

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月23日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580214

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測定系の確立

研究課題名（英文）Quantification of insulin-like growth factor 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（和文）：

本研究では、魚類の成長に重要なインスリン様成長因子-I（IGF-I）およびその活性を調節している IGF 結合蛋白（IGFBP）の蛋白および遺伝子測定系を確立し、成長との関係を解析した。個体標識したサクラマスを用いた飼育実験から、IGF-I 量は個体の成長率と正の相関を、IGFBP-1b は負の相関を示すことが見出された。本研究により、魚類における成長の正および負の指標の確立が期待できる。

研究成果の概要（英文）：

The present study established time-resolved fluoroimmunoassay and real-time quantitative PCR for salmon insulin-like growth factor (IGF)-I and an IGF-binding protein (IGFBP-1b). Feeding and fasting experiment using individually-tagged masu salmon revealed that IGF-I and IGFBP-1b generally show positive and negative correlations with growth rate, respectively. The present study suggests that these components are useful as growth indices in salmon.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
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：成長、ホルモン、サケ科魚類、免疫測定系、発現解析

1. 研究開始当初の背景

魚類の成長を正確に推定・評価することは、水産増養殖業はもちろん、水産資源の変動を把握する上でも重要である。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）と呼ばれるホルモンが非常に重要な役割を果たしている。一方、IGF-I の生物活性は複数存在する IGF 結合蛋白（IGFBP）によって厳密に調節されている。申請者らはサケ科魚類の血中には3種類のIGFBPが存在

することを見出し、主要な2種類のIGFBPについて放射免疫測定法による定量法を魚類で初めて確立した。そして、それぞれがIGF-Iを介した成長の「促進型」および「阻害型」であることを提唱した。これらをIGF-Iとともに用いることにより、魚類の成長をより正確に推定・評価できる可能性がでてきたが、放射性同位元素を用いない方法への転換が求められている。また、血液を採取できないような仔稚魚の成長を評価するにはmRNAの測定が有効であると考えられる。しかし、それらのmRNA量と成長率との関係は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、放射性同位元素を用いないIGF-IおよびIGFBPの蛋白測定法を確立することを主な目的とした。さらに、これらのmRNA量の定量法を合わせて確立し、血中蛋白量との関係を明らかにすることを試みた。そして、成長の指標としての有用性を個体標識したサクラマスを用いた飼育実験により検証した。

3. 研究の方法

(1) IGF-IとIGFBPの免疫測定系の確立
ユーロピウム (Eu) を蛍光標識として用いた時間分解蛍光免疫測定法 (TR-FIA) によりIGF-I蛋白測定系を確立した。手順としては、血中IGF-Iをまず酸エタノール抽出した。続いて、ヤギ抗ウサギIgGをコーティングした96穴プレートに抗IGF-I血清とスタンダードまたはサンプルを添加し一晩反応させた。そして標識IGF-Iを加えてさらに一晩反応させた後に時間分解蛍光光度計にて蛍光を測定した。

IGFBP-1bに関しては、精製IGFBP-1bをビオチンにて標識した。そして、上述の方法で標識と抗体を反応させた後、Euで標識したアビジンを用いることにより蛍光を得た。IGFBP-2bのTR-FIAでは、Eu標識のIGF-Iと精製IGFBP-2bを複合体を形成させ、間接的に標識を行った。そして、抗IGFBP-2b血清を用いてIGF-Iと同様の方法で確立を試みた。

(2) IGF-IとIGFBP mRNA量の定量法確立

IGF-Iに関しては、大西洋サケの配列を参考にしてエクソンをまたぐようプライマーを設計した。そして、サイバーグリーンを用いたリアルタイム定量PCR (qPCR) 法によりmRNAの定量を試みた。PCR反応は、はじめに50°Cで2分、続いて95°Cで10分の反応を行ったのち、95°Cで15秒の熱変性と60°Cで1分のアニーリングを1サイクルとして40サイクル行った。また、内部標準としてelongation factor-1a (EF-1 a) のqPCRを確立し、相対量としてmRNAを表した。

IGFBP-1bのqPCRについては、研究中にもう一つのサブタイプであるIGFBP-1aが同定されたことから、両者の配列の差を利用して特異的なプライマーを設計した。

(3) 飼育実験

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター七飯淡水実験所にて、1年魚のサクラマスを用いた飼育実験を行った。まず実験魚をPITタグにより個体標識し、実験期間中(6週間)給餌する群、絶食する群、および4週間の絶食後2週間給餌する再給餌群の3群に分けた。実験開始から0, 4, 5および6週目に実験魚より血液および肝臓試料を採取し解析に用いた。

4. 研究成果

(1) 免疫測定系の確立

サクラマスの血清はIGF-IのTR-FIAにおいて平行性を示したことから、本種IGF-Iの測定が可能となった。

IGFBP-1bのTR-FIAにおいて、種々の抗体濃度と標識濃度を検討したところ、良好なスタンダードカーブが得られた。さらに、サクラマス血清がスタンダードに対して平行性を示すとともに、IGF-Iによる測定の阻害は認められなかった。これらのことから、魚類において初めてIGFBPのTR-FIAが確立された(図1)。

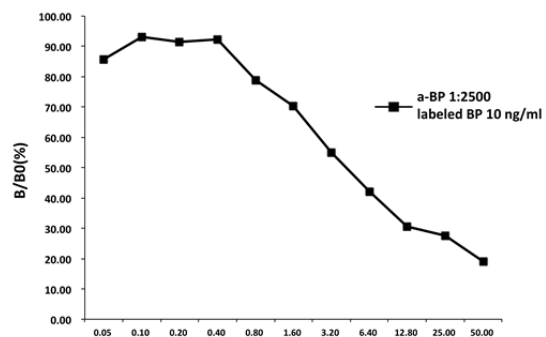


図1 IGF-IのTR-FIAのスタンダードカーブ

一方、IGFBP-2bにおいては、標識と抗体との反応は確認されたものの、未標識IGFBP-2bでの置換が十分ではなかった。考えられる原因として、IGFBP-2bとIGF-Iの複合体が解離していることが考えられた。そこで、複合体に対して架橋と標識を同時に行い、安定化を試みた。現在、本標識IGFBP-2bを用いてスタンダードカーブを作成中である。今後は、IGF-Iによる測定の阻害の有無を確認し、TR-FIAの確立を完了する予定である。

(2) リアルタイム定量PCRの確立

IGF-IのqPCRにおいて良好なスタンダードカーブが確認されるとともに、融解曲線は単

一のピークを示したことから、mRNAの定量法が確立された。IGFBP-1bに対するプライマーはIGFBP-1aを増幅せず、その特異性が確認された。その結果、igfbp-1bのqPCRが確立された。同時に、igfbp-1aについてもqPCRを確立し、二つのサブタイプの定量が可能になった。

(3) 飼育実験

サクラマスは血中IGF-Iは絶食により減少し、再給餌により回復した。さらに、個体の成長率と血中量の相関を調べたところ、正の相関が認められた(図2)。

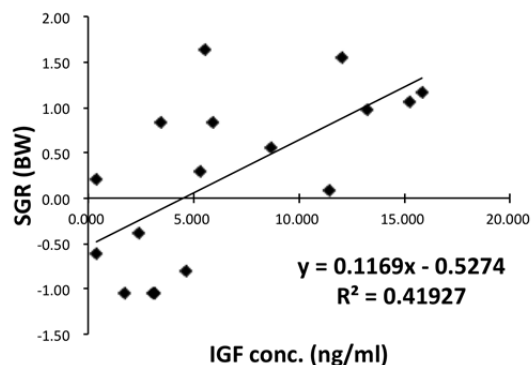


図2 血中IGF-Iと個体の成長率との関係

この結果はギンザケを用いた研究とよく一致しており、サクラマスにおいても血中IGF-I量は成長の正の指標になりうると考えられた。肝臓IGF-I mRNAも絶食により減少する傾向が観察されたが、有意ではなく、血中量ほどは成長を反映していない可能性が考えられた。今後、筋肉などの他の組織での発現を解析する必要がある。

一方、血中IGFBP-1bは絶食により上昇し、再給餌により給餌群と同じレベルまで下がった。血中IGFBP-1bは個体の成長率とは負の相関を示した(図3)。

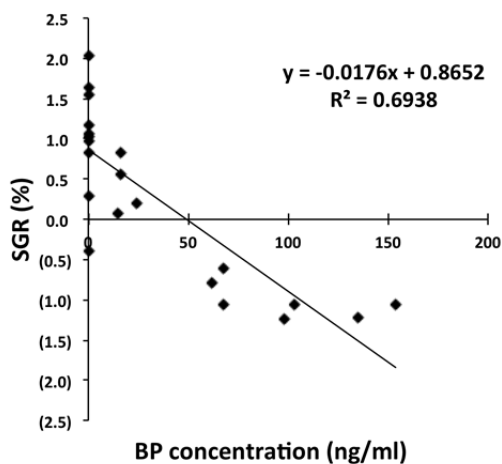


図3 血中IGFBP-1bと個体の成長率との関係

このように本タイプは成長の負の指標として用いられる可能性が考えられた。また、肝臓IGFBP-1b mRNA量は血中量と同様の変化を見せたことから、蛋白レベルおよび遺伝子レベルを用いて成長の停滞を評価できることが示唆された。IGFBP-1a mRNAも成長が停滞すると公知となり、1aと1bを組み合わせることにより感度の高い指標の確立が期待できる。

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5件)

- ① Metzger, D.C., Luckenbach, J.A., Shimizu, M., and Beckman, B.R. Normalizing for biology: accounting for technical and biological variation in levels of reference gene and insulin-like growth factor 1 (*igf1*) transcripts in fish livers. *Comparative Biochemistry and Physiology* (in press). (査読有)
DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.04.014
- ② Hevrøy, E.M., Azpeleta, C., Shimizu, M., Lanzén, A., Kaiya, H., Espe, M., and Olsvik, P.A. (2011) Effects of short-term starvation on ghrelin, GH-IGF system, and IGF-binding proteins in Atlantic salmon. *Fish Physiology and Biochemistry* 37:217-232. (査読有)
DOI: 10.1007/s10695-010-9434-3
- ③ Shimizu, M., Suzuki, S., Horikoshi, M., Hara, A., and Dickhoff, W.W. (2011) Circulating salmon 41-kDa insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) is not IGFBP-3 but an IGFBP-2 subtype. *General and Comparative Endocrinology* 171:326-331. (査読有)
DOI: 10.1016/j.ygcn.2011.02.013
- ④ Shimizu, M., Kishimoto, K., Yamaguchi, T., Nakano, Y., Hara, A., and Dickhoff, W.W. (2011) Circulating salmon 28- and 22-kDa insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) are co-orthologs of IGFBP-1. *General and Comparative Endocrinology* 174:97-106. (査読有)
DOI: 10.1016/j.ygcn.2011.08.005
- ⑤ Shimizu, M., Cooper, K.A., Dickhoff, W.W., and Beckman, B.R. (2009) Postprandial changes in plasma growth hormone, insulin, insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding proteins in coho salmon fasted for varying periods. *American Journal of*

*Physiology-Regulatory, Integrative,
and Comparative Physiology*
297:R352-R361. (査読有)
DOI: 10.1152/ajpregu.90939.2008

[学会発表] (計7件)

- ① 下村考弘・中嶋拓郎・堀越萌李・飯嶋亜内・
ト部浩一・水野伸也・平松尚志・原 彰彦・
清水宗敬、サクラマス銀化に伴うインス
リン様成長因子-I の変化と鰹
Na⁺, K⁺-ATPase との関係、平成 24 年度日
本水産学会春季大会、東京海洋大学(品川、
東京)、2012 年 3 月 28 日
- ② 下村孝弘・中嶋拓郎・堀越萌李・飯嶋亜
内・ト部浩一・水野伸也・平松尚志・原 彰
彦・清水宗敬、サクラマスにおけるインス
リン様成長因子結合蛋白-1 の発現パター
ンと成長との関係 第 5 回サケ学研究会、
北海道大学(札幌市)、2011 年 12 月 12
日
- ③ 清水宗敬、成長のメカニズムからサケ科
魚類の生活史多型と資源管理を考える(シ
ンポジウム「生理学を武器にして動物生態
学をおもしろくできないだろうか?」にて
発表)、日本生態学会第 58 回全国大会、札
幌コンベンションセンター(札幌市)、2011
年 3 月 8 日~12 日
- ④ 下村考弘・堀越萌李・中嶋拓郎・飯嶋亜
内・ト部浩一・水野伸也・平松尚志・原 彰
彦・清水宗敬、サクラマスにおける海水適
応能の発達とインスリン様成長因子-I の
発現パターン、第 4 回サケ学研究会、北
海道大学(函館市)、2010 年 12 月 18 日
- ⑤ 清水宗敬・Kathleen A. Cooper・Walton W.
Dickhoff・Brian R. Beckman、1 回の給餌
に対するサケ科魚類の血中インスリン様
成長因子-I と結合蛋白の反応、平成 22
年度日本水産学会秋季大会、京都大学(京
都市)、2010 年 9 月 22 日~25 日
- ⑥ 清水宗敬・鈴木せいら・堀越萌李・原 彰
彦・Walton W. Dickhoff、サケ科魚類は成
長のための「定期預金」を持っていない
か?、第 3 回サケ学研究会、北海道立水産
孵化場(恵庭市)、2009 年 12 月 5 日
- ⑦ Shimizu, M., Suzuki, S., Horikoshi, M.,
Hara, A., and Dickhoff, W.W. Which
IGF-binding proteins should we look at
during smoltification? 8th
International Workshop on
Smoltification, Oregon State
University (Corvallis, Oregon, USA),
Sept 20-24, 2009.

[その他]

ホームページ等

<http://www.geocities.jp/fishvitellogeni/ms/Welcome.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