

魚類肝臓におけるスフィンゴ糖脂質の生理機能解析  
(Physiological functions of fish hepatic glycosphingolipids)

大石 一樹

2021

## 要旨

スフィンゴ糖脂質は、セラミドに糖鎖が結合した分子で、主に細胞膜上に存在し、哺乳類ではシグナル伝達などに関与している。魚類でも脳や肝臓などに存在しているが、これらの臓器でどのような生理的役割を担っているかはわかっていない。そこで本研究では、脳に次いでスフィンゴ糖脂質が多く発現している肝臓での魚類スフィンゴ糖脂質の生理的役割を明らかにすることを目的とした。

まず、絶食時の魚類肝臓におけるスフィンゴ糖脂質の役割を解析した。魚類の重要なエネルギー源である脂質は、肝臓などにトリグリセリド(TG)の形で貯蔵される。この貯蔵脂質は、絶食時に分解され、エネルギー源として消費される。近年、哺乳類では脂質蓄積を制御する様々な分子が報告されているが、魚類ではどのような分子が脂質蓄積の制御を担っているのかは明らかになっていない。そこで、哺乳類肝臓で TG 蓄積の制御因子として報告されているガングリオシドに注目した。メダカを用いた解析から、絶食により TG 分解が起きている肝臓では、ガングリオシド脱シアリル化を担っている *neu3a* の発現が増加していた。そこで、魚類培養細胞を用いてガングリオシド脱シアリル化が脂質代謝に与える影響を検討したところ、魚類 Neu3 によるガングリオシド脱シアリル化によって蓄積したラクトシルセラミド(LacCer)が、リパーゼの活性化を誘導することで TG 分解を促進していることが示唆された。

次に、*Edwardsiella tarda* 感染における魚類スフィンゴ糖脂質の役割を検討した。*E. tarda* は細胞表面の膜マイクロドメインを介して宿主細胞内に侵入するが、侵入に関与する宿主側の分子については明らかになっていない。そこで、膜マイクロドメインに多く存在するスフィンゴ糖脂質に着目した。メダカを用いた解析から、*E. tarda* 感染魚の肝臓ではスフィンゴ糖脂質合成が抑制されており、スフィンゴ糖脂質が感染に関与していることが示唆された。そこで、魚類培養細胞を用いてスフィンゴ糖脂質が *E. tarda* 感染に与える影響を調べたところ、*E. tarda* 感受性が高い細胞では LacCer 含有量が高いことがわかった。さらに、LacCer の蓄積を誘導した細胞では *E. tarda* 感染が促進され、糖脂質合成を阻害した細胞では感染が抑制されたことから、LacCer が *E. tarda* 感染に影響していることが示唆された。そこで、その作用機序を明らかにするため、*E. tarda* への LacCer 曝露を行い、その性状変化を観察した。その結果、*E. tarda* が LacCer と結合することで細胞への感染が阻害され、感染時の足場として LacCer を利用していることが示唆された。

以上の結果から、スフィンゴ糖脂質の 1 つである LacCer が、魚類肝臓においてエネルギー代謝や免疫の機能を制御する重要な分子であることが明らかになった。

## Abstract

Glycosphingolipids (GSLs) are mainly expressed on cell surface. In mammals, GSLs are involved in various physiological roles. Although GSLs express in fish tissues, the physiological roles of fish GSLs remain unclear. Here, the present study focused on the effect of fish hepatic GSL in metabolism and bacterial infection.

Fish liver play various physiological roles such as lipid metabolism and detoxification. Fish store triglyceride (TG) in the liver and adipose tissue, and TG is consumed as an energy source upon metabolic demand. Alteration of GSL composition affect lipid metabolism in mammalian liver, while it is unclear whether similar mechanism exist in fish liver. First, this study aimed to clarify whether the alteration of ganglioside composition affects lipid metabolism of fish hepatocyte. To elucidate how lipid metabolism is associated with fasting in medaka liver, the biological parameters and *neu3a* expression were estimated. As a result, *neu3a* level was significantly up-regulated in the liver accompanied by the decrease of TG content. Next, to determine the role of Neu3a in hepatic lipid metabolism, Neu3a stable transfectants were generated using fish liver Hepa-T1 cells. Oleic acid exposure to Neu3a cells resulted in the reduction of TG and increase of free fatty acid and diacylglycerol in comparison with mock cells. Furthermore, lipase activities induced by oleic acid treatment were higher in Neu3a cells than in mock. To examine which gangliosides were related to these events, ganglioside composition of Neu3a cells were analyzed by thin layer chromatography (TLC). Neu3a cells showed accumulation of lactosylceramide (LacCer). In addition, exposure of

LacCer toward Hepa-T1 cells resulted in an increase of lipase activity. These results suggest that Neu3a up-regulation in medaka under fasting condition promotes hepatic TG degradation for energy production via LacCer accumulation.

The present study has also revealed that LacCer was involved in *Edwardsiella tarda* infection. Previous studies indicate that *E. tarda* invade to host cell via membrane microdomain, but the mechanisms have been unclear. First, the present study examined whether the GSL composition was involved in the *E. tarda* infection. Intraperitoneal injection of *E. tarda* reduced medaka hepatic glucosylceramide (GlcCer) levels accompanied by the decrease of GlcCer and GM3 synthase mRNA levels. These results suggested that host GSL may be involved in *E. tarda* infection. Next, the significance of GSL in *E. tarda* infection was examined using fish cultured cells, DIT29 with high amount of LacCer and GlcCer and GAKS with low amount of these GSLs. Disruption of the membrane microdomain affected the susceptible of DIT29 cells to *E. tarda*, suggesting that the involvement of microdomain LacCer and GlcCer in the infection. In addition, incubation with the GSL synthase inhibitor suppressed *E. tarda* infection in DIT29 cells, and Neu3-overexpressing GAKS cells, which accumulated LacCer, elevated the infection. Furthermore, incubating *E. tarda* with LacCer, but not GlcCer, suppressed subsequent cell invasion in DIT29 cells. Thus, LacCer may be a positive regulator of *E. tarda* infection. These results indicate that LacCer is an important regulator of lipid metabolism and bacterial infection in fish liver.

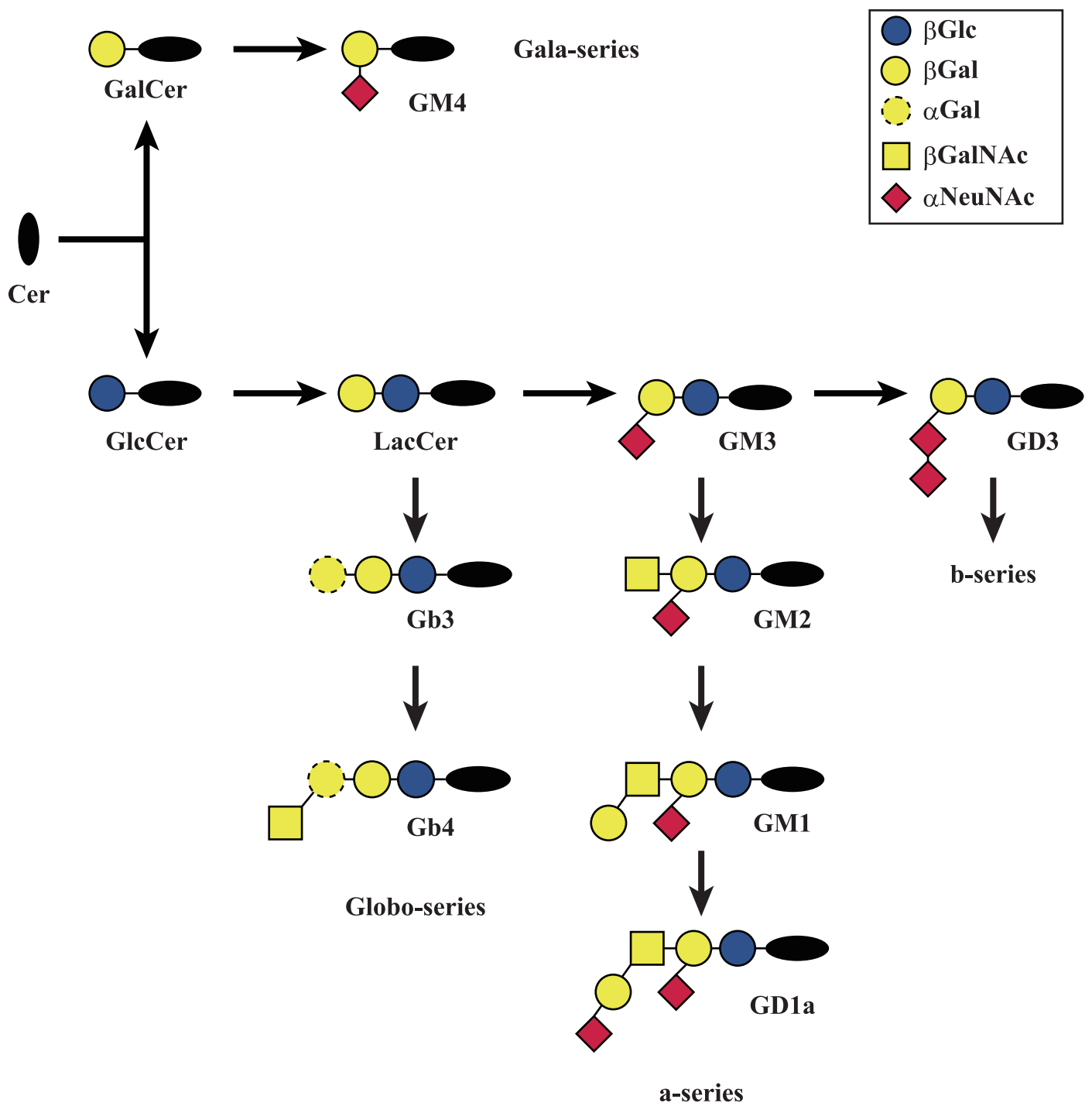


図 スフィンゴ糖脂質合成系

# 略語一覧

DAG: ジアシルグリセロール

DL-PPMP: DL-threo-1-phenyl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol

FFA: 遊離脂肪酸

GalCer: ガラクトシルセラミド

GlcCer: グルコシルセラミド

LacCer: ラクトシルセラミド

MBCD: メチル- $\beta$ -シクロデキストリン

MOI: Multiplicity of infection

*st3gal5*: GM3 合成酵素

TG: トリグリセリド

TLC: 薄層クロマトグラフィー

*ugcg*: グルコシルセラミド合成酵素

# 目次

1	イントロダクション	1
2	スフィンゴ糖脂質組成の変化が魚類肝臓の脂質代謝に与える影響	7
2-1	緒言	8
2-2	実験方法	12
2-2-1	メダカ絶食試験	
2-2-2	絶食条件下での脂質代謝関連遺伝子およびメダカ <i>neu3a</i> 遺伝子の発現量解析	
2-2-3	メダカ <i>neu3a</i> の 5' RACE	
2-2-4	メダカ Neu3a 安定発現細胞の作製	
2-2-5	メダカ Neu3a 安定発現細胞の酵素活性測定	
2-2-6	メダカ Neu3a の細胞内局在解析	
2-2-7	脂肪酸曝露実験	
2-2-8	メダカ Neu3a 安定発現細胞のリパーゼ活性測定	
2-2-9	メダカ Neu3a 安定発現細胞のスフィンゴ糖脂質組成の解析	
2-2-10	ラクトシルセラミド曝露細胞のリパーゼ活性測定	
2-2-11	統計処理	
2-3	結果	20
2-3-1	メダカ絶食試験	
2-3-2	絶食メダカ肝臓における <i>neu3a</i> および脂質代謝関連遺伝子の発現量解析	
2-3-3	メダカ <i>neu3a</i> の転写因子結合配列の解析	
2-3-4	メダカ Neu3a 安定発現細胞へのオレイン酸曝露実験	
2-3-5	Hepa-T1 細胞への LacCer 曝露実験	
2-4	考察	26



3 宿主スフィンゴ糖脂質が <i>Edwardsiella tarda</i> 感染に与える影響	37
3-1 緒言	38
3-2 実験方法	41
3-2-1 <i>E. tarda</i> の培養条件	
3-2-2 メダカを用いた <i>E. tarda</i> 感染実験	
3-2-3 <i>E. tarda</i> 感染時のメダカスフィンゴ糖脂質代謝関連遺伝子発現量解析	
3-2-4 魚類培養細胞を用いた <i>E. tarda</i> 感染実験	
3-2-5 ティラピア Neu3a の酵素活性測定	
3-2-6 メダカ肝臓および魚類培養細胞のスフィンゴ糖脂質組成の解析	
3-2-7 <i>E. tarda</i> のスフィンゴ糖脂質結合能の評価	
3-2-8 統計処理	
3-3 結果	46
3-3-1 <i>E. tarda</i> 感染メダカ肝臓および脾臓における遺伝子発現量解析	
3-3-2 <i>E. tarda</i> 感染メダカ肝臓および脾臓のスフィンゴ糖脂質組成の解析	
3-3-3 魚類培養細胞を用いた <i>E. tarda</i> 感染実験	
3-3-4 スフィンゴ糖脂質組成を変化させた魚類培養細胞を用いた <i>E. tarda</i> 感染実験	
3-3-5 LacCer および GlcCer の <i>E. tarda</i> への毒性	
3-3-6 <i>E. tarda</i> の糖脂質結合能の評価	
3-4 考察	52
4 総合考察	64
謝辞	71
参考文献	72

# 1 イントロダクション

## 1 イントロダクション

スフィンゴ糖脂質は、セラミドにグルコースやガラクトース、シアル酸などの糖が鎖状に結合した分子であり、セラミド部分を細胞膜中に埋め込み、糖鎖部分を細胞外に露出した状態で細胞膜上に存在している。その糖鎖部分の構造は多様性に富み、その構造に基づいてガラ系列やグロボ系列、ガングリオ系列などのいくつかのグループに分類されている。スフィンゴ糖脂質の糖鎖は、糖鎖合成酵素による糖分子の付加と糖鎖分解酵素による糖鎖からの糖分子の遊離によって制御されている。スフィンゴ糖脂質の合成系は、小胞体におけるセラミドへの糖分子の付加が起点となる。例えば、UDP-glucose ceramide glucosyltransferase によりセラミドへグルコースが付加されるとグルコシルセラミド(GlcCer)が産生する。このGlcCer にさらにガラクトースが付加されることでラクトシルセラミド(LacCer)となる。このLacCer は、グロボ系列やガングリオ系列など様々な系列のスフィンゴ糖脂質の前駆体となる(Ichikawa et al., 1998; Lingwood, 2011; Yu et al., 2011)。スフィンゴ糖脂質の分解は、エキソ型グリコシダーゼによる糖鎖非還元末端からの糖分子の遊離が初発反応となり、順次加水分解されていく。ガングリオシドの場合は、シアル酸が糖鎖非還元末端から遊離することが糖鎖分解の初発反応となり、この反応はシアリダーゼ Neu3 が担っている(Papini et al., 2004; Miyagi, 2010)。これらの合成/分解酵素のはたらきにより、細胞膜上には多様な糖鎖構造を有するスフィンゴ糖脂質が出現する。

このスフィンゴ糖脂質の多様な糖鎖構造は、その生理機能に深く影響していることが嘔

乳類で明らかになってきた。例えば、スフィンゴ糖脂質組成の変化が肝臓や脂肪組織における代謝制御に影響することが報告されている(Tagami et al., 2002; Sasaki et al., 2003; Yamaguchi et al., 2011)。ob/ob マウスや Zucker/fa/fa ラットといった肥満モデル動物の脂肪組織では GM3 ガングリオシドの蓄積が認められている(Tagami et al., 2002)。また、GM3 ガングリオシドの増加は、ヒト肝細胞においてアポリポタンパク質 B-100 の分泌を阻害し、GD3 ガングリオシドが増加すると反対にミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質の遺伝子発現を増加させ、アポリポタンパク質 B-100 の分泌が促進される(Kang et al., 2007; Choi et al., 2017)。このように、スフィンゴ糖脂質組成の変化は肝臓や脂肪組織の脂質代謝に影響を与え、肥満などの脂質代謝異常疾患を引き起こすことが示唆されている。

また、代謝制御だけでなくウイルスや細菌の感染にもスフィンゴ糖脂質は関与している。ウイルスや細菌が宿主細胞の特定のスフィンゴ糖脂質を認識し、接着することが感染の引き金となる(Heung et al., 2006; Kunz and Kozjak-Pavlovic, 2019)。例として、胃潰瘍などの原因菌である *Helicobacter pylori* は、LacCer を感染時の足場として利用することが知られる(Ångström et al., 1998)。また、*Escherichia coli* は、*H. pylori* と同様に宿主の小腸上皮に分布している LacCer を感染時の足場とするが、Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ Cer 構造を持つ他のスフィンゴ糖脂質も認識し、接着することができる(Teneberg et al., 2004)。さらに、細菌が分泌する毒素の中にもスフィンゴ糖脂質を受容体とするものがいくつか存在する。その1つが、コレラトキシンである。コレラトキシンは、毒素活性を有する A サブユニットと宿主細胞への毒素輸送に関

与する B サブユニットから構成されている。その B サブユニットが、宿主の小腸上皮細胞に存在している GM1 ガングリオシドと結合することで、コレラトキシンが細胞内へと取り込まれ、その毒性が発揮される(Holmgren et al., 1975)。これらのことから、宿主スフィンゴ糖脂質と細菌の相互作用を理解することは、細菌の感染制御の観点から重要である。

このように哺乳類ではスフィンゴ糖脂質の生理機能に関する知見が蓄積されつつあるが、哺乳類以外の脊椎動物におけるスフィンゴ糖脂質に関する解析はほとんど行われておらず、その生理機能に関する知見は乏しい。魚類では、哺乳類と同様に脳におけるスフィンゴ糖脂質の発現量が他の組織に比べて高いことや、脳以外にも肝臓など様々な組織で発現していることが明らかになっているが、その生理機能についてはほとんど解析が行われていない(Ostrander et al., 1991; Hildebrandt et al., 1999; Tanaka and Okamura, 1999; Saito et al., 2001; Duan et al., 2010; Yamakawa et al., 2018)。哺乳類で得られている知見を踏まえると、魚類においてもスフィンゴ糖脂質は魚病細菌の感染制御や栄養代謝などに関与していることが推測される。また、淡水域に棲息するシクリッド *Oreochromis mossambicus* や沿岸に生息しているマアジ *Trachurus japonicus* などのように肝臓の GM3 含量が高い魚種もいれば、外洋を回遊しているカツオ *Katsuwonus pelamis* やマサバ *Scomber japonicus* などのように GM4 含量が高い魚種もあり(Hildebrandt et al., 1999; Saito et al., 2001)、棲息環境や様式に適応して組織のスフィンゴ糖脂質組成を変化させている可能性が推測されるが、この違いがどのような生理的意味を持つのかについても現在のところよくわかっていない。

そこで本研究では、魚類スフィンゴ糖脂質の生理的意義を明らかにすることを目的として、脳に次いでスフィンゴ糖脂質の発現が高い肝臓に注目して解析を行った。肝臓は魚類の主な脂質蓄積部位であり(Ando and Mori 1993; Weil et al., 2013; Kaneko et al., 2016a)、貯蔵されたトリグリセリド(TG)は栄養状態の悪化に伴いエネルギー源として動員される(Han et al., 2011; Kaneko et al., 2016b)。ニジマス *Oncorhynchus mykiss* やヨーロッパヘダイ *Sparus auratus*、ティラピア *Oreochromis niloticus* などの飼育実験から、絶食時に成長ホルモン(GH)が脂質蓄積部位に作用することで、脂質動員の引き金になることがわかっているが(Bergan et al., 2015; Vélez et al., 2019)、GH 以外にも脂質代謝の制御に関与している分子の存在が示唆されている。哺乳類では、スフィンゴ糖脂質の1つであるガングリオシドが、脂質代謝の制御を担っていることが報告されている(Tagami et al., 2002; Sasaki et al., 2003; Kang et al., 2007; Yamauchi et al., 2011; Choi et al., 2017)。そこで2章では、魚類ガングリオシドに着目し、絶食時の肝臓におけるエネルギー代謝にスフィンゴ糖脂質が与える影響を検討した。続いて、3章では、養殖魚に甚大な被害を与えているエドワジエラ症に着目した。エドワジエラ症の原因菌である *Edwardsiella tarda* は自身の NanA シアリダーゼにより、宿主細胞の細胞表面に発現している N 型糖タンパク質の糖鎖末端からシアル酸を遊離することで宿主細胞に接近する。その後、シアル酸の遊離によって露出したマンノースおよび N-アセチルグルコサミンといった糖を介して宿主細胞内へと侵入する(Chigwechokha et al., 2015)。しかし、単に *E. tarda* NanA シアリダーゼの酵素活性を阻害しただけでは、宿主細胞への *E. tarda* 感染は完全には

抑制することはできないことから(Chigwechokha et al., 2015; Shinyoshi et al., 2017)、糖タンパク質以外にも感染に関与している分子が膜マイクロドメインに存在していることが予想された。膜マイクロドメインには、スフィンゴ糖脂質が凝集し、クラスターを形成している。スフィンゴ糖脂質は、細菌や毒素の受容体として利用されることから、*E. tarda* も膜マイクロドメイン中のスフィンゴ糖脂質を感染に利用している可能性があり、その役割について解析を行った。4章では、脂質代謝および感染という現象から見えてきた魚類スフィンゴ糖脂質の生理的意義について総合的に考察した。

## 2 スフィンゴ糖脂質組成の変化が魚類肝臓の 脂質代謝に与える影響



## 2-1 緒言

肝臓は魚類の主な脂質蓄積部位であり、貯蔵されたトリグリセリド(TG)は栄養状態の悪化に伴いエネルギー源として動員される。天然水域に棲息する魚類では、産卵や回遊時に絶食期間が発生する。また、養殖魚においても赤潮や魚病の発生時には、被害拡大防止のための餌止めにより短期から長期の絶食に晒される。このような条件下において、魚類は体内に蓄えたエネルギー物質を消費することによって生命活動を維持している。魚類は哺乳類に比べて脂質へのエネルギー依存度が高く、絶食条件下において哺乳類ではグリコーゲンがエネルギー物質として動員されるのに対して、ニジマス *Oncorhynchus mykiss* やギベリオブナ *Carassius auratus* などの複数の魚種が、脂質を絶食時のエネルギー源として利用している (Ince and Thorpe 1976; Méndez and Wieser 1993; Colins and Anderson 1995; Bergan et al., 2012; Li et al., 2018)。魚類では、食餌によって取り込まれた大部分の脂質は、直ちにエネルギーに変換されて消費される。余剰な脂質は、体内の脂質蓄積部位である肝臓や骨格筋、脂肪組織などに TG の形で貯蔵される (Ando and Mori 1993; Weil et al., 2013; Kaneko et al., 2016a)。そして、絶食により栄養状態が悪化した際に、肝臓などの脂質蓄積部位に貯蔵してある TG を分解し、エネルギー源として利用している。実際に、マダイ *Pagrus major* やティラピア *Oreochromis niloticus* では絶食により脂質蓄積部位である肝臓から筋肉に脂質が移動することおよび肝臓や脂肪組織においてリパーゼ活性が上昇することが報告されている (Han et al., 2011; Kaneko et al., 2016b)。この絶食時の脂質動員は、成長ホルモン(GH)が引き金になって

いることがわかっている(Bergan-Roller and Sheridan, 2018)。しかし、その詳細なメカニズムについては不明な点が多く、GH 以外にも脂質蓄積を制御する分子の存在が示唆されている。

そこで本研究では、ガングリオシドに注目した。ガングリオシドは主に細胞表面に存在しているスフィンゴ糖脂質の 1 種で、哺乳類では、細胞増殖(Hakomori and Igarashi 1995)や細胞間相互作用(Zeller and Marchase 1992)、シグナル伝達(Takahashi et al., 2017)など様々な現象に関与している。さらに、脂質代謝にも関与していることが哺乳類で報告されている。例えば、ヒトメラノーマ細胞では、GD3 ガングリオシドが増加すると lipogenic phenotype が悪化すること(Yamaguchi et al., 2011) や、GM3 ガングリオシド含量の変化がアテローム性動脈硬化症(Garner et al., 2002)や糖尿病(Tagami et al., 2002)、肥満(Nagafuku et al., 2015 ; Inamori et al., 2018)といった疾患の発症に関与することが報告されている。さらに、GM3 が増加するとヒト肝細胞でのアポリポタンパク質 B-100 の分泌が阻害され、GD3 が増加すると反対にアポリポタンパク質 B-100 の分泌が促進される(Kang et al., 2007; Choi et al., 2017)。これらのことから、ガングリオシド量または組成の変化がヒトでの脂質代謝制御において重要な役割を担っていることが示唆される。魚類の肝臓にもガングリオシドは存在しており(Ostrander et al., 1988, 1991; Hildebrandt et al., 1999; Saito et al., 2001)、ヒトでの報告と同様に魚類でも肝臓のガングリオシド量や組成が変化することで脂質代謝が影響を受けることが予想されるが、ガングリオシド組成が魚種によって異なっており、魚類独自のメカニズムが存在することが予想された。

ガングリオシドの質的・量的制御は、ガングリオ系列の合成の起点となる GM3 合成酵素 ST3  $\beta$ -galactoside  $\alpha$  -2,3-sialyltransferase 5 とガングリオシド脱シアリル化酵素 Neu3 によって制御されている。これまでの報告から、肥満モデルである Zucker *fafa* ラットや *ob/ob* マウスの脂肪組織では GM3 合成酵素の発現が高く (Tagami et al., 2002)、肥満モデルマウス KKAY で GM3 合成酵素を欠損させると体重増加の抑制や血中 TG 量の減少など肥満症状の改善が見られるなど (Inamori et al., 2018)、GM3 合成酵素は脂肪組織の脂質代謝において重要な役割を担っている。その一方で、ヒト *NEU3* トランスジェニックマウスの肝臓では TG の蓄積が増加すること (Yoshizumi et al., 2007) が報告されている。また、HIF-2 $\alpha$  によって *NEU3* の発現が促進され、それにより蓄積したセラミドがヒト肝臓において非アルコール性脂肪肝を誘導すること (Xie et al., 2017) が報告されている。これらの報告から、GM3 合成酵素は脂肪組織における脂質代謝の制御を担っており、肝臓における脂質代謝の制御は主に Neu3 が担っていることが推測された。そのため、本研究では Neu3 に着目して魚類肝臓の脂質代謝に与える影響を検討した。これまでに魚類では、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* (Manzoni et al., 2007, Shiozaki et al., 2020)、メダカ *Oryzias latipes* (Shiozaki et al., 2013)、ナイルティラピア *O. niloticus* (Chigwechokha et al., 2014)、ニホンウナギ *Anguilla japonica*、スポットテッドガー *Lepisosteus oculatus*、カンパチ *Seriola dumerili* (Shiozaki et al., 2020) の 6 種で Neu3 遺伝子のクローニングが完了している。これらの魚類 Neu3 は細胞膜に局在を示すとされ、GD1a や GD3、GM3 といったガングリオシドを良い基質とするなど (Shiozaki et al., 2013; Chigwechokha et al.,

2015; Shiozaki et al., 2020) 哺乳類 Neu3 と類似の酵素学的性状を示すことから、哺乳類 Neu3 と同様に魚類 Neu3 も肝臓での脂質代謝の制御に関与していることが予想された。

そこで本章では、魚類 Neu3 によるガングリオシド組成の変化が肝臓の脂質代謝に影響する可能性についてメダカを用いて検討を行った。メダカはゲノム情報が明らかになっており、遺伝子発現の解析を行うのに適している。また、小型魚類であるため限られたスペースで多くの個体を用いて飼育実験を行うことが可能である。まず、絶食メダカの肝臓を用いて *neu3a* および脂質代謝関連遺伝子群の発現量の変化を real-time PCR を用いて解析した。その後、メダカ Neu3a 安定発現細胞を作製し、スフィンゴ糖脂質組成の変化が脂質代謝へ与える影響について解析した。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 メダカ絶食試験

試験は市販のヒメダカを用いて行った。明期 14 時間、暗期 10 時間、止水、25°C で 1 週間馴致を行った後、試験に供した。馴致期間中は 1 日 2 回、オトヒメ B2 (日清丸紅飼料株式会社) を与えた。

絶食試験は、3 L の飼育水槽を用いて行った。水槽にヒメダカ(0.12±0.02 g) を 6 匹ずつ移し、絶食 0、3、5、および 7 日目に水槽から取り上げ、氷上にて解剖し、肝臓を摘出した。取り出した肝臓は直ちに-80°C の冷凍庫に移し、解析まで保管した。

### 2-2-2 絶食条件下での脂質代謝関連遺伝子およびメダカ *neu3a* 遺伝子の発現量解析

Sepasol-RNA Super G (ナカライテスク株式会社) を用いて Total RNA を抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡株式会社) を用いて逆転写を行った。得られた cDNA を用いて、メダカ *neu3a* および脂質代謝関連遺伝子(*lpl* [lipoprotein lipase]、*ppara* [peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$ ]、*cpt1* [carnitine *O*-palmitoyltransferase 1]、*fasn* [fatty acid synthase]、*dgat2* [diacylglycerol *O*-acyltransferase 2]、*srebf1* [sterol regulatory element binding transcription factor 1]) の mRNA 発現量を定量した。解析には、KOD SYBR qPCR Mix (東洋紡株式会社) および StepOne Real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いた。*neu3a*、*lpl*、*ppara*、*cpt1*、*fasn*、*dgat2*、および *actb* [ $\beta$ -actin] の PCR 条件は、98°C で 2 分間初期変性

後、98°C, 10 秒、60°C, 10 秒、68°C, 30 秒を 40 サイクルとした。*srebfl*、および *actb* の PCR 条件は、98°C で 2 分間初期変性後、98°C, 10 秒、68°C, 30 秒を 40 サイクルとした。本解析で用いたプライマーセットを Table 2-1 に示す。なお、*pparg* は Kondo ら(2010)、*lpl* は Wang ら(2015)のプライマーセットを用いた。また、*actb* を内部標準遺伝子として用いた。

### 2-2-3 メダカ *neu3a* の 5' RACE

2-2-2 と同様の方法で、近交系メダカ Hd-rRII の受精後 5 日目の卵 10 個を用いて Total RNA を調製した。DNase 処理により Total RNA 溶液中のゲノム DNA を取り除き、フェノール抽出により RNA の回収を行った。逆転写は、PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ株式会社)を用いて行った。*neu3a* mRNA の逆転写は、リン酸化処理をしたプライマー 5'-CACATCGTTAAGGG-3'を用いた。逆転写反応は、42°C, 15 分、85°C, 5 秒で行った。反応後、*Escherichia coli* RNase H を加えて RNA を除き、Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (タカラバイオ株式会社)を用いて 5'末端の Poly A tailing を行った。

1st PCR は、得られた dA-tailed cDNA を鋳型にし、KOD-Plus Neo (東洋紡株式会社)を用いて行った。PCR 条件は、94°C で 2 分間初期変性後、98°C, 10 秒、61°C, 30 秒、68°C, 5 分を 35 サイクル行った。用いたプライマーは以下に示すとおりである。

Oligo dT-Anchor primer      5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTAA-3'  
  
5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTC-3'

5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTG-3'

*neu3a* specific primer      5'-GACCACGCGTATCGATGTC-3'

2nd PCR は、1st PCR の増幅産物を鋳型にして行った。プライマーは、プライマー1: 5'-TTCATGGTGCGATGGTTTGGCA-3' とプライマー2: 5'-GACCACGCGTATCGATGTC-3' を用いた。プライマー1 は、メダカ *neu3a* の open reading frame のうち開始コドンから 260–281 番目の塩基と相補的に結合するように設計し、プライマー2 は Oligo dT-Anchor primer で付加した配列と相補的に結合するように設計した。PCR 条件は、94°C で 2 分間初期変性後、98°C, 10 秒、64°C, 30 秒、68°C, 5 分を 35 サイクルとした。得られた PCR 産物のシーケンスは ABI3130xl (Applied Biosystem) にて解析した。その後、得られた配列情報を基に Ensembl genome browser (<https://asia.ensembl.org/index.html>) を用いて、メダカ *neu3a* の転写開始点 5' 上流部の配列を決定した。さらに、予想転写因子結合部位の解析は、転写開始点から約 2,300 bp 上流までの配列を対象に TFBIND (<http://tfbind.hgc.jp/>) を用いて行った。

#### 2-2-4 メダカ Neu3a 安定発現細胞の作製

魚類肝臓の *in vitro* モデルとしてウナギ肝臓由来細胞 Hepa-T1 を用いた。Hepa-T1 細胞は 10% 牛胎児血清(FBS) を添加した E-RDF 培地(極東製薬工業株式会社) を用いて、28°C、大気条件下で培養した。

pcDNA3.1 および pcDNA3.1 メダカ Neu3a-HA 発現プラスミド DNA (Shiozaki et al., 2013)

のトランスフェクションは、X-treme GENE HP DNA transfection reagent (Roche)を用いた。

*neu3a* 遺伝子安定発現細胞は、0.4 mg/mL G418 にて選抜した。

#### 2-2-5 メダカ Neu3a 安定発現細胞の酵素活性測定

安定発現細胞の Neu3a シアリダーゼ活性測定には、細胞ホモジネートを用いた。細胞ペレットに Homogenate Buffer (10 µg/mL ロイペプチン、0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、1 mM EDTA in PBS)を加えてホモジナイズした後、600 g、4°C で 5 分間遠心分離を行い、得られた上清をホモジネートとした。タンパク質濃度はプロテインアッセイ CBB 溶液を用いて測定した。

得られたホモジネートを、50 mM 酢酸ナトリウム Buffer (pH 4.2)、0.1% Triton X-100 存在下において 37°C で 1 時間反応させた。また、基質として mix ganglioside を終濃度で 0.5 mg/mL になるように加えた。遊離シアル酸量は、マロノニトリル誘導体化法を用いて測定した(Li, 1992)。酵素反応後、反応液を 125 mM 四ホウ酸 Buffer (pH 9.5)および 0.09%マロノニトリル存在下で 80°C で 20 分間反応させ、シアル酸の誘導体化を行った。遊離シアル酸量は HPLC を用いて測定した。移動相は 0.01 M 酢酸アンモニウム (pH5.5)/メタノール=85:15 とし、カラムは 5C<sub>18</sub>-MS-II (4.6 mm I.D.×150 mm)を用い、励起波長 357 nm、蛍光波長 434 nm、流速 1.0 mL/min で測定を行った。

シアリダーゼ活性は以下のように定義した。



シアリダーゼ活性(nmol/h/mg protein) =遊離シアル酸量(nmol)/反応時間(h)/タンパク質量(mg)

#### 2-2-6 メダカ Neu3a の細胞内局在解析

Neu3a 安定発現細胞におけるメダカ Neu3a の細胞内局在は、間接蛍光抗体法を用いて解析した。4% paraformaldehyde (PFA)/PBS を加えて細胞を固定後、0.1% Triton X-100/PBS を加えて膜透過処理を行った。その後、1% BSA/PBS を加えてブロッキング処理を行った。一次抗体は anti-HA (3F10; Roche)を、二次抗体は Alexa Fluor-555 goat anti-rat IgG (Cell Signaling Technology)を用いた。染色標本の観察にはセクション顕微鏡 Axio Imager.M2 (Carl Zeiss)を用いた。また、セクション画像の取得には、イメージングシステム ApoTome (Carl Zeiss)を用いた。

#### 2-2-7 脂肪酸曝露実験

細胞への脂肪酸曝露は以下のように行った。Neu3a 安定発現細胞を血清飢餓条件で 16 時間培養後、1 mM オレイン酸/E-RDF (1% BSA)培地で 9 時間培養した。その後、2-2-5 と同様の方法でホモジネートを調製した。

総脂質の抽出は以下の方法で行った。ホモジネート(タンパク質 100  $\mu$ g 当量)とクロロホルム/メタノール(C:M)=2:1 を混合し、超音波処理を行った。その後、1,970 g、室温で 10 分間遠心分離を行い、上清を回収した。得られた上清をエバポレーターで乾固させ、10% Triton

X-100/2-プロパノールに溶解させた。TG 量はトリグリセライド E-テストワコー(富士フィルム和光純薬株式会社)を用いて測定した。

脂質組成の分析は薄層クロマトグラフィーを用いて行った。上記と同様の方法で抽出した総脂質を、乾固後、[C:M]=2:1 に溶解させた。得られたサンプルをガラスプレートに添加し、展開溶媒(ヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸=80:20:1)を充満させた展開槽にプレートを入れて展開させた。その後、プレートを乾燥させ、3%硫酸銅/15%リン酸を吹き付け、100°C でバンドが現れるまで加熱した。バンドの定量は、解析ソフト Quantity one (Bio-rad)を用いた。

細胞内の脂肪滴の観察は、Nile Red (MP Biomedical)を用いて行った。オレイン酸曝露後の細胞を 4% PFA/PBS で固定し、0.2 µg/mL Nile Red/PBS を加えて脂肪滴の染色を行った。その後、PBS で染色液を洗い流し、2-2-6 と同様の方法で観察を行った。脂肪滴の大きさは ImageJ (National Institutes of Health)を用いて定量した。

#### 2-2-8 メダカ Neu3a 安定発現細胞のリパーゼ活性測定

Neu3a 安定発現細胞を血清飢餓条件で 16 時間培養後、1 mM オレイン酸/E-RDF (1% BSA) 培地で 9 時間培養した。ライセートの調製は、Watanabe ら(2017)の方法を参照して行った。細胞ペレットに Lysis Buffer (50 mM HEPES (pH 7.5)、150 mM 塩化ナトリウム、1% NP-40、2 mM EDTA、0.2 mM PMSF、10 µg/mL ロイペプチン、10 mM フッ化ナトリウム、2 mM オルトバナジン酸ナトリウム、0.25%デオキシコール酸ナトリウム)を加えて、氷上で 15 分間

インキュベートした。その後、13,200 g、4°C で 5 分間遠心分離を行い、得られた上清をライセートとした。タンパク質濃度の測定は、2-2-5 と同様にブラッドフォード法を用いて測定した。

得られたライセート(タンパク質 50 µg 当量)と 100 mM Tris-HCl (pH 7.5)、20 µM 4-methylumbelliferyl palmitate (4MU-palmitate)を混合し、37°C で 1 時間反応させた。遊離した 4MU 量はマイクロプレートリーダー(Thermo Fisher scientific)を用い、励起波長 355 nm、蛍光波長 460 nm の条件で測定した。リパーゼ活性は以下のように定義した。

リパーゼ活性(nmol/h/mg protein) = 遊離 4MU 量(nmol)/反応時間(h)/タンパク質量(mg)

#### 2-2-9 メダカ Neu3a 安定発現細胞のスフィンゴ糖脂質組成の解析

細胞ペレットに 2-プロパノール/ヘキサン/水=55:25:20 を加えてよく懸濁し、超音波処理を行った。その後、1,970 g、室温で 10 分間遠心分離を行い、上清を回収した。得られた上清はエバポレーターで乾固させた。乾固後、0.1 M NaOH/メタノールを加え、40°C で 2 時間反応させてけん化処理を行った。脱塩処理は Sep-Pak C18 カートリッジ (ジールサイエンス株式会社)を用いて行った。サンプルはメタノールおよび[C:M]=2:1 を用いて溶出させた。その後、遠心エバポレーターで乾固させ、[C:M]=1:1 に溶解させた。得られたサンプルをガラスプレートに添加し、展開溶媒(クロロホルム/メタノール/0.5% CaCl<sub>2</sub>=60:40:9)を充滿させた展開槽にプレートを入れて展開させた。その後、プレートを乾燥させ、0.5%オルシノール

1/2N 硫酸を吹き付け、110°C でバンドが現れるまで加熱した。バンドの定量は、解析ソフト Quantity one を用いて行った。

#### 2-2-10 ラクトシルセラミド曝露細胞のリパーゼ活性測定

Hepa-T1 細胞に、1  $\mu$ M LacCer/E-RDF (FBS-)を 16 時間曝露した。その後、PBS で洗浄し、1 mM オレイン酸/E-RDF (1% BSA)培地で 9 時間培養した。その後、2-2-8 と同様の方法でリパーゼ活性の測定を行った。

#### 2-2-11 統計処理

すべての統計処理は FreeJSTAT (<http://toukeijstat.web.fc2.com/>)を用いて行った。2 群間の比較には、対応のない *t* 検定を、3 群以上の比較は Tukey 検定をそれぞれ用いた。

## 2-3 結果

### 2-3-1 メダカ絶食試験

絶食がメダカ魚体へ与えた影響を調べるために、7日間絶食させたメダカから肝臓を取り出し、魚体重、肝臓重量および肝臓中の TG 量の測定を行った。その結果、7日間の絶食期間中の魚体重の変化は認められなかった(Fig. 2-1A)。その一方で、肝臓重量および肝臓中の TG 量は、0日目と比較してともに約 50%減少しており(各  $p < 0.05$ ; Fig. 2-1B and C)、絶食期間中に肝臓の TG がエネルギー源として利用されたことが推察された。

### 2-3-2 絶食メダカ肝臓における *neu3a* および脂質代謝関連遺伝子の発現量解析

絶食状態の肝臓での脂質代謝の状態を評価するため、脂質代謝関連遺伝子(*lpl*、*ppara*、*cpt1*、*srebfl*、*fasn*、および *dgat2*)の発現量を real-time PCR で解析した。絶食 3 日目の時点では、0日目と比較していずれの遺伝子の発現量にも大きな変化は認められなかった(Fig. 2-2A-F)。しかし、絶食 5 日目には、血中を循環しているリポタンパク質中の TG をグリセリンと遊離脂肪酸に分解し、肝臓への遊離脂肪酸の取り込みに関与している *lpl* の mRNA 発現量が、絶食試験開始時と比較して約 60%減少していた( $p < 0.05$ ; Fig. 2-2A)。このことから、絶食 5 日目には、メダカの血中を循環しているリポタンパク質量が減少していたことが推察された。さらに、絶食により肝臓中の TG 量の減少(Fig. 2-1C)も認められたことから、絶食状態のメダカ肝臓では、貯蔵されていた TG を分解し、生成した脂肪酸を利用することで $\beta$ -酸化によ

るエネルギー産生が起きていた可能性が示唆された。そこで、 $\beta$ -酸化が誘導されていたのかを確認するため、そのマーカーである *ppara* および *cpt1* の mRNA 発現量を解析した(He et al., 2015)。しかし、絶食試験期間中に *ppara* および *cpt1* mRNA 発現量の大きな変化は認められなかった(Fig. 2-2B and C)。このことから、分解された TG は $\beta$ -酸化を介したエネルギー産生に利用されておらず、マダイやティラピアでの報告と同様に(Han et al., 2011; Kaneko et al., 2016b)、肝臓以外の組織や臓器に輸送されている可能性が推察された。その一方で、脂肪酸合成酵素の転写制御因子として知られている *srebf1* の mRNA 発現量は、0 日目と比較して絶食 5 日目( $p<0.01$ ; Fig. 2-2D)および 7 日目( $p<0.05$ ; Fig. 2-2D)に発現が増加しており、絶食条件下の肝臓において脂肪酸合成系が亢進している可能性が示唆された。そこで、脂肪酸合成に関与する酵素(脂肪酸合成酵素および TG 合成酵素)の遺伝子発現の変化を調べたが、脂肪酸合成酵素 *fasn* の mRNA 発現量に変化は認められなかった(Fig. 2-2E)。また、TG 合成酵素 *dgat2* の mRNA 発現量についても減少する傾向が認められたものの、有意な差は認められなかった(Fig. 2-2F)。これらの結果から、*srebf1* の発現量増加は脂肪酸合成や TG 合成とは無関係であることが示唆された。これらの結果から、絶食条件下のメダカ肝臓では、他の臓器や組織に優先的に脂肪酸を供給するために TG 分解が促進され、 $\beta$ -酸化によるエネルギー産生が抑制されていることが示唆された。

次に、このように TG 分解が亢進している絶食時の肝臓において、ガングリオシドの脱シアルル化を担っているメダカ *neu3a* の遺伝子発現がどのような変化を示すのかを解析した

ところ、0 日目に比べて絶食 7 日目においてその発現量が約 6.5 倍に増加しており ( $p < 0.05$ ; Fig. 2-2G)、Neu3a によるガングリオシドの脱シアリル化が絶食時の肝臓での脂質代謝に影響していることが推察された。

### 2-3-3 メダカ *neu3a* の転写因子結合配列の解析

絶食時のメダカ肝臓を用いた遺伝子発現量解析の結果から、メダカ *neu3a* が脂質代謝に関連している可能性が推察された。そこで、メダカ *neu3a* の 5' 上流部における脂質代謝に関連する転写因子結合配列の存在について解析した。Shiozaki ら(2013)の報告によりメダカ *neu3a* の open reading frame 配列は明らかになっているが、それより上流の配列は明らかにされていないことから、解析に先立ち 5' RACE にてメダカ *neu3a* の転写開始点の特定を試みた。その結果、メダカ *neu3a* には 1st ATG を含むエクソンの上流に、192 塩基からなるイントロンを挟んで、104 塩基からなるエクソンが確認された(Fig. 2-3)。続いて Ensembl ゲノムブラウザを用いて、転写開始点の 5' 上流部の配列を決定し、得られた転写開始点の 5' 上流部分の配列を予想転写因子結合配列解析プログラム TFBIND にて解析した。その結果、PPAR の結合配列である PPAR 応答配列、脂肪細胞の分化に関与する C/EBP $\alpha$  (Wu et al., 1999) および脂肪酸合成酵素の発現制御を担っている SREBP-1 (Brown et al., 1997) の予想結合配列が確認された。絶食時のメダカ肝臓において、*neu3a* と *srebf1* の mRNA 発現が類似のパターンを示したことから(Fig. 2-2D and G)、*srebf1* が *neu3a* の転写因子の候補である可能性が示

唆された。

#### 2-3-4 メダカ Neu3a 安定発現細胞へのオレイン酸曝露実験

肝臓での脂質代謝におけるメダカ Neu3a の役割を明らかにするため、Hepa-T1 細胞を魚類肝臓の *in vitro* モデルとして解析を行った。まず、Hepa-T1 細胞にメダカ *neu3a* 遺伝子を導入し、Neu3 安定発現細胞を作出した。得られた Neu3a 安定発現細胞のシアリダーゼ活性は、pcDNA3.1 プラスミドを導入した mock 細胞(10.7 nmol/h/mg protein)と比較して、高い酵素活性を示した(194.8 nmol/h/mg protein,  $p < 0.01$ ; Fig. 2-4A)。また、安定発現細胞における Neu3a の細胞内局在を間接蛍光抗体法で確認したところ、魚類細胞でも細胞膜に局在を示すことが確認された(Fig. 2-4B)。

続いて、Neu3a が脂質代謝に与える影響を調べるため、Neu3a 安定発現細胞に脂肪酸を曝露することで TG 蓄積を誘導し、細胞内の脂肪滴形成への影響を評価した。1 mM オレイン酸を 9 時間曝露し、細胞内に形成された脂肪滴を Nile Red を用いて観察したところ、mock 細胞では直径 0.4–0.7  $\mu\text{m}$  の脂肪滴が大部分を占めたのに対し、Neu3a 細胞では 0.6–1.5  $\mu\text{m}$  の脂肪滴が観察され、Neu3a 細胞では mock 細胞よりも大きな脂肪滴が形成されていた(Fig. 2-5A)。そこで、Neu3a 細胞の方が mock 細胞より多くの TG を蓄積していると考え TG 量の定量を行ったが、Neu3a 細胞(1.38 mg/mg protein)では mock 細胞(1.89 mg/mg protein)に比べて TG の蓄積量が少ないことが明らかになった( $p < 0.01$ ; Fig. 2-5B)。さらに、オレイン酸を曝露



した細胞の脂質組成を TLC にて解析したところ、mock 細胞ではオレイン酸曝露により細胞内の TG 量が増加していたのに対して( $p<0.05$ ; Fig. 2-5C)、Neu3a 細胞ではオレイン酸曝露による TG 量の増加は認められなかった(Fig. 2-5C)。また、細胞内の遊離脂肪酸およびジアシルグリセロール量については細胞間で有意な差は認められなかったが、オレイン酸を曝露した Neu3a 細胞では mock 細胞と比較して遊離脂肪酸量が増加する傾向が認められた(Fig. 2-5C)。これらの結果から、Neu3a 細胞では TG 分解が亢進している可能性が示唆された。

そこで、Neu3a 細胞での TG 分解誘導を確認するため、オレイン酸を曝露した細胞のリパーゼ活性を測定した。その結果、Neu3a 細胞(3.77 nmol/h/mg protein)は mock 細胞(2.48 nmol/h/mg protein)と比較して、オレイン酸曝露時にリパーゼ活性が増加していた( $p<0.05$ ; Fig. 2-5D)。以上の結果から、オレイン酸曝露時の Neu3a 細胞では、リパーゼの活性化により TG の分解が誘導されたことが示唆された。

#### 2-3-5 Hepa-T1 細胞への LacCer 曝露実験

メダカ Neu3a はガングリオシドシリアリダーゼであるため、Neu3a 細胞における TG 分解にはガングリオシド組成の変化が影響した可能性が予想された。そこで、TG 分解に関与したガングリオシドを明らかにするため、Neu3a 細胞と mock 細胞のスフィンゴ糖脂質組成を TLC にて分析した。その結果、Neu3a の良い基質である GM3 ガングリオシド量に細胞間で差は認められなかったが、GM3 の分解産物であるラクトシルセラミド(LacCer)が Neu3a 細

胞で蓄積しており ( $p < 0.05$ ; Fig. 2-6)、LacCer が Neu3a 細胞における TG 分解の亢進に影響を与えた可能性が示唆された。

そこで、LacCer がリパーゼ活性の誘導に関与するのかについて、LacCer を曝露した Hepa-T1 細胞を用いて検討した。その結果、LacCer 曝露細胞でリパーゼ活性の有意な増加が確認された ( $p < 0.01$ ; Fig. 2-7)。以上の結果から、Neu3a によるガングリオシド脱シアリル化によって蓄積した LacCer が、魚類肝細胞において TG 量を制御する分子であることが示唆された。

## 2-4 考察

脂質は脊椎動物にとって重要なエネルギー源の1つである。絶食条件下において、哺乳類はグリコーゲンを利用してエネルギーを産生するのに対して、多くの魚類が脂質を利用してエネルギー産生をしており、魚類は哺乳類に比べて脂質へのエネルギー依存度が高くなっている(Ince and Thorpe 1976; Méndez and Wieser 1993; Colins and Anderson 1995; Bergan et al., 2012; Li et al., 2018)。これまでの報告から、魚類において絶食時の脂質動員はGHが引き金になることがわかっているが、その詳細なメカニズムは明らかになっておらず、GH以外にも肝臓において脂質代謝の制御に関与する分子の存在が示唆されている。そこで本章では、ガングリオシドの脱シアリル化が魚類肝臓の脂質代謝にどのような影響を与えるのか、特に絶食条件下における役割に注目して解析を行った。

メダカを7日間絶食条件下で飼育したところ、肝臓TG量の減少が認められ、絶食状態の肝臓においてTG分解が亢進していることが確認された。絶食条件下では、他の魚種においても脂質蓄積部位においてリパーゼ活性が上昇し、TGの分解が誘導されることが知られている(Han et al., 2011; Tian et al., 2013)。その後、TGの分解産物として得られた脂肪酸の一部は筋肉へと移動することも確認されている(Kaneko et al., 2016a)。本研究でも、脂肪酸を分解しエネルギーを取り出す経路である $\beta$ -酸化のマーカー-*ppara* および *cpt1* の発現量は絶食期間中のメダカ肝臓では変化が認められず、このことからメダカでもTG分解によって生じた脂肪酸を、肝臓自身のエネルギー源として利用するのではなく、他の組織のエネルギー源と

して供給している可能性が推察された。この肝臓においては、メダカ *neu3a* の発現量は、絶食試験開始時と比較して絶食 7 日目にその発現量が著しく増加していた。また、このメダカ *neu3a* の遺伝子発現の変化は、脂質代謝関連の転写因子であるメダカ *srebfl* と類似の発現パターンを示した。さらに、メダカ *neu3a* の転写開始点 5' 上流部に Srebp-1 の予想結合配列が確認されており、これらの結果からもメダカ *neu3a* が脂質代謝に関与していることが強く示唆された。非アルコール性脂肪肝の患者では、*NEU3* mRNA の発現増加により肝臓の脂質代謝が亢進することから(Xie et al., 2017)、絶食時のメダカ肝臓においても *neu3a* mRNA 発現量増加は肝臓の脂質代謝に影響を与えたことが推察された。しかし、哺乳類では Neu3 の発現増加は肝臓における TG の蓄積を誘導するのに対して(Yoshizumi et al., 2007; Xie et al., 2017)、絶食メダカの肝臓では TG 量は減少していた。そのため、哺乳類 Neu3 と魚類 Neu3 はともに肝臓の脂質代謝に関与するという点は一致しているものの、肝臓の脂質代謝に与える影響は哺乳類と魚類とは異なることが予想された。

そこで、肝臓での脂質代謝においてメダカ Neu3a がどのような役割を担っているのかを明らかにするため、Neu3a 安定発現細胞を用いて解析を行った。その結果、Neu3a による ganglioside 脱シリアル化によって蓄積した LacCer がリパーゼの活性化を誘導することで、Neu3a 細胞では TG 分解が促進されていることが明らかになった。スフィンゴ糖脂質とリパーゼの活性化の関係については、Freysz ら(1991)が、ニワトリ神経細胞に mix ganglioside を曝露すると、ジアシルグリセロールリパーゼとモノアシルグリセロールリパーゼの活性が、

濃度依存的に増加することを報告している。また、Nakamura ら(2013)によるとホスホオリパーゼ A<sub>2</sub>α に、LacCer が直接結合することでその酵素活性が上昇することが報告されている。魚類肝臓でも、絶食時にホルモン感受性リパーゼなどのリパーゼ活性が増加することが、マダイやティラピアで報告されている(Han et al., 2011; Kittilson et al., 2011; Tian et al., 2013; Kaneko et al., 2016b)。これらのことから、Neu3a によるガングリオシド脱シアリル化によって蓄積した LacCer が、直接または間接的にリパーゼに作用することで酵素の活性化を誘導し、TG 分解が亢進されたことが推察された。

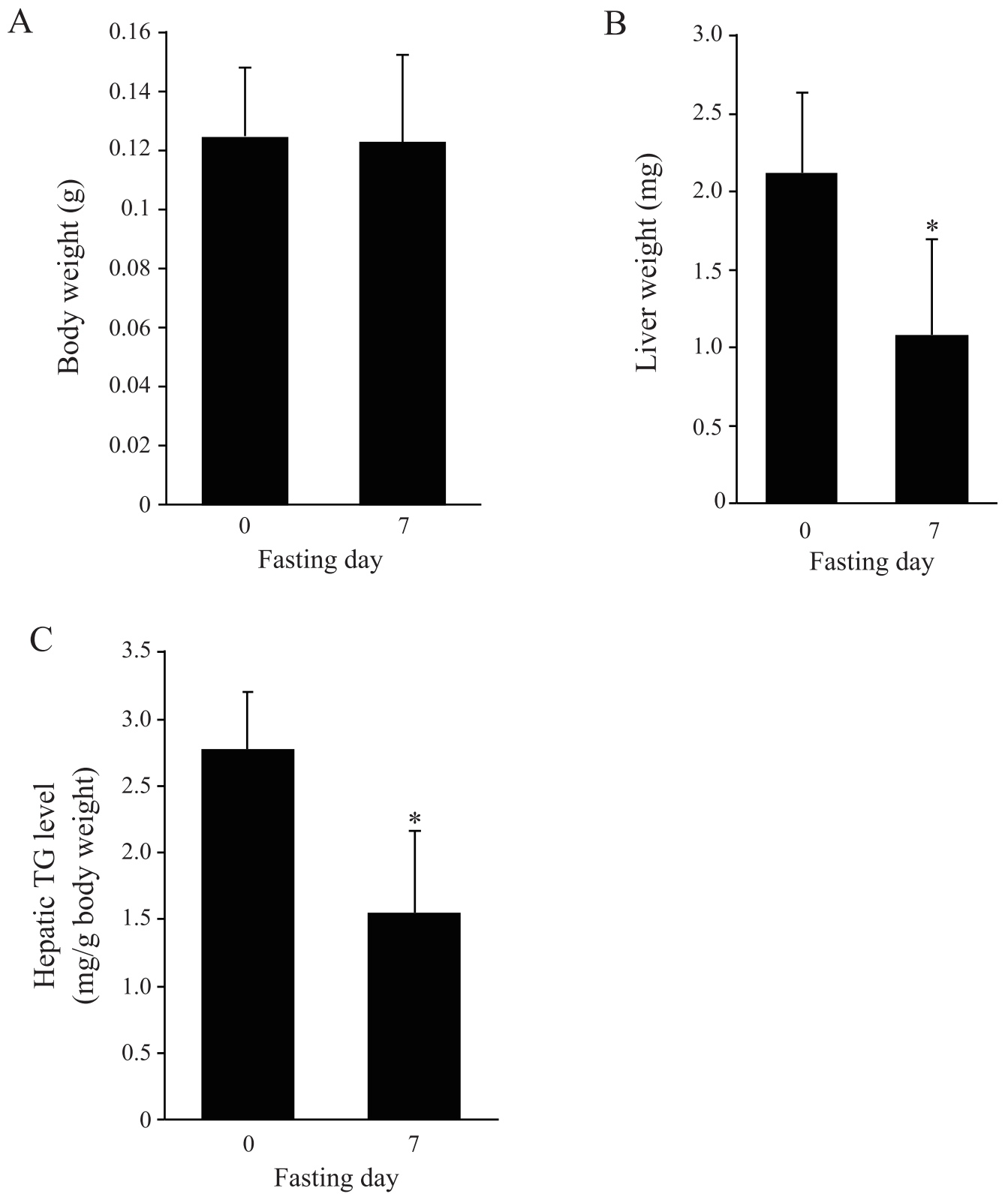
しかし、Neu3a を遺伝子導入した魚類肝臓細胞では TG 含量が mock 細胞に比べて少ないにもかかわらず、脂肪滴の肥大が観察された。Cohen ら(2015)によると、脂肪滴膜の脂質組成が脂肪滴の大きさを調節することが報告されている。哺乳類を含めてガングリオシドが脂肪滴の形成に与える影響については知見が得られていないが、Li ら(2002)によるとシロザメ *Mustelus griseus* およびホシザメ *Mustelus manazo* の肝臓中の脂肪滴表面には、ガングリオシド GM4 が存在していることが観察されている。このことから、サメ以外の魚類でも脂肪滴表面にガングリオシドが存在していることが推測される。Neu3a によるガングリオシド脱シアリル化により脂肪滴表面のガングリオシド組成が変化することで、脂肪滴の大きさが変化した可能性が推察された。また、脂肪滴が肥大化することでリパーゼによる分解を受けやすくなり、Neu3 細胞では TG 量が減少したことが推察された。

本章の結果から予想された絶食条件下における魚類肝臓での脂質代謝制御メカニズムを

Fig. 2-8 に示した。まず、絶食により発現が増加した Neu3 が、LacCer の蓄積を誘導する。次に、蓄積した LacCer がリパーゼの活性を誘導することで肝臓内の TG が分解される。そして、分解された TG 由来の脂肪酸は、肝臓での $\beta$ -酸化には利用されずに肝臓外へと排出され、筋肉などにおいてエネルギー源として利用されていることが推察された。今後、LacCer が直接または間接的にリパーゼの活性化を誘導しているのかについて、その作用機序を明らかにすることで、魚類肝臓における脂質代謝制御機構の一端が明らかになることが期待される。また、*neu3a* の転写開始点 5' 上流部に脂質代謝関連の転写因子の結合配列の存在が予想されたが、実際にこれらに転写因子が結合するのかどうかを本研究では確認することができなかった。今後、魚類 *neu3a* の転写制御機構が明らかになることで、今回明らかになった脂質代謝調節以外の機能も明らかになることが期待される。

**Table 2-1 real-time PCR に用いたプライマーセット**

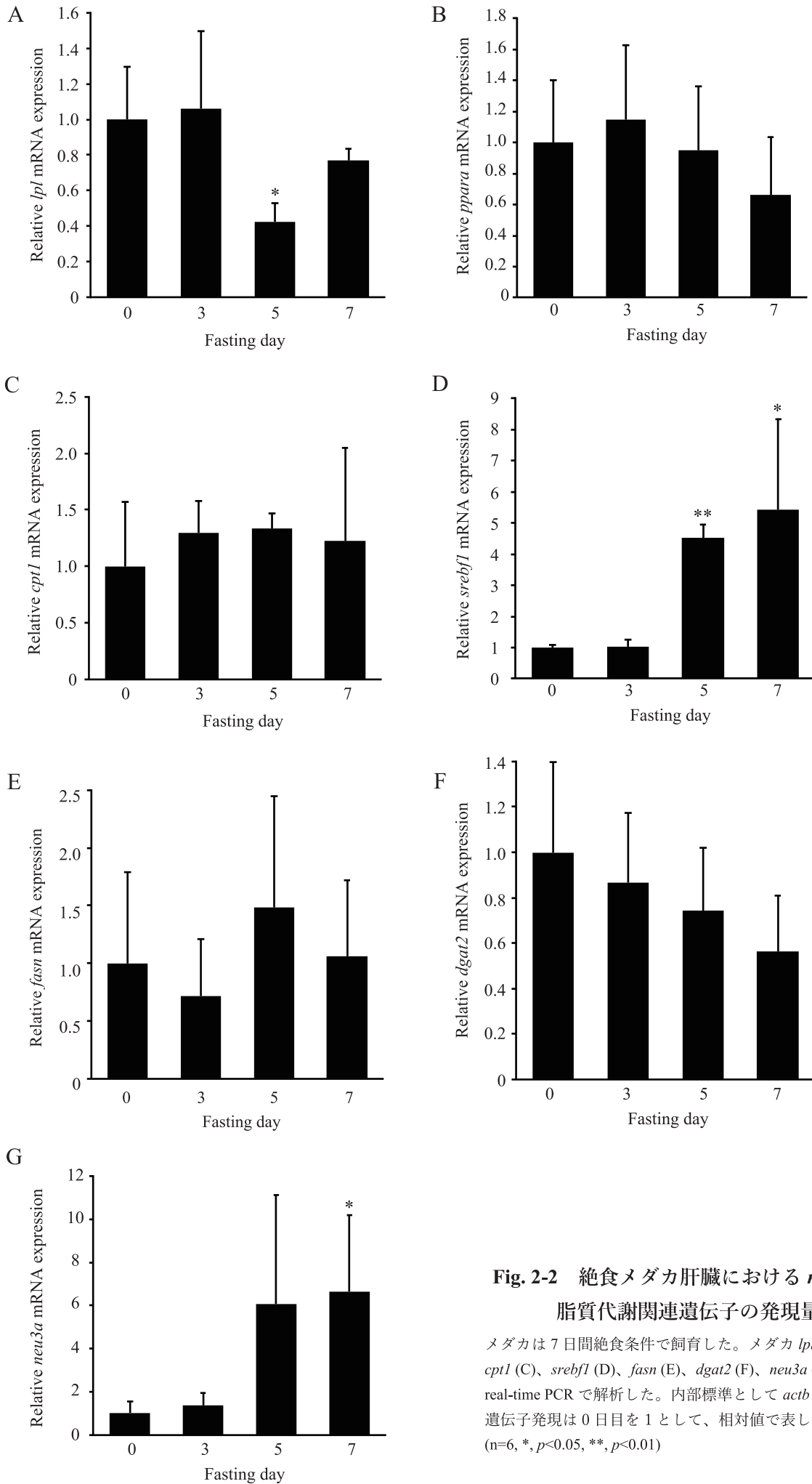
Gene name	Accession number	Product size (bp)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>neu3a</i>	NM_001287546.1	72	TGATGGCTCTGTAAAGTGGTCG	TTCAATGGTGGGATGGTTTGGCA
<i>lpl</i>	NM_001308995.1	124	TCCACCTGTTCAATCGACT	AGCTTGTTCAGCGGTTC
<i>ppara</i>	NM_001164875.1	234	GCTTCGGGTTGAACACCGTGACT	TTCATACAGGACGCCCAAAGGG
<i>cpt1</i>	XM_004071865.4	423	ATGTCTACCTCCGTGGACGA	CAAGTTTGGCCCTCCTTTTG
<i>srebfl</i>	XM_004071693.4	256	AGACAGTCTCAACTTAGGACCCGCACT	TCCGATTGCCGGGTTTGAAAG
<i>fasn</i>	XM_004080702.4	505	GACGCTTCAGGAAATGGGTA	GGACAGGAAACCGGACTATCA
<i>dgat2</i>	XM_004076639.4	327	TAGCTGCAATGTATACTGCCCTGGCTC	CAGACATCAGGTTAGTCTCTAAGAACAGGC
<i>actb</i>	NM_001104808.1	183	CCCTGGAATCGCAGACAGAA	GGGCCAGACTCATCGTACTC



**Fig. 2-1** メダカ絶食試験

メダカを7日間の絶食試験に供し、(A) 魚体重、(B) 肝臓重量および (C) 肝臓中の TG 量を定量した。(n=6, \*,  $p < 0.05$ )





**Fig. 2-2** 絶食メダカ肝臓における *neu3a* および脂質代謝関連遺伝子の発現量解析

メダカは7日間絶食条件で飼育した。メダカ *lpl* (A)、*ppara* (B)、*cpt1* (C)、*srebfl* (D)、*fasn* (E)、*dgat2* (F)、*neu3a* (G) の発現量を real-time PCR で解析した。内部標準として *actb* を用いた。遺伝子発現は0日目を1として、相対値で表した。(n=6, \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ )

A

1 AGTATCAAGTGTCTCGTGAACGTCGGAGGGTCTGGTTCCGCGTCCAAAAATGATGTTATAA 60

61 TGCCGAGGTCTGAAGACAGCCCAGGTGAAACGCGACAAGTAAAGGTAAGAGCTGCTGCCGC 120

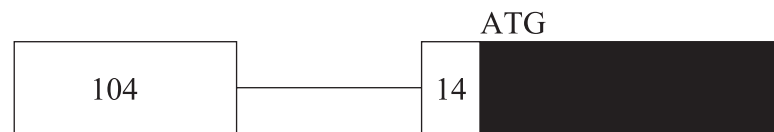
121 TGTGACGCGCTAGACGCCCTTTTGCTTCTTTTGCCAGCGAGGAGATGCAGGAGTGAGAAA 180

181 AAGCCTCCTCTGGATGTCAGCTCCAGAGGTTCTTATTGGATTATAAATGAAAGTAATGCC 240

241 GGTCACGCATATGTGGGGTATTTGTTTTCTTTTTCTTTTTCTTTCTGCTAGGACTT 300

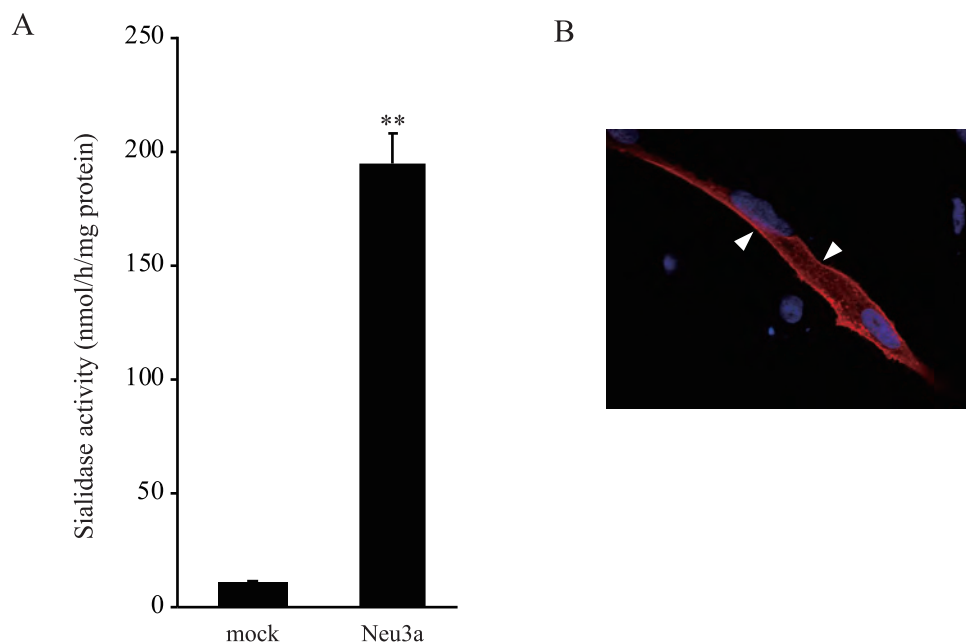
301 CTCATCCACCATGGGAAACAGACCATCCAAGAGTGACAACGTGGAGGAACCAGTCAAAC 360

B



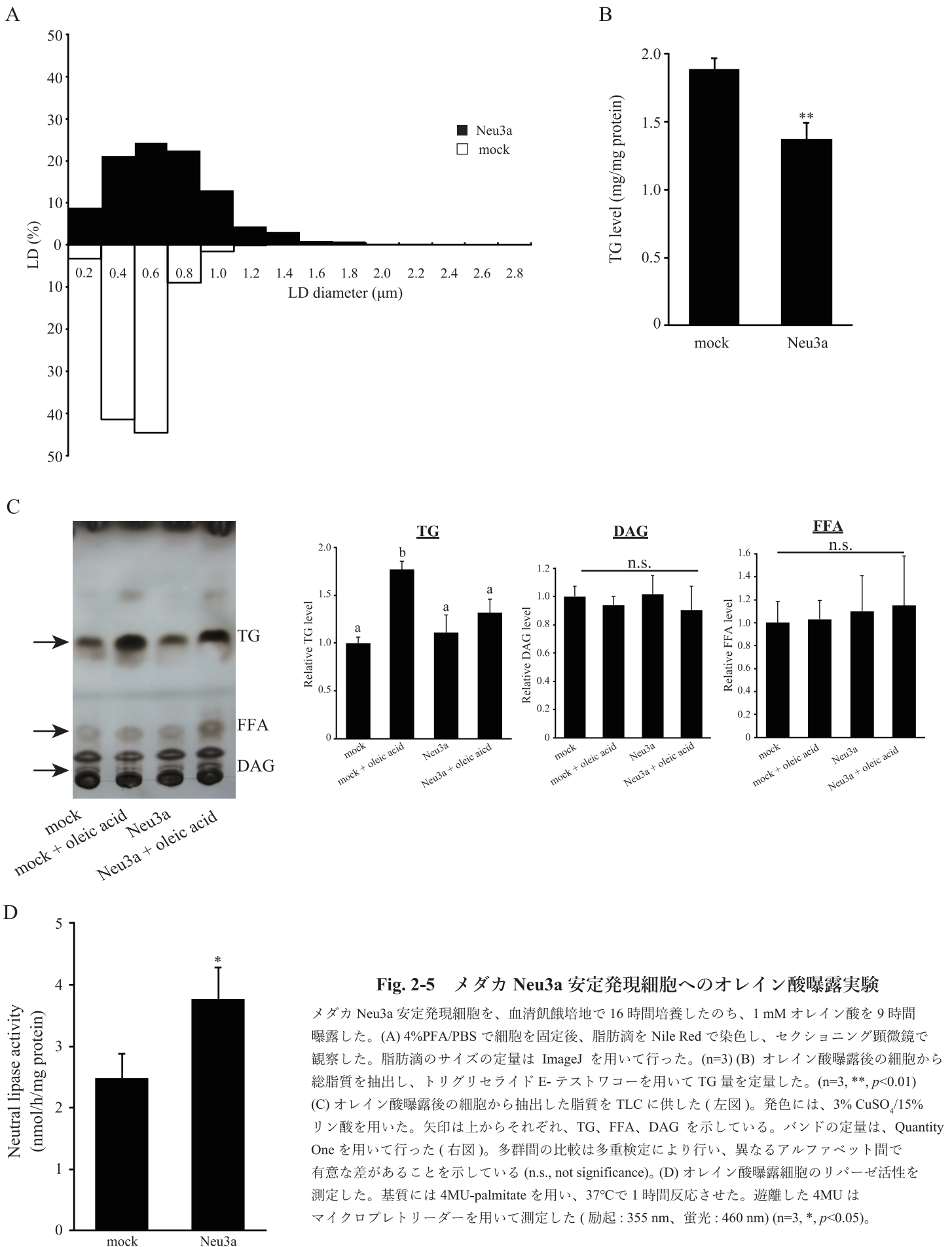
**Fig. 2-3** メダカ *neu3a* open reading frame 配列上流部の塩基配列およびエクソン-イントロン構造

(A) メダカ *neu3a* open reading frame 配列上流部の塩基配列を表している。線で囲われた部分がエクソンを、太線は開始コドンを表している。(B) メダカ *neu3a* open reading frame 配列上流部のエクソン-イントロン構造を表している。数字は、塩基数を表している。



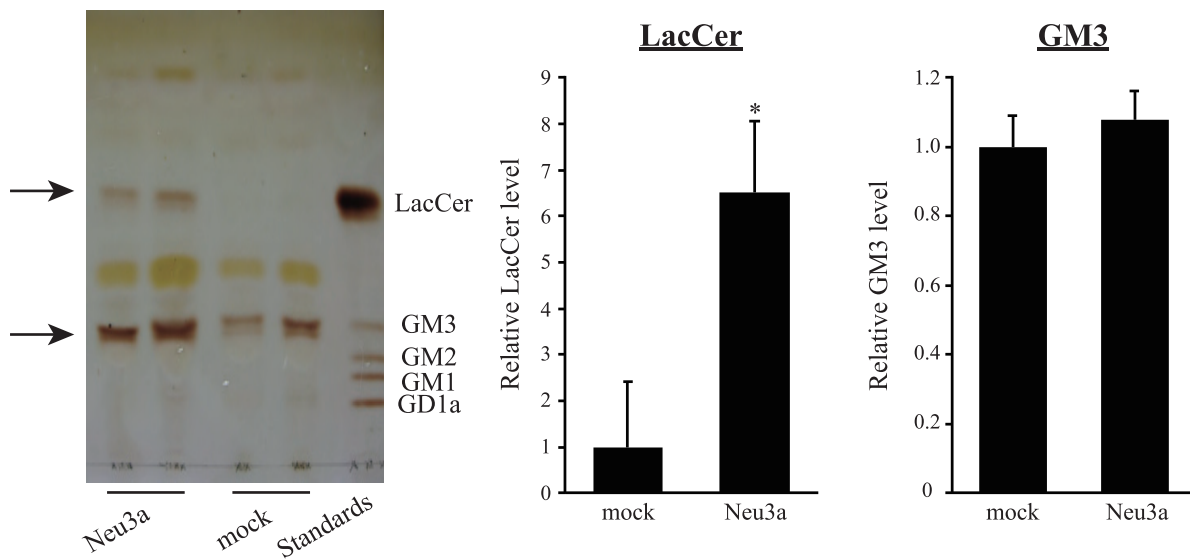
**Fig. 2-4** メダカ Neu3a 安定発現細胞の作製

(A) Neu3a 安定発現細胞の Neu3 シアリダーゼ活性は、HPLC を用いて測定した。基質に Mix gangliosides を用いて、pH 4.2、37°C で反応させた。(n=3, \*\*,  $p < 0.01$ ) (B) Neu3a の細胞内局在は間接蛍光抗体法で確認した。細胞を固定後、0.1% Triton X-100 で膜透過処理を行い、1% BSA/PBS でブロッキングした。一次抗体 anti-HA および二次抗体 Alexa-555 anti-mouse IgG により Neu3a を検出した。矢印は Neu3a の局在を表している。



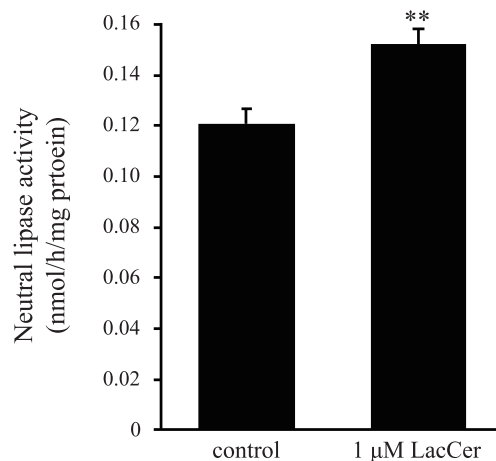
**Fig. 2-5** メダカ Neu3a 安定発現細胞へのオレイン酸曝露実験

メダカ Neu3a 安定発現細胞を、血清飢餓培地で 16 時間培養したのち、1 mM オレイン酸を 9 時間曝露した。(A) 4%PFA/PBS で細胞を固定後、脂肪滴を Nile Red で染色し、セクション顕微鏡で観察した。脂肪滴のサイズの定量は ImageJ を用いて行った。(n=3) (B) オレイン酸曝露後の細胞から総脂質を抽出し、トリグリセライド E- テストワコーを用いて TG 量を定量した。(n=3, \*\*,  $p < 0.01$ ) (C) オレイン酸曝露後の細胞から抽出した脂質を TLC に供した (左図)。発色には、3%  $\text{CuSO}_4$ /15% リン酸を用いた。矢印は上からそれぞれ、TG、FFA、DAG を示している。バンドの定量は、Quantity One を用いて行った (右図)。多群間の比較は多重検定により行い、異なるアルファベット間で有意な差があることを示している (n.s., not significance)。 (D) オレイン酸曝露細胞のリパーゼ活性を測定した。基質には 4MU-palmitate を用い、37°C で 1 時間反応させた。遊離した 4MU はマイクロプレートリーダーを用いて測定した (励起: 355 nm、蛍光: 460 nm) (n=3, \*,  $p < 0.05$ )。



**Fig. 2-6 Neu3a 安定発現細胞のスフィンゴ糖脂質組成**

Neu3a 安定発現細胞からスフィンゴ糖脂質を抽出し、TLC に供した。発色にはオルシノール硫酸を用いた。矢印は上からそれぞれ、LacCer と GM3 を示している。GM3 と LacCer の定量には Qunatity One を用いた (n=3, \*p<0.05)。



**Fig. 2-7 Hepa-T1 細胞への LacCer 曝露実験**

(B) LacCer がリパーゼ活性を誘導するか確認するため、Hepa-T1 細胞に 1 μM LacCer を曝露し、その後リパーゼ活性を測定した。基質には 4MU-palmitate を用い、37°C で 1 時間反応させた。遊離した 4MU はマイクロプレートリーダーを用いて測定した (励起 : 355 nm、蛍光 : 460 nm) (n=3, \*\*p<0.01)。

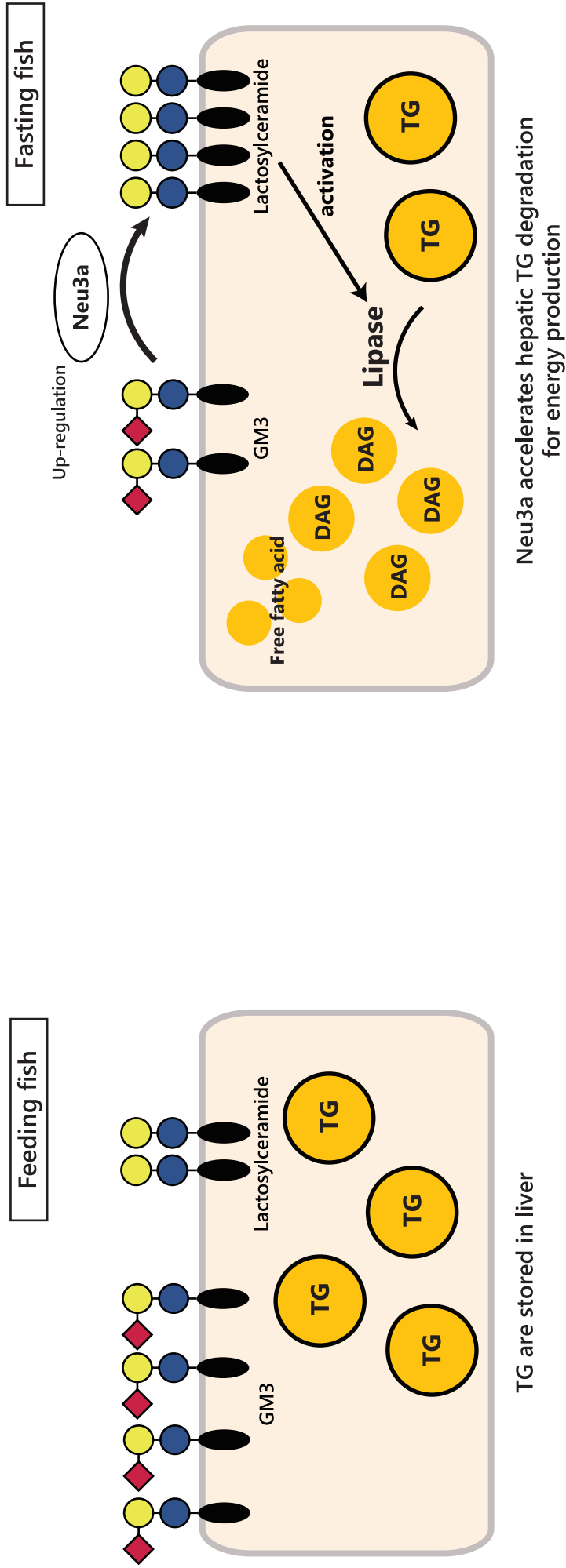


Fig. 2-8 魚類 Neu3a によるガングリオシド脱シアルリル化を介した TG 分解予想メカニズム

### 3 宿主スフィンゴ糖脂質が *Edwardsiella tarda* 感染に与える影響

### 3-1 緒言

*Edwardsiella tarda* は、腸内細菌科に属するグラム陰性の魚病細菌で、マダイ *Pagrus major* やヒラメ *Paralichthys olivaceus*、ウナギ *Anguilla japonica*、ティラピア *Oreochromis niloticus* に感染し、エドワジエラ症を引き起こすことが知られている(Matsuyama et al., 2007; Joh et al., 2011; Situmorang et al., 2014; Mohapatra et al., 2015)。病魚では、腹部膨満や肛門の発赤、肝臓での結節様小白斑といった特徴的な症状が観察される(Park et al., 2012)。症状の進行が緩慢であることから長期に亘って魚が死亡し、累積死亡率が高く、養殖業に大きな被害をもたらしている。

病原細菌の多くは、宿主細胞の膜マイクロドメインなどからのエンドサイトーシスを介して細胞内へと侵入することが広く知られている(Shin et al., 2000; Peyron et al., 2000; Kim et al., 2004)。例えば、*Streptococcus pneumoniae* は、宿主細胞表面のカベオラからエンドサイトーシスを介して細胞内へと侵入する(Asmat et al., 2014)。Hu ら(2019)によると、*Edwardsiella piscicida* も細胞膜上のカベオラからエンドサイトーシスを介して宿主細胞内へと侵入することが報告されている。さらに、*Edwardsiella* 属は免疫系、非免疫系細胞に関係なく膜マイクロドメインからのエンドサイトーシスを介して宿主細胞内へと侵入することがわかっている(Sui et al., 2017; Hu et al., 2019)。このことから、宿主細胞の膜マイクロドメインが *Edwardsiella* 属細菌の重要な感染経路であり、膜マイクロドメイン中に存在する分子は、*E. tarda* の感染において重要な役割を担っていることが予想された。

膜マイクロドメインには、コレステロールやスフィンゴ糖脂質といった脂質のほかに、上皮成長因子受容体(Puri et al., 2005; Hofman et al., 2008)やインスリン受容体(Kabayama et al., 2007)といった膜タンパク質が発現している。Chigwechokha ら(2015)によると、*E. tarda* は自身の NanA シアリダーゼにより、宿主細胞表面に発現している N 型糖タンパク質の糖鎖末端からシアル酸を遊離することで宿主細胞に接近する。その後、シアル酸が遊離することで露出したマンノースおよび N-アセチルグルコサミンといった糖を介して宿主細胞内へと侵入する。なお、この NanA シアリダーゼは宿主細胞の糖脂質の糖鎖からはシアル酸を遊離しないことがわかっている(Chigwechokha et al., 2015)。また、Vo ら(2019)は、NanA シアリダーゼの発現量の違いが、*E. tarda* 株間の感染度の違いに影響することを示唆しており、*E. tarda* は宿主細胞の糖鎖構造を変化させることで自身の感染にとって有利な環境を作り出している可能性がある。その一方で、単に *E. tarda* NanA シアリダーゼの酵素活性を阻害しただけでは、宿主細胞への *E. tarda* 感染は完全には抑制することはできず(Chigwechokha et al., 2015; Shinyoshi et al., 2017)、NanA シアリダーゼによって生じたアシアロ糖タンパク質以外にも感染に関与している分子が膜マイクロドメインには存在していることが予想された。

糖タンパク質を除いて糖鎖構造を有する分子としてはスフィンゴ糖脂質がある(Fujita et al., 2007)。スフィンゴ糖脂質は、セラミドの脂肪酸部分に糖鎖が結合した分子で、細胞増殖や分化(Hakomori and Igarashi, 1995)、細胞間相互作用(Milijan et al., 2002)、シグナル伝達(Doronin et al., 2014)などの様々な現象に関与している。さらに、スフィンゴ糖脂質は細菌や



ウイルス感染において重要な役割を担っている(Kunz and Kozjak-Pavlovic, 2019)。例えば、マダコの腸管に発現している GM4 ガングリオシドは *Vibrio trachuri* の認識部位として利用されている(Chisada et al., 2013)。それ以外にも GM3 ガングリオシドの分解産物であるラクトシルセラミド(LacCer)は、*Lactobacillus fermentum* や *Shigella dysenteriae*、*Escherichia coli*、*Mycobacterium* 属などの感染の足場として利用されることがわかっている(Karlsson, 1989; Teneberg et al., 2004; Nakayama et al., 2016)。このように、短鎖のスフィンゴ糖脂質は細菌感染の足場だけでなく認識部位としても利用されており、宿主スフィンゴ糖脂質は *E. tarda* 感染にも関与していることが予想された。

そこで本章では、*E. tarda* 感染における宿主スフィンゴ糖脂質の役割を解明することを目的とし、まず、メダカを用いて *E. tarda* 感染時の肝臓のスフィンゴ糖脂質組成を解析した。続いて、*E. tarda* 感染時に宿主スフィンゴ糖脂質がどのように利用されているのかを明らかにするため、スフィンゴ糖脂質組成が異なる魚類培養細胞を用いて感染メカニズムの解明を試みた。

## 3-2 実験方法

### 3-2-1 *E. tarda* 培養条件

本研究では *E. tarda* FPC498 株 (ヒラメ由来、鹿児島大学水産学部魚病学研究室から分与) を用いた。*E. tarda* はトリプトソーヤ寒天培地(TSA; 日水製薬株式会社)を用い、28°C で培養を行った。

### 3-2-2 メダカを用いた *E. tarda* 感染実験

試験は市販のヒメダカを用いて行った。ヒメダカは、明期 14 時間、暗期 10 時間、止水、25°C で馴致させたのち、試験に供した。馴致期間中は 1 日 2 回、オトヒメ B2 を与えた。

感染実験は、3 L の飼育水槽を用いて行った。ヒメダカ(0.32±0.06 g)の腹腔に 20 µL の  $1.0 \times 10^7$  CFU/mL *E. tarda* または PBS を注射した。感染から 24 時間後に肝臓および脾臓を摘出した。取り出した組織は直ちに -80°C の冷凍庫で凍結させ、解析まで保存した。

### 3-2-3 *E. tarda* 感染時のメダカスフィンゴ糖脂質代謝関連遺伝子発現量解析

Sepasol-RNA Super G を用いて Total RNA を抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用いて逆転写を行った。得られた cDNA を用いて、メダカ *ugcg* [UDP-glucose ceramide glucosyltransferase]、*st3gal5* [ST3 β-galactoside α-2, 3-sialyltransferase 5]、*actb* mRNA 発現量および *E. tarda* *16S rRNA* mRNA 発現量を KOD SYBR qPCR Mix および StepOne

Real-time PCR system を用いて解析した。 *ugcg*、 *st3gal5*、 *actb* の PCR 条件は、 98°C で 2 分間初期変性後、 98°C, 10 秒、 60°C, 10 秒、 68°C, 30 秒を 40 サイクルとした。 *16S rRNA* の PCR 条件は、 95°C で 2 分間初期変性後、 95°C, 15 秒、 60°C, 1 分を 40 サイクルとした。 本解析で用いたプライマーセットは Table 3-1 に示した。

#### 3-2-4 魚類培養細胞を用いた *E. tarda* 感染実験

*E. tarda* 感染に与えるスフィンゴ糖脂質の影響を評価するためにキンギョ鱗由来 GAKS とメダカ肝臓由来 DIT29 細胞を用いて感染実験を行った。 GAKS 細胞は、 10% FBS を添加した DMEM 培地を用いて、 37°C、 5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。 また、 DIT29 細胞は、 10% FBS および 10 mM HEPES を添加した L-15 培地を用いて、 33°C、 大気条件下で培養した。 GAKS 細胞への pcDNA3.1 およびティラピア Neu3a-HA 発現プラスミド(Chigwechokha et al., 2014) の導入は、 ポリエチレンイミン法を用いた(Ahn et al., 2008)。

*E. tarda* の感染試験は以下のように行った。  $1 \times 10^9$  cfu/mL *E. tarda* を RPMI (GAKS 細胞)、 または L-15 培地(DIT29 細胞)に Multiplicity of infection (MOI) 10 となるように懸濁し、 28°C (GAKS 細胞)または 33°C (DIT29 細胞)で 1 時間感染させた。 その後、 *E. tarda* 懸濁液を取り除き、 PBS で細胞を洗浄し、 200 µg/mL ゲンタマイシン、 200 µg/mL ストレプトマイシン、 200 U/mL ペニシリンを含む培地で 1 時間培養した。 再度、 細胞を 100 µg/mL ゲンタマイシン、 100 µg/mL ストレプトマイシン、 100 U/mL ペニシリンを含む培地で 1 時間培養した。

その後、0.5% Triton X-100/PBS で細胞を溶解させ、得られた細胞溶解液を TSA プレートに塗抹し、28°C で 24 時間 TSA プレートを培養し、コロニー数を計測した。

膜マイクロドメインの形成阻害は methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MBCD) を用いて行った。GAKS 細胞および DIT29 細胞を、それぞれ 1 mM MBCD で 10 分間処理し、その後、上記と同様の方法で感染実験を行った。

スフィンゴ糖脂質合成の阻害は、グルコシルセラミド合成酵素の阻害剤である DL-threo-1-phenyl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol (DL-PPMP) を用いた。DIT29 細胞を 10  $\mu$ M DL-PPMP 存在下で 3 日間培養し、その後、上記と同様の方法で感染実験を行った。

### 3-2-5 ティラピア Neu3a の酵素活性測定

ティラピア Neu3a の酵素活性は 2 章の 2-2-5 と同様の方法で行った。

### 3-2-6 メダカ臓器および魚類培養細胞のスフィンゴ糖脂質組成の解析

摘出したメダカ肝臓および脾臓は凍結乾燥を行い、続いて解剖バサミで細切したのちに、脂質抽出に供した。肝臓および脾臓または細胞ペレットに 2-プロパノール:ヘキサン:水 = 55:25:20 を加えてよく懸濁し、超音波処理を行った。その後、1,970 g、室温で 10 分間遠心分離を行い、上清を回収した。得られた上清はエバポレーターで乾固させた。乾固後、0.1 M NaOH/メタノールを加え、40°C で 2 時間反応させてけん化処理を行った。脱塩処理は Sep-

Pak C18 カートリッジを用いて行った。糖脂質画分は、メタノールおよびクロロホルム:メタノール(C:M)=2:1 を用いてカラムより溶出させた。その後、遠心エバポレーターで乾固させ、[C:M]=1:1 に溶解させた。得られたサンプルを TLC プレートにスポットし、展開溶媒(クロロホルム:メタノール:0.5% CaCl<sub>2</sub>=60:40:8)を充満させた展開槽にて展開させた。展開後、プレートを乾燥させ、0.5%オルシノール/2N 硫酸を吹き付け、110°C でバンドが現れるまで加熱した。バンドの定量は Quantity One を用いて行った。

### 3-2-7 *E. tarda* のスフィンゴ糖脂質結合能の評価

Nakayama ら(2016)の方法を参照し、*E. tarda* のスフィンゴ糖脂質への接着能を評価した。96-well プレートに、LacCer または GlcCer (40 nmol/well)をコートした。TSB 培地で *E. tarda* を対数増殖期まで培養し、回収した後 PBS に懸濁した。この懸濁液を糖脂質でコートした well に 1 mg/well となるように添加し、28°C で 1 時間培養した。PBS で well を洗浄し、70% エタノールで 30 分間固定した。固定後、0.1%クリスタルバイオレットを用いて接着した *E. tarda* を染色した。その後、10%酢酸を加えて色素を溶出させ、マイクロプレートリーダーで吸光度 550 nm を測定した。

Chigwechokha ら(2015)の方法を参照し、スフィンゴ糖脂質の *E. tarda* 感染の阻害能について評価した。*E. tarda* を 0.02–20 μM の LacCer または GlcCer 存在下で 1 時間培養し、3-2-4 と同様の方法で DIT29 細胞に感染させ、コロニー数を計測した。また、いずれの感染実験

においても 1 時間培養した培養液を回収し、分光光度計で吸光度 630 nm を測定し、糖脂質の毒性について評価した。

*E. tarda* が認識している糖脂質の糖鎖部分を明らかにするため、2  $\mu$ M ラクトース存在下で 1 時間 *E. tarda* を培養し、3-2-4 と同様の方法で GAKS 細胞に感染させ、コロニー数を計測した。

#### 3-2-8 統計処理

すべての実験における統計解析は、FreeJSTAT (<http://toukeijstat.web.fc2.com/>)により行った。

2 群間の比較には、対応のない *t* 検定を、3 群以上の比較は Tukey 検定をそれぞれ用いた。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 *E. tarda* 感染メダカ肝臓および脾臓における遺伝子発現量解析

*E. tarda* 感染による宿主スフィンゴ糖脂質組成の変化を調べるため、*E. tarda* 感染の標的である肝臓と脾臓におけるスフィンゴ糖脂質代謝関連酵素の遺伝子発現量の変化を real-time PCR を用いて解析した。Fig. 3-1A に示すように、*E. tarda* 感染を確認するためのマーカーとして用いた *16S rRNA* の遺伝子発現は感染魚のみで認められることから、肝臓および脾臓に *E. tarda* が感染していることが確認された。

続いて、スフィンゴ糖脂質合成の起点となる GlcCer 合成酵素 *ugcg* およびガングリオシド GM3 合成酵素 *st3gal5* の遺伝子発現を調べた。その結果、脾臓ではコントロール(PBS 投与)と比較して *ugcg* の発現が約 80%減少していた(Fig. 3-1B)。一方で、ガングリオシド合成の起点である *st3gal5* の発現量は約 2 倍に増加していた(Fig. 3-1C)。また、肝臓では *ugcg* および *st3gal5* 両方の遺伝子発現量がコントロール(PBS 投与)と比較して約 60%減少していた(Fig. 3-1D and E)。以上の結果から、*E. tarda* 感染により宿主の標的臓器においてスフィンゴ糖脂質組成が変化している可能性が示唆された。

#### 3-3-2 *E. tarda* 感染メダカ肝臓および脾臓のスフィンゴ糖脂質組成の解析

*E. tarda* 感染によるスフィンゴ糖脂質組成の変化を確認するため、メダカ肝臓および脾臓のスフィンゴ糖脂質組成を TLC にて解析した。メダカ脾臓にはガングリオシド GM3、GM2、

GM1、GD1a および Gb3 グロボシドの 5 種類のスフィンゴ糖脂質が分布しているが、そのうち、*E. tarda* 感染により GD1a の含量が約 4 倍に増加していた(Fig. 3-2A)。肝臓では、GlcCer と GM2 が分布しており、*E. tarda* 感染によりこのうち GlcCer 含量が減少する傾向が認められた(Fig. 3-2B)。これらの結果から、*E. tarda* 感染により宿主のスフィンゴ糖脂質組成が変化していることが明らかとなり、宿主スフィンゴ糖脂質組成の変化が *E. tarda* 感染において何らかの役割を担っている可能性が示唆された。

### 3-3-3 魚類培養細胞を用いた *E. tarda* 感染実験

メダカ感染実験の結果から、宿主のスフィンゴ糖脂質が感染時に何らかの役割を担っていることが示唆された。そこで、*E. tarda* 感染における宿主スフィンゴ糖脂質の役割を明らかにするため、GAKS 細胞と DIT29 細胞の 2 種類の魚類培養細胞を用いて *E. tarda* 感染実験を行った。2 種類の魚類培養細胞の糖脂質組成を TLC にて分析したところ、GM3 や Gb4 は細胞間で含量に差が認められなかったのに対して、GlcCer および LacCer といった短鎖のスフィンゴ糖脂質の含量が GAKS 細胞に比べて DIT29 細胞で高いことが明らかとなった(Fig. 3-3A)。続いて、これらの細胞に *E. tarda* (MOI 10) を 1 時間感染させ、その後、形成されたコロニー数を計測し、*E. tarda* の感染度を評価したところ、DIT29 細胞の方が GAKS 細胞に比べて約 2.1 倍高い感染度を示した( $p < 0.01$ ; Fig. 3-3B)。このことから、スフィンゴ糖脂質組成の違いが魚類細胞間の感染度の違いに影響していることが示唆された。*E. tarda* は膜マイク



ロドメインを介して宿主細胞内に侵入することが、哺乳類培養細胞で明らかになっており (Sui et al., 2017; Hu et al., 2019)、2 種類の魚類細胞間の感染度の違いにもこの膜マイクロドメインが関与している可能性が示唆された。そこで、両細胞の膜マイクロドメインの形成を MBCD 処理により阻害することで感染度に変化が認められるか解析した。その結果、MBCD 処理をした DIT29 細胞では *E. tarda* 感染が減少したのに対し、GAKS 細胞では *E. tarda* 感染の減少は認められなかった(Fig. 3-3B)。以上の結果から、*E. tarda* は魚類培養細胞においても膜マイクロドメインから宿主細胞内に侵入し、さらに膜マイクロドメイン中に存在するスフィンゴ糖脂質が感染に関与していることが示唆された。また、MBCD 処理および *E. tarda* 感染の有無によるスフィンゴ糖脂質組成の変化は認められなかった(Fig. 3-3C and D)。

#### 3-3-4 スフィンゴ糖脂質組成を変化させた魚類培養細胞を用いた *E. tarda* 感染実験

3-3-3 の結果から、細胞間での GlcCer および LacCer 含量の違いが *E. tarda* 感染に影響することが示唆された。そこで、これらの糖脂質が *E. tarda* 感染度に与える影響を評価するため、その代謝系に注目して感染実験を行った(Fig. 3-4A)。まず、GlcCer および LacCer 含量が高い DIT29 細胞を GlcCer 合成酵素阻害剤 DL-PPMP で処理し、その後、*E. tarda* の感染度の変化を調べた。まず、DL-PPMP 処理による糖脂質組成の変化を TLC にて解析したところ、DL-PPMP 処理細胞では GlcCer 含量が減少しており(Fig. 3-4B)、GlcCer 合成が阻害されていることが確認された。この細胞に *E. tarda* を感染させたところ、その感染は約 50%減少

し( $p<0.05$ ; Fig. 3-4C)、スフィンゴ糖脂質が宿主への *E. tarda* 感染を促進していることが示唆された。

次に、GAKS 細胞にティラピア *neu3a* 遺伝子を導入し、LacCer 含量を増加させた状態で *E. tarda* 感染が促進されるか検討した。ティラピア Neu3a はガングリオシドを良い基質とし、ガングリオシドの脱シアリル化により GM3 から LacCer を産生する(Chigwechokha et al., 2014)。まず、ティラピア Neu3a が発現していることを確認するため、ティラピア *neu3a* 遺伝子導入細胞の Neu3a シアリダーゼ活性を測定した。*neu3a* 導入細胞(218.9 nmol/h/mg protein)は、pcDNA3.1 を導入した mock 細胞(3.3 nmol/h/mg protein)と比較して高いシアリダーゼ活性を示した( $p<0.01$ ; Fig. 3-4D)。また、これらの細胞のスフィンゴ糖脂質組成を調べたところ、ティラピア Neu3a の基質である GM3 含量に変化は認められなかったが、*neu3a* 導入細胞では mock 細胞と比較して LacCer が増加していた(Fig. 3-4E)。そこで、この *neu3a* 導入細胞に *E. tarda* を感染させたところ、*neu3a* 導入細胞では mock 細胞に比べて *E. tarda* 感染が約 4 倍に上昇した(Fig. 3-4F)。以上の結果から、短鎖のスフィンゴ糖脂質 LacCer および GlcCer が *E. tarda* 感染を促進する可能性が示唆された。

### 3-3-5 LacCer および GlcCer の *E. tarda* への毒性

LacCer および GlcCer が *E. tarda* 感染を促進する因子である可能性が示唆されたが、そのメカニズムは不明である。そこで、これらの糖脂質が *E. tarda* 感染を促進するメカニズムに

ついて検討した。LacCer (20 nM–20  $\mu$ M)または GlcCer (20 nM–20  $\mu$ M)を含む培地で *E. tarda* を1時間培養し、分光光度計で培地の濁度を測定した。Fig. 3-5 に示すように、コントロール(DMSO 添加)と糖脂質を添加した培地間で培地の濁度に差は認められなかったことから、これらのスフィンゴ糖脂質は *E. tarda* に対して毒性を示さないことが明らかになった。

### 3-3-6 *E. tarda* の糖脂質結合能の評価

*Escherichia coli* や *Helicobacter pylori*、*Mycobacterium* 属などの多くの菌が、感染時に宿主細胞の LacCer を足場として利用している(Ångström et al., 1998; Teneberg et al., 2004; Nakayama et al., 2016)。そこで、*E. tarda* 感染時の足場として LacCer および GlcCer が利用されている可能性について検討した。*E. tarda* を LacCer または GlcCer をコートした well に曝露し、その接着度をクリスタルバイオレットを用いて評価した。その結果、コントロールと比較して LacCer をコートした well では、*E. tarda* の接着が有意に増加していた( $p < 0.01$ ; Fig. 3-6A)。その一方で、GlcCer をコートした well では *E. tarda* の接着が有意に減少していた( $p < 0.01$ ; Fig. 3-6A)。そこで、*E. tarda* を LacCer (20 nM–20  $\mu$ M)、または GlcCer (20 nM–20  $\mu$ M) を添加した培地で1時間培養後、DIT29 細胞へ感染させ、これらのスフィンゴ糖脂質が感染度に与える影響について評価した。その結果、LacCer を曝露した *E. tarda* を感染させたところ、濃度依存的に *E. tarda* の感染が抑制されていた( $p < 0.05$ ; Fig. 3-6B)。その一方で、GlcCer を曝露した *E. tarda* では細胞への感染度に違いは認められなかった(Fig. 3-6C)。これら

の結果から、*E. tarda* も大腸菌などと同様に LacCer を感染の足場分子として利用していることが示唆された。

LacCer などのスフィンゴ糖脂質はセラミド部分を細胞膜中に埋め込み、糖鎖部分を細胞外に露出した状態で細胞膜上に存在している。そこで、LacCer を構成する糖分子の *E. tarda* との相互作用について検討した。Chigwechokha ら(2015)により、LacCer の構成糖であるガラクトースおよびグルコースと *E. tarda* は結合しないことがわかっている。そこで、本研究では、LacCer の糖鎖部分である Gal( $\beta$ -1,4)Glc に着目し、ラクトースと *E. tarda* が結合する可能性について検討した。しかし、*E. tarda* を 2  $\mu$ M ラクトースを添加した培地で 1 時間培養しても、GAKS 細胞への感染抑制は認められなかった(Fig. 3-6D)。このことから、Gal( $\beta$ -1,4)Glc 部分も *E. tarda* との結合には関与しないことが明らかとなり、*E. tarda* は糖鎖部分以外の構造または LacCer 全体を認識している可能性が示唆された。

### 3-4 考察

*Edwardsiella* 属細菌は、宿主細胞の膜マイクロドメインを介して細胞内へと侵入することが明らかになっている。*E. tarda* は、膜マイクロドメインの1種であるクラスリン被覆ピットやカベオラからのエンドサイトーシスを介して細胞内に侵入し(Sui et al., 2017)、*E. piscicida* は、マクロピノサイトーシスやカベオラからのエンドサイトーシスにより宿主細胞内へと侵入する(Hu et al., 2019)。これらの報告から、膜マイクロドメインに存在する分子が *E. tarda* 感染時の足場などとして宿主細胞内への侵入に利用されていることが予想されたが、現在までのところそのような分子を特定した報告はない。

膜マイクロドメインには、種々の膜タンパク質が発現しており、膜貫通型シグナリングに深く関与している(Fujita et al., 2007; Hofman et al., 2008)。Chigwechokha ら(2015)により、*E. tarda* は自身の NanA シアリダーゼを利用して宿主細胞の糖タンパク質の糖鎖構造を変化させることで、細胞内へと侵入することが報告されている。その一方で、この感染経路において重要な役割を担う NanA シアリダーゼの酵素活性を単に阻害しただけでは、*E. tarda* による宿主細胞への感染を完全に抑制することはできない(Chigwechokha et al., 2015; Shinyoshi et al., 2017)。そのため、*E. tarda* は糖タンパク質の糖鎖構造を制御するだけでなく、宿主細胞の糖脂質の糖鎖構造も制御している可能性が予想された。そこで本章では、宿主細胞の膜マイクロドメイン中のスフィンゴ糖脂質組成の変化が *E. tarda* 感染に与える影響について検討した。

まず、*E. tarda* 感染時に宿主のスフィンゴ糖脂質代謝が変化しているのかを調べるために、メダカに *E. tarda* を感染させた。その結果、*E. tarda* の標的器官である肝臓では、スフィンゴ糖脂質合成の起点である GlcCer 合成酵素の mRNA 発現量が減少していた。さらに、ガングリオシド合成の起点となる GM3 合成酵素の遺伝子発現も減少していた。また、肝臓のスフィンゴ糖脂質組成を解析したところ、遺伝子発現解析の結果と一致するように *E. tarda* 感染魚において GlcCer 含量が減少する傾向が認められ、宿主スフィンゴ糖脂質が *E. tarda* 感染に関与している可能性が示唆された。

そこで、スフィンゴ糖脂質組成の変化が *E. tarda* 感染に与える影響について魚類培養細胞を用いて解析を行った。まず、感染実験に用いる 2 種類の魚類培養細胞のスフィンゴ糖脂質組成を TLC で解析したところ、DIT29 細胞は GAKS 細胞よりも LacCer と GlcCer の含量が高いことが明らかになった。続いて、魚類培養細胞でも膜マイクロドメインが *E. tarda* 感染に関与しているのかについて検討したところ、HeLa や RAW264.7 細胞と同様に(Sui et al., 2017; Hu et al., 2019)、MBCD 処理で膜マイクロドメインを破壊した DIT29 細胞では細胞内への *E. tarda* の侵入が有意に減少したが、GAKS 細胞では *E. tarda* 感染の抑制は認められなかった。さらに、GlcCer 合成酵素の阻害剤 DL-PPMP で処理し、スフィンゴ糖脂質の合成系を阻害した細胞では、*E. tarda* の感染が抑制された。その一方で、魚類 Neu3a シアリダーゼの過剰発現により LacCer 含量を増加させた細胞では、*E. tarda* 感染が促進され、宿主細胞の GlcCer や LacCer といった短鎖のスフィンゴ糖脂質が *E. tarda* 感染のキー分子であることが

明らかになった。

細菌の中には短鎖のスフィンゴ糖脂質を感染の際の足場として利用しているものがある (Ångström et al., 1998; Lafont et al., 2002; Teneberg et al., 2004; Chisada et al., 2005)。そのうち結核菌は、ラフト中の LacCer への接着を介して宿主細胞内に侵入することがヒト好中球で明らかになっている (Nakayama et al., 2016)。本研究においても、*E. tarda* は結核菌と同様に LacCer に対して結合能を示し、LacCer が *E. tarda* の宿主細胞への侵入において重要な役割を担っていることが示唆された。さらに、LacCer 存在下で培養した *E. tarda* を DIT29 細胞に感染させたところ、*E. tarda* 感染が濃度依存的に抑制された。その一方で、*E. tarda* は GlcCer に対して結合能を示さず、DIT29 細胞への感染実験においても、GlcCer による *E. tarda* の感染抑制は認められなかった。このことから、宿主細胞への接着には、GlcCer ではなく LacCer が利用されている可能性が示唆された。現在のところ、*E. tarda* では D-マンノースやシアル酸と結合する繊毛タンパク質は報告されているが (Wong et al., 1989; Sakai et al., 2003)、LacCer を認識する分子は同定されていない。また、Chigwechokha ら (2015) により、ガラクトースやグルコースといった LacCer の糖鎖部分を構成する単糖とも *E. tarda* は結合しないことが明らかになっている。そこで、LacCer のどの部分が *E. tarda* との結合に関与しているのかについて解析した。本研究では、LacCer の糖鎖部と同一の糖から構成されるラクトースによる評価を行ったが、*E. tarda* の感染抑制は認められなかった。一般に、細菌のスフィンゴ糖脂質への結合は、その糖鎖部分の構造のみによって阻害されないことが知られている

(Strömberg and Karlsson, 1990)。そのため、*E. tarda* は他の細菌と同様に、LacCer 分子全体を認識している可能性がある。例えば、GM1 ガングリオシドを認識する *H. pylori* の病原性因子 VacA は、GM1 を構成している脂肪酸や糖鎖、スフィンゴシンとは結合せず、GM1 全体を認識する(Wada et al., 2010)。また、糖脂質の脂肪酸が細菌の LacCer 認識に影響を与えることも知られている。トリヒドロキシ塩基また 2-ヒドロキシ脂肪酸は、*Propionibacterium granulosum* が LacCer と結合するために必要なことがわかっており(Strömberg and Karlsson, 1990)、脂質部分が *E. tarda* の結合に影響を与える可能性があることが示唆されている。また、LacCer と結合する *E. tarda* 側の分子についてもほとんど明らかになっていない。細菌の中には、菌自身の糖鎖と宿主の糖鎖との相互作用により LacCer を認識しているものもある。Abul-Milh ら(1999)によると、*Actinobacillus pleuropneumoniae* を抗リポポリサッカライド(LPS)O 抗原抗体で処理すると、LacCer への結合が減少することが報告されている。このことから、*E. tarda* においても LPS が宿主細胞の LacCer への結合に関連している可能性が推察された。

*E. tarda* を感染させたメダカの脾臓では、GlcCer 合成酵素の mRNA 発現が減少し、GM3 合成酵素の mRNA 発現が増加していた。また、肝臓ではこれらの酵素の遺伝子発現量は減少していた。さらに、臓器のスフィンゴ糖脂質組成は遺伝子発現のパターンと一致するように、脾臓では GD1a が増加し、肝臓では GlcCer が減少する傾向が認められた。これら *in vivo* 実験で得られた結果と、魚類培養細胞を用いて得られた結果を合わせて考えると、宿主であ

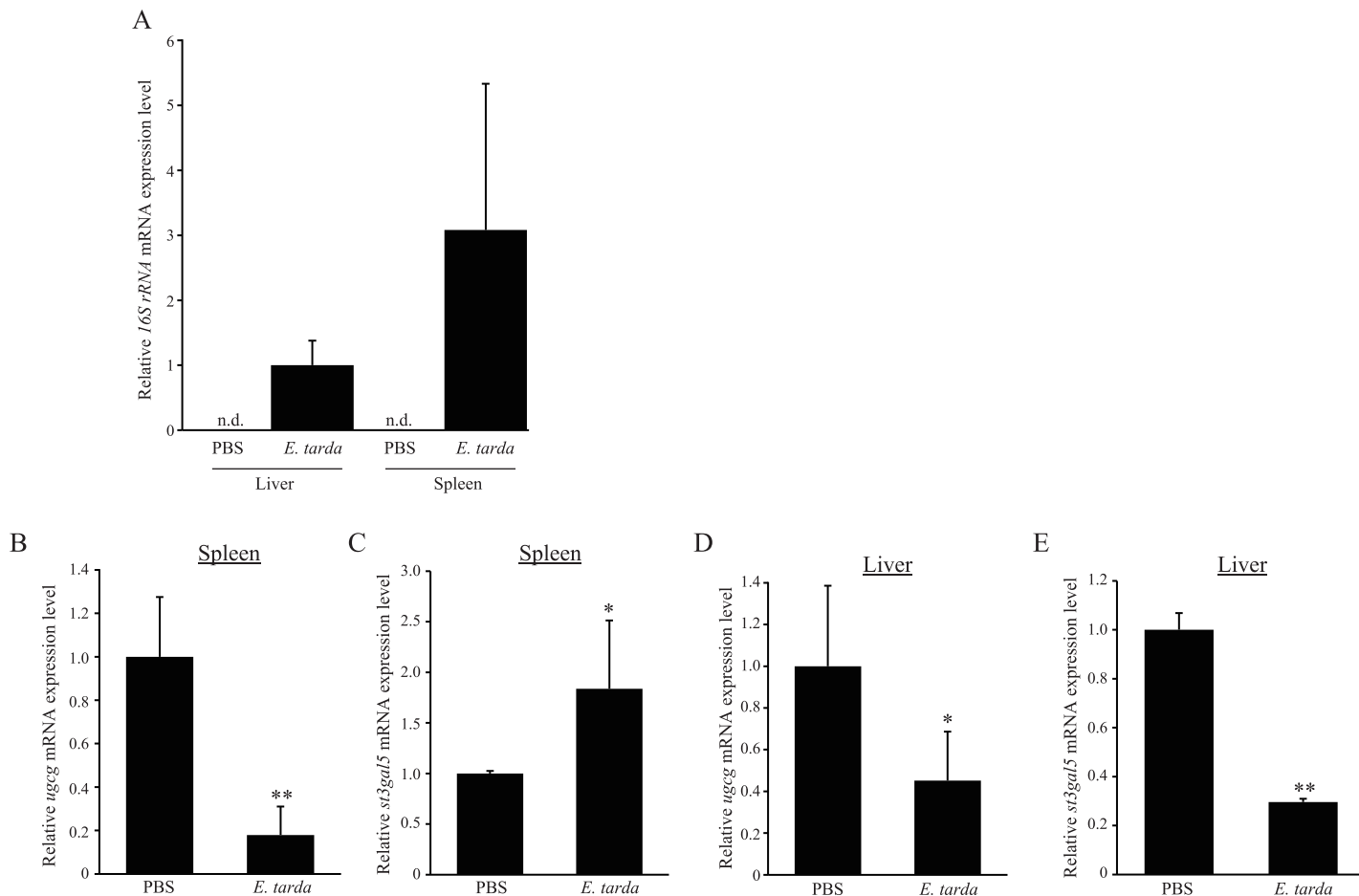


るメダカは LacCer の前駆体である GlcCer の合成を抑制することで *E. tarda* 感染に対して対抗していることが推察された。その一方で、メダカ肝臓では LacCer の分布は認められていない。*E. tarda* 感染は、飼育水の水質悪化や高水温といったストレス環境下において促進される(Parke et al., 2012)。2章の結果から、絶食時のメダカ肝臓で、*neu3a* の発現が増加し、LacCer が蓄積することが明らかになっている。*E. tarda* は日和見感染菌であることから、絶食や高水温などの高ストレスにより LacCer の蓄積が誘導されることで感染が促進されている可能性が示唆された。以上の結果から、メダカはスフィンゴ糖脂質の合成系を変化させ、LacCer 含量を変化させることで *E. tarda* の感染に対抗していることが推察された。さらに、LacCer は哺乳類だけでなく魚類においても細菌感染を制御する重要な分子であることが明らかになった。これらの結果から明らかになった *E. tarda* の予想感染メカニズムを Fig. 3-7 に示した。健康な魚では LacCer 含量が低く、*E. tarda* は宿主細胞を認識することができず、感染は成立しない(Fig. 3-7 左図)。しかし、絶食や高水温などの高ストレスにより LacCer の蓄積が誘導されるような条件下にある場合は、宿主細胞の LacCer 発現量が増加し、*E. tarda* が宿主細胞を認識し、接着することが容易になり、感染が引き起こされる可能性が示唆された(Fig. 3-7 右図)。また、細菌の接着部位としての役割以外にも、LacCer 含量の変化が、膜輸送やエンドサイトーシスに影響することが報告されていることから(Sillence et al., 2002; Sharma et al., 2004; Singh et al., 2007, 2010)、LacCer が宿主細胞内に侵入した後の *E. tarda* の細胞内輸送にも関与している可能性がある。今後、LacCer が接着以降の感染ステップにも

関与しているのかを明らかにすることで、*E. tarda* 感染時の宿主 LacCer の役割をより深く理解することができると思う。

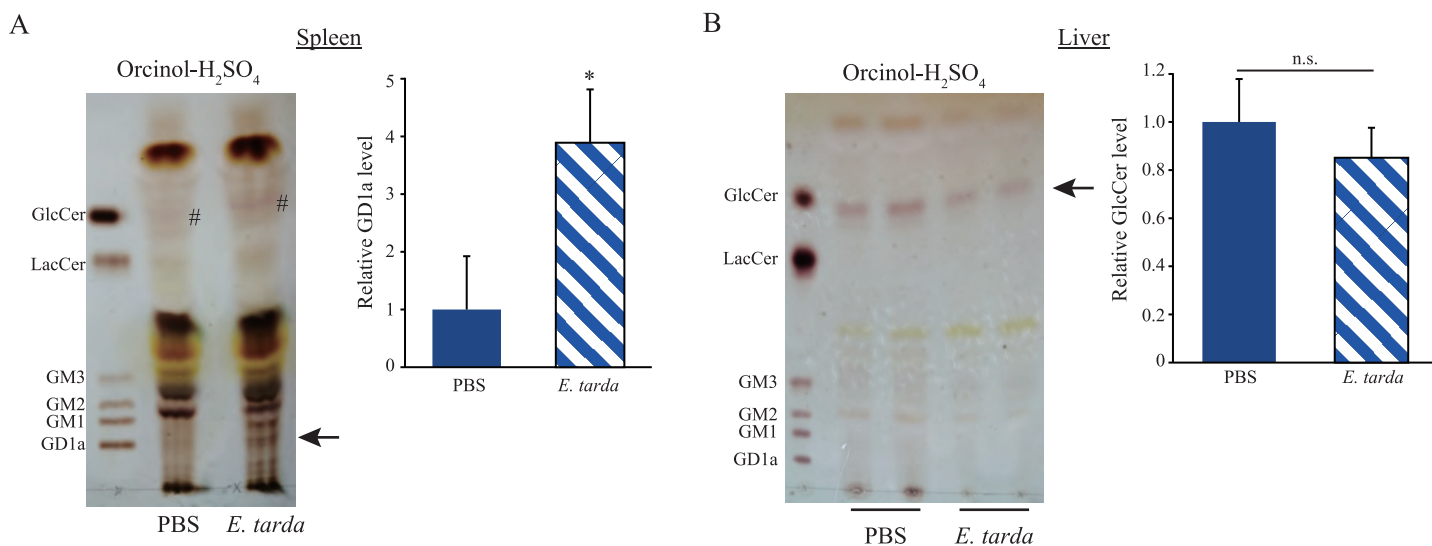
**Table 3-1 real-time PCR に用いたプライマーセット**

Gene name	Accession number	Product size (bp)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>16S rRNA</i>	CP023706	499	TGCAAGTCGAGCGGTAGCAG	AACGCTTGCACCCCTCCGTAT
<i>ugcG</i>	XM_004084439	153	ACCTTCACAAGAAAGAGTCAAGAGG	ACAGCAGGATCTCGTACTTTGGGT
<i>st3gal5</i>	XM_020706740	257	AGTCCGAAATCCCAGTCAGAGGAGT	CACCACTGCTACGAAACAGAGTATGTG
<i>actb</i>	NM_001104808	183	CCCTGGAATCCGACACAGAA	GGGCCAGACTCATCGTACTC



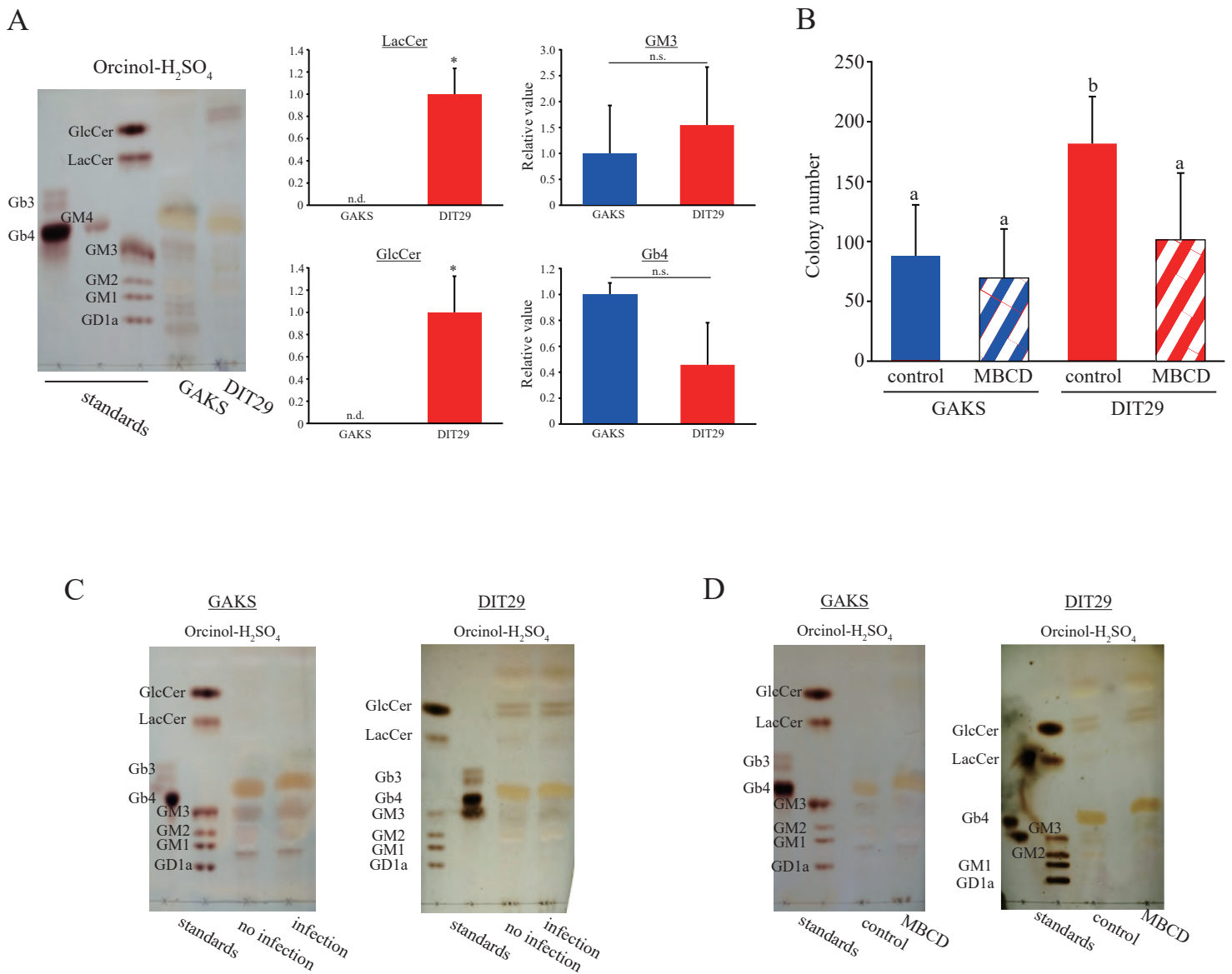
**Fig. 3-1** *E. tarda* 感染メダカにおけるスフィンゴ糖脂質代謝関連遺伝子の発現量変化

*E. tarda* 感染から 24 時間後にメダカから脾臓および肝臓を摘出し、*E. tarda* 16S rRNA (A)、メダカ *ugcg* (B, D) および *st3gal5* (C, E) の発現量を real-time PCR で解析した。内部標準はメダカ *actb* を用いた。遺伝子発現は感染魚の肝臓 (A) または PBS 試験区 (B-E) を 1 として、相対値で表した。(n=3, \*\*,  $p<0.01$ ; \*,  $p<0.05$ ; n.d., not detected)



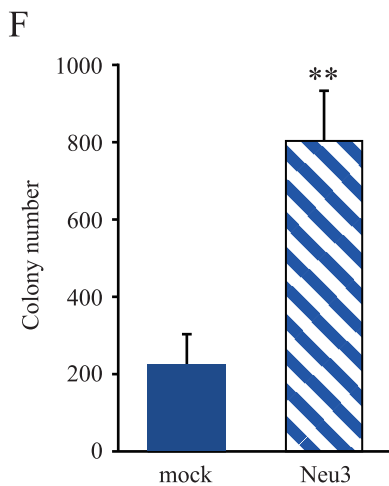
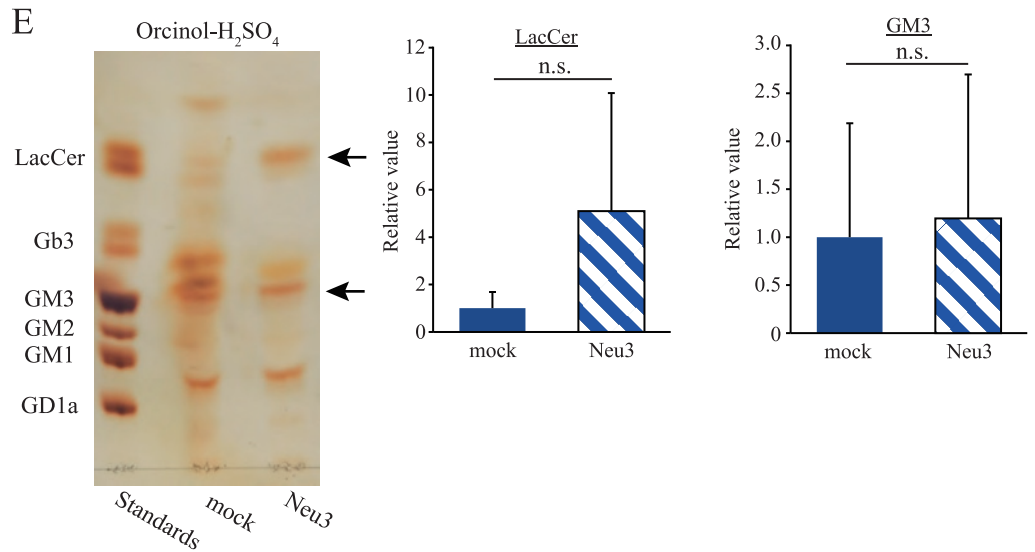
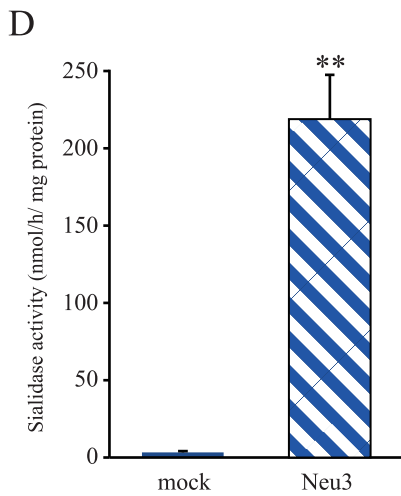
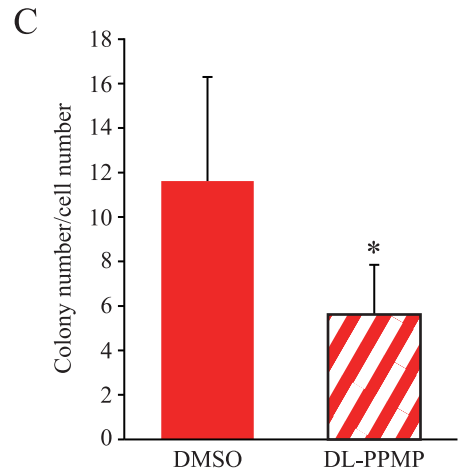
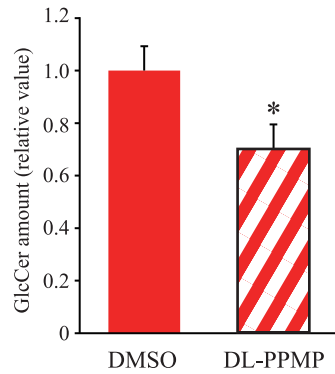
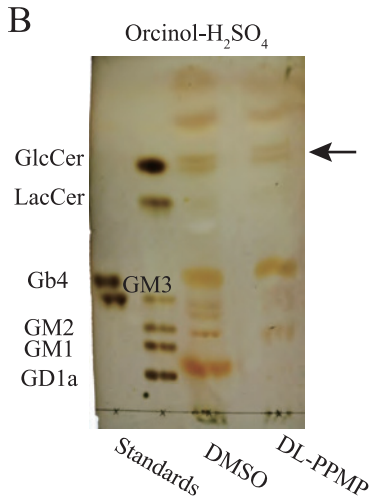
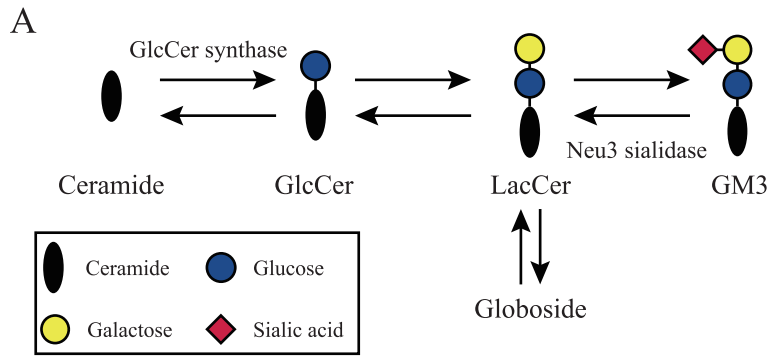
**Fig. 3-2** *E. tarda* 感染メダカにおけるスフィンゴ糖脂質組成の変化

*E. tarda* 感染から 24 時間後にメダカから脾臓 (A) および肝臓 (B) を摘出し、スフィンゴ糖脂質を抽出後、TLC に供した (左図)。定量は Quantity One software を用いて行った (右図)。スフィンゴ糖脂質量は、PBS 試験区を 1 として、相対値で表した。矢印は GD1a (A) と GlcCer (B) をそれぞれ表している。# は、脾臓由来の色素である。(n=3, \*,  $p<0.05$ ; n.s., not significance)



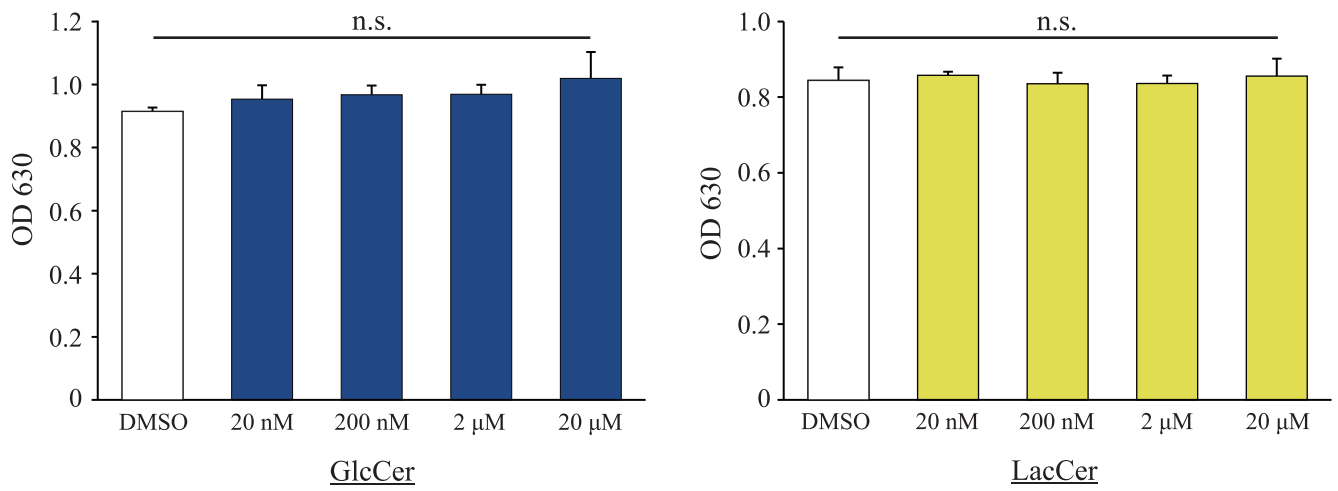
**Fig. 3-3 魚類培養細胞を用いた *E. tarda* 感染実験**

(A) GAKS および DIT29 細胞からスフィンゴ糖脂質を抽出し、TLC にてその組成を解析した。発色は 0.5% オルシノール硫酸を用いた。スフィンゴ糖脂質の定量は Quantity One software を用いた ( $n=3$ , \*,  $p<0.05$ ; n.s., not significance)。 (B) 膜マイクドメインが *E. tarda* 感染に与える影響を評価するため、1 mM MBCD で 10 分間 GAKS および DIT29 細胞を処理した。その後、MBCD を洗い流し、*E. tarda* (MOI=10) を 28°C で 1 時間感染させた。*E. tarda* 感染後、抗生物質処理を行い、TSA プレートに塗抹した。24 時間培養後にコロニー数をカウントし、感染度を評価した。多群間の比較は多重検定により行い、異なるアルファベット間で有意な差があることを示している。*E. tarda* 感染細胞 (C) および MBCD 処理細胞からスフィンゴ糖脂質を抽出し、TLC にてその組成を解析した。発色は 0.5% オルシノール硫酸を用いた。



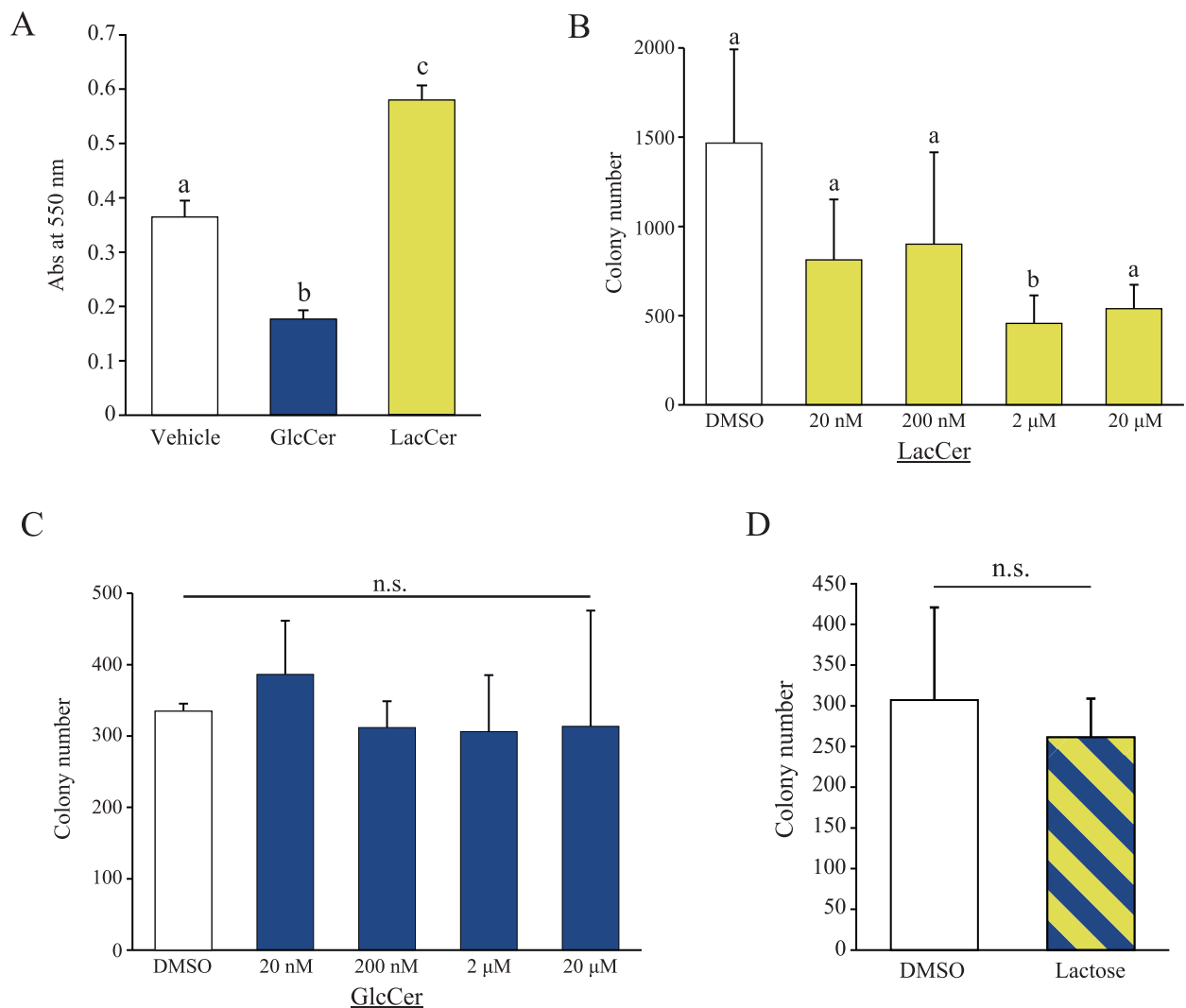
**Fig. 3-4 スフィンゴ糖脂質の発現を変化させた魚類培養細胞を用いた感染実験**

(A) ガングリオ系列およびグロボ系列スフィンゴ糖質の代謝経路を表している。(B)GlcCer 合成酵素阻害剤で処理した DIT29 細胞からスフィンゴ糖脂質を抽出し、TLC にてその組成を比較した (左図)。発色は 0.5% オルシノール硫酸を用いた。定量は Qnantity One software を用いた (右図)(n=3, \*, p<0.05)。矢印は GlcCer を表している。(C) スフィンゴ糖脂質の合成系が *E. tarda* 感染に与える影響を評価するため、DIT29 細胞を GlcCer 合成酵素阻害剤で 3 日間処理し、*E. tarda* (MOI=10) を感染させた。24 時間培養後に、コロニー数をカウントし、感染度を評価した (n=3, \*, p<0.05)。(D) *neu3a* 遺伝子導入細胞のシアリダーゼ活性を HPLC を用いて測定した。基質に、Mix gangliosides を用いて、pH 4.2、37°C で 1 時間反応させた (n=3, \*\*, p<0.01)。(E) *neu3a* 遺伝子を導入した細胞からスフィンゴ糖脂質を抽出し、TLC にてその組成を比較した。発色は 0.5% オルシノール硫酸を用いた。定量は、Qnantity One software を用いた (n=3, not significance)。矢印は LacCer (上) と GM3 (下) を表している。(F) *neu3a* 遺伝子導入細胞を用いて *E. tarda* 感染実験 (MOI=100) を行った。24 時間培養後に、コロニー数をカウントし、感染度を評価した (n=3, \*\*, p<0.01)



**Fig. 3-5 LacCer および GlcCer の毒性評価**

*E. tarda* に与える毒性を評価するため、0-20 μM GlcCer または LacCer を添加した培地で *E. tarda* を 28°C で 1 時間培養した。その後、培地の濁度 (OD 630) を分光光度計で測定した。(n=3, n.s., not significance)

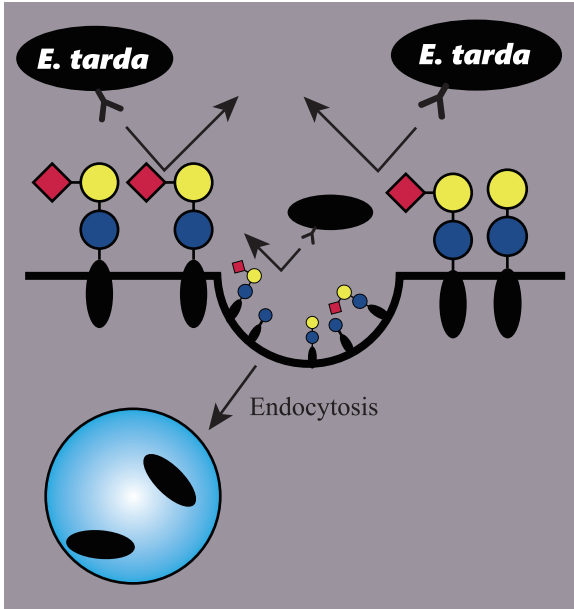


**Fig. 3-6 LacCer を介した *E. tarda* 感染メカニズムの検討**

(A) *E. tarda* の糖脂質結合能を調べるため、GlcCer または LacCer をコートした well に *E. tarda* を曝露し、その接着した数をクリスタルバイオレットを用いて評価した。多群間の比較は多重検定を行った。異なるアルファベット間で有意な差があることを示している。LacCer (B)、GlcCer (C) およびラクトース (D) が *E. tarda* 感染に与える影響を評価するため、*E. tarda* 懸濁液に 0-20 μM LacCer、GlcCer または 2 μM ラクトースを添加し、28°C で 1 時間培養した。培養後、LacCer、GlcCer またはラクトースを取り除き、細胞に感染させた。その後、抗生物質処理を行い、TSA プレートに塗抹し、24 時間培養後にコロニー数を用いて感染度を評価した。多群間の比較は多重検定を行った。異なるアルファベット間で有意な差があることを示している。(n.s., not significance)

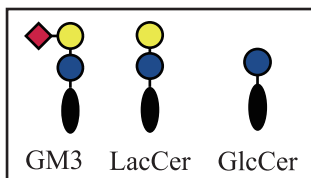
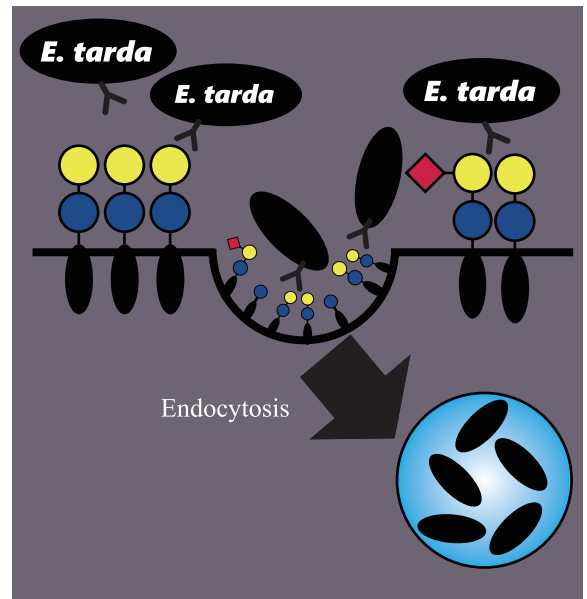
Low LacCer expressing cell

Reduced *E. tarda* infection through microdomain



High LacCer expressing cell

Increased *E. tarda* infection



**Host LacCer levels regulate *E. tarda* infection**

Fig. 3-7 LacCer を介した *E. tarda* の予想感染メカニズム



## 4 総合考察

## 4 総合考察

スフィンゴ糖脂質は、セラミド部分を細胞膜に埋め込み、糖鎖部分を細胞外に露出した状態で細胞膜上に存在している。魚類においては、マダイやカツオ、サンマといった食用魚からゼブラフィッシュやメダカといった小型魚類で、スフィンゴ糖脂質の組織分布が報告されている(Fenderson et al., 1992; Hildebrandt et al., 1999; Duan et al., 2010; Yamakawa et al., 2018)。

一方、これまでの研究では、魚種間および組織間のスフィンゴ糖脂質の組成について比較は行われているものの、それらスフィンゴ糖脂質が魚類においてどのような生理的な役割を担っているのかについてはほとんど研究が行われていない。哺乳類では、肝臓や脂肪組織などにおいてスフィンゴ糖脂質組成の変化が糖・脂質代謝に影響することや(Tagami et al., 2002; Sasaki et al., 2003)、膜マイクロドメインに存在するスフィンゴ糖脂質が、膜タンパク質と相互作用することでシグナル伝達を制御していることが報告されている(Iwabuchi et al., 2010; Russo et al., 2016)。また、細菌やウイルスが宿主の膜マイクロドメインや細胞膜上のスフィンゴ糖脂質を認識し、接着することで感染の引き金になることもわかっている(Heung et al., 2006; Kunz and Kozjak-Pavlovic 2019)。このように哺乳類ではスフィンゴ糖脂質が様々な生理機能を担っていることから、魚類においても同様に多様な生理機能への関与が予想された。

そこで本研究では、肝臓に存在するスフィンゴ糖脂質に注目し、その生理機能の解析を行った。一般に、魚類肝臓のスフィンゴ糖脂質の含有量は、脳に次いで高い傾向を示す

(Fenderson et al., 1992; Hildebrandt et al., 1999; Duan et al., 2010; Yamakawa et al., 2018)。魚類は肝臓を主な脂質蓄積部位とし(Ando and Mori 1993; Weil et al., 2013; Kaneko et al., 2016a)、肝臓に貯蔵されたトリグリセリド(TG)は、栄養状態の悪化に伴いエネルギー源として動員される(Han et al., 2011; Kaneko et al., 2016b)。さらに、肝臓は栄養物質の代謝だけでなく、血液成分の調整や異物の分解など魚類の生命維持に関わる重要な働きを担っている。そこで本研究では、特に肝臓の機能において重要と思われる脂質代謝に注目してスフィンゴ糖脂質の意義について解析した。さらに魚類肝臓は、種々の魚病細菌の標的臓器である一方で、その感染メカニズムが不明なものが多い。そのため、それらの魚病細菌がどのようなメカニズムで肝臓に感染するのかを理解することは、養殖魚の健康管理の点から、産業的意義が大きいと思われる。そこで、本研究では感染時に肝臓を標的の1つにする *E. tarda* の感染機序についても、スフィンゴ糖脂質に着目して解析を進めた。本研究のように、エネルギー代謝や細菌感染における肝臓スフィンゴ糖脂質の機能を明らかにすることは、魚類における肝臓の重要性をより深く理解するうえで学術的に意義があると思われる。

まず2章では、魚類スフィンゴ糖脂質が肝臓の脂質代謝に与える影響について検討した。その結果、絶食により肝臓中の TG をエネルギー源として消費しているメダカでは、ガングリオシドの脱シアリル化を担っている *neu3a* の遺伝子発現が増加していた。そこで、魚類培養細胞を用いてガングリオシド脱シアリル化が脂質代謝に与える影響について検討したところ、*Neu3a* によるガングリオシド脱シアリル化により蓄積した LacCer がリパーゼの活性

化を誘導し、その結果 TG 分解が促進されていることが示唆された。魚類肝臓のスフィンゴ糖脂質組成は魚種間で違いが認められるが(Ostrander et al., 1991; Hildebrandt et al., 1999; Tanaka and Okamura, 1999; Duan et al., 2010; Yamakawa et al., 2018)、この違いがどのような生理的意味を持つのかについては現在のところよくわかっていない。しかし、2章の結果から、魚種間での肝臓のスフィンゴ糖脂質組成の違いおよびその代謝系の変化がリパーゼの活性を介した脂質代謝に影響を与えることが推察された。モザンビークティラピア *Oreochromis mossambicus* やマアジ *Trachurus japonicus* といった淡水域や沿岸域に棲息する魚の肝臓では GM3 含量が高いのに対し、カツオ *Katsuwonus pelamis* やマサバ *Scomber japonicus* といった回遊性で遊泳能力が高い魚の肝臓は GM4 を多く含んでいる(Hildebrandt et al., 1999; Saito et al., 2001)。GM3 および GM4 の非還元末端からシアル酸が遊離すると、それぞれ LacCer およびガラクトシルセラミド(GalCer)になる。一般に、ガングリオシド糖鎖の非還元末端からのシアル酸の遊離は、シアリダーゼ Neu3 が担っている。魚類 Neu3 が GM4 を良い基質とするかは明らかになっていないが、哺乳類 Neu3 は GM4 を基質とする。また、脊椎動物間の Neu3 の保存性は非常に高いことから、GM4 は魚類 Neu3 の基質である可能性が高い。肝臓 GM3 含量の高いマアジは沿岸に定住するが、GM4 を主とするカツオなどは長距離を移動する回遊魚であり、移動期間中に長期間の絶食に晒されやすい。そのため、カツオやマサバといった回遊魚は、肝臓の主要なガングリオシドを GM3 ではなく GM4 にすることで、LacCer の蓄積を抑制し、リパーゼの活性化を抑え、TG 分解の速度を調節している可能性が推察さ

れた。

さらに3章において、この LacCer は、*E. tarda* 感染に深く関わる分子でもあることが明らかとなった。*Edwardsiella* 属細菌は宿主細胞の膜マイクロドメインからエンドサイトーシスを介して細胞内に侵入することが、哺乳類培養細胞を用いた解析から明らかになっている (Sui et al., 2017; Hu et al., 2019)。しかし、その詳細な機序については不明であった。本研究の結果から、魚類培養細胞でも膜マイクロドメインを破壊すると *E. tarda* の細胞内への侵入が抑制されることから、膜マイクロドメインに存在する分子が感染に関与していることが明らかになった。そこで、膜マイクロドメインに存在するスフィンゴ糖脂質に着目して解析したところ、スフィンゴ糖脂質の合成系を阻害した細胞では *E. tarda* の感染が抑制され、一方で魚類 Neu3 遺伝子導入により LacCer 含量が増加した細胞では、*E. tarda* の感染が促進されることが明らかになった。また、LacCer を曝露した *E. tarda* は宿主細胞への感染が減少することから、LacCer は *E. tarda* 感染時に足場として利用されていることが示唆された。本研究の結果から、マイクロドメインに存在する LacCer が、*E. tarda* 感染を促進する責任分子であることが初めて明らかとなった。

*E. tarda* は、マダイやヒラメ、ウナギ、ティラピアに感染し、エドワジエラ症を発症する (Parke et al., 2012)。マダイの肝臓では GM4 が、ヒラメが属するカレイ目魚類では GM2 が、ティラピアが属するカワスズメ目では GM3 が、主なガングリオシドである (Ostrander et al., 1988; Hildebrandt et al., 1999; Saito et al., 2001)。また、ウナギ肝臓のガングリオシド組成に関

しては報告がないが、GM3 が存在することがわかっている(大石、未発表データ)。このように、*E. tarda* 感受性が高い魚種間でのスフィンゴ糖脂質組成は異なっており、感受性が高い魚種に特徴的なスフィンゴ糖脂質組成は認められない。このことは、魚種特有のスフィンゴ糖脂質組成よりも、生理状態に応じてスフィンゴ糖脂質組成が変化することが *E. tarda* 感染に影響している可能性を示唆している。マダイやヒラメなどのように GM3 以外のガングリオシドが肝臓の主なガングリオシドである魚種でも、少ないながら GM3 の存在は確認されている(Ostrander et al., 1988; Hildebrandt et al., 1999; Saito et al., 2001)。これらの魚種では、水温や栄養状態により生理状態が変化することで、GM3 または LacCer の含量が優位になることで *E. tarda* 感染感受性が増加している可能性が推察された。さらに 2 章と 3 章の結果を総合的に考えると、スフィンゴ糖脂質による肝臓脂質代謝の変化とエドワジエラ症の発症との関連性が考察できる。すなわち、本研究の結果から以下のような仮説が提唱される：1) *E. tarda* は、健康な魚の腸管に常在菌として分布しており、日和見感染をする(Muratori et al., 2000; Liu et al., 2014)、2) 養殖魚の栄養状態が良好な条件下では、*E. tarda* は感染しても宿主の免疫システムにより排除される、3) しかし、栄養状態が悪化し、肝臓などの脂質蓄積部位に貯蔵されている脂質が動員される様な条件下では、Neu3 によるガングリオシド脱シリアル化を介した TG 分解が活性化しており、この現象に関与する LacCer が宿主細胞に蓄積する、4) LacCer は *E. tarda* 感染の足場となる分子の 1 つであるため、標的臓器において LacCer 含量が高い魚は *E. tarda* に感染する。この仮説を証明するためには、1) 肝臓のスフ

インゴ糖脂質組成が異なる魚を用意し、絶食条件下で LacCer の含量が変化するのか、2) この魚を用いて *E. tarda* 感染実験を行った際に感染度に違いが認められるのかについて検討する必要があり、今後の課題である。

本研究の結果から、LacCer が脂質代謝および *E. tarda* 感染を制御する重要な分子であることが明らかになった。今後は、他のスフィンゴ糖脂質がどのような生理機能を担っているのかを明らかにすることで、養殖業などの産業への応用が期待される。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり多大なるご指導ご鞭撻をいただきました鹿児島大学水産学部  
塩崎一弘准教授に心よりお礼申し上げます。

研究を遂行するにあたり適切な助言をいただきました鹿児島大学水産学部 小松正治教  
授、鹿児島大学農学部 藤田清貴准教授、佐賀大学農学部 濱洋一郎教授、琉球大学農学部 金  
子哲教授にお礼申し上げます。

実験を進めるにあたり協力をいただいた鹿児島大学水産学部小谷研究室の早坂央希さん、  
塩崎研究室の皆さん、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科整形外科学教室の皆さんには感  
謝いたします。

最後に、大学院博士課程まで勉学に専念することに理解してくれた両親に深く感謝いた  
します。



## 参考文献

- Abul-Milh, M., Paradis, S.É., Dubreuil, J.D., and Jacques, M. (1999) Binding of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides to glycosphingolipids evaluated by thin-layer chromatography. *Infect Immun* **67**: 4983–4987.
- Ahn, H.H., Lee, J.H., Kim, K.S., Lee, J.Y., Kim, M.S., Khang, G., *et al.* (2008) Polyethyleneimine-mediated gene delivery into human adipose derived stem cells. *Biomaterials* **29**: 2415–2422.
- Ando, S., and Mori, Y. (1993) Characteristics of serum lipoprotein features associated with lipid levels of muscle and liver from five species of fish. *Nippon Suisan Gakkaishi* **59**: 1565–1571.
- Ångström, J., Teneberg, S., Milh, M.A., Larsson, T., Leonardsson, I., Olsson, B.M., *et al.* (1998) The lactosylceramide binding specificity of *Helicobacter pylori*. *Glycobiology* **8**: 297–309.
- Asmat, T.M., Agarwal, V., Saleh, M., and Hammerschmidt, S. (2014) Endocytosis of *Streptococcus pneumoniae* via the polymeric immunoglobulin receptor of epithelial cells relies on clathrin and caveolin dependent mechanisms. *Int J Med Microbiol* **304**: 1233–1246.
- Bergan, H.E., Kittilson, J.D., and Sheridan, M.A. (2012) Nutrition-regulated lipolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is associated with alterations in the ERK, PI3K-Akt, JAK-STAT, and PKC signaling pathways. *Gen Comp Endocrinol* **176**: 367–376.

Bergan, H.E., Kittilson, J.D., and Sheridan, M.A. (2015) Nutritional state modulates growth hormone-stimulated lipolysis. *Gen Comp Endocrinol* **217-218**: 1–9.

Bergan-Roller, H.E. and Sheridan, M.A. (2018) The growth hormone signaling system: Insights into coordinating the anabolic and catabolic actions of growth hormone. *Gen Comp Endocrinol* **258**: 119–133.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997) The SREBP pathway : Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **89**: 331–340.

Chigwechokha P.K., Komatsu, M., Itakura, T., and Shiozaki, K. (2014) Nile Tilapia Neu3 sialidases : Molecular cloning, functional characterization and expression in *Oreochromis niloticus*. *Gene* **552**: 155–164.

Chigwechokha P.K., Tabata, M., Shinyoshi, S., Oishi, K., Araki K., Komatsu, M. *et al.* (2015) Recombinant sialidase NanA (rNanA) cleaves  $\alpha$ 2-3 linked sialic acid of host cell surface N-linked glycoprotein to promote *Edwardsiella tarda* infection. *Fish Shellfish Immunol* **47**: 34–45.

Chisada, S., Horibata, Y., Hama, Y., Inagaki, M., Furuya, N., Okino, N., and Ito, M. (2005) The glycosphingolipid receptor for *Vibrio trachuri* in the red sea bream intestine is a GM4 ganglioside which contains 2-hydroxy fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* **333**: 367–373.

Chisada, S., Shimizu, K., Kamada, H., Matsunaga, N., Okino, N., and Ito, M. (2013) Vibrios adhere to epithelial cells in the intestinal tract of red sea bream, *Pagrus major*, utilizing GM4 as an attachment site. *FEMS Microbiol Lett* **341**: 18–26.

Choi, H., Jin, U., Kang, S., Abekura, F., Park, J., Kwon, K., *et al.* (2017) Monosialyl ganglioside GM3 decreases apolipoprotein B-100 secretion in liver cells. *J Cell Biochem* **118**: 2168–2181.

Cohen, B., Shamay, A., and Argov-Argman, N. (2015) Regulation of lipid droplet size in mammary epithelial cells by remodeling of membrane lipid composition - A potential mechanism. *PLoS One* **10**: e0121645.

Colins, A.L. and Anderson T.A. (1995) The regulation of endogeneous energy stores during starvation and refeeding in the somatic tissues of the golden perch. *J Fish Biol* **47**:1004–1015.

Doronin, I.I., Vishnyakova, P.A., Kholodenko, I.V., Ponomarev, E.D., Ryazantsev, D.Y., Molotkovskaya, I.M., and Kholodenko, R.V. (2014) Ganglioside GD2 in reception and transduction of cell death signal in tumor cells. *BMC Cancer* **14**: 295.

Duan, J., and Sugawara, T. (2010) Rapid quantitative analysis of sphingolipids in seafood using HPLC with evaporative light- scattering detection : Its application in tissue distribution of sphingolipids in fish. *J Oleo Sci* **513**: 509–513.

Fenderson, B.A., Ostrander, G.K., Hausken, Z., Radin, N.S., Hakomori, S. (1992) A ceramide analogue (PDMP) inhibits glycolipid synthesis in fish embryos. *Exp Cell Res* **198**: 362–366.

Freysz, L., Farooqui, A.A., Horrocks, L.A., Massarelli, R and Dreyfus, H. (1991) Stimulation of mono- and diacylglycerol lipase activities by gangliosides in chicken neuronal cultures. *Neurochem Res* **16**: 1241–1244.

Fujita, A., Cheng, J., Hirakawa, M., Furukawa, K., Kusunoki, S., and Fujimoto, T. (2007) Gangliosides GM1 and GM3 in the living cell membrane form clusters susceptible to cholesterol depletion and chilling. *Mol Biol Cell* **18**: 2112–2122.

Garner, B., Priestman, D.A., Stocker, R., Harvey, D.J., Butters, T.D., and Platt, F.M. (2002) Increased glycosphingolipid levels in serum and aortae of apolipoprotein E gene knockout mice. *J Lipid Res* **43**: 205–214.

Hakomori, S., and Igarashi, Y. (1995) Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling. *J Biochem* **118**: 1091–1103.

Han, C., Wen, X., Zheng, Q., and Li, H. (2011) Effect of starvation on activities and mRNA expression of lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Fish Physiol Biochem* **37**: 113–122.

He, A., Ning, L., Chen, L., Chen, Y., Xing, Q., Li, J., *et al.* (2015) Systemic adaptation of lipid metabolism in response to low- and high-fat diet in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Physiol Rep* **3**: e12485.

Heung, L.J., Luberto, C., and Poeta, M.D. (2006) Role of sphingolipids in microbial pathogenesis.

*Infect Immun* **74**: 28–39.

Hildebrandt, H., Jonas, U., Ohashi, M., Klaiber, I., and Rahmann, H. (1999) Direct electrospray-

ionization mass spectrometric analysis of the major ganglioside from crucian carp liver after thin

layer chromatography. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **122**: 83–88.

Hofman, E.G., Ruonala, M.O., Bader, A.N., Heuvel, D., Voortman, J., Roovers, R.C., *et al.* (2008)

EGF induces coalescence of different lipid rafts. *J Cell Sci* **121**: 2519–2528.

Holmgren J., Lonroth I., Mansson J.E., and Svennerholm L. (1975) Interaction of cholera toxin and

membrane GM1 ganglioside of small intestine. *Proc Nat Acad Sci USA* **72**: 2520–2524.

Hu, T., Zhang, L., Wang, W., Yang, D., Xiao, J., Zhang, Y., and Liu, X. (2019) *Edwardsiella*

*piscicida* enters nonphagocytic cells via a macropinocytosis-involved hybrid mechanism. *J Bacteriol*

**201**: e00548-18.

Ichikawa, S., Ozawa, K., and Hirabayashi, Y. (1998) Molecular cloning and characterization of the

mouse ceramide glucosyltransferase gene. *Biochem Biophys Res Commun* **253**: 707–711.

Inamori, K., Ito, H., Tamura, Y., Nitta, T., Yang, X., Nihei, W. *et al.* (2018) Deficient ganglioside

synthesis restores responsiveness to leptin and melanocortin signaling in obese KKAY mice. *J Lipid*

*Res* **59**: 1472–1481.

Ince, B.W. and Thorpe, A. (1976) The effects of starvation and force-feeding on the metabolism of the Northern pike, *Esox Lucius* L. *J Fish Biol* **8**:79–88.

Iwabuchi, K., Nakayama, H., Iwahara, C., and Takamori, K. (2010) Significance of glycosphingolipid fatty acid chain length on membrane microdomain-mediated signal transduction. *FEBS Lett* **584**: 1642–1652.

Joh, S., Kim, M., Kwon, H., Ahn, E., Jang, H., and Kwon, J. (2010) Characterization of *Edwardsiella tarda* isolated from farm-cultured eels, *Anguilla japonica*, in the Republic of Korea. *J Vet Med Sci* **73**: 7–11.

Kabayama, K., Sato, T., Saito, K., Loberto, N., Prinetti, A., Sonnino, S., *et al.* (2007) Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 13678–13683.

Kaneko, G., Shirakami, H., Hirano, Y., Oba, M., Yoshinaga, H., Khieokhajonkhet, A., *et al.* (2016a) Diversity of lipid distribution in fish skeletal muscle. *Zool Sci* **33**: 170–178.

Kaneko, G., Shirakami, H., Yamada, T., Ide, S., Haga, Y., Satoh, S., and Ushio, H. (2016b) Short-term fasting increases skeletal muscle lipid content in association with enhanced mRNA levels of lipoprotein lipase 1 in lean juvenile red seabream (*Pagrus major*). *Aquaculture* **452**: 160–168.

Kang, S., Jin, U., Kim, K., Lee, Y., Park, Y., and Kim, C. (2007) Disialoganglioside GD3 increases in the secretion of apoB-containing lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* **356**: 418–423.

Karlsson, K. (1989) Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Annu Rev Biochem* **58**: 309–350.

Kim, S., Watarai, M., Suzuki, H., Makino, S., Kodama, T., and Shirahata, T. (2004) Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*. *Microb Pathog* **37**: 11–19.

Kittilson, J.D., Reindl, K.M., and Sheridan, M.A. (2011) Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess two hormone-sensitive lipase-encoding mRNAs that are differentially expressed and independently regulated by nutritional state. *Comp Biochem Physiol Part A* **158**: 52–60.

Kondo, H., Misaki, R., and Watabe, S. (2010) Transcriptional activities of medaka *Oryzias latipes* peroxisome proliferator-activated receptors and their gene expression profiles at different temperatures. *Fish Sci* **76**: 167–175.

Kunz, T.C., and Kozjak-pavlovic, V. (2019) Diverse facets of sphingolipid involvement in bacterial infections. *Front Cell Dev Biol* **7**: 203.

Lafont, F., Tran Van Nhieu, G., Hanada, K., Sansonetti, P., and van der Goot, F.G. (2002) Initial steps of *Shigella* infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction. *EMBO J* **21**: 4449–4457.

Li, H., Xu, W., Jin, J., Yang, Y., Zhu, X., Han, D., *et al.* (2018) Effects of starvation on glucose and lipid metabolism in gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III). *Aquaculture* **496**: 166–175.

- Li, K. (1992) Determination of sialic acids in human serum by reversed-phase liquid chromatography with fluorimetric detection. *J Chromatogr* **579**: 209–213.
- Li, Y., Sugiyama, E., Ariga, T., Nakayama, J., Hayama, M., Hama, Y., *et al.* (2002) Association of GM4 ganglioside with the membrane surrounding lipid droplets in shark liver. *J Lipid Res* **43**: 1019–1025.
- Lingwood, C.A. (2011) Glycosphingolipid functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**: a004788.
- Liu, X., Chang, X., Wu, H., Xiao, J., Gao, Y., and Zhang, Y. (2014) Role of intestinal inflammation in predisposition of *Edwardsiella tarda* infection in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol* **41**: 271–278.
- Manzoni, M., Colombi, P., Papini, N., Rubaga, L., Tiso, N., Preti, A., *et al.* (2007) Molecular cloning and biochemical characterization of sialidases from zebrafish (*Danio rerio*). *Biochem J* **406**: 395–406.
- Matsuyama, T., Fujiwara, A., Nakayasu, C., Kamaishi, T., Oseko, N., and Hirono, I., *et al.* (2007) Gene expression of leucocytes in vaccinated Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) during the course of experimental infection with *Edwardsiella tarda*. *Fish Shellfish Immunol* **22**: 598–607.
- Méndez, G., and Wieser, W. (1993) Metabolic responses to food deprivation and refeeding in juveniles of *Rutilus rutilus* (Teleostei : Cyprinidae). *Environ Biol Fish* **36**: 73–81.



Miljan, E.A., Meuillet, E.J., Mania-Farnell, B., George, D., Yamamoto, H., Simon, H., and Bremer, E.G. (2002) Interaction of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor with gangliosides. *J Biol Chem* **277**: 10108–10113.

Miyagi, T. (2010) Mammalian sialidase and their functions. *Trends Glycosci Glycotechnol* **22**: 162–172.

Mohapatra, S., Chakraborty, T., Shimizu, S., Urasaki, S., Matsubara, T., Nagahama, Y., and Ohta, K. (2015) Starvation beneficially influences the liver physiology and nutrient metabolism in *Edwardsiella tarda* infected red sea bream (*Pagrus major*). *Comp Biochem Physiol Part A* **189**: 1–10.

Muratori, M.C.S., de Oliveira, A.L., Ribeiro, L.P., Leite, R.C., Costa, A.P.R., and da Silva M.C.C. (2000) *Edwardsiella tarda* isolated in integrated fish farming. *Aquac Res* **31**: 481–483.

Nagafuku, M., Sato, T., Sato, S., Shimizu, K., Taira, T., and Inokuchi, J. (2015) Control of homeostatic and pathogenic balance in adipose tissue by ganglioside GM3. *Glycobiology* **25**: 303–318.

Nakamura, H., Moriyama, Y., Makiyama, T., Emori, S., Yamashita, H., Yamazaki, R., and Murayama, T. (2013) Lactosylceramide interacts with and activates cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>α. *J Biol Chem* **288**: 23264–23272.

Nakayama, H., Kurihara, H., Morita, Y.S., Kinoshita, T., Mauri, L., Prinetti A., et al. (2016) Lipoarabinomannan binding to lactosylceramide in lipid rafts is essential for the phagocytosis of mycobacteria by human neutrophils. *Sci Signal* **9**: ra101.

Ostrander, G.K., Bozlee, M., Fukuda, M., Dell, A., Thomas-Oates, J.E., Lavery, S.B., et al. (1991) Isolation and characterization of the major glycosphingolipids from the liver of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Identification of an abundant source of 9-O-Acetyl GD3. *Arch Biochem Biophys* **284**: 413–421.

Ostrander, G.K., Lavery, S.B., Hakomori, S., and Holmes, E.H. (1988) Isolation and characterization of the major acidic glycosphingolipids from the liver of the English sole (*Parophrys vetulus*). *J Biol Chem* **263**: 3103–3110.

Park, S.B., Aoki, T., and Jung, T.S. (2012) Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish. *Vet Res* **43**: 67.

Papini, N., Anastasia, L., Tringali, C., Croci, G., Bresciani, R., Yagaguchi, K., et al. (2004) The plasma membrane-associated sialidase MmNEU3 modifies the ganglioside pattern of adjacent cells supporting its involvement in cell-to-cell interactions. *J Biol Chem* **279**: 16989–16995.

Peyron, P., Bordier, C., N'Diaye, E.N., and Maridonneau-Parini, I. (2000) Nonopsonic phagocytosis of *Mycobacterium Kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 association with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *J Immunol* **165**: 5186–5191.

Puri, C., Tosoni, D., Comai, R., Rabellino, A., Segat, D., Caneva, F., *et al.* (2005) Relationships between EGFR signaling-competent and endocytosis-competent membrane microdomains. *Mol Biol Cell* **16**: 2704–2718.

Russo, D., Parashuraman, S., and D'Angelo, G. (2016) Glycosphingolipid-protein interaction in signal transduction. *Int J Mol Sci* **17**: 1732.

Saito M., Kitamura H. and Sugiyama K. (2001) Liver ganglioside of various animals ranging from fish to mammalian species. *Comp Biochem Physiol Part B* **129**:747–758.

Sakai, T., Kanai, K., Osatomi, K., and Yoshikoshi, K. (2003) Identification of a 19.3-kDa protein MRHA-positive *Edardasiella tarda*: putative fimbrial major subunit. *FEMS Microbiol Lett* **226**: 127–133.

Sasaki, A., Hata, K., Suzuki, S., Sawada, M., Wada, T., Yamaguchi, K., *et al.* (2003) Overexpression of plasma membrane-associated sialidase attenuates insulin signaling in transgenic mice. *J Biol Chem* **278**: 27896–27902.

Sharma, D.K., Brown, J.C., Choudhury, A., Peterson, T.E., Holicky, E., Marks, D.L., Simari, R., Parton, R.G., and Pagano, R.E. (2004) Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. *Mol Biol Cell* **15**: 3114–3122.

Shin, J.S., Gao, S., and Abraham S.N. (2000) Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science* **289**: 785–788.

Shinyoshi, S., Kamada, Y., Matsusaki, K., Chigwechokha, P.K., Tepparin, S., Araki, K., *et al.* (2017) Naringenin suppresses *Edwardsiella tarda* infection in GAKS cells by NanA sialidase inhibition. *Fish Shellfish Immunol* **61**: 86–92.

Shiozaki, K., Takeshita, K., Ikeda, M., Ikeda, A., Harasaki, Y., Komatsu, M., *et al.* (2013) Molecular cloning and biochemical characterization of two novel Neu3 sialidases, *neu3a* and *neu3b*, from medaka (*Oryzias latipes*). *Biochimie* **95**: 280–289.

Shiozaki, K., Uezono, K., Hirai, G., Honda, A., Minoda, M., and Wakata R. (2020) Identification of novel fish sialidase genes responsible for KDN-cleaving activity. *Glycoconj J* **37**: 745–753.

Sillence, D.J., Puri, V., Marks, D.L., Butters, T.D., Dwek, R.A., Pagano, R.E., and Platt, F.M. (2002) Glucosylceramide modulates membrane traffic along the endocytic pathway. *J Lipid Res* **43**: 1837–1845.

Singh, R.D., Holicky, E.L., Cheng, Z., Kim, S., Wheatley, C.L., Marks, D.L., *et al.* (2007) Inhibition of caveolar uptake, SV40 infection, and  $\beta$ 1-integrin signaling by a nonnatural glycosphingolipid stereoisomer. *J Cell Biol* **176**: 895–901.

Singh, R.D., Marks, D.L., Holicky, E.L., Wheatley, C.L., Sato, S.B., Kobayashi, T., *et al.* (2010) Gangliosides and  $\beta$ 1-integrin are required for caveolae and membrane domains. *Traffic* **11**: 348–360.

Situmorang, M.L., Dierckens, K., Mlingi, F.T., Van Delsen, B., and Bossier, P. (2014) Development of a bacterial challenge test for gnotobiotic Nile tilapia *Oreochromis niloticus*

larvae. *Dis Aquat Organ* **109**: 23–33.

Strömberg, N., and Karlsson, K. (1990) Characterization of the binding of *Propionibacterium granulosum* to glycosphingolipids adsorbed on surfaces. *J Biol Chem* **265**: 11244–11250.

Sui, Z., Xu, H., Wang, H., Jiang, S., Chi, H., and Sun, L. (2017) Intracellular trafficking pathways of *Edwardsiella tarda*: From clathrin- and caveolin-mediated endocytosis to endosome and lysosome. *Front Cell Infect Microbiol* **7**: 400.

Tagami, S., Inokuchi, J., Kabayama, K., Yoshimura, H., Kitamura, F., Uemura, S., *et al.* (2002) Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. *J Biol Chem* **277**: 3085–3092.

Takahashi, K., Proshin, S., Yamaguchi, K., Yamashita, Y., Katakura, R., Yamamoto, K., *et al.* (2017) Sialidase NEU3 defines invasive potential of human glioblastoma cells by regulating calpain-mediated proteolysis of focal adhesion proteins. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1861**: 2778–2788.

Tanaka, N., and Okamura, H. (1999) Characteristic distributions of glycosphingolipid composition of Japanese pilchard (sardine). *J Jpn Oil Chem Soc* **48**: 131–135.

Teneberg, S., Ångström, J., and Ljungh, A. (2004) Carbohydrate recognition by enterohemorrhagic *Escherichia coli*: Characterization of a novel glycosphingolipid from cat small intestine. *Glycobiology* **14**: 187–196.

Tian, J., Wen, H., Zeng, L., Jiang, M., Wu, F., Liu, W., and Yang, C. (2013) Changes in the activities and mRNA expression levels of lipoprotein lipase (LPL), hormone-sensitive lipase (HSL) and fatty acid synthetase (FAS) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during fasting and re-feeding. *Aquaculture* **400–401**: 29–35.

Vélez, E.J., Perelló-Amorós, M., Lutfi, E., Azizi, S., Capilla, E., Navarro, I., *et al.* (2019) A long-term growth hormone treatment stimulates growth and lipolysis in gilthead sea bream juveniles. *Comp Biochem Physiol Part A* **232**: 67–78.

Vo, L.K., Tsuzuki, T., Kamada-futagami, Y., Chigwechokha, P.K., Honda, A., Oishi, K., *et al.* (2019) Desialylation by *Edwardsiella tarda* is the initial step in the regulation of its invasiveness. *Biochem J* **476**: 3183–3196.

Wada, A., Hasegawa, M., Wong, P., Shirai, E., Shirai, N., Tan, L., *et al.* (2010) Direct binding of gangliosides to *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) neutralizes its toxin activity. *Glycobiology* **20**: 668–678.

Wang, L., Kaneko, G., Takahashi, S., Watabe, S., and Ushio, H. (2015) Identification and gene expression profile analysis of a major type of lipoprotein lipase in adult medaka *Oryzias latipes*. *Fish Sci* **81**: 163–173.

Watanabe, T., Sakiyama, R., Iimi, Y., Sekine, S., Abe, E., Nomura, K.H., *et al.* (2017) Regulation of TG accumulation and lipid droplet morphology by the novel TLDP1 in *Aurantiochytrium limacinum* F26-b. *J Lipid Res* **58**: 2334–2347.

Weil, C., Lefèvre, F., and Bugeon, J. (2013) Characteristics and metabolism of different adipose tissues in fish. *Rev Fish Biol Fisheries* **23**: 157–173.

Wong, J.D., Miller, M.A., and Janda, J.M. (1989) Surface properties and ultrastructure of *Edwardsiella* species. *J Clin Microbiol* **27**: 1797–1801.

Wu, Z., Rosen, E.D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A.E., *et al.* (1999) Cross-regulation of C/EBP $\alpha$  and PPAR $\gamma$  controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* **3**: 151–158.

Xie, C., Yagai, T., Luo, Y., Liang, X., Chen, T., Wang, Q., *et al.* (2017) Activation of intestinal hypoxia-inducible factor 2a during obesity contributes to hepatic steatosis. *Nat Med* **23**: 1298–1308.

Yamakawa, N., Vanbeselaere, J., Chang, L., Yu, S., Ducrocq, L., Harduin-Lepers, A., *et al.* (2018) Systems glycomics of adult zebrafish identifies organ-specific sialylation and glycosylation patterns. *Nat Commun* **9**: 4647.

Yamaguchi, Y., Furukawa, K., Hamamura, K., and Furukawa, K. (2011) Positive feedback loop between PI3K-Akt-mTORC1 signaling and the lipogenic pathway boosts Akt signaling : Induction of the lipogenic pathway by a melanoma antigen. *Cancer Res* **71**: 4989–4997.

Yoshizumi, S., Suzuki, S., Hirai, M., Hinokio, Y., Yamada, T., Yamada, T., *et al.* (2007) Increased hepatic expression of ganglioside-specific sialidase, *NEU3*, improves insulin sensitivity and glucose tolerance in mice. *Metabolism* **56**: 420–429.

Yu, R.K., Tsai, Y., Ariga, T., and Yanagisawa, M. (2011) Structure, biosynthesis, and functions of gangliosides-An overview. *J Oleo Sci* **60**: 537–544.

Zeller, C.B. and Marchase, R.B. (1992) Ganglioside as modulators of cell function. *Am J Physiol* **262**:C1341–1355.