

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23658174

研究課題名（和文） 萌芽研究－アミノ酸は魚類のエネルギー代謝中核物質か？

研究課題名（英文） Amino acids are pivotal substances in energy metabolism?

研究代表者

潮 秀樹 (Hideki Ushio)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：50251682

研究成果の概要（和文）：ゼブラフィッシュの GLP-1 のアミノ酸配列について得られた抗血清を用いたウェスタンブロットングを行ったが、いずれの試料からも陽性反応が認められなかった。本研究期間内では、残念ながら GLP-1 陽性細胞の特定には至らなかった。アミノ酸への応答を明らかにするために、ゼブラフィッシュに Lys 欠飼料を投与したところ、肝臓から筋肉への脂質の移行が起こることが明らかとなり、少なくとも魚類では摂取したアミノ酸がエネルギー代謝制御機構に大きく影響を与えるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：A rabbit polyclonal antibody against zebrafish GLP-1 was produced and used for the detection of GLP-1 protein in several tissues. The antibody did not work well unfortunately. Lys-deficient diet induced lipid mobilization from liver to muscle, which suggests that amino acids function as pivotal regulators in fish energy metabolisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：水産化学

科研費の分科・細目：水圏応用科学・水圏生命科学

キーワード：アミノ酸，代謝，魚類

## 1. 研究開始当初の背景

陸上動物は糖に対する嗜好性が高いが、魚類はアミノ酸に対する嗅覚・味覚応答が非常に高く、糖にはほとんど反応しない (Oike et al., 2007). アンモニア態窒素排出が可能であるにもかかわらず、尿素回路に必要な Arg に対して栄養要求性を示す (Kaushik et al., 1988). マツカワで Arg によってインスリン分泌が促される (Andoh, 2007). 魚類では糖の腸吸収、血糖値の変化、インスリン応答が遅い (Hemre et al., 2002). ゼブラフィッシュでは、糖の取り込みを司る GLUT1 ノックアウトによって神経系の発生は破綻するが、その他の臓器は正常に発生を続ける (Jensen et al., 2006). 一方、哺乳類では、食物刺激によって腸組織から分泌されるインクレチン

(GLP-1 など) が  $\beta$  細胞からのインスリン (Ins) 分泌を制御する。哺乳類では自律神経系による制御も受けるが (Park et al., 2010), 独立した組織を形成しない魚類の  $\beta$  細胞の神経支配については全く不明である。また、哺乳類の糖味覚受容体 T1Rs が消化管内に発現し、GLP-1 の分泌を制御する (Kokrashvili et al., 2009). 魚類ではこの受容体がアミノ酸に特異的に応答することから (Oike et al., 2007), アミノ酸による  $\beta$  細胞機能制御の可能性が強く示唆される。これまでの準備的研究で、T1Rs 遺伝子がニジマスおよびメダカの腸に発現することを見出しており (図 1), T1Rs が GLP-1 分泌を制御する可能性があった。

## 2. 研究の目的

小型魚類を用いて、インクレチンによるインスリン分泌のアミノ酸による制御とインスリンによるアミノ酸取り込み制御を明らかにすることによって、魚類のエネルギー代謝におけるアミノ酸の重要性を見出し、エネルギー代謝主軸物質としてアミノ酸を中心とした魚類固有のエネルギー代謝経路の再構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

蛍光性のあるアミノ酸アナログ

7-azatryptophan, 5-hydroxytryptophan, 5-bromotryptophanをCHSE-214細胞に取り込ませた。蛍光顕微測光システムにて取り込みの状況を測定した。また、ゼブラフィッシュのGLP-1のアミノ酸配列をEMBOSS Antigenicによって解析し、抗原性の高い配列候補としてTSDVSSYLQDQAAQSFVAWLKを得、KLH標識し、ウサギ抗血清を得た。

アミノ酸への応答を明らかにするために、ゼブラフィッシュにLys欠飼料を投与した。

## 4. 研究成果

蛍光性のあるアミノ酸アナログでは、7-azatryptophanの取り込みが優れていることが明らかとなった。

ゼブラフィッシュ肝臓および腸から抽出したタンパク質について得られた抗血清を用いたウェスタンブロッティングを行ったが、いずれの試料からも陽性反応が認められなかった。本配列は比較的疎水性が高いため、今後、抗原配列の再設計を行い、特異的な抗血清を得る予定である。このため、本研究期間内では、残念ながらGLP-1陽性細胞の特定には至らなかった。アミノ酸への応答を明らかにするために、ゼブラフィッシュにLys欠飼料を投与したところ、肝臓から筋肉への脂質の移行が起こることが明らかとなった。以上のように、本研究期間内では、エネルギー代謝主軸物質として確定するには至らなかったが、少なくとも魚類では摂取したアミノ酸がエネルギー代謝制御機構に大きく影響を与えるものと考えられた。

## 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 17 件)

1. Kondo H, Suga R, Suda S, Nozaki R, Hirono I, Nagasaka R, Kaneko G, Ushio H, Watabe S (2011) EST analysis on adipose tissue of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and tissue distribution of adiponectin. *Gene* 485: 40-45. doi: 10.1016/j.gene.2011.05.035.

2. 長阪玲子, 風間貴充, 潮 秀樹, 坂本浩志, 坂本憲一 (2011) □□オリザノールの添加がアスタキサンチン含有飼料によるブリ切り身の変色抑制作用に及ぼす影響. *日本水産学会誌* 77: 1101-1104. doi: 10.2331/suisan.77.1101.

3. Nagasaka R, Kazama T, Ushio H, Sakamoto H, Sakamoto K, Satoh S (2011) Accumulation of gamma-oryzanol in teleost. *Fish. Sci.* 77: 431-438. doi:10.1007/s12562-011-0336-9.

4. Islam Md, Nagasaka R, Ohara K, Hosoya T, Ozaki H, Ushio H, Hori M (2011) Biological abilities of rice bran-derived antioxidant phytochemicals for medical therapy. *Current Topics in Medical Chemistry* 11: 1847-1853. doi: 10.2174/156802611796235099.

5. Nagasaka R, Yamasaki T, Uchida A, Ohara K, Ushio H (2011) □-Oryzanol recovers mouse hypoadiponectinemia induced by animal fat ingestion. *Phytomedicine* 18: 655-660. doi: 10.1016/j.phymed.2011.01.004

6. Ohara K, Kiyotani Y, Uchida A, Nagasaka R, Maehara H, Kanemoto S, Hori M, Ushio H (2011) Oral administration of □□aminobutyric acid and □□oryzanol prevents stress-induced hypoadiponectinemia. *Phytomedicine* 18: 669-671. doi: 10.1016/j.phymed.2011.01.003.

7. Hirano Y, Kaneko G, Koyama H, Ushio H, Watabe S (2011) cDNA cloning of two types of growth hormone receptor in torafugu *Takifugu rubripes*: tissue distribution is possibly correlated to lipid accumulation patterns. *Fish. Sci* 77: 855-865. doi: 10.1007/s12562-011-0377-0.

8. Hakuno F, Yamauchi Y, Kaneko G, Yoneyama Y, Nakae J, Chida K, Kadowaki T, Yamanouchi K, Nishihara M, Takahashi SI (2011) Constitutive expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 inhibits myogenic differentiation through nuclear exclusion of Foxo1 in L6 myoblasts. *PLoS ONE* 6: e25655. doi:10.1371/journal.pone.0025655.

9. Kaneko G, Furukawa S, Kurosu Y, Yamada T, Takeshima H, Nishida M,

Mitsuboshi T, Otaka T, Shirasu K, Koda T, Takemasa Y, Aki S, Mochizuki T, Fukushima H, Fukuda Y, Kinoshita S, Asakawa S, Watabe S (2011) Correlation with larval body size of mRNA levels of growth hormone, growth hormone receptor I and insulin-like growth factor I in larval torafugu Takifugu rubripes. *J. Fish Biol.* 79: 854-874. doi:10.1111/j.1095-8649.2011.03037.x.

1 0. Mentang F, Maita M, Ushio H, Ohshima T (2011) Efficacy of silkworm (*Bombyx mori* L.) chrysalis oil as a lipid source in adult Wistar rats. *Food Chem* 127: 899-904. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.01.045.

1 1. Ishikawa Y, Ohara K, Ohshima T, Ushio H (2011) Linear chain aldehydes evoke calcium responses in B16 melanoma cells. *EXCLI J* 10: 303-311. [http://www.excli.de/vol10/Ishikawa\\_Ushio12\\_2011/Ishikawa\\_Ushio\\_09122011\\_proof.pdf](http://www.excli.de/vol10/Ishikawa_Ushio12_2011/Ishikawa_Ushio_09122011_proof.pdf)

1 2. Sakai S, Murata T, Tsubosaka Y, Ushio H, Hori M, Ozaki H (2012) □-Oryzanol reduces adhesion molecule expression in vascular endothelial cells via suppression of nuclear factor-κB activation. *J Agric Food Chem* 60: 3367-3372. doi: 10.1021/jf2043407.

1 3. Hiroko Yamaguchi, Misako Nakaya, Gen Kaneko, Chie Yoneda, Toshitaka Mochizuki, Katsuya Fukami, Hideki Ushio, Shugo Watabe (2013) Comparison in taste and extractive components of boiled dorsal muscle and broth from half-smooth golden puffer *Lagocephalus spadiceus* caught in Japan with those of the same fish imported. *Fish Sci* 79: 327-334. 10.1007/s12562-012-0585-2

1 4. Yoji Igarashi, Hiroyuki Doi, Yusuke Yamanoue, Shigeharu Kinoshita, Toshiaki Ishibashi, Hideki Ushio, Shuichi Asakawa, Mutsumi Nishida, Shugo Watabe (2013) Molecular phylogenetic relationship of *Tetraodon* pufferfish based on mitochondrial DNA analysis. *Fish Sci* 79: 243-250. 10.1007/s12562-013-0598-5

1 5. Yuna Han, Gen Kaneko, Reiko Nagasaka, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono, Shin-Ichiro Takahashi, Shugo Watabe,

Hideki Ushio (2013) Distribution of adipocyte-related cells in skeletal muscle of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. 79: 143-148. 10.1007/s12562-012-0579-0

1 6. Susumu Yamaguchi, Hidenori Fujiwara, Ikukazu Tashima, Hideki Ushio (2013) Oxidized arachidonic acid and hexanal enhance mouse taste perception of monosodium glutamate. *Nutritional Neuroscience* 16: 54-60. 10.1179/541476830512Y.0000000030

1 7. Mala NURILMALA, Hideki USHIO, Gen KANEKO, Yoshihiro OCHIAI (2013) Reliability of the Commercial Quality Evaluation on Yellowfin Tuna *Thunnus albacares* Meat. *Food Science and Technology Research*. In press.

〔学会発表〕 (計 23 件)

1. 長阪玲子, 植木瑞葵, 潮 秀樹, 近藤秀裕, 廣野育生, 金子 元, 渡部終五, 魚類におけるアミノ酸代謝の制御機構に関する基礎研究, 平成 22 年度日本水産学会秋季大会, 講演要旨集 p.131 2010 年 9 月 22-25 日

2. 小林由佳, 飯野翔太, 長阪玲子, 潮 秀樹, ガンマオリザノールによる mTOR の活性抑制に関する研究 BMB2010, 2010/12/07

3. 長阪玲子, 植木瑞葵, 飯野翔太, 潮 秀樹, 近藤秀裕, 廣野育生, 金子 元, 渡部終五, Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor activity by target of rapamycin and amino acids in teleost, BMB2010, 2010/12/07

4. 植木瑞葵, 長阪玲子, 近藤秀裕, 廣野育生, 金子 元, 渡部終五, 潮 秀樹, 魚類におけるアミノ酸代謝の制御機構に関する基礎研究 2, 平成 23 年度日本水産学会春季大会, 2011 年 3 月 30 日

5. Reiko Nagasaka, Mizuki Ueki, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono, Gen Kaneko, Shugo Watabe, Hideki Ushio, Regulatory mechanisms of amino acid metabolism in teleost. 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 22 日

6. 菅 亮太, 近藤秀裕, 青木 宙, 廣野育生 ニジマスアディポネクチンの構造および発現第 12 回マリンバイオテクノロジー学会. 2010 年 5 月 30 日

7. 近藤秀裕・廣野育生・長阪玲子・金子 元・潮 秀樹・渡部終五 ニジマス脂肪組織で発現する遺伝子の網羅的解析 平成 22 年度日本水産学会秋期大会 2011 年 9 月 23 日
7. Kondo H, Suda S, Kawana Y, Hirono I, Nagasaka R, Kaneko G, Ushio H, Watabe S EFFECTS OF FEED RESTRICTION ON GENE EXPRESSION PROFILES OF ADIPONECTIN AND ENERGY METABOLISM GENES IN RAINBOW TROUT ONCORHYNCHUS MYKISS MUSCLE Genomics in Aquaculture 2011 年 9 月 14 日
8. Ushio H Physiological functions of gamma-oryzanol and application of gamma-oryzanol to fish cultures The International Symposium on Muscle Biochemistry 2011 年 10 月 28 日
9. Kaneko G Studies on the species-specific lipid accumulation in torafugu and red seabream. The International Symposium on Muscle Biochemistry 2011 年 10 月 28 日
10. 金子 元、近藤秀裕、廣野育生、長阪玲子、佐藤秀一、潮 秀樹、渡部終五 発現配列タグ (EST) を利用したトラフグおよびマダイのアポリポタンパク質の発現様式の比較 平成 23 年度日本水産学会秋季大会 2011 年 9 月 29 日
11. 白神裕人、金子 元、Anurak Khieokhajonkhet、平野雪、潮 秀樹、佐藤秀一、渡部終五 マダイ各組織におけるリポタンパク質リパーゼ活性 平成 23 年度日本水産学会秋季大会 2011 年 9 月 29 日 1. Lu Wang, Gen Kaneko, Hideki Ushio, Shi-Ichiro Takahashi, Shugo Watabe (2013) Tissue distribution of medaka lipoprotein lipase gene expression. 平成 24 年度日本水産学会秋季大会. 山口県下関市水産大学校
12. Kazuyuki Ohara, Gen Kaneko, Hideki Ushio, and Shi-Ichiro Takahashi (2013) The change of lipid metabolism related genes on lipid accumulated fish cells. 第 85 回日本生化学会大会. 福岡県博多区福岡国際会議場
13. Anurak Khieokhajonkhet, Gen Kaneko, Lu Wang, Muhammad Mehedi Hasan, Shugo Watabe and Hideki Ushio (2012) cDNA cloning, gene expression and nutritional regulation of the hormone sensitive lipase genes in red seabream (*Pagrus major*). 第 85 回日本生化学会大会. 福岡県博多区福岡国際会議場
14. Honein Karim, Kaneko Gen, Katsuyama Ichiro, Matsumoto Masaki, Kawashima Yukio, Yamada Masao, Ushio Hideki, Watabe Shugo (2012) In silico investigations of an endogenous cellulase from *Teredo navalis*. 第 35 回日本分子生物学会大会. 福岡県博多区福岡国際会議場
15. Lu Wang, Gen Kaneko, Hideki Ushio, Shin-Ichiro Takahashi and Shugo Watabe (2012) The effects of fasting on lipid metabolism in medaka. 第 85 回日本生化学会大会. 福岡県博多区福岡国際会議場
16. Karim Honein, Gen Kaneko, Masao Yamada, Engkong Tan, Shuichi Asakawa, Hideki Ushio (2013) Whole transcriptome analysis of *Teredo navalis* in search of lignocellulose degrading genes. 平成 25 年度日本水産学会春季大会. 東京都港区東京海洋大学
17. 五十嵐洋治, 木下滋晴, 土井啓行, 石橋敏章, 潮 秀樹, 渡部終五 (2013) ミドリフグ・ミオシン重鎖遺伝子 TnMYHM2528-1 の異なる塩分条件下での発現変動. 平成 25 年度日本水産学会春季大会. 東京都港区東京海洋大学
18. 大西愛美, 小山寛喜, 木下滋晴, 金子 元, 浅川 修一, 室井洋佑, 宮崎誠尚, 渡部終五, 潮 秀樹 (2013) クロマグロ・ミオシン重鎖および転写因子 Sox6 遺伝子の筋肉部位による発現の違い. 平成 25 年度日本水産学会春季大会. 東京都港区東京海洋大学
19. 小山寛喜, Sanit Piyapattanakorn, 潮 秀樹, 安元 剛, 神保 充, 渡部終五 (2013) エビ類の遊泳脚および幼生体からのミオシン重鎖遺伝子クローニング. 平成 25 年度日本水産学会春季大会. 東京都港区東京海洋大学
20. 吉永葉月, 金子 元, 潮 秀樹, 高橋伸一郎, 佐藤 秀一 (2013) 低アミノ酸飼料がニジマスの脂質代謝に及ぼす影響. 平成 25 年度日本水産学会春季大会. 東京都港区東京海洋大学
21. 金子雄亮, 金子 元, 潮 秀樹 (2013) ゼブラフィッシュ培養細胞を利用したトラフグ転写因子 Fox01 の機能解析. 平成 25 年度日本水産学会春季大会. 東京都港区東京海洋大学

22. 松岡洋子, 植木暢彦, 鈴木大資, 万建栄, 潮 秀樹, 渡部終五 (2013) シログチおよびスケトウダラすり身ゲル形成能に及ぼす加熱温度履歴の影響について. 平成 25 年度日本水産学会春季大会. 東京都港区東京海洋大学

23. 佐藤根妃奈, 金子 元, 潮 秀樹, 渡部終五 (2013) ヒラメにおける低濃度および高濃度トリブチルスズの影響. 平成 25 年度日本水産学会春季大会. 東京都港区東京海洋大学

〔図書〕 (計 1 件)

1. 増補改訂版魚類生理学の基礎, 曾田・金子編, 第 10 章代謝(分担), 204-215, 恒星社厚生閣, 東京

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 飼育魚類の筋肉内脂質含量増加方法及びそのための飼料

発明者: 大場萌未, 吉永

葉月, 潮 秀樹,

金子 元, 高橋伸

一郎, 佐藤秀一

権利者: 東京大学, 東京海洋大学

種類: 特許

番号: 特願 2013- 57976

出願年月日: 2013 年 03 月 21 日

国内外の別: 国内

○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

潮 秀樹 (Hideki Ushio)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号: 5 0 2 5 1 6 8 2

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号: