

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 6 月 12 日現在

機関番号：32670

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22651074

研究課題名（和文）ソマトラクチンによる健康的な体脂肪率の調節

研究課題名（英文）Healthful regulation of body fat percentage by somatolactin

研究代表者

深町 昌司 (FUKAMACHI SHOJI)

日本女子大学・理学部・准教授

研究者番号：20323446

研究成果の概要（和文）：ソマトラクチン（SLa）の役割として、筋肉や肝臓における中性脂肪量の調節が示唆されていた。本研究の目的は、この機能の確認と水産業への応用の可能性を探ることである。SLa の突然変異系統と過剰発現遺伝子組換え系統を、内的、及び外的な環境を様々に変化させて飼育した時の肝臓脂肪率を測定したところ、SLa の発現量よりも月齢や食餌の違いによる影響の方が大きいことが判明した。

研究成果の概要（英文）：It has been indicated that somatolactin (SLa) would function to regulate triglycerides in the muscles and liver. The purpose of this study is to verify the function and explore a possibility for its application to fisheries. Using the mutant and transgenic strains of the *SLa* gene which were bred under various breeding conditions, we found that the internal/external environments (age and foods) have more effects on percent hepatic triglycerides than the SLa expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	0	2,000,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	330,000	3,430,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：メダカ、ソマトラクチン、脂肪率

1. 研究開始当初の背景

水棲脊椎動物（魚類）には、成長ホルモン・プロラクチンファミリーに属するソマトラクチンアルファ（somatolactin alpha; SLa）という、脳下垂体中葉から分泌されるペプチドホルモンが存在する。1990年の発見以来、多くの魚類内分泌学者が研究を行い、生殖・浸透圧調節・ストレス応答・エネルギー代謝などの様々な役割が論じられてきたが、確た

る証拠は得られなかった。その理由として、これらの研究では、主に生理学的な実験手法のみが用いられてきたことが挙げられる。

申請者らは、体色異常突然変異メダカ（*color interfere; ci*）の原因遺伝子が *SLa* であることを突き止め、*SLa* が皮膚色の調節に必須であることを遺伝学的に証明した [Fukamachi et al. 2004 PNAS]。一方で、*SLa* の受容体（SLR）が皮膚以外の様々な器

官に発現していることもわかり、SLR を最も強く発現する肝臓と筋肉を調べたところ、*ci* 変異体では野生型の数倍量もの中性脂肪が蓄積していることが新たに判明した [Fukamachi et al. 2005 Genetics]。

この「SLa と体色」、及び「SLa と体脂肪率」の因果関係を確認するため、野生型の *SLa* 遺伝子を *ci* 変異体に導入したところ、体色の異常は回復したが、体脂肪率は肝臓でも筋肉でも全く回復しなかった [Fukamachi et al. 2009 Gene]。すなわち、この *SLa*-transgenic *ci* 系統 (Actb-SLa:GFP) の作成により、「SLa と体色」の因果関係は証明されたが、「SLa と体脂肪率」との因果関係の証明には、異なる手法を用いた実験が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、上述の「SLa と体脂肪率」の因果関係を検証することを目的とした。なお、本研究の結果次第では、低脂肪高蛋白のヘルシーな魚や脂ののった美味しい魚の養殖や、ヒトのダイエットやメタボリック症候群対策など、SLa の医療分野への応用を視野に入れている。

3. 研究の方法

(1) 肝臓脂肪率の測定方法の確立

本研究では、肝臓に含まれる中性脂肪の割合 (肝臓脂肪率) に焦点を当てた。上述の先行研究では、他研究室に実験協力を依頼し、HPLC 法による中性脂肪の定量を行っていたが、本研究では研究室内で独自に測定系を立ち上げることで、随時大量にサンプルを測定できるようになることを目指した。

(2) 月齢による肝臓脂肪率への影響

飼育室 (水温 27°C、明期 14 時間) で比較的大量にストックしていたセレベスマダカ (*Oryzias celebensis*) を用いて、8 ヶ月間に計 5 回、同一水槽から数匹を無作為に選び、肝臓脂肪率を測定した。データの比較検定は、一元配置分散分析と事後検定 (Tukey 法) により行った。

(3) 水温による肝臓脂肪率への影響

大型の水槽に、OK-cab 系統と *ci* 系統の成魚を 6 匹ずつ投入し、一つの水槽は飼育室内に、もう一つの水槽は野外に設置した。2011 年 7 月～2012 年 2 月まで飼育したところ、野外の水槽の水温は 4°C にまで低下した。飼育期間中、飼育室内・野外ともに何匹かの魚は死んでしまったが、生き残った個体を用いて肝臓の脂肪率を測定した。データの比較検定は、多重 t 検定と Bonferroni の補正により行った。

(4) 食餌・水槽色・系統による脂肪率への影響

ci 系統、Actb-SLa:GFP 系統に加え、野生

型系統 (HNI) からそれぞれ雌雄 1 匹ずつ、合計 6 匹の成魚を水槽に投入した。この水槽を 4 つ用意して飼育室内に設置し、それぞれ通常飼育、絶食飼育、黒塗り水槽飼育、白塗り水槽飼育を 1 ヶ月間行った。結果、全 24 匹の魚が生き残り、これらの肝臓脂肪率を測定した。データの比較検定は、飼育環境と系統をもとに 24 匹の魚をグループ分けした後、二元配置分散分析と事後検定 (Tukey 法、または Dunnett 法) により行った。

(5) SLa の発現量による脂肪率への影響 I

Actb-SLa:GFP 系統 [*ci/ci*; *B/B*; *R/R*; *SLa⁺/SLa⁺*] と Hd-rr 系統 [*Ci/Ci*; *b/b*; *r/r*; *SLa⁻/SLa⁻*] との F₁ を Hd-rr 系統に戻し交配した。詳細は省略するが、これにより、8 種類の遺伝子型の F₂ が得られる。これらの魚を同一環境下で飼育し、成魚まで成長した時点で肝臓脂肪率を測定した。あらかじめ、これらの F₂ の遺伝子型を表現型観察により同定しておき、得られたデータを *ci*, *b*, *r*, *SLa* それぞれの遺伝子に関して野生型と変異型の 2 つのグループに分類して比較を行った。検定は多重 t 検定と Bonferroni の補正により行った。

(6) SLa の発現量による脂肪率への影響 II

(5) 同様に、Actb-SLa:GFP 系統と Hd-rr 系統との F₁ を、今度は *ci* 系統 [*ci/ci*; *B/B*; *R/R*; *SLa⁺/SLa⁺*] と交配した。詳細は省略するが、これにより SLa の発現量に関し、過剰発現 (SLa⁺⁺)、通常発現 (SLa⁺)、および無発現 (SLa⁻) の 3 種類の F₂ が得られる。これらを表現型で区別するのは困難であるため、成魚まで成長後、尾鰭からゲノム DNA を抽出し、PCR-RFLP 法により遺伝子型を同定したのち、肝臓脂肪率を測定した。得られたデータを上記の 3 グループに分類し、一元配置分散分析と事後検定 (Tukey 法) により比較検定を行った。

4. 研究成果

(1) 肝臓の脂肪率測定系の改善

先行研究同様、本実験の開始直後は、メダカの体腔から取り出した肝臓をそのまま脂肪抽出に用いていた。脂肪抽出には Bligh & Dyer 法を用い、脂肪量の測定には市販のキット (トリグリセライド E-テストワコー; 和光純薬) を用いた。しかし、データのぶれが大きかったため、様々に条件を検討した結果、取り出した肝臓を一度生理的塩類溶液に浸し、実体顕微鏡下で余分な付着物を丁寧にピンセットで取り除く、というステップを加えることにした。実際、実体顕微鏡下で観察すると、体腔内から持ち込まれたと思われる「油の玉のようなもの」が肝臓に付着しており、これらの不均一な混入がデータのぶれの原因であることが伺われた。実際、肝臓を丁寧にトリミングすることで、データの変動係

数が有意に減少し、安定した値を得ることに成功した (表 1)。以降のすべての実験において、この方法を用いて肝臓脂肪率を測定した。

表 1. プロトコル改善による変動係数の低下

系統	プロトコルの改善	n	肝臓の脂肪率 (%)			変動係数
			Mean	Max	Min	
Hd-rr	前	24	2.58	7.90	0.51	0.63
	後	16	0.51	0.80	0.20	0.30
<i>ci</i>	前	20	3.44	8.64	0.46	0.63
	後	19	0.76	1.86	0.45	0.47
Actb-S	前	9	2.86	4.84	0.30	0.53
La:GFP	後	5	0.50	0.70	0.38	0.26

(2) 老化による肝臓脂肪率の上昇

10~17ヶ月齢のセレブスメダカを用いて実験を行ったところ、肝臓脂肪率は加齢により急激に上昇することがわかった (図 1)。先行研究においては、実験に用いるメダカを3ヶ月間以上同一環境下で飼育することで、環境要因の形質への影響を抑えたつもりであったが、月齢を揃えてはいなかった。

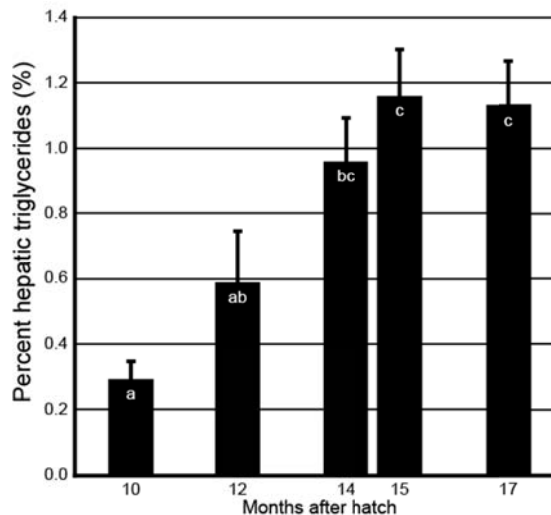


図 1. 加齢による肝臓脂肪率への影響

表 1 と図 1 の結果を鑑みるに、先行研究では SLa による体脂肪率への影響を正確に評価出来ていなかった可能性が高い。以下の実験では、改善されたプロトコルと、月齢を揃えた魚を用いて実験を行い、SLa の生理活性を正確に評価することを心がけた。

(3) 越冬時の肝臓肥大

屋内・屋外飼育による肝臓脂肪率への影響を調べたところ、まず、肝臓は越冬時に肥大し、体重における肝臓重量の割合 (hepatosomatic index; HSI) が約 2 倍に増加していることがわかった (屋内 $3.1 \pm 0.2\%$ 、屋外: $6.3 \pm 0.7\%$)。一方で、肝臓脂肪率には有意な差は無く (屋内 $0.34 \pm 0.02\%$ 、屋外:

$0.45 \pm 0.07\%$)、メダカは越冬に備えて中性脂肪を選択的に蓄えるのではなく、肝臓全体を肥大させることで栄養源を確保していることが伺われた。なお、この実験には *ci* 系統を用いたため、越冬時の肝臓肥大には SLa が関与しないことも明らかとなった。

(4) 絶食時の肝臓脂肪率の増加

通常、絶食、黒水槽、白水槽飼育による肝臓脂肪率への影響を調べたところ、まず、絶食環境下では肝臓が萎縮し、HSI が有意に低下することがわかった (図 2)。一方、肝臓脂

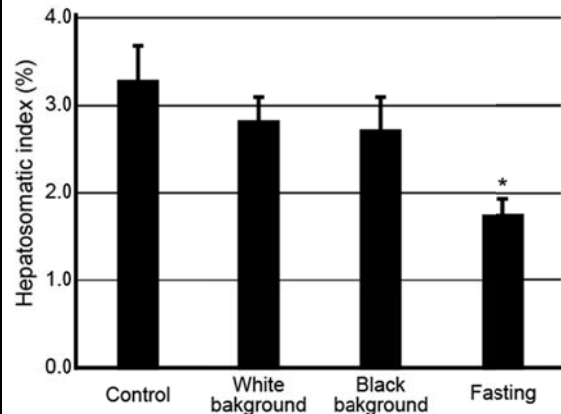


図 2. 飼育環境の違いによる HSI への影響

肪率は、絶食環境下では逆に増加することが明らかとなった (図 3)。肝臓中の中性脂肪量に関してはどの環境下でも差が無かったことから、1ヶ月間の絶食により、中性脂肪以外の貯蓄栄養分 (おそらく、グリコーゲン等の炭水化物) が消費されたために肝臓重量が低下したと考えられる。

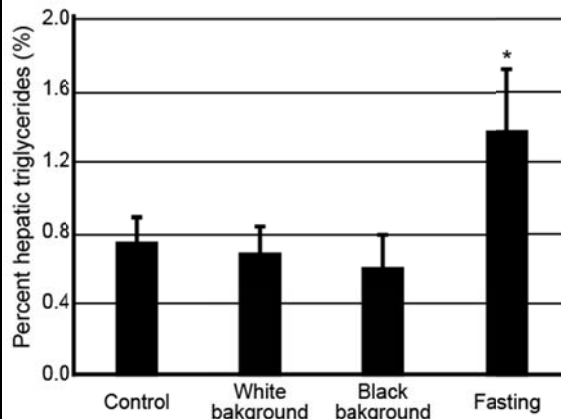


図 3. 飼育環境の違いによる肝臓脂肪量への影響

同じデータを環境の違いではなく系統の違いでグループ化して比較すると、SLa の発現量が多いほど肝臓脂肪率が上昇することが明らかとなった (図 4)。従って、SLa には肝臓における中性脂肪の蓄積を促進する役割があることが示唆された。

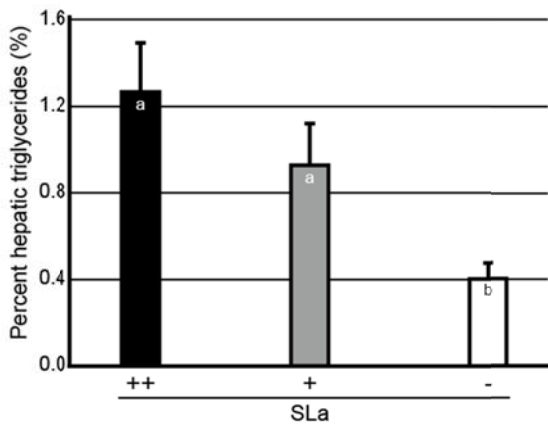


図 4. 系統差による肝臓脂肪率への影響

(5) 遺伝子型の違いによる肝臓脂肪率への影響

(Actb-SLa:GFP x Hd-rr) x Hd-rr の交配 (メス x オス) からは、合計で 78 匹の F₂ 成魚を得た。これらを、*ci*, *b*, *r*, *SLa* の遺伝子座に加え、性決定遺伝子座である Y 遺伝子座の遺伝子型 (性別) にもとづいてデータをグループ分けし、肝臓脂肪率を比較した (図 5)。いずれのグループ分けにおいても有意な差は検出されず、*SLa* を含むどの遺伝子も肝臓における脂肪代謝には大きく関与しないことが示された。なお、SLa++ と SLa+ とで差が無いことは、図 4 の結果と矛盾しない。

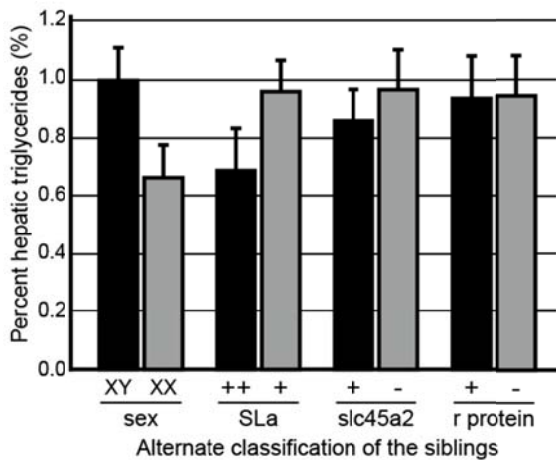


図 5. 遺伝子型の異なる F₂ における肝臓脂肪率の比較

また、(Actb-SLa:GFP x Hd-rr) x *ci* の交配からは、合計で 30 匹の F₂ 成魚を得た。これらを SLa の発現量に応じて 3 グループ (SLa++, SLa+, SLa-) に分け、肝臓脂肪率を測定・比較したところ、グループ間に有意な差は検出されなかった (図 6)。この結果は、図 4 の結果と矛盾する。この理由として、以下の二つが考えられる。一つは、SLa の肝臓脂肪率への影響は、限られた月齢 (図 1) や系統 (遺伝的背景; genomic background) など、特定の条件においてのみ観察できるとい

う可能性である。もう一つは、図 6 の SLa- におけるエラーバーが大きいことから、肝臓に付着している「油の玉のようなもの」を完全に取り除くことに失敗した結果、肝臓脂肪率の平均値が高くなってしまった (表 1) 可能性である。

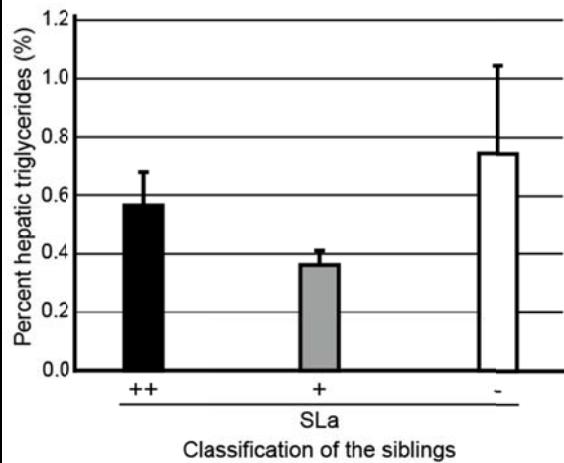


図 6. SLa の発現量が異なる F₂ における肝臓脂肪率の比較

いずれにせよ、SLa は肝臓脂肪率を上昇する役割があるのかもしれない (図 4) が、月齢 (図 1) や食餌 (図 3) による影響ほど顕著ではないと結論できる。従って、SLa の主要な機能は体色調節であり、SLa の投与または阻害によって筋肉や内臓の脂肪率を調節することは、可能かもしれないが、より強力な作用を有する別の遺伝子を探索する方が有効だろうと考えている。

以上の成果は、現在 BMC Genetics 誌への再投稿準備中である。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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
深町 昌司 (Shoji Fukamachi)
日本女子大学・理学部・准教授
研究者番号：20323446

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし