

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06235

研究課題名(和文) 魚類筋肉pH調整に及ぼす食餌性エルゴチオネインの影響

研究課題名(英文) Effects of dietary ergothionein consumption on physiological pH of fish muscle

研究代表者

大島 敏明 (Ohshima, Toshiaki)

東京海洋大学・学術研究院・名誉教授

研究者番号：70134856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：エルゴチオネイン(ET)の顕著な酸化還元電位は、酸化を防ぐのに効果的である。食品の需要が高まっているが、酸化や食品の変色による収穫後の劣化は、品質と供給の大幅な低下につながる。本研究は、食用サケ科魚種におけるET輸送体タンパク質(ETT)の最初の同定を達成した。腸、肝臓、血球、筋肉でのETT遺伝子の発現は、食餌からのETの取り込みと筋肉への蓄積を示している。食用魚種のETTを特定し、さらに、食餌性ETを介してその転写調節を解明した。さらに、推定ETT遺伝子の発現は、貯蔵中の脂質の酸化と肉の変色に関する品質の低下を防ぐ戦略としてサケ養殖におけるME補給の可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1) 食用魚種におけるETTの最初の同定を示しています。ニジマスはETTを持っており、ETの取り込みを仲介します。腸、肝臓、血球、筋肉でのETT遺伝子の発現は、食事からのETの取り込みを示し、筋肉への蓄積を示している。食用魚種のETTを特定し、食餌性ETを介してその転写調節を解明した最初の知見である。2) 数種サケ科魚種における推定ETT遺伝子の発現は、貯蔵中の脂質の酸化と肉の変色に関する品質の低下を防ぐ戦略としてサケ養殖におけるME補給の可能性を示唆している。3) ESHを含む飼料を介してESHを組織に蓄積し死後硬直の遅延に関与することを、ニジマスを用いて初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The remarkable redox potential of ergothioneine (ET) is effective in preventing oxidation. Demand for food is increasing, but post-harvest deterioration due to oxidation and discoloration of food leads to significant deterioration in quality and supply. This study achieved the first identification of ET transporter proteins (ETTs) in edible salmon fish species. Expression of the ETT gene in the intestine, liver, blood cells, and muscle indicates uptake of ET from the diet and accumulation in the muscle. We identified the ETT of edible fish species and further elucidated its transcriptional regulation via dietary ET. In addition, the expression of the putative ETT gene suggests the potential for ME supplementation in salmonid culture as a strategy to prevent quality degradation related to lipid oxidation and meat discoloration during storage.

研究分野：食品栄養化学

キーワード：エルゴチオネイン エルゴチオネイン輸送体タンパク質 ニジマス ギンザケ マスノスケ pH 死後硬直 抗酸化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究計画では、筋肉中のプロトン濃度が上昇すると、酸化型エルゴチオネインが遊離プロトンを摂り込み還元型に移行するのに伴い、筋肉プロトン濃度が減少して pH 低下が抑えられる新規な機構を、「プロトンプール」として提案する。エルゴチオネインはチオール基がジスルフィド結合を形成し酸化型二量体として、あるいはチオール基がチオン基を形成した酸化型単量体として生体内に存在すると考えられている。エルゴチオネインの人を含める多くの動物種に対する安全性はこれまでに確認されており、食品などに応用できる。

2. 研究の目的

エルゴチオネインを取り込んだ筋肉では pH 低下が抑えられることは、上述のとおりブリとラットで確認した。生体組織の酸化ストレス障害に対するエルゴチオネインの防御、修復機能に関する多くの研究例があるが、エルゴチオネインが pH 抑制に関与するメカニズムは未解明である。さらに、エルゴチオネインが筋組織に取り込まれる機構としては、ヒトおよび数種哺乳類において Organic cation transporter1 (OCTN1) の関与が解明されているが、魚類においてはゼブラフィッシュに同様の輸送体タンパク質が報告されている (Pfeiffer et al., (2015) のみで、他魚種においては未解明である。そこで、本研究では下記の諸点を明らかにする。

3. 研究の方法

ニジマスにおけるエルゴチオネインの取り込みに関与する OCTN1 様輸送体タンパク質の存在

ゲノム情報が公開されているニジマスにおける OCTN1 様輸送体タンパク質の発現を確認するとともに、エルゴチオネインの体内動態との関連性を明らかにする。赤血球、腸管、肝臓、筋組織における OCTN1 様輸送体の発現量とエルゴチオネイン含量の関係性について検討する。OCTN1 については、まず RT-PCR による cDNA の発現を確認する。用いるプライマーセットは GeneBank および NCBI/NIH のデータベース上で公表されている塩基/アミノ酸配列をもとに設計したプライマーセットを用いる。

筋肉細胞におけるエルゴチオネインの化学形に及ぼす pH の影響の解明

ニジマス死後の異なる筋肉 pH における細胞中エルゴチオネイン分子の化学形を、現有する LC-MS/MS, LC-TOF/MS, NMR 等の機器分析法を駆使して、エルゴチオネインが酸化型(チオン型)・還元型(チオール型)の存在割合、酸化型二量体・チオール含有還元型単量体の化学形の存在割合を定量する。

筋肉におけるプロトンプールとしてのエルゴチオネインの化学形と pH 調整機能

エルゴチオネインの単量体・二量体間の化学形変換に影響する酸化還元系に関与する因子を明らかにする。さらに、上述の LC-MS/MS, LC-TOF/MS 等で得た多くの成分に対するメタボローム解析により筋肉中でエルゴチオネインを取り巻くおそらく複数種類の還元性化合物を特定し、これらで形成されるプロトン濃度調整機構「プロトンプール」の全貌を解明する。

4. 研究成果

ニジマスにおけるエルゴチオネインの取り込みに関与する OCTN1 様輸送体タンパク質の存在

タモギタケ抽出液 (ME) を飼料として補給した後のニジマスの全血、筋肉、腸、肝臓における ET 含有量の有意な増加は、ニジマスに ETT が存在することを強く示唆した (図 1)。RT-PCR に用いる E1/ETT および 18srRNA のプライマー配列を設計した。RTG の E1 のノックダウンでトランスフェクトされた siRNA の塩基配列を表 2 に示した。RTG-2 細胞における ETT 候補 (E1) のノックダウンにより、E1 mRNA 発現が著しく減少した。ET の取り込みは、ノックされたグループの方がコントロールグループよりも低く、E1 がニジマスの ETT として機能していることが示唆された。さらに、筋肉を含むさまざまな組織での ETT 遺伝子の発現は、食餌からサケの筋肉への ET の取り込みを示した。結論として、この試験は、食餌からの ET の取り込みと、食用魚種の筋肉へのその沈着の根底にある可能性のある経路を部分的に明らかにした。

この分析には、10 個のタンパク質配列が含まれていた。最終的なデータセットには合計 556 の配置があった。進化論的分析は MEGAX で実施した (Kumar et al., 2018)。ゼブラフィッシュからの同族体のそれぞれについて、3 つの異なるクレードが形成された。ただし、E1 のみがゼブラフィッシュと陸生種からの ETT オルソログをもつ ETT の分岐群に属していた。一方、E2 は未知の機能遺伝子の分岐群に属していた (図 1)。これらの結果は、E1 がニジマス ETT であることを示唆している。

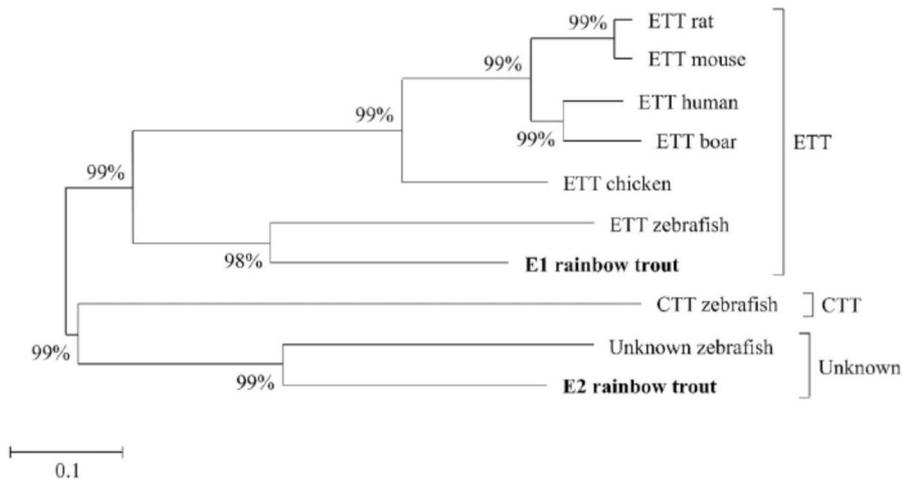


図 1. ニジマスの ETT 候補、ゼブラフィッシュの特徴的なホモログ遺伝子、および陸生種の特徴的な ETT オルソログからなる系統樹
 進化の歴史は、最尤法および JTT マトリックススペースのモデルにより推測した (Jones et al., 1992)

ニジマスでは ETT がエルゴチオネインを取り込むのに重要な役割を果たしていることを上記の通り証明した。他の商業的に重要なサケ科魚類に ETT が存在することは報告されていないため、引き続き、ギンザケ、タイセイヨウサケ、およびマスノスケの ETT を特定した。3 種のサケ科魚類すべてに適用可能な種特異的プライマーセット、および、これらを網羅するユニバーサルプライマーセットを開発した。ETT 遺伝子発現は、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応を使用して評価し、ETT 遺伝子に関する分子情報を得た。特徴づけられた ETT オルソログに対する推定 ETT 遺伝子 (E1) の高い配列同一性。および系統樹の ETT クレードの下への配置は、サケ科魚類の推定 ETT を示していた。推定 ETT 遺伝子発現と、血球 (ET 濃度の全血、肝臓、腸、および筋肉における対応する ET 濃度との関係は、ETT が食餌から得られた ET の輸送に重要な役割を果たしていることを示唆した。さらに、サケ科の魚種で推定 ETT の遺伝子発現を検出するのに有効なユニバーサルプライマーセットの開発に成功した。

本研究は食用魚種における ETT の最初の同定を提示している。ニジマスは ETT をもっており、ET の取り込みを仲介する。腸、肝臓、血球、筋肉での ETT 遺伝子の発現は、食餌からの ET の取り込みを示し、筋肉への蓄積を示している。食用魚種の ETT を特定し、食餌性 ET を介してその転写調節を解明した最初の知見であり、詳細を以下に公表した。

Lalitphan Kitsanayanyong, Jade Pahila, Yuki Ishikawa, Tomoyuki Koyama, Viswanath Kiron, Toshiaki Ohshima (2021) Functional Identification of Ergothioneine Transporter in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol.*, 256:110631, DOI:10.1016/j.cbpb.2021.110631

他の商業的に重要なサケ科魚類に ETT が存在することは報告されていないため、引き続き、ギンザケ、タイセイヨウサケ、およびマスノスケの ETT を特定した。3 種のサケ科魚類すべてに適用可能な種特異的プライマーセット、および、これらを網羅するユニバーサルプライマーセットを開発した (表 3)。ETT 遺伝子発現は、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応を使用して評価し、ETT 遺伝子に関する分子情報を得た。特徴づけられた ETT オルソログに対する推定 ETT 遺伝子 (E1) の高い配列同一性。および系統樹の ETT クレードの下への配置は、サケ科魚類の推定 ETT を示していた。推定 ETT 遺伝子発現と、血球 (ET 濃度の全血、肝臓、腸、および筋肉における対応する ET 濃度との関係は、ETT が食餌から得られた ET の輸送に重要な役割を果たしていることを示唆した (図 2)。さらに、サケ科の魚種で推定 ETT の遺伝子発現を検出するのに有効なユニバーサルプライマーセットの開発に成功した。

本研究は、ギンザケ、アトランティックサーモン、マスノスケにおける推定 ETT 遺伝子発現と ET 濃度の関係は、推定 ETT 遺伝子発現が高い細胞や組織が蓄積し、推定 ETT 遺伝子発現が低い細胞や組織ではより低い ET 濃度であることを示した。これらのデータは、推定 ETT 遺伝子発現の比率がサケ科の組織における ET 蓄積の量に影響を及ぼした可能性があることを示唆している。

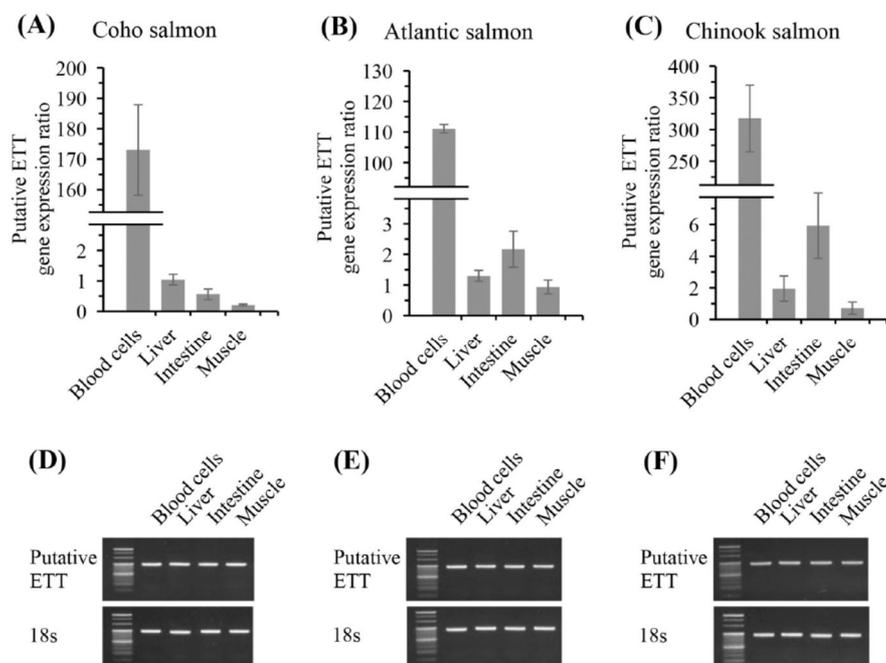


図2. 種特異的プライマーセットを使用したサケ科魚類の推定エルゴチオネイントランスポーター (ETT) の qPCR

(A) ギンザケ, (B) タイセイヨウサケ, および (C) マスノスケにおける推定 ETT の遺伝子発現. 発現は肝臓に対する遺伝子発現比として定量化された. グラフの値は, 平均値 \pm SEM, $n = 3\sim 6$ 匹として示されている. (D) ギンザケ, (E) タイセイヨウサケ, および (F) マスノスケの PCR アンプリコンは, 40 サイクルの増幅後に得た.

本研究で明らかにした推定 ETT 遺伝子の発現は, 貯蔵中の脂質の酸化と肉の変色に関する品質の低下を防ぐ戦略としてサケ養殖における ME 補給の可能性を示唆しており, 以下に公表した.

Lalitphan Kitsanayanyong, Yuki Ishikawa, Toshiaki Ohshima (2022) Putative ergothioneine transporter of salmonids as a functional tool for ergothioneine supplementation. *Aquaculture*, 547, DOI:10.1016/j.aquaculture.2021.737496

筋肉細胞におけるエルゴチオネインの化学形に及ぼす pH の影響の解明

ESH を酸化して得た ESSE を検出し, UPLC による分離条件を決定した. 過酸化水素を用いた酸化処理により ESH が酸化され, TLC 上で ESH のスポットと移動度が異なるスポットが原点付近に検出された. 過酸化水素による酸化処理の後に 2-メルカプトエタノールによって還元処理をすると, 原点付近のスポットが消え ESH と同様のスポットのみとなった. 過酸化水素によって ESH が酸化され ESSE となり, ESSE のジスルフィド結合が 2-メルカプトエタノールにより還元され ESH となったものと推測した.

TOF/MS を用いた測定結果から ESSE の 2 価イオン同位体理論値 4 種類のうち 2 種類の m/z 229.0902 および 229.5911 を検出したため ESSE であると考えた. ESSE と ESH の分離においては C18, HILIC カラムを検討した, 各クロマトグラムを比較し C18 よりも HILIC カラムによる ESSE と ESH の分離が良好であったことから HILIC カラムを用いて分離することとした. HILIC カラムを用いた分離により, ESH と同じ保持時間で ESSE の 2 価イオンのピークが検出された. これは, ESH がカラムを通過した後に一部が酸化し ESSE となったものと推測される.

筋肉におけるプロトンブールとしてのエルゴチオネインの化学形と pH 調整機能

即殺後 5 時間以降から硬直指数の上昇が確認され, 即殺後 9 時間目以降で対照区と比較してキノコ区と ESH 区では硬直指数が低い傾向を示したことから, タモギタケ抽出液添加飼料および ESH 水溶液添加飼料により死後硬直が抑制されたと考えられる. 一方, 硬直指数について対照区と比較して ESH 区では有意差 ($P < 0.05$) がなかったがキノコ区では即殺後 1 から 2 時間および 9 から 12 時間において有意差がありキノコ区において ESH 区よりも死後硬直が抑制されたと考えられる. 加えて筋肉中 ESH 含量は対照区と比較してキノコ区と ESH 区とも高い傾向であるが, キノコ区と ESH 区間に差はないと考えられる. これらより給餌した ESH を含む飼料を介して ESH を組織に蓄積し死後硬直の遅延に参与するが, タモギタケ抽出液区では ESH に加えて

タモギタケ抽出液に含まれる ESH の他の成分が関与したために ESH 区より死後硬直が遅延した可能性があると考えた。

ESH 標品及びタモギタケ熱水抽出液をニジマスに給餌し、筋肉における ESH の代謝変動を確認した。対照区、ESH 給餌区、タモギタケ熱水抽出液給餌区間のニジマスで尾叉長及び魚体重に有意差がなかったことから、ESH 標品およびタモギタケ熱水抽出液にはニジマスの成長に影響しないことが示唆された。

3 試験区間の筋肉中 ESH 量には有意差 ($p < 0.05$) が認められなかったが、タモギタケ熱水抽出液給餌区では他の 2 区よりも多い傾向にあった。タモギタケ熱水抽出液給餌区と ESH 給餌区で給餌した ESH は同濃度であったことから、取り込み量の変化は OCTN1 トランスポーターの発現量あるいは輸送能力に関係している可能性があり、タモギタケ熱水抽出液中の成分によって引き起こされたと考えた。

メタボローム解析の結果から、ESH 単体及び ESH を同量含むタモギタケ熱水抽出液の給餌は、ニジマス筋肉中の代謝に影響しないことが示唆された。また、ESH 標品給餌区と比較して、タモギタケ熱水抽出液給餌区におけるニジマスの筋肉中 ESH 量が高くなったことから、タモギタケ熱水抽出液中の成分が筋肉への ESH 蓄積を促進することが示された。

代謝物の多変量解析結果については、PCA で群間を分離できず、OPLS-DA によって作成した予測モデルも良好でなかったことから、3 試験区間に顕著な代謝傾向の差はなかった。このことは、ESH 標品及びタモギタケ熱水抽出液による代謝への影響が小さいことを示唆しており、劇的な代謝変動を起こさないという点から、両添加物は給餌に安全な物質であると考えられる。また、S-plot から抽出したプロットについて、タモギタケ熱水抽出液給餌区のニジマス筋肉は 1-[(5-amino-5-carboxypentyl)amino]-1-deoxyfructose や alpha-D-glucose 1,6-bisphosphate といった、メイラード反応に関連する物質を対照区よりも多く含有していることが示された。これらの物質の増加は ESH 給餌区と対照区との比較で抽出されなかったことから、タモギタケ熱水抽出液に含まれる成分が移行したと考えられる。

これらのニジマス筋肉中代謝物の多変量解析結果は未発表であり、現在、学術誌への論文投稿の準備を進めている。従って、ニジマス筋肉中代謝物の多変量解析結果のうち、下記の実験データの詳細は本年末まで公表を控えさせていただく。

1. ニジマス筋肉中代謝物の PCA スコアプロット
2. ニジマス筋肉中代謝物の OPLS-DA スコアプロット
3. ニジマス筋肉中代謝物の S-plot
4. データ非依存性分析における ESH プリカーサーイオンのピーク強度の比較

本研究の結果から、ニジマスに対する ESH の給餌においては、ESH 標品よりもタモギタケ熱水抽出液の方が、筋肉への ESH 蓄積を促進することが示唆された。*A. oryzae* 由来の ESH を給餌する際にも、精製度合の低い粗抽出液を給餌することで、ニジマス筋肉中への ESH 蓄積を向上させる可能性がある。

エルゴチオネインは強力な親水性抗酸化剤であり、その顕著な酸化還元電位は酸化を防ぐのに効果的である。特定の生物のみが ET を生合成し、数種の食用キノコが天然 ET の既知の供給源である。世界的な人口増加により、食品の需要が高まっているが、酸化や食品の変色による収穫後の劣化は、品質と供給の大幅な低下につながる。したがって、我々の研究グループはそのような損失を最小限に抑えるための戦略の開発に焦点を合わせて実施してきた。ET を含むキノコ抽出物は、短い貯蔵寿命を克服するためにいくつかの食品に適用されている。本科学研究費補助金研究の最終年度には、これらの研究動向についての最近のアプリケーションに関するレビューの執筆依頼を受け、これまでの研究成果と併せて本科研費研究成果をまとめて下記に公表した。

Lalitphan Kitsanayanyong and Toshiaki Ohshima (2022) Ergothioneine: a potential antioxidative and anti-melanosis agent for food quality preservation. *FEBS Letters*, doi:10.1002/1873-3468.14267

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 ○Lalitphan Kitsanayanyong, Yuki Ishikawa, Tomoyuki Koyama, Reiko Nagasaka, Toshiaki Ohshima
2. 発表標題 The putative ergothioneine transporter of Salmonidae: Gene expression and development of universal primer across certain trout and salmon species
3. 学会等名 The Japanese Society of Fisheries Science
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Lalitphan Kitsanayanyong, Jade Go Pahila, Yuki Ishikawa, Reiko Nagasaka, Tomoyuki Koyama, Toshiaki Ohshima
2. 発表標題 Organic cation transporter-like protein in rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) fed on ergothioneine-rich mushroom extract
3. 学会等名 令和1年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤雅治, 谷田陵, 石川雄樹, 大島敏明
2. 発表標題 エルゴチオネインがニジマス死後硬直時間に及ぼす影響
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石川 雄樹 (Yuki Ishikawa) (50638004)	東京海洋大学・学術研究院・博士研究員 (12614)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	長阪 玲子 (Reiko Nagasaka) (90444132)	東京海洋大学・学術研究院・助教 (12614)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関