

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580198

研究課題名（和文）サケ科魚類の成長を司るインスリン様成長因子結合蛋白の同定

研究課題名（英文）Identification of circulating IGF-binding proteins in salmon

研究代表者

清水 宗敬（SHIMIZU MUNETAKA）

北海道大学・大学院水産科学研究院・講師

研究者番号：90431337

研究成果の概要：魚類を含む脊椎動物の成長には、インスリン様成長因子（insulin-like growth factor, IGF）-I が重要な役割を果たしている。しかし、IGF-I の活性は 6 種類の IGF 結合蛋白（IGF-binding protein, IGFBP）によって厳密に調節されている。これらの IGFBP の機能はタイプにより異なるが、大まかに IGF-I を介した成長の「促進型」と「阻害型」に分けられる。サケ科魚類の血中には少なくとも 3 種類の IGFBP が検出されるが、それぞれがどのタイプに相当するのには非常に混乱している。本研究はこれらの IGFBP の同定を行って上述の混乱を解決することを目的としている。まず、サケ科魚類の血中 IGF-I の主要な運搬役であり、成長の「促進型」と考えられている 41 kDa IGFBP（41K BP）および IGFBP-3 の cDNA クローニングを行った。クローニングにより得られた配列を解析したところ、41K BP は IGFBP-2 に最も高い相同性を示した。一方、IGFBP-3 の配列は、41K BP のものとは異なっていた。このことから、41K BP は IGFBP-3 ではなく IGFBP-2 であることが明らかになった。さらにもう一種類の IGFBP をクローニングすると共に、これらの発現解析を行った。新たに得られた IGFBP の演繹アミノ酸配列は IGFBP-2 に最も近かった。また、41K BP も同じタイプに分類されたため、これらは遺伝子の重複によって生じたパラログであると考えられた。両者のアミノ酸配列から、41K BP を IGFBP-2b、そしてもう一方を IGFBP-2a と呼ぶことが妥当であると考えられた。二つの IGFBP-2 の発現は主に肝臓で認められた。一方、IGFBP-3 の発現は肝臓で非常に低く、血中の主要な成分にはなりにくいと考えられた。以上、本研究によってサケ科魚類の 41K BP は、従来推測されていた IGFBP-3 ではなく IGFBP-2 であることが証明され、15 年以上議論されていた問題が解決された。本研究の結果から、サケ科魚類の IGFBP の機能は哺乳類とは大きく異なることが示唆され、脊椎動物の成長のメカニズムを理解する上でユニークなモデルとなる可能性がある。また、魚類の成長のメカニズムを明らかにし、養殖業において効率化を図る上でも、本研究の知見は有用であると考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：生理、内分泌

1. 研究開始当初の背景

水産学において、魚類の成長の仕組みを理解し、それを統御することは最重要課題の一つである。例えば、今後ますます需要が高まる養殖業において、餌料中の蛋白質を動物性から植物性のものへ代替することが提唱されている。しかし、植物性蛋白質のアミノ酸組成は動物性のものと異なることや、植物餌料中に成長を阻害する成分が存在するなど問題が多い。このような問題を解決して行くには、魚類の成長がどのような機構で調節されているのかをまず明らかにする必要がある。

魚類を含む脊椎動物の成長には、インスリン様成長因子-I (IGF-I) が重要な役割を果たしているが、その活性は6種類のIGF結合蛋白 (IGFBP) により厳密に調節されている。これらのIGFBPの機能はタイプにより異なるが、大まかにIGF-Iを介した成長の「促進型」と「阻害型」に分けられる。サケ科魚類の血中には少なくとも3種類のIGFBPが検出されるが、それぞれがどのタイプに相当するのかは非常に混乱している (図1)。

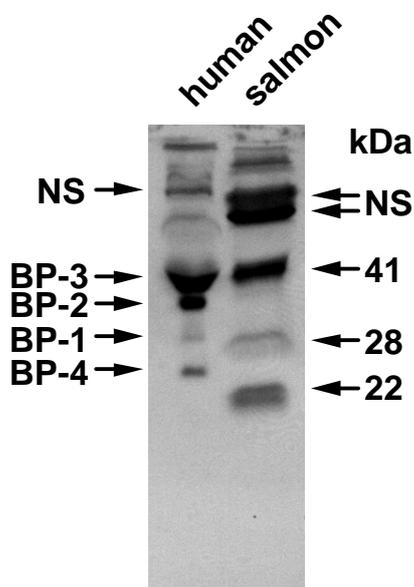


図1 ヒトとサケのIGFBP

2. 研究の目的

研究代表者のグループは、サケ科魚類の血中の主要なIGFBPである41K BPをこれまでに精製し、そのN末端部分アミノ酸配列を調

べた。41K BPは従来IGFBP-3と考えられていたが、解析の結果IGFBP-2である可能性が示唆された。しかし、部分配列だけでは41K BPを完全に同定することはできない。

そこで、本研究ではサケ科魚類41K BPのcDNAをクローニングして、その配列を哺乳類の6種類のIGFBPと比較した。また、サケ科魚類のIGFBP-3も合わせてクローニングし、これらの配列の比較から41K BPのタイプを同定することを目的とした。

3. 研究の方法

まず、サケ41K BPのN末端部分配列およびIGFBPの保存領域を元に縮重プライマーを設計した。そして、サケ科魚類の一種であるマスノスケ (*Oncorhynchus tshawytscha*) より得た一本鎖cDNAを鋳型としてPCR (Polymerase Chain Reaction) を行ってcDNA断片を得た。この部分配列を用いて、遺伝子特異プライマーを設計し、RACE法 (Rapid Amplification of cDNA Ends) により全長cDNAをクローニングした。

一方、脊椎動物のIGFBP-3に比較的良く保存されている領域の配列を元に、縮重プライマーを設計した。そして、上述と同様の方法でcDNA断片を得、RACE法を行った。

得られた演繹アミノ酸配列と既知のIGFBPの配列をクラスター解析に供した。

クローニングした複数のサケIGFBPから新たに遺伝子特異プライマーを設計した。成熟期のマスノスケから組織試料を採集し、発現の組織分布をPCRにより解析した。

4. 研究成果

上述の方法により、41K BPの全長cDNAがクローニングされた。その演繹アミノ酸配列を他の動物種と比較したところ、41K BPはIGFBP-2に分類された (図2)。さらに、サケ

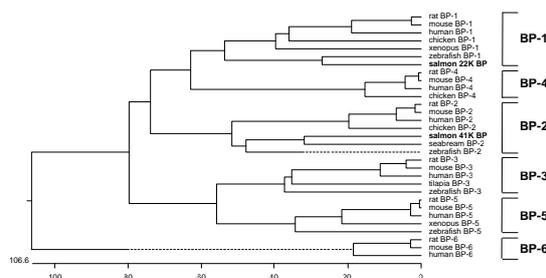


図2 IGFBPの系統樹

IGFBP-3のcDNA断片のクローニングを試みた。IGFBP-3と考えられる遺伝子の発現量は非常に低く、全長cDNAを得るには至らなかったが、N末端領域を含む部分配列を明らかにすることができた。そのN末端領域のアミノ酸配列と精製41K BPのものと比較したところ、両者は異なっていた。これらの結果から、サケ41K BPは従来考えられていたIGFBP-3ではなく、IGFBP-2であることが証明された。

さらに、41K BPのクローニングの過程で、もう一種のIGFBP-2のパラログが検出され、これもクローニングした。これら2種類のサケIGFBP-2の配列を他の動物種と比較し、その相同性の違いから、41K BPをIGFBP-2b、他方をIGFBP-2aと命名した。

これまでニジマスにおいて“IGFBP-3”のクローニングが報告されていた。しかしながら、クラスター解析ではIGFBP-2のグループに入ることも指摘されており、真のIGFBP-3の存在ははっきりしていなかった。本研究において、他の動物種のIGFBP-3と高い相同性を持つcDNAがクローニングされた。クラスター解析においてもIGFBP-3のグループに入ることから、これがサケ科魚類のIGFBP-3であると考えられた。そして、ニジマスで報告された“IGFBP-3”は実際にはIGFBP-2bに対応すると考えられた(図3)。

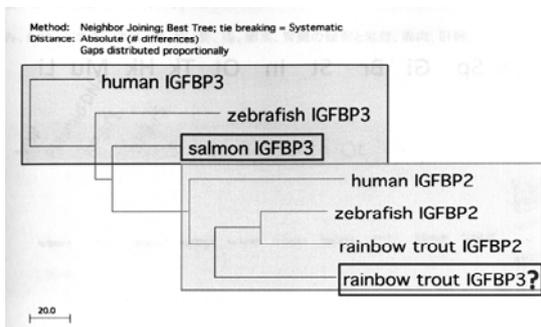


図3 サケ科魚類の”真の”IGFBP-3の同定

本研究により同定された3種のサケ科魚類IGFBPの組織発現をPCRにより調べた。解析に供した組織は、脳、脳下垂体、鰓、心臓、肝臓、腎臓、胃、小腸、脾臓、幽門垂、筋肉、生殖腺である。PCRによる解析の結果、IGFBP-2aとIGFBP-2b(41K BP)は肝臓をはじめ複数の組織で発現していることが明らかになった。一方、IGFBP-3の発現は通常のPCRでは認められなかった。そこで、Nested PCRを行ったところ、心臓や幽門垂などの組織で発現が認められ、肝臓ではバンドは検出されなかった。また、ニジマスにおいても同様に肝臓での発現は認められなかった(図4)。脊椎動物においてIGFBPの主な産生部位は肝臓であるが、サケIGFBP-3は肝臓でほとんど産生されず、血中の主要なIGFBPにはなり得

ないことが示唆された。このように非常に低い発現のため、これまでサケIGFBP-3が検出されなかったと考えられる。

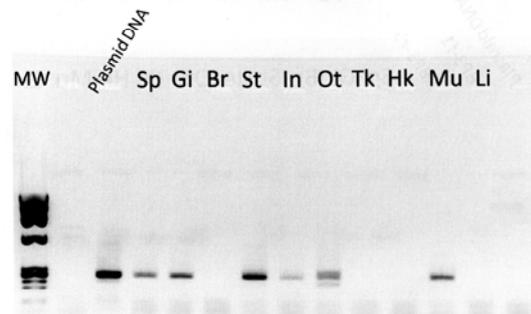


図4 IGFBP-3の組織発現パターン

哺乳類において、IGFBP-3は酸不安定サブユニット(acid-labile subunit, ALS)と呼ばれる成分と複合体を形成し、血中の約80%のIGF-Iを運搬している。このため血中には高濃度のIGF-Iのプールが存在している。一方、サケ科魚類では41K BPが主要なIGF-Iの運搬役であるが、ALSを含む複合体の存在は証明されていない。本研究で41K BPはIGFBP-2であること、またIGFBP-3の発現が非常に低いことなどが明らかになったが、これらがサケ科魚類血中に高分子量の複合体が存在せずにIGF-I量も低い原因であると考えられた。

以上、本研究により、15年以上混乱していたサケ41K BPのタイプが同定された。サケ41K BPは哺乳類における成長促進型のIGFBP-3と従来考えられていたが、その配列は成長阻害型のIGFBP-2であった。一方、血中41K BPの機能や生理的調節はIGFBP-3と近い。これらのことから、進化の過程で魚類のIGFBP-2は、独自に成長促進機能を獲得し、結果として哺乳類のIGFBP-3と相同となった可能性がある。このように、サケ科魚類はIGFBPの構造と機能、さらには脊椎動物の成長のメカニズムを解析する上で有用なモデルとなると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Shimizu, M., Fukada, H., Hara, A., and Dickhoff, W.W. Response of the salmon somatotrophic axis to growth hormone administration under two different salinities. *Aquaculture* 273:320-328 (2007). 査読有。

[学会発表] (計 3 件)

- ① Suzuki, S., Shimizu, M., Dickhoff, W.W., and Hara, A. Identification of Chinook salmon insulin-like growth factor binding protein-3. 21st COE Program The 7th International Symposium "Innovative Marine Life Science for Three Es, Edibles, Environment and Education, in 21st Century". Hokkaido University (Sapporo, Hokkaido, Japan), Nov 17-19, 2008.
- ② Shimizu, M., Cooper, K., Dickhoff, W.W., and Beckman, BR. Postprandial changes in circulating insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding proteins in coho salmon fasted for varying period. 6th International Symposium on Fish Endocrinology, University of Calgary (Calgary, Alberta, Canada), June 22-27, 2008.
- ③ 清水宗敬、サケ学 (Salmon Science) に関する考察、第 1 回サケ学研究会、北海道大学 (函館)、2007 年 9 月 24 日

[その他]

<http://www.geocities.co.jp/CollegeLife/3845/ms-researchj.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 宗敬 (SHIMIZU MUNETAKA)

北海道大学・大学院水産科学研究院・講師

研究者番号：90431337

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし