

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2018～2020

課題番号：18KT0093

研究課題名(和文) 時間栄養学(給餌タイミング)による魚類肉質改善法の確立

研究課題名(英文) Establishment of fish meat quality improvement by chrono nutritional approach

研究代表者

平坂 勝也 (HIRASAKA, Katsuya)

長崎大学・海洋未来イノベーション機構・准教授

研究者番号：70432747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：時間栄養学(栄養学を時間生物学の立場から扱う)に着目した魚類筋肉内脂肪量の調節が可能となるかどうか解析を行った。2ヶ月間の給餌実験で、BMI(体格指数)は暗期給餌群が明期給餌群よりも有意に高値を示した。明期給餌群では体重と筋肉中性脂肪量との間に正の相関関係が見られるのに対して、暗期給餌群では両者に関係性が認められなかった。脂質代謝関連遺伝子の発現量は、時計遺伝子結合配列を有する遺伝子において、明期と暗期間に差が認められた。以上の結果より、給餌タイミングの違いが時計遺伝子結合配列を有する脂質代謝酵素の発現量を変化させることで、筋肉内脂肪蓄積に影響する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、給餌タイミングの違いが脂質代謝酵素の発現量を変化させ、魚類筋肉内脂肪蓄積に影響する可能性が示唆された。遺伝子組換えではなく、給餌のタイミングを変えることで魚類筋肉内脂肪含量をコントロールすることは、養殖業を中心とする産業への大きな技術革新を生み出すことになる可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined whether it is possible to regulate the amount of fat in fish muscles by chrono nutritional approach, which treats nutrition from the standpoint of chronobiology. In a two-month feeding experiment, the body mass index (BMI) in the dark feeding group was significantly higher than that in the light feeding group. Although there was significant correlation between the body weight and muscle triglyceride in the light feeding group, its relationship did not find in the dark feeding group. There were significant differences between light and dark groups in the expression of lipid metabolism-related genes, which have E-box sequence that plays an important role in circadian genes on the upstream of their genes. These results suggest that differences in feeding timing may affect intramuscular fat accumulation through an expression of lipid metabolism-related genes.

研究分野：栄養学

キーワード：時計遺伝子 脂質代謝酵素 筋肉 中性脂肪 BMI

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

時計遺伝子とは、概日リズムの発現に必要な遺伝子の一群を指す。生体内の様々な因子の発現に直接あるいは間接的に関与しており、1日のプログラムタイマーのように、1日の中で遺伝子を制御して環境変化に合わせた生体活動を制御し、効率的な体内環境を作り出している。中枢組織である脳内は太陽の光や食餌によって概日リズムを1日24時間の日周リズムに調節しており、これに対して、末梢組織である筋内は食餌によって調節されている。時計遺伝子の転写活性化および制御には、主に正の制御因子である Brain-Muscle Arnt Like Protein (Bmal1), Circadian Locomotor Output Cycles Kaput (Clock) と、負の制御因子である Period (Per), Cryptochrome (Cry) の4つの因子が決まった時刻に発現量を増減することにより24時間の振幅が生み出され、日周リズムを調節している。

哺乳動物の場合、食餌のタイミングによって筋内の体内時計が乱れ、脂肪蓄積に影響を及ぼすことが知られている。1つの要因として一部の脂質代謝関連遺伝子は、自身の遺伝子プロモーター領域に時計遺伝子の正の制御因子と結合する E-box の塩基配列を持っており、体内時計の乱れによって正常に発現せず、脂肪蓄積に影響を及ぼしていることが報告されている。

魚類においても、哺乳動物と脂肪蓄積のメカニズムは類似している。食餌により摂取した脂質は消化吸收後、中性脂肪 (TG) に再合成され、血管を循環する。その後、血管上に存在するリポタンパク質リパーゼ (LPL) の働きにより TG が分解され、TG の構成要素である脂肪酸 (FA) が末梢組織に取り込まれる。FA は fatty acid binding protein 4a (Fabp4a) を介して腹腔内、皮下及び筋肉内に輸送され、脂質合成酵素により TG として細胞内に蓄積される。脂質合成酵素を含む脂質代謝関連酵素は転写因子である Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) によって遺伝子の発現が調節されており、PPAR γ の遺伝子上流には E-box の塩基配列が確認されている。しかし、筋内の体内時計の乱れによって、脂質代謝関連遺伝子の発現量がどのように変化するか、あるいは、脂肪蓄積にどのような影響を及ぼすのか詳細な報告はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、魚類筋内脂質代謝関連酵素の日周リズムに合わせて給餌を行うことで、筋内脂肪量の調節が可能となるかを明らかにする。具体的には、明期、暗期給餌は魚類筋内脂肪蓄積にどのような影響を及ぼすのか調べ、筋内時計遺伝子による脂肪蓄積のメカニズムを解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 試料魚・給餌実験

試料魚として、給餌実験では成魚のゼブラフィッシュのオス計 50 尾を用いた。水温 $28.5 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ で、1 週間の予備飼育後、ゼブラフィッシュを明期給餌群 (n=20)、暗期給餌群 (n=20) の 2 群に分け実験を行った。午前 9 時より午後 9 時まで照明を点灯し、2 つの水槽で飼育を行った。餌は体重の 0.3%g、1 日に 1 回、明期給餌群は照明を明るくした直後、暗期給餌群は照明を消す 30 分前に給餌し、2 カ月間飼育を行った。本飼育 0 日目、30 日目、60 日目に前日絶食後、解剖し、各測定に供した。また、Control として、予備飼育直後に解剖したゼブラフィッシュを 0 ヶ月目とした。中性脂肪量測定、脂質代謝関連遺伝子の発現量測定に使用した背部普通筋は、麻酔後、直ちに採肉し液体窒素を用いて急速凍結後実験に供した。

(2) 体格測定

麻酔溶液にて、ゼブラフィッシュを麻酔状態にした後、標準体長、体重を測定した。肥満度測定は、Oka らの報告を参考にして肥満度 = 体重 (g) / 標準体長 (cm)² で計算を行った。

筋内の中性脂肪量測定

(3) TG 量測定

TG 量はゼブラフィッシュ背部普通筋よりサンプルを抽出し、Triglyceride Assay Kit-Quantification (ab65336, abcam) を使用して測定した。

(4) 筋肉における脂質関連遺伝子の発現量解析

RNA 抽出

ゼブラフィッシュ背部普通筋を採肉後、直ちに液体窒素を用いて急速凍結した。サンプルは RNA 抽出試薬 (ISOGEN) を用いて抽出し、総 RNA の濃度は Nano Drop (Thermo Fisher Scientific) を用いて、260 nm と 280 nm の吸光度を測定し濃度を確認した。

逆転写 PCR

1 μ g 相当の総 RNA に終濃度 10 μ M Oligo-dT プライマー、100 μ M Random プライマーを加え、70°C で 5 分間、4°C で 5 分間反応させた (アニーリング)。アニーリング後、M-MLV Reverse Transcriptase Buffer (Promega) 終濃度 0.5 mM dNTP、0.01 U/ml M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) を加え、42°C 60 分、95°C 5 分、逆転写反応を行い、cDNA を合成した。

リアルタイム RT-PCR による mRNA 定量

合成した cDNA に Power SYBER Green MIX (Applied Biosystems)、滅菌済超純水、プライマーを加え、Real-time PCR system (Applied Biosystems 7300) を用いて反応と解析を行った。この時、内部標準として β -actin を使用した。測定した脂質代謝関連遺伝子は以下のとおりである。

脂肪分解酵素:

Phospho Lipase A2 12A (PLA212A) Phospho Lipase A2 13B (PLA21B) Hormone-Sensitive Lipase1 (HSL1) Hormone-Sensitive Lipase2 (HSL2) Lipoprotein lipase1 (LPL1) Lipoprotein lipase2 (LPL2)

脂肪合成酵素:

CarnitinO-palmitoyltransferase Type1 b (CPT1b) Acetyl-CoA Carboxylase2 (ACC2) Cluster of Differentiation36 (CD36) Fatty Acid Synthase (FAS) Diacylglycerol O-acyltransferase1 (DGAT1) Stearol-CoA desaturase b (SCDB)

脂肪合成に關与する転写因子:

Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ (PPAR γ) Peroxisome Proliferator Activated Receptor δ -a (PPAR δ -a) Peroxisome Proliferator Activated Receptor δ -b (PPAR δ -b) Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC1 α) Sterol regulatory element-binding protein1 (SREBP1)

4. 研究成果

2ヶ月間の給餌実験で、体重は2か月目において、暗期群が明期群よりやや高値を示し、標準体長は試験期間を通して暗期群が明期群に比べ小さい傾向であった。BMI (体格指数) は暗期群が明期群よりも高値を示し、2ヶ月目において、暗期群が明期群に比べて有意に高値を示した(図1)。

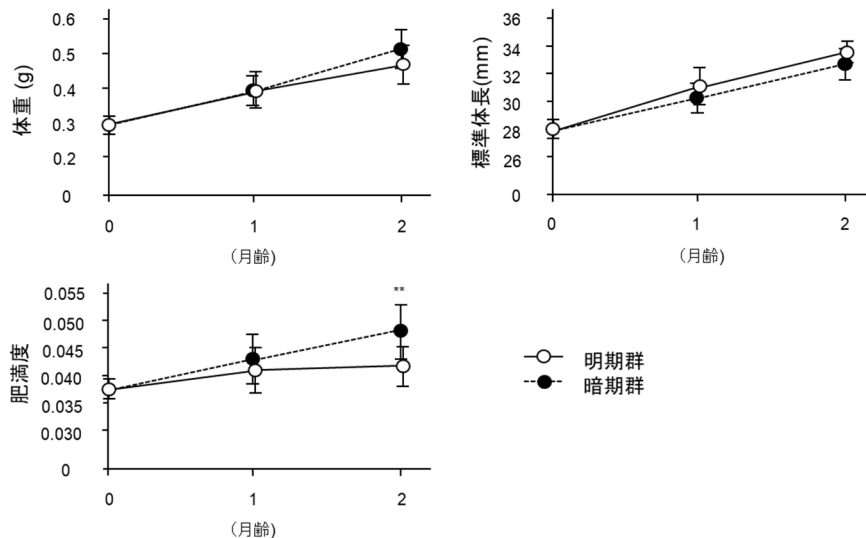


図1 明・暗期群による体格推移

次に、明・暗給餌における筋肉内 TG 量の変化について解析を行った。明暗期群ともに筋肉中 TG 量は給餌期間の延長に伴い増大する傾向を示した。明期群では体重と筋肉 TG 量との間に正の相関関係が見られた。これに対して、暗期群の 1 か月目においては、明期群と同等の体重である者の筋肉 TG 量が高い傾向を示し、暗期群の 2 か月目においては、体重が増加するにつれて筋肉内 TG 量が減少する傾向を示した。このように、明期群と異なり、暗期群では体重と筋肉 TG 量に關係性が認められなかった (図 2)。

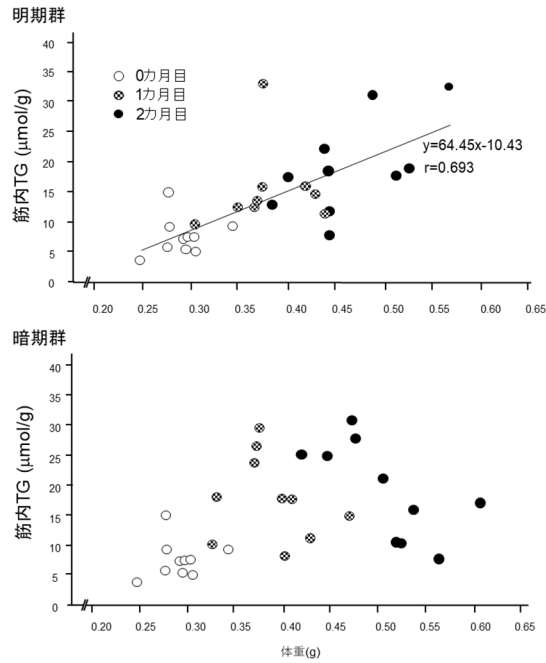


図2 明・暗期群における筋肉TG量と体重の関連性

最後に、筋肉内において発現の変動する遺伝子について解析を行った。脂質代謝関連遺伝子の発現量は、時計遺伝子結合配列を有する遺伝子において、明期と暗期間に差が認められた。脂質代謝関連遺伝子 HSL2, DGATa, ACC2, CPT1b, PPAR b, SREBP1, PGC-1 は、2カ月目において、明期暗期間に有意な差異が認められ、DGATa以外の遺伝子は時計遺伝子結合配列を上流に有していた。その中でも、酸化の律速酵素として知られている CPT1b の発現は給餌 2 ヶ月目において、明期と暗期間に顕著な差が認められた (図3)。

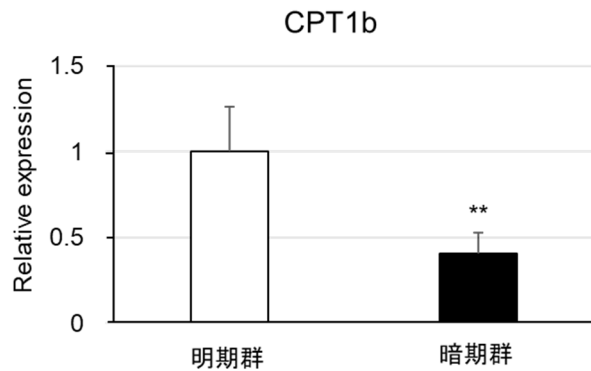


図3 明・暗期群における筋肉内脂質代謝関連酵素遺伝子の発現量の変化

摂食試験 2 ヶ月目において、暗期群の筋肉 TG 量は明期群とほぼ同値であったが、CPT1b の発現量は明期群が暗期群よりも有意に高値を示した。CPT1b は末梢組織に取り込まれた FA を酸化させる遺伝子である。明期群では筋肉に蓄えられた TG がエネルギーを供給するために酸化を促進したためであることが考えられた。実際に、CPT1b の筋特異的なノックアウトマウスは高脂肪食負荷によって脂肪蓄積を抑制することが報告されている。これらを考慮すると CPT1b はゼブラフィッシュ筋内でも筋肉の脂肪蓄積を抑制した可能性が示唆される。以上より、給餌タイミングの違いが時計遺伝子結合配列を有する脂質代謝酵素の発現量を変化させることで、筋肉内脂肪蓄積に影響する可能性が示唆された。

今後、養殖魚において、給餌タイミングによる肉質変化が可能になれば、遺伝子操作や薬剤を使用しない養殖魚の安全で安心な食源の開発にも繋がるのではないかと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jiang Tong, Miyazaki Riho, Hirasaka Katsuya, Yuan Peng Xiang, Yoshida Asami, Hara Kenji, Tachibana Katsuyasu, Taniyama Shigeto	4. 巻 50
2. 論文標題 Effect of blood deposition phenomenon on flesh quality of yellowtail (<i>Seriola quinqueradiata</i>) during storage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Texture Studies	6. 最初と最後の頁 325～331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jtxs.12397	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Jiang T, Yuan P, Hirasaka K, Hamada Y, Hara K, Tachibana K, Taniyama S.	4. 巻 85(6)
2. 論文標題 The effect of blood deposition on the degradation of the connective tissue of the yellowtail <i>Seriola quinqueradiata</i> during storage.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 1099-1107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12562-019-01356-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saitoh K, Yoshimura T, Sun L, Yang M, Wang Y, Taniyama S, Hara K, Murayama F, Nikawa T, Tachibana K, Hirasaka K.	4. 巻 86(1)
2. 論文標題 Effect of dietary fish oil on enhanced inflammation and disturbed lipophagy in white adipose tissue caused by a high fat diet.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 187-196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12562-019-01374-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiramoto Shigeru, Yahata Nobuhiro, Saitoh Kanae, Yoshimura Tomohiro, Wang Yao, Taniyama Shigeto, Nikawa Takeshi, Tachibana Katsuyasu, Hirasaka Katsuya	4. 巻 61
2. 論文標題 Dietary supplementation with alkylresorcinols prevents muscle atrophy through a shift of energy supply	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Nutritional Biochemistry	6. 最初と最後の頁 147～154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jnutbio.2018.08.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jiang Tong、Miyazaki Riho、Hirasaka Katsuya、Yuan Peng Xiang、Yoshida Asami、Hara Kenji、Tachibana Katsuyasu、Taniyama Shigeto	4. 巻 50
2. 論文標題 Effect of blood deposition phenomenon on flesh quality of yellowtail (<i>Seriola quinqueradiata</i>) during storage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Texture Studies	6. 最初と最後の頁 325 ~ 331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jtxs.12397	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 平坂勝也	4. 巻 2(11)
2. 論文標題 時間栄養学に基づいた魚類肉質改善法の解析	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 1100-1102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 柴田 重信	4. 発行年 2020年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 256
3. 書名 時間栄養学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

海洋未来イノベーション機構 海洋水産応用科学分野
<https://ahs-mn.localinfo.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------