを使用した。25  $\mu$ L 反応系での PCR 溶液の組成は 0.5 U Taq polymerase (Takara, Tokyo, Japan)、200  $\mu$ M dNTP、10 mM Tris-HCl pH8.3、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub> および 20 pmole のプライマーとした。増幅は 40 サイクルで行い、各サイクルは熱変性 94°C 0.5 分間、対合反応 50°C 1 分間、伸長反応 72°C 1 分間とし、終了時には 72°C で 3 分間伸長反応を行った。増幅断片はプラスミドベクター pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, US) にクローニングし、塩基配列を決定した。

## 3. 3' および 5'RACE

縮重プライマーによる PCR 法により同定した PPAR 遺伝子は 3' および 5'RACE 法を用いて完全長の塩基配列を決定した。RACE 用の鋳型作成に用いた総 RNA はマダイ脂肪組織より抽出し、抽出は上記同様 AGPC 法にて行った。5' および 3' 末端にアダプター配列を有する RACE 用の鋳型は SMART RACE cDNA Amplification kit (Clontech, Palo, Alto, CA, USA) を用いて作成した。増幅は Nested PCR 法による 2 回増幅により行い、使用した遺伝子特異的プライマー配列は Table 3-1 に記載した。1 回目の PCR 反応は部分断片の増幅と同一条件で行い、PCR 産物は 100 倍希釈して 2 回目の PCR 反応 (Nested PCR) に使用した。2 回目の PCR 反応も一回目と同一条件で行ったが、サイクル中の対合反応の温度は 55°C とした。増幅産物は前記同様プラスミドにクローニングし、塩基配列を決定した。

## 4. 分子系統解析

マダイおよび他種生物のアミノ酸配列を用いた PPAR の分子系統解析は近隣接合法 (Neighbor Joining 法) により行った。Bootstrap 1000 回検定による系統樹作成には

DNASIS Pro ver.2.06 (Hitachi, Tokyo, Japan)を使用した。

## 5. RT-PCR

遺伝子発現の組織分布は RT-PCR 法により決定した。RNA は幼魚 (166 g) の脂肪組織、鰓、心臓、肝臓、生殖腺 (未成熟)、筋肉 (背側白色筋)、および成魚 (1.8 kg) の卵巣および精巣より抽出した。総 RNA 抽出は AGPC 法 (Chomczynski and Sacchi 1987) により行った。cDNA 合成は 15  $\mu$ L 反応系で行い、総 RNA 1  $\mu$ g を用いた。逆転写反応は random hexamer をプライマーとして行い、First-Strand cDNA synthesis kit (GE healthcare) を使用した。

合成した cDNA 15  $\mu$ L のうち 0.5  $\mu$ L を 25  $\mu$ L 反応系の PCR に供した。PCR 反応液の組成は前記と同様とし、30 サイクルの増幅を行った。温度条件は熱変性 94°C 0.5 分間、対合反応 55°C 0.5 分間、伸長反応 72°C 0.5 分間とし終了時に 72°C で 3 分間伸長反応を行った。反応産物のうち 5  $\mu$ L を 3% アガロースゲル電気泳動上で分離し、エチジウムブロマイド染色により増幅産物を検出した。本実験に使用した特異的プライマーの塩基配列は Table 3-2 に記載した。

## 6. 細胞培養用培地の調製

植え込み用培地は基礎培地として DME /F12 (Invitrogen) を使用し、65 mM NaCl、10% ウシ胎児血清 (Invitrogen)、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシンおよび 100 U/mL ペニシリン (Invitrogen) を添加して使用した。分化誘導用培地は無血清とし、DME /F12 に 65 mM NaCl、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン (Invitrogen)、100 U/mL ペニシリン (Invitrogen)、ITS 溶液 (1  $\times$  ITS: 5  $\mu$ g/mL ウシインスリン、50  $\mu$ g/mL トランスフェリン、5 ng/mL 亜セレン酸ナトリウム、Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) および 50 ng/mL ハイドロコルチゾン (Sigma) を添加したものを使用した。15-deoxy-  $\Delta^{12,14}$ -プロスタグランジン J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) (Cayman, Ann Arbor, MI, USA) および Ciglitazone (Cayman) は DMSO 中に、Fenofibrate (Sigma) はエタノール中に調整した。2-bromopalmitate (2-bromohexadecanoic acid, Sigma) はエタノール中に調製し、終濃度 1% のウシ血清アルブミン (脂肪酸不含) とともに添加した。

## 7. SV 細胞の調製

前駆脂肪細胞を含むマダイ SV 細胞は腹腔内脂肪組織から酵素消化法により調製した。採取した脂肪組織は 5% ウシ血清アルブミンを含む PBS 中で細切し、その後 1 mg/mL の Type I コラゲナーゼ (Invitrogen) を加え、室温にて一時間消化した。消化液は 200  $\mu$ m のナイロンメッシュで濾過した後、800  $\times$  g で 3 分間遠心分離し、成熟脂肪細胞 (上層) と SV 画分 (沈殿) を分離した。回収した SV 画分は植え込み用培地に懸濁し、約 80% コンフルエント (4.3 $\times$ 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>) の条件で 35 mm のプラスチック培養皿で培養した。2 日後に SV 細胞は

血清不含の植え込み用培地で3回洗浄し、非接着の細胞を除いた後、さらに2日間培養し、コンフルエントの状態での分化誘導実験に使用した。

脂肪細胞の分化誘導は培地を分化誘導培地に交換することによって誘導した。細胞は血清不含の植え込み用培地で2回洗浄し、血清培地を除去したのちに分化誘導培地に交換した。培養は25°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で行い、培地は2日または3日ごとに交換した。

## 8. 細胞観察

マダイ培養脂肪細胞は10%ホルマリンで固定したのち Sudan black B および nuclear fast red 染色に供し、脂肪蓄積を観察した。

## 9. RNA抽出、cDNA合成および脂肪蓄積関連遺伝子発現の定量

第1章で同定した脂質代謝関連遺伝子およびマウスにおいて分化に伴い発現が低下することが報告 (Spiegelman et al. 1983, Cornelius et al. 1988) されているβアクチン遺伝子について PPAR 遺伝子と併せてマダイ SV 細胞における発現を調べた。

総 RNA 抽出は市販キット SV total RNA isolation system (Promega, Madison, WI, USA)を用いて行い、抽出した RNA 量は紫外吸光 260 nm を用いて定量した。逆転写反応は random hexamer をプライマーとして行い、cDNA 合成は Omniscript RT PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用した。合成反応は 1 μg の総 RNA を 10 μL の反応系で行った。

遺伝子発現の定量はリアルタイム PCR 法で行い、検出と定量は iCycler iQ real-time PCR detection system (Biorad, Hercules, CA, USA) を使用した。PCR 反応は 20 μL 反応系で行い、iQ SYBR Green Supermix (Biorad) を用いて調製した。プライマーは各 1 μM で使用し、使用したプライマーの塩基配列は Table 3-2 に記載した。PCR の温度条件は、はじめに 3 分間 95°C 熱変性したのち、熱変性 95°C 0.5 分間、対合反応 50°C 0.5 分間、伸長反応 72°C 0.5 分間のサイクルで 40 回増幅した。各サンプルの測定値は 2 回反復の平均値とし、遺伝子発現量は (コピー数 / μg RNA) として算出した。また検量線は各遺伝子の濃度既知のマダイ cDNA 断片を用いて作成した。

## 10. 統計処理

各処理間の有意差検定は分散分析 (ANOVA) および Tukey 多重比較により行った。解析には KyPlot 4.0 (Kyens Lab, Tokyo, Japan) を用い、有意水準 5% ( $P < 0.05$ ) により有意差を判定した。

# 結果

## 1. PPAR 遺伝子の一次構造解析と組織分布

縮重プライマーを用いた PCR により 3 種の PPAR 遺伝子の部分塩基配列が得られた。3' および 5'RACE 法によりそれぞれ完全長の塩基配列を決定し、これまで報告されている他生物由来 PPAR のアミノ酸配列とともに分子系統解析を行った結果、マダイから得られた 3 種の遺伝子はそれぞれ PPAR $\alpha$ 、 $\beta$  および  $\gamma$  に相当するものであった (Fig. 3-1)。同定したマダイ PPAR 遺伝子の塩基配列はそれぞれデータベース GenBank にマダイ PPAR $\alpha$  (AB298547)、 $\beta$  (AB298548) および  $\gamma$  (AB298549) として登録した。1,948bp のマダイ PPAR $\alpha$  はアミノ酸 469 残基 (ORF 1,407bp)、1,990bp の PPAR $\gamma$  はアミノ酸 522 個 (ORF 1,566bp) をコードしていた (Fig. 3-2)。PPAR $\beta$  については 3' および 5'RACE において完全長を決定することはできなかったが、399 アミノ酸残基に相当する 1,201bp の塩基配列を決定した (Fig. 3-2)。

マダイにおいて同定された 3 種の PPAR 遺伝子のアミノ酸配列は、相互には 55–63%、またヒト PPAR $\gamma$  に対しても 55–61% の相同性を示し、その一次構造は高度に保存されていた (Fig. 3-2)。ヒト PPAR $\gamma$  と比較して、マダイ PPAR $\gamma$  ではリガンド結合部位内に 24 個のアミノ酸付加が認められた (Fig. 3-2)。

RT-PCR 法により各サブタイプの組織分布を調べたところ、いずれのサブタイプも魚体各組織で広範に発現が認められた (Fig. 3-3)。精巣における  $\alpha$  サブタイプおよび筋肉における  $\gamma$  サブタイプの発現は検出されなかったが、脂肪組織、鰓、心臓、生殖腺 (幼魚)、肝臓および卵巣ではいずれのサブタイプも発現が確認された (Fig. 3-3)。

## 2. 培養脂肪細胞における分化時の遺伝子発現と哺乳類 PPAR 作動薬の効果

マダイ腹腔内脂肪組織より調整した初代培養 SV 細胞を用いて、脂肪細胞分化過程における PPAR 遺伝子の発現レベルの変動を調べた。この実験では PPAR と併せて第 1 章で同定した脂質蓄積関連遺伝子についてもあわせて発現動態を解析した。

マダイ SV 細胞は分化誘導処理により 7–10 日後には細胞質内に脂肪滴の蓄積が認められた (Fig. 3-4)。また、脂肪細胞の分化に伴い、脂質代謝遺伝子の発現に変動が見られた (Fig. 3-5)。脂肪の取り込み (LPL1, LPL2)、脂肪酸合成 (FAS)、および脂肪酸不飽和化 (d6DES, SCDa および SCDb) 関連遺伝子は分化依存的に発現が上昇した (Fig. 3-5)。一方、Glut1 および  $\beta$  アクチンは発現が低下し、また Glut3 の発現レベルは分化誘導期間中に変化は見られなかった (Fig. 3-5)。

マダイ脂肪細胞の分化過程において、3 種類の PPAR 遺伝子はそれぞれ異なる発現動態を示した (Fig. 3-6)。PPAR $\alpha$  は一過性の上昇を示し、分化誘導 7 日目で発現レベルは最大となったが 10 日目には分化前 (0 日) のレベルに低下した (Fig. 3-6)。また、PPAR $\beta$  の発現は脂肪細胞分化に伴い上昇傾向を示したが、PPAR $\gamma$  遺伝子発現は 10 日間の分化誘導期間中に変動は見られなかった (Fig. 3-6)。

魚類脂肪細胞の機能発現における PPAR の役割を調べるため、哺乳類 PPAR 作動薬 (15dPGJ<sub>2</sub>, Ciglitazone, Fenofibrate, 2-bromopalmitate) が分化時の PPAR および下流の

脂質代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響を調べた。培養マダイ SV 細胞を各作動薬の存在下で 3 日間分化誘導処理を行い、それぞれの遺伝子発現レベルを解析した。

処理期間中、マダイ SV 細胞には作動薬および分化誘導処理による細胞死や細胞密度低下などの細胞障害性は見られなかった (Fig. 3-7)。作動薬の効果としては、15d-PGJ<sub>2</sub> 添加により PPAR $\beta$  および  $\gamma$  の発現低下が、また Ciglitazone により PPAR $\beta$  および  $\gamma$  の発現上昇が見られたが、いずれも脂質代謝遺伝子への影響は見られなかった (Fig. 3-8)。また、Fenofibrate は PPAR および脂質代謝遺伝子の発現に特に影響は示さなかった (Fig. 3-8)。2-bromopalmitate は PPAR $\gamma$  の発現を有意に増加させ、PPAR $\alpha$  および  $\beta$  の発現を有意に低下させた (Fig. 3-8)。これに伴い、LPL1、FAS、SCDa および SCDB などの遺伝子発現の有意な上昇が確認された (Fig. 3-8)。

## 考察

本章では脂肪細胞分化における PPAR の役割に焦点をあて、各サブタイプの特徴および脂肪細胞分化・機能発現と遺伝子発現の関係について解析した。マダイ PPAR は哺乳類のものと同様の一次構造は類似しており (Fig. 3-2)、組織分布はいずれのサブタイプも魚体内に広範に発現が認められた (Fig. 3-3)。マダイ脂肪細胞の分化に際しては 3 種のサブタイプはそれぞれ異なる発現動態を示した (Fig. 3-3)。マダイ脂肪細胞の分化に際して、哺乳類 PPAR の作動薬である 15dPGJ<sub>2</sub>、Ciglitazone および Fenofibrate は明瞭な添加効果を示さなかったが、2-bromopalmitate は PPAR $\gamma$  および下流の脂質代謝遺伝子を活性化させた (Fig. 3-8)。以上のような結果が得られており、そこから考えられる分子機構について考察を進める。

本研究の結果ではマダイの PPAR は  $\alpha$ 、 $\beta$  および  $\gamma$  とも脂肪組織、鰓、肝臓、心臓など多くの組織で発現が検出された (Fig. 3-3)。他の魚種においても、組織ごとに発現レベルは異なるものの、PPAR 遺伝子発現は様々な組織で検出されている (Andersen et al. 2000, Boukouvala et al. 2004, Batista-Pinto et al. 2005, Leaver et al. 2005, Raingeard et al. 2006)。これらの結果は PPAR が魚体内の様々な組織において脂質代謝に関わっていることを示している。近年の分子生物学的研究により、魚類 PPAR 各サブタイプにおけるゲノム構成は哺乳類と異なっていることが報告されている (Robinson-Rechavi et al. 2001, Maglich et al. 2003, Leaver et al. 2007)。例えば、大西洋サケ PPAR $\beta$  には 2 つのアイソタイプ ( $\beta 1$  と  $\beta 2$ ) があり、 $\beta 1$  は肝臓で、 $\beta 2$  は鰓で主に発現するなど、異なる組織分布を示すことから両サブタイプには機能的に差異があることが示唆されている (Leaver et al. 2007)。PPAR の機能をより理解するためには、マダイにおいてもサブタイプ構成を明らかにし、それぞれの機能についても解析することが望まれる。

本章では初代細胞培養系を用い、マダイ脂肪細胞分化における PPAR 遺伝子の発現動態について解析した。第 2 章で述べたとおり、マダイ腹腔内脂肪組織より調整した SV 細胞は培養条件下で脂肪細胞へと分化させることができ、脂肪滴の蓄積 (Fig. 3-4) や特徴的な遺

伝子発現 (Fig. 3-7) を示した。その過程において、3種の PPAR 遺伝子はそれぞれ異なる制御を受けることが明らかとなり (Fig. 3-6)、脂肪細胞分化において異なる役割を担っていることが示唆された。 $\alpha$  サブタイプは7日目までに一過性の発現上昇を示したことは (Fig. 3-6)、哺乳類での報告 (Brandes et al. 1986, Pasquali et al. 2004) と同様に、 $\alpha$  サブタイプが分化の初期過程に関与していることが示唆されたことになる。哺乳類において PPAR $\gamma$  は脂肪細胞分化に主導的な役割を果たしており、脂肪細胞分化において PPAR $\gamma$  は活性化され、下流にあたる脂質蓄積系の遺伝子発現を誘導する (Gregoire et al. 1998, Morrison and Farmer 1999)。同様に、大西洋サケの培養脂肪細胞では脂肪細胞分化とともに PPAR $\gamma$  タンパク質の発現が誘導されることが確認されている (Vegusdal et al. 2003)。マダイにおいても、2-bromopalmitate 添加により PPAR $\gamma$  遺伝子が誘導され、それと同時に脂質代謝関連遺伝子の発現が上昇することが確認されたことは (Fig. 3-8)、PPAR $\gamma$  は脂肪細胞分化に必要であることを示唆している。しかし、こうした結果とは異なり、分化誘導後の遺伝子発現の経時変化を調べると (Fig. 3-6)、PPAR $\gamma$  は誘導期間中には発現変動は見られず、一方  $\beta$  サブタイプは上昇傾向を示したことから、 $\beta$  サブタイプが脂肪細胞の分化や機能発現に関与することが示唆される。このように、2つの実験結果 (Fig. 3-6, Fig. 3-8) からは、それぞれ矛盾する結論が示唆され、魚類脂肪細胞分化における PPAR 各サブタイプの役割は十分に解明されていない。一つの可能性として、タイムコース実験 (Fig. 3-6) において培養条件への適合が十分でなかったなどの要因で、PPAR $\gamma$  が十分機能しなかったために、結果として  $\beta$  サブタイプが  $\gamma$  の機能を補償したことが考えられる。本研究においては、脂肪細胞の分化はサケ脂肪細胞の場合 (Vegusdal et al. 2003) と異なり、無血清条件下でのホルモン処理により誘導しているが、魚類脂肪細胞における PPAR の役割を明確にするためには今後、より両種間で統一した実験条件での研究等が必要と考えられる。

魚類 PPAR $\alpha$  および  $\gamma$  において、ヒト PPAR $\gamma$  と比較するとリガンド結合部位にいくつかのアミノ酸付加が認められることが報告されている (Andersen et al. 2000, Leaver et al. 2005, Kondo et al. 2007)。マダイの PPAR $\gamma$  においても、リガンド結合部位に 24 個のアミノ酸残基の付加 (Res. 298-321) が認められ (Fig. 3-2)、リガンド特性が哺乳類のものとは異なることが示唆された。実際に哺乳類 PPAR $\gamma$  の作動薬である 15d-PGJ<sub>2</sub>、Ciglitazone、および PPAR $\alpha$  作動薬である Fenofibrate はマダイ脂肪細胞分化に対して明瞭な効果を示さなかった (Fig. 3-8)。今回試した作動薬の中では、非代謝性の脂肪酸である 2-bromopalmitate だけが LPL、FAS、SCD などの機能発現を促進することができ、脂肪酸修飾物や代謝物が脂肪細胞における機能発現の制御物質となりうることが示唆された。ただし、2-bromopalmitate によりマダイ PPAR $\gamma$  の脂肪細胞分化依存的発現は誘導されたが (Fig. 3-8)、実際にリガンドとして PPAR $\gamma$  に対して結合しているのかは未だ明らかではない。大西洋サケでは 2-bromopalmitate は  $\beta$  サブタイプを活性化することが報告され (Leaver et al. 2007)、またマウスの株化脂肪細胞では 2-bromopalmitate により活性化された PPAR $\beta$  が  $\gamma$  サブタイプを活性化し、間接的に脂肪細胞分化を誘導することが報告されている (Amri et

al. 1994、Bastie et al. 1999)。マダイ脂肪細胞において、2-bromopalmitate は PPAR $\gamma$  および脂質蓄積遺伝子の活性化を誘導したが (Fig. 3-8)、こうした効果もマウスの場合と同様に  $\beta$  サブタイプを介したものである可能性もあり、その作用機序を明らかにするためには、今後更なる解析が必要である。

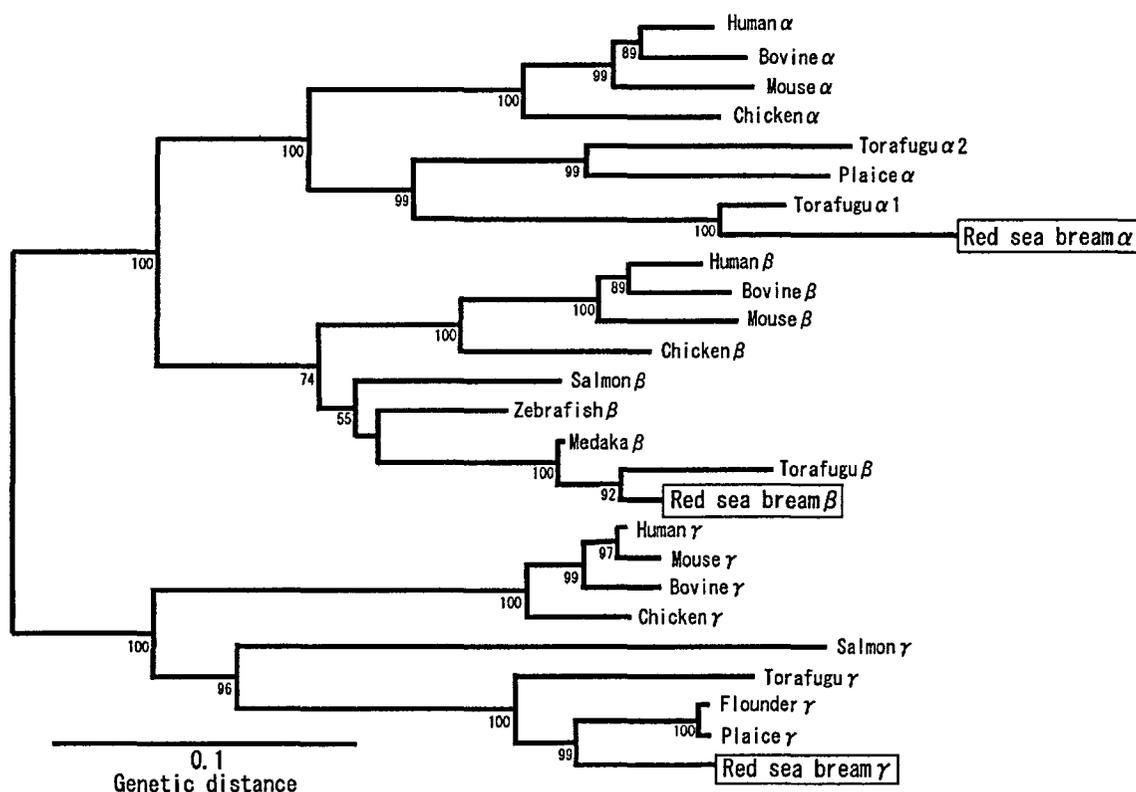
**Table 3-1. The oligonucleotide sequences for degenerated PCR and RACE**

Target gene	Nucleotide sequence	Approximate position in human PPAR $\gamma$ *
<b>Degenerated PCR</b>		
PPAR $\alpha$	(Forward) 5' -GTGCACGCTTGGCAGGGNTGYAA-3'	(res. 124-132)
	(Reverse) 5' -AACCGCGAACTCGAATTTNGGCTC-3'	(res. 365-372)
PPAR $\beta$	(Forward) 5' -TGCCCAAGCCGARAARGAGAA-3'	(res. 185-192)
	(Reverse) 5' -AACCGCGAACTCGAATTTNGGCTC-3'	(res. 365-372)
PPAR $\gamma$	(Forward) 5' -AGCGTTTTCTACTAYGGGT-3'	(res. 119-125)
	(Reverse) 5' -AACCGCGAACTCGAATTTNGGCTC-3'	(res. 365-372)
<b>Gene specific primers for 3' RACE</b>		
PPAR $\alpha$	(First) 5' -GACAAGTGTGAGCGCG-3'	(res. 146-151)
	(Nested) 5' -AAGCGGAGATGGTAACGGG-3'	(res. 194-199)
PPAR $\beta$	(First) 5' -GATCGCTGTGAGCGTT-3'	(res. 146-151)
	(Nested) 5' -CTTTGGGAATGTCCCATGA-3'	(res. 173-178)
PPAR $\gamma$	(First) 5' -CGACATGGAGCACATGCA-3'	(res. 200-205)
	(Nested) 5' -CTGAAATACTTCCCCCTCAC-3'	(res. 223-229)
<b>Gene specific primers for 5' RACE</b>		
PPAR $\alpha$	(First) 5' -TTCTCTACCGCTTCGGC-3'	(res. 290-295)
	(Nested) 5' -CAGCTCCACAGCGTCCAT-3'	(res. 274- 279)
PPAR $\beta$	(First) 5' -GATAGAAAACATGGACCC-3'	(res. 248-253)
	(Nested) 5' -ACCGCTTTCTGCTTTCCA-3'	(res. 278-284)
PPAR $\gamma$	(First) 5' -CATCTTTGCCACCAGGGT-3'	(res. 253-258)
	(Nested) 5' -AGCCTTGGCCTTGTTTCATGTT-3'	(res. 227-233)

\* The amino acid sequence of PPAR $\gamma$  is indicated in Fig.3-2.

**Table 3-2 The oligonucleotide sequences for RT-PCR and real time PCR**

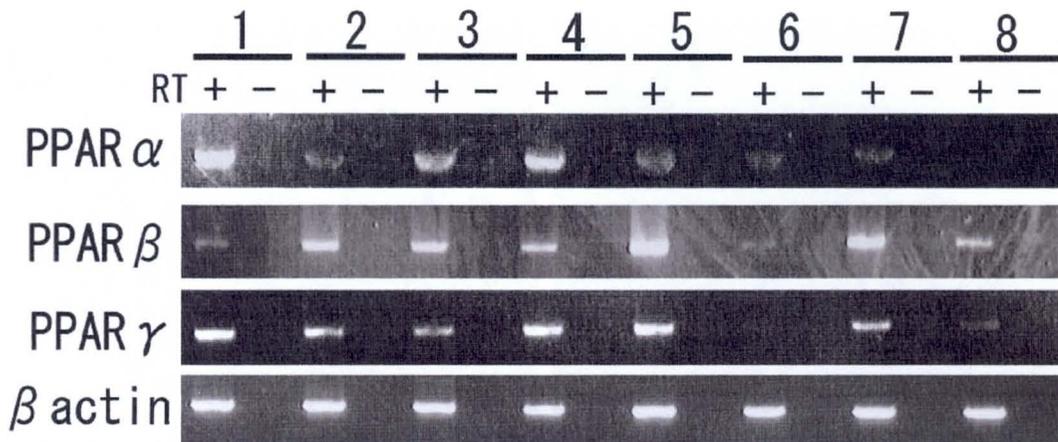
Target gene	GenBank accession No.	(Forward) (Reverse) Sequences	Amplified fragment length
PPAR $\alpha$	AB298547	5' -GACAAGTGTGAGCGCG-3' 5' -CATCTTTGCCACCAGGGT-3'	(362bp)
PPAR $\beta$	AB298548	5' -CTTTGGGAATGTCCATGA-3' 5' -GATAGAAAACATGGACCCC-3'	(339bp)
PPAR $\gamma$	AB298549	5' -CGACATGGAGCACATGCA-3' 5' -TTCTCTCACGGCTTCGGC-3'	(360bp)
Lipoprotein lipase 1 (LPL1)	AB243791	5' -CTCAAGACCGCGAGAT-3' 5' -AAGCGTCGCTCTGACC-3'	(493bp)
Lipoprotein lipase 2 (LPL2)	AB054062	5' -ATTCATTCTGCTGGTGAC-3' 5' -TCAGTGCTTCTCCAGAGTTAC-3'	(320bp)
Fatty acid synthetase (FAS)	AB298550	5' -AGCTGTTTCTGTTGGGAT-3' 5' -CTGGGAAGAGGGCCATC-3'	(345bp)
Delta-6-desaturase (d6DES)	AB298553	5' -GCACCTCCAGCATCACGC-3' 5' -ACGAAGCTGATGAGCGC-3'	(330bp)
StearoylCoA desaturase a (SCDa)	AB298551	5' -CTTCGCCACATTGGTTG-3' 5' -CACTCAAAGCAACCATTGC-3'	(342bp)
StearoylCoA desaturase b (SCDb)	AB298552	5' -CTTTGCTCACATCGGCTG-3' 5' -CGCTGAACGTGACAAACTT-3'	(342bp)
Glucose transporter 1 (Glut1)	AB298554	5' -TTGTCTTGGGCATCCTTATT-3' 5' -AGAGCTGCAGGACGACG-3'	(351bp)
Glucose transporter 3 (Glut3)	AB298555	5' -AGTTATTGGCATCCTGGTG-3' 5' -AGAGAGCTGGAGGATGATA-3'	(351bp)
$\beta$ actin	AB252854	5' -GGCACTGCTGCCTCCTC-3' 5' -GCCAGGATGGAGCCTCC-3'	(309bp)



**Fig. 3-1 Phylogenetic analysis of PPARs**

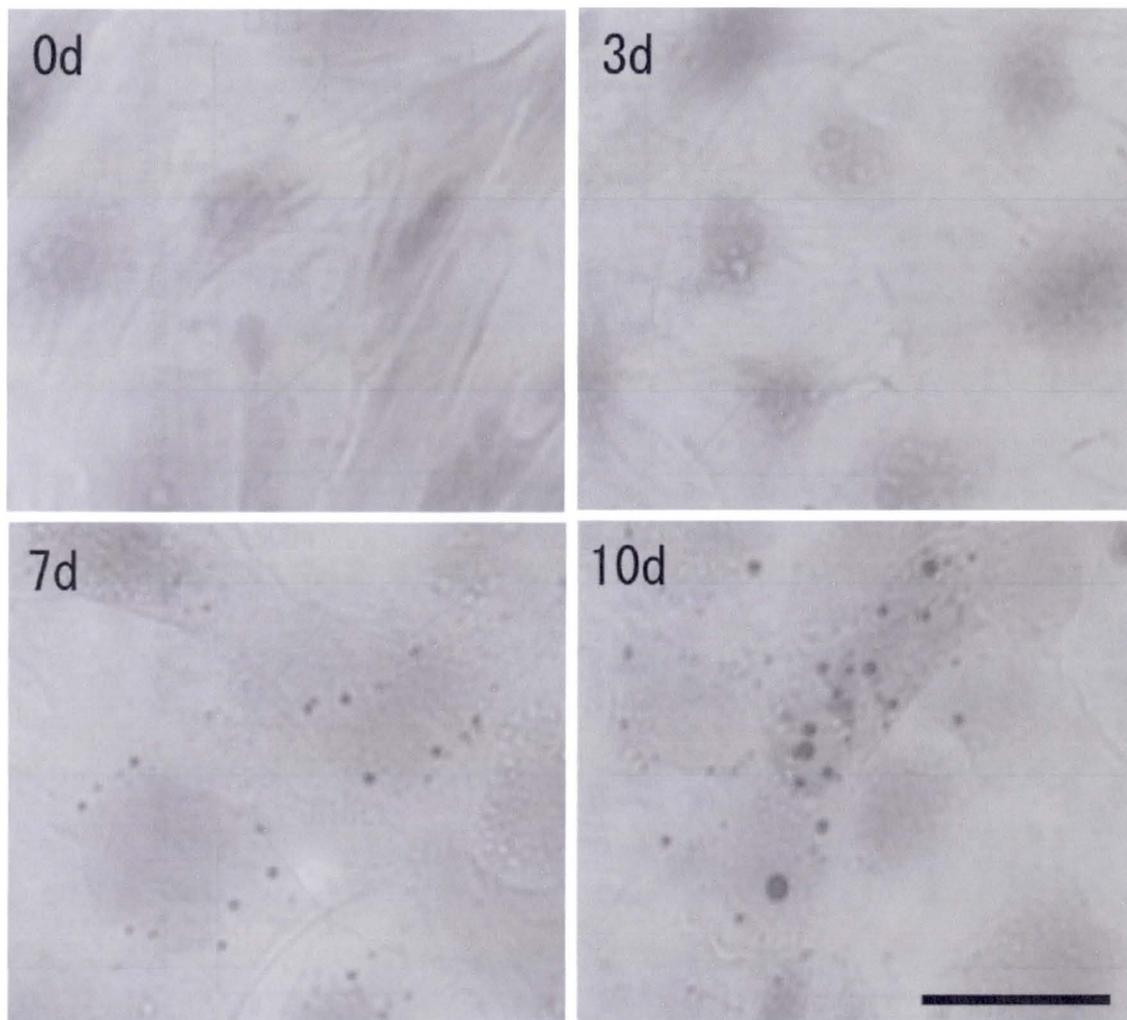
The phylogenetic tree was constructed using DNASIS Pro version 2.06 software (Hitachi, Tokyo, Japan). The sequences of red sea bream are boxed. The Genbank accession numbers used in this analysis are as follows: red sea bream PPAR $\alpha$  ([AB298547](#)), red sea bream PPAR $\beta$  ([AB298548](#)), red sea bream PPAR $\gamma$  ([AB298549](#)), human PPAR $\alpha$  ([NML001001930](#)), bovine PPAR $\alpha$  ([AF229356](#)), mouse PPAR $\alpha$  ([NML011144](#)), chicken PPAR $\alpha$  ([PPL539467](#)), torafugu PPAR $\alpha$ 1 ([AB275885](#)), torafugu PPAR $\alpha$ 2 ([AB275886](#)), human PPAR $\beta$  ([NML177435](#)), bovine PPAR $\beta$  ([AF229357](#)), mouse PPAR $\beta$  ([NML011145](#)), chicken PPAR $\beta$  ([AF163810](#)), salmon PPAR $\beta$  ([AF342945](#)), zebrafish PPAR $\beta$  ([AF342938](#)), medaka PPAR $\beta$  ([AY055372](#)), torafugu PPAR $\beta$  ([AB275887](#)), human PPAR $\gamma$  ([L40904](#)), mouse PPAR $\gamma$  ([NML011146](#)), bovine PPAR $\gamma$  ([AY179866](#)), chicken PPAR $\gamma$  ([AF163811](#)), salmon PPAR $\gamma$  ([AJ416951](#)), flounder PPAR $\gamma$  ([AJ249075](#)), plaice PPAR $\gamma$  ([AJ539469](#)), and torafugu PPAR $\gamma$  ([AB275888](#)).





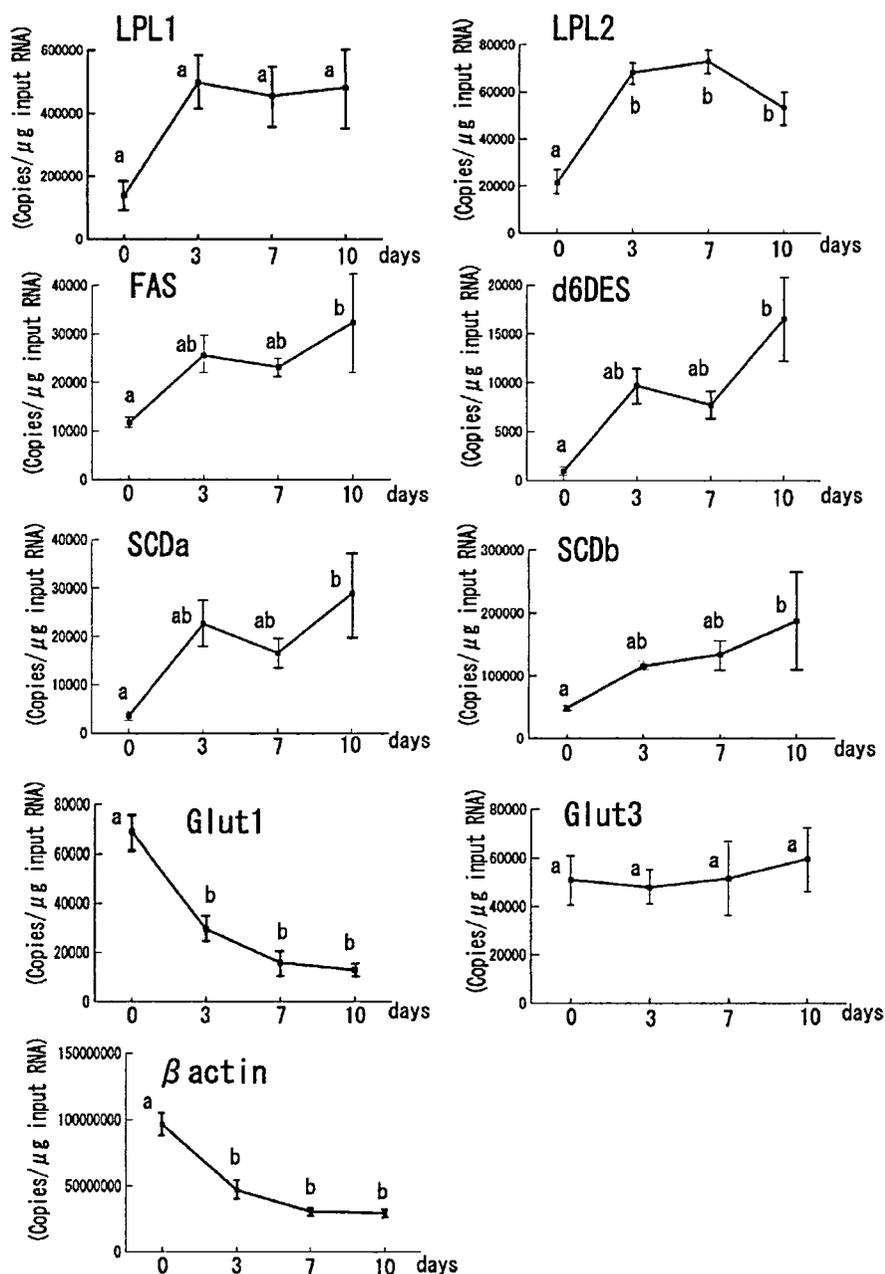
**Fig. 3-3 Tissue-specificities of red sea bream PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$**

The expression of each gene was detected by RT-PCR. The RNA samples were extracted from 1) adipose tissue, 2) gill, 3) heart, 4) hepatopancreas, 5) gonad, 6) muscle, 7) ovary, and 8) testis. The cDNA samples were prepared with reverse transcription (RT+) and negative controls for contamination of genomic DNA were run without reverse transcription (RT-).



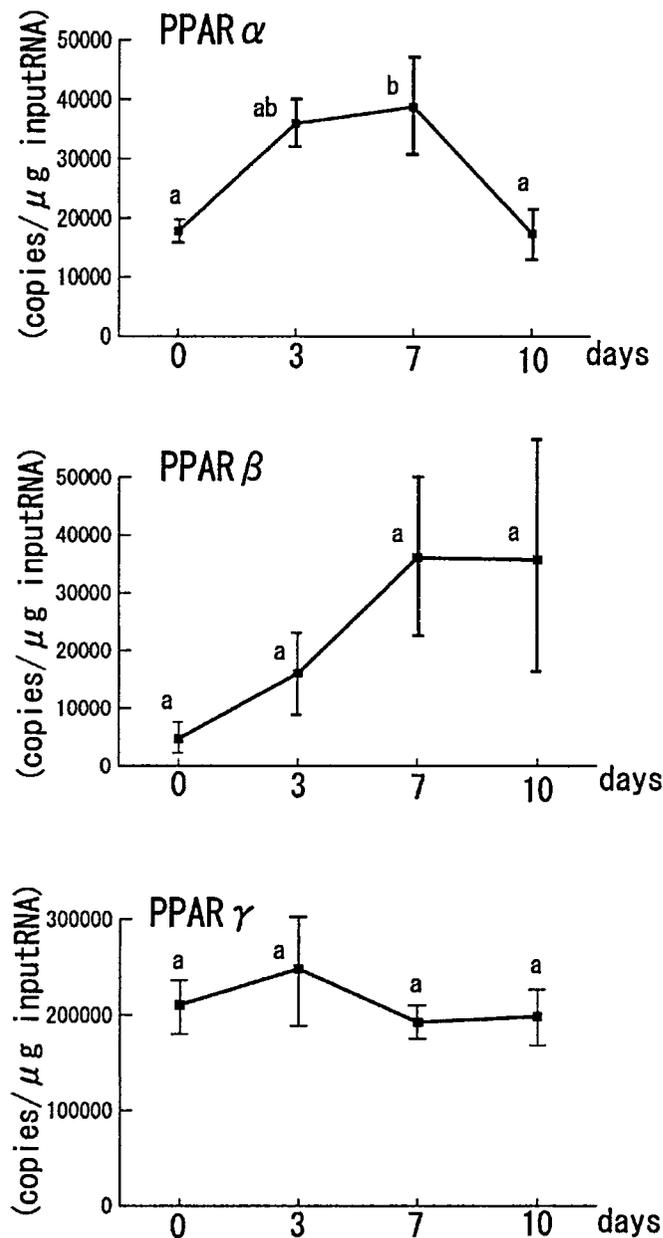
**Fig. 3-4 The lipid accumulation in the cytoplasm during the differentiation of red sea bream SV cells.**

The cells were fixed in 10% formaldehyde and stained with Sudan black B and nuclear fast red after 0, 3, 7 and 10 days of the induction of adipocyte differentiation. The bar indicates 50  $\mu\text{m}$ .



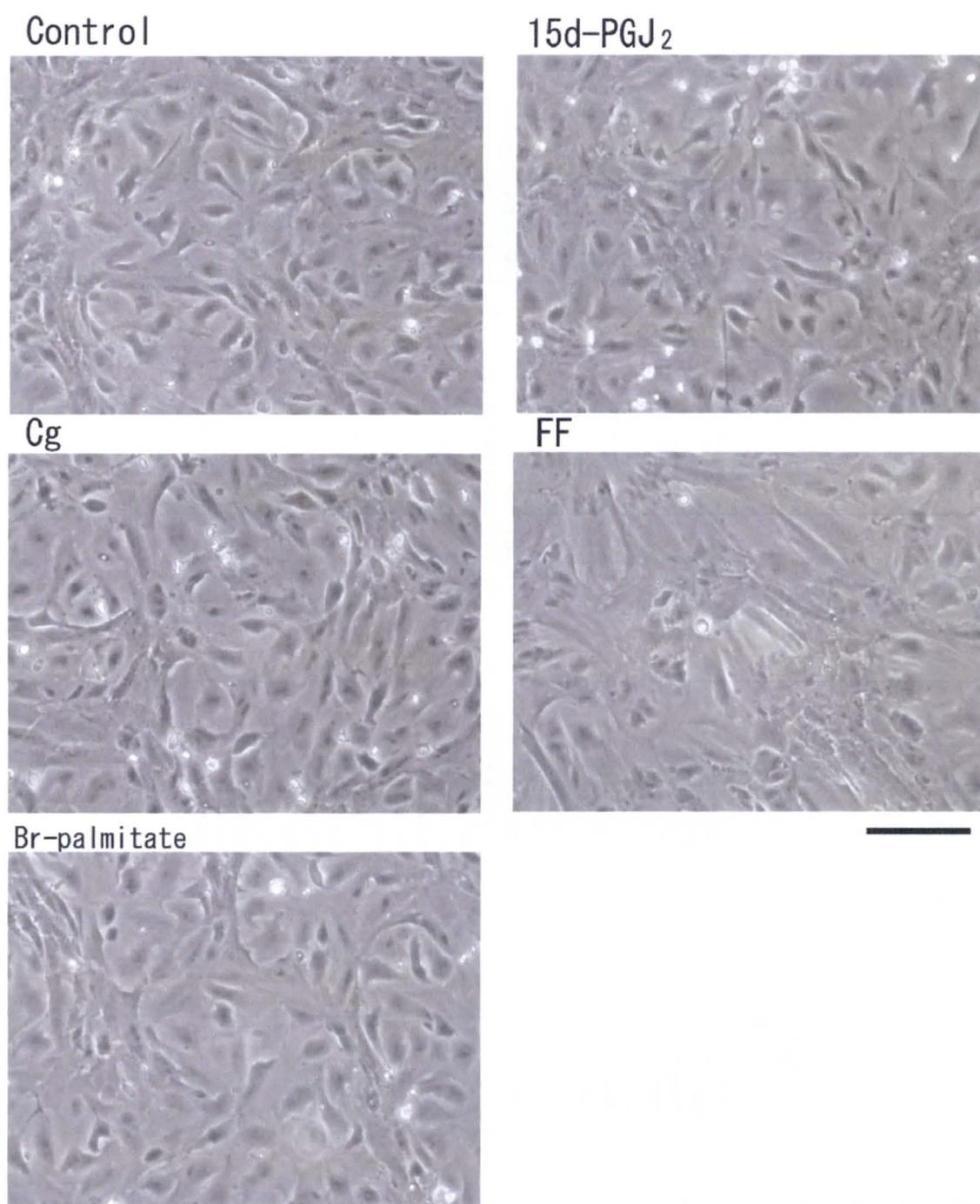
**Fig. 3-5 The changes in the adipogenic gene expression levels in the red sea bream SV cells during adipocyte differentiation**

The cells were sampled after 0, 3, 7 and 10 days of the induction of adipocyte differentiation. The expression levels are indicated as copies /μg input RNA. The bars represent standard error. The experiment was repeated six times with isolated cell cultures derived from six different fish. Means not sharing a common superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ). The abbreviations of each gene are shown in Table 3-2.



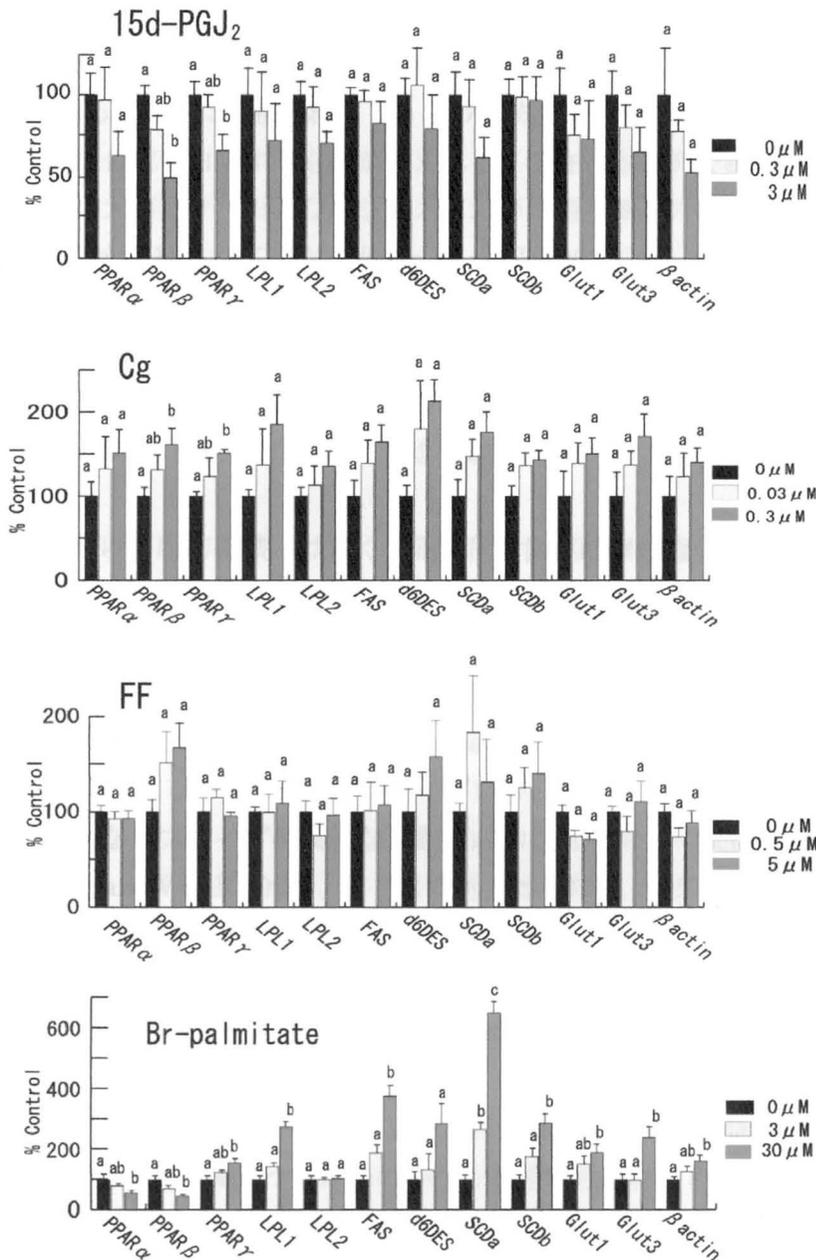
**Fig. 3-6 The changes in the gene expression levels of red sea bream PPARs during the adipocyte differentiation in red sea bream SV cells**

The cells were sampled after 0, 3, 7 and 10 days of the induction of adipocyte differentiation. The expression levels are indicated as copies/ $\mu$ g input RNA. The bars represent standard error. The experiment was repeated six times with isolated cell cultures derived from six different fish. Means not sharing a common superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 3-7 The phase contrast micrographs of the red sea bream SV cells after treatment with mammalian PPAR agonists**

The cells were cultured in the induction medium for 3 days in the absence (control) or presence of 3  $\mu\text{M}$  of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>), 0.3  $\mu\text{M}$  of ciglitazone (Cg), 5  $\mu\text{M}$  of fenofibrate (FF) and 30  $\mu\text{M}$  of 2-bromopalmitate (Br-palmitate). The bar indicates 100  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 3-8 The changes in the expression levels of PPARs and adipogenic genes by the treatment with mammalian PPAR agonists in red sea bream SV cells**

The cells were cultured in the induction medium for 3 days in the presence of 0, 0.3, 3 μM of 15d-PGJ<sub>2</sub> (PG), 0, 0.03, 0.3 μM of ciglitazone (Cg), 0, 0.5, 5 μM of fenofibrate (FF) and 0, 3, 30 μM of 2-bromopalmitate (Br-palmitate). Values (mean ± SEM) are reported as percentage to the mean value of the control (0 μM) and taken as 100%. Means not sharing a common superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ).

## 第4章 2-bromopalmitate を用いたマダイ脂肪細胞における機能改変の試み

脂肪細胞は魚体での主要な脂肪蓄積部位であり、蓄積される脂肪の大半はトリグリセリド (TG) である。魚体に蓄積される TG 中の脂肪酸には飼料脂質などの外来脂肪酸および生体内での新規合成に由来するものが含まれる。現在、本研究で扱ったマダイをはじめ、魚類においては大西洋サケおよびニジマスにおいて脂肪細胞の初代培養系が確立され、その脂肪蓄積機構が研究されている (Vegusdal et al. 2003, Oku et al. 2006b, Bouraoui et al. 2008)。大西洋サケ脂肪細胞では分化に伴い、細胞への外来脂肪酸の取り込みが促進する (Todorcevic et al. 2008)。また、第2章で述べたとおり、マダイ前駆脂肪細胞を脂肪酸無添加の培地において分化させると、脂肪酸合成により2週間ほどで脂肪蓄積が見られ、さらに脂肪酸合成はインスリンによって促進されることが明らかとなっている (Oku et al. 2006b)。

脂肪組織における脂肪蓄積には多くの脂質代謝関連酵素や遺伝子が関与する。脂肪細胞分化に伴い、脂肪取り込み、脂肪酸合成および脂肪酸不飽和化などの脂質蓄積関連遺伝子の発現が上昇することがマダイおよび大西洋サケで報告されている (Oku and Umino 2008, Todorcevic et al. 2008)。また、脂肪蓄積関連遺伝子の多くは転写因子 PPAR により転写レベルで調節されることが知られる (Gregoire et al. 1998, Morrison and Farmer 1999)。PPAR には  $\alpha$ 、 $\beta$  および  $\gamma$  の3つのサブタイプが存在するが、いずれもリガンド依存型の転写因子で、様々なサブタイプ特異的な作動薬が知られており (Schoonjans et al. 1996a, 1996b, Kersten and Wahli 2000)、第3章で述べたとおり、マダイ脂肪細胞において PPAR の作動薬の一種で非代謝性の脂肪酸 2-bromopalmitate により、PPAR $\gamma$  および下流の脂質蓄積関連遺伝子の分化依存的発現が活性化されることが明らかとなった (Oku and Umino 2008)。このことから、魚類においても PPAR 作動薬を用いた魚類脂肪細胞の機能改変の可能性が示唆される。

本章では、第3章で明らかとなった PPAR 作動薬による遺伝子発現の変化が実際に魚類脂肪細胞における機能改変につながるのかどうかを明らかにするため、2-bromopalmitate がマダイ脂肪細胞における脂肪蓄積に及ぼす影響を調べた。この研究では脂肪蓄積における2つの側面、すなわち脂肪酸新規合成および脂肪酸生変換に着目して 2-bromopalmitate 添加とマダイ脂肪細胞の機能との関係を調べた。はじめに、初代培養系および分化誘導系を利用し、マダイ脂肪細胞における脂肪酸合成の特徴 (合成の炭素源と最終産物) を明らかにし、2-bromopalmitate が TG 蓄積と脂肪酸組成に及ぼす影響を調べた。次に、2つの主要な必須脂肪酸系列である 18:3n-3 または 18:2n-6 を培養脂肪細胞にそれぞれ取り込ませ、2-bromopalmitate が蓄積した脂肪酸の生変換に及ぼす影響について調べた。本章においては、PPAR 作動薬による遺伝子発現の操作が脂肪細胞の機能・形質に与える一連の影響を明らかにすることにより、魚類脂肪細胞における人為的機能発現の制御に関する一つのケーススタディーとした。

## 材料と方法

### 1. 試験魚

試験に使用したマダイ (1–2 kg) は南勢水産 (三重県南伊勢町) より購入し使用時まで養殖研究所 (三重県南伊勢町) にてマダイ用市販飼料 (日清丸紅、東京都中央区) を給餌して飼育した。

### 2. 細胞培養用培地の調整

植え込み用培地には DME /F12 (1 : 1, v/v) 培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用し、65 mM NaCl、10%ウシ胎児血清 (Invitrogen)、100 µg/mL ストレプトマイシン、100 U/mL ペニシリンを添加して使用した。

脂肪細胞の分化誘導に際しては、外来脂肪酸の影響を避けるため、脂肪酸の含まれていない Ham F12K nutrient (Invitrogen)を用いて調整した。本項で用いた分化誘導培地 (FA(-) 分化誘導培地) は DME (Invitrogen) と Ham F12K nutrient を 1 : 1 (v/v)で混和した培地に 65 mM NaCl、100 µg/mL ストレプトマイシン、100 U/mL ペニシリン、ITS 溶液 (5 µg/mL ウシインスリン、50 µg/mL トランスフェリン、5 ng/mL 亜セレン酸ナトリウム, Sigma, St. Louis, MO, USA)および 50 ng/mL ハイドロコルチゾン (Sigma) を添加したものを使用した。また 2-bromopalmitate (2-bromohexadecanoic acid, Sigma)、 $\alpha$ -リノレン酸 (18 : 3n-3, Sigma)、リノール酸 (18 : 2n-6, Sigma) は脂肪酸不含のウシ血清アルブミン (終濃度 1%) とともに添加した。

### 3. 脂肪組織からの Stromal-vascular 細胞 (SV 細胞) の調製

前駆脂肪細胞を含むマダイ SV 細胞は腹腔内脂肪組織から酵素消化法により調製した。採取した脂肪組織は 5%ウシ血清アルブミンを含む PBS 中で細切し、その後 1 mg/mL の TypeI コラゲナーゼ (Invitrogen) を加え室温にて一時間消化した。消化液は 200 µm のナイロンメッシュで濾過した後、800 × g で 3 分間遠心分離し、成熟脂肪細胞 (上層) と SV 画分 (沈殿) を分離した。回収した SV 画分は植え込み用培地に懸濁し、約 80%コンフルエント ( $4.3 \times 10^4 / \text{cm}^2$ ) の条件で 35mm のプラスチック培養皿で培養した。2 日後に SV 細胞は血清不含の植え込み用培地で 3 回洗浄し、非接着の細胞を除いた後、さらに 2 日間培養し、コンフルエントの状態での分化誘導実験に使用した。

### 4. 脂肪酸生合成または外来脂肪酸取り込みによる分化誘導

脂肪細胞の分化誘導は培地を分化誘導培地に交換することによって誘導した。脂肪酸合成過程の解析においては、細胞は血清不含の植え込み用培地で 2 回洗浄し、血清培地を除去したのちに 2-bromopalmitate (0-30 µM) を含む FA(-)分化誘導培地に交換した。細胞は

25°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で行い、培地は2日または3日ごとに交換した。上記条件で1-2週間培養したのち、分析に供した。

また、外来脂肪酸の取り込みと生変換過程の解析では、血清培地を除去したのちに300 μMの脂肪酸(18:3n-3または18:2n-6)をウシ血清アルブミンとともに添加したFA(-)分化誘導培地に交換した。また、対照として脂肪酸無添加の試験区を設定した。2-bromopalmitateは分化誘導開始時に同時に添加した。300 μMの脂肪酸および2-bromopalmitate存在下で3日間培養したのち、脂肪酸分析時に培地中の脂肪酸による影響を避けるため、培地を脂肪酸無添加のFA(-)分化誘導培地と交換し、さらに24時間培養した。この間も引き続き2-bromopalmitateは添加した。細胞は25°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で培養した。

## 5. 細胞観察

マダイ培養脂肪細胞は10%ホルマリンで固定したのち Sudan black B および nuclear fast red 染色に供し、脂肪蓄積を観察した。

## 6. <sup>14</sup>C グルコースおよび <sup>14</sup>C アセテートの取り込み

放射性ラベルした基質(D-U<sup>14</sup>C)Glucose および 1-<sup>14</sup>C acetic acid sodium salt, 各 200 μCi/mL)はGEヘルスケア社(Buckinghamshire, UK)より購入した。25 mL培養フラスコ中に培養したマダイSV細胞を分化誘導に供した。細胞は分化誘導0、1および2週間後に1 μCi/mLの<sup>14</sup>Cグルコースまたはアセテートで18時間ラベルし、その取り込み量を測定した。ラベルした細胞はPBSで3回洗浄した後、20 mM Tris-HCl pH7.4・150 mM NaCl・2 mM EDTA・0.5% SDS中に可溶化し、その放射活性を測定した。測定にはLSC-6000シンチレーションカウンターシステム(Aloka, Tokyo, Japan)を使用し、3回反復計測の平均値を一つの測定値とした。

## 7. トリグリセリドの定量

脂肪蓄積の指標としてTG含量を測定した。SV細胞は25 mM Tris-HCl pH7.5・1 mM EDTA中に回収し、総脂質をクロロホルム-メタノール(2:1, v/v)で抽出したのち分析に供した。TG含量の測定は市販キットTG Test WAKO(Wako, Osaka, Japan)を用いた酵素法により行った。

## 8. ガスクロマトグラフ/マススペクトロメトリー(GC/MS)による脂肪酸組成分析

脂肪組織約100 mgまたは35 mm培養皿に培養したマダイSV細胞2-4枚を25 mM Tris-HCl pH7.5・1 mM EDTA中に回収し、分析に供した。総脂質はクロロホルム-メタノール(2:1, v/v)で抽出し、5%塩酸メタノールでメチルエステル化したのちGC/MSにより脂肪酸種と各含量を測定した。GC/MS分析には、GC/MSシステムQP-5050(Shimadzu, Kyoto, Japan)およびDB-WAX(Shimadzu)カラムを使用した。温度条件は、はじめに120°C

10分加温したのち20°C/minの割合で191°Cまで温度を上昇し、30分間加温した。その後220°Cまで10°C/minの割合で温度を上昇させ、220°Cで80分間加温した。各脂肪酸メチルエステルはEIマスの総イオン強度として検出し、脂肪酸種は保持時間および質量スペクトル分析により同定した。脂肪酸含量は検出された脂肪酸の総イオン強度中における相対値として算出した。

## 9. RNA抽出、cDNA合成および脂肪蓄積関連遺伝子発現の定量

総RNA抽出は市販キットSV total RNA isolation system (Promega, Madison, WI, USA)を用いて行い、抽出した総RNA量は紫外吸光260nmを用いて定量した。逆転写反応はrandom hexamerをプライマーとして行い、cDNA合成にはOmniscript RT PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を使用した。合成反応は1µgの総RNAを10µLの反応系で行った。

遺伝子発現の定量はリアルタイムPCR法で行い、検出と定量にはiCycler iQ real-time PCR detection system (Biorad, Hercules, CA, USA)を使用した。PCR反応は20µL反応系で行い、反応液はiQ SYBR Green Supermix (Biorad)を用いて調製した。プライマーは各1µMで使用し、使用したプライマーの塩基配列はTable 4-1に記載した。PCRの温度条件は、はじめに3分間95°C熱変性したのち、熱変性95°C 0.5分間、対合反応50°C 0.5分間、伸長反応72°C 0.5分間のサイクルで40回増幅した。各サンプルの測定値は2回反復の平均値とし、遺伝子発現量は(コピー数/µg RNA)として算出した。また検量線は各遺伝子の濃度既知のマダイcDNA断片を用いて作成した。発現量は対照区との相対値として表示した。

## 10. 統計処理

各処理間の検定は一元配置分散分析(ANOVA)およびTukeyの多重比較により行った。解析にはKyplot4.0 (Kyens Lab, Tokyo, Japan)を使用し、有意水準5% ( $P<0.05$ )で有意差と判定した。

# 結果

## 1. 脂肪酸合成の特徴と2-bromopalmitateの効果

はじめにマダイ脂肪酸合成の全体的特徴を解析した。FA(-)誘導培地を用いて脂肪酸無添加条件においてマダイSV細胞に分化誘導処理を行うと、脂肪酸合成により1-2週間ほどで細胞質内に脂肪滴の蓄積が認められる(Fig. 4-1)。脂肪酸合成の前駆体を推定するため、分化過程でのグルコース、アセテートの細胞への取り込みを調べると、いずれも増加する傾向が見られた(Fig. 4-2)。統計的な有意差ではないが、アセテートと比べグルコースの方が取り込みの増加は大きく、分化誘導0日と比べると2週間後にはアセテートの増加が約

32%なのに対し、グルコースは 103%増加した (Fig. 4-2)。また、マダイ脂肪細胞分化の前後で比較すると、細胞の脂肪酸組成に変動が見られた (Table 4-2)。分化誘導 0 日のものと比較すると、2 週間後には 16:1 の増加と 16:0 の減少が見られた (Table 4-2)。

次に、2-bromopalmitate 存在下で脂肪酸分化誘導処理を一週間行い、脂肪酸合成関連遺伝子の発現、TG 含量および脂肪酸組成に及ぼす影響を調べた。2-bromopalmitate の添加により PPAR $\gamma$ 、FAS および SCDa 遺伝子発現は増加傾向が見られた (Fig. 4-3)。培養期間中、マダイ脂肪細胞の TG 含量は増加するが、2-bromopalmitate による TG 含量への影響は見られなかった (Fig. 4-4)。一方、マダイ脂肪細胞の脂肪酸組成は 2-bromopalmitate 添加により変化が見られ、添加濃度に応じて 16:1 の含量が有意に増加した (Table 4-3)。

## 2. 脂肪酸生変換における 2-bromopalmitate の効果

マダイ脂肪細胞における蓄積脂肪酸の生変換への 2-bromopalmitate の影響を調べるため、 $\alpha$ リノレン酸 (18:3n-3) またはリノール酸 (18:2n-6) をそれぞれマダイ SV 細胞に取り込ませ、2-bromopalmitate 添加の及ぼす脂肪酸組成への影響を調べた。

300  $\mu$ M の 18:3n-3 または 18:2n-6 を含む培地中で分化誘導を行うと、3 日以内に細胞質への脂肪蓄積が観察された (Fig. 4-5)。脂肪酸組成を分析すると、それぞれ添加した脂肪酸 (18:3n-3 または 18:2n-6) の含量が増加したが、それとともに、デルタ 6 不飽和化産物 (18:4n-3 または 18:3n-6) および鎖長延長産物 (20:3n-3 または 20:3n-6) の生成がそれぞれ確認された (Table 4-4)。

2-bromopalmitate 添加により、18:3n-3 を取り込ませた細胞においては、SCDa 遺伝子発現は上昇し (Fig. 4-6)、それとともに脂肪酸 16:1 および 18:1 の増加が見られた (Table 4-5)。しかし、デルタ 6 不飽和化 (18:4n-3) や鎖長延長産物 (20:3n-3) の生成には影響は見られなかった (Table 4-5)。一方、18:2n-6 を取り込ませた細胞では、2-bromopalmitate は脂肪蓄積関連遺伝子の発現に有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 4-6) が、脂肪酸組成には影響が見られ、18:0 は有意に増加し 18:3n-6 は有意に減少した (Table 4-5)。

## 考察

第 3 章で述べたとおり、マダイ SV 細胞における脂肪細胞の分化過程において、2-bromopalmitate は様々な脂質代謝関連遺伝子の発現を活性化することが明らかとなった (Oku and Umino 2008)。本章では、さらに遺伝子発現の操作と形質との関係を調べるため、2-bromopalmitate による脂肪蓄積関連遺伝子発現の変動がマダイ脂肪細胞の機能に与える影響をさらに精査したものである。分化依存的な脂肪酸合成の過程において 2-bromopalmitate は SCDa 遺伝子の発現上昇に最も効果を示し (Fig. 4-3)、その産物の一つである脂肪酸 16:1 の含量を増加させた (Table 4-3)。同様に 18:3n-3 を取り込んだ脂肪細胞においても SCDa 遺伝子発現 (Fig. 4-6) と 16:1 および 18:1 の含量増加が認められた

(Table 4-5)。また、18:2n-6を蓄積した細胞では、応答性は異なるが、2-bromopalmitate添加は脂肪酸組成に影響を与えた (Table 4-6)。こうした結果から魚類脂肪細胞の機能は、2-bromopalmitateのような外来性の因子を用いて操作することが可能であることが推察される。

生体を用いた解析では、蓄積される脂肪酸は新規合成のほかに飼料脂質など外因性のものも含まれるため、両者を明確に区別した上での解析は困難である。本研究では脂肪酸不添加の培養系を用い、外来脂肪酸の影響を極力排除した上で脂肪酸合成機構の解析を行った。この条件下では脂肪細胞に蓄積される脂肪酸は主に新規合成に由来するものと判断できる (Oku et al. 2006b)。本研究の結果では、脂肪細胞分化と脂肪蓄積の過程においてグルコース取り込みに顕著な増加傾向が見られたことから (Fig. 4-2)、グルコースが脂肪酸合成の炭素源に利用されていることが示唆された。さらに、脂肪蓄積に伴い脂肪酸 16:1の含量が増加したことは (Table 4-2)、16:1がマダイ脂肪細胞における脂肪酸合成系の最終産物であることを示唆する。哺乳類においては、偶蹄目の筋肉間脂肪細胞はアセテートを利用することが知られているが、ヒトやマウスなど多くの哺乳類脂肪細胞においてはグルコースを基質として脂肪酸を合成する (Ingle et al. 1972, Aso et al. 1995, Foufelle et al. 1996)。哺乳類の脂肪酸新規合成経路では初期産物としてパルミチン酸 (16:0) が合成されたのち、C16-18の鎖長延長や SCD (デルタ 9 不飽和化酵素) による不飽和化を受けパルミトオレイン酸 (16:1) やオレイン酸 (18:1) が合成される (Volpe and Vagelos 1976, Wakil et al. 1983, Ulrich et al. 2001)。こうした研究を考慮しつつ、合成基質や最終産物から推察すれば、マダイにおける脂肪酸合成の全体的特徴は哺乳類のものと類似したものであると考えられる。

マダイなどの海産養殖魚では高度不飽和脂肪酸 (HUFA) の合成能は低く、その多くを必須脂肪酸として要求することは周知のとおりである (Kanazawa et al. 1979, Watanabe 1982, March 1993)。海産魚の鰭由来の繊維芽様細胞株を用いた研究では、オヒョウ由来の TF 細胞では C<sub>18-20</sub> 鎖長延長活性が、ヨーロッパマダイ由来の SAF-1 細胞はデルタ 5 不飽和化酵素活性がそれぞれ欠損していることが明らかとなっており、それらの海産魚における HUFA 合成不全の原因と考えられている (Tocher et al. 1989, Tocher and Ghioni 1999)。また、ニジマスでは HUFA は 18:3n-3 および 18:2n-6 から生合成することができるが (Henderson 1996)、n-3HUFA 合成活性は肝臓と盲囊粘膜 (cecal mucosa) において高く、腹腔内脂肪組織では見いだせないことが報告されており (Bell et al. 2003)、ニジマスのように HUFA 合成能をもつ魚種においても脂肪組織は HUFA 合成の場ではないとされている。マダイ脂肪細胞において 18:3n-3 や 18:2n-6 の培地添加により脂肪蓄積を誘導し (Fig. 4-5)、その組成を分析したところ、添加した脂肪酸種の含量の増加とともに、デルタ 6 不飽和化 (18:4n-3 または 18:3n-6) や C<sub>18-20</sub> 鎖長延長産物 (20:3n-3 および 20:2n-6) の生成が見られたが、アラキドン酸 (20:4n-6) や DHA (22:6n-3) のような HUFA 生成産物は特に検出されなかった。この結果は、マダイにとって HUFA が必須脂肪酸であり、かつ脂肪細胞

自体が HUFA 合成の場でないことを示している。

脂肪酸合成において、2-bromopalmitate は脂肪蓄積関連遺伝子発現に効果を示し、PPAR $\gamma$ 、FAS および SCDa の発現に上昇傾向が見られた (Fig. 4-3)。しかし、FAS 遺伝子発現の上昇に関わらず、細胞の TG 含量は特に増加することはなかった (Fig. 4-4)。脂肪酸の合成過程においては、FAS のほかにもアセチル CoA やリンゴ酸の代謝関連酵素など数多くの酵素や遺伝子が関与することが知られる (Segner and Bohm 1994)。TG 含量が増加しなかった原因の一つとしては、2-bromopalmitate ではこれらの経路まで活性化することができなかった可能性が考えられる。SCD は脂肪酸のデルタ 9 位に二重結合を挿入する不飽和化酵素であり、16:0 や 18:0 を 16:1 および 18:1 に生変換する役目をもつ (Miyazaki and Ntambi 2003)。マダイにおいて同定された二種類の SCD 遺伝子との間に系統上の関係は見られないが、コイにおいて二種類の SCD 様遺伝子 (*Csd1* および *Csd2*) が同定されている (Polley et al. 2003)。コイ肝臓においては低温処理により *Csd2* 遺伝子の一過性発現上昇が、また飽和脂肪酸給餌により *Csd1* 遺伝子発現の増加が誘導されることが知られ、二種類の SCD 様遺伝子に機能的な区別があることが示唆されている (Polly et al. 2003)。マダイにおける二種類の SCD 遺伝子の機能的差異は不明であるが、2-bromopalmitate に対する応答に違いが見られることから (Fig. 4-3)、少なくともその発現制御機構には違いがあると考えられる。

ラット肝臓において、ペルオキシゾーム増殖因子 (PPAR リガンド) である 3-thia fatty acid ( $C_{13}$ -S-acetic acid,  $C_{14}$ -S-acetic acid) を投与し、SCD 遺伝子発現を活性化すると 18:1 の含量が増加することが報告されている (Madsen et al. 1997)。マダイ脂肪細胞においても SCD 遺伝子の活性化はラット肝臓における研究と類似した効果を見せた。マダイ脂肪細胞では 2-bromopalmitate 添加により、SCDa の遺伝子発現は上昇し (Fig. 4-3)、16:1 の含量を増加させた (Table 3)。また、同様に 18:3n-3 を蓄積した細胞においても 2-bromopalmitate は SCDa 遺伝子発現を上昇させ (Fig. 4-6)、16:1 および 18:1 の含量を増加させた (Table 4-5)。一方、18:2n-6 を蓄積した細胞では、2-bromopalmitate 添加により脂肪蓄積関連遺伝子の発現には有意な差は見られなかった (Fig. 4-6) が、脂肪酸組成に関しては 18:0 の増加と 18:3n-6 の減少が見られた (Table 4-6)。遺伝子発現や脂肪酸組成の変動で見ると、18:3n-3 を蓄積した細胞と 18:2n-6 を蓄積した細胞との間に、2-bromopalmitate に対する応答に違いが見られたことから、その効果は脂肪細胞内に蓄積された脂肪酸の種類によって差が生じることが示唆された。その原因として、脂肪酸はそれ自体が PPAR リガンドとなりうることが知られており (Ding and Mersmann 2001, Azarin 2004, Madsen et al. 2005)、2-bromopalmitate との間に何らかの併用効果が生じた可能性が考えられる。

本章においてマダイ脂肪細胞における脂肪蓄積の特徴とその制御について培養系を用いて検討したが、PPAR 作動薬などの外部因子により脂肪蓄積関連遺伝子の発現とあわせ、脂肪細胞の機能・形質も操作しうるということが明らかとなった。現在では、新規飼料原料開発や

養殖魚への脂肪蓄積制御などの観点から脂質代謝物など様々なものが飼料添加物として魚類においても効果が検討されているが (Kleveland et al. 2006, Leaver et al. 2006)、培養系を用いた本研究における手法や成果も今後こうした研究の一助になるものと期待される。

**Table 4-1 The oligonucleotide sequences for real time PCR**

Target gene	GenBank accession No.	(Forward) (Reverse) Sequences	Amplified fragment length
PPAR $\alpha$	AB298547	5' -GACAAGTGTGAGCGCCG-3' 5' -CATCTTTGCCACCAGGGT-3'	(362bp)
PPAR $\beta$	AB298548	5' -CTTTGGGAATGTCCCATGA-3' 5' -GATAGAAAACATGGACCCC-3'	(339bp)
PPAR $\gamma$	AB298549	5' -CGACATGGAGCACATGCA-3' 5' -TTCTCTACCGCTTCGGC-3'	(360bp)
Fatty acid synthetase (FAS)	AB298550	5' -AGCTGTTTATCTGGGGAT-3' 5' -CTGGGAAGAGGGCCATC-3'	(345bp)
StearoylCoA desaturase a (SCDa)	AB298551	5' -CTTCGCCACATGTTG-3' 5' -CACTCAAAGCAACCATTGC-3'	(342bp)
StearoylCoA desaturase b (SCDb)	AB298552	5' -CTTTGCTCACATCGGCTG-3' 5' -CGCTGAACGTGACAAACTT-3'	(342bp)
Delta-6-desaturase (d6DES)	AB298553	5' -GCCTTCCAGCATCACGC-3' 5' -ACGAAGCTGATGAGCGC-3'	(330bp)
$\beta$ actin	AB252854	5' -GGCACTGCTGCCTCCTC-3' 5' -GCCAGGATGGAGCCTCC-3'	(309bp)

**Table 4-2 The fatty acid composition of total lipid in the red sea bream adipocytes cultured in the FA(-) induction medium for 0day and 2weeks**

Fatty acids	(Adipose tissue)	0 day	2 weeks
14:0	(7.2±0.9)	3.9±0.3 <sup>a</sup>	2.9±0.5 <sup>a</sup>
16:0	(40.79±1.2)	39.5±2.9 <sup>a</sup>	22.8±1.9 <sup>b</sup>
16:1 <sup>*</sup>	(11.8±1.6)	8.4±1.1 <sup>a</sup>	21.1±0.9 <sup>b</sup>
18:0	(11.7±0.6)	10.6±0.5 <sup>a</sup>	8.4±4.3 <sup>a</sup>
18:1 <sup>+</sup>	(26.4±0.6)	31.4±2.6 <sup>a</sup>	38.7±4.3 <sup>a</sup>
18:2 (n-9)	(N.D.)	N.D.	2.1±2.1
18:2 (n-6)	(2.0±0.2)	5.1±0.7 <sup>a</sup>	4.1±1.3 <sup>a</sup>
20:4 (n-6)	(N.D.)	1.1±0.3	Trace

The Values (mean ±SEM) are indicated as relative amounts (%) of the detected fatty acids. The experiment was repeated four times with isolated cell culture derived from four different fish. The FA compositions of the adipose tissue used for the cell preparation were also indicated. Means not sharing a common superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

\*Predominantly 16:1n-7

+Predominantly 18:1n-9

**Table 4-3 The fatty acid composition of total lipid in the red sea bream adipocytes cultured in the FA(-) induction medium for 1 week in the presence of 2-bromopalmitate (0, 3 and 30  $\mu$ M)**

Fatty acids	0 $\mu$ M	3 $\mu$ M	30 $\mu$ M
14:0	2.0 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	2.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	2.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
16:0	22.3 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	20.4 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	19.8 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>
16:1 *	15.2 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	18.0 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	22.7 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>
18:0	6.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	7.1 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	6.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
18:1 +	45.0 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	44.5 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	41.1 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>
18:2 (n-9)	4.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	4.7 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	4.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>
18:2 (n-6)	1.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.1 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
20:4 (n-6)	2.6 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	2.0 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	1.9 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>

The Values (mean  $\pm$ SEM) are indicated as relative amounts (%) of the detected fatty acids. The experiment was repeated six times with isolated cell culture derived from six different fish. Means not sharing a common superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

\*Predominantly 16:1n-7

+Predominantly 18:1n-9

**Table 4-4 The fatty acid composition of total lipid in the red sea bream adipocytes cultured for 3 days in the induction medium supplemented with 18:3n-3 or 18:2 n-6**

Fatty acids	not suppl.	+18:3 (n-3)	+18:2 (n-6)
14:0	2.2±0.3	1.7±0.3	1.04±0.1
16:0	24.7±1.6	17.6±2.6	12.6±1.9
16:1 *	11.9±1.4	1.7±0.2	1.1±0.1
18:0	13.7±3.3	16.2±3.5	10.3±2.5
18:1 +	38.1±1.1	8.2±1.2	10.3±1.0
18:2 (n-9)	2.9±0.3	2.2±0.2	N.D.
18:2 (n-6)	3.1±0.4	1.9±0.3	56.5±0.9
18:3 (n-6)	N.D.	N.D.	1.47±0.3
18:3 (n-3)	N.D.	39.4±2.3	N.D.
18:4 (n-3)	N.D.	3.5±0.4	N.D.
20:2 (n-6)	N.D.	N.D.	4.4±0.8
20:4 (n-6)	3.4±0.8	2.5±1.0	2.2±0.5
20:3 (n-3)	N.D.	5.0±0.7	N.D.

The Values (mean±SEM) are indicated as relative amounts (%) of the detected fatty acids. The experiment was repeated four times with isolated cell culture derived from four different fish.

\*Predominantly 16:1n-7

+Predominantly 18:1n-9

**Table 4-5 The fatty acid composition of total lipid in the red sea bream adipocytes cultured in the induction medium supplemented with 18:3n-3 in the presence of 2-bromopalmitate (0, 3 and 30  $\mu$ M)**

Fatty acids	0 $\mu$ M	3 $\mu$ M	30 $\mu$ M
14:0	1.1 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.9 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.9 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
16:0	19.6 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	20.3 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	21.6 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
16:1 *	1.7 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	2.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	4.9 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>
18:0	11.5 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	12.9 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	13.6 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>
18:1 +	9.7 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	11.5 $\pm$ 1.0 <sup>ab</sup>	13.9 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>
18:2 (n-9)	1.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	1.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
18:2 (n-6)	1.9 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	1.8 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	2.1 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>
18:3 (n-3)	39.5 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	35.6 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	29.1 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>
18:4 (n-3)	6.1 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	5.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	4.8 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
20:4 (n-6)	1.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	1.6 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
20:3 (n-3)	5.9 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	6.0 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	5.7 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>

The Values (mean $\pm$ SEM) are indicated as relative amounts (%) of the detected fatty acids. The experiment was repeated six times with isolated cell culture derived from six different fish. Means not sharing a common superscripts are significantly different ( $P<0.05$ ).

\*Predominantly 16:1n-7

+Predominantly 18:1n-9

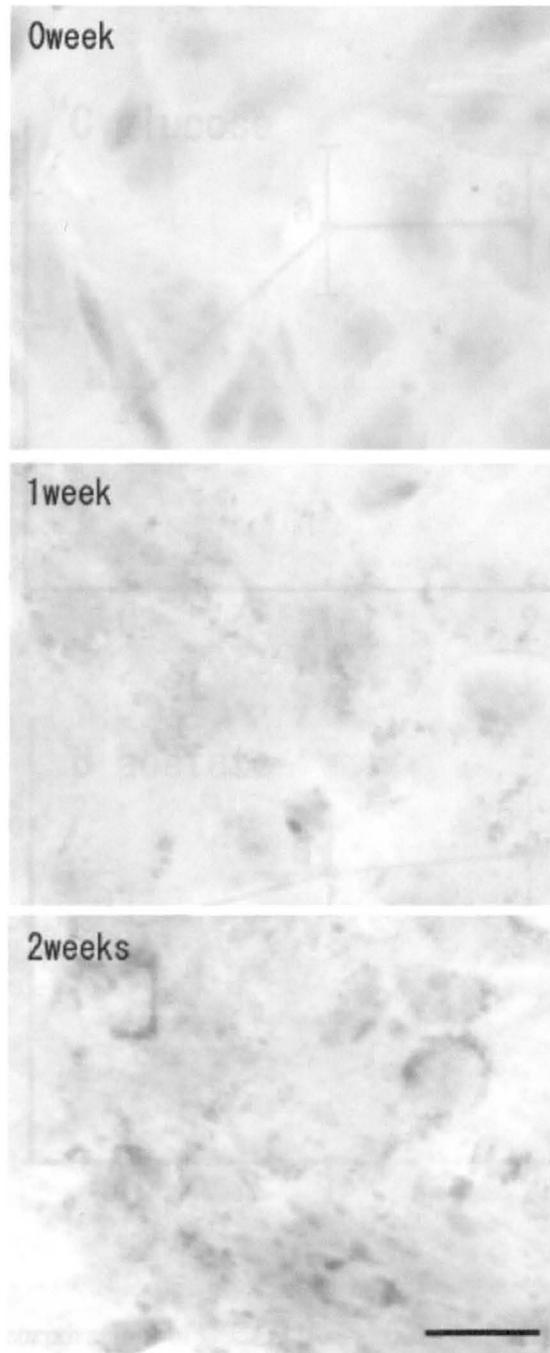
Table 4-6 The fatty acid composition of total lipid in the red sea bream adipocytes cultured in the induction medium supplemented with 18:2n-6 in the presence of 2-bromopalmitate (0, 3 and 30  $\mu$ M)

Fatty acids	0 $\mu$ M	3 $\mu$ M	30 $\mu$ M
14:0	1.0 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.9 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	2.7 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>
16:0	15.5 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	16.6 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	19.0 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>
16:1 *	0.8 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	2.6 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>
18:0	6.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	8.0 $\pm$ 0.4 <sup>ab</sup>	8.9 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>
18:1 +	10.2 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	9.7 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	12.5 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>
18:2 (n-6)	54.2 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	53.0 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	44.8 $\pm$ 5.5 <sup>a</sup>
18:3 (n-6)	3.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	3.4 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	2.1 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
20:2 (n-6)	6.7 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	6.1 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	5.9 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>
20:4 (n-6)	1.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	1.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>

The Values (mean $\pm$ SEM) are indicated as relative amounts (%) of the detected fatty acids. The experiment was repeated six times with isolated cell culture derived from six different fish. Means not sharing a common superscripts are significantly different ( $P$ <0.05).

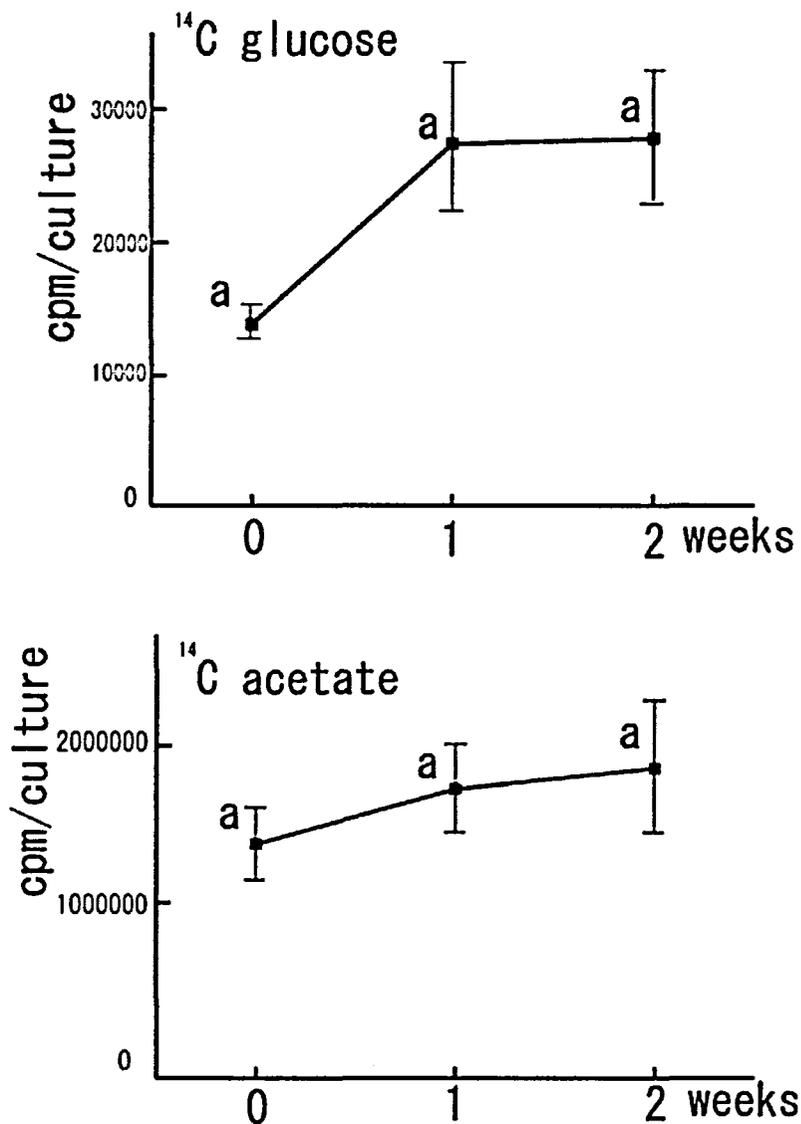
\*Predominantly 16:1n-7

+Predominantly 18:1n-9



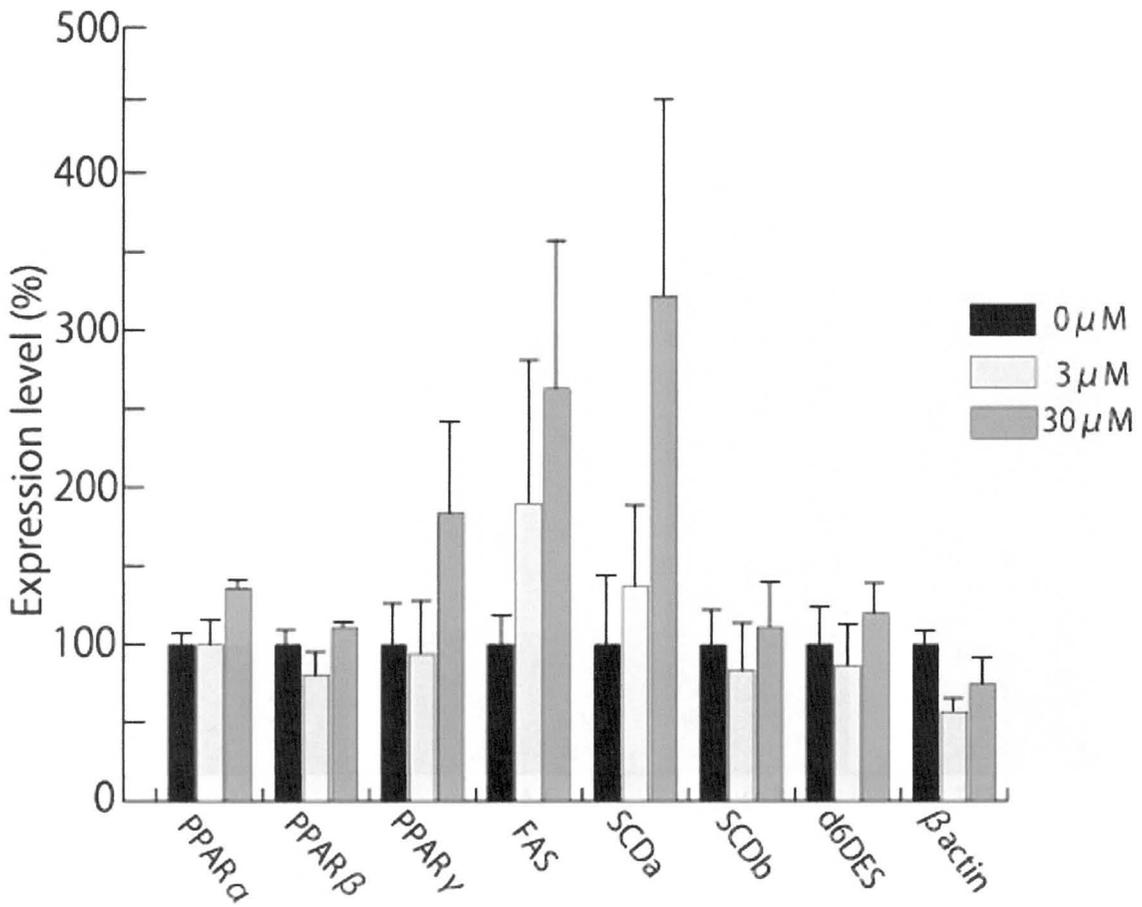
**Fig. 4-1 Lipid accumulation in the differentiating adipocytes of red sea bream in the FA(-) induction medium**

The red sea bream SV cells were differentiated with the FA(-) induction medium for 2 weeks. The cells were fixed in 10% formaldehyde and stained with Sudan black B and nuclear fast red after 0, 1 and 2 weeks of the induction of adipocyte differentiation. The bar indicates 50  $\mu$ m.



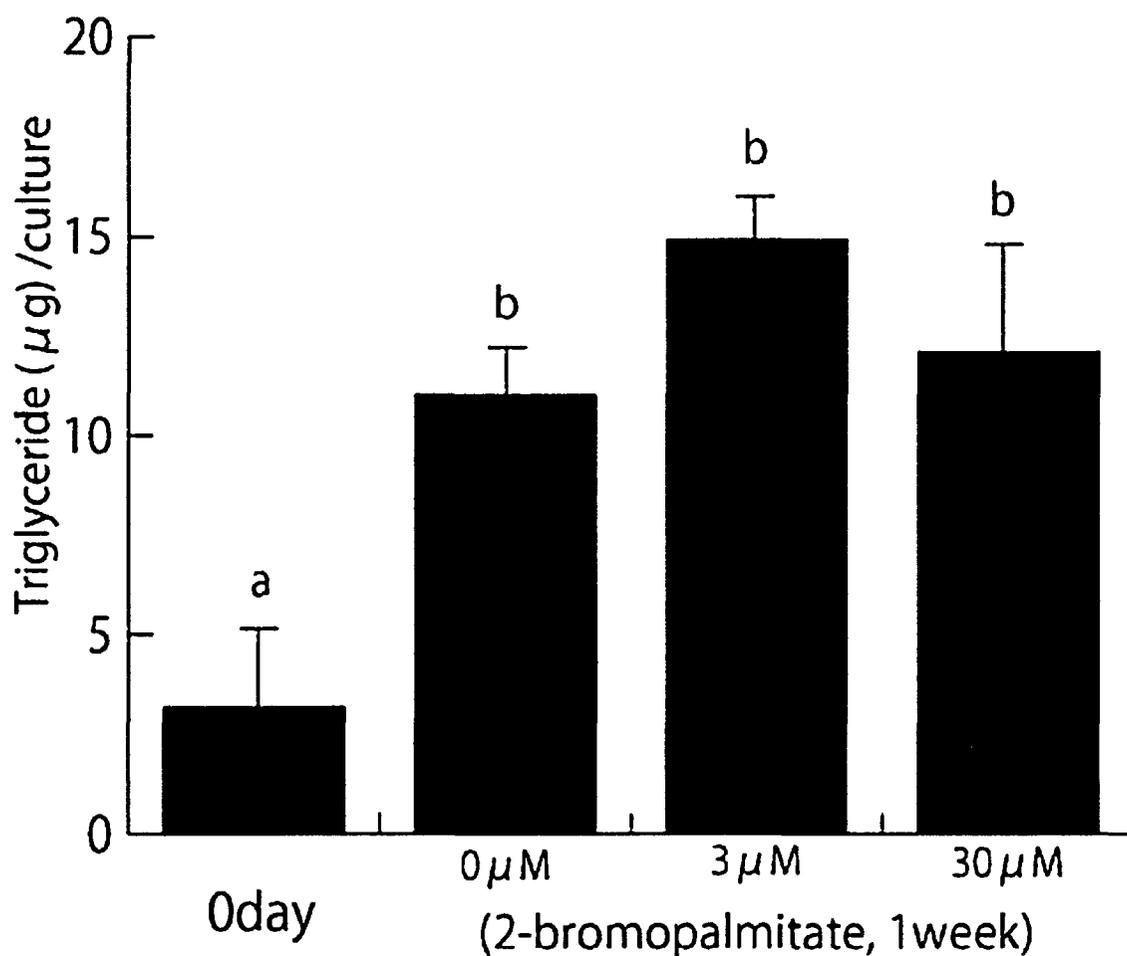
**Fig. 4-2 The incorporation of <sup>14</sup>C glucose and <sup>14</sup>C acetate in the differentiating adipocytes of red sea bream**

The cells were cultured in 25ml culture flasks and harvested after 0, 1 and 2 weeks of the induction of adipocyte differentiation. The incorporated radio activities are indicated as cpm/culture. The bars represent standard error. The experiment was repeated four times with isolated cell cultures derived from four different fish. Means not sharing a common superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).



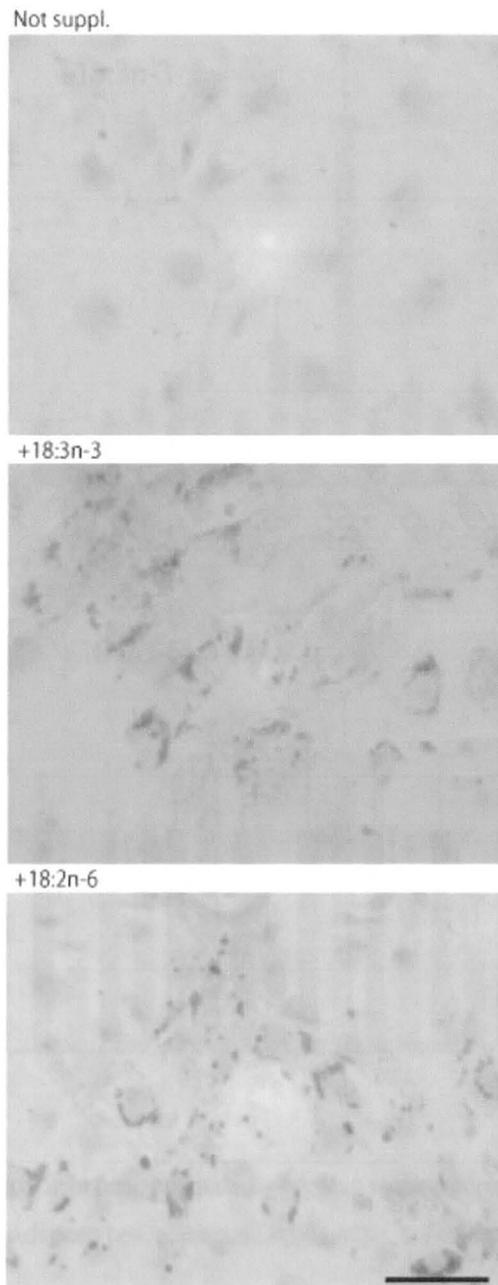
**Fig. 4-3 Changes in the expression levels of adipogenic genes by the treatment with 2-bromopalmitate in the red sea bream adipocytes cultured in the FA(-) medium**

The cells were cultured in the FA(-) induction medium for 1 week in the presence of 0, 3 and 30  $\mu\text{M}$  of 2-bromopalmitate. The values (means $\pm$ SEM) are represented as percentage to the mean value of the control (0  $\mu\text{M}$ ). The experiment was repeated six times with isolated cell cultures derived from six different fish. The abbreviations of each gene are given in Table 4-1.



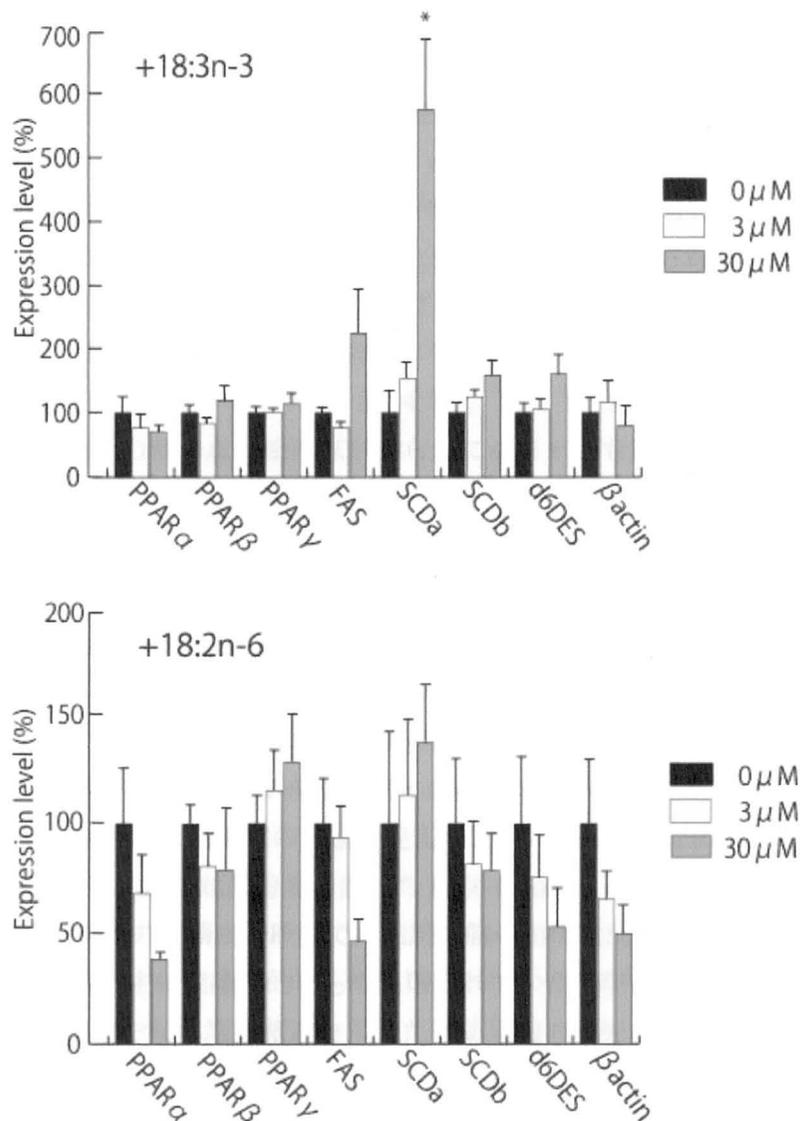
**Fig. 4-4 The triglyceride accumulation in the red sea bream adipocytes differentiated in the FA(-) induction medium in the presence of 2-bromopalmitate**

The cells were cultured in 35mm diameter dish and differentiated with the FA(-) induction medium for 1 week in the presence of 0, 3 and 30 µM of 2-bromopalmitate. The values (means±SEM) are represented as triglyceride (µg)/culture. The experiment was repeated six times with isolated cultures derived from six different fish. Means not sharing a common superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 4-5 Lipid accumulation in the differentiating adipocytes of red sea bream in the induction medium with fatty acid supplementation**

The red sea bream SV cells were cultured for 3 days in the induction medium with 300  $\mu$ M of  $\alpha$ -linolenic acid (+18:3n-3) or linoleic acid (+18:2n-6), followed by the cultivation for 24 hr in the medium without fatty acid supplementation. The cells were fixed in 10% formaldehyde and stained with Sudan black B and nuclear fast red. The bar indicates 50  $\mu$ m.



**Fig. 4-6 The effects of 2-bromopalmitate on the expression levels of adipogenic genes in the red sea bream adipocytes accumulated with  $\alpha$ -linolenic acid (+18:3n-3) or linoleic acid (18:2n-6)**

The red sea bream SV cells were cultured for 3 days in the induction medium with 300 $\mu$ M of  $\alpha$ -linolenic acid (+18:3n-3) or linoleic acid (+18:2n-6), followed by the cultivation for 24hr in the FA(-) medium without fatty acid supplementation. During this process, 2-bromopalmitate (0, 3 and 30  $\mu$ M) was supplemented continuously. The values (means $\pm$ SEM) are represented as percentage to the mean value of the control (0  $\mu$ M). The experiment was repeated six times with isolated cell culture derived from six different fish. The abbreviations of each gene are given in Table 4-1.

## 総合考察

本研究では魚類脂肪細胞の分化および機能発現機構を解明することを目的とした。特に、海産養殖魚として重要種であるマダイを用い、脂肪蓄積関連遺伝子の同定（第1章）と初代培養系による脂肪細胞の分化誘導実験系の確立（第2章）を行い、その分化に際しては脂質代謝関連など多くの機能遺伝子が分化依存的に発現制御されることが明らかとなった（第3章）。また、マダイ脂肪細胞における機能遺伝子発現は上流にあたる転写因子PPAR作動薬を用いて操作することが可能であり（第3章）、その結果、脂肪酸組成などの細胞形質にも効果を示すことが示された（第4章）。これら一連の結果から、脂肪細胞分化における哺乳類細胞との共通点・相違点が明らかになるとともに、魚類において外部因子を用いた脂肪細胞の機能発現の人為的制御の可能性が示された。

飼料より摂取した脂質などのエネルギー源は末梢組織で生命活動のため利用される一方、その余剰分は体脂肪として魚体に蓄積される。そのため、高脂質給餌などによる過度なエネルギー摂取は魚体への過剰な脂肪蓄積となり（Oku and Ogata 2000）、養殖魚の品質に大きな影響を与える。これまでに、効率的成長や体成分制御の観点から、養魚飼料において飼料脂質の至適含量や脂肪酸組成など、養殖魚の体脂肪蓄積に関しては飼料成分との関係について数多くの研究がなされてきた（Watanabe 1982, Takeuchi et al. 1991, March 1993）。一方、脂肪蓄積を蓄積部位の発達と捉えた細胞レベルの研究については、魚体あるいは魚肉可食部における脂肪組織分布を調べたもの（Yamada and Nakamura 1964, Zhou et al. 1996）や、マダイの初期成長段階での脂肪細胞の出現状況を観察した報告例（Umino et al. 1996）など知見は主に組織学的なものに限られていた。哺乳類や鳥類などにおいては、株化した前駆脂肪細胞や初代培養細胞を用いた脂肪細胞の研究が多く行われており、特に増殖・分化の分子機構や内分泌制御について大きな成果をあげている（Dani et al. 1986, Ramsay 1996, Gregoire et al. 1998）。魚類においてもマダイの他に、大西洋サケ（Vegusdal et al. 2003, Todorovic et al. 2008）およびニジマス（Bouraoui et al. 2008）において初代培養系を用いた脂肪細胞の分化誘導系が確立され、細胞レベルでの脂肪蓄積に関する研究に用いられている。報告によれば、サケおよびニジマス脂肪細胞の分化誘導は血清およびタラ肝油を主成分とする脂質添加物存在下において、ホルモン処理することによって行う（Bouraoui et al. 2008, Todorovic et al. 2008）。ただしこの方法では血清を含むため内分泌解析に不確定要素が入りやすく、蓄積された脂質の由来が特定しにくいなどの欠点がある。本研究では内分泌などの外部因子の影響評価が容易であり、脂質源を容易に決定できるよう無血清培養による分化誘導法を採用した。マダイ脂肪細胞は無血清培養条件下において、脂肪蓄積、機能遺伝子発現およびインスリンなどホルモンへの応答能を保持していた（第2章）。マダイ初代培養を用いた本研究における脂肪蓄積過程の解析では、脂肪酸合成については脂質無添加で1-2週間（第2章および第4章）、あるいは脂質取り込みに関しては300  $\mu$ M 脂肪酸添加条件（第4章）で3日間の培養とし、培養培地および培養期間の違

いを利用して、脂肪酸合成と脂肪酸取り込みそれぞれの特性を解析することが可能となった。当然のことであるが、培養細胞は個体レベルとは異なる環境に置かれており、培養系に移行したことによりその特性が変わる可能性があるほか、哺乳類脂肪細胞に関しては分化誘導法に依存して応答性が異なることも報告されている (Deslex et al. 1986, Slieker et al. 1998)。より詳細に魚類脂肪細胞の特性を把握するためには、血清培養も含め、複数の培養条件を用いて今後比較検討する必要がある。

ギンザケの脂肪組織および肝臓の組織片を用いて脂肪酸合成能を測定した研究では、脂肪組織での脂肪酸合成能は肝臓の 1/30 程度と報告されている (Lin et al. 1977)。また、重水素ラベルした 18:3n-3 基質を用いた投与試験では、ニジマス腹腔内脂肪組織には HUFA 合成の反応中間体が検出されないことから、HUFA 合成は不活発であることが報告されている (Bell et al. 2003)。これらの結果から、魚類における脂肪組織は第一義的には外来脂質を受動的に蓄積する場であり、脂肪酸合成や生変換に関してその能力は高くないと考える方が妥当かもしれない。しかしながら本研究においては外来脂質の細胞への取り込みに関わる LPL2 種に加え、脂肪酸合成 (FAS) や不飽和化 (d6DES、SCDs) 関連遺伝子の発現がマダイ脂肪組織において確認された (第 1 章)。また、不飽和化酵素の一種ステアロイル CoA 不飽和化酵素遺伝子 (SCDa) は 2-bromopalmitate のような外部因子で活性化され一価不飽和脂肪酸含量 (16:1 および 18:1) を増加させることが明らかになった (第 4 章)。ウシなどの畜肉では筋肉間脂肪組織の一価脂肪酸含量は食肉の物性、特に柔軟性の決定に重要とされ (Melton et al. 1982, Yang et al. 1999)、肉質改善の観点からその責任遺伝子である SCD 遺伝子の解析が進められている (Ohsaki et al. 2007)。マダイ脂肪組織において脂肪酸不飽和化機能の存在が確認され、その遺伝子発現の操作が脂肪酸組成に反映されたことは、外部因子を介した代謝機能制御の一例として、今後、魚類脂肪組織の機能強化・改変による肉質改善技術の開発に貢献するものと期待される。その他に脂質代謝に関連する経済形質として、脂肪酸合成や HUFA 合成などがある。脂肪酸合成についてはその特性解析からマウスなどの哺乳類脂肪細胞との類似性が示唆された (第 4 章) が、外部因子 (2-bromopalmitate) による機能発現の強化は見られなかった。主要な必須脂肪酸系列である n-3 (18:3) および n-6 (18:2) については、マダイ脂肪細胞においてデルタ 6 不飽和化や C18-20 鎖長延長が起こることが示されたが、HUFA 生成は確認されず、また、2-bromopalmitate は HUFA 合成に影響を及ぼすことはなかった (第 4 章)。今後の展開として、魚類脂肪組織において経済価値の高い有用な遺伝子の機能に焦点を当て、その制御機構を解明していくことが将来的な水産業への応用を考えるにあたっては必要と考えられる。

第 3 章では脂質代謝遺伝子の発現を網羅的に制御する転写因子 PPAR を中心に解析した。PPAR はリガンド依存型転写因子であり、そのため、外部因子をリガンドとして用いることにより脂質代謝遺伝子発現を人為的に操作する余地がある。また、使用するリガンドの種類によって下流遺伝子の応答性に差が出ることが知られており (Schoonjans et al. 1996a,

Qi et al. 2000)、養殖魚においても適切に PPAR 機能の利用を図れば、有用形質の機能発現を選択的に制御することが期待される。脂肪蓄積関連遺伝子の制御には  $\gamma$  サブタイプ (PPAR $\gamma$ ) が中心的な役割を果たすことが知られる (Schoonjans et al. 1996b, Brun et al. 1997)。第 3 章で述べたとおり、魚類ではマダイも含め PPAR $\gamma$  のリガンド結合部の構造は哺乳類のものと異なるが (第 3 章)、リガンドスクリーニングなどの研究が未だ十分行われていないために、現在までそのリガンドは同定されていない。マダイ脂肪細胞では分化誘導と組み合わせた場合、作用機序はいまだ不確定であるが、非代謝性脂肪酸である 2-bromopalmitate を用いて PPAR $\gamma$  および下流の脂質代謝遺伝子の発現を活性化することができた (第 3 章および第 4 章)。このことは脂質代謝物による PPAR および関連遺伝子の制御の可能性を示唆する。また、作動薬への感受性は遺伝子ごとに異なり、最も感受性が高かった SCDa は約 6 倍の遺伝子発現上昇と、それに伴う細胞形質への影響 (16:1 の増加) が見られた (第 4 章)。しかし、その効果は共存する脂肪酸種により影響されると見られ、18:3n-3 を蓄積したマダイ脂肪細胞と異なり、18:2n-6 を蓄積した細胞では SCDa 遺伝子発現への効果は見られなかった。このことは、将来的に飼料添加物等により PPAR 遺伝子活性化の操作を行う場合、作動薬の同定と併せて、飼料組成・体成分にも留意する必要があることを意味する。

本研究ではマダイ培養脂肪細胞を用いて、分化や機能発現における主要な代謝酵素や転写因子の動態を分子レベルで明らかにした。脂肪酸合成・取り込みなど脂肪蓄積の全体的特徴は哺乳類と類似するものの、2 種類の LPL 様遺伝子の発現 (第 1 章)、脂溶性ビタミンへの応答性 (第 2 章) や PPAR による発現制御機構 (第 3 章) など、いくつかの相違点を示唆する結果が得られたことは、これまで得られてきた哺乳類の脂質代謝機構もしくはその制御機構に関する知見が、必ずしも魚類に適合しないことを暗示している。マダイを含めた海産養殖魚においては、飼料成分として脂質の利用率が高い、高度不飽和脂肪酸を要求する、などの特徴的な栄養要求を示すことが知られる (Watanabe 1982, March 1993)。そのため、栄養要求に合致しない油脂を用いると、成長不良や代謝異常となることがあり (Mourente and Bell 2006, Montero et al. 2008)、植物性などの代替飼料原料を養殖業に導入する上での問題点となっている。また、魚類において、体脂肪の蓄積や脂質代謝酵素活性は栄養状態、季節および生殖周期などにより大きく変動することが知られている (Black and Skinner 1987, Osato et al. 1991, Saera-Vila et al. 2005)。本研究で明らかになったマダイ脂質代謝機構や脂肪細胞発達機構の特徴が、そうした魚類の生理特性とどのように関わっているのか明らかにすることが今後の課題である。

さらに養殖魚において、品質向上技術や代替飼料原料開発の観点から、脂肪酸やその代謝物・修飾物などを代謝メディエーターとして用いた脂質代謝機能の強化・改変が試みられている (Ganga et al. 2005, Kennedy et al. 2006, Kleveland et al. 2006, Leaver et al. 2006)。しかしながら、こうした研究は現在、飼育試験を通して行われているのが実情である。飼料試験の場合、試験飼料あたり複数の試験区を設けて数週間にわたり給餌を行い、

成長指標や体成分分析により結果を判定するのが一般的である (Oku and Ogata 2000)。そのため、様々な物質を候補としてスクリーニングすることを想定すると、飼育試験では時間的・空間的制約が生じる。こうした従来用いられてきた手法と比べて、本研究で開発した手法は代謝メディエーターの効率的開発への一つの道筋をつけたものと位置づけられる。すなわち、培養系を用い、遺伝子発現や形質評価などを小スケールで行い、ある程度結果の予測をもって飼育試験などの実証研究をおこなうことが可能となった。あくまでケーススタディーであるが、本研究では第 3 章において 4 種類の PPAR 作動薬を用いて培養系においてスクリーニングを行い、そのうち 2-bromopalmitate が多くの脂質代謝遺伝子を活性化することを把握した。その上で第 4 章において形質評価を行い、その主な作用はデルタ 9 不飽和化であり、脂肪酸組成改変につながることを明らかにした。当然、代謝メディエーター開発において、最終的には実証研究としての飼育試験が必要不可欠であることは言うまでもないが、その予備段階として、本研究で行った一連の手法を用いれば、より多数の因子を迅速に解析し、候補因子を飼育試験に先立って取捨選択することが可能である。また、得られる作用効果についても培養系における形質評価から予測することができる。そうした意味では、本研究は将来的な、養殖魚における有用形質の機能発現制御とその応用研究に貢献するものと考えている。

## 謝辞

本論文の作成にあたり、終始御指導、御鞭撻を頂いた広島大学生物生物圏科学研究科、海野徹也准教授に深甚なる謝意を表します。また、終始有益なる御助言を頂きました長澤和也教授、飯島憲章教授、植松一眞教授に感謝の意を表します。本研究実施にあたり、非常勤職員岡井いづみ氏をはじめ水産総合研究センター養殖研究所の各位には、各方面においてご協力いただきました。ここに記して感謝の意を表します。さらに、本研究の一部である水研センター交付金プロジェクト研究「バイオデザイン計画」に参画の機会を与えて頂くとともに、本研究の始動に尽力されました尾形博元養殖研究所栄養研究室長に深謝申し上げます。

## 引用文献

- Ailhaud, G., Amri, E. Z., Bardon, S., Barcellini-Couget, S., Bertrand, B., Catalioto, R. M., Dani, C., Djian, P., Doglio, A., Forest, C., Gaillard, D., Grimaldi, P., Negrel, R., Vannier, C., Vassaux, G., 1990. The adipocyte: Relationships between proliferation and adipose cell differentiation. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 142, 57-59.
- Ailhaud, G., 1996. Early adipocyte differentiation. *Biochem. Soc. Trans.*, 24, 400-402.
- Albalat, A., Gutierrez, J., Navarro, I., 2005. Regulation of lipolysis in isolated adipocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): The role of insulin and glucagon. *Comp. Biochem. Physiol.*, 142A, 347-354.
- Albalat, A., Sanchez-Gurmaches, J., Gutierrez, J., Navarro, I., 2006. Regulation of lipoprotein lipase activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 146, 226-235.
- Amri, E.-Z., Alihaud, G., Grimaldi, P. -A., 1994. Fatty acids as signal transducing molecules: involvement in the differentiation of preadipose to adipose cells. *J. Lipid Res.*, 35, 930-937.
- Andersen, O., Eijssink, V. G. H., Thomassen, M., 2000. Multiple variants of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\gamma$  are expressed in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gene*, 255, 411-418.
- Aso, H., Abe, H., Nakajima, I., Ozutsumi, K., Yamaguchi, T., Takamori, Y., Kodama, A., Hoshino, F. B., Takano, S., 1995. A preadipocyte clonal line from bovine intramuscular adipose tissue: None expression of GLUT4 protein during adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 213, 369-375.
- Auwerx, J., Schoonjans, K., Fruchart, J.-C., Staels, B., 1996. Transcriptional control of triglyceride metabolism: fibrates and fatty acids change the expression of the LPL and apo C-III genes by activating the nuclear receptor PPAR. *Atherosclerosis*, 124 Suppl. 29-37.
- Azain, M. J., 2004. Role of fatty acids in adipocyte growth and development. *J. Anim. Sci.*, 82, 916-924.
- Bastie, C., Holst, D., Gaillard, D., Jehl-Pietri, C., Grimaldi, P. A., 1999. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor PPAR $\delta$  promotes induction of PPAR $\gamma$  and adipocyte differentiation in 3T3C2 fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 274, 21920-21925.
- Batista-Pinto, C., Rodrigues, P., Rocha, E., Lobo-da-Cunha, A., 2005. Identification and organ expression of peroxisome proliferator activated receptors in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1731, 88-94.

- Bell, M. V., Dick, J. R., Porter, A. E. A., 2003. Tissue deposition of n-3 FA pathway intermediates in the synthesis of DHA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Lipids*, 38, 925-931.
- Black, D., Skinner, E. R., 1987. Changes in plasma lipoproteins and tissue lipoprotein lipase and salt-resistant lipase activities during spawning in the rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 88B, 261-267.
- Boone, C., Mouro, J., Gregoire, F., Remacle, C., 2000. The adipose conversion process: Regulation by extracellular and intracellular factors. *Reprod. Nutr. Dev.*, 40, 325-358.
- Boukouvala, E., Antonopoulou, E., Favre-Krey, L., Diez, A., Bautista, J. M., Leaver, M., J., Tocher, D. R., Krey, G., 2004. Molecular characterization of three peroxisome proliferator-activated receptors from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Lipids*, 39, 1085-1092.
- Bouraoui, L., Gutierrez, J., Navarro, I., 2008. Regulation of proliferation and differentiation of adipocyte precursor cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Endocrinol.*, 198, 459-469.
- Brandes, R., Arad, R., Bar-Tana, J., 1986. Adipose conversion of cultured rat primary preadipocytes by hypolipidemic drugs. *Biochim. Biophys. Acta*, 877, 314-321.
- Brun, R. P., Kim, J. B., Hu, E., Spiegelman, B. M., 1997. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the control of adipogenesis. *Curr. Opin. Lipidol.*, 8, 212-218.
- Capilla, E., Diaz, M., Albarat, A., Navarro, I., Pessin, J. E., Keller, K., Planas, J. V., 2004. Functional characterization of an insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) from fish adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 287, 348-357.
- Chawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M., Mangelsdorf, D. J., 2001. Nuclear receptors and lipid physiology: Opening the x-files. *Science*, 294, 1866-1870.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phOH-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.
- Cook, H. W., 1991. Fatty acid desaturation and chain elongation in eucaryotes. In: Vance, D. E., Vance, J. (Ed.), *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Elsevier Science, Amsterdam, Netherland, pp141-169.
- Cornelius, P., Enerback, S., Bjursell, G., Olivecrona, T., Pekala, P., 1988. Regulation of lipoprotein lipase mRNA content in 3T3-L1 cells by tumor necrosis factor. *Biochem. J.*, 249, 765-769.
- Cossins, A. R., Murray, P. A., Gracey, A. Y., Logue, J., Polley, S., Caddick, M., Brookst, S., Postle, T., Maclean, N., 2002. The role of desaturases in cold-induced lipid restricting. *Biochem. Soc. Transact.*, 30, 1082-1086.

- Dani, C., Doglio, A., Grimaldi, P., Ailhaud, G., 1986. Expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene and its insulin regulation during differentiation of preadipose cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 138, 468-475.
- Dani, C., Amri, E. Z., Bertrand, B., Enerback, S., Bjursell, G., Grimaldi, P., Ailhaud, G., 1990. Expression and regulation of pOb24 and lipoprotein lipase genes during adipocyte conversion. *J. Cell. Biochem.*, 43, 103-110.
- Deslex, S., Negrel, R., Vannier, C., Etienne, J., Ailhaud, G., 1986. Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int. J. Obesity*, 10, 19-27.
- Ding, S. T., Mersmann, H. J., 2001. Fatty acid modulate porcine adipocyte differentiation and transcripts for transcription factors and adipocyte-characteristic proteins. *J. Nutr. Biochem.*, 12, 101-108.
- Eckel R. H., 1987. Adipose tissue lipoprotein lipase. In: Borensztajn, J. (Ed.), *Lipoprotein lipase*. Evener, Chicago, pp79-132.
- Escriva, H., Safi, R., Hanni, C., Langlois, M. -C., Saumitou-Laprade, P., Stehelin, D., Capron, A., Pierce, R., Laudet, V., 1997. Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 6803-6808.
- Foufelle, F. Girard, J., Ferre, P., 1996. Regulation of lipogenic enzyme expression by glucose in liver and adipose tissue: A review of the potential cellular and molecular mechanisms. *Advan. Enzyme regul.*, 36, 199-226.
- Ganga, R., Bell, J. G., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M. J., Izquierdo, M. S., 2005. Effect of dietary lipids on plasma fatty acid profiles and prostaglandin and leptin production in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 142B, 410-418.
- Gaskins, H. R., Hausman, G. J., Martin, R. J., 1989. Regulation of gene expression during adipocyte differentiation: a review. *J. Anim. Sci.*, 67, 2263-2272.
- Gharbi-Chihi, J., Grimaldi, P., Torresani, J., Ailhaud, G., 1981. Triiodothyronine and adipose conversion of Ob17 preadipocytes: Binding to high affinity sites and effects on fatty acid synthesizing and esterifying enzymes. *J. Receptor Res.*, 2, 153-173.
- Gregoire, F. M., Smas, C. M., Sul, H. S., 1998. Understanding Adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.*, 78, 783-809.
- Guo, Q., Wang, P. -R., Milot, D. P., Ippolito, M. C., Hernandez, M., Burton, C. A., Wright, S. D., Chao, Y.-S., 2001. Regulation of lipid metabolism and gene expression by fenofibrate in hamsters. *Biophys. Biochim. Acta*, 1533, 220-232.
- Hausman, G. J., Campion, D. R., Martin, R. J., 1980. Search for the adipocyte precursor

- cell and factors that promote its differentiation. *J. Lipid Res.*, 21, 657-670.
- Hausman, G. J., Poulos, S. P., Pringle, T. D., Azain, M. J., 2008. The influence of thiazolidinediones on adipogenesis in vitro and in vivo: potential modifiers of intramuscular adipose tissue deposition in meat animals. *J. Anim. Sci.*, 86, suppl. 236-243.
- Henderson, R. J., 1996. Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. *Arch. Anim. Nutr.*, 49, 5-22.
- Hide, W., Chan, L., Li, W. H., 1992. Structure and evolution of the lipase superfamily. *J. Lipid Res.*, 33, 167-178.
- Hirata, K., Dichek, H. L., Cioffi, J. A., Choi, S. Y., Leeper, N. J., Quintana, L., Kronmal, G. S., Cooper, A. D., Quertermous, T., 1999. Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family. *J. Biol. Chem.*, 274, 14170-14175.
- Horrobin, D. F., 1993. Fatty acid metabolism in health and disease: the role of  $\Delta$ -6-desaturase. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57 suppl., 732-737.
- Houseknecht, K. L., Cole, B. M., Steele, P. J., 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) and its ligands: A review. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 22, 1-23.
- Ibabe, A., Grabenbauer, M., Baumgart, E., Fahimi, H. D., Cajaraville, M. P., 2002. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *Histochem. Cell Biol.*, 118, 231-239.
- Ibabe, A., Herrero, A., Cajaraville, M. P., 2005. Modulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by PPAR $\alpha$ - and PPAR $\gamma$ - specific ligands and by 17 $\beta$ -estradiol in isolated zebrafish hepatocytes. *Toxicol. In Vitro*, 19, 725-735.
- Ingle, D. L., Bauman, D. E., Garrigus, U. S., 1972. Lipogenesis in the ruminant: in vitro study of tissue sites, carbon source and reducing equivalent generation for fatty acid synthesis. *J. Nutr.*, 102, 609-616.
- Jaye, M., Lynch, K. J., Krawiec, J., Marchadier, D., Maugeais, C., Doan, K., South, V., Amin, D., Perrone, M., Rader, D. J., 1999. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat. Genet.*, 21, 424-428.
- Jayakumar, A., Tai, M. H., Huang, W. Y., Al-Feel, W., Hsu, M., Abu-Elheiga, L., Chirala, S. S., Wakil, S., 1995. Human fatty acid synthetase: Properties and molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 8695-8699.
- 門脇 孝, 1996. いま脂肪細胞がおもしろい!. *実験医学*, 14, 16, pp24-26.
- Kaestner, K. H., Ntambi, J. M., Kelly, Jr. T. J., Lane, D., 1989. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearyl-CoA desaturase. *J. Biol. Chem.*, 264, 14755-14761.

- Kanazawa, A., Teshima, S., Ono, K., 1979. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 63B, 295-298.
- Kawada, T., Aoki, N., Kamei, Y., Maeshige, K., Nishiu, S., Sugimoto, E., 1990. Comparative investigation of vitamins and their analogues on terminal differentiation, from preadipocytes to adipocytes, of 3T3-L1 cells. *Comp. Biochem. Physiol.*, 96A: 323-326.
- Kawada, T., Kamei, Y., Sugimoto, E., 1996. The possibility of active form of vitamins A and D as suppressors on adipocyte development via ligand-dependent transcriptional regulators. *Int. J. Obesity*, 20, suppl. 3: 52-57.
- 河田照雄, 1996. 脂肪細胞の分子生物学. *モレキュラー・メディシン*, 33, 10, pp1116-1124.
- Kennedy, S. R., Leaver, M. J., Campbell, P. J., Zheng, X., Dick, J. R., Tocher, D. R., 2006. Influence of dietary oil content and conjugated linoleic acid (CLA) on lipid metabolism enzyme activities and gene expression in tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Lipids*, 41, 423-436.
- Kersten, S., Wahli, W., 2000. Peroxisome proliferator activated receptor agonists. In: Jolles, P. (Ed.), *New approaches to drug delivery*. Birkhauser Verlag, Switzerland, pp141-151.
- Kleveland, E. J., Ruyter, B., Vegusdal, A., Sundvold, H., Berge, R. K., Gjoen, T., 2006. Effects of 3-thia fatty acids on expression of some lipid related genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Comp. Biochem. Physiol.*, 145B, 239-248.
- Kliwer, S., Xu, H. E., Lambert, M. H., Willson, T. M., 2001. Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog. Horm. Res.*, 56, 239-263.
- Kondo, H., Misaki, R., Gelman, L., Watabe, S., 2007. Ligand-dependent transcriptional activities of four torafugu pufferfish *Takifugu rubripes* peroxisome proliferator-activated receptors. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 154, 120-127.
- Labarca, C., Paigen, K., 1980 A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.*, 102, 344-352.
- Leaver, M. J., Boukouvala, E., Antonopoulou, E., Diez, A., Favre-Krey, L., Ezaz, M. T., Bautista, J. M., Tocher, D. R., Krey, G., 2005. Three peroxisome proliferator-activated receptor isotypes from each of two species of marine fish. *Endocrinology*, 146, 3150-3162.
- Leaver, M. J., Tocher, D. R., Obach, A., Jensen, L., Henderson, R. J., Porter, A. R., Krey, G. 2006. Effects of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on lipid composition, metabolism and gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*) tissues. *Comp.*

- Biochem. Physiol., 145A, 258-267.
- Leaver, M. J., Ezaz, M. T., Fontagne, S., Tocher, D. R., Boukouvala, E., Krey, G., 2007. Multiple peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta$  subtypes from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Mol. Endocrinol.*, 38, 391-400.
- Lee, C. H., Olson, P., Evans, R. M., 2003. Minireview: Lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology*, 144, 2201-2207.
- Liang, X. F., Oku, H., Ogata, H. Y., 2002a. The effects of feeding condition and dietary lipid level on lipoprotein lipase gene expression in liver and visceral adipose tissue of red sea bream *Pagrus major*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 131A, 335-342.
- Liang, X. F., Ogata, H. Y., Oku, H., 2002b. Effect of dietary fatty acids on lipoprotein lipase gene expression in the liver and visceral adipose tissue of fed and starved red sea bream *Pagrus major*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 132A, 913-919.
- Lin, H., Romsos, D. R., Tack, P. I., Leveille, G. A., 1977. Influence of diet on in vitro and in vivo rates of fatty acid synthesis in coho salmon [*Oncorhynchus Kisutch* (Walbaum)]. *J. Nutr.*, 107, 1677-1682.
- Lindberg, A., Olivecrona, G., 2002. Lipoprotein lipase from rainbow trout differs in several respects from the enzyme in mammals. *Gene*, 292, 213-223.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Madsen, L., Froyland, L., Grav, H. J., Berge, R. K. 1997. Up-regulated  $\Delta^9$ desaturase gene expression by hypolipidemic peroxisome-proliferating fatty acids results in increased oleic acid content in liver and VLDL: accumulation of a  $\Delta^9$ -desaturated metabolite of tetradecylthioacetic acid. *J. Lipid Res.*, 38, 554-563.
- Madsen, L., Petersen, R. K., Kristiansen, K., 2005. Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1740, 266-286.
- Maglich, J. M., Caravella, J. A., Lambert, M. H., Willson, T. M., Moore, J. T., Ramamurthy, L., 2003. The first completed genome sequence from a teleost fish (*Fugu rubripes*) adds significant diversity to the nuclear receptor superfamily. *Nucleic Acid Res.*, 31, 4051-4058.
- March, B. E., 1993. Essential fatty acids in fish physiology. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 71, 684-689.
- McNeel, R. L., Ding, S. T., Smith, E. O., Mersmann, H. J., 2000. Expression of porcine adipocyte transcripts during differentiation in vitro and in vivo. *Comp. Biochem. Physiol.*, 126B, 291-302.

- Melton, S. L., Amiri, M., Davis, G. W., Backus, W. R., 1982. Flavor and chemical characteristics of ground beef from grass-, forage-grain- and grain-finished steers. *J. Anim. Sci.*, 55, 77-87.
- Miyazaki, M., Ntambi, J. M. 2003. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 68, 113-121.
- Montero, D., Grasso, V., Izquierdo, M. S., Ganga, R., Real, F., Tort, L., Caballero, M. J., Acosta, F., 2008. Total substitution of fish oil by vegetable oils in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: effects on hepatic Mx expression and some immune parameters. *Fish Shellfish Immunol.*, 24, 147-155.
- Morrison, R. F., Farmer, S. R., 1999. Insight into the transcriptional control of adipocyte differentiation. *J. Cell. Biochem., Suppl.* 32/33, 59-67.
- Mourente, G., Bell, J. G., 2006. Partial replacement of dietary fish oil with blends of vegetable oils (rapeseed, linseed and palm oils) in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) over a long term growth study; effects on muscle and liver fatty acid composition and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Comp. Biochem. Physiol.*, 145B, 389-399.
- Mueckler, M., 1994. Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.*, 219, 713-725.
- 中川平介, 2002. 美味しい養殖魚の品質評価. 養殖, 8, pp56-59.
- Nilsson-Ehle, P., Garfinkel, A. S., Schotz, M. C., 1980. Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism. *Ann. Rev. Biochem.*, 49, 667-693.
- Ntambi, J. M., Kim, Y. C., 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. *J. Nutr.*, 130, 3122-3126.
- Ogata, H. Y., Oku, H. 2000a. Effects of water velocity on growth performance of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. World Aquacul. Soc.*, 31, 225-231.
- Ogata, H. Y., Oku, H. 2000b. The effects of swimming exercise on growth and whole-body protein and fat contents of fed and unfed fingerling yellowtail. *Fish. Sci.*, 66, 1100-1105.
- Ogata, H. Y., Oku, H., 2001. The effects of dietary retinoic acid on body lipid deposition in juvenile red sea bream (*Pagrus major*); a preliminary study. *Aquaculture*, 193, 271-279.
- Ohsaki, H., Sawa, T., Sasazaki, S., Kano, K., Taniguchi, M., Mukai, F., Mannen, H., 2007. Stearoyl-CoA desaturase mRNA expression during bovine adipocyte differentiation in primary culture derived from Japanese Black and Holstein cattle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 148A, 629-634.
- Oku, H., Ogata, H. Y., 2000. Body lipid deposition in juveniles of red sea bream *Pagrus major*, yellowtail *Seriola quinqueradiata*, and Japanese flounder *Paralichthys*

- olivaceus*. Fish. Sci., 66, 25-31.
- Oku, H., Ogata, H. Y., Liang, X. F., 2002. Organization of the lipoprotein lipase gene of red sea bream *Pagrus major*. Comp. Biochem. Physiol., 131B, 775-785.
- Oku, H., Koizumi, N., Okumura, T., Kobayashi, T., Umino, T., 2006a. Molecular characterization of lipoprotein lipase, hepatic lipase and pancreatic lipase: Effects of fasting and refeeding on their gene 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.
- Oku, H., Umino, T., 2008. Molecular characterization of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their gene expression in the differentiating adipocytes of red sea bream *Pagrus major*. Comp. Biochem. Physiol., 151B, 268-277.
- Olson, A. L., Pessin, J. E., 1996. Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. Annu. Rev. Nutr., 16, 235-256.
- 大里進子, 宮田克也, 松尾重巳, 伊藤太郎, 高良治江, 三嶋敏雄, 橘勝康, 槌本六良, 1991. 養殖マダイの成長に伴う魚体内各部中脂肪量の変化. 日水誌, 57, 905-913.
- Pasquali, D., Pierantoni, G. M., Fusco, A., Staibano, S., Colantuoni, V., Bellis, A. D., Bellastella, A., Sinisi, A. A., 2004. Fenofibrate increases the expression of high mobility group AT-hook 2 (HMGA2) gene and induces adipocyte differentiation of orbital fibroblasts from Graves' ophthalmopathy. J. Mol. Endocrinol., 33, 133-143.
- Paulauskis, J. D., Sul, H. S., 1988. Cloning and expression of mouse fatty acid synthase and other specific mRNAs. Developmental and hormonal regulation in 3T3-L1 cells. J. Biol. Chem., 263, 7049-7054.
- Plagnes-Juan, E., Lansard, M., Seiliez, I., Medale, F., Corraze, G., Kaushik, S., Panserat, S., Skiba-Cassy, S., 2008. Insulin regulates the expression of several metabolism-related genes in the liver and primary hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Exp. Biol., 211, 2510-2518.
- Planas, J. V., Capilla, E., Gutierrez, J., 2000. Molecular identification of a glucose transporter from fish muscle. FEBS letters, 481, 266-270.
- Polley, S. D., Tikku, P. E., Trueman, R. T., Caddick, M. X., Morozov, I. Y., Cossins, A. R., 2003. Differential expression of cold- and diet-specific genes encoding two carp liver  $\Delta 9$ -acyl-CoA desaturase isoforms. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 284, 41-50.

- Qi, C., Zhu, Y., Reddy, J. K., 2000. Peroxisome proliferator-activated receptors, coactivators, and downstream targets. *Cell Biochem. Biophysics*, 32, 187-204.
- Raingear, D., Cancio, I., Cajaraville, M. P., 2006. Cloning and expression pattern of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  in the thicklip grey mullet *Chelon labrosus*. *Mar. Environ. Res.*, 62, 113-117.
- Ramsay, T. G., 1996. Fat cells. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 25, 847-870.
- Ramsay, T. G., Rosebrough, R. W., 2003. Hormonal regulation of postnatal chicken preadipocyte differentiation in vitro. *Comp. Biochem. Physiol.*, 136B, 245-253.
- Robinson-Rechavi, M., Marchand, O., Escriva, H., Bardet, P. L., Zelus, D., Hughes, S., Laudet, V., 2001. Euteleost fish genomes are characterized by expansion of gene families. *Genome Res.*, 11, 781-788.
- Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P., Spiegelman, M., 2007. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes and Dev.*, 14, 1293-1307.
- Rubin, C. S., Hirsch, A., Fung, C., Rosen, O. M., 1978. Development of hormone receptors and hormonal responsiveness *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, 253, 7570-7578.
- Ruyter, B., Andersen, O., Dehli, A., Farrants, A. -K. O., Gjoen, T., Thomassen, M. S., 1997. Peroxisome proliferator activated receptors in Atlantic salmon (*Salmo salar*): effects on PPAR transcription and acyl-CoA oxidase activity in hepatocytes by peroxisome proliferators and fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1348, 331-338.
- Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J. A., Gomez-Requeni, P., Medale, F., Kaushik, S., Perez-Sanchez, J., 2005. Molecular characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) lipoprotein lipase. Transcriptional regulation by season and nutritional condition in skeletal muscle and fat storage tissues. *Comp. Biochem. Physiol.*, 142B, 224-232.
- Safonova, I., Darimont, C., Amri, E. Z., Grimaldi, P., Ailhaud, G., Reichert, U., Shroot, B., 1994. Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 104, 201-211.
- Sato, M., Hiragun, A., 1988. Demonstration of  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitaminD<sub>3</sub> receptor-like molecule in ST 13 and 3T3 L1 preadipocytes and its inhibitory effects on preadipocyte differentiation. *J. Cell. Physiol.*, 135, 545-550.
- Schoonjans, K., Staels, B., Auwerx, J., 1996a. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J. Lipid Res.*, 37, 907-925.
- Schoonjans, K., Staels, B., Auwerx, J., 1996b. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1302, 93-109.

- Segner, H., Bohm, R., 1994. Enzymes in lipogenesis. In: Hochachka, P. W., Mommsen, T. P. (Ed.), *Biochemistry and molecular biology of fishes*, vol3. Elsevier Science, Amsterdam, Netherland, pp313-325.
- Seiliez, I., Panserat, S., Corraze, G., Kausik, S., Bergot, P., 2003. Cloning and nutritional regulation of a  $\Delta^6$ -desaturase-like enzyme in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 135B, 449-460.
- Sheridan, M. A., Harmon, J. S., 1994. Adipose tissue. In: Hochachka, P. W., Mommsen, T. P. (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of fishes*, vol3. Elsevier Science, Amsterdam, Netherland, pp305-311.
- Shindo, K., Tsuchiya, T., Matsumoto, J. J., 1986. Histological study on white and dark muscles of various fishes. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 52, 1377-1399.
- Slieker, L. J., Sloop, K. W., Surface, P. L., 1998. Differentiation method-dependent expression of leptin in adipocyte cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 251, 225-229.
- Spiegelman, B. M., Frank, M., Green, H., 1983. Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes: Regulation of mRNA content for glycerophosphate dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development. *J. Biol. Chem.*, 258, 10083-10089.
- Suryawan, A., Swanson, L. V., Hu, C. Y., 1997. Insulin and hydrocortisone, but not triiodothyronine, are required for the differentiation of pig preadipocytes in primary culture. *J. Anim. Sci.*, 75, 105-111.
- Suryawan, A., Hu, C. Y., 1997. Effects of retinoic acid on differentiation of cultured pig preadipocytes. *J. Anim. Sci.*, 75, 112-117.
- Symonds, M. E., Mostyn, A., Pearce, S., Budge, H., Stephenson, T., 2003. Endocrine and nutritional regulation of fetal adipose tissue development. *J. Endocrinol.*, 179, 293-299.
- Takeuchi, T., Shiina, Y., Watanabe, T., 1991. Suitable protein and lipid levels in diet for fingerlings of red sea bream *Pagrus major*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 293-299.
- Tiku, P. E., Gracey, A. Y., Macartney, A. I., Beynon, R. J., Cossins, A. R., 1996. Cold-induced expression of  $\Delta^9$ -desaturase in carp by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Science*, 271, 815-818.
- Tocher, D. R., Carr, J., Sargent, J. R. 1989. Polyunsaturated fatty acid metabolism in fish cells: Differential metabolism of (n-3) and (n-6) series acids by cultured cells originating from a freshwater teleost fish and from a marine teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94B, 367-374.
- Tocher, D. R., Ghioni, C. 1999. Fatty acid metabolism in marine fish: Low activity of

- fatty acyl  $\Delta 5$  desaturation in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cells. *Lipids*, 34, 433-440.
- Todorovic, M., Vegusdal, A., Gjoen, T., Sundvold, H., Torstensen, B. E., Kjaer, M. A., Ruyter, B., 2008. Changes in fatty acids metabolism during differentiation of Atlantic salmon preadipocytes: Effects of n-3 and n-9 fatty acids. *Biophys. Biochim. Acta*, 1781, 326-335.
- Tontonoz, P., Hu, E., Spiegelman, B. M., 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR $\gamma$ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 79, 1147-1156.
- Ullrich, N. F. E., Purnell, J. Q., Brunzell, J. D., 2001. Adipose tissue fatty acid composition in humans with lipoprotein lipase deficiency. *J. Investig. Med.*, 49, 273-275.
- Umino, T., Nakagawa, H., Arai, K., 1996. Development of adipose tissue in the juvenile red sea bream. *Fish. Sci.*, 62, 520-523.
- Vegusdal, A., Sundvold, H., Gjoen, T., Ruyter, B., 2003. An in vitro method for studying the proliferation and differentiation of atlantic salmon preadipocytes. *Lipids*, 38, 289-296.
- Volpe, J. J., Vagelos, P. R. 1976. Mechanisms and regulation of biosynthesis of saturated fatty acids. *Physiological reviews*, 56, 339-417.
- Vu, D., Ong, J. M., Clemens, T. L., Kern, P. A., 1996. 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$  induces lipoprotein lipase expression in 3T3-L1 cells in association with adipocyte differentiation. *Endocrinology*, 137, 1540-1544.
- Wakil, S. J., Stoops, J. K., Joshi, V. C., 1983. Fatty acid synthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 537-579.
- Watanabe, T., 1982. Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B, 3-15.
- Wilson, A. C., Williamson, I. P., 1970. Fatty acid synthetase from the liver of the plaice, *Pleuronectes platessa*. *Biochem. J.*, 117, 26-27.
- Wong, H., Schotz, M., 2002. The lipase gene family. *J. Lipid Res.*, 43, 993-999.
- 山田充阿弥, 中村節子, 1964. 魚肉の組織化学的研究-I、主要食用魚肉における脂質の存在状態. *東海水研報*, 39, 21-28.
- 山田充阿弥, 1981. マイワシ肉の脂質含量とその存在状態. *東海水研報*, 104, 103-109.
- Yang, A., Larsen, T. W., Powell, V. H., Tume, R. K., 1999. A comparison of fat composition of Japanese and long-term grain-fed Australian steers. *Meat Sci.*, 51, 1-9.
- Yen, C. F., Jiang, Y. N., Shen, T. F., Wong, I. M., Chen, C. C., Chen, K. C., Chang, W. C., Tsao, Y. K., Ding, S. T., 2005. Cloning and expression of the genes associated with lipid metabolism in Tsaiya ducks. *Polut. Sci.*, 84, 67-74.
- Zechner, R., 1997. The tissue-specific expression of lipoprotein lipase: implications for

energy and lipoprotein metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.*, 8, 77-88.

Zhou, S., Ackman, R. G., Morrison, C., 1996. Adipocytes and lipid distribution in the muscle tissue of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53, 326-332.