

母親の高脂肪食がメダカの卵に与える影響

東京大学大学院理学系研究科（研究当時） 井上雄介
 東京大学大学院理学系研究科（現：京都産業大学） 武田洋幸
 東京大学大学院理学系研究科（現：東京農工大学） 馬谷千恵

1. はじめに—親の食餌と仔の健康—

親の食餌成分、特に「母親がどのような食餌を摂取していたか」が生まれてくる次世代の仔の発生や成長後の代謝に影響する、ということは一般に受け入れられている。次世代の仔は母親からの卵細胞と父親からの精子が受精することで受精卵となり、発生していく。卵細胞はほとんどの動物において、体の中にある細胞の中で最も大きい細胞であり、母親由来の遺伝情報を含むDNAだけでなく、細胞内小器官(オルガネラ)やRNA、タンパク質、栄養成分などを含んでいる。これまで、主に哺乳類を用いた研究から、母親だけに脂肪を多く含む食餌である高脂肪食を投与すると、仔の発生が異常となることや、成長後にグルコース代謝などに悪影響を与えることなどが明らかになりつつある。例えば、高脂肪食投与された母親から生まれた仔マウスは、通常食投与された母親から生まれた仔マウスよりも、胎児の段階で体長が小さいことや、出生時の体脂肪率が高いこと、糖代謝異常を示す(インスリン抵抗性がある)などの報告がある¹⁾など。また、妊娠期や授乳期に高脂肪食投与された母親から生まれた仔マウスでは、非アルコール性脂肪肝という肝臓の障害が引き起こされやすいといった報告もある^{2),3)}。

一方で、哺乳類は一般に妊娠期に母親の子宮の中で発育し、出生後も一定期間母乳を摂取して成長するため、母親が摂取した食餌が、仔の発生に作用する経路は複数存在する。すなわち、母親が摂取した栄養成分は、卵細胞のみならず、胎盤、母乳など複数の経路を介して作用し、これらが相互作用する可能性もあることから、母親の食餌が仔に作用するメカニズムについては不明な点が多く残されている。

真骨魚類は、魚類の種のうち半分以上を占める分類群であり、哺乳類と同じ脊椎動物に属している。真骨魚類をモデルとした、親の食餌と仔の発生や成長の関係性に関する研究については、主に水産養殖の観点から行われてきた。特に餌のコストを下げつつ、効率よく育てるための餌成分が注目されている。

これまでの研究で、ヨーロッパヘダイでは植物を多く含む餌で飼育すると仔の成長が悪くなることや、ゼブラフィッシュではビタミンBやアミノ酸の一つのメチオニンなどの栄養素が少ないと胚における免疫などの遺伝子の発現が低下することが報告されている。このように、真骨魚類においても親の食餌により仔の発生が影響を受ける現象は報告されているものの、その裏付けとなる分子メカニズムはほとんど明らかとなっていない。一方、ほとんどの真骨魚類は卵生であり、母親から放出された卵が体外受精して仔が発生する。そのため、親の食餌から引き起こされる仔の発生・成長の変化は、哺乳類と比べて卵細胞由来の部分が重きをなすと考えられるため、真骨魚類を用いることで、母親の食餌が仔に作用するメカニズムに対して容易にアプローチすることができるのではないかと考えられた。

2. 研究モデルとしてのメダカ⁴⁾

真骨魚類の一種であるメダカは、日本において研究モデルとして確立した。研究対象としてのメダカのデビューは100年以上前にさかのぼり、1900年代初頭に、京都高等工芸学校(現:京都工芸繊維大学)の会田龍雄先生が体色の遺伝に関して論文を発表したことから始まる。その後1950年代には、名古屋大学の山本時男先生の研究室にてホルモンによって実験的に性転換を起こす研究などが報告された。さらに、山本研究室に所属していた富田英夫先生が生涯にわたって数多くのメダカの自然変異体をコレクションしたことによって、メダカは遺伝学・発生学の研究に大きく貢献してきた。1970年代には、放射線医学総合研究所の田口素子先生・石川裕二先生、東京大学の江上信雄先生らにより、近親交配を繰り返して遺伝的に均質された系統である近交系のメダカが多数樹立された。よく使われるHd-rR系統もこの時代に樹立されたものである。2000年代に入ると、遺伝子の解析が飛

躍的に進んだ。2000年には東京大学の嶋昭紘先生の研究室において、成瀬清先生らによりメダカの遺伝子が染色体上のどこに位置するかを表す連鎖地図が報告され、2001年には同研究室深町昌司先生らによりヒメダカというメダカの系統の原因遺伝子が報告された。その後も様々な表現型に関わる遺伝子が同定されるとともに、2007年には東京大学・基礎生物学研究所・理化学研究所・新潟大学・遺伝学研究所などの研究グループにより全ゲノムが解読された。こうしてメダカは遺伝学・発生学・神経科学など基礎研究だけではなく、病態モデルとしても多く用いられるようになり、学術の発展に大きく貢献している。我々も孵化後から高脂肪食(High-fat diet: HFD)を与えて肥満モデルメダカを確立し、早期ライフステージにおけるHFDが脂肪肝を誘導し、肝臓の遺伝子発現や肝細胞のクロマチン状態を変化させることを明らかにしている⁵⁾。

3. メダカが卵を産むしくみ

繁殖期のメダカは毎朝産卵する。メスマダカにおいて毎日成熟した卵を産生するしくみについては、ここ10数年で明らかになってきた^{6,7)}。脊椎動物において成熟した卵の産生は脳の視床下部と、脳下垂体、生殖腺(卵巢)により制御されている(英語の頭文字をとって、HPG軸と呼ばれている)。メダカの場合、脳の視床下部に細胞体があるコレシストキニンを産生するニューロン(神経細胞)が、脳下垂体において軸索末端からコレシストキニンを放出し、卵胞刺激ホルモン(FSH)産生細胞からのFSH放出を促進する。FSHは血液を介して卵巣まで運ばれ、卵胞の発育を促進する。卵胞が発育していくと、卵巣から性ステロイドホルモンのエストロゲンが合成される。エストロゲンは血液を介して脳にも運ばれる。そして、脳の視床下部に細胞体をもち、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)を産生するニューロンにエストロゲンが作用し、このニューロンの活動を活発にする。脳下垂体においてGnRHニューロンの神経終末からGnRHが放出されると、脳下垂体の黄体形成ホルモン(LH)産生細胞からのLH放出が促進され

る。LHも血液を介して卵巣に作用し、卵胞の最終成熟を促し、成熟した卵が卵巣の外へ出る排卵を引き起こす。排卵を終えたメスマダカは、オスメダカのアプローチを受けると放卵し、同時にオスメダカも放精することで受精卵が得られる。繁殖状態のメダカでは以上の現象が1日の周期で生じている。

4. 母親の高脂肪食がメダカの卵に与える影響

我々は、母親への高脂肪食投与が、生まれてくる仔の発生に与える影響について明らかにするため、前述の通り研究モデルとしての様々な利点をもち、繁殖についての知見も豊富なメダカを用いて実験を行った⁸⁾。具体的には、通常食(normal chow: NC)を餌として与えたメダカと孵化後から高脂肪食(HFD)を餌として与えたメダカの群を用意した(図1A)。図1Bに示すように、HFD投与されたメスマ

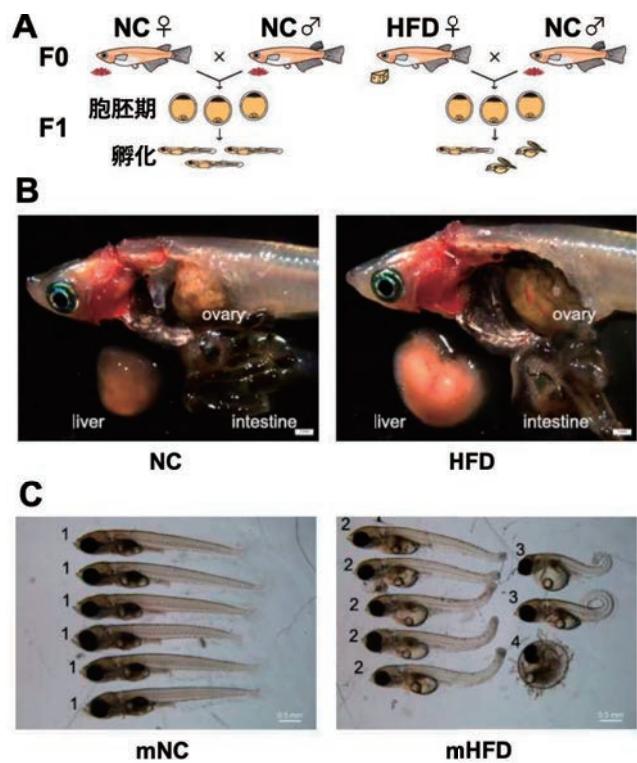


図1 A:メダカの餌の条件の模式図。メスマダカは孵化後から通常食(NC)もしくは高脂肪食(HFD)を投与して飼育したものを使用。一方、それぞれのメスマダカとペアとなるオスメダカはNCを投与して飼育したもののみを使用。B,C:NC+HFDのメスマダカの体内(B)およびそれぞれの母親から生まれた稚魚の形態(C)。mNCはNCメスマダカから産まれた仔、mHFDはHFDメスマダカから産まれた仔(文献⁸⁾より一部改変転載)。

ダカでは、NC 投与群と比べて肝臓に脂肪が蓄積しており、卵巣も大きくなっていた。そして、それぞれ性成熟後、NC 食で飼育されたオスメダカとペアリングし、産まれたメダカ胚・稚魚を観察した。その結果、さらに、HFD 群のメスマダカと NC 飼育のオスメダカから得られた卵は受精率が低く、発生したとしても尾が曲がるといった発生異常を示すものが多いということが明らかとなった(図 1C)。

そこで、HFD 群のメスマダカから得られる受精卵や卵細胞における遺伝子発現パターンが、NC 群のメスマダカから得られるものと異なるかを RNA-seq により解析した。原腸陷入より前のステージである胞胎期では、HFD 群のメスマダカ由来の卵で遺伝子の転写や翻訳に関わる遺伝子が低下することや、胚性遺伝子の活性化が低下していることが明らかとなった。また、卵細胞では、小胞体ストレスに関わる遺伝子が上がっている一方、卵黄タンパク質をアミノ酸に代謝することに関わる遺伝子や受精後に卵殻を硬化させることに関わる遺伝子の発現が低下することが明らかとなった。

次に卵に含まれる成分について解析を行った。NC 群と HFD 群のメスマダカの卵巣から成熟した卵を取り出し、卵に含まれる水溶性成分と脂溶性成分についてそれぞれ比較した。解糖系やアミノ酸代謝内の代謝産物を対象とした解析においては、アミノ酸の異化により生じるアンモニアを解毒化する代謝経路である尿素回路の代謝産物(オルニチン、シトルリン、クレアチニン、アルギニン)が HFD 群の卵で少なくなっていることが明らかとなった。一方で、脂溶性成分の解析では、トリアシルグリセロールが NC 群と比べて HFD 群で高いことが明らかとなった。

以上の結果から、母親への高脂肪食により、遺伝子発現から卵の成分まで変化し、卵の質が悪くなることが明らかとなってきた。成熟した卵がつくられるには、前述のようにホルモンの作用(内分泌制御)だけでなく、母親由来の RNA 合成や卵黄形成など様々な過程がある。そこでまず内分泌制御への影響を知るために、脳下垂

体で產生され、卵胞成熟に関わる FSH と LH の発現を NC 群と HFD 群のメスマダカで比較したところ、FSH に関してはわずかに増加したもの、大きな違いは見られなかった。一方で、卵巣を薄く切片にし、卵巣内部の形態を観察したところ、HFD 群のメスマダカにおいて卵黄蓄積が少ないものや中身が抜けているような異常な卵胞が多く観察された(図 2, 3)。

つづいて卵黄形成への影響を知るために、肝臓におけるビテロジェニン(卵黄タンパク質の前駆物質)遺伝子の発現を解析したところ、HFD 群のメスマダカでは、NC 群と比較してビテロジェニンの発現が低いことが明らかとなった。また、NC 群と HFD 群の卵に含まれるビテロジェニンのタンパク質の量を解析したところ、卵に含まれるビテロジェニンの量も HFD 群で少ないことが明らかとなった。

以上の結果より、孵化後から高脂肪食を餌として摂取した母親は、①卵巣が肥大して異常な卵細胞を多く形成するようになること、②卵の中に含まれる卵黄タンパク質や尿素回路の代謝産物が低下すること、③発生に重要な遺伝子の低下が見られることが明らかとなり、それらの異常により、卵の死亡率の増加や稚魚の形態異常が起こることが示唆された。哺乳類でも、高脂肪食を母親に投与すると、卵細胞における染色体分裂の異常や胎児の成長が低下するなどの報告がある^{9,10)}。また、ゼブラフィッシュでも、母親を過食により肥満にさせると、稚魚の形態異常が起きることが報告されており¹¹⁾、本研究で

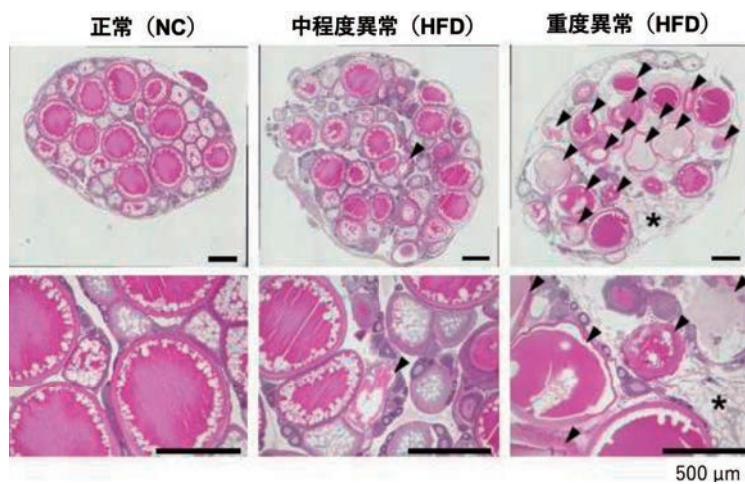


図 2 高脂肪食のメスマダカの卵巣。鏡(やじり)は異常な卵胞を、アスタリスクは脂肪様組織を示す(文献⁸⁾より一部改変転載)。

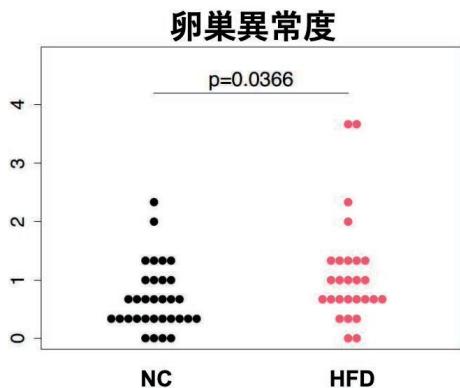


図3 メスメダカの卵巣の異常度。グラフの縦軸は、1:<20%の卵胞が異常, 2:20~50%の卵胞が異常, 3:50~80%の卵胞が異常, 4:>80%の卵胞が異常であることを示す(文献⁸⁾より一部改変転載)。

メダカの卵や稚魚で観察された現象と類似している。したがって、本研究は、母親の高脂肪食摂取や肥満が生まれてくる次世代の仔に与える悪影響について脊椎動物に共通する現象を示したものであると考えられる。

さらに、本研究では、卵の遺伝子発現と卵黄成分、卵黄タンパク質の発現など多角的な解析を行ったことで、母親への高脂肪食投与が卵を介して仔に異常を及ぼすしくみについて以下の仮説を導き出した。メダカに代表される卵生生物は卵黄の中に含まれる卵黄タンパク質を栄養源として発生するが、高脂肪食投与された母親から得られる卵ではその卵黄タンパク質が少なく、アミノ酸に代謝する酵素の発現も少ないとから、胚が充分な栄養(アミノ酸)を利用できないために発生が異常になっている可能性が考えられる。HFD群の卵に含まれるアミノ酸や代謝物の一部が少ないという本研究結果もこの作業仮説を支持するものである。これに加え、高脂肪食投与された母親の卵巣に油滴のような構造が観察されたことや、その母親から得られた卵で脂質の量が増加していたこと、小胞体ストレスに関わる遺伝子が高くなっていたことから、過剰な脂質も卵に悪影響を及ぼしている可能性も考えられる。

以上より、本研究は、母親への高脂肪食投与が次世代の仔に悪影響を及ぼすことを示し、その機構に対する作業仮説を提示した。細かい作用機序を明らかにするにはさらなる解析が必要ではあるが、高脂肪食が引き起こす悪影響について、医学の分野から水産学まで、鍵となる知見となると考えられる。

参考文献

- 1) Jungheim *et al.*, *Endocrinology*, 2010
- 2) Gregorio *et al.*, *Am J Obstet Gynecol*, 2010
- 3) Oben *et al.*, *J Hepatol*, 2010
- 4) Takeda & Shimada, *Annu Rev Genet*, 2010
- 5) Inoue, Suzuki, Kunishima *et al.*, *BMC genomics*, 2023
- 6) Kanda, *Gen Comp Endocrinol*, 2019
- 7) Uehara *et al.*, *Nat Commun*, 2024
- 8) Inoue *et al.*, *Endocrinology*, 2024.
- 9) Rao *et al.*, *Reprod Fertil Dev* 2020
- 10) Han *et al.*, *Nat Genet*, 2018
- 11) Do *et al.*, *Reproduction*, 2020