

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580260

研究課題名(和文) 真骨魚類における細胞内浸透圧調節機構の解明と食品機能性・呈味性向上への応用

研究課題名(英文) Physiological study on amino acid-based intracellular osmoregulation in the teleosts and its application for aquaculture industries.

研究代表者

渡邊 壮一 (Watanabe, Soichi)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：20507884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では真骨魚類の細胞内浸透圧調節機構としての細胞内アミノ酸調節の理解を深め、魚類の呈味性向上手法への応用可能性を検討した。まずアミノ酸輸送体を網羅的に93種同定し、アミノ酸取込も含めた魚類アミノ酸輸送研究の情報基盤を確立した。環境移行実験によって、ある一定以上の高浸透圧ストレス時に初めて甘味に關与する特定の細胞内アミノ酸濃度が上昇することが見出された。その遊離アミノ酸は高分子タンパクの分解や細胞外からの取込によって供給されることが強く示唆された。またこのメカニズムは広範な魚種に存在することも明らかとなり、養殖魚・蓄養魚における付加価値を付与する新たな技術としての有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This research project aimed to clarify the mechanisms for intracellular osmoregulation, and to investigate its applicability to the fish industry. To reveal the molecular basis of amino acid transport in the teleosts, expression patterns of 93 amino acid transporter genes, identified in this project, were determined. According to rearing experiments, osmoregulatory intracellular amino acid increase was evoked by hyperosmotic stress above a certain level and this response was likely conserved among teleost species. Several analyses strongly suggest that the amino acids related to intracellular osmoregulation were derived by decomposition of proteins, and uptake of specific amino acids from extra- to intra-cellular fluids was stimulated in response to hyperosmotic challenge. Major osmoregulatory amino acids in the muscle of teleosts can show sweet taste, indicating that exposure to proper hyperosmotic conditions can be applicable to taste improvement of cultured fish.

研究分野：魚類生理学

キーワード：浸透圧調節 真骨魚類 遊離アミノ酸

### 1. 研究開始当初の背景

すべての生物において体液はその生命活動を担保する上で必須なものである。またほぼすべての脊椎動物では体液浸透圧・成分組成は厳密に調整されていて、その破綻はすなわち死につながる。循環系を持つ生物では体液は細胞内液と細胞外液に大別される。脊椎動物において体液に占める細胞内外液存在比は 2:1 程度であるといわれており、体液恒常性および物質収支を考える際に細胞内液を無視することはできない。真骨魚類の浸透圧調節研究の多くは細胞外液すなわち血液の水・イオン調節機構に着目して行われており、現在その詳細まで解明されつつある。しかし細胞内液の浸透圧調節機構についての知見は非常に乏しいのが開始当初の状況であった。細胞内外での浸透圧差があると水移動による細胞体積変化が起こり、程度により生命活動に支障をきたす。そのため細胞内液の浸透圧も血液浸透圧と併せてコントロールされる必要があるが、細胞内液の成分組成は細胞外液と大きく異なる。細胞外液の浸透圧構成成分は無機イオン、特に  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  が主であるのに対して、細胞内液では  $\text{K}^+$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$  といった無機イオンに加えて、遊離アミノ酸に代表される低分子有機物が主要成分となる。つまり細胞内液の浸透圧調節は細胞外に乏しい物質を用いて行う必要がある。また細胞内イオン濃度変動は膜電位形成に影響を与えるため、細胞内浸透圧調節には低分子有機物の寄与が大きいことが予想された。しかし短期的な血液浸透圧変動に対応するために細胞内低分子有機物量を迅速に上昇させることが可能であるかについては不明であった。申請者は当課題開始までに広塩性魚モザンビークティラピアを用いた先行研究により、血液浸透圧上昇に反応して迅速に細胞内遊離アミノ酸量が増加することを明らかにし、この現象は水分量減少による単純な濃縮では説明できないものであることも見出した。さらにアミノ酸の種類によって浸透圧上昇に対応した増加量及びタイミングが大きく異なっていた。これらの事実より細胞内浸透圧調節機構において遊離アミノ酸類が重要な役割を果たしていることが示唆されたが、そのメカニズムについては複雑なものであると考えられた。

### 2. 研究の目的

本課題では細胞内浸透圧調節としての遊離アミノ酸調節機構を分子基盤に至るまで多角的に解析、詳細を解明することを目的とした。さらにその機構の魚種特異性・普遍性を検討し、呈味性・食品機能性向上手法への応用を目指した。

### 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。また魚種間における普遍性を検討するために水産有用魚種である海産魚トラフグや進化的にティラピアから離れたサケ科広塩性魚ニジマスを用いた。

#### (1) ティラピアアミノ酸トランスポーター群遺伝子の網羅的同定

生体内のアミノ酸の挙動にはアミノ酸トランスポーターが関与することが考えられる。そこで本課題の端緒として、研究対象種の近縁であるナイルティラピアのゲノムデータベースより当該遺伝子群について探索を行った。その結果を基にモザンビークティラピアから候補配列を同定し、組織別発現解析を行うことで、各組織におけるアミノ酸輸送特性の違いが存在する可能性等について検討を行った。

#### (2) 浸透圧ストレス強度の程度と細胞内遊離アミノ酸濃度変化の関連性の検討

体液の恒常性はある程度の幅を持って維持されている。このことから細胞内浸透圧調節を積極的に行う必要が生じる閾値が浸透圧ストレス強度にも存在することが考えられる。そこで浸透圧ストレス強度として淡水から 50,60,70% 海水に移行する 3 段階を設定し、移行後 24 時間後の筋肉中遊離アミノ酸濃度変化を測定した。

#### (3) 細胞内浸透圧調節関連遊離アミノ酸種の組織による差異の検討

細胞内の遊離アミノ酸組成は組織により違いが見られる。これまで可食部である筋肉に主に着目したが、その他の組織における変化も解析を行うことでより遊離アミノ酸を利用した細胞内浸透圧調節機構についての理解を深めることができる。そこで、高浸透圧ストレス曝露 24 時間後の組織内遊離アミノ酸変化について肝臓、筋肉、血漿で解析を行った。

#### (4) 浸透圧ストレス曝露時の筋肉メタボローム解析による遊離アミノ酸濃度調節機構の検討

細胞外からの取り込みに加えて、細胞内におけるアミノ酸合成および代謝調節等が細胞内遊離アミノ酸量調節に関与することが考えられる。これについて検討を行うため、淡水 淡水移行、淡水 70% 海水移行 24 時間群を設定した。移行実験群については移行前 1 日から絶食しているため、正味 2 日の絶食を経たものとなるため、実験前対照群も設定した。浸透圧ストレスおよび短期絶食による細胞内アミノ酸代謝の変化を網羅的に解析するため、採取した筋組織をメタボローム解析に供した。

#### (5) 細胞内浸透圧調節機構としての細胞内遊離アミノ酸量変化の魚種間における普遍性の検討

ティラピアで見出された浸透圧変化に応

答した細胞内遊離アミノ酸濃度変化が他魚種にも応用可能であるかを検討するため、トラフグ・ニジマスを用いて、高浸透圧ストレス曝露 72 時間までの筋肉中遊離アミノ酸濃度変化を検討した。

(6) 絶食・再給餌に伴う細胞内遊離アミノ酸濃度の変化の検討

浸透圧変化以外に栄養条件の変化によっても細胞内アミノ酸量の変動することがこれまでの研究で見出された。そこで、浸透圧変化による細胞内遊離アミノ酸変動との差異を検討するべく、2 週間絶食後、再給餌を行う飼育実験を行った。この時絶食 0,2,4,7,14 日、再給餌 1,3 日目に肝臓、筋肉、血球、血漿を採取し、各組織における遊離アミノ酸濃度の変化を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) ナイルティラピアゲノムデータベースの情報を基に、モザンビークティラピアのアミノ酸トランスポーターの同定を行った結果、計 93 種の候補配列が得られた。さらにティラピア各組織における発現パターンを確認したところ、脳、腸、腎臓において特異的に発現するトランスポーターが確認された。これらの組織ではアミノ酸輸送がそれぞれ血液脳関門の形成、栄養吸収、原尿からの再吸収に重要であることが考えられる。このような機構ではその他の組織における細胞内へのアミノ酸輸送とは異なるシステムを要することが予想された。また筋肉、肝臓等の組織に発現するアミノ酸トランスポーター遺伝子は広範な発現を示すものが多く見られ、体内の多くの組織においてある程度共通のアミノ酸輸送機構が利用されていることが示唆された。次に淡水および海水適応ティラピアにおけるアミノ酸トランスポーター遺伝子の発現変動を各組織において解析したところ、腸や腎臓においては環境にตอบสนองした発現変化が見られたが、肝臓、筋肉を含むそれ以外の組織では顕著な環境による影響は観察されなかった。

(2) 浸透圧ストレスの程度と細胞内遊離アミノ酸濃度変化の関連性を検討したところ、いずれの環境移行群においても血液浸透圧は上昇していたものの、その程度は異なり、細胞内遊離アミノ酸濃度は 70% 移行群のみで顕著に観察された。70% 移行群では血液浸透圧がおよそ 420 mOsm まで達しており、平常時と比較して 30% の上昇となった。それ以外の移行群では血液浸透圧の上昇は 20% 以下となっており、ある程度の体液浸透圧上昇には細胞内イオン濃度の調節で対応していることが考えられた。細胞内遊離アミノ酸による細胞内浸透圧調節機構は膜内外間での電位差・イオン濃度差の恒常性が維持できなくなるような浸透圧ストレスが負荷された際に亢進されることが考えられ、その発露には閾値が存在することが明らかとなった。つまり本手法を他魚種に活用する際にも、浸透圧ス

トレス強度の設定が肝要となることが示された。

(3) 細胞内遊離アミノ酸濃度の高浸透圧ストレス時の変化を筋肉以外の組織においても検討したところ、筋肉では主に増加するグリシン、アラニンではなく、アスパラギン酸、グルタミン酸が顕著に増加することが示された。これらのアミノ酸は肝臓組織において平常時から豊富に含まれるものであり、細胞種によって細胞内浸透圧調節に用いられる遊離アミノ酸が異なることが示唆された。また血漿中の遊離アミノ酸について見ると、これら細胞内で濃度が上昇するアミノ酸濃度が顕著に減少していた。このことから細胞外からの特定の遊離アミノ酸の取り込みが一定程度活性化されていることが示唆された。加えて血漿中では無給餌条件にも関わらず、70% 海水移行時のみで必須アミノ酸量の増加が見られた。この現象は生体を構成しているタンパク質の分解によって生じたものである可能性が高い。また組織によって浸透圧変化応答性を示すアミノ酸が異なることは、細胞内での生合成や細胞内高分子タンパク組成の違いに起因している可能性も否定できず、細胞内で完結した遊離アミノ酸供給経路の存在も考えられる。またタウリンについては肝臓・筋肉いずれにおいても初期含有量が多い低分子有機物であるが、高浸透圧にตอบสนองした顕著な濃度上昇は見られなかった。タウリンは生体内において遊離状態でのみ存在し、タンパクには含まれない。このようなことから細胞内浸透圧調節のための遊離アミノ酸はタンパク分解によって供給されることが支持される。

(4) 細胞内における遊離アミノ酸供給を検討するため、筋肉組織アミノ酸代謝経路についてのメタボローム解析を行った結果、アミノ酸代謝経路に顕著な変化を示すものは少なく、アミノ酸のみが変動している傾向が見られた。このことから生合成による供給が細胞内遊離アミノ酸調節に関与することは考えにくく、細胞内へのアミノ酸取込みや高分子タンパクの分解の亢進が重要であることが強く示唆された。アミノ酸代謝の中間産物などにも大きな変化は見られず、細胞内のアミノ酸濃度を高く維持するためアミノ酸の代謝を抑制するような機構の存在も本研究からは示唆されなかった。多くの細胞内遊離アミノ酸量は 2 日間の短期絶食において変動を示さなかったものの、ヒスチジン、セリン、プロリン、リジンなどは顕著に減少した。これらのアミノ酸は存在量こそ少ないものの、比較的絶食に強いと言われる魚類において短期絶食にตอบสนองするという点で興味深い。

(5) ニジマスおよびトラフグを用いて高浸透圧ストレスに対する細胞内遊離アミノ酸濃度変化について検討を行った結果、ティラピアと同様にある一定程度の浸透圧負荷を越えた時のみに細胞内遊離アミノ酸の増加が観察され、当該機構の亢進には閾値が存在す

ることが示された。サケ科魚類や海産魚においても細胞内アミノ酸濃度調節機構の存在が示されたことから、広範な魚種において普遍的に存在し、呈味性向上手法としても多くの魚種に応用可能であることが考えられる。筋肉中の遊離アミノ酸組成は魚種によりやや異なるが、浸透圧にตอบสนองして上昇するアミノ酸はほぼ一致して、グリシン、アラニンといった甘味関連アミノ酸が上昇した。テトラピアについては簡易的に官能試験も実施したが、統計的に有意に呈味性が向上したことが示され、他魚種においても、より浸透圧ストレス条件を最適化することで食品としての付加価値を向上させることができる手法として活用できることが期待される。

(6) 養殖魚の場合、出荷前に無給餌期間を設けることが一般的であり、絶食と細胞内アミノ酸濃度の関連性についても検討を行った。その結果、含有量の低い、細胞内浸透圧調節に対して寄与の低いアミノ酸については顕著に減少したが、含有量の多い遊離アミノ酸についてはその濃度は絶食2週間後においてもほとんど減少しなかった。このことから細胞内に多く存在するアミノ酸は遊離状態で存在することによって生命維持に何らかの役割をもつことが示唆された。さらに再給餌後には細胞内遊離アミノ酸濃度は迅速に回復したものの、血漿中の遊離アミノ酸は再給餌3日目に初めて回復した。このことから、再給餌後には細胞内への遊離アミノ酸の取り込みが活性化されることが考えられ、浸透圧負荷との組み合わせが有効となることが考えられる。

## 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 9件)

(1) Hyojin Ahn, Kyung Mi Lee, Mayu Inokuchi, Soichi Watanabe, Akihiro Okamura, Katsumi Tsukamoto, Toyoji Kaneko. Observations of initial water ingestion and ion absorption in the digestive tract of Japanese eel larvae. *Fish. Sci.* (2015) 81, 283-290. 査読有

(2) Fumiya Furukawa, Soichi Watanabe, Keigo Kakumura, Junya Hiroi, Toyoji Kaneko. Gene expression and cellular localization of ROMKs in the gills and kidney of Mozambique tilapia acclimated to fresh water with high potassium concentration. *Am. J. Physiol.* (2014) 307, R1302-1312. 査読有

(3) Andre P Seale, Jacob J Stagg, Yoko Yanaguchi, Jason P Breves, Satoshi Soma, Soichi Watanabe, Toyoji Kaneko, Avner Cnaan, Sheenan Harpaz, Darren T Lerner, E Gordon Grau. Effects of salinity and prolactin on gene transcript levels of ion transporters, ion pumps and prolactin receptors in Mozambique tilapia intestine. *Gen. Comp. Endocrinol.* (2014) 206, 146-154. 査読有

(4) Hyojin Ahn, Yoshiaki Yamada, Akihiro Okamura, Katsumi Tsukamoto, Toyoji Kaneko, Soichi Watanabe. Intestinal expression of peptide transporter 1 (PEPT1) at different life stages of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* (2013) 166, 157-164. 査読有

(5) Yi Kyung Kim, Soichi Watanabe, Soo il Park, Joon Bum Jeong, Toyoji Kaneko, Myeong Ae Park, In Kyu Yeo. Molecular characterization and gene expression of NKCC2 in the gastrointestinal tract of Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) during the four days after infection with *Streptococcus parauberis*. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* (2013) 46, 145-157. 査読有

(6) Miyuki Mekuchi, Soichi Watanabe, Toyoji Kaneko. Bicarbonate secreted from the pancreas contributed to the formation of the Ca precipitates in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *J. Exp. Zool. A* (2012) 319, 53-62. 査読有

(7) Andre P Seale, Soichi Watanabe, Jason P Breves, Darren T Lerner, Toyoji Kaneko, E Gordon Grau. Differential regulation of TRPV4 mRNA levels by acclimation salinity and extracellular osmolality in euryhaline tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* (2012) 178, 123-130. 査読有

(8) Fumiya Furukawa, Soichi Watanabe, Toyoji Kaneko. Excretion of cesium and rubidium via the branchial potassium-transporting pathway in Mozambique tilapia. *Fish. Sci.* (2012) 78, 597-602. 査読有

(9) Soichi Watanabe, Andre P Seale, E Gordon Grau,

Toyoji Kaneko. The stretch-activated cation channel TRPV4 mediates hyposmotically-induced prolactin release from prolactin cells of Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Am. J. Physiol.* (2012) 302, R1004-1011. 査読有 [学会発表](計 4件)

(1) Satoshi Soma, Toyoji Kaneko, Soichi Watanabe. Low salinity environment enhances the ability of intestinal amino acid absorption in Mozambique tilapia. 11<sup>th</sup> International Congress on the Biology of Fish. 2014年8月3日~7日 エディンバラ(英国)

(2) Soichi Watanabe, Andre P Seale, Mayu Inokuchi, E Gordon Grau, Toyoji Kaneko. Molecular equipment for cell volume-linked osmosensing. 11<sup>th</sup> International Congress on the Biology of Fish. 2014年8月3日~7日 エディンバラ(英国)

(3) 安孝珍、山田祥朗、岡村明浩、塚本勝巳、金子豊二、渡邊壮一 ニホンウナギ食仔魚消化管におけるペプチド輸送体(PEPT1)遺伝子の発現動態解析 平成26年度日本水産学会春季大会 2014年3月28日~31日 北海道大学水産学部(北海道)

(4) 相馬智史、金子豊二、渡邊壮一 環境浸透圧によりモザンビークティラピアの腸管アミノ酸吸収機構の変化 平成24年度日本水産学会秋季大会 2012年9月14日~17日、

水産大学校(山口県)

〔図書〕(計 3件)

(1) 渡邊壯一、金子豊二 水生動物における放射性物質の取り込みと排出 54-80 ページ、水圏の放射能汚染(黒倉寿編)2015年、恒星社厚生閣

(2) Toyoji Kaneko, Fumiya Furukawa, Soichi Watanabe. Excretion of cesium through potassium transport pathway in the gills of a marine teleost. (pp.105-118) In Agricultural Implication of the Fukushima Nuclear Accident. 2013, Tomoko M Nakanishi and Keitaro Tanoi Ed. Springer.

(3) 金子豊二、渡邊壯一 浸透圧調節・回遊 216-233 ページ、増補改訂版魚類生理学の基礎(會田勝美・金子豊二編)2013年、恒星社厚生閣

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

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

渡邊 壮一(WATANABE SOICHI)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号: 20507884

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: