

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 15 日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780194

研究課題名（和文） 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

研究課題名（英文） Basic research in regulatory pathway of teleost for amino acid

研究代表者

長阪 玲子（NAGASAKA REIKO）

東京海洋大学・海洋科学部・助教

研究者番号：90444132

研究成果の概要（和文）：魚類は糖の利用効率が低く、生体エネルギー生産におけるアミノ酸への依存度が高いため、脱アミノ反応を頻繁に行っていることが予想される。しかし、アミノ酸の代謝を制御する経路についての研究は皆無に近い。本研究では、魚類のアミノ酸の代謝制御経路について検討した。その結果、魚類においてもアミノ酸制御経路が存在し、哺乳類と同様の制御因子がアミノ酸代謝に重要な役割を果たすものと推定された。

研究成果の概要（英文）：Fish has been considered as glucose intolerant. Because they depend on amino acid for production of their energy, it is to be anticipated that they have sensitive amino acid sensor system. However, there are few reports about amino acid control regulation system of teleost. This research investigated regulatory pathway of teleost for amino acid. As a result, there were regulatory pathways of teleost for amino acid same as mammal. Some factors which also existed in mammal played important role for amino acid metabolism of teleost.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：代謝・酵素，代謝制御因子

1. 研究開始当初の背景

魚類では哺乳類と比べて糖質の利用効率が悪く、生体活動のエネルギーとしてアミノ酸に強く依存し、その傾向は肉食性魚種で強くなる。このため、哺乳類とは異なり、魚類は糖質に比べてアミノ酸に対する味覚応答の閾値が著しく低く、積極的にアミノ酸を摂取するように適応しているといわれる。一方、養殖魚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アミノ酸からのエネルギー生産を上回る量の脂質からのエネルギー供給が有効であることが明らかにされている。さらに、アミノ酸の節約効果を期待して昨今の魚類養殖においては、多量の脂質が添加された養魚飼料が用いられている。これは、養殖魚への過剰な脂質の蓄積を引き起こし、その結果肉質の低下や貯蔵時の脂質劣化を招く例も数多く報告されている。

これは魚類におけるアミノ酸・脂質代謝の制御機構に関する理解の遅れが原因であるといえる。

真核生物である酵母からヒトまで高度に保存されているタンパク質リン酸化酵素 TOR (target of rapamycin) は、栄養源の有無を感知し、細胞の様々な機能 (転写, 翻訳, タンパク質分解) を制御している。哺乳類での TOR の中心的役割としてはアミノ酸代謝制御の起点であることが挙げられるが、魚類の TOR に関する研究は始まったばかりであり、アミノ酸代謝の制御への関与については明らかにされていない。また、哺乳類では過剰に摂取したアミノ酸の代謝制御に核受容体型転写因子 peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) が重要な役割を果たす。魚類における PPARs についても構造情報などが明らかになりつつあるが、脱アミノ反応をいかに制御しているかの知見は全くない。

本研究により脱アミノ反応を理解出来れば、タンパク質分解によって生じたアミノ酸による異化作用および糖新生作用の向上を制御することも可能になることから、脱アミノ反応に関する基礎的知見が提供されるだけでなく、タンパク質の効率的な固定が期待できることから水産業においても極めて意義のある研究であると考えられる。

2. 研究の目的

魚類は糖の利用効率が低く、生体エネルギー生産におけるアミノ酸への依存度が高いため、脱アミノ反応が頻繁に起こっていることが予想される。しかし、アミノ酸の代謝を制御する経路についての研究は皆無に近い。本研究ではアミノ酸代謝制御経路の中心と考えられている TOR と PPARs に焦点を当て、これらを介した魚類の脱アミノ反応制御経路に関して基礎的な知見を得ることを目的とした。

アミノ酸をエネルギー分子として利用してきた脊椎動物は、デンプンを蓄積した陸上植物を摂取するにもなって、魚類に見られるアミノ酸主体のエネルギー代謝から糖主体のエネルギー代謝へと進化したものと予想される。多くの 2 型糖尿病に罹患した人々はこの進化の過程を逆行しているともいえ、魚類のアミノ酸代謝制御機構を理解することは、脊椎動物全般の生体エネルギー代謝制御機構を理解するための礎となりうる。また、アミノ酸代謝を含む魚類のエネルギー代謝制御経路を明らかにしてその方策を考察することは養殖における魚類へのタンパク質固定の効率化という大命題に直接的に貢献できると考えた。

3. 研究の方法

(1) 魚類培養細胞における TOR と PPARs の関連を明らかにした。

魚類培養細胞などにおいてもラパマイシンが TOR を阻害することが明らかになっていることから、魚類培養細胞にラパマイシンを投与し、PPARs の発現誘導について、ウエスタンブロッティングを用いてタンパク質レベルで評価した。PPAR ファミリーには $-\alpha$, $-\gamma$, $-\delta$ などが存在するが、今回は全てのタイプを探索し、魚類における TOR 阻害による PPAR ファミリーの発現制御を確認した。

また魚類培養細胞および急性摘出臓器にラパマイシンを投与し、TOR およびリン酸化 TOR をウエスタンブロッティングによって評価した。魚類に交差性のある TOR およびリン酸化 TOR に対する市販抗体を用いることにより、TOR と PPARs の関連を明らかにした。また、PPARs および TOR を制御していると考えられている AKT, ERK についてもタンパク質発現量をウエスタンブロッティングにより評価した。

(2) 魚類の PPARs が関与するアミノ酸に対する反応解明

魚類培養細胞が飢餓状態でオートファジーが誘導されていることから、魚類培養細胞を無血清状態と L-アラニンを追加した条件下で培養した。L-アラニンは魚類においてインスリン分泌誘導を示すことが知られており、哺乳類などでは糖原性アミノ酸として知られている。そこで PPARs が誘導すると考えられているアミノ基転移酵素 ALT の mRNA 発現量を比較した。ALT のプライマーは各種データベースより設計した。また、ラパマイシンを投与したときの ALT の発現量についても検討した。ALT は mRNA の発現量が必ずしも活性と一致しない可能性もあるが、マウスなどで発現量と活性に相関性があるという報告もあることから今回は mRNA 発現量として評価した。また、ラパマイシンを投与した細胞での ALT の mRNA 発現量についても検討した。

(3) 魚類の TOR が関与する脱アミノ反応の機構解明

魚類に TOR 活性阻害作用が明らかになりつつあるオリザノールを給餌し、飼育試験を行った。オリザノールが含有されていない飼料を投与した区を control とし、餌 1kg あたりオリザノール 2mg 含有している飼料投与区を 2 区、10mg 含有している飼料投与区を 3 区として 8 週間飼育試験を行った。飼育試験後、肝臓を急性摘出し、TOR, PPARs, また TOR の下流である Eukaryotic translation initiation factor 4 elongation binding protein 1 (4EBP1) の発現量をウエスタンブロッティングにより評価した。

4. 研究成果

(1) 本研究ではマスノスケ発眼胚体由来の CHSE-214 に TOR の阻害剤であるラパマイシン (RAPA) を投与し, TOR および PPARs, また哺乳類においてこれらの制御に関与していると考えられている AKT, ERK の発現をタンパク質レベルで評価した. その結果, 魚類の TOR のリン酸化は阻害され (図 1), PPARs 発現量は上昇したが (図 2), AKT, ERK には有意な差は見られなかった (図 3, 4).

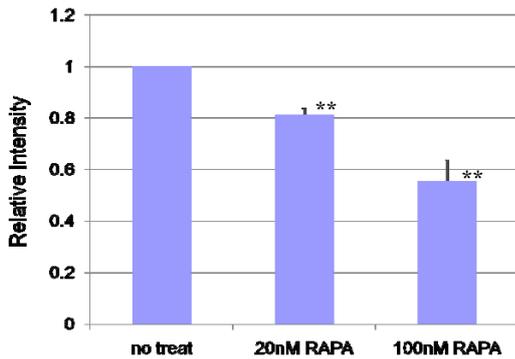


図 1. CHSE-214 における TOR リン酸化発現量の割合 (** $P < 0.01$, $n=3$)

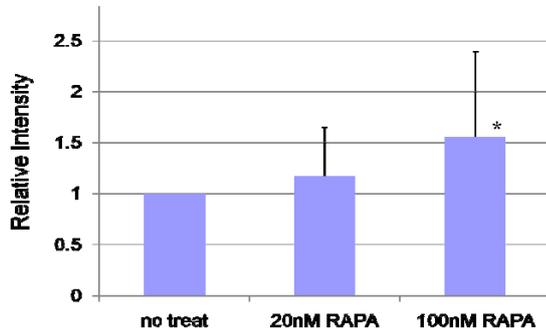


図 2. CHSE-214 における PPARs 発現量 (* $P < 0.05$, $n = 11$)

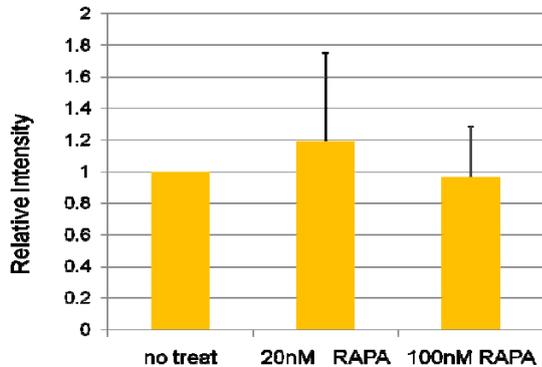


図 3. CHSE-214 における ERK 発現量 ($n = 9$)

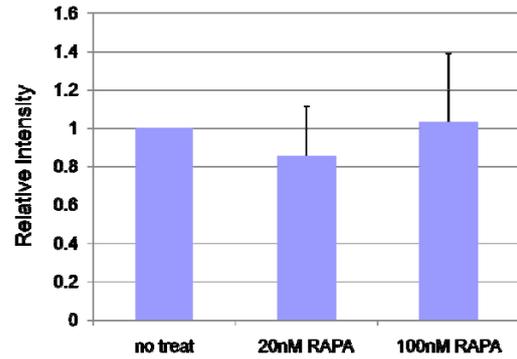


図 4. CHSE-214 における AKT 発現量 ($n = 6$)

MAPK や PI3K カスケードによる TOR 制御は哺乳類で知られているが, AKT, ERK に差が見られなかったことから魚類においてラパマイシンの影響はこれらインスリン成長因子経路へのフィードバック機構には強い影響をもたらさないものと示唆された.

(2) 魚類培養細胞が飢餓状態でオートファジーが誘導されていることから, 魚類培養細胞を無血清状態 (no treat) と L-アラニンを追加した条件下 (+L-alanine) で培養した. その結果, 投与 24 時間後では差が見られなかったものの, 無血清培養で 48 時間後に ALT

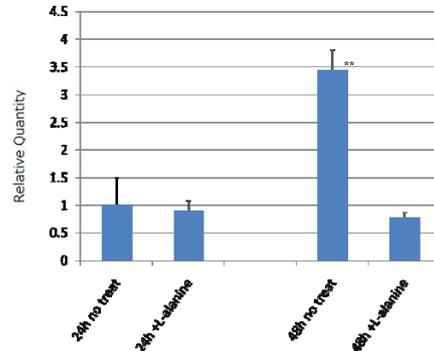


図 5. L-アラニンに曝露した CHSE-214 における ALT の mRNA 発現量 (** $P < 0.01$, $n = 3$)

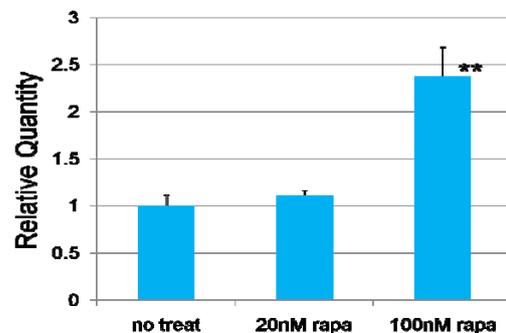


図 6. CHSE-214 における ALT の mRNA 発現量 (** $P < 0.01$, $n = 3$)

mRNA 発現量が有意に増加した。しかし L-アラニンを投与した区では ALT の上昇は見られなかった (図 5)。また、ラパマイシンを 100nM 投与した細胞で有意に ALT mRNA 発現量が増加した (図 6)。このことから飢餓状態になると ALT の活性が上がり、アラニンをエネルギーとして使用している可能性が考えられた。また、ラパマイシンによる TOR 活性抑制によりエネルギーの節約機構として ALT 発現量が上昇した可能性が考えられた。これは哺乳類において飢餓状態や活性化 PPARs の誘導としても確認されていることであり、魚類でも哺乳類と同様な経路が働いている可能性が示唆された。

(3) TOR リン酸化を阻害すると考えられているオリザノールをニジマスに給餌し、急性摘出した肝臓の TOR, PPARs, TOR の下流である 4E-BP1 のタンパク質発現量を評価した。その結果、8 週間の飼育試験でコントロールに比べ、オリザノールを給餌した試験区においてリン酸化 TOR が抑制され、PPARs の発現量が上昇することが明らかになった (図 7, 8)。

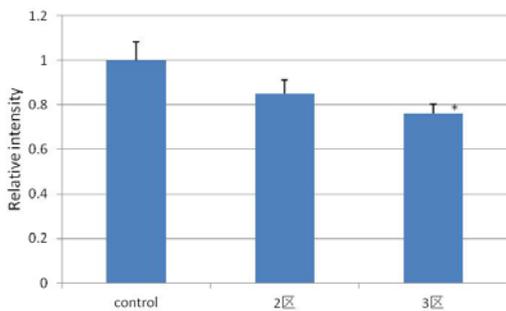


図 7. ニジマス肝臓の TOR リン酸化発現量の割合 (**P<0.01, *P<0.05, n=5)

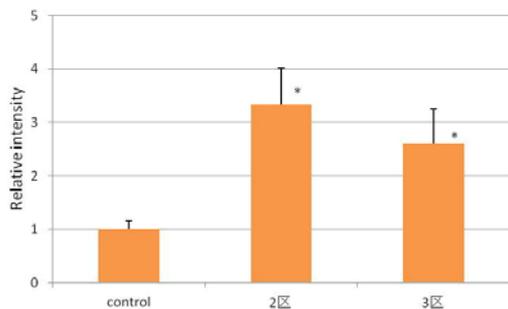


図 8. ニジマス肝臓の PPARs 発現量 (*P < 0.05, n=5)

また、TOR の下流で翻訳機構を担っている 4E-BP1 のリン酸化は抑えられた (図 9)。TOR の活性が下流の因子にも影響を及ぼしたこ

とから脂質代謝やアミノ酸代謝といった代謝系が働いていると考えられる。

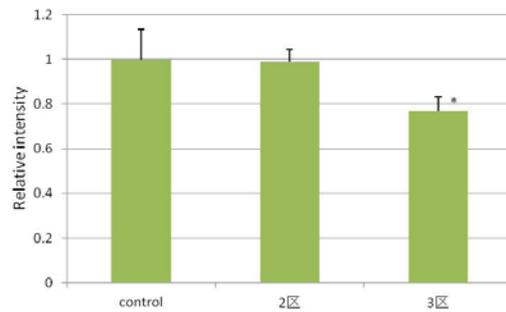


図 9. ニジマス肝臓の 4E-BP1 リン酸化発現量の割合 (*P<0.05, n=5)

以上のことから魚類 TOR シグナル伝達経路ではインスリン成長因子経路よりもタンパク質合成における翻訳機構のほうが影響を受ける可能性が考えられる。また、飼育実験ではコントロールに比べ 2 区、3 区ともに飼料効率の改善がみられ、本研究の大命題でもある養殖におけるタンパク質固定の効率化に新たな知見をもたらすものと考えられる。

本研究により魚類においても哺乳類と同様の制御因子が存在し、代謝に関与していることが示唆された。

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 8 件)

- ① 長阪玲子, 風間貴充, 潮 秀樹, 坂本浩志, 坂本憲一, 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, 査読有. 77 (2011) 1101-1104.
- ② Hidehiro Kondo, Ryota Suga, Satomitsu Suda, Reiko Nozaki, Ikuo Hirono, Reiko Nagasaka, Gen Kaneko, Hideki Ushio, Shugo Watabe Expressed sequence tag analysis on adipose tissue of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and tissue distribution of adiponectin, 査読有. Gene, 485 (2011) 40-45.
- ③ Reiko Nagasaka, Takamitsu Kazama, Hideki Ushio, Hiroshi Sakamoto, Kenichi Sakamoto, Shuichi Satoh. Accumulation of gamma-oryzanol in teleost. 査読有. Fish. Sci. 77 (2011) 431-438.
- ④ Md Shafiqul Islam, Reiko Nagasaka, Kazuyuki Ohara, Takamitsu Hosoya, Hiroshi Ozaki, Hideki Ushio, Masatoshi

Hori, Biological abilities of rice bran-derived antioxidant phytochemicals for medical therapy. Current Topics in Medical Chemistry, 査読有. 11 (2011) 1847-1853.

- ⑤ Reiko Nagasaka, Tomoteru Yamsaki, Asako Uchida, Kazuyuki Ohara, Hideki Ushio, γ -Oryzanol recovers mouse hypoadiponectinemia induced by animal fat ingestion, Phytomedicine, 査読有. 18 (2011) 655-660.
- ⑥ Kazuyuki Ohara, Yuka Kiyotani, Asako Uchida, Reiko Nagasaka, Hiroyuki Maehara, Shigeharu Kanemoto, Masatoshi Hori, Hideki Ushio, Oral administration of γ -aminobutyric acid and γ -oryzanol prevents stress-induced hypoadiponectinemia, Phytomedicine, 査読有. 18 (2011) 669-671.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 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, 長崎大学
- ② 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, 京都国際会館
- ③ 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 27 日, (東日本大震災のため学会が中止となり要旨集の発行をもって発表となった。)
- ④ 風間貴充, 長阪玲子, 近藤秀裕, 廣野育生, 佐藤秀一, 韓 ユナ, 金子 元, 渡部終五, 潮 秀樹, γ オリザノール投与が魚類の代謝制御に及ぼす影響, 平成 23 年度日本水産学会春季大会, 2011 年 3 月 27 日, (東日本大震災のため学会が中止となり要旨集の発行をもって発表となった。)
- ⑤ 韓 ユナ, 金子 元, 渡部終五, 潮 秀樹, 長阪玲子, 近藤秀裕, 廣野育生, ニジマス筋肉および肝臓におけるアディポネクチン発現分布, 平成 23 年度日本水産学会春季大会, 2011 年 3 月 27 日, (東日本大震災のため学会が中止となり要旨集の発行をもって発表となった。)
- ⑥ 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 年 12 月 7 日, 神戸国際展示場

- ⑦ 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, 2010 年 9 月 23 日, 京都大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長阪 玲子 (Nagasaka Reiko)
東京海洋大学 海洋科学部 助教
研究者番号 : 90444132

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :