

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：35403

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06233

研究課題名（和文）養殖効率を飛躍的に向上させるイカ内臓由来新規成長促進因子の単離同定と利用法の開発

研究課題名（英文）Isolation, identification, and application of a novel growth-promoting factor from squid viscera

研究代表者

三浦 智恵美 (Miura, Chiemi)

広島工業大学・環境学部・教授

研究者番号：90518002

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）： 魚類養殖を持続可能な生物生産技術とするためには、環境への負荷を最小限に抑えた飼料の開発が求められる。本研究では、未利用生物資源であるイカ内臓由来の新規成長促進因子に着目して、その単離同定を行い、得られたイカ由来成長促進因子の魚類に対する作用機構を明らかにした。更に、これら成長促進因子を含む機能性飼料原料の効率的な利用方法の促進のために、同物質を多く含むと考えられる飼料原料を網羅的に調べ、摂食性が高く、成長促進が期待できる他の飼料原料の探索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界人口が増加する中、動物性タンパク質としての魚類養殖は、世界的に生産量が増加しているが、日本では、天然魚由来の魚粉が使用されているため、環境負荷の観点から問題となっている。この状況の克服には、魚粉代替タンパク源の開発等が急務である。加えて対象魚の摂食・消化および成長を促進する物質により飼料効率を改善する方策も有効である。イカの内臓は、養魚用飼料へ添加することにより摂食性の向上や成長の促進が期待できる。イカの内臓の機能性物質が特定され、その作用機構が解明されれば、それらを利用した効率的な養殖を行うことが可能となり、それを指標として、新しい「成長促進が期待できる飼料原料」の探索が可能となる。

研究成果の概要（英文）： In order to make fish aquaculture a sustainable bioproduction technology, it is necessary to develop feeds with minimal environmental impact. In this study, we focused on novel growth-promoting factors derived from squid entrails, an underutilized biological resource, and isolated and identified them, and clarified the mechanism of action of the obtained growth-promoting factors from squid on fish. Furthermore, in order to promote the efficient use of functional feed ingredients containing these growth-promoting factors, we comprehensively investigated feed ingredients that are thought to contain high levels of these substances and searched for feed ingredients other than squid entrails that are good intake and expected to promote growth.

研究分野：水族生殖生理学

キーワード：イカ内臓 消化ホルモン 摂食 成長促進 機能性因子 フィッシュソルブル

1. 研究開始当初の背景

世界人口が著しく増加する中、動物性タンパク質を人類に供給する魚類養殖は、その重要度を増しており、世界的には生産量は著しく増加している。しかし、日本で多く行われているマダイ、ブリ、マグロおよびウナギ等肉食性魚類の養殖には、食用可能なカタクチイワシ等多くの天然魚由来の魚粉が使用されているため、環境負荷の観点から大きな問題となっている。この海洋漁業資源への負荷を減らすためには、未利用魚介類や海藻などの資源、及び水産加工廃棄物などの未利用資源を活用することが重要であると考えられる。更に魚類養殖では、飼料効率の向上が、経営的にも環境負荷軽減の面でも、重要な課題の一つである。転換効率の良い飼料の開発に必須である魚類の内分泌等の生理学的研究として、ブリでは、消化酵素の分泌に関わるコレシストキニ(CCK)などの消化管ホルモンを指標とする魚粉の品質評価の研究が多く行われている(Furutane et al. 2013, Fukada et al. 2013, Yamamoto et al. 2015)。さらに食欲亢進ホルモンであるニューロペプチドY(NPY)の摂餌効果の研究(Silverstein et al. 2015)や、飼料成分によるブリ NPY 遺伝子の発現量調節の研究(Fukada et al. 2019)などが行われているが、未利用残渣の摂餌効果等の生理学的な研究はほとんど行われていないのが現状であった。本研究では未利用生物資源であるイカの内臓由来の新規成長促進因子に着目し、環境への負荷を最小限に抑えた飼料の開発のための研究を目指した。

古くからイカの内臓には、集魚効果を有することが知られている。我々は、イカ内臓より有毒なカドミウムを除去した製品「イカマリン®」の開発に成功し、この製品の魚類の消化および成長に及ぼす影響、さらには魚粉の削減効果について検討した。ブリを用いた養殖漁場での実証試験では、イカの内臓1%の添加によりエクストルーデットペレット飼料中の魚粉を5%削減しても、魚粉を削減していない飼料以上の成長の誘導と飼料効率の向上に成功した。マダイの成長に与える効果についても、イカの内臓を添加した飼料の給餌により、マダイの成長は著しく促進され、飼料効率は1.76倍も向上することを示した。このように養魚用飼料への添加により、摂食性の向上や成長の促進が期待でき、飼料へのイカの内臓添加によってもたらされた著しい成長促進と飼料効率の向上効果は、イカの内臓に含まれる何らかの機能性因子の作用によるものと考えられた。更にカンパチやマグロでも摂餌性、消化および成長に係るホルモンや酵素の産生を著しく向上させ、成長を促進させることを明らかにした。我々は、イカの内臓による成長促進効果は、食欲や成長に関わるホルモンの産生促進と消化能力の向上に起因することを報告したが(Kondo et al. 2017)、その原因物質の特定には至っていない。原因物質が特定され、その作用機構が解明されれば、その物質と機構を利用した効率的な養殖を行うことが可能となるとともに、その物質を指標として、新しい「成長促進が期待できる飼料原料」を探索できるものと考えられた。

2. 研究の目的

給餌型の養殖では、飼料効率の向上が、経営的にも環境負荷軽減の面でも、最も重要な課題の一つである。飼料効率の良い飼料の開発には、栄養学的な検討に加え、対象魚の内分泌等の生理学的側面からのアプローチが必要不可欠である。内分泌環境をコントロールし、摂餌性、消化能力の向上、さらには成長誘導の体内環境を整えることのできる条件を検討し、自然界で魚類が摂餌するエサ生物の中に、これらの生理機能を向上させる因子が含まれていれば、それを利用することが理想である。本研究では、イカの内臓によってもたらされた著しい成長促進・飼料効率向上効果が、何らかの機能性因子によるものと考え、イカの内臓に含まれる摂食および成長促進に効果のある機能性因子を単離同定するとともに、その物質の魚に対する作用機構を明らかにし、高効率な養殖技術の開発を目指すことを目的とした。

さらに同物質を多く含むと考えられる飼料原料を網羅的に調べ、摂食性が高く、成長促進が期待できる他の飼料原料の探索を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

イカの内臓に含まれる成長促進・飼料効率向上に効果のある因子の探索を、内分泌学的な視点から行うために、まずイカ内臓に含まれる摂食および成長促進に効果のある機能性因子の単離を行った。機能性候補物質は、イカ内臓の水溶性画分からメタノール/クロロフォルム/DDWにより抽出し、ロータリーエバポレーターにて濃縮後、Sep-Pack C18カートリッジを用いて粗精製を行った。それらの粗精製品の解析を逆相液体クロマトグラフィー(HPLC)により行った。次に、ブリの消化管を用いた生体外実験系により、これらのカラム抽出物の解析を行った後、候補物質を解析し、さらに実験動物のメダカ及びグッピーを用いて、これらの物質が食欲および成長に関わるか否かを解析した。また同様に他の同物質を多く含むと考えられる飼料原料を網羅的に調べ摂食性が高く、成長促進が期待できる特に摂餌促進性が高いと考えられる魚介類のエキス類を中心に飼料原料の洗い出しを行った。候補の1つである魚粉製造時の煮汁や魚の頭やヒレ、内臓等の廃棄物の煮汁などが主原料とされるフィッシュソルブルについてイカの内臓と同様に解析した。

4. 研究成果

イカの内臓に含まれる摂食および成長促進に効果のある機能性候補物質は、内臓の水溶性画分からメタノール/クロロフォルム/DDW (2.5 / 1 / 1)により抽出し、ロータリーエバポレーターにて濃縮後、Sep-Pack C18カートリッジを用いて粗精製を行った。それらの粗精製品の解析を逆相液体クロマトグラフィー(HPLC)により行ったところ、5~10個のピークが得られた。

その後、ブリの消化管を用いた生体外実験系により、これらのカラム抽出物の解析を行ったところ、消化関連酵素活性の発現を誘導する物質が含まれていることが確認された。さらにこ

これらの候補物質を解析したところ、イカの内臓に含まれる摂食および成長促進に効果のある機能性物質としてチミン、リコペロジンおよび4-ヒドロキシキノリンなどの物質が含まれていることが確認された。単離同定された中から、食欲亢進関連因子を発現誘導する候補を餌に添加し魚類の飼育を行い、誘引性、摂食性および成長に影響を及ぼすか否かを調べた。

まず実験生物としてメダカを用いて、4-ヒドロキシキノリンおよびリコペロジン添加餌による摂食性と成長を調べた。0.3cmのメダカ各15尾を収容した各水槽を準備し、1, 10, 100 μ Mの各濃度のリコペロジン、0.1, 1, 10 μ Mの各濃度の4-ヒドロキシキノリンおよびこれらの化合物を含まない飼料(対照群)を作製し、それぞれ3回の反復となるように、1日2回飽食給餌し、3ヶ月間飼育した。その結果、10 μ Mのリコペロジンを添加した飼料、および1と10 μ Mの4-ヒドロキシキノリンを添加した飼料を給餌したメダカがこれらの化合物を含まない飼料を給餌した対照群と比較して給餌量が増え、平均体長及び成長率が増加した。さらに分子レベルでこれらの物質の作用を明らかにするために、飼育後、各実験群のメダカの腸および脳の全RNAを抽出し、リアルタイムPCR法により消化管でのコレシストキニン(CCK)遺伝子発現と脳でのニューロペプチドY(NPY)遺伝子の発現を解析した。CCKの発現に関しては10 μ Mのリコペロジンと、1 μ Mの4-ヒドロキシキノリンを添加した飼料を給餌したメダカでは、腸でのCCKの発現量が、対照群に比べて高くなった。これらのことから、イカの内臓に含まれるリコペロジンおよび4-ヒドロキシキノリンは、メダカの成長を誘導することが示唆された。

次にイカの内臓由来の成長促進因子を含む機能性飼料原料の開発のため、他の魚類未利用残渣のフィッシュソルブルに着目して実験を行なった。フィッシュソルブル0, 0.1, 1, 10, 20, 50%を餌に添加しメダカとゼブラフィッシュの成長を調べたところ10%において最も効果が認められた。次にSep-Pak C18カートリッジにてフィッシュソルブルの粗精製を行い、それらの抽出物を飼料に添加しメダカの成長を調べたところ、コントロールと比較して精製画分では積極的な摂餌行動が見られ、高成長も確認された。さらに逆相液体クロマトグラフィー(HPLC)により分析を行なったところ、一個の大ピークと数個の小ピークが得られた。これらのことからフィッシュソルブルに成長を促進する物質が存在する可能性が示唆されたためCE-TOFMSによるメタボローム解析を行なった。メタボローム解析は、フィッシュソルブルと同時にイカの内臓とマダイの残渣からの抽出物でも行なった。その結果、4-ヒドロキシキノリンを含む数種類の候補となる物質が得られた。その中からテレフタル酸、ハルマン、グルコースの3種を選定し飼料に添加し実験動物としてメダカおよびグッピーを用いて摂食性および成長に影響を及ぼすか否かの実験を行った。

メダカの稚魚各7匹とグッピーの稚魚各10匹を収容した水槽をそれぞれ準備し、テレフタル酸、グルコース、ハルマンを各濃度1と100 μ Mとこれらの化合物を含まない飼料(対照群)を作製し、1日1回飽食給餌、水温25 で4週間飼育し体長体重を測定した。飼育期間終了後

は、各実験群魚の頭部、肝臓、腸の全RNAを抽出し、PCR法によりフィッシュソルブル含有機能性分子が成長と消化関連因子の発現に及ぼす影響の有無を調べた。メダカとグッピー両種ともテレフタル酸、グルコース、ハルマンを添加した飼料を給餌した魚がこれらの化合物を含まない飼料を給餌した対照群の魚と比較して給餌量が増え、平均体長及び成長率が増加した。テレフタル酸1 μ Mは両種とも最も成長した。グッピーでのこれらの物質が誘導する消化関連遺伝子の解析では、テレフタル酸1 μ Mとグリセリン 1 μ Mを与えた場合に頭部での成長ホルモン (gh)、肝臓でのインスリン様成長ホルモン (igf-1)、腸でのコレシストキニン (cck) の遺伝子発現が認められた。これらのことから、フィッシュソルブルに含まれているテレフタル酸は、メダカとグッピーの成長を誘導する可能性が高いことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三浦智恵美, 梶本恭平, 加藤隆史, 三浦猛
2. 発表標題 イカ内臓由来機能性物質のメダカ成長に与える影響
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦智恵美, 梶本恭平, 加藤隆史, 田辺匠太郎, 三浦 猛
2. 発表標題 魚類の成長促進因子の探索とその作用機序の解析
3. 学会等名 日本動物学会 第93回 早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦智恵美, 田辺匠太郎, 串崎友弥, 三浦 猛
2. 発表標題 魚の未利用残渣に含まれる魚類成長促進因子の探索
3. 学会等名 日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 村瀬優忠, 中野慎太郎, 串崎友弥, 三浦智恵美
2. 発表標題 魚の未利用残渣に含まれる魚類成長促進因子の解析
3. 学会等名 日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2024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	三浦 猛 (Miura Takeshi) (00261339)	愛媛大学・農学研究科・教授 (16301)	

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
---------	---------