

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780174

研究課題名(和文) 魚類における消化管アミノ酸吸収機構の包括的解明

研究課題名(英文) Physiological study on amino acid transporting systems in the intestinal tract of teleosts

研究代表者：渡邊 壮一 (WATANABE SOICHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教 研究者番号：20507884

研究成果の概要(和文)：

本研究ではモザンビークティラピアを実験魚として用い、魚類でのアミノ酸吸収機構としての消化管におけるアミノ酸トランスポーター遺伝子の同定とその発現動態、および飼育環境条件によるその変動の解析を行った。また生体内でのアミノ酸需要の一部として、細胞内浸透圧調節物質としての遊離アミノ酸の寄与とその変動についても検討した。その結果、消化管で発現する 10 種のアミノ酸トランスポーター遺伝子を同定した。またその発現は腸の前半部において高い傾向にあり、魚類では前腸が栄養吸収に重要な場であることが明らかとなった。またアミノ酸トランスポーター遺伝子は飼育環境によりその発現が変動し、そのパターンも淡水環境において高発現である傾向が全体として観察され、塩分環境要因との関連があることが示された。また、細胞内浸透圧調節物質としてアミノ酸が寄与していることが示され、海水のような高塩分環境に適応する際には、遊離アミノ酸の総量を増加させる長期的対応機構とグリシン、アラニンなど一部のアミノ酸を増加させる短期的対応機構が存在することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

This research project aimed to reveal the molecular mechanisms for amino acid absorption in the gastrointestinal tract in teleosts, and the relationship among amino acid absorption mechanisms, intracellular free amino acids as osmolytes, and environmental salinities. In this project, 10 amino acid transporter genes were identified from the cDNA library derived from Mozambique tilapia intestinal tract total RNA. The expression levels of almost all of these genes were higher in the anterior part of intestine comparing with those in the posterior intestine, and there was apparent inverse relationship between environmental osmolality and expression levels of some of identified amino acid transporters. Intracellular concentration of total free amino acids was increased in response to environmental salinity increase. There seems to be two different intracellular amino acid control mechanisms, the one is for short-term, acute blood osmolality changes, and the other is for long-term adaptation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：魚類生理学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：栄養吸収 浸透圧調節

1. 研究開始当初の背景

食料としての魚類は、古来より日本人にとっての主要な動物性タンパク源であり、現在においても日本人の動物性タンパク質摂取量の4割を担う重要なものである。単にタンパク源としてだけでなく、魚肉には数多くの健康増進作用も報告されており、機能性食品としての一面も併せ持っている。近年、魚介類の品質保持に優れた流通の発達と相まって、世界的にその需要が高まっている。しかし、国内においては特に若年層で魚介類消費量の減少の一途をたどっている。国内での将来的な需要を向上させることは国民の健康増進に寄与するだけでなく、水産業の活性化にもつながる。これを実現させるためには食育を通じた啓蒙活動のみならず、更なる食味の改善を目指すことが必要となってくる。天然から漁獲されたものに関しては、流通過程での鮮度保持以外で対応することは困難だが、養殖魚においてはこの限りではない。養殖研究においてはこれまでも食味向上に関して広く研究が進められているが、食味に関わる要素の体内への取り込み、または移行メカニズムに関しては未だ不明な点が多い。

水産物の食味として品質に大きく影響するものにアミノ酸およびその関連化合物(グリシン、アラニン等)が挙げられる。これら呈味成分の含有量が少ないといわゆる水っぽい味になってしまう。またこれらの物質は生理的にも非常に重要な物質であり、アミノ酸についてはタンパクの構成成分として生体の成長、維持に不可欠な栄養物質である。またこれらの物質は細胞内浸透圧調節機構への関与も考えられ、細胞機能の維持においても重要な役割を果たしていることが示唆されている。アミノ酸およびその関連化合物はその大部分が消化吸收過程において消化管から体内へ移

行し、様々な生体内活動に利用されるが、その吸収経路は多岐にわたる。消化管内腔は体内がほぼ無菌状態であるのと対照的に、生体にとって有害な物質も含まれる。これに対処するため消化管での物質吸収は選択的に必要な物質だけを取り込み、有害成分の取り込みを最小限に抑える機構を持つ。消化管でのアミノ酸等の取り込みはsolute carrier family (SLC)と呼ばれる輸送体タンパク質ファミリーに属する様々な輸送体によってそれぞれ特異的経路で体内に取り込まれることが、哺乳類における研究より明らかになってきている。広塩性魚であるティラピアは本来淡水域を主な生息環境としているにも関わらず、同一給餌条件下で海水飼育の方が体重増加率が良いことが報告されている。当魚種では浸透圧調節のエネルギーコストが海水適応下で高いことから、海水において基礎代謝が低くなることで成長に利用可能な栄養分が増えることは考えにくい。このことから、体の材料となるアミノ酸の取り込みが環境変化によって促進されている可能性も考えられ、成長の観点からも大変興味深い。

2. 研究の目的

本研究では食味および成長に関連する物質、特にアミノ酸の消化管における取り込み機構の包括的な理解とその生理学的意義の解明を目指すとともに、環境浸透圧が及ぼす魚肉の呈味性への影響を検討することとした。

3. 研究の方法

実験魚としては環境浸透圧変化の影響を同一魚種において比較検討することが必要となる。そこで本研究では浸透圧調節機構や成長についての知見が豊富な広塩性魚であるモザンビークティラピア *Oreochromis mossambicus*

を用いた。

(1) ティラピア消化管において発現するアミノ酸トランスポーター群遺伝子の網羅的同定

消化管でのアミノ酸吸収機構を解明する上で、その役割を担うアミノ酸トランスポーター群の同定は不可欠である。そこでまず本研究では哺乳類での知見とこれまでに公開されている魚類のゲノムデータベースを活用し、消化管でのアミノ酸吸収に関与することが予想される15種の輸送体について、縮重プライマーを設計した。ティラピア消化管cDNAライブラリーを鋳型として、各種アミノ酸トランスポーターcDNAの部分配列を同定した。その後RACE法により、全長配列の同定を行った。

(2) ティラピア消化管部位別のアミノ酸トランスポーター群遺伝子の発現パターン解析

消化管の部位ごとのアミノ酸吸収特性の差異を検討するため、腸管を形態的に前腸、後腸に大別し、まず大まかに遺伝子ごとの発現パターンを定量PCR法により解析した。その後、詳細な解析を要する遺伝子に関しては、前腸を3部位、後腸を前後半に分離、さらに前腸と後腸の移行部も含めて、計6部位に分け、発現パターンを詳細に検討した。

(3) ティラピア消化管におけるアミノ酸トランスポーター群遺伝子発現の環境浸透圧による変動の検討

海水のような高浸透圧環境では真骨魚類は環境水を積極的に飲み、脱塩をした後、水を取り込む。このように環境浸透圧によって消化管内環境は大きく変動する。この際、消化管におけるアミノ酸吸収機構も変化している可能性を検討するため、淡水、海水、180‰海水で飼育したティラピアにおいて、同定した各種アミノ酸トランスポーター遺伝子の発現変動

を前腸、後腸に大別し、検討した。

(4) ティラピア筋肉中遊離アミノ酸含量に対する飼育環境浸透圧の影響の検討

遊離アミノ酸はタンパク合成に重要なだけでなく、細胞内浸透圧調節物質として重要であることが示唆されている。体内でのアミノ酸需要を把握するため、まず淡水と海水で飼育したティラピア筋肉中遊離アミノ酸含量についてHPLCを用いて、分離、測定した。

(5) 環境浸透圧変化時における筋肉中遊離アミノ酸量変動の経時的解析

急激な環境浸透圧変化時には血液浸透圧は通常の範囲を超えて変動することが知られており、細胞内浸透圧もそれに対応するため、変動することが考えられる。そこで、淡水飼育ティラピアを70‰希釈海水に移行した際の細胞内浸透圧調節物質としての筋肉中遊離アミノ酸の変動を経時的に解析した。

4. 研究成果

(1) cDNAクローニングの結果、10種のアミノ酸トランスポーター遺伝子、AT1-10をティラピア消化管より同定した。同定したトランスポーターの予想される輸送基質を組み合わせることでティラピアの必須アミノ酸の取込みはすべて可能である。また消化管以外も含めた組織別発現動態を解析したところ(図1)、全身性の発現を示すもの(AT1, 3, 6, 7, 10)と比較的消化管特異的に発現するもの(AT2, 4, 5, 8, 9)に大別された。

図1. 各種アミノ酸トランスポーター組織別発現後者については必須アミノ酸を輸送するものが多く含まれ、消化物からのアミノ酸吸収に特に重要な役割を果たしていることが示唆された。

これらの成果は今回同定した以外のトランス

ポーターの関与を否定するものではないが、得られた情報を用いて、様々な解析を行うことで消化管での複雑なアミノ酸輸送機構の解明につながると予想された。

(2) 次にティラピア消化管部位毎の各種アミノ酸トランスポーターの発現量解析を淡水飼育ティラピアについて行ったところ、AT1, 4, 10以外が前腸において発現が高いことが示された。特に消化管特異的発現を示したAT5と9については後腸での発現はほとんど検出されないレベルであった。さらに部位を詳細に分けた解析の結果、AT9は前腸の中でも最前部において高発現であることも示された。これらの成果より、消化管におけるアミノ酸吸収の主たる場は前腸であることが示された。AT1と10については顕著な発現差は見られなかった。

また主に中性アミノ酸、特にグリシンを輸送することが予想されるトランスポーターAT4は例外的に後腸において高発現を示した。

(3) ティラピア消化管でのアミノ酸トランスポーター発現の環境浸透圧による影響を検討したところ、AT4以外のトランスポーターは淡水環境において発現が高まる傾向にあることが示された(図2)。

アミノ酸トランスポーターにはアミノ酸とナトリウムイオン等を共輸送するものが多く、淡水環境の消化管内には、海水群と比較してイオンの含量が少ないため、輸送活性自体が抑えられている可能性がある。それを補うために消化管での発現を高めていると考えられる。

(4) 浸透圧環境の違いによる細胞内浸透圧調節物質である遊離アミノ酸の需要の変化を把握するため、淡水と海水で長期間飼育したティラピアの筋肉中遊離アミノ酸量の測定を行った。その結果、遊離アミノ酸各成分を個別に見ると、環境による明確な差はないものの、

総量としては、淡水群と比較して海水群では約20 mM濃度が高いことが明らかとなった。血液浸透圧についても淡水と比較して海水群で20 mOsmほど高くなっており、細胞内の水分を保持しつつ、細胞内浸透圧と血液浸透圧を釣り合わせるために細胞内遊離アミノ酸量を増加させていることが示唆された。なお、筋肉中水分含量なども同時に測定したが、環境に依らず一定であることが示された。この結果から、細胞内浸透圧調節物質として遊離アミノ酸は重要な物質であり、その需要は海水馴致個体において高まることが示唆された。

(5) 長期的適応では細胞内遊離アミノ酸含量と血液浸透圧との間の相関が示唆された。次に急激な環境浸透圧変化の際に生じる血液浸透圧変化に対する細胞内遊離アミノ酸量の応答について解析を行った。その結果、淡水から海水に移行した個体では、血液浸透圧が大きく上昇し、24時間後に最大約400 mOsmに達し、上昇率としては30%程であった。またこの際、筋肉中水分含量は減少したが、減少率は10%程度にとどまっており、何らかの機構により細胞内に水分が保持されていることが示された。この時、遊離アミノ酸濃度は顕著に上昇し、総量としての増加率は約35%となった。このことは水分含量の減少による濃縮以外に、積極的に細胞内遊離アミノ酸を増加させる機構の存在を示唆している。さらに、長期適応では確認できなかった遊離アミノ酸の成分ごとの変化量の違いも見出された。特に、グリシン、アラニンの増加量が顕著であった。また、アラニンについては増加率についても24時間後に約2.5倍になっており、短期的な細胞内浸透圧調節機構としてグリシン、アラニンの調節機構の存在が示唆された。浸透圧を上昇させるためには、物質の存在濃度を増加させる必要があり、生合成による供給ではなく、高分子タンパクの分解によってこれら遊離ア

ミノ酸が供給されている可能性が高い。この結果は、生物学的知見を提示するだけでなく、魚肉の呈味性の向上にむけて応用可能と期待される。

以上、一連の研究により、テラピアをモデルとした生体内へのアミノ酸供給機構としての消化管アミノ酸吸収機構と、生体内でのアミノ酸需要の一部である細胞内浸透圧調節機構の環境浸透圧との関連の一端を明らかにした。今後は絶食や成長との関連も視野に入れつつ、より詳細な研究を進める必要がある。

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8件)

(1) Soichi Watanabe, Miyuki Mekuchi, Hiroki Ideuchi, Yi Kyung Kim, Toyoji Kaneko. Electroneutral cation-Cl⁻ cotransporters NKCC2b and NCCb expressed in the intestinal tract of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology part A* (査読有) in press, 2011.

(2) Fumiya Furukawa, Soichi Watanabe, Toyoji Kaneko. Responses of gill mitochondria-rich cells in Mozambique tilapia exposed to acidic environments (pH 4.0) in combination with different salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology part A* (査読有) 158, 2011, 468-476.

(3) Jason P. Breves, Soichi Watanabe, Toyoji Kaneko, Tetsuya Hirano, E. Gordon Grau. Prolactin restores branchial mitochondrion-rich cells expressing Na⁺/Cl⁻ cotransporter in hypophysectomized Mozambique tilapia. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and*

Comparative Physiology (査読有) 299, 2010, 702-710.

(4) Yi Kyung Kim, Soichi Watanabe, Toyoji Kaneko, Min Do Huh, Soo Il Park. Expression of aquaporin 3, 8 and 10 in the intestines of freshwater- and seawater-acclimated Japanese eels *Anguilla japonica*. 76, 2010, 695-702.

(5) Soichi Watanabe, Toyoji Kaneko. Prolactin-releasing peptide receptor expressed in the pituitary in Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*: an aspect of prolactin regulatory mechanisms. *General and Comparative Endocrinology* (査読有) 167, 2010, 27-34.

(6) Fumiya Furukawa, Soichi Watanabe, Toyoji Kaneko, Katsuhisa Uchida. Changes in gene expression levels of somatolactin in the pituitary and morphology of gill mitochondria-rich cells in Mozambique tilapia after transfer to acidic freshwater (pH 3.5). *General and Comparative Endocrinology* (査読有) 166, 2010, 549-555

(7) Ryohei Yanagie, Kyung Mi Lee, Soichi Watanabe, Toyoji Kaneko. Ontogenic change in tissue osmolality and developmental sequence of mitochondria-rich cells in Mozambique tilapia developing in freshwater. *Comparative Biochemistry and Physiology part A* (査読有) 154, 2010, 263-269.

(8) Keigo Kakumura, Soichi Watanabe, Justin D Bell, John A Donald, Tes Toop, Toyoji Kaneko, Susumu Hyodo. Multiple urea transporter proteins in the kidney of holocephalan elephant fish (*Callorhinchus milii*). *Comparative Biochemistry and*

Physiology part B (査読有) 154, 2009,
239-247.

[学会発表] (計3件)

(1) 渡邊 壮一 ウナギは海水適応下でいかに
して水を補給するか? 第16回Hindgut Club
Japanシンポジウム 2010年12月4日 専修大学
神田キャンパス

(2) 渡邊 壮一 広塩性魚における環境浸透圧
変化による筋肉中遊離アミノ酸量変動と呈味
への影響 平成22年同日本水産学会秋季大会
2010年9月23日 京都大学総合人間科学部

(3) Soichi Watanabe. TRPV4
Stretch-Activated Calcium Channel
Mediates Hyposmolality-Sensitive
Prolactin Release From Hypophysial
Prolactin Cells of Mozambique Tilapia.
International Congress on the Biology of
Fish. July 6-9, 2010, Universitat Autònoma
de Barcelona, Barcelona, Spain.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 壮一 (WATANABE SOICHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：20507884