

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19580233

研究課題名（和文）魚類アディポネクチンの性状および脂質・糖質代謝制御機構に関する研究

研究課題名（英文）Researches on fish adiponectin and lipid and carbohydrate metabolisms

研究代表者

潮 秀樹（USHIO HIDEKI）

東京海洋大学・海洋科学部・准教授

研究者番号：50251682

研究成果の概要：哺乳類では、血中アディポネクチンレベルの上昇によって脂肪、筋および肝細胞における脂質代謝が促進されることが明らかになってきた。また、哺乳類脂肪細胞の分化や代謝調節において核内受容体 PPAR $\cdot$  が重要な働きを担う。一方、魚類におけるこれらの存在についてはゼブラフィッシュなどの cDNA および EST データベースによって確認しうが、現時点では機能性を有した脂質代謝関連タンパク質が存在するかどうかについては全く情報が得られていない。そこで本研究では、魚類においても脂質代謝に関与すると考えられるアディポネクチンなどの発現頻度を明らかにし、脂質代謝調節経路を推定することを目的とした。

ニジマスEST配列より、ニジマスアディポネクチンおよび受容体の全配列をin silicoクローニングし、その演繹アミノ酸配列に従って、ニジマスアディポネクチンペプチドを固相合成した。本ペプチドを用いてウサギ抗血清を作製し、ニジマス肝臓、血漿等を採取してSDS-PAGEに付し、ウェスタンブロッティングを行った。ウェスタンブロッティングの結果、認識エピトープの異なる数種類の抗体で交差性が認められるアディポネクチン様成分がニジマス脂肪組織、RTG-2細胞、血漿に認められることが明らかとなった。抗ニジマスアディポネクチン抗体が認識するタンパク質は、哺乳類アディポネクチンに相当する約30k成分以外に高分子成分が認められた。還元条件下でも同様な傾向を示すことから、ニジマスアディポネクチンはジスルフィド結合以外の相互作用力によって多量体化するものと考えられた。これは、哺乳類アディポネクチン多量体が還元条件下によって容易に単量体化することと大きく異なった。これらのことから、ニジマスにおけるアディポネクチンの作用メカニズムは哺乳類の多量体アディポネクチンシステムと類似しているものと推定された。ニジマスアディポネクチン受容体には1a、1bおよび2の3種のアイソフォームが存在するものと推定されたが、1aは膜貫通回数が少なく、生理的に機能しないものと推定された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,600,000	480,000	2,080,000
20年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：脂質，糖，代謝，アディポネクチン，糖尿病，AMPK

## 1. 研究開始当初の背景

魚類では哺乳類と比べてアミノ酸の分解活性が高く、生体活動のエネルギーとしてアミノ酸に強く依存するとされ、その傾向は肉食性魚種で強くなる。したがって、魚類における体タンパク質の維持・増大には、タンパク質摂取に加えて脂質からの十分なエネルギー供給が必須である。このことから、ブリやサケマス類などの経済的に重要な魚類養殖において、タンパク質の節約効果を期待して多量の脂質が添加された養魚飼料が用いられている。しかしながら、養殖魚への過剰な脂質の蓄積がその肉質や貯蔵性の低下を引き起こす例も数多く報告されている。このような情報の混乱は、ひとえに魚類における脂質・糖質代謝制御機構に関する理解の遅れが原因であるといえる。

最近、哺乳類における代謝制御の詳細な情報が得られ始め、これまで脂質の貯蔵場所とだけ考えられてきた脂肪細胞が脂質・糖質代謝制御において非常に重要な働きをしていることが明らかとなってきた。魚類における脂質・糖質代謝研究では、吸収、分解、生合成経路などの部分的な情報が得られているだけであり、これらの総合的な制御機構についての情報は皆無に近い。申請者らは、これまでの研究でアユにおいて脂肪細胞から分泌されるレプチンが産卵期および産卵後の摂食障害を引き起こすことを明らかにした (J. Exp. Zool., 305A, 507-512, 2006)。さらにニジマスにおいて、脂肪細胞の分化誘導を司る転写因子型核受容体 PPAR $\gamma$ 、レプチン受容体、脂質トランスポーター CD36 および脂肪細胞が分泌するアディポネクチンの発現を確認し、平成 17 年度日本水産学会大会にて発表した。これらの脂質・糖質代謝制御因子のうち、特にアディポネクチンは最近哺乳類における研究においても注目されており、2 型糖尿病におけるインスリン感受性の向上、脂質 $\beta$ 酸化活性化による脂質異化亢進、ミトコンドリアにおける脱共役タンパク質発現亢進などの作用を有することが報告されている。

## 2. 研究の目的

一般に、魚類は正常時でも末梢細胞への糖の取り込み活性が低く、哺乳類の糖尿病と同様に糖負荷時に持続的高血糖を示す耐糖能異常状態に陥っていると言われる。そのため、末梢細胞は血糖を利用しにくく、これが生体活動エネルギーをアミノ酸異化にかなり依存することにもつながっている。したがって、

魚類のインスリン感受性を向上させることによって末梢細胞の糖の取り込み能を高め (哺乳類のレベルを基準とした耐糖能改善)、脂質・糖質代謝を活性化し、多量の脂質に頼らずとも、タンパク質の節約効果を高めることができるものと予想される。また、魚類においてもアディポネクチンが脂質異化を正に制御するならば、比較的少量の脂質の投与によってタンパク質節約が可能となることも容易に予想できる。そこで本研究では、魚類におけるエネルギー代謝制御機構の全容解明のための基盤的研究として、アディポネクチンを中心とした脂質・糖質代謝制御機構の解明を目指すこととした。

## 3. 研究の方法

ニジマスから急性摘出し、酵素分散によって分離したニジマス筋細胞、肝細胞および RTG-2 に哺乳類でアディポネクチン上昇作用を確認している  $\gamma$ オリザノールを投与し、リン酸化 AMPK に対する特異的抗体を用いた近赤外蛍光ウェスタンブロッティング (WB) によって確認した。マウスやゼブラフィッシュのアディポネクチンとの相同性を元にニジマス EST 配列からニジマスアディポネクチンの *in silico* クローニングを行った。さらにその配列を元に、アミノ酸 13 残基のペプチドを固相合成し、KLH コンジュゲーション後ウサギに免疫し、抗ニジマスアディポネクチン抗血清を得た。抗ニジマスアディポネクチン抗血清を用いて哺乳類でアディポネクチン上昇作用を確認している  $\gamma$ オリザノールを経口投与したニジマスのアディポネクチン血中レベルを近赤外蛍光ウェスタンブロッティングにて測定した。

また、ニジマス EST 配列を元に同様にしてニジマスアディポネクチン受容体を *in silico* クローニングした。受容体についての特異的抗体を現在作成中である。

## 4. 研究成果

抗ニジマスアディポネクチン抗血清を用いて哺乳類でアディポネクチン上昇作用を確認している  $\gamma$ オリザノールを経口投与したニジマスのアディポネクチン血中レベルを測定したところ、 $\gamma$ オリザノールの投与によって有意にアディポネクチンレベルが上昇した。

*in silico* クローニングによってニジマス



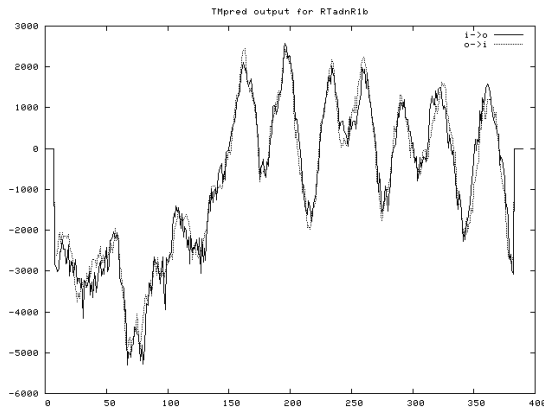


図4. ニジマスアディポネクチン受容体1bの膜貫通予測。

図4に示すように、ニジマスアディポネクチン受容体1bは7回膜貫通型の典型的なGPCRの特徴を示し、哺乳類アディポネクチン受容体1と同様に生理的な機能を果たしうると推定された。

さらに、ニジマスアディポネクチン受容体2についても膜貫通予測を行ったところ、図5に示すように1bと同様な7回膜貫通型の典型的パターンが得られた。

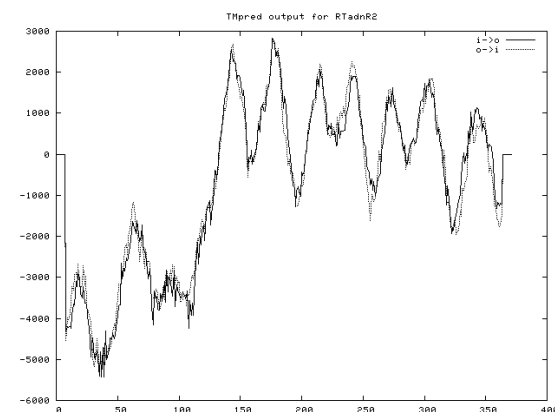


図5. ニジマスアディポネクチン受容体2の膜貫通予測。

これらのことから、ニジマスでも、哺乳類で報告されているように、アディポネクチン受容体が少なくとも2つ存在していることが明らかとなった。これらの体内分布については現在検討中である。

以上のことから、ニジマスにおいても哺乳類と同様にアディポネクチンによる代謝制御システムが存在することが世界で初めて明らかとなり、その機能を人為的に制御することによってエネルギー代謝を調節する手法の開発が可能であることが明らかとなった(特許出願済:特願2007-178082)。

## 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20件)

1. K. Ohara, A. Uchida, R. Nagasaka, H. Ushio, T. Ohshima. The effects of hydroxycinnamic acid derivatives on adiponectin secretion. *Phytomedicine*, 16, 130-137 (2009). 査読有
2. HND. Bao H. Ushio, T. Ohshima. Antioxidative Activities of Mushroom (*Flammulina velutipes*) Extract Added to Bigeye Tuna Meat: Dose-Dependent Efficacy and Comparison with Other Biological Antioxidants. *J. Food Sci.*, 74, C162-C169 (2009). 査読有
3. 風間貴充, 長阪玲子, 潮 秀樹, 佐藤秀一. 養殖飼料への穀類糠成分オリザノールの添加効果. *養殖*, 2009.1, 48-50 (2009). 査読有
4. K. Motoyama, Y. Suma, S. Ishizaki, Y. Lu, Y. Nagashima, H. Ushio, K. Shiomi. Identification of Tropomyosins as Major Allergens in Antarctic Krill and Mantis Shrimp and Their Amino Acid Sequence Characteristics. *Mar. Biotechnol.*, 10, 709-718 (2008). 査読有
5. HND. Bao, H. Ushio, T. Ohshima. Antioxidative Activity and Antidiscoloration Efficacy of Ergothioneine in Mushroom (*Flammulina velutipes*) Extract Added to Beef and Fish Meats. *J. Agric Food Chem.*, 56, 10032-10040 (2008). 査読有
6. C. Chotimarkorn, H. Ushio. The effect of trans-ferulic acid and gamma-oryzanol on ethanol-induced liver injury in C57BL mouse. *Phytomedicine*, 15, 951-958 (2008). 査読有
7. K. Hibi, H. Ushio, H. Fukuda, K. Mitsubayashi, T. Hayashi, H. Ren, H. Endo. Immunomagnetic separation using carbonyl iron powder and flow cytometry for rapid detection of *Flavobacterium psychrophilum*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 391, 1147-1152 (2008). 査読有
8. A. Uchida, K. Ohara, R. Nagasaka, H. Ushio, H. Maehara, S. Kanemoto. Effect of rice germ on plasma adiponectin level in c57BL/6j mice. *FEBS J.*, 275, S1, 434 (2008). 査読有
9. 潮 秀樹, 長阪玲子, …堀正敏. 米抽出物  $\gamma$ オリザノールおよび GABA の新たな生理作用. *美味技術研究会誌*, 12, 21-25 (2008). 査読有
10. R. Nagasaka, K. Ohara, H. Ushio. Inhibition of the ubiquitous transcription

factor Yin Yang 1 by phytosteryl ferulates and their therapeutic potentials. FEBS J., 275, S1, 140 (2008).査読有

11. K. Ohara, R. Nagasaka, H. Ushio. The effects of phytosteryl ferulates on multimeric form of adiponectin secreted from 3T3-L1 adipocytes. FEBS J., 275, S1, 140 (2008).査読有

12. D. Iwanaga, M. Tanaka, R. Nagasaka, H. Ushio. Effect of glutathione on mammalian taste cell. FEBS J., 275, S1, 405 (2008).査読有

13. A. Shinoda, S. Yamaguchi, R. Nagasaka, H. Ushio, Y. Ninomiya. Lipid oxidized products interact with taste glutamate receptors? FEBS J., 275, S1, 430 (2008).査読有

14. 長阪玲子, 篠田 明, 潮 秀樹, 大島敏明. 昆布に含まれる $\gamma$ オリザノール. 日水誌, 74, 61-65 (2008). 査読有

15. Md Islam, Takahisa Murata, M Fujisawa, Reiko Nagasaka, Hideki Ushio, AM Bari, Masatoshi Hori, Hiroshi Ozaki. Anti-inflammatory effects of phytosteryl ferulates in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. Br. J. Pharmacol., 154, 812-24 (2008).査読有

16. R. Nagasaka, C. Chotimarkorn, I. M Shafiqul; M. Hori, H. Ozaki, H. Ushio. Anti-inflammatory effects of hydroxycinnamic acid derivatives, Biochem. Biophys. Res. Commun., 358, 615-619 (2007).査読有

17. Y. Suma, S. Ishizaki, Y. Nagashima, Y. Lu, H. Ushio, K. Shiomi. Comparative analysis of barnacle tropomyosin: divergence from decapod tropomyosins and role as a potential allergen. Comp. Biochem. Physiol. Part B, 147, 230-236 (2007).査読有

18. J.-H. Sohn, H. Ushio, N. Ishida, M. Yamashita, M. Terayama, T. Ohshima. Effect of bleeding treatment and perfusion of yellowtail on lipid oxidation in post mortem muscle. Food Chem., 104, 962-970 (2007).査読有

19. 内田麻子, 大原和幸, 長阪玲子, 潮 秀樹. 糠漬け大根における $\gamma$ オリザノール含量. 日本調理科学会誌, 40, 184-188 (2007). 査読有

20. K. Hibi, K. Mitsubayashi, H. Fukuda, H. Ushio, T. Hayashi, H. Ren, H. Endo. Rapid direct determination using combined separation by prepared immunomagnetic and flow cytometry of Flavobacterium psychrophilum. Biosensors Bioelectronics, 22, 1916-1919 (2007).査読有

[学会発表] (計 24 件)

日本水産学会 (3/27-31, 2009, 東京)

1. 養殖魚における $\gamma$ オリザノールの蓄積について. 風間貴充, 長阪玲子, 潮 秀樹, 佐藤秀一, 坂本浩志, 坂本憲一

2. 昆布に含まれるガンマオリザノール成分の機能性についての検討. 長阪玲子, 風間貴充, 潮 秀樹

BMB2008 (Dec. 9-12, 2008, Kobe)

3. Oral administrations of surfactants perturb mouse plasma adiponectin levels. Y. Kiyotani, K. Ohara, R. Nagasaka, H. Ushio

4. Mechanisms for modification of mammalian taste sensation. D. Iwanaga, M. Tanaka, S. Yamaguchi, R. Nagasaka, H. Ushio

5. Mechanisms of oxidized oil for modification of mammalian taste perception. S. Yamaguchi, A. Shinoda, D. Iwanaga, R. Nagasaka, H. Ushio

6. Inhibition of the ubiquitous transcription factor Nrf2 by phytosteryl ferulates and their therapeutic potentials. R. Nagasaka, K. Ohara, H. Ushio

7. The effect of phytosteryl ferulates on mRNA expressions of NF-kappaBs and IkappaBs in 3T3-L1 adipocytes. K. Ohara, R. Nagasaka, H. Ushio

8. Accumulation of gamma-oryzanol in rainbow trout Oncorhynchus mykiss. T. Kazama, R. Nagasaka, H. Ushio, S. Satoh

5th World Fisheries Congress (Oct. 20-25, 2008, Yokohama)

9. Research for modulation of lipid and carbohydrate metabolisms in teleost through phytosteryl hydroxycinnamates to provide high-quality culture fish. R. Nagasaka, H. Ushio, S. Satoh.

10. Molecular mechanisms involved in lipid accumulation in pufferfish. G. Kaneko, T. Yamada, Y. Han, M. Hirayama, R. Nagasaka, H. Ushio, S. Watabe.

日本水産学会 (9/26-30, 2008, 函館)

11. 魚類におけるガンマオリザノールの蓄積について. 長阪 玲子・Nguen Vu・佐久間萌・内田麻子・潮 秀樹・佐藤 秀一・坂本浩志・坂本憲一

12. 脱脂米糠および $\gamma$ オリザノール強化脱脂米糠が魚類の代謝に及ぼす影響. 佐久間萌・長阪玲子・潮 秀樹・佐藤秀一

33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference (June 28-July 3, 2008, Athens, Greece)

13. Inhibition of the ubiquitous transcription factor Yin Yang 1 by phytosteryl ferulates and

their therapeutic potentials. R. Nagasaka, K. Ohara, H. Ushio.

14. The effects of phytosteryl ferulates on multimeric form of adiponectin secreted from 3T3-L1 adipocytes. K. Ohara, R. Nagasaka, H. Ushio.

15. Effect of glutathione on mammalian taste cell. D. Iwanaga, M. Tanaka, R. Nagasaka, H. Ushio. Effect of rice germ on plasma adiponectin level in c57Bl mouse. A. Uchida, K. Ohara, R. Nagasaka, H. Ushio, H. Maehara, S. Kanemoto.

16. Lipid oxidized products interact with taste glutamate receptors? A. Shinoda, D. Iwanaga, S. Yamaguchi, R. Nagasaka, H. Ushio, Y. Ninomiya.

BMB2007 (Dec. 9-12, 2007, Kobe)

17. AMPK pathway modulating energy metabolism of teleost. R. Nagasaka, Nguen Vu, H. Ushio.

18. The effects of hydroxycinnamic acid derivatives on NF-kB pathway of 3T3-L1 adipocyte. K. Ohara, R. Nagasaka, H. Ushio.

19. Effect of oxidized oil on mammalian taste perception. S. Yamaguchi, H. Shiramasa, I. Tashima, N. Matsuzaki, D. Iwanaga, A. Shinoda, H. Ushio.

日本農芸化学会 (3/31-4/3, 2007, 東京)

20. 米抽出物の生活習慣病予防効果. 内田麻子, 長阪玲子, 潮 秀樹, 前原裕之, 金本繁晴

21. ヒドロキシ桂皮酸誘導体が 3T3L1 脂肪細胞のアディポサイトカイン分泌に及ぼす影響. 大原和幸, 長阪玲子, 潮 秀樹

22. 脂肪酸がマウス血中アディポネクチンレベルに及ぼす影響. 山田和弘, 大原和幸, 長阪玲子, 潮 秀樹

23. 油脂酸化物が哺乳類の味覚に及ぼす影響. 山口 進, 白砂尋士, 田島郁一, 松崎成秀, 岩永大吾, 潮 秀樹

日本水産学会 (3/27-31, 2007, 清水)

24. ニジマスのガンマオリザノールによる脂質代謝促進作用について. 長阪 玲子・佐久間 萌・潮 秀樹・佐藤 秀一

[図書] (計 2 件)

1. 潮 秀樹, 堀 正敏. 第 21 章 米糠由来  $\gamma$  オリザノールの多彩な生理活性作用. 新規素材探索—医薬品リード化合物・食品素材を求めて—. 上村監修. シーエムシー出版, 204-211 (2008).

2. 潮 秀樹. 第 5 章糖質, 第 7 章低分子有機化合物. 水圏生化学の基礎. 渡部編. 恒星社厚生閣 (2008).

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

1. 潮他 7 名,健康機能成分を吸着・濃縮した乾燥脱脂穀類糠, 該糠から調製した健康機能成分の濃縮物, 及びそれらの製造方法,東京海洋大学・(株)サタケ,PCT/JP2009/001169,平成 21 年 3 月 17 日,外国 (PCT)

2. 潮他 4 名, 炭酸ガス固定化剤及び該炭酸ガス固定化材を用いた炭酸ガス固定化方法. 東京海洋大学・(株)サタケ. 特願 2008-120366, 平成 20 年 5 月 2 日.

3. 潮他 5 名,魚類を用いた植物生理活性物質の濃縮・蓄積方法, 坂本飼料株式会社,PCT/JP2009/001228,平成 20 年 3 月 19 日,外国 (PCT)

4. 潮他 3 名, 魚類のタンパク質節約剤及びタンパク質節約方法. 東京海洋大学. 特願 2007-178082, 平成 19 年 7 月 6 日.

○取得状況 (計 1 件)

1. 前原裕之, 金本繁晴, 潮 秀樹 渡辺尚彦「糖量測定装置」特許第 3944574 号

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

潮 秀樹 (USHIO HIDEKI)

東京海洋大学・海洋科学部・准教授

研究者番号: 50251682

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし