

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580219

研究課題名(和文) スーパーサーモンに学ぶ食欲と成長の分子機構解明とその普通魚可食部増大への利用

研究課題名(英文) A study on the mechanisms of growth in super salmon and its application for improvement of muscle production

研究代表者

中野 俊樹 (NAKANO TOSHIKI)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：10217797

研究成果の概要 (和文)：

魚類を含む脊椎動物の成長は成長ホルモン (GH)、成長ホルモン受容体 (GHR) およびインシュリン様成長因子 (IGF-I) の系により主に制御されている。この系は様々な要因により影響されることが知られているが、GH 組換え魚における知見は少ない。本研究では GH 組換えギンザケを用い成長関連因子の発現動態を検討した。組換え魚において GH 遺伝子は脳下垂体以外にも肝臓と筋肉で検出された。肝臓と筋肉における GHR の mRNA の発現量は普通魚に比べ組換え魚で高く、一方脳下垂体では低かった。肝臓における IGF-I の mRNA の発現量は普通魚に比べ組換え魚で高かった。調べた成長関連遺伝子の発現は摂食後徐々に増加し、4-8 時間にはピークに達しその後元のレベルに戻った。以上の結果より、GH 組換え魚においても成長関連遺伝子の発現には一定のリズムが存在し、それには摂食活動や栄養状態などが関係していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Growth in fish is regulated by the growth hormone (GH)/ growth hormone receptor (GHR)/ insulin-like growth factor (IGF)-I axis. This GH-IGF-I axis is influenced by several factors. With regard to hormonal effect, it is known that salmon transgenic for GH show increased growth. However, very little is known about the expression patterns of growth-related genes in GH transgenic fish. The present study examined the daily expression patterns of mRNAs for the growth-related genes after feeding in GH transgenic coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). GH mRNA was detected in both liver and muscle as well as in the pituitary from transgenic fish. GHR mRNA levels in the liver and muscle were higher in transgenic fish than in non-transgenic wild type fish but lower in the pituitary. The expression level of hepatic IGF-I mRNA was greater in transgenic fish. The daily GH, GHR and IGF-I mRNA expression patterns reached their peak at roughly 4-8 h after feeding, however, GHR and IGF-I mRNA expressions in the liver was observed to be irregular in non-transgenic fish. These results suggest that the daily expression patterns for growth-related genes are particularly pronounced in GH transgenic fish. Furthermore, our findings would be useful for consideration of the time of feeding and the optimum time of day for tissue sampling for analysis of growth-related genes in fish.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：水産化学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：農林水産物、水産学、栄養学、組換え食品、バイオテクノロジー、生理学

1. 研究開始当初の背景

生体には環境や生体内で発生する種々の酸化物質・活性酸素に由来する酸化ストレスに対し抗酸化防御能が備わっており、それらについて研究代表者(以下代表者と略す)は数々の知見を学発表してきた。これら一連の研究より、健康な養殖魚を育成するためには防御能の賦活化が示唆された。それらを追求し得られた知見を日本水産学会大会におけるシンポジウムで発表し、講演内容を「養殖魚の健全性に及ぼす微量栄養素」(恒星社厚生閣刊)にまとめた。さらに代表者の分担執筆による英文総説集が英国 CABI 社より出版された。

養殖による生産量を向上させるためには養殖魚の健全性を維持すると共に、養殖対象魚介類の生産性を効率化・向上することも重要である。そこで代表者は、遺伝子組換え魚介類およびジェノミクス研究の分野において世界を先導する研究者の一人であるカナダ国立ウエストバンクーバー研究所の R.H. デブリン博士らと共に遺伝子組換えサケを用いた分子生物学・生理学的研究を企画した。しかし組換え魚の養殖を想定した場合種々のストレスが避けられないにも関わらず、成長ホルモン(GH)遺伝子組換え魚に及ぼすストレスの影響や成長関連遺伝子の発現動態についてはほとんど研究がなされていないのが現状であった。

2. 研究の目的

食資源の確保のためには、魚介類増養殖技術のさらなる発展が解決の一助になると思われる。従って成長促進、抗病性向上およびDHAのような機能性成分の強化など、生産から消費まで様々な恩恵をもたらすと期待される遺伝子組換え技術を応用した養殖魚介類に関する研究は重要である。一般的に魚類の成長はGH/インシュリン様成長因子-I(IGF-I)系により調節されている。養殖魚は育成環境などから種々のストレスを受け健康などが影響を受けるが、それらストレスがGH/IGF-I系やGH遺伝子組換え魚における成長関連遺伝子の発現や動態、そして成長に及ぼす影響に関する知見は少ない。

本研究ではデブリン博士の協力の下GH遺伝子組換えギンザケ“スーパーサーモン”と非組換え普通魚を用い、その成長に関わる遺伝子の発現動態について検討した。

3. 研究の方法

(1) 成長ホルモン(GH)遺伝子組換えスーパーサーモンの作出

デブリン(1994)に倣って、サケ由来のメタロチオネイン-B-プロモーターにサケGH遺伝子を融合した発現ベクターOnMTGH1をギンザケ卵にマイクロインジェクション法で導入し、組換え魚を作出した。その後ウエストバンクーバー研究所内の隔離飼育施設で飼育した。

(2) 血漿GHおよびインシュリン様成長因子(IGF)-Iの定量

抗GHおよび抗IGF-I抗体を用い、ELISA法により定量した。

(3) 血漿グルコースの定量

グルコースオキシダーゼを用いる酵素法により定量した。

(4) GH、GH受容体(GHR)およびIGF-IのmRNA蓄積量の定量

既報の配列情報を基に作製したプライマーとプローブを用いリアルタイムPCR法により、脳下垂体や肝臓など各組織におけるGH、GH受容体(GHR)およびIGF-IのmRNA蓄積量を定量した。

4. 研究成果

(1) 血漿におけるGHおよびIGF-Iの動態

体重約20gに成長した組換えギンザケ当歳魚と非組換え普通魚を用い、飼料を投与後経時的にサンプリングした。血漿中のGHおよびIGF-Iのレベルは、ほぼ全てのサンプリング時間を通じ非組換え魚に比べ組換え魚において高く推移した。

(2) 血漿におけるグルコースの動態

普通魚に比べ組換え魚において血漿のグルコースレベルは高く推移した。

(3) 成長関連遺伝子の発現動態

① 脳下垂体

GHについて：一般的にはGHが過剰発現すると脳下垂体にけるGH発現量は低下するといわれるが、本実験条件下では組換え魚と普通魚の間で違いは余り認められず、その発現量は飼料摂食後に上昇した。

GHRについて：組換え魚においてGHRは飼料摂食後に上昇し24時間後には低いレベルに戻った。一方、普通魚ではそのような傾向は認められなかった。また、IGF-Iは何れの魚においても検出できなかった。

② 肝臓

GHについて：組換え魚では脳下垂体以外の様々な組織でGH遺伝子が発現していると考えられる。非組換え魚ではGH遺伝子が全く検出できず、組換え魚においてのみその発現が確認された。そしてその値は飼料投与後に上昇し、24時間後には低いレベルに戻った。

GHRおよびIGF-Iについて：IGF-IおよびGHR遺伝子は飼料投与後に上昇する傾向にあった。

③ 筋肉

GHについて：組換え魚筋肉においてGH遺伝子が検出された。個体差が大きく有意差は認められなかったが、その発現量は飼料摂取後に徐々に上昇し24時間後には低いレベルに戻った。

GHRについて：筋肉においてGHRは飼料摂食後に上昇し、その傾向は組換え魚で顕著であった。また発現量は組換え魚において高かった。

以上のようにGH組換え魚の肝臓と筋肉ではGHの発現が認められ、何れの組織におけるGHRの発現量も組換え魚において高かった。さらにそれらの発現パターンは摂食との関連が窺われた。今後は摂食が成長関連遺伝子を発現させるメカニズムの解析に興味を持たれる。

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3件)

1. Nakano T, Shoji Y, Shirakawa H, Suda Y, Yamaguchi T, Sato M, Devlin RH. Daily expression patterns of growth-related genes in growth hormone transgenic coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. La mer (Journal of French-Japanese Society for Oceanography) 2011, in press. (査読あり)
2. 中野俊樹. ストレスと魚類. 養殖 48, 64-67, 2011. (査読なし)
3. Nakano, T., Kameda, M., Yamaguchi, T., Sato, M., Afonso, L., Iwama, G.K., Devlin, R.H., Effect of stress on growth related gene expressions in coho salmon, In Proceedings

of 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Oct. 20-25 (CD-ROM), pp 3f-1-2. 2008. (査読なし)

4. Kameda M, Nakano T, Yamaguchi T, Sato M, Afonso LOB, Iwama GK & Devlin RH. Effects of heat shock on growth hormone receptor expression in coho salmon. In Proceedings of 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Oct. 20-25 (CD-ROM), pp 3f-16. 2008. (査読なし)

[学会発表] (計11件)

1. Nakano, T., Shoji, Y., Shirakawa, H., Suda, Y., Yamaguchi, T., Sato, M., Devlin, R.H., Daily expression patterns of growth-related genes in transgenic coho salmon, International Conference of French-Japanese Society for Oceanography (Techno-Ocean 2010), Abstracts (CD-ROM) (Kobe International Convention Center, Kobe, Japan, Oct. 14-16, 2010)
2. 中野俊樹, 白川 仁, 山口敏康, 佐藤 実, 須田義人, Devlin, R.H., 成長ホルモン組換えギンザケにおける成長関連遺伝子の動態について (その2), 日本春季大会講要, p.25, 2010年度日本水産学会春季大会 (日本大学生物資源科学部, 藤沢, 2010年3月26日-3月30日)
3. 中野俊樹, 山口敏康, 佐藤 実, Devlin, R.H., 成長ホルモンを組換えたギンザケの成長関連遺伝子の動態について, 日本秋季大会講要, p.39, 2009年度日本水産学会秋季大会 (いわて県民情報交流センター・アイーナ, 盛岡, 2009年9月30日-10月3日)
4. 亀田真澄, 中野俊樹, 山口敏康, 佐藤 実, Devlin, R.H., ヒートショックにより誘発される酸化ストレスはギンザケ成長ホルモン受容体の発現を制御する, 日本秋季大会講要, p.115, 2009年度日本水産学会秋季大会 (いわて県民情報交流センター・アイーナ, 盛岡, 2009年9月30日-10月3日)
5. 中野俊樹, 亀田真澄, 山口敏康, 佐藤 実, Devlin, R.H., 成長ホルモン組換え魚類における成長関連遺伝子の動態, 講要 p.121, 第6回東北大学バイオサイエンスシンポジウム (仙台国際センター, 仙台, 2009年6月16日)
6. 亀田真澄, 中野俊樹, 山口敏康, 佐藤 実, Afonso, L., Iwama, G.K., Devlin, R.H., ギンザケにおける成長ホルモン受容体の発現およびグルタチオンのレベルに及ぼすヒートショックの影響, 講要 p.128, 第6回東北大学バイオサイエンス

シンポジウム(仙台国際センター、仙台、
2009年6月16日)

7. Nakano, T., Yamaguchi, T., Sato, M., The beneficial effect of probiotics in cultured fish, 100th American Oil Chemists' Society (AOCS) Annual Meeting, Abstracts p. 2, (Rosen Shingle Creek, Orland, FL, USA, May 3-6, 2009)
8. 中野俊樹、山口敏康、佐藤 実、Devlin, R.H.、成長ホルモン組換えギンザケにおける成長関連因子の発現について、日水春季大会講要、p.26、2009年度日本水産学会春季大会(東京海洋大学品川キャンパス、東京、2009年3月27日-3月31日)
9. Nakano, T., Kameda, M., Yamaguchi, T., Sato, M., Afonso, L., Iwama, G.K., Devlin, R.H., Effect of stress on growth related gene expressions in coho salmon, 5th World Fisheries Congress, Abstracts p. 196, (Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan, Oct. 20-24, 2008)
10. Kameda, M., Nakano, T., Yamaguchi, T., Sato, M., Afonso, L., Iwama, G.K., Devlin, R.H., Effects of heat shock on growth hormone receptor expression in coho salmon, 5th World Fisheries Congress, Abstracts p. 389, (Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan, Oct. 20-24, 2008)
11. Nakano, T., Yamaguchi, T., Sato, M., The utilization of carotenoids to improve fish health in aquafeeds, 99th American Oil Chemists' Society (AOCS) Annual Meeting, Abstracts p. 133, (Washington State Convention and Trade Center, Seattle, WA, USA, May 18-21, 2008)

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 俊樹 (NAKANO TOSHIKI)
東北大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：10217797

(2) 研究分担者

白川 仁 (SHIRAKAWA HITOSHI)