

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658167

研究課題名(和文) サケ未利用資源の卵巣外皮からの成長促進ペプチドの探索

研究課題名(英文) Research on the identification of growth-stimulating peptides from the ovarian envelopes of salmon

研究代表者

森山 俊介 (MORIYAMA, SHUNSUKE)

北里大学・海洋生命科学部・教授

研究者番号：50222352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、未使用資源であるサケ卵巣外皮から魚の成長促進に関与するペプチドを探索し、物性および生物活性を明らかにすることを目的とした。アセトン処理した卵巣外皮から調製した80%アセトン抽出物をゲル濾過および高性能液体クロマトグラフィーに付すことにより、分子量6.7から17kDaの15のペプチドを単離した。このうち分子量10.9 kDaのペプチドはニジマス肝臓のインスリン様成長因子の発現を増加させる活性を有した。一方、このペプチドのアミノ酸配列を決定することはできなかった。これらのことより分子量10.9 kDaのペプチドは、魚類の成長促進に関与する新規の成長促進因子であることを強く示唆する。

研究成果の概要(英文)：Chum salmon is one of the most important aquatic resources in Tohoku and Hokkaido areas of Japan. The salted salmon roe or ikra is high in commercial value, but the ovarian envelopes after removing ikra don't have much utility value. To demonstrate the presence and functions of growth-stimulating peptide in the ovarian envelopes, we tried to identify a peptide involved in growth regulation from ovarian envelopes of salmon.

The 80% acetone extracts of the ovarian envelopes was fractionated by gel filtration chromatography, and peptides were purified by HPLC. At least 5 peptides were purified. Molecular weight of these peptides was estimated from 6.7 to 17.5 kDa, but amino acid sequence of these peptides was not determined. A 10.9 kDa peptide stimulates hepatic Insulin-like growth factor-I mRNA expression of rainbow trout. These results suggest that the 10.9kDa peptide might be involved in growth regulation of salmon.

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：卵巣外皮 サケ ペプチド 成長促進 インスリン様成長因子

1. 研究開始当初の背景

シロザケ *Oncorhynchus keta* は、岩手県の特産品の一つであり、長年に渡る人工孵化および放流事業を推進したことにより、毎年、約 3 万トンが県内の主要漁港に水揚げされ、鮮魚や加工食品として流通している。なかでもサケの卵はイクラや筋子として商品価値が極めて高いだけでなく、タンパク質含量が高く、アミノ酸、DHA や EPA といった機能性脂質や各種ビタミンなどの成分を豊富に含んでいることから栄養学的にも優れていることが知られている。一方、イクラを採取した後に排出される卵巣外皮は機能性や有効活用が殆ど見出されていないため産業廃棄物として処分されている。申請者は、魚類の成長の調節機構における脳下垂体の成長ホルモンおよび体組織のインスリン様成長因子の機能を研究する過程で、マダイやウナギなど魚類の卵巣に細胞の増殖や分化、また、骨形成などに関与する成長促進因子を検出した。これらの知見に基づいて、サケ卵巣外皮から調製した粗抽出物をニジマス稚魚に摂餌させると、コントロールと比べて、成長が著しく促進されることを明らかにした。これらの結果は、サケ卵巣外皮に魚類の成長促進において重要な機能を担う機能性ペプチドが存在することを強く示唆する。

2. 研究の目的

本研究はサケ卵を採取した後に排出される未利用資源の卵巣外皮を水産資源の増産に高度有効活用するための基礎的知見を集積することを目的として、サケ卵巣外皮の抽出物から成長促進に関与する成長促進ペプチドを単離・同定し、肝臓のインスリン様成長因子 (IGF-I) の発現促進活性を明らかにするとともに、そのペプチドの魚類の成長促進に及ぼす効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 卵巣外皮由来の成長促進ペプチドの探索

サケの卵巣外皮は釜石湾で捕獲され、イクラを採取した後のメス魚から採取した。卵巣外皮をアセトン処理により脱脂した後、凍結乾燥した。卵巣外皮を 1N 塩酸/アセトン (1:28) 溶液中でホモジナイズした後、4 で 1 時間抽出した。遠心分離により得られた抽出残渣を 80% アセトン溶液で、再度、1 時間抽出した。遠心分離のより得られた抽出液を、冷アセトンに加えて、ペプチドを沈殿させた後、遠心分離により沈殿物を回収して、凍結乾燥した。

80%アセトン抽出物を、1N 酢酸あるいは 1%トリフルオロ酢酸 (TFA) で溶解した後、Supergex75 カラムを用いたゲル濾過により分画した。カラムは 1N 酢酸/30%アセトニトリルあるいは 0.1%TFA/30%アセトニトリルで平衡化した。流速は 1 分間あたり 1 ml とし、

280 nm の吸光度を測定してピーク毎に分取した後、凍結乾燥した。得られたフラクションを逆相 ODS-120T カラムを用いた高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) に付して、ペプチドを精製した。溶出液は 0.1%TFA を含むアセトニトリルを用い、濃度を 20%~60% まで 60 分間で上昇させる直線濃度勾配法によってペプチドを溶出させた。流速は 1 分間あたり 1 ml とし、カラム温度は 40 とした。220 nm の吸光度を測定し、ピーク毎に分取して凍結乾燥した。

分画および精製したペプチドの分子量および純度は 15%アクリルアミドゲルを用いた SDS ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法により分析した。ゲル中のペプチドを電気的に PVDF 膜に転写した後、ペプチドをアミドブラック染色法により検出した。精製したペプチドのアミノ末端部のアミノ酸配列はアミノ酸シーケンサーにより解析した。

(2) 成長促進ペプチドの生物活性

サケの卵巣外皮の 80%アセトン抽出物をゲル濾過および HPLC に付して精製したペプチドの生物活性を肝臓の IGF-I mRNA の発現に及ぼす効果として評価した。ニジマス肝臓片 (2 mm 角) を MEM 培地で 48 時間、10 で培養した後、卵巣外皮由来のペプチドを添加して、さらに 24 時間培養した。その後、回収した培養肝臓片における IGF-I mRNA レベルをリアルタイム PCR により測定した。なお、内部標準遺伝子には β アクチンを用いた。

卵巣外皮の 80%アセトン抽出物をサケ飼料 1 g あたり 10 mg 添加した機能性飼料を試作し、この飼料をニジマス稚魚に 3 ヶ月間、摂餌させて成長促進効果を検討した。なお、ポジティブコントロールには脳下垂体由来の成長促進成分を含む増体促進飼料を摂餌させる群を設けた。成長促進効果は体重および肝臓の IGF-I 遺伝子の発現レベルに基づいて評価した。

4. 研究成果

(1) 卵巣外皮由来の成長促進ペプチドの探索

卵巣外皮からの 80%アセトン抽出物の収量は約 10 mg/g であった。抽出物の 0.1%TFA 可溶部を HPLC に付した結果、分子量 6.7~17 kDa の 15 個のペプチドが存在した。そこで、80%アセトン抽出物を 1N 酢酸で溶解し、その可溶部を Superdex75 カラムに付してゲル濾過し、得られたフラクション 2 を HPLC に付して精製した結果、おもなペプチドは分子量 6.7、10.9、13.4、14.5 および 17.5 kDa であった (図 1)。これらのペプチドを精製するために、80%アセトン抽出物の 1N 酢酸可溶部をゲル濾過および HPLC に付したが、目的とするペプチド群は難溶性が高く、不溶化することがわかった。そこで、ゲル濾過の緩衝液を 0.1%TFA/30%アセトニトリルに変更し、さらにゲル濾過のフラクションを凍結乾

燥せずに、直接、HPLC に付すことにより、目的とする 6.7、10.9、13.4、14.5 および 17.5 kDa ペプチド群を精製できることがわかった。

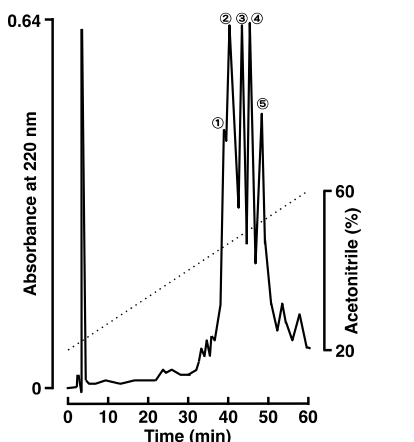


図 1 . 80%アセトン抽出物のゲル濾過フラクション 2 の HPLC .
に 10.9 kDa のペプチドを含む

これらのペプチドのアミノ末端部のアミノ酸配列を解析したが決定することはできなかった。このことは、アミノ末端部がブロックされているものと考えられる。今後、さらに精製したペプチドの構造解析を進める必要がある。

(2) 成長促進ペプチドの生物活性

卵巣外皮の 80%アセトン抽出物から精製した分子量 10.9、13.4 および 17.5 kDa のペプチドを 10、100 および 1000 ng/ml 濃度を用いてニジマス肝臓片を 24 時間 (10) 培養すると、10.9 kDa のペプチド添加肝臓片における IGF-I の発現レベルは、濃度依存的に増加した (図 2) 。しかし、13.4 および 17.5 kDa ペプチドには IGF-I 発現促進活性は認められなかった。これらのことから、分子量 10.9 kDa のペプチドは、サケ科魚類の成長促進機構において重要な機能を担う新規の成長促進ペプチドと考えられる。

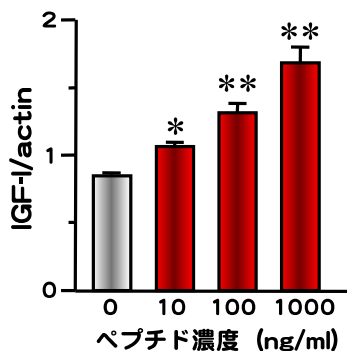


図 2 . 分子量 10.9 kDa ペプチドで培養したニジマス肝臓片 (n=4) における IGF-I mRNA の発現レベル

卵巣外皮の 80%アセトン抽出物を含む機能性飼料をニジマス稚魚に 3 ヶ月間、摂餌させた結果、脳下垂体由来の成長促進成分を含

む増体促進飼料よりも効果は劣るものの、コントロール群と比べて、著しい体重の増加が認められた。また、機能性飼料を摂餌した魚の肝臓の IGF-I mRNA の発現レベルはコントロールよりも高い値を示した (図 3) 。

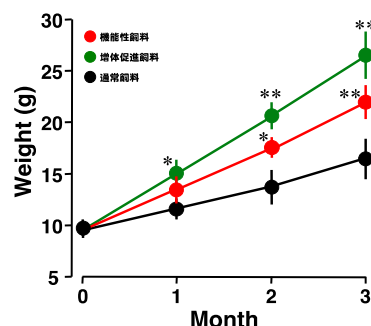


図 3 . 卵巣外皮由来の 80%アセトン抽出物を含む機能性飼料および脳下垂体由来の増体促進飼料を摂餌したニジマス稚魚の体重

これらのことから卵巣外皮の 80%アセトン抽出物を、少なくともサケ科魚類の成長を促進させる技術に応用することは可能であると考えられる。今後、水産増養殖への有効活用に向けた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 9 件)

Breves JP, Seale AP, Moorman BP, Lerner DT, Moriyama S, Hopkins KD, Grau EG, Pituitary control of branchial NCC, NKCC and Na(+), K (+)-ATPase α -subunit gene expression in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, J Comp Physiol B, 査読有, in press.

10.1007/s00360-014-0817-0.

Tachibana T, Moriyama S, Khan MS, Sakamoto T, Central administration of prolactin-releasing peptide shifts the utilities of metabolic fuels from carbohydrate to lipids in chicks, Physiol Behav, 査読有, 2013, 120, 40-45.

10.1016/j.physbeh.2013.06.017.

Uchida K, Moriyama S, Sower SA, Nozaki M, Glycoprotein hormone in the pituitary of hagfish and its evolutionary implications, Fish Physiol Biochem, 査読有, 2013, 39, 75-83.

10.1007/s10695-012-9657-6.

Murakami J, Okada R, Sadamoto H, Kobayashi S, Mita K, Sakamoto Y, Yamagishi M, Hatakeyama D, Otsuka E, Okuta A, Sunada H, Takigami S, Sakakibara M, Fujito Y, Awaji M, Moriyama S, Lukowiak K, Ito E, Involvement of insulin-like peptide in long-term synaptic

plasticity and long-term memory of the pond snail *Lymnaea stagnalis*, 査読有, J Neurosci, 2013, 33, 371-381.

10.1523/JNEUROSCI.0679-12.2013.

Pierce AL, Breves JP, Moriyama S, Uchida K, Grau EG, Regulation of growth hormone (GH) receptor (GHR1 and GHR2) mRNA level by GH and metabolic hormones in primary cultured tilapia hepatocytes, Gen Comp Endocrinol, 査読有, 2012, 179, 22-29.

10.1016/j.ygcen.2012.07.010.

Iwata M, Kinoshita K, Moriyama S, Kurosawa T, Iguma K, Chiba H, Ojima D, Yoshinaga T, Arai T, Chum salmon fry grow faster in seawater, exhibit greater activity of the GH/IGF axis, higher Na⁺, K⁺-ATPase activity, and greater gill chloride cell development, Aquaculture, 査読有, 2012, 362-363, 101-108.

10.1016/j.aquaculture.2010.10.035.

Kurata Y, Kimura Y, Yamanaka Y, Ishikawa A, Okamoto H, Masaoka T, Nagoya H, Araki K, Moriyama S, Hirano H, Mori T, Effects of growth hormone on the salmon pituitary proteome, J Proteomics, 査読有, 2012, 75, 1718-1731.

10.1016/j.jppt.2011.12.009.

Flores AM, Shrimpton JM, Patterson DA, Hills JA, Cooke SJ, Yada T, Moriyama S, Hinch SG, Farrell AP, Physiological and molecular endocrine changes in maturing wild sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, during ocean and river migration, J Comp Physiol B, 査読有, 2012, 182, 77-90.

10.1007/s00360-011-0600-4.

Pierce AL, Breves JP, Moriyama S, Hirano T, Grau EG, Differential regulation of Igf1 and Igf2 mRNA levels in tilapia hepatocytes: effects of insulin and cortisol on GH sensitivity, J Endocrinol, 査読有, 2011, 211, 201-210.

10.1530/JOE-10-0456.

[学会発表](計 8 件)

清水恵子、笠井宏明、山田雄一郎、清水勇一、森山俊介、シロザケ稚魚の降海に伴う腸内細菌構成の変化、平成26年度日本水産学会春季大会、2014年03月27日～2014年03月31日、北海道大学水産学部、函館市、北海道。

天野春菜、志和久之、Nurulnadia Binti Mohd Yusoff、宇野誠一、小山次朗、森山俊介、5種類エストロゲン様物質の単独および複合投与によるマコガレイ血中ビトロジェニン量の比較、第38回日本比較内分泌学会大会・第40回日本神経内分泌学会学術集会 合同大会、2013年10月24日～2013年10月26日、宮崎市民プラザ、宮崎市、宮崎。

西山真樹、内田勝久、森山俊介、千葉洋明、阿部希美、下谷豊和、野崎眞澄、クロヌタウナギにおける生殖腺の発達に応じた血中性ステロイドホルモンの動態と合成酵素の探索、第38回日本比較内分泌学会大会・第40回日本神経内分泌学会学術集会 合同大会、2013年10月24日～2013年10月26日、宮崎市民プラザ、宮崎市、宮崎。

清水恵子、笠井宏明、森山俊介、岩手県産天然ワカメ葉上の細菌叢とエゾアワビの消化管細菌叢について、平成25年度日本水産学会春季大会、2013年03月26日～2013年03月30日、東京海洋大学、品川、東京。

天野春菜、森山俊介、Yusoff NB、宇野誠一、小山次朗、エストロゲン様物質の経口投与によるマコガレイ血中ビトロジェニンの動態、平成25年度日本水産学会春季大会、2013年03月26日～2013年03月30日、東京海洋大学、品川、東京。

天野春菜、細見靖道、森山俊介、藤井一則、平松尚志、東藤孝、原彰彦、低濃度エストロゲン投与によるマコガレイ3タイプビトロジェニンの血中動態、第37回日本比較内分泌学会大会、2012年11月29日～2012年12月01日、福井大学、福井市、福井。

Amano H, Uno S, Koyama J, Hiramatsu N, Todo T, Hara A, Moriyama S, Development of subtype-specific enzyme-linked immunosorbent assay for vitellogenin in marbled sole, *Pleuronectes yokohamae*, The 2012 Society of Environmental Toxicology and Chemistry Asia Pacific Annual Meeting, 2012年09月24日～2012年09月27日 ANA Hotel, Kumamoto.

森山俊介、サケ頭部の未利用資源に含まれる機能性素材と新商品創出に向けて、岩手医科大学・(財)岩手生物工学研究センター 包括連携協定締結記念シンポジウム2011年11月7日、エスポワールいわて、盛岡市、岩手。

6. 研究組織

(1)研究代表者

森山 俊介 (MORIYAMA Shunsuke)

北里大学・海洋生命科学部・教授

研究者番号：50222352