

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21248027

研究課題名（和文） 魚類エネルギー代謝制御因子の網羅的解析と制御法の確立

研究課題名（英文） Comprehensive researches on fish energy metabolism control factors and development of methods for energy metabolism control

研究代表者

潮 秀樹（USHIO HIDEKI）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：50251682

研究成果の概要（和文）：

魚類のエネルギー代謝制御系を網羅的に解析し、有効なエネルギー代謝制御方法の考案につなげ、科学的事実に基づいた効率的魚類養殖手法の確立を目指した。その結果、穀類糠成分のガンマオリザノールの投与が魚類の脂質および糖質代謝を亢進し、効率的な魚類養殖法として有用であるものと判断された。

研究成果の概要（英文）：

Control mechanisms of fish energy metabolisms were investigated. Gamma-oryzanol administration is useful for accelerating growth of culture fish through the induction of energy productions from carbohydrates and lipids.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,600,000	3,180,000	13,780,000
2010年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2011年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	29,600,000	8,880,000	38,480,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

昨今の漁業資源の激減や諸外国の需要の急拡大によって我が国における食用魚獲得量は大幅に減少している。したがって、近い将来我が国における食資源確保の手段として魚類養殖の重要性が再認識されることは想像するに難くない。しかしながら、哺乳類と比べて糖質の利用効率が低い魚類は、生体活動のエネルギー源として脂質とアミノ酸に強く依存する。このことが、過剰な脂質投与を招き、有機物を多量に含む残餌や魚体からの窒素排泄などによる水圏環境汚染と

もに、魚類養殖の効率化を阻んでいる。魚類養殖の根本的な効率化なしでは、食資源確保手段としての有効性は期待できない。

一方、魚類における糖質、脂質、アミノ酸の3大栄養素の代謝経路についてはほぼ明らかになっているが、これらの代謝の制御系についてはほとんど不明である。哺乳類において脂質や糖質の代謝制御に重要な働きを果たす核受容体型転写因子 peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) については、トラフグなど一部の魚種でクローニングされ、構造などからその機能の特異性

も示唆されているが、その制御系や作用点については全く不明のままであった。また、哺乳類においてアミノ酸代謝制御の起点と考えられている mammalian target of rapamycin (mTOR) に関しては魚類に関する知見がないに等しかった。魚類においても同様な代謝制御因子群が機能しているものと考えられるが、全く異なる環境で進化してきたことからインスリンや PPAR の例に見るように機能や作用が他の脊椎動物と異なる可能性が非常に高い。上述したように、哺乳類では脂肪組織が内分泌器官として働くことが明らかにされているが、魚類の脂肪組織の機能についても未だに不明であった。

このような状況の下、米糠成分の γ -オリザノールが哺乳類の NF- κ B による PPAR γ の抑制作用を解除し、アディポサイトカインを介して糖質代謝および脂質代謝を亢進し、2 型糖尿病でみられるインスリン抵抗性を改善することを明らかにした。また、 γ -オリザノールの経口投与によってニジマスおよびブリの糖質および脂質代謝が促進され、タンパク質の節約効果が認められた。この例のように、主要な代謝制御因子の機能を制御できれば魚類特有のエネルギー代謝系を利用して飛躍的な魚類養殖効率化が可能となるものと考えられた。

2. 研究の目的

魚類のエネルギー代謝制御系を網羅的に解析し、有効なエネルギー代謝制御方法の考案につなげ、科学的事実に基づいた効率的魚類養殖手法の確立を目指した。

3. 研究の方法

γ -オリザノール、アディポサイトカイン、インスリン、成長ホルモンなどをトラフグ、ゼブラフィッシュ、ニジマスなどの個体や急性摘出臓器、初代維持細胞あるいは系統培養細胞に投与して、作動する代謝制御因子群（転写因子群とその制御因子、タンパク質リン酸化酵素系、細胞分裂制御系、トランスポーター群、代謝酵素系、サイトカイン類など）をリアルタイム PCR やマイクロアレイを用いて解析し、各種サイトカインによって作動する代謝制御因子群を網羅的に解析することとした。また、魚類の脂肪細胞の組織分布や生理機能については全く不明であったため、ニジマスのトランスクリプトーム解析から脂肪細胞のマーカーを選択し、免疫組織化学的にその分布を明らかにすることとした。これらの成果をもとに、魚類のエネルギー代謝制御法の考案につなげることにした。

4. 研究成果

魚類でエネルギー代謝に影響を及ぼすことが確認されている γ オリザノール(ORZ)の

吸収メカニズムを明らかにするために、ニジマス反転腸を調製し、ORZ および植物ステロールの吸収速度を解析した。哺乳類に比べて両成分の吸収が著しく高いことが明らかとなり、ニジマスはこれらの成分を積極的に吸収する輸送体を発現していることが示唆された(図1, 2)。また、マスノスケ発眼胚体由来培養細胞 CHSE-214 を用い、哺乳類においてアミノ酸代謝制御の起点の役割を果たしている TOR(target of rapamycin)と PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) の発現をウエスタンブロッティングによってタンパク質レベルで評価した。CHSE-214 へのラパマイシンの投与により、リン酸化 TOR の相対的タンパク質発現量がラパマイシンの濃度依存的に減少することが明らかになった(図3)。また、PPARs の発現量が上昇した(図4)。

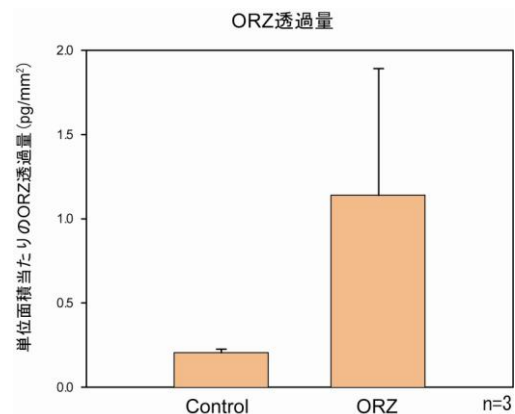


図1. ニジマス反転腸における ORZ 透過量.

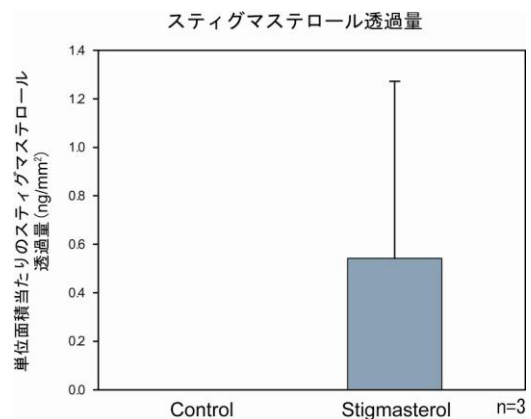


図2. ニジマス反転腸におけるスティグマステロール透過量.

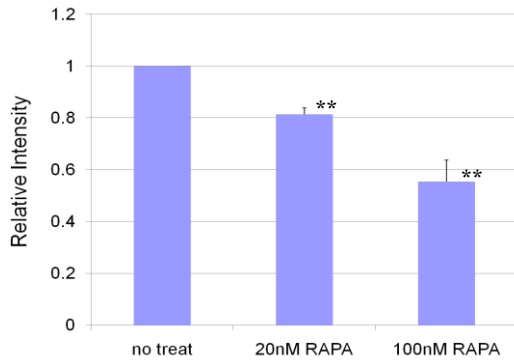


図3. CHSE-214におけるTORリン酸化発現量の割合 (**P<0.01, n=3)

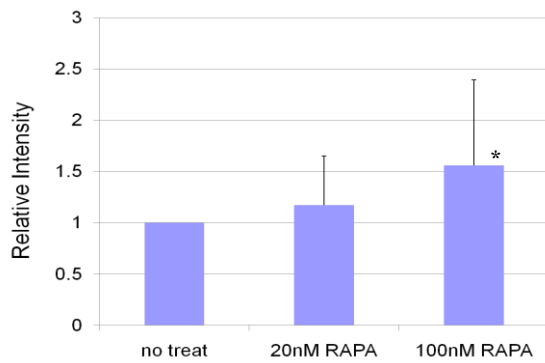


図4. CHSE-214におけるPPARs発現量 (*P<0.05, n=11)

ORZによるニジマスおよびゼブラフィッシュの脂質代謝制御系に及ぼす影響を調べたところ、ORZ投与によってニジマスおよびゼブラフィッシュ肝臓でCPT-1遺伝子転写産物が著しく増大し、AMPKおよびACCのリン酸化率も有意に増大した。以上のことから、ORZの投与は魚類の脂質代謝亢進に有効であるものと考えられた。次いで、糖質代謝制御系に及ぼす影響を調べたところ、ORZ投与によってゼブラフィッシュ筋肉および肝臓でphosphofructokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase, alanine transaminase, aspartate aminotransferaseなどの遺伝子転写産物が著しく増大することが明らかとなった。一方、脂肪酸合成に重要なfatty acid synthaseの遺伝子発現は誘導されなかった。以上のことをまとめると、ORZの投与は魚類の脂質および糖質代謝亢進に有効であるものと考えられた(表1)。

表1. ORZの投与が魚類のエネルギー代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響

		脂肪酸合成	脂肪酸分解	糖新生	解糖
		ニジマス	筋肉 →	↑	
	肝臓 ↓	↑			
ゼブラフィッシュ	筋肉 ↓	→	↓	↑	
	肝臓 ↓	↑	→	↑	

アディポネクチンは脂肪細胞で産生される情報伝達分子の一つで、哺乳類では栄養代謝の調節に重要な働きをもつ[1]。魚類ではこれまでに、ゼブラフィッシュで2種類のアディポネクチン遺伝子が同定されているが、それ以外の魚種では報告されていなかった[2]。そこで、転写産物の遺伝子配列情報が豊富なニジマスを対象に、アディポネクチン遺伝子ホモログのcDNAクローニングを試みた。ニジマスESTデータベースよりアディポネクチンに相同性を示す配列を検索し、得られた部分配列を元にORF全長を含むcDNA断片の塩基配列を決定した。配列解析の結果、ニジマスはゼブラフィッシュと異なり、1種類のアディポネクチン遺伝子のみを持つことが示された。ニジマスアディポネクチンの演繹アミノ酸配列を他生物種のものと比較したところ、ゼブラフィッシュのアディポネクチンBと80%以上、他の脊椎動物のものと60%以上のアミノ酸同一率を示した。本遺伝子の発現は主に筋肉でみられ、腹腔内脂肪中ではほとんどみられなかった(図5)。

哺乳類では脂肪細胞が、アディポネクチンを含む様々な情報伝達分子を産生し、全身的な栄養代謝を調節する[3]。しかしながら、ニジマスアディポネクチン遺伝子は腹腔内脂肪でほとんど発現がみられなかったことから、ニジマス腹腔内脂肪中の脂肪細胞はアディポネクチンを産生しておらず、全身的な栄養代謝の調節には関与しないことが考えられた。そこで、次世代シーケンサーを用いた転写産物の網羅的な配列解析を行った。決定した31,101配列のうち、約半数が既報の遺伝子と相同性を示したが、情報伝達に関わる分子はほとんどみられなかった。また、魚類の腹腔内脂肪中には臍細胞が散在していることが知られており、本研究でもトリプシンやインスリンといった臍臓由来の遺伝子転写産物が同定された。一方、脂肪酸の蓄積に重要な脂肪酸結合タンパク質および脂肪細胞の分化に関与するLymphocyte G0/G1 switch protein 2をコードする遺伝子が、それぞれ全配列の約2%を占めていた。これら遺伝子の発現は、腹腔内脂肪においてのみ顕著

にみられたことから (図 6), ニジマスにおいて脂肪細胞で特異的に発現する遺伝子である可能性が示された。また, 脂肪酸結合タンパク質心筋タイプ (H-FABP) 遺伝子も同様な組織分布を示すものと考えられた。

哺乳類や鳥類では, アディポネクチン遺伝子の発現量は個体の栄養状態によって影響を受けることが知られている [4,5]。そこで, アディポネクチン遺伝子の発現に及ぼす摂餌制限の影響を調べた。一週間に一度給餌した区 (摂餌制限区) と毎日二回給餌した区 (飽食区) を比較したところ, 筋肉におけるアディポネクチン遺伝子の mRNA 蓄積量は摂餌制限区で顕著に低かった (図 7)。摂餌制限に伴ってアディポネクチン遺伝子とともに発現量が減少する遺伝子をマイクロアレイ法により網羅的に解析したところ, 2,701 遺伝子が飽食区に比べて摂餌制限区で顕著に変動していた。このうち腹腔内脂肪で強く発現していた Lymphocyte G0/G1 switch protein 遺伝子の発現が, 摂餌制限区で減少していたことから (図 7)、ニジマスアディポネクチン遺伝子は筋肉中の脂肪蓄積細胞で発現していることが考えられた。

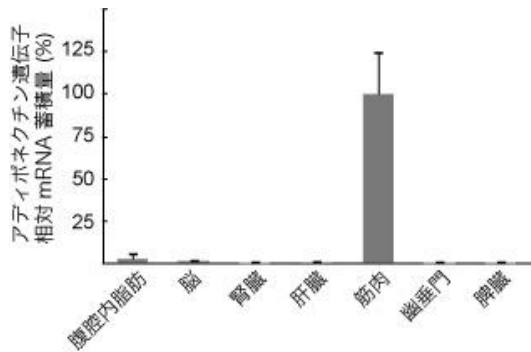


図 5. ニジマス各組織におけるアディポネクチン遺伝子の相対 mRNA 蓄積量。
アディポネクチン mRNA 蓄積量を同一組織における β アクチン mRNA 蓄積量で割ったものについて, 筋肉における値を 100 とした。

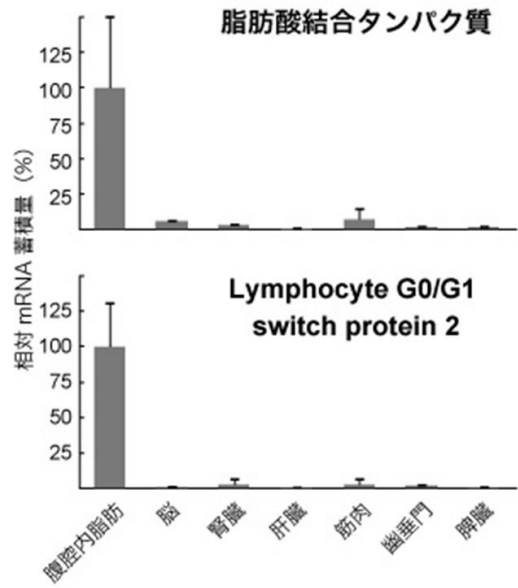


図 6. ニジマス各組織における脂肪酸結合タンパク質および Lymphocyte G0/G1 switch protein 2 遺伝子の相対 mRNA 蓄積量。

各遺伝子の mRNA 蓄積量を同一組織における β アクチン mRNA 蓄積量で割ったものについて, 腹腔内脂肪における値を 100 とした。

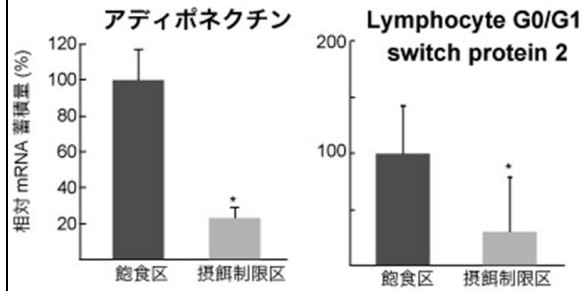


図 7. ニジマス筋肉におけるアディポネクチンおよび Lymphocyte G0/G1 switch protein 2 遺伝子の相対 mRNA 蓄積量。

各遺伝子の mRNA 蓄積量を同一組織における β アクチン mRNA 蓄積量で割ったものについて, 飽食区における値を 100 とした。

以上の成果から, 魚類の脂肪細胞のマーカーとして, アディポネクチンと H-FABP に対する特異的抗体を作製し, これまで不明であった魚類筋肉における脂肪細胞の分布を明らかにした。その結果, アディポネクチンは筋細胞間に分布することが明らかとなった。一方, 細胞質に分布する H-FABP も同様な分布様式を示し (結果は示さず), 筋肉内では脂肪細胞が筋細胞間に存在することが明らかとなった。

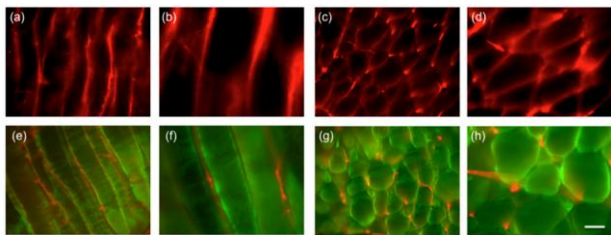


図8. ニジマス筋肉におけるアディポネクチンの分布。

a, b, c, d, 抗アディポネクチンによる染色像. e, f, g, h, 抗アディポネクチン (赤色), 抗 MF-20 (緑色) による染色像. a, b, e, f, 縦断面. c, d, g, h, 横断面.

以上のことから、魚類の脂肪細胞は内臓や皮下以外に筋細胞間に分布し、アディポサイトカインなどの分泌によってエネルギー代謝を制御する可能性が示唆された。また、ORZ の投与は魚類の脂質および糖質代謝を亢進し、アミノ酸からのエネルギー生産への依存を解除する可能性が改めて確認され、効率的な魚類養殖法として科学的にも有用であるものと判断された。

[1] Savino F, Petrucci E, Nanni GE (2008) Adiponectin: an intriguing hormone for paediatricians. *Acta Paediatr* 97: 701-705

[2] Nishio S, Gibert Y, Bernard L, Brunet F, Triqueneaux G, Laudet V (2008) Adiponectin and adiponectin receptor genes are coexpressed during zebrafish embryogenesis and regulated by food deprivation. *Dev Dyn* 237: 1682-1690

[3] Kershaw EE, Flier JS (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2548-2556

[4] Bertile F, Raclot T (2004) Differences in mRNA expression of adipocyte-derived factors in response to fasting, refeeding and leptin. *Biochim Biophys Acta* 1683: 101-109

[5] Maddineni S, Metzger S, Ocón O, Hendricks G III, Ramachandran R (2005) Adiponectin gene is expressed in multiple tissues in the chicken: food deprivation influences adiponectin messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 146: 4250-4256

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] (査読有, 計 12 件)

1. Kondo H, Suga R, Suda S, Nozaki R, Hirono I, Nagasaka R, Kaneko G, Ushio H, Watabe S (2011) EST analysis on adipose tissue of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and tissue distribution of adiponectin. *Gene* 485: 40-45. doi: 10.1016/j.gene.2011.05.035.

2. 長阪玲子, 風間貴充, 潮 秀樹, 坂本浩志, 坂本憲一 (2011) γ -オリザノールの添加がアスタキサンチン含有飼料によるブリ切り身の変色抑制作用に及ぼす影響. *日本水産学会誌* 77: 1101-1104. doi: 10.2331/suisan.77.1101.

3. Nagasaka R, Kazama T, Ushio H, Sakamoto H, Sakamoto K, Satoh S (2011) Accumulation of gamma-oryzanol in teleost. *Fish. Sci.* 77: 431-438. doi:10.1007/s12562-011-0336-9.

4. Islam Md, Nagasaka R, Ohara K, Hosoya T, Ozaki H, Ushio H, Hori M (2011) Biological abilities of rice bran-derived antioxidant phytochemicals for medical therapy. *Current Topics in Medical Chemistry* 11: 1847-1853. doi: 10.2174/156802611796235099.

5. Nagasaka R, Yamasaki T, Uchida A, Ohara K, Ushio H (2011) γ -Oryzanol recovers mouse hypoadiponectinemia induced by animal fat ingestion. *Phytomedicine* 18: 655-660. doi: 10.1016/j.phymed.2011.01.004

6. Ohara K, Kiyotani Y, Uchida A, Nagasaka R, Maehara H, Kanemoto S, Hori M, Ushio H (2011) Oral administration of γ -aminobutyric acid and γ -oryzanol prevents stress-induced hypoadiponectinemia. *Phytomedicine* 18: 669-671. doi: 10.1016/j.phymed.2011.01.003.

7. Hirano Y, Kaneko G, Koyama H, Ushio H, Watabe S (2011) cDNA cloning of two types of growth hormone receptor in torafugu *Takifugu rubripes*: tissue distribution is possibly correlated to lipid accumulation patterns. *Fish. Sci.* 77: 855-865. doi: 10.1007/s12562-011-0377-0.

8. Hakuno F, Yamauchi Y, Kaneko G, Yoneyama Y, Nakae J, Chida K, Kadowaki T, Yamanouchi K, Nishihara M, Takahashi SI (2011) Constitutive expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 inhibits myogenic differentiation through nuclear exclusion of Foxo1 in L6 myoblasts. *PLoS ONE* 6: e25655. doi:10.1371/journal.pone.0025655.

9. Kaneko G, Furukawa S, Kurosu Y, Yamada T, Takeshima H, Nishida M, Mitsuboshi T, Otaka T, Shirasu K, Koda T, Takemasa Y, Aki S, Mochizuki T, Fukushima H, Fukuda Y, Kinoshita S, Asakawa S, Watabe S (2011) Correlation with larval body size of mRNA levels of growth hormone, growth hormone receptor I and insulin-like growth factor I in larval torafugu *Takifugu rubripes*. *J. Fish Biol.* 79: 854-874. doi:10.1111/j.1095-8649.2011.03037.x.

10. Mentang F, Maita M, Ushio H, Ohshima T (2011) Efficacy of silkworm (*Bombyx mori* L.) chrysalis oil as a lipid source in adult Wistar rats. *Food Chem* 127: 899-904. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.01.045.

1 1. Ishikawa Y, Ohara K, Ohshima T, Ushio H (2011) Linear chain aldehydes evoke calcium responses in B16 melanoma cells. EXCLI J 10: 303-311.

http://www.excli.de/vol10/Ishikawa_Ushio12_2011/Ishikawa_Ushio_09122011_proof.pdf

1 2. Sakai S, Murata T, Tsubosaka Y, Ushio H, Hori M, Ozaki H (2012) γ -Oryzanol reduces adhesion molecule expression in vascular endothelial cells via suppression of nuclear factor- κ B activation. J Agric Food Chem 60: 3367-3372. doi: 10.1021/jf2043407.

〔学会発表〕 (計 11 件)

1. 長阪玲子, 植木瑞葵, 潮 秀樹, 近藤秀裕, 廣野育生, 金子 元, 渡部終五, 魚類におけるアミノ酸代謝の制御機構に関する基礎研究, 平成 22 年度日本水産学会秋季大会, 講演要旨集 p.131 2010 年 9 月 22-25 日
2. 小林由佳, 飯野翔太, 長阪玲子, 潮 秀樹, ガンマオリザノールによる mTOR の活性抑制に関する研究 BMB2010, 2010/12/07
3. 長阪玲子, 植木瑞葵, 飯野翔太, 潮 秀樹, 近藤秀裕, 廣野育生, 金子 元, 渡部終五, Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor activity by target of rapamycin and amino acids in teleost, BMB2010, 2010/12/07
4. 植木瑞葵, 長阪玲子, 近藤秀裕, 廣野育生, 金子 元, 渡部終五, 潮 秀樹, 魚類におけるアミノ酸代謝の制御機構に関する基礎研究 2, 平成 23 年度日本水産学会春季大会, 2011 年 3 月 30 日
5. Reiko Nagasaka, Mizuki Ueki, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono, Gen Kaneko, Shugo Watabe, Hideki Ushio, Regulatory mechanisms of amino acid metabolism in teleost. 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 22 日
6. 菅 亮太, 近藤秀裕, 青木 宙, 廣野育生 ニジマスアディポネクチンの構造および発現 第 12 回マリンバイオテクノロジー学会. 2010 年 5 月 30 日
7. 近藤秀裕・廣野育生・長阪玲子・金子 元・潮 秀樹・渡部終五 ニジマス脂肪組織で発現する遺伝子の網羅的解析 平成 22 年度日本水産学会秋期大会 2011 年 9 月 23 日
7. Kondo H, Suda S, Kawana Y, Hirono I, Nagasaka R, Kaneko G, Ushio H, Watabe S EFFECTS OF FEED RESTRICTION ON GENE EXPRESSION PROFILES OF ADIPONECTIN AND ENERGY METABOLISM GENES IN RAINBOW TROUT ONCORHYNCHUS MYKISS MUSCLE Genomics in Aquaculture 2011 年 9 月 14 日
8. Ushio H Physiological functions of

gamma-oryzanol and application of gamma-oryzanol to fish cultures The International Symposium on Muscle Biochemistry 2011 年 10 月 28 日

9. Kaneko G Studies on the species-specific lipid accumulation in torafugu and red seabream. The International Symposium on Muscle Biochemistry 2011 年 10 月 28 日

10. 金子 元, 近藤秀裕, 廣野育生, 長阪玲子, 佐藤秀一, 潮 秀樹, 渡部終五 発現配列タグ (EST) を利用したトラフグおよびマダイのアポリポタンパク質の発現様式の比較 平成 23 年度日本水産学会秋季大会 2011 年 9 月 29 日

11. 白神裕人, 金子 元, Anurak Khieokhajokhet, 平野雪, 潮 秀樹, 佐藤秀一, 渡部終五 マダイ各組織におけるリポタンパク質リパーゼ活性 平成 23 年度日本水産学会秋季大会 2011 年 9 月 29 日

〔図書〕 (計 1 件)

1. 金子 元, 潮 秀樹, 渡部終五 沿岸漁獲物の高品質化「魚類のエネルギー代謝に及ぼす水温および飢餓の影響」恒星社厚生閣 2012 pp. 168

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

1. 名称: 反芻動物用飼料添加物、及び飼育方法

発明者: 潮 他 5 名

権利者: 東京大学・株式会社サタケ

種類: 特許出願

番号: 特願 2011-140036

出願年月日: 7 月 12 日, 2011

国内外の別: 国内

2. 名称: 養殖魚用餌及びその製造方法

発明者: 潮 他 5 名

権利者: 双日株式会社

種類: 特許出願

番号: 特願 2012-020944

出願年月日: 2 月 2 日, 2012

国内外の別: 国内

3. 名称: 養殖魚死亡抑制剤

発明者: 潮 他 4 名

権利者: 双日株式会社

種類: 特許出願

番号: 特願 2012-020944

出願年月日: 2 月 2 日, 2012

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 2 件)

1. 名称: 脂質代謝調節作用を有する食品素

材，健康食品，動物用飼料及び動物の飼育方法

発明者：潮他 4 名

権利者：東京海洋大学・株式会社サタケ

種類：特許

番号：特許第 4785140 号

取得年月日：7 月 22 日，2011

国内外の別：国内

2. 名称：頭足類に属する動物の体色改善剤
と頭足類に属する動物の加工方法

発明者：潮他 3 名

権利者：東京海洋大学

種類：特許

番号：特許第 4876227 号

取得年月日：11 月 22 日，2011

国内外の別：国内

〔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・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：50251682

(2) 研究分担者

渡部 終五 (WATABE SHUGO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：40111489

金子 元 (KANEKO GEN)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：30466809

廣野 育生 (HIRONO IKUO)

東京海洋大学・大学院海洋科学研究科・教授

研究者番号：00270926

近藤 秀裕 (KONDO HIDEHIRO)

東京海洋大学・大学院海洋科学研究科・准教授

研究者番号：20314635

長阪 玲子 (NAGASAKA REIKO)

東京海洋大学・大学院海洋科学研究科・助教

研究者番号：90444132