

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780217

研究課題名（和文）ニジマスモデルとした魚類における大豆油粕給与による胆汁異常発生メカニズムの解明

 研究課題名（英文）Effects of soybean meal based diet on bile acid-related genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*

研究代表者

村下 幸司（MURASHITA KOJI）

独立行政法人水産総合研究センター・増養殖研究所 養殖システム部・研究員

研究者番号：60597649

研究成果の概要（和文）：養殖魚へ与える餌の主成分は魚粉（天然魚を加工したもの）であり、魚粉を植物性原料に置きかえる必要がある。植物性原料として最も利用性が高いのが大豆油粕（SBM）であるが、SBM を魚へ給与すると胆汁量が減少して成長が遅延してしまう。そこで本研究にて SBM がニジマスの胆汁生理に及ぼす影響を調べたところ、胆汁の合成・利用が阻害されることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To investigate the effects of soybean meal on the bile physiology in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, diets based on soybean meal (SBM) or fish meal (FM) were fed to trout for 10 weeks. In fish fed diet SBM, the expression levels of bile acid synthesis and bile acid transporter genes were lower than those of fish fed diet FM, which indicates that SBM suppress bile synthesis and its availability in rainbow trout.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：魚類栄養生理学

科研費の分科・細目：水圏応用科学・水圏生命科学

キーワード：水族栄養・胆汁・大豆油粕・魚粉・養魚飼料

## 1. 研究開始当初の背景

世界的に魚類養殖が増大する中、その飼料の主原料である魚粉の減少・価格高騰が大きな問題となっている。喫緊の課題として、魚粉を植物性原料に置きかえる必要がある。魚粉に代わる植物性原料として量的・質的・价格的に最も利用性が高いのが大豆油粕（SBM）であるが、SBM 給与により胆汁量や胆汁成分組成に異常をきたすことが分かってきた。しかし、魚類の胆汁生理に関する知見はほとんど無く、そのほぼ全てが明らかでない状態である。

## 2. 研究の目的

養魚飼料において植物性原料を高度に利用

するためにも、植物性原料が胆汁生理異常を起こすメカニズムを詳細に理解することは極めて重要である。そこで本研究では、SBM が魚類の胆汁生理へ及ぼす影響を分子レベルで調べることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 胆汁生理関連遺伝子のクローニング  
魚類では胆汁生理に関わる遺伝子がほとんど同定されていなかったことから、哺乳類の知見を基に、ニジマスを用いて、EST 情報や他動物の相同性を利用することで胆汁生理に重要と考えられる 8 種の遺伝子のクローニ

ングを試みた。

(2) 胆汁生理関連遺伝子の発現解析

得られた遺伝子配列を基に、各遺伝子の発現量測定系を確立し、組織発現分布や摂餌後発現変化を調べることで、各遺伝子の機能が魚類においても保存されているかを推察した。

(3) SBM がニジマス胆汁生理へ及ぼす影響

SBM がニジマスの胆汁生理に及ぼす影響を調べるため、魚粉主体飼料(FM)、魚粉低減飼料(LFM)、胆汁酸添加 SBM 主体飼料(BA) および SBM 主体飼料(SBM)の 4 飼料を作製し、ニジマス稚魚を 10 週間飽食飼育した。飼育終了後、(2)で確立した方法にて各遺伝子発現量を測定すると共に、腸サック法を用いて胆汁酸取込能を調べた。

4. 研究成果

(1) 胆汁生理関連遺伝子のクローニング

哺乳類では胆汁生理の分子機構が良く理解されている (図 1)。胆汁の主成分である胆汁酸は、肝臓にてコレステロールから生成され、胆のうに蓄えられる。蓄えられた胆汁酸は、摂食により胆のうから腸管内へ分泌されて脂肪へ作用した後、その約 95%が再度腸管から吸収されて肝臓へと運ばれ再利用される (いわゆる腸肝循環)。魚類では、これらに関わる分子の多くが同定されておらず、その機構も明らかでない。ニジマスを用いて胆汁酸の合成・合成抑制・腸肝循環に関与する 8 種類の遺伝子同定を試みたところ、全ての分子を同定することに成功した。また、その内の幾つかには複数のホモログも確認され (図 2)、魚類特有の遺伝子重複によるものだと考えられた。

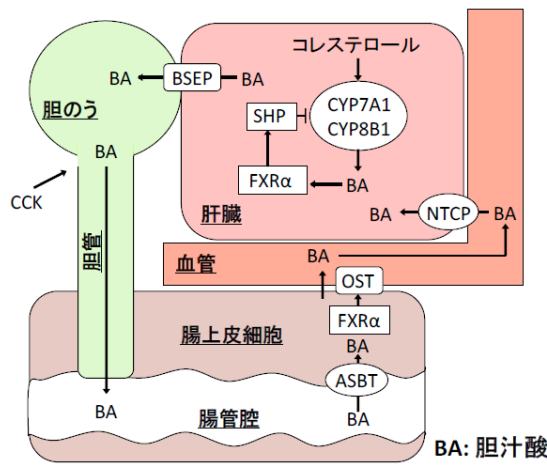


図 1. 哺乳類での胆汁合成・腸肝循環機構。

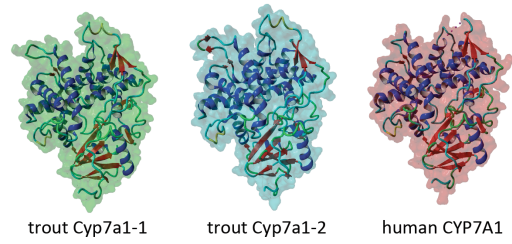


図 2. 胆汁酸合成酵素 Cyp7a1 の予測立体構造。ニジマスで同定された 2 つの Cyp7a1 は、どちらもヒト CYP7A1 と類似した立体構造を持つと予測された。

(2) 胆汁生理関連遺伝子の発現解析

①組織発現分布

単離された胆汁生理関連遺伝子の内、哺乳類では肝臓への胆汁酸取込に関与する胆汁酸輸送体である NTCP については脳で強く発現しており機能分化が示唆された。一方、その他の遺伝子については、肝臓、腸および胆のう等の胆汁生理に重要な組織で主発現しており、胆汁生理に関する機能が保存されていると推察された (図 3)。

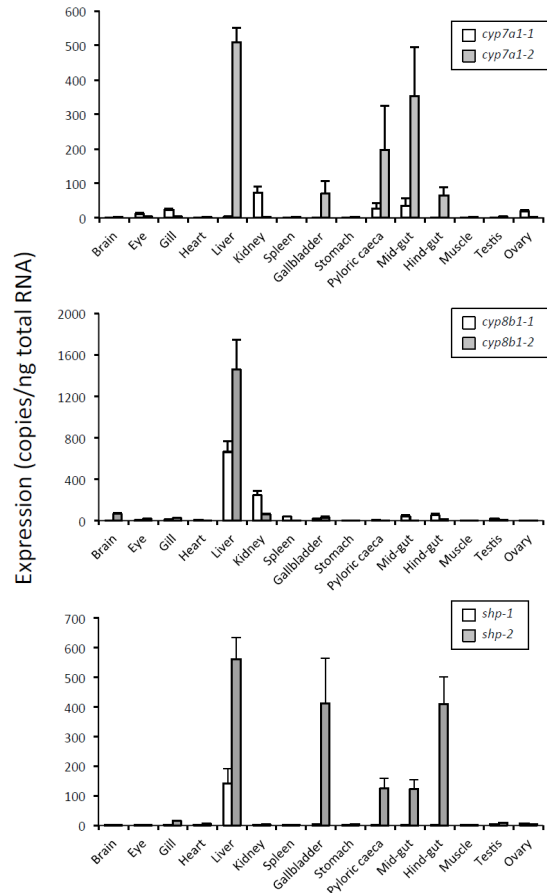


図 3. 胆汁酸合成酵素 Cyp7A1 および

Cyp8b1 とそれら発現を抑制する Shp の組織発現分布。

② 摂餌後発現変化

単離した各遺伝子について摂餌後の発現変化を調べたところ、胆汁酸輸送体や胆汁酸受容体については顕著な変化が認められなかった。胆汁酸合成酵素である Cyp7a1 と Cyp8b1 の遺伝子発現量は摂餌後に増大し、ニジマスにおいても胆汁酸合成に関与することが考えられた (図 4)。また、Cyp8b1 遺伝子については、絶食魚においても変動が認められたことから、その発現には概日リズムが存在すると考えられた。一方、胆汁酸合成を抑制する Shp 遺伝子発現量 (shp-2) は、摂餌後に急激な減少が認められたことから、ニジマスにおいても胆汁酸合成を抑制する機能を有することが示唆された。

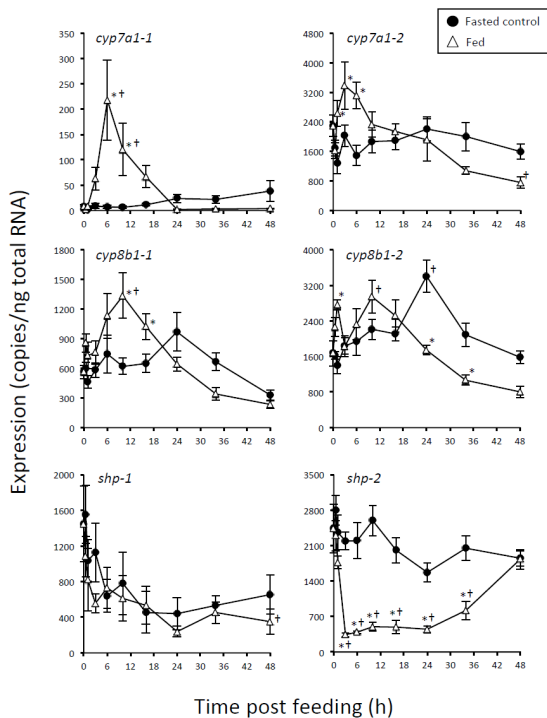


図 4. 胆汁酸合成酵素 Cyp7a1 および Cyp8b1 と胆汁酸合成抑制因子 Shp 遺伝子の摂餌後変化。

(3) SBM がニジマス胆汁生理へ及ぼす影響

① 成長成績と胆のう重量

FM、LFM、BA および SBM 飼料にてニジマスを飼育したところ、FM 区に対していずれの区でも成長が劣ったが、BA 区では SBM 区に対して改善していた (図 4)。また、胆のう重量は、BA 区で BA 区と同等であったが、LFM 区と SBM 区では大きく劣っていた。

② 胆汁生理関連遺伝子発現量

各飼料による 10 週間の飼育終了後、摂餌後経時的に胆汁生理関連遺伝子の発現量を測定した。その結果、多くの遺伝子では飼料区間に差がみられなかったものの、肝臓での胆汁酸合成酵素である Cyp7a1 および腸管からの胆汁酸再吸収に重要な Asbt の遺伝子は FM 区以外において発現が抑制されていた (図 5)。

③ 腸管からの胆汁酸吸収能力

各飼料で飼育した魚の腸管 (直腸) を用いて、腸サック法による胆汁酸吸収能を調べた。その結果、いずれの区でも胆汁酸の吸収が確認されたものの、FM 区に比べるとその他 3 区は吸収能が劣ることが明らかとなった (図 6)。

上記①-③より、SBM 給与による胆汁量の減少は胆汁酸の合成と再吸収の両方が抑制されるために起こることが明らかとなった。ただし、SBM 区においてもある程度の胆汁酸吸収能は有していたことから、BA 区では FM 区と同等な胆のう重量を示したと考えられる。

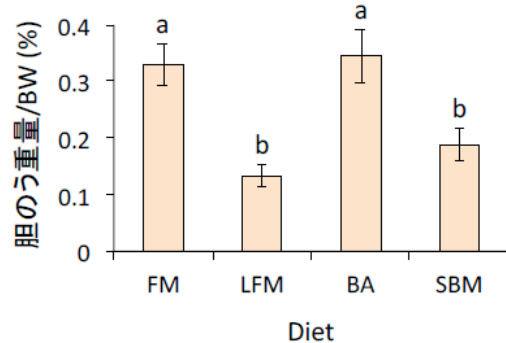
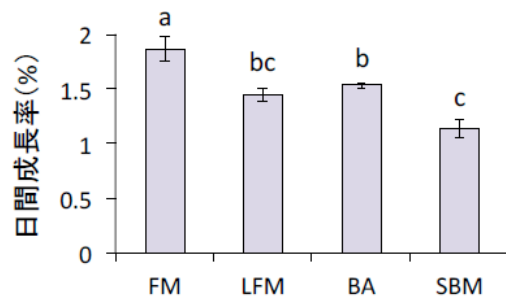


図 5. 各試験飼料区における日間成長率と胆のう重量.

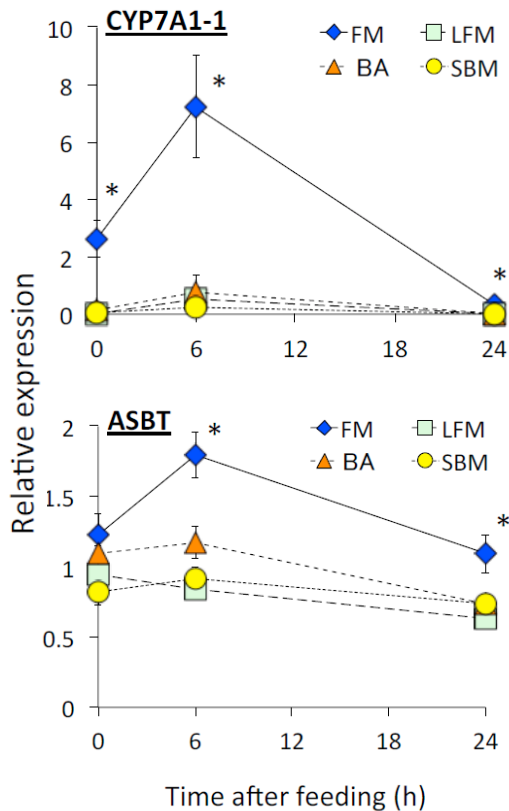


図 6. 肝臓での胆汁酸合成酵素 Cyp7a1 および腸管での胆汁酸輸送体 Asbt の遺伝子発現量.

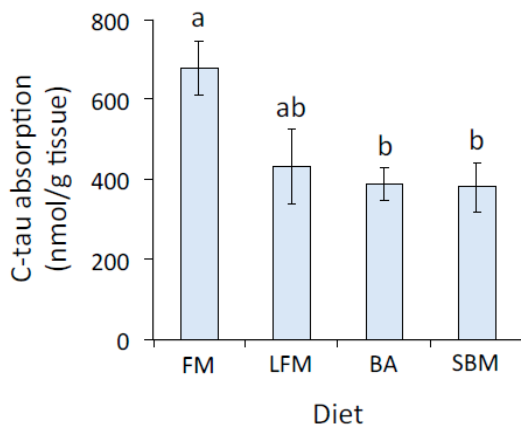


図 7. 胆汁酸取込能.

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 件)

① 村下 幸司、大豆油粕給与がニジマスの胆汁酸合成・腸肝循環に及ぼす影響、平成 25 年度日本水産学会春季大会、2013 年 3 月 26 日-30 日、東京海洋大学 (東京)

② 村下 幸司、Postprandial changes in bile acid synthesis-related genes in rainbow trout、6th World Fisheries Congress、2012 年 5 月 7 日-11 日、Edinburgh, Scotland

③ 村下 幸司、ニジマスにおける NTCP および ASBT: クローニングと発現解析、平成 24 年度日本水産学会春季大会、2012 年 3 月 26 日-30 日、東京海洋大学 (東京)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

村下 幸司 (MURASHITA KOJI)  
独立行政法人水産総合研究センター・増養殖研究所 養殖システム部・研究員  
研究者番号: 60597649

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者