

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660172

研究課題名(和文)ウナギ筋由来蛍光蛋白質を用いた機能性栄養素の簡易評価法の開発

研究課題名(英文)Development of simple evaluation methods for functional nutrition using fluorescent protein derived from eel muscle

研究代表者

橘 勝康(TACHIBANA, Katsuyasu)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授

研究者番号：20171712

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):近年の研究により、ウナギの筋肉から緑色蛍光蛋白質(UnaG)が発見された。UnaGはビリルビンと反応し蛍光を発する。また、UnaGは脳型脂肪酸結合蛋白質と相同性を持つ。本研究では、ウナギ筋由来蛍光蛋白質が機能性栄養素を簡易に評価するのに有効であることを明らかにすることを目的とした。ウナギ筋粗抽出液とビリルビンを混合するだけで蛍光強度を得ることができた。この蛍光強度はウナギ筋粗抽出液の蛋白質濃度依存的に増加した。ウナギ筋粗抽出液の蛍光強度は脂肪酸組成でなく脂肪酸含量に正に相関した。以上の結果より、ウナギ筋粗抽出液を用いることで、ウナギ中の脂肪酸量を簡易に測定することが可能であることがわかった。

研究成果の概要(英文):The green fluorescent protein, Una G, was identified from Japanese eel in 2013. Una G produces green fluorescence by interacting with bilirubin, and belongs to brain type fatty-acid-binding protein family. In this study, we focused on development of simple evaluation methods for functional nutrition such as DHA and EPA using fluorescent protein derived from eel muscle. We found that the mixture of crude protein from muscle of eel and bilirubin produces green fluorescence. In addition, the intensity of fluorescence was increased in a concentration-dependent manner with the crude protein from muscle of eel. The fluorescence of the crude protein was positively correlated to the content, but not the constitution, of fatty acid from muscle of eel. These results suggest that the crude protein including Una G from muscle of eel may be able to measure the content of fatty acid in eel easily.

研究分野：水産食品学

キーワード：機能性食品 蛍光蛋白質 脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

日本ウナギは漁獲高激減など話題の絶えない魚である。2009年に日本ウナギの筋肉において、緑色蛍光蛋白質の存在が示されたが、その実体については不明なままであった。その後、2013年に日本ウナギの稚魚を材料に、緑色蛍光蛋白質に反応する遺伝子の単離に成功し、「UnaG」と命名された。興味深いことに、UnaGは血液中に存在するヘモグロビンの代謝産物であるビリルビンと結合し、初めて蛍光を発する特性を持つ。UnaGは脂肪酸結合蛋白質(FABP)ファミリーに属する139個のアミノ酸からなる蛋白質である。FABPは脂肪酸が細胞内で生理活性を発揮させるために必須の蛋白質である。したがって、UnaGは脂肪酸が機能するためのアダプター蛋白質としての可能性が示唆される。これまでに我々は、ウナギの脂肪酸は血清中だけでなく筋肉もまた極めて不飽和脂肪酸の割合が高く、特に、ドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)を多く含むことを報告した。しかしながら、このような多価不飽和脂肪酸の測定はガスクロマトグラフィーなどを用いて解析しなければならぬため、手間と日数が必要であった。

2. 研究の目的

近年の研究により、ウナギの筋肉から緑色蛍光蛋白質(UnaG)が発見された。UnaGはビリルビンと反応し蛍光を発する。また、UnaGは脳型脂肪酸結合蛋白質(DHAやEPAなどの高度不飽和脂肪酸と親和性が高い)と相同性を持つ。したがって、ウナギ筋由来UnaGとビリルビンを反応させることにより、ウナギ中の高度不飽和脂肪酸量を簡易に測定することが可能となりうる。本研究では、ウナギ筋由来蛍光蛋白質が機能性栄養素を簡易に評価するのに有効であることを明らかにする。本研究の具体的研究項目は、蛍光検出法の確立、多価不飽和脂肪酸量との相関性解析である。

3. 研究の方法

【ウナギ筋粗蛋白質の抽出】

ウナギ普通筋は採取後すぐに液体窒素にて急速凍結し、実験まで-80°Cにて保存した。保存しておいたサンプルは液体窒素にて粉碎し、抽出バッファー(150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)に溶解した。ポリトロンホモジナイザーで破砕し、遠心後の上清をウナギ筋粗抽出液とした。蛋白質の定量はPierce社のBCA解析キット(Pierce)を用いて定量化した。

【ウナギ筋粗抽出液の蛍光検出】

様々な濃度のウナギ筋粗抽出液は終濃度0.5 µMビリルビンと混合し、37°C、暗所で10分間反応させた。その後、マルチモード・プレートリーダーCytation3(BioTek)を用いて、励起497 nm / 蛍光527 nmで測定を行った。

【ウナギ筋肉からの脂質抽出】

試料を秤量し、リン酸塩緩衝液を加え、ホモジナイズし、試料懸濁液を得た。クロロホルム/メタノール/資料懸濁液(1:2:0.8)となるように、クロロホルム、メタノール、リン酸緩衝液を加え攪拌した。精製水/クロロホルム(1:1)で分層させ、クロロホルム層(下層)を回収した。その後、窒素気流下で溶媒留去し、クロロホルムに再溶解し、脂質抽出液とした。

【ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸分析】

脂質抽出液は0.2 mg/ml BHTクロロホルム溶液で希釈し、内部標準入りクロロホルム(100 µg/ml トリコサン酸メチル)を混合し、窒素気流下で溶媒を除去した。その後、5%塩化水素・メタノールを添加し、70°Cで3時間反応させた。放冷後、精製水、ヘキサンを添加し、攪拌した。静置後、上層を回収し、窒素気流下で乾固しクロロホルムに再溶解し、試料溶液とした。

試料溶液、標準溶液、脂肪酸メチル標準品(37 component FAME Mix)は下記の条件で測定した。

<ガスクロマトグラフィー分析条件>

機器：ガスクロマトグラフ GC-2010 型(島津製作所)

カラム：SP-2380 30 m × 0.25 mm 膜厚 0.2 µm

カラム温度：50°C(1分保持) 270°C(+5°C/分で昇温、15分保持)

注入口温度：250°C

検出器：水素炎イオン化検出器(FID) 270°C

注入量：1 µl (splitless 注入)

キャリアガス：ヘリウム(線速度 30 cm/sec、低流量モード)

標準溶液の調製濃度とピーク面積を用いて検量線を作成し、試料溶液の各成分のピーク面積比から、ガスクロマトグラフィー検液中濃度を算出した。ガスクロマトグラフィー検液中濃度から試料中脂肪酸含量及び脂肪酸組成を算出した。

4. 研究成果

UnaGはビリルビンと反応し蛍光を発することが報告されている。ウナギ筋粗抽出液とビリルビンを混合し、励起497 nm / 蛍光527 nmで測定を行った結果、蛍光強度を得ることができた。さらに、蛍光強度はウナギ筋粗抽出液の蛋白質濃度依存的に増加した(図1)。興味深いことに、ウナギ筋粗抽出液の蛋白質濃度と蛍光強度の関係における回帰直線は、それぞれ、 $y = 16.761x + 171.30$ (Eel_No.1) $y = 31.130x + 302.02$ (Eel_No.2)であり、傾きが各ウナギで異なることがわかった(図1)。UnaGはFABPファミリーに属するヒト脳型脂肪酸結合蛋白質(hB-FABP)と相同性があり、しかもDHAと高い親和性

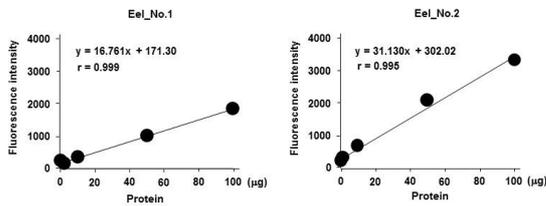
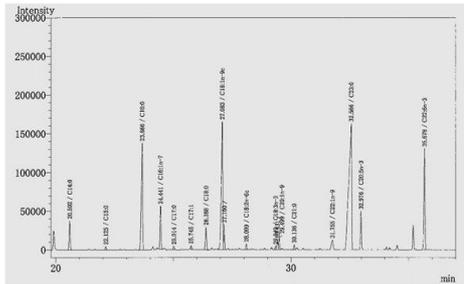


図1. ウナギ筋粗抽出液を用いた蛍光検出

を持つ FABP として機能するためのドメインが保存されていることから、脂肪酸量により、上記の回帰直線に傾きの違いを生じた可能性が示唆される。次に、同個体のサンプルを用いて、脂肪酸量と組成割合について解析を行った。ウナギ筋肉中の主要な脂肪酸はオレイン酸 (C18:1)、パルミチン酸 (C16:0)、DHA (C22:6)、EPA (C20:5) の順で高い含量と割合を示した (図 2、表 1)。筋肉中の脂肪酸



Eel_No.2

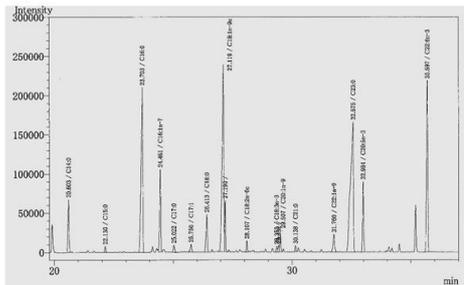


図2. ウナギ筋肉中脂肪酸のクロマトグラム

含量は、それぞれ 78.38 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Eel_No.1)、96.65 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Eel_No.2) であり Eel_No.2 の方が高い脂肪酸含量であった。特に、ウナギ筋肉中の主要な脂肪酸 (C16:0、C18:1、C20:5、C22:6) は、Eel_No.2 で高い含量であった (表 1)。一方、Eel_No.1、Eel_No.2 における脂肪

表1. ウナギ筋肉中の脂肪酸量と組成割合

脂肪酸	試料中脂肪酸量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)		試料中脂肪酸組成 (%)	
	Eel_No.1	Eel_No.2	Eel_No.1	Eel_No.2
C14:0	3.85	4.60	4.9	4.8
C15:0	0.45	0.55	0.6	0.6
C16:0	17.64	22.61	22.5	23.4
C16:1 n-7	5.45	7.30	7.0	7.6
C17:0	0.57	0.84	0.7	0.9
C17:1	0.49	1.00	0.6	1.0
C18:0	3.22	4.13	4.1	4.3
C18:1 n-9c	22.66	26.92	28.9	27.9
C18:2 n-6c	0.76	0.94	1.0	1.0
C18:3 n-3	0.44	0.52	0.6	0.5
C20:1 n-9	1.43	1.63	1.8	1.7
C21:0	0.64	0.52	0.8	0.5
C22:1 n-9	2.22	2.34	2.8	2.4
C20:5 n-3	5.16	6.23	6.6	6.4
C22:6 n-3	13.40	16.52	17.1	17.1
合計	78.38	96.65	100.0	100.0

酸組成割合は変化がなかった。したがって、ウナギ筋粗抽出液の蛋白質濃度と蛍光強度の関係における回帰直線の傾きの違いは脂肪酸組成でなく脂肪酸含量に相関することが示唆された。以上の結果より、ウナギ筋粗抽出液を用いることで、ウナギ中の脂肪酸量を簡易に測定することが可能であることがわかった。

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 1件)

1. Liang J, Miyazaki R, Zhao X, Hirasaka K, Taniyama S, Tachibana K. Changes in the pericellular connective tissue and breaking strength of the three types of muscles of the cultured carp *Cyprinus carpio* during storage in ice. *Fisheries Science*, 査読有, 80(5): 1083-1088, 2014, DOI: 10.1007/s12562-014-0769-z

[学会発表](計 4件)

1. 宮崎貴美子、宮崎里帆、梁 佳、曹 敏傑、平坂勝也、橘 勝康、谷山茂人、緑豆由来のトリプシンインヒビターの添加がワニエソかまぼこの火戻りに及ぼす影響、平成 28 年度日本水産学会春季大会、2016 年 3 月 27 日~30 日、東京海洋大学 (品川キャンパス) (東京都港区)
2. 宮崎里帆、宮崎貴美子、濱田友貴、平坂勝也、橘 勝康、谷山茂人、長崎県産養殖クロマグロの肉質と体格組成の関係、平成 28 年度日本水産学会春季大会、2016 年 3 月 27 日~30 日、東京海洋大学 (品川キャンパス) (東京都港区)
3. 齋藤志伸、宮崎里帆、宮崎貴美子、谷山茂人、平坂勝也、橘勝康、凍結時の氷結晶形成がアオリイカ外套筋の肉質に与える影響、平成 27 年度日本水産学会春季大会、2015 年 3 月 27 日~2015 年 3 月 31 日、東京海洋大学 (品川キャンパス) (東京都港区)
4. 宮崎里帆、山口蓮寿美、平坂勝也、竹下哲史、谷山茂人、橘勝康、マアジのヤケ肉発生に及ぼす強制運動とその後の遊泳回復の影響、平成 27 年度日本水産学会春季大会 2015 年 3 月 27 日~2015 年 3 月 31 日、東京海洋大学 (品川キャンパス) (東京都港区)

[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]

ホームページ等

<http://research.jimu.nagasaki-u.ac.jp/IST?ISTActId=FINDDJPDetail&ISTKidoKbn=&ISTErrorChkKbn=&ISTFormSetKbn=&ISTTokenChkKbn=&userId=312>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橘 勝康 (TACHIBANA, Katsuyasu)
長崎大学水産・環境科学総合研究科(水産)・
教授

研究者番号：20171712

(2) 研究分担者

谷山茂人 (TANIYAMA, Shigeto)
長崎大学水産・環境科学総合研究科(水産)・
准教授

研究者番号：20467971

平坂勝也 (HIRASAKA, Katsuya)
長崎大学水産・環境科学総合研究科(水産)・
助教

研究者番号：70432747