

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2017

課題番号：25850142

研究課題名(和文) エネルギー代謝が及ぼすストレス応答と骨格筋代謝とのネットワーク解明

研究課題名(英文) Elucidation of the network of stress responses and skeletal muscle metabolisms by fish energy metabolisms.

研究代表者

長阪 玲子 (Nagasaka, Reiko)

東京海洋大学・学術研究院・助教

研究者番号：90444132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではエネルギー代謝および骨格筋代謝に着目し、エネルギー代謝がストレス応答に及ぼす影響とこれらによる骨格筋代謝への関与を明らかにすることを目的とした。ストレス応答が魚類でも筋代謝および細胞外マトリックスの分解に影響を及ぼし、エネルギー代謝の差異が筋代謝に影響を及ぼすことを明らかにした。また、オリザノールによってゼブラフィッシュの筋肉中でのエネルギー代謝が活発になっていることも考えられた。本研究の結果、エネルギー代謝の改変はタンパク質合成系を促進させ、オートファジーに影響を及ぼすこと、ストレス応答を緩和させることで魚肉の品質にも影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to reveal the effect of energy metabolism to stress response and its relationship to skeletal muscle metabolism. We revealed that stress responses affected muscle metabolism and degradation of extracellular matrix in teleost. In addition, differences in energy metabolisms influenced the muscle metabolisms. Furthermore, there is a possibility that oryzanol activate energy metabolisms in the muscle of zebrafish. As a result of this study, it was suggested that alteration of energy metabolism promotes protein synthesis system, influences autophagy, and has stress relief effect, thereby affecting quality of fish meat.

研究分野：水産化学

キーワード：ストレス応答 筋代謝 エネルギー代謝 魚類

1. 研究開始当初の背景

魚類は一般的にエネルギー代謝といった生理的要因やエサ、光、水質など様々な環境要因が骨格筋の質や量に影響を及ぼしているといわれている。マグロやブリなどの大型魚は生育期の高水温といった外的環境要因や漁獲時の興奮状態により、筋肉が白化し保水性が失われる「ヤケ肉」と呼ばれる肉質劣化が起こる。ヤケ肉の発生は脳の破壊により抑制されること、抗酸化剤を添加したエサがヤケ肉発生防止に効果的といわれていること、天然魚より養殖魚、オスよりメスのほうがヤケ肉になりやすいことから、致死後の骨格筋の状態にはストレス応答系だけではなく、エサを介したエネルギー代謝調節、生殖調節系の神経ネットワークが複雑に絡み合い密接につながっている可能性がある。これまで水温や性成熟に伴う骨格筋への影響は調べられているものの、摂餌との関係は絶食・再給餌との関連を言及したものが多く、エサによるエネルギー代謝調節、ストレス応答といったネットワークが骨格筋に及ぼす詳細なメカニズムは解明されていない。

一方我々は γ オリザノールなどの米由来成分の経口投与によってニジマス、ブリ、マダイ、クロマグロの飼料効率が改善されることを見出しており、またその骨格筋の脂質・糖質代謝を亢進させることを明らかにした。エサに含まれている米由来成分によってエネルギー代謝が改変され、ストレス応答が軽減された結果として骨格筋の脂質・糖質代謝が亢進した可能性がある。また、これまでの研究で γ オリザノールはタンパク質異化作用の一つであるオートファジーの誘導因子 mammalian target of rapamycin (mTOR) を介してアミノ酸代謝を制御することが示唆されたことから、生育中のエネルギー代謝が骨格筋の同化・異化プロセスに関与することが予想される。mTOR はマウスにおいて筋肉量を調節するミオスタチン遺伝子を制御し、ミオスタチンは心理ストレスにより制御されることが明らかになっている。近年魚類でもミオスタチン遺伝子の存在および筋肉量の調節に関与していること、種々の代謝シグナル伝達系に関与することが知られる insulin growth factor (IGF) や phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) 経路が骨格筋代謝も制御することが分かってきたことから、魚類においても生育中のエネルギー代謝によりストレス応答に変化を引き起こし、骨格筋の状態を制御している可能性がある。骨格筋タンパクの同化・異化などの骨格筋代謝はさまざまな段階において互いに干渉しあい、環境に応じたエネルギー代謝の状態を精緻に反映していると考えられる。生育時における種々の生体応答による骨格筋代謝への関与を明らかにすることは、可食部位である骨格筋の質を高め、品質および生産効率向上を図る上で重要な要素であると考え、この研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

このような背景から本研究では (1) 米由来成分によるエネルギー代謝の改変が骨格筋代謝に及ぼす影響を明らかにすること (2) エネルギー代謝がストレス応答および骨格筋代謝に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

エネルギー代謝が骨格筋の合成・分解系に及ぼす影響を明らかにするために、ペプチドーム解析を行った。各プロテアーゼの基質特異性を確認するために、タンパク質のモデルとしてウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin; BSA) を用い、BSA を 5 つのプロテアーゼで消化したときの各プロテアーゼの基質特異性を確認した。さらに、エネルギー代謝の異なる状態として、飽食給餌および絶食給餌をしたゼブラフィッシュをサンプルとし、各プロテアーゼの基質特異性を参考に筋組織タンパク質の分解に関与したプロテアーゼを推定した。また、エネルギー代謝の差異が筋代謝に及ぼす影響を検討するために、飽食給餌および絶食給餌のゼブラフィッシュを用いて筋代謝関連因子のタンパク質発現量を測定した。

栄養状態の異なるゼブラフィッシュを用い、前述で推定した筋細胞内タンパク質の分解に関与するプロテアーゼが分解対象とするタンパク質の同定を試みた。筋タンパク質の定量的ペプチドーム解析を行い、起源タンパク質の推定を行った。

さらに、代謝改変作用が確認されているオリザノールを投与したゼブラフィッシュを 2 週間飼育し、その後空気暴露によりストレスを負荷した。また、オリザノールを投与したニジマス を 3 カ月飼育し、慢性的な飼育密度ストレスを負荷した。

また、生育中のストレス応答が、オリザノールにより緩和されるかを、魚肉品質の観点からも検討した。具体的にはこれまでに代謝亢進作用があることが明らかになっているオリザノール含有飼料を作成し、対照飼料とともにニジマスの飼育実験を行った。さらに慢性的なストレスを与えることで、オリザノールのもつストレス緩和作用を検討した。ストレス応答は血中コルチゾール量の測定により評価した。また、食用として重要な筋肉の水分含量、タンパク質含量、脂質含量を常法で測定した。さらに、食品としての評価をテクスチャー解析、K 値、グリコーゲン、遊離アミノ酸含量等により検討した。また、骨格筋を急性摘出し、コラーゲン分解酵素およびオートファジー関連因子の mRNA 量を、リアルタイム PCR により測定した。同時にストレス環境下での IGF/PI3K/TOR 経路関連因子の mRNA 量を測定した。また、致死後の骨格筋との関連をタンパク質分解酵素、骨格筋量調節因子について遺伝子レベルで検

討した。

また、ゼブラフィッシュを用いて生育中のエネルギー代謝の差異がストレス応答および骨格筋代謝にもたらす作用について LC/MS-MS によるメタボローム解析を行った。また、魚類筋培養細胞を用いて、代謝促進作用を確認しているオリザノールが直接筋細胞の分化に関わるかを検討した。さらに、次世代への影響としてオリザノールを給餌し、ストレスを与えたゼブラフィッシュの精子活性を測定した。

4. 研究成果

BSA を 5 つのプロテアーゼで消化したときの各プロテアーゼの基質特異性の情報をもとに、飽食給餌および絶食給餌のゼブラフィッシュの筋組織タンパク質の分解に関与したプロテアーゼを推定した。その結果、分解断片の多くが Lys, Arg および Tyr で切断されたことから、ゼブラフィッシュの筋組織タンパク質の分解には trypsin と chymase が関与していると考えられた。一方で、飽食飼育よりも絶食飼育において Asp の切断が多いことから、caspase-3 や Granzyme B が働いている可能性が考えられた。Caspase-3 も Granzyme B もアポトーシスの誘導に関与するプロテアーゼであり、絶食飼育 2 週間においてアポトーシスが誘導傾向にあると示唆された。さらに筋代謝関連因子のタンパク質発現量を測定した結果、飽食給餌によりゼブラフィッシュ筋肉中のオートファジーは抑制され、タンパク質合成系が促進されていることを明らかにした。

また PCA 解析により摂食状態がタンパク質分解に及ぼす影響を明らかにした。その結果、分解断片から 169 種のタンパク質が同定された。飽食飼育のゼブラフィッシュ筋肉中では、筋肉の形成・維持、タンパク質の合成および細胞内のシグナル伝達に関与するタンパク質の分解が多く認められた。飽食時でも、筋組織タンパク質は合成だけでなく、オートファジーなどで定常的な分解が盛んに行われると推察された。

また、ストレス応答が及ぼす筋代謝への影響を検討し、グルココルチコイドのアゴニストを用いたストレスモデル実験および空気暴露によるストレス実験の結果から、ストレス応答が筋代謝および細胞外マトリックスの分解に関与することを示唆した。また、エネルギー代謝の差異が筋代謝に及ぼす影響を検討するために、飽食給餌および絶食給餌のゼブラフィッシュを用いて筋代謝関連因子のタンパク質発現量を測定した。その結果、筋肥大抑制因子の活性化が抑制されたが、筋分化調節因子のタンパク質発現量は栄養状態による有意な差は見られなかった。

さらに、代謝改変作用が確認されているオリザノールを投与したゼブラフィッシュを 2 週間飼育し、その後空気暴露によりストレスを負荷した。ストレスで上昇したコルチゾー

ル量がオリザノール給餌により減少する傾向があった。オリザノール給餌は短期ストレスに対する緩和作用がある可能性を示唆した。

ニジマスを用いた慢性ストレスを与える飼育実験では、オリザノール投与により飼料効率の改善がみられた。通常飼料を給餌したストレス区でコルチゾール量の有意な減少が見られ、慢性ストレスは魚類において HPA 系の制御機構に影響を及ぼすことが示唆された。オリザノールを投与したストレス区でのコルチゾール量は非ストレス区と同レベルであったことから、オリザノール給餌により代謝が改変され、ストレス応答に影響を及ぼしたことが考えられた。また、食用としての観点からの検討では、ニジマスはテクスチャー解析により、ストレスによる軟化の促進が確認された。また、細胞外マトリックスの分解に関与する MMP の遺伝子発現量が低下し、オートファジーが促進した。一方でオリザノール配合飼料によりストレス状況下でも魚肉の軟化が改善され、慢性的なストレスで亢進したコラーゲンの分解酵素とオートファゴソームの形成因子の発現が抑制された。このことからオリザノールは魚類においてストレスに伴う品質劣化の改善に有効であることが示唆された。コラーゲン分解酵素およびオートファジー関連因子、IGF/PI3K/TOR 経路、および骨格筋代謝関連因子の検討では、タンパク質分解酵素のカルパインの mRNA 発現量が増加し、同時にカルパイン内在性阻害タンパク質であるカルパスタチンの mRNA 発現量も増加した。これまでに明らかにした飽食飼育時と同様に、オリザノール給餌ではタンパク質の合成だけでなく、定常的な分解も盛んに行われていることが示唆され、体内のエネルギー代謝が改変されたことを確認した。筋代謝に関与する IGF-1 mRNA 発現量はストレスにより増大したが、オリザノール投与によってコントロールレベルまで低下した。栄養感知やストレス応答に関与する TOR も同様の変動をしたことから、生育中のエネルギー代謝がストレス応答を通じ筋肉の同化異化バランスにも関与することが示唆された。

また、ゼブラフィッシュを用いて生育中のエネルギー代謝の差異がストレス応答および骨格筋代謝にもたらす作用について LC/MS-MS によるメタボローム解析を行った。多変量解析に供することでオリザノール投与により特徴的に変動する代謝物を検討したところ、ゼブラフィッシュの筋肉中でオリザノール投与によって ATP 代謝関連物質が増加したことから、ゼブラフィッシュの筋肉中でのエネルギー代謝がオリザノールにより活発になっていることが考えられた。また、ニジマス筋初代培養細胞を用いて、代謝促進作用を確認しているオリザノールが直接筋細胞の分化に関わるかを検討した結果、オリザノールによる筋分化関連遺伝子の発

現に変動はなく、直接筋分化には関係していないことが明らかとなった。また、オリザノール給餌により、ゼブラフィッシュの精子活性を上げる傾向があることを示した。

本研究の結果、エネルギー代謝の改変はタンパク質合成系を促進させ、オートファジーに影響を及ぼすこと、ストレス応答を緩和させることで魚肉の品質にも影響を及ぼすことが示唆された。

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 8 件)

1. Reiko Nagasaka, Atsuko Harigaya, Toshiaki Ohshima, Effect of proteolysis on meat quality of brand fish, red sea bream *Pagrus major*, *Food Science and Technology Research*, 査読有, 24(3), 465-473, 2018.
2. Jade Go Pahila, Hisayuki Kaneda, Reiko Nagasaka, Tomoyuki Koyama, Toshiaki Ohshima, Effects of ergothioneine-rich mushroom extracts on lipid oxidation and discoloration in salmon muscle stored at low temperatures, *Food Chemistry*, 査読有, 233, 273-281, 2017. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.04.130.
3. Chao-Wu Xiao, Carla M. Wood, Eleonora Swist, Reiko Nagasaka, Kurtis Sarafin, Claude Gagnon, Lois Fernandez, Sylvie Faucher, Hong-Xing Wu, Laura Kenney, Walisundera M.N. Ratnayake, Cardio-metabolic Disease Risks and Their Associations with Circulating 25-Hydroxyvitamin D and Omega-3 levels in South Asian and White Canadians, 査読有, *PLoS ONE* 11(1): e0147648, 2016 DOI: 10.1371/journal.pone.0147648
4. Atsuko Harigaya, Reiko Nagasaka, Toshiaki Ohshima, Roles of apoptosis and autophagy on the texture of red sea bream muscle, 査読有, *KnE Life Sciences*, 1, 35-38, 2015. DOI: 10.18502/cls.v1i0.82
5. Gen Kaneko, Hirohito Shirakami, Yuki Hirano, Moemi Oba, Hazuki Yoshinaga, Anurak Khieokhajonkhet, Reiko Nagasaka, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono and Hideki Ushio, Diversity of lipid distribution in fish skeletal muscle, 査読有, *Zoological Science*, 33(2), 170-178, 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.2108/zs150096>
6. Reiko Nagasaka, Yuki Ishikawa, Takumi Inada, Toshiaki Ohshima, Depigmenting Effect of Winter Medicinal Mushroom, *Flammulina velutipes* (Higher Basidiomycetes) on Melanoma Cells, *International Journal of Medicinal*

- Mushrooms, 査読有, 17(6), 511-520, 2015.
7. Reiko Nagasaka, Claude Gagnon, Eleonora Swist, Isabelle Rondeau, Isabelle Massarelli, Winnie Cheung, Walisundera M.N. Ratnayake, EPA and DHA status of South Asian and White Canadians living in the National Capital Region of Canada, 査読有, *Lipids*, 49, 1057-1069, 2014.
 8. Hideki Ushio, Reiko Nagasaka, Utilization of Biological Responses of Fish and Shellfish for Improving Seafood Qualities, *Aqua-BioScience*, 査読有, *onographs*, 6 (3), 91-98, 2013.

[学会発表](計 30 件)

1. 笠原万有璃・石川雄樹・星剛流・細田萌菜美・長阪玲子, 「ニジマス初代培養細胞の筋分化に及ぼす小胞体ストレス経路の影響」, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (Consortium of Biological Sciences 2017; ConBio2017), 2017 年 12 月 6-9 日, 神戸ポートアイランド
2. 笠原万有璃・石川雄樹・星剛流・長阪玲子, 「小胞体ストレスによる魚類の筋分化促進に関する研究」, 平成 28 年度日本水産学会大会春季大会, 2017 年 3 月 26-30 日, 東京海洋大学品川キャンパス
3. 長阪玲子・金城春菜・石川雄樹・大島敏明, 「ニジマスにおけるストレス応答と魚肉の品質に関する研究」, 平成 28 年度日本水産学会大会春季大会, 2016 年 3 月 26-30 日, 東京海洋大学品川キャンパス
4. 石川雄樹, 大島敏明, 長阪玲子, 「赤外蛍光イメージング法を利用した魚類の植物性飼料摂食性評価についての研究」, BMB2015, 2015 年 12 月 1-4 日, 神戸ポートアイランド
5. 金城春菜, 石川雄樹, 長阪玲子, 近藤秀裕, 廣野育生, 金子元, 潮秀樹, 「魚類の短期ストレスが及ぼす筋代謝への影響」, 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 2014 年 9 月 20-22 日, 九州大学 (箱崎キャンパス)
6. 長阪玲子, 針ヶ谷敦子, 近藤秀裕, 廣野育生, 金子元, 潮秀樹, 魚類の筋タンパク質分解に関する研究, 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 2014 年 9 月 20-22 日九州大学 (箱崎キャンパス)
7. 長阪玲子, 針ヶ谷敦子, 近藤秀裕, 廣野育生, 金子元, 潮秀樹, 「魚肉筋タンパク質の分解に関する研究」, 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 2014 年 3 月 27-31 日, 北海道大学 (函館キャンパス)
8. Han Yuna, 金子元, 潮秀樹, 長阪玲子, 近藤秀裕, 廣野育生, 「オリザノールの経口投与がニジマスのエネルギー代謝に及ぼす影響」, 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 2014 年 3 月 27-31 日, 北海道大学 (函館キャンパス)
9. 金城春菜, 石川雄樹, 長阪玲子, 近藤秀裕,

廣野育生, 金子元, 潮秀樹, 「魚類のストレス応答が及ぼす筋代謝への影響」, 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 2014 年 3 月 27-31 日, 北海道大学(函館キャンパス)

10. 石川雄樹, 長阪玲子, 大島敏明, 「近赤外蛍光イメージングを利用した小型魚類の摂食行動評価法についての検討」, 平成 26 年度日本水産学会春季大会 2014 年 3 月 27-31 日, 北海道大学(函館キャンパス)

11. Atsuko Harigaya, Reiko Nagasaka, Toshiaki Ohshima, “Roles of apoptosis and autophagy on the texture of red seabream muscle”, The 1st International Symposium on Aquatic Product Processing, Bogor, IPB Convention Center (IPBICC) 13-15th November 2013, Bogor, Indonesia

〔図書〕(計 4 件)

1. The Han Nguyen, Reiko Nagasaka, Toshiaki Ohshima “Chapter 12, The Natural Antioxidant Ergothioneine Resources, Chemical Characterization, and Applications”, In Lipid Oxidation: Challenges in Food Systems (A. Logan, U. Nienaber, S. Pan ed.) AOCS press, Champaign, IL, pp. 381-415, 2013.

2. 長阪玲子, 潮秀樹, 韓ユナ 「γオリザノールを用いた飼料の効果 糖質, 脂質代謝を促し高成長」, 月刊養殖ビジネス, 8 月号, (8 月 1 日発行) p20-22, 2013.

3. Islam Md. Shafiqul, Naoki Matsuki, Reiko Nagasaka, Hideki Ushio, Masatoshi Hori, Rice Bran Antioxidants in Health and Wellness, Wheat and Rice in Disease Prevention and Health: Benefits, Risks and Mechanisms of Whole Grains in Health Promotion, 443-451, 2014, Elsevier Chapter 34

4. 長阪玲子, 第 4 章「貝・エビ・カニ」, 「日本食およびその素材の健康機能性開発」 p159-168. シーエムシー出版, 監修: 矢澤一良 2016 年 5 月 20 日発行 ISBN コード: 978-4-7813-1157-9

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: 水溶性切削液

発明者: 長阪 玲子, 黒瀬 雅詞, 岡安 武蔵, 奈良 力男, 澤本 悟博

権利者: 国立大学法人東京海洋大学, 独立行政法人国立高等専門学校機構, 株式会社石井工業, 株式会社澤本商事, 株式会社岡安商店

種類: 特許権

番号: 特開 2017-115070

出願年月日: 平成 27 年 12 月 25 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

長阪 玲子 (NAGASAKA REIKO)

東京海洋大学・学術研究院・助教

研究者番号: 90444132

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()