

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580277

研究課題名(和文) スーパーサーモンと普通魚の食欲調節の違いの解明とその応用による養魚育成技術の開発

研究課題名(英文) A study on the mechanisms of appetite regulation in super salmon and its application for aquaculture

研究代表者

中野 俊樹 (NAKANO, TOSHIKI)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10217797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：魚類を含む脊椎動物の成長は、成長ホルモン(GH) インシュリン様成長因子系により制御されている。しかしGH遺伝子組換え魚におけるその系にかかわる代謝産物の動態については不明な点が多い。本研究ではGH遺伝子組換えギンザケを用い、メタボローム解析により代謝産物を非組換え魚と比較した。組換え区の筋肉では解糖系のアクティビティが変化していた。TCA回路では一部の代謝産物レベルが組換え区で変化していた。また肝臓ではそれらの様相が異なっていた。さらにそれらの変化は絶食により顕著となった。以上よりGH遺伝子の組換えは特に筋肉において高成長のためのエネルギーの生産を増大させていると推察される。

研究成果の概要(英文)：Growth in fish is regulated by the growth hormone (GH)-insulin-like growth factor (IGF) axis. Little is known concerning the in vivo levels of global metabolites and the mechanism of enhancement of growth in GH transgenic fish. The present study examined the charged metabolites levels in GH transgenic coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by metabolomic analysis. The most notable difference found between transgenic and NT fish was that glycolysis metabolite levels changed in the muscle of transgenic fish. In addition, the change in some metabolite levels in the transgenic fish muscle was enhanced by ration-restriction. However, a few metabolites levels of the TCA cycle were found to decrease in the transgenic fish muscle. These effects observed in muscle were different from effects seen in liver. The results suggest that GH transgenesis can improve the use of carbohydrates as a source of energy associated with rapid growth.

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：農林水産物 水産学 栄養学 組換え食品 バイオテクノロジー 生理学

1. 研究開始当初の背景

口てい疫や鳥インフルエンザなどの影響で魚介類に対する需要が拡大している。この需要増を賄うためには養殖技術による増産が必要となる。本課題の研究代表者（以下代表者と略す）は、健魚を育成するため酸化的ストレスや養魚用サプリメントに関する一連の研究が評価され国際学会等で招待講演をしてきた。水産分野ではサプリメントの研究が盛んになる一方で、様々な恩恵をもたらす食料増産にも繋がる遺伝子組み換え生物の研究も期待されている。カナダ水産海洋省国立ウエストバンクーバー研究所の R.H. デブリン博士は、成長ホルモン(GH) 遺伝子を導入することで種々の組織で GH を過剰発現し驚異的な成長をするサケ“スーパーサーモン”の作出に世界で初めて成功した (Devlin *et al.*, *Nature*, 1994 & 2001)。その後、GH 組換え魚の商業的な生産をアメリカの民間会社が FDA に申請しているが、高成長のメカニズムとそれに関わる因子や安全性の分析は十分ではない。

代表者はこのスーパーサーモンを用い、魚類成長の中枢をなす GH-インシュリン用成長因子 (IGF-I) 系に関わる因子の発現動態について解析した。その結果 GH と IGF-I の血中レベルは組換え個体において一日を通して高く推移すること、それら成分に関わる遺伝子は摂食後徐々に増大するリズムを持つことなどを明らかにした。しかし、GH 組換え魚において認められる高い成長をもたらす原因は体内の GH レベルの上昇のみでは説明が付かず、未だ不明な点が多いのが現状であった。

2. 研究の目的

前述のように魚類の成長は GH-IGF-I 系により主に調節されている。養殖魚は環境から様々なストレスを受け、それらが健康や生産性に影響を与えると考えられる。代表者らは環境由来のストレスがギンザケの GH-IGF-I 系に及ぼす影響を検討してきたが、GH 組換え魚における各種代謝産物の動態やストレスの影響、さらに食欲に関する知見は少ない。

本研究では R.H. デブリン博士とカナダ水産海洋省の協力の下、GH を過剰発現している GH 組換えスーパーサーモンに認められる高い摂食活性発現のメカニズムを明らかにするため、その発現に関わると考えられる代謝産物の動態についてメタボローム解析し、さらに成長関連遺伝子の発現に及ぼすストレスの影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) GH 遺伝子組換えスーパーサーモンの作出、飼育およびサンプリング:

GH 遺伝子組換えスーパーサーモンは、R.H. デブリン博士ら(1994)により開発されたオールサーモン GH 発現用ベクター-OnMTGH1 をマイクロインジェクション法により導入・固定したギンザケ(*Oncorhynchus kisutch*) M77 系をカナダ国立ウエストバンクーバー研究所(CAER-DFO/UBC)内の特殊隔離飼育施設で飼育・蓄養した。また非組換え普通魚は、カナダ・ブリティッシュコロンビア州、チヘイリス川産のギンザケを用いた。

代謝産物の動態の違いを明らかにするためにはサンプリング時のサイズと年齢を揃える必要があった。そこで3つの試験区を設定した。すなわち、非組換え普通魚(対照, 1歳魚)区、GH 組換え魚(当歳魚)区、および給餌制限組換え魚(1歳魚)区の3区を設けた。さらに日本国内で飼育実験するために非組換えギンザケ当歳魚を宮城県内の養鱒場より購入し、東北大学大学院農学研究科内の飼育施設で飼育した。

なお、以上の実験は全てカナダ水産海洋省太平洋実験動物委員会(PRACC/DFO)と東北大学の動物実験指針を遵守して行った。

(2) メタボローム解析:

組織を液体窒素中で瞬間凍結後、内部標準物質として Methionine sulfone (MES)ならびに D-Camphol-10-sulfonic acid (CSA)、およびメタノールを添加しホモジナイズした。そこにクロロホルムと蒸留水 (MilliQ 水)を加え攪拌し、遠心分離した。その上層の水-メタノール層を限外ろ過フィルター(分画分子量 5,000 Da)により限外ろ過し、ろ液を遠心濃縮したものを適宜蒸留水で希釈して分析用試料として用いた。

イオン性一次代謝産物は、キャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-TOFMS, アジレント社製)により定法に従い網羅的に分析した。

4. 研究成果

(1) イオン性一次代謝産物の検出

普通筋肉と肝臓を上記方法によりメタボローム分析したところ、陽イオン性と陰イオン性の化合物を合わせ約 200 種類の代謝産物を検出し定量することができた。しかし代謝産物によっては個体間の差が大きいものも認められた。その中で解糖系と TCA 回路は結果が安定していたので、それら系に関わる化合物の動態について解析した。

(2) 給餌後の代謝産物の比較

組換え区では複数の組織で GH 遺伝子が発現している。本研究により組換え区の筋肉では解糖系のアクティビティーが変化していることが分かった。一方 TCA 回路では、一部の代謝物レベルが組換え区において減少していた。また肝臓ではそれら様相の傾向が若干異なっていた。

(3) 代謝産物のレベルに及ぼす絶食ストレスの影響

給餌した場合では組換え区の筋肉で解糖系のアクティビティーが変化したが、絶食によりその変化が顕著となることが認められた。一方 TCA 回路では、給餌した場合と比べ絶食が組換え区の代謝産物レベルに与える影響は小さいことが分かった。

(4) 生理学的なストレスの影響

組換え魚と比較するため非組換え普通魚を用い、養殖環境で最も受けやすいと考えられるすくい取りなどのハンドリングによるストレスが遺伝子発現に及ぼす影響について調べた。その結果、ストレス後には成長関連因子(GH、IGF-I および GH 受容体)に関わるいくつかの遺伝子のレベルが変化することが判明した。

(5) 総合考察

一般にサケ科魚類では炭水化物の利用能が低いといわれているが、GH 遺伝子の組換えはギンザケの筋肉において高い成長に必要なエネルギーの生産を増大させていると推察される。さらに、生理学的なストレスが成長関連遺伝子の発現に影響を及ぼしたことより実験動物の扱いには注意が必要ことが判明し、さらに組換え魚の場合との比較に興味を持たれる。

今後は代謝経路に関わる酵素活性の変動や成長に関与する遺伝子の発現、さらにストレスの影響などについても検討することで、GH 組換え魚に特徴的な高い成長と食欲促進のメカニズムの解明に繋がるものと考えられる。

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3件)

1. T. Nakano, L.O.B. Afonso, B.R. Beckman, G.K. Iwama, R.H. Devlin: Acute physiological stress down-regulates mRNA expressions of growth-related genes in coho salmon, *PLoS ONE*, 8, e71421, 2013.

doi:10.1371/journal.pone.0071421 .

(査読あり)

2. T. Nakano, M. Masuda, T. Suzuki, H. Ohshima: Inhibition by polyphenolic phytochemicals and sulfurous compounds of the formation of 8-chloroguanosine mediated by hypochlorous acid, human myeloperoxidase, and activated human neutrophils, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76, 2208-2213, 2012. (査読あり)
3. T. Nakano, Y. Shiba, T. Yamaguchi, M. Sato, H. Ohshima: Natural marine products inhibit formation of 8-chloroguanosine mediated by hypochlorous acid, myeloperoxidase and activated neutrophils, *Free Radic. Biol. Med.*, 53 (suppl. 1), S95, 2012. (査読あり)

[学会発表](計10件)

1. T. Nakano, T. Yamaguchi, M. Sato, R.H. Devlin, : Effect of moderate or severe acute stressor on expressions of growth-related genes in cultured fish, Book of 15th Colloque franco-japonais d'Océanographie, 15th Colloque franco-japonais d'Océanographie (La Presidence de Aix-Marseille Universite, Jardins du Pharo, Marseille, France, Oct. 21-22, 2013)
2. T. Nakano : Rising to the challenge of reconstructing the coastal fisheries environment following the massive tsunami in Japan: the national 10-year "Tohoku Ecosystem-Associated Marine Sciences (TEAMS)" project, Book of 15th Colloque franco-japonais d'Océanographie, 15th Colloque franco-japonais d'Océanographie (Chambre de Commerce et d'Industrie, Boulogne-sur-mer, France, Oct. 17-18, 2013)
3. 中野俊樹, 白川 仁, 山口敏康, 佐藤 実, G. Yeo, R.H. Devlin, 曾我朋義: 成長ホルモン遺伝子組換えギンザケにおける代謝産物の特徴について、日水秋季大会講要、p.86、2013年度日本水産学会秋季大会(三重大学、津、2013年9月19日 - 9月22日)
4. 林 聡司, 中野俊樹, 山口敏康, 佐藤 実: ORAC 法によるオキシテトラサイクリン投与ギンザケの抗酸化レベルの評価について、日水秋季大会講要、p.15、2013年度日本水産学会秋季大会(三重大学、津、2013年9月19日 - 9月22日)
5. T. Nakano, H. Shirakawa, T. Yamaguchi,

- M. Sato, Y. Suda, M. Saito, H. Maki, T. Soga, G. Yeo, R.H. Devlin: Metabolome profiling of growth hormone transgenic and non-transgenic fish. *Seikagaku*, 85, 122 (2013), 86th Ann. Meet. Jap. Biochem. Soc. (Pacifco Yokohama, Sep. 11-13, 2013)
6. 中野俊樹、白川 仁、山口敏康、佐藤 実、須田義人：ギンザケにおけるインシュリン様成長因子関連遺伝子の発現に及ぼす熱ストレスの影響、日水春季大会講要、p.134、2013 年度日本水産学会春季大会（東京海洋大学品川キャンパス、東京、2013 年 3 月 26 日 - 3 月 30 日）
7. T. Nakano, Y. Shiba, T. Yamaguchi, M. Sato, H. Ohshima: Natural marine products inhibit formation of 8-chloroguanosine mediated by hypochlorous acid, myeloperoxidase and activated neutrophils, Book of Abstract (USB-memory), Society for Free Radical Research International 16th Biennial Meeting (Imperial College London, London, UK, Sep. 6-9, 2012)
8. T. Nakano, Y. Shoji, S. Hayashi, T. Yamaguchi, M. Sato, N. Sugama, A. Takemura: Differences in heat shock-induced stress responses of temperate coho salmon *Oncorhynchus kisutch* and tropical rabbitfish *Siganus guttatus*, Book of Asia-Pacific Marine Biotech. Conf., 16S2-1, Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (Central Public Hall of Kochi City Culture Plaza, CUL-PORT, Kochi, Japan, Jul. 13-16, 2012)
9. 中野俊樹、庄子 唯、山口敏康、洲鎌 望、竹村明洋、佐藤 実：外因性コルチゾルがサンゴ礁域魚ゴマアイゴの生理状態に及ぼす影響について、日水春季大会講要、p.138、2012 年度日本水産学会春季大会（東京海洋大学品川キャンパス、東京、2012 年 3 月 26 日 - 3 月 30 日）
10. T. Nakano, Y. Shoji, S. Hayashi, T. Yamaguchi, M. Sato, L.O.B. Afonso, R.H. Devlin, G.K. Iwama: Heat shock-induced oxidative stress modulates growth-related gene expressions and redox status in coho salmon, Book of Abstract (CD-ROM), International Conference of Comparative Physiology and Biochemistry, (Nagoya Congress Center, Nagoya, Japan, May 31-June 5, 2011)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 俊樹 (NAKANO TOSHIKI)
東北大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：10217797

(2) 研究分担者

白川 仁 (SHIRAKAWA HITOSHI)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：40206280