

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24248037

研究課題名(和文) 中枢神経ストレスが魚類のエネルギー代謝・免疫応答に及ぼす影響に関する研究

研究課題名(英文) Effects of stresses via CNS on fish energy metabolisms and immunological systems

研究代表者

潮 秀樹 (Ushio, Hideki)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：50251682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,400,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の視覚によるストレス負荷モデルの作成を行った。次いで、ストレスがエネルギー代謝に及ぼす影響を調べるために、組織中のタンパク質分解物をNanoLC-MS/MSを用いた定量的かつ網羅的に解析する定量的プロテオフラグメントーム解析手法を確立した。魚類筋組織ではタンパク質分解が定常的に起こっていること、絶食モデルでその分解が増大することが明らかとなった。過密ストレスおよび低温ストレスでは、魚種によって免疫系への影響が異なることなどが明らかになった。次世代シークエンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析によって、マダイの炎症・免疫応答系遺伝子を同定した。オリザノールにストレス緩和作用を確認した。

研究成果の概要(英文)：Evaluation methods of fish stress responses via central nervous system including visual stress, overcrowding stress, etc. were developed. Proteofragmentome analysis using NanoLC-MS/MS developed in this research suggested that proteolyses related to autophagy, proteasome system, and apoptosis occur in normal fish muscle tissue, and that the proteolyses are upregulated by the stresses. Immunological responses against the stresses were partly different among fish species. gamma Oryzanol is a stress-suppressor.

研究分野：水産化学

キーワード：水産業 シグナル伝達 発現制御 ストレス

1. 研究開始当初の背景

遺伝子マーカーによる耐病形質の抽出やワクチンの開発によって魚病対策が進んでいる中、魚類養殖のさらなる効率向上には稚仔魚の生残率を極限まで高めること、漁獲時の品質低下をぎりぎりまで抑えるような技術革新が強く望まれている。たとえば、魚類養殖対象種として重要性が急速に高まっているクロマグロの人工種苗の場合、輸送中、輸送後や生簀の沖出しなどの末梢組織の活動に影響を及ぼすだけではなく中枢神経を介したストレス因子の入力によって極端な逃避行動を引き起こし、1日に数千の種苗が死ぬ現象が頻繁に観察される。また、養殖魚の収穫時のパニックによる筋肉傷害が肉質を著しく低下させることも大きな問題となっている。これまでの魚類養殖では、個体レベルの外的中枢神経ストレス（以下、中枢ストレス）因子についてはほとんど配慮されることがなかった。哺乳類である我々と同様に、魚類にとっても輸送、個体密度、水におい、光、波、餌などの外的環境変化が魚類の中枢神経系に与える影響は非常に大きなものであり、これらに対する生物学的応答、すなわち恐怖などが極端な逃避行動を惹起して衝突死を引き起こしたり、免疫力の低下や代謝制御系の異常を引き起こすことは、稚仔魚の生残率および収穫時の肉質を低下せしめ、結果的に養殖の効率を著しく低下させてきたものと考えられる。また、致死後の魚体でも、死後数時間にわたって、神経や筋肉などの生命活動が一部維持されており、その際の取り扱いが中枢神経から末梢神経を介したストレス応答を引き起こすため、肉質や肉色の悪化、ひいては商品価値の低下につながると思われる。一方、食用家畜においてその心身の安静化・平常化を重視したアニマルウェルフェアの概念が欧米各国を中心に常識化しつつあり、水産物でもロブスターの致死法、サーモンの脱血方法に対する強い指導や法令規制などが実施されつつあり、天然魚ではあるが、フカヒレを目的としたサメの捕獲流通禁止は一部同様の観点からの規制である。このような状況の下で、欧米諸国に対して我が国の水産業が積極的に展開するために、水産業にもアニマルウェルフェアの観点をできる限り早く浸透させるべく、準備を進める必要がある。そのためには、魚類においても中枢ストレスが個体の生命活動に及ぼす影響についての基礎情報の蓄積が急務であった。このような背景のもと、我々はこれまで、オリザノールやアミノ酪酸などの米副産物成分の経口投与によって物理的拘束によるマウスの中枢ストレスに対する生物応答が著しく改善される(1)ことを見出した。また、魚類では同成分の吸収蓄積が哺乳類に比べて著しく高い(2)こと、同成分の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(2,3)ことも見出しており、後者の一因として中枢ストレスの緩和が

関与するものと考えられていた。

2. 研究の目的

本研究では研究期間内に、(1)魚類における中枢ストレス因子に対する生物応答機構を遺伝子レベル、タンパク質レベル、情報伝達系レベルで明らかにするとともに(2)米副産物成分による中枢ストレス緩和機構を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュおよびミドリフグなどを用いた外的中枢神経ストレス因子に対する生物応答モデル系を構築した。対象魚とレッドテールブラックシャークなどの魚類(敵対魚)を混飼し、その際の逃避行動をビデオで記録し、ImageJにて画像解析を行って行動パターンを数値化・解析した。

画像パターンによる視覚を介したストレスについても検討を加えた。ゼブラフィッシュおよびミドリフグにさらに、様々な画像パターンを提示し、遊泳行動の差異を上述したビデオシステムで解析した。

LC-MS/MSを用いたペプチドーム解析によって臓器中のペプチド断片を解析することによって、分解ターゲットタンパク質を同定し、さらに分解に寄与したプロテアーゼの推定を行うことが可能となった(プロテオフラグメントーム解析)。

ストレス強度を評価するために、血中のコルチゾルやエピネフリンなどストレスマーカーホルモンレベルをELISAキットなどで測定した。

魚類代謝制御系や免疫制御系に関わる因子群のmRNA発現量やタンパク質発現量およびリン酸化レベルを、リアルタイムPCRあるいは特異的抗体を用いたウェスタンブロットティングおよび蛍光抗体組織化学検出法によって評価した。

次世代シーケンサーを用いて、常法によって得られた全mRNAにつき、トランスクリプトーム解析を行った。

LC-MS/MSを用いてタンパク質分解物を網羅的に解析した。

4. 研究成果

ゼブラフィッシュおよびミドリフグなどを用いた外的中枢神経ストレス因子に対する生物応答モデル系を構築した。ゼブラフィッシュとレッドテールブラックシャークを混飼すると、レッドテールブラックシャークによる威嚇行動が頻発し、ゼブラフィッシュは逃避および物陰に隠れる行動を起こした。その際の逃避行動をビデオで記録し、ImageJにて画像解析を行って行動パターンを数値化・解析したところ、初期ではゼブラフィッシュの運動が盛んであったが、1日程度経過すると運動量が著しく低下し、特定の場所に静止することが多くなった。1週間の混飼の前後でゼブラフィッシュ筋肉のペプチド-

ム解析を行ったところ、オートファジー系、ユビキチン・プロテアソーム系、アポトーシス系などのタンパク質分解系が同時に作動しているものと推定された。分解ターゲットタンパク質として、筋原線維タンパク質のほか、パルプアルブミンや解糖系タンパク質などの筋形質タンパク質が多く分解されていた。

画像パターンによる視覚を介したストレスについても検討を加えた。ゼブラフィッシュおよびミドリフグにさらに、様々な画像パターンを提示し、遊泳行動の差異を上述したビデオシステムで解析した。ゼブラフィッシュの場合はある一定の間隔を持った横じまに、ミドリフグの場合は斑点に対して忌避行動を示し、80%以上の時間をパターンから離れた位置に逃避することが明らかとなった。

ストレス強度を評価するために、血中のコルチゾルやエピネフリンなどストレスマーカーホルモンレベルを ELISA キットなどで測定した。

次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析によって、マダいの炎症・免疫応答系遺伝子を同定した。多くはニジマスなどで知られる遺伝子と重複しており、本魚種は中枢ストレスに対する海産魚モデルとして有用であると考えられた。また、血中コルチゾルと同様にストレスの有効な指標である血糖値について、NMR 法を応用した簡便な測定法をゼブラフィッシュモデルで確立した。

魚類の生体防御機構に及ぼすストレスの影響および作用機序を解明するため、飼育密度ストレスおよび飼育水温ストレスに着目し解析を行った。トラフグ *Taki fugu rubripes* およびヒラメ *Paralichthys olivaceus* を低密度および高密度で飼育し、ストレスおよび免疫関連遺伝子群について定量 PCR 法による遺伝子発現解析を行った。いずれの魚種も高密度で飼育した区の脳で熱ショックタンパク質遺伝子の mRNA 量が高くなった。トラフグでは、高密度飼育区の個体の脾臓における CD4, CD8, IgM および TGF- β 遺伝子の mRNA 量が低くなった。一方、ヒラメでは、免疫関連遺伝子群の mRNA 量に差はみられなかった。これらのことから、飼育密度の免疫へ及ぼす影響は魚種によって異なることが考えられた。さらに、ヒラメを用いて免疫関連遺伝子群の発現動態に及ぼす水温の影響を解析した。15 および 22 °C で飼育した個体に魚病細菌のホルマリン不活化菌体を投与し、マイクロアレイ法を用いて脾臓における網羅的な遺伝子発現解析を行った。いずれの温度においても、炎症応答に関わる遺伝子群の発現応答がみられたが、15 °C で飼育した区においていくつかのインターフェロン (IFN) 応答遺伝子の発現誘導がみられなかった。したがって、飼育水温の低下は IFN の情報伝達に影響を及ぼすことが示された。

すでに中枢ストレス緩和作用が確認され

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。ストレス指標としてコルチゾール量を測定したところ、ストレス区でコルチゾール量の増加がみられた。有意差はなかったものの、オリザノール給餌したストレス区では、通常飼料給餌を行ったストレス区よりコルチゾール量に減少傾向がみられた。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。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。サンプリングしたニジマス魚肉を 4 に設定したインキュベーター内で 4 日間貯蔵し、オリザノールによるストレス緩和やそれに伴う肉質への影響を検証した。生残率に有意な差は見られなかったものの、オリザノール飼料投与区ではコントロール区およびストレス区ともに飼料効率の改善がみられた。ストレス指標としてコルチゾール量を測定したところ、ストレス区でコルチゾール量の有意な減少が見られた。これは通常飼料投与区、オリザノール投与区でも同様であった。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。また、筋肉中グリコーゲン含量もストレス区で有意に低下したが、オリザノール投与したストレス区の方が通常飼料を投与したストレス区よりグリコーゲン含量が高い傾向がみられた。さらに、通常飼料を与えたストレス区よりオリザノールを投与したストレス区で、貯蔵中における筋肉 pH の低下が緩やかな傾向が得られた。一方、テクスチャー解析では貯蔵開始時に通常飼料を与えたストレス区で、通常飼料コントロール区、およびオリザノール投与したコントロールおよびストレス区に比べて有意にかたさの値が低下した。さらに、貯蔵に伴ってどの区においてもかたさが低下したが、貯蔵 4 日目では通常飼料を投与したストレス区に比べ、オリザノール飼料を投与したストレス区ではかたさの値が有意に低い結果となった。このことより、ストレスによる軟化をオリザノール給餌により防げる可能性が示唆された。

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 9 件)

1. 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, *Lipids*, 2014, 49, 1057-1069. 10.1007/s11745-014-3942-3.

2. Hong Zhang, Yin Lu, Hideki Ushio, Kadzuo Shiomi. Development of sandwich ELISA for detection and quantification of invertebrate major allergen tropomyosin by a monoclonal antibody. *Food Chem.* 150:151-157 (2014). (査読有)
10.1016/j.foodchem.2013.10.154.

3. Holger Feroudj, T Matsumoto, Y Kurosu, Gen Kaneko, Hideki Ushio, K Suzuki, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono, Y Nagashima, S Akimoto, K Usui, S Kinoshita, S Asakawa, M Kodama, S Watabe. DNA microarray analysis on gene candidates possibly related to tetrodotoxin accumulation in pufferfish. *Toxicon.* 77:68-72 (2014). (査読有)
10.1016/j.toxicon.2013.10.030.

4. A Khieokhajokhet, Gen Kaneko, K Ohara, H Shirakami, Hideki Ushio. Hormone-sensitive lipase in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*: putative function of the inclinator muscle of fin as a lipid storage site. *Fish. Sci.*, 80: 341-352 (2014). (査読有)
10.1007/s12562-013-0695-5

5. Abdulatef Ahhmed, Gen Kaneko, Hideki Ushio, Safa Karaman, Tomo Inomata, Ryoichi Sakata, Hasan Yetim. Proteins degradation value in cured meat product made from M. Cutaneous-omo brachialis muscle of bovine. *Eur Food Res Technol.*, 238: 10.1007/s00217-013-2109-4

6. 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

7. 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

8. 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*. *Fish Sci* 79: 143-148. 10.1007/s12562-012-0579-0

9. Susumu Yamaguchi, Hidenori Fujiwara, Ikuo Tashima, Hideki Ushio. Oxidized arachidonic acid and hexanal enhance mouse taste perception of monosodium glutamate. *Nutr Neurosci.* 16:54-60 (2013). (査読有)10.1179/541476830512Y.0000000030

〔学会発表〕(計 15 件)

平成 27 年度日本水産学会大会春季大会

1. 吉永葉月, 金子元, 潮 秀樹, 高橋伸一郎, 佐藤秀一. リジン過剰飼料がニジマスの脂質代謝に及ぼす影響.

2. 佐藤根妃奈, 陳殷光, 浅川修一, 潮 秀樹. ヒラメ肝臓におけるペルフルオロオクタンスルホン酸の毒性影響.

3. Norie Kaneshige, Hidehiro Kondo and Ikuo Hirono. Effect of temperature on innate immune response of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). 口頭発表. 7th International Symposium on Aquatic Animal Health (2014 年 9 月 4 日). Portland, USA.

平成 26 年度日本水産学会大会秋季大会
4. Holger F, 平野雪, 佐藤根妃奈, 松本卓也, 金子元, 陳殷光, 浅川修一, 渡部終五, 潮 秀樹.
5. 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.
6. 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 年度日本水産学会春季大会
7. 小林圭吾・潮秀樹・廣野育生・近藤秀裕. 高密度飼育がトラフグのストレスおよび生体防御関連遺伝子群の発現動態におよぼす影響.

平成 25 年度日本水産学会春季大会
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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 FoxO1 の機能解析.
14. 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.
15. 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.

〔図書〕(計 1 件)

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, 潮 秀樹), 204-215, 恒星社厚生閣, 東京

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 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

名称: 飼育魚類の脂質含量の低減方法及びそのための飼料
発明者: 吉永葉月, 大場萌未, 潮 秀樹, 金子元, 高橋伸一郎, 佐藤秀一, 芳賀 讓
権利者: 東京大学, 東京海洋大学
種類: 特許
番号: 特願 2014-033630
出願年月日: 2014 年 02 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:
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
潮 秀樹 (USHIO Hideki)
東京大学大学院
研究者番号: 50251682

(2) 研究分担者
廣野育生 (HIRONO Ikuo)
東京海洋大学大学院
研究者番号: 00270926

(3) 研究分担者
近藤秀裕 (KONDO Hidehiro)
東京海洋大学大学院
研究者番号: 20314635

(4) 研究分担者
長阪玲子 (NAGASAKA Reiko)
東京海洋大学大学院
研究者番号: 90444132

(5) 研究分担者
金子元 (KANEKO Gen)
東京大学大学院
研究者番号: 30466809