

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780153

研究課題名 (和文) 魚類のインスリン代謝と脂肪蓄積の分子機構

研究課題名 (英文) Insulin signaling and lipid metabolism in fish

研究代表者

金子 元 (KANEKO GEN)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：30466809

研究成果の概要 (和文)：

トラフグおよびマダイから脂質代謝関連遺伝子をクローニングし、脂肪が蓄積する組織でそれらの mRNA 蓄積量が高いことを示した。また、絶食状態では脂肪がトラフグでは肝臓から、マダイでは脂肪組織から筋肉へと輸送される可能性を示した。さらに、脂肪蓄積に関連する各種ホルモンおよびその下流分子をクローニングし、組織分布などの基礎的知見を得た。

研究成果の概要 (英文)：

We cloned several genes possibly involved in lipid metabolism from torafugu and red seabream, and showed that their transcripts were predominant in tissues containing high quantities of lipid. Changes in expression of these genes suggested that lipid is transported mainly from liver to muscle in torafugu under starved conditions, whereas from adipose tissues to muscle in red seabream. cDNAs encoding hormones and their downstream signaling molecules related to lipid metabolism were also cloned and analyzed for their expression and tissue distribution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：代謝・酵素、インスリン

1. 研究開始当初の背景

(1) 脂肪は生体の主要な構成成分の一つで、エネルギーの貯蔵や細胞内シグナル伝達など多くの生命現象に関わっている。一般に、過剰に摂取されたエネルギーは脂肪として肝臓、脂肪組織および筋組織に貯蔵されるが、

魚類の主要な脂肪蓄積部位は種ごとに異なっており、トラフグのように主に肝臓に脂肪を蓄積する種と、マダイのように肝臓と筋肉の両方に脂肪を蓄積する種に大別される。

(2) 哺乳類では成長ホルモン (GH)、インスリンおよびインスリン様成長因子 (IGF) が

脂質蓄積に重要な役割を果たしているが、魚類ではこれらの分子に関する知見は非常に限られている。

2. 研究の目的

トラフグおよびマダイを対象に、魚類の種特異的な脂肪蓄積の分子機構の一端を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) トラフグおよびマダイにつき、脂肪および脂質代謝関連遺伝子の組織分布を調べる。また、絶食などの生理的要因が上記遺伝子の発現に及ぼす影響を調べ、両魚種の脂質代謝の違いを考察する。

(2) GH およびインスリンシグナル伝達経路の分子をトラフグおよびマダイからクローニングし、組織分布や細胞内局在などの基礎的知見を得る。

4. 研究成果

(1) トラフグおよびマダイにつき、肝臓および筋肉の脂肪含量を測定した。また、両魚種の肝臓、筋肉、皮膚、鰓、腸の組織切片を作製し、オイルレッド O で脂肪を染色した。これらの結果から、トラフグでは肝臓が、マダイでは肝臓および筋肉が主要な脂肪蓄積部位であることを確認した (図 1)。

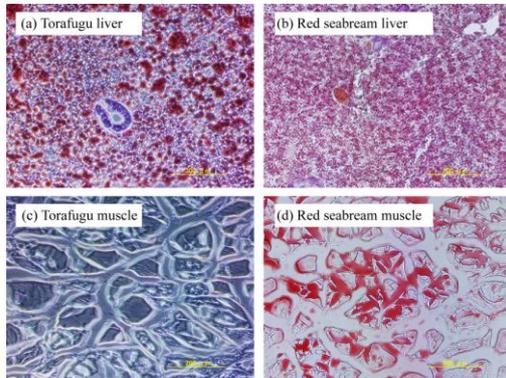


図 1. トラフグおよびマダイの脂肪染色. 筋肉および肝臓の組織切片を作成し、オイルレッド O で脂肪を赤く染色した。

(2) トラフグおよびマダイにつき、ペルオキシソーム受容体増殖因子 (PPAR) γ 、リポタンパク質リパーゼ (LPL) などの脂質代謝関連遺伝子をクローニングした。また、これら遺伝子の転写産物の組織分布を調べたところ、脂肪蓄積に重要な PPAR γ の転写産物はマダイ筋肉でのみ認められるなど、(1) の脂

肪の分布と概ね一致することがわかった (図 2)。

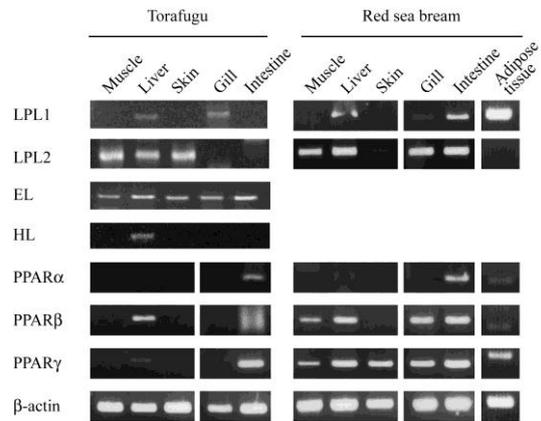


図 2. トラフグおよびマダイにおける脂質代謝関連遺伝子の転写産物の組織分布. EL, 血管上皮リパーゼ; HL, 肝性リパーゼ。

(3) トラフグを 10 日間絶食させたところ、PPAR γ 、LPL1 および LPL2 の mRNA 蓄積量は肝臓で約 0.5 倍に低下し、筋肉および皮膚では 5 - 10 倍に増大した。これらの結果から、トラフグでは絶食時に肝臓から筋肉と皮膚へ脂質が輸送されることが示唆された (図 3)。

10 日間絶食させたマダイでも同様の実験を行った。トラフグとは異なり、肝臓の PPAR γ の mRNA 蓄積量は絶食により変化しなかったが、脂肪組織のそれは大きく低下した。これらの結果から、絶食時に筋肉へ脂肪を供給する主要組織は肝臓でなく脂肪組織であることが示唆された。また、絶食時の筋肉では、PPAR γ の mRNA 蓄積量が増大したことから、一時的に脂肪が蓄積されることが示唆された。

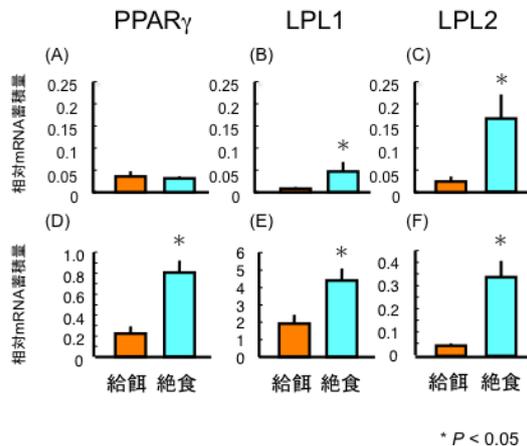


図 3. トラフグおよびマダイの脂質代謝関連遺伝子の mRNA 蓄積量に及ぼす絶食の影響. (A) - (C) はトラフグ、(D) - (F) はマダイ. * $P < 0.05$

(4) 哺乳類では、肝臓や脂肪組織からの脂肪の放出は、GH に制御されること報告されている。また、GH の機能の多くは GH 依存的に各組織で発現誘導される IGF に仲介される。そこで、トラフグから GH、GH 受容体、GH 受容体の下流で機能する細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK)、IGF-I および IGF-II をコードする cDNA をクローニングした。また、IGF-I および IGF-II の転写産物の組織分布を明らかにするとともに (図 4)、市販抗体を用いて ERK の検出を行った。

種々の条件下でこれら遺伝子の mRNA 蓄積量を定量的リアルタイム PCR により調べたところ、高塩分で飼育した際に GH の mRNA 蓄積量が増大すること、さらに GH、IGF-I の mRNA 蓄積量は体長の大きい個体で高いことなどが明らかとなった (図 5)。

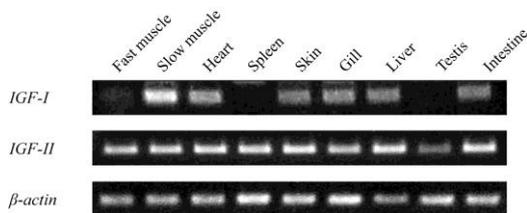


図 4. トラフグ IGF-I および IGF-II 遺伝子の転写産物の組織分布. 内部標準として β アクチン遺伝子を用いた。

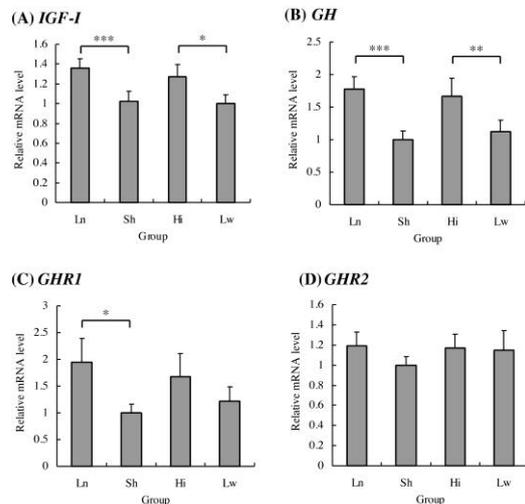


図 5. トラフグ GH、GH 受容体および IGF-I の mRNA 蓄積量と成長との関連. GH 受容体には 2 種のアイソフォームが存在した. GHR, GH 受容体。

(5) 転写因子 Foxo1 は、脂肪蓄積を阻害する種々の遺伝子の転写を活性化するとともに、核内で PPAR γ と結合してその転写活性を阻害する。そこで、トラフグ Foxo1 の cDNA ク

ローニングを行い転写産物の組織分布を明らかにした。また、トラフグ Foxo1 をラット L6 筋芽細胞で強制発現したところ、無血清状態では Foxo1 は核に局在することがわかった。さらに、トラフグ Foxo1 および PPAR γ の大腸菌発現系を構築した。

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 2 件)

Kaneko G, Yamada T, Nagasaka R, Ushio H, Watabe S. Molecular characterization of lipase family in pufferfish *Takifugu rubripes*. *Comp. Biochem. Physiol.* 153A, S76, 2009.

Kaneko G, Yamada T, Han Y, Hirayama M, Nagasaka R, Ushio H, Watabe S. Molecular mechanisms involved in lipid accumulation of pufferfish. *Proceeding of 5th World Fisheries Congress*, 2009.

[学会発表] (計 10 件)

Kaneko G, Yamada T, Nagasaka R, Ushio H, Watabe S. Molecular characterization of lipase family in pufferfish *Takifugu rubripes*. *Annual Main Meeting of the Society for Experimental Biology*, Glasgow, UK. June 28 - July 1, 2009.

Kaneko G, Yamada T, Han Y, Hirayama M, Nagasaka R, Ushio H, Watabe S. Molecular mechanisms involved in lipid accumulation of pufferfish. *5th World Fisheries Congress*, Yokohama, Japan. October 20 - 24, 2008.

山田敏弘、金子元、長阪玲子、潮秀樹、渡部終五. 絶食に伴うマダイ脂質代謝関連遺伝子の発現変動. 平成 22 年度日本水産学会春季大会、2010 年 3 月 28 日、藤沢。

金子元、平野雪、小山寛樹、渡部終五. トラフグ成長ホルモン受容体遺伝子の cDNA クローニングと一次構造解析. 平成 22 年度日本水産学会春季大会、2010 年 3 月 27 日、藤沢。

黒須洋平、木下滋晴、金子元、武政佑一郎、福島英登、福田裕、耕田隆彦、望月俊孝、浅川修一、渡部終五. トラフグにおける各種成長関連遺伝子の発現量と成長との関係. 平成 22 年度日本水産学会春季大会、2010 年 3 月 27 日、藤沢。

金子元、山田敏弘、澤田聡子、渡部終五. 筋肉の生化学的性状に及ぼす飼育温度の影響. 平成 21 年度水産利用関係研究開発推進会議

利用加工技術部会研究会、2009年11月19日、横浜.

山田敏弘、金子元、長阪玲子、潮秀樹、渡部終五. 絶食に伴うトラフグ脂質代謝関連遺伝子の発現変動. 平成 21 年度日本水産学会秋季大会、2009年10月2日、盛岡.

金子元、山田敏弘、Han Yuna、長阪玲子、潮秀樹、渡部終五. トラフグ・リボタンパク質リパーゼ遺伝子のクローニングと発現解析. 平成 21 年度日本水産学会春季大会、2009年3月28日、東京.

金子元、平井惇也、渡部終五. トラフグの低塩分飼育下における成長関連遺伝子および筋肉タンパク質の発現制御. 平成 21 年度日本水産学会春季大会、2009年3月28日、東京.

古川聡史、黒須洋平、木下滋晴、金子元、武島弘彦、西田睦、渡部終五. トラフグ・インスリン様成長因子 I のイントロン配列および各種成長関連遺伝子の仔魚期における発現量と成長との関連. 平成 21 年度日本水産学会春季大会、2009年3月29日、東京.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子元 (KANEKO GEN)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：30466809