

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450281

研究課題名(和文) スーパーサーモンにおけるエネルギー生産機序の解明と普通魚育成への応用

研究課題名(英文) A study on the mechanisms of energy production in super salmon and its application for cultured fish

研究代表者

中野 俊樹 (NAKANO, TOSHIKI)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：10217797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

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) インスリン様成長因子(IGF)-I系により主に制御されている。GH遺伝子組換え魚は短期間で著しく成長するがエネルギー生産のメカニズムについては不明な点が多い。本研究ではGHを過剰生産するGH遺伝子組換えギンザケについてメタボローム解析とミトコンドリア解析を行った。給餌条件では組換え魚の筋肉で解糖系のアクティビティーが変化し、それは栄養状態の影響を受けた。またミトコンドリア機能は、組換え魚である程度亢進していた。以上より組換えの影響は筋肉において顕著で、代謝等を変化させながら高成長に関わるエネルギーを得ていると推察される。

研究成果の概要(英文)：Growth in fish is regulated by the growth hormone (GH)-insulin-like growth factor (IGF)-I axis. Little is known concerning the in vivo levels of metabolites, energy production and the mechanism of enhancement of growth in GH transgenic fish. The present study examined the features of GH transgenic coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by metabolomic and mitochondrial function analysis. The difference found between transgenic (T) and non-transgenic (NT) fish was that glycolysis metabolite levels changed in the muscle of transgenic fish. The feature of metabolites in T fish which were fully fed after ration-restriction was not similar to that in fully-fed T fish. Mitochondrial function in the muscle of T fish was found to be promoted by GH transgenesis. The results suggest that GH transgenesis can improve the metabolic pathway and mitochondrial function associated with rapid growth.

研究分野：農学

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

安全な食品に対する関心が高まる中、鳥インフルエンザなどの影響で魚介類に対する需要が拡大している。世界的な水産物に対する需要増大に対し養殖技術の向上は解決策の一つである。本課題の研究代表者(以下代表者と略す)は、健全な魚類を育成するためにストレスや養魚用サプリメントに関して研究を展開し、原著論文や総説を発表してさらに日本水産学会の学会賞・水産学進歩賞を受賞した。水産分野では養魚用サプリメントの研究が盛んになる一方で、様々な恩恵をもたらす食料増産にも繋がる遺伝子組み換え生物の研究も期待されている。カナダ水産海洋省国立ウエストバンクーバー研究所(CAER-UBC/DFO)の R. H. デブリン博士は、成長ホルモン(GH) 遺伝子を導入することで種々の組織で GH を過剰発現し驚異的な成長をするサケ“スーパーサーモン”の作出に世界で初めて成功した(Devlin *et al.*, *Nature*, 1994 & 2001)。その後、アメリカの民間会社が GH 組換え魚の商業的な生産を FDA に申請し認可され、遂に市場投入が実現される見通しとなった(Ledford, *Nature*, 2015)。しかし高成長のメカニズムとそれに関わる因子、安全性の解析やリスク評価は十分ではない。

代表者はデブリン博士の協力を得て彼が育成するスーパーサーモンを用い、魚類成長の中枢をなす GH-インシュリン用成長因子(IGF)-I 系に関わる因子の発現について解析してきた。その結果 GH と IGF-I の血中レベルは組換え個体において一日を通して高く推移すること、それら成分に関わる遺伝子は摂食後に徐々に増大する一定のリズムを持つこと、さらに組換え魚では高い摂食活性を有することなどを明らかにした。しかし、GH 組換え魚において認められる高い成長をもたらす原因は未だ不明な点が多いのが現状であった。

2. 研究の目的

前述のように魚類の成長は GH-IGF-I 系により主に調節されている。養殖魚は環境から様々なストレスを受け、それらが健康や生産性に影響を与えると考えられる。代表者らは環境由来のストレスがギンザケの GH-IGF-I 系に及ぼす影響を検討してきたが、GH 組換え魚における各種代謝産物の動態や栄養状態やストレスの影響、エネルギー産生のメカニズムに関する知見は少ない。

本研究ではデブリン博士とカナダ水産海洋省の協力の下、GH を過剰発現している GH 組換えスーパーサーモンのエネルギー産生性を明らかにするため、代謝産物をメタボローム解析すると共に組織のエネルギー生産を担うミトコンドリアの機能について検討した。

3. 研究の方法

(1) GH 遺伝子組換えスーパーサーモンの作出、飼育およびサンプリング:

GH 遺伝子組換えスーパーサーモンは、R.H. デブリン博士ら(1994)により開発されたオールサーモン GH 発現用ベクター-OnMTGH1 をマイクロインジェクション法により導入・固定したギンザケ(*Oncorhynchus kisutch*) M77 系をカナダ国立ウエストバンクーバー研究所(CAER-DFO/UBC)内の特殊隔離飼育施設で飼育・蓄養した。また非組換え普通魚は、カナダ・ブリティッシュコロンビア州、チヘイリス川産のギンザケを用いた。

代謝産物の動態の違いを明らかにするためにはサンプリング時のサイズと年齢を揃える必要があった。そこで3つの試験区を設定した。すなわち、非組換え普通魚(対照, 1歳魚)区、GH 組換え魚(当歳魚)区、および給餌制限組換え魚(1歳魚)区の3区を設けた。さらに日本国内で飼育実験するために非組換えギンザケ当歳魚を宮城県内の養鱒場より購入し、東北大学大学院農学研究科内の飼育施設で飼育した。

以上の実験はカナダ水産海洋省太平洋実験動物委員会(PRACC/DFO)と東北大学の動物実験指針を遵守して行った。

(2) メタボローム解析:

組織を液体窒素中で瞬間凍結後、内部標準物質として Methionine sulfone (MES)ならびに D-Camphol-10-sulfonic acid (CSA)、およびメタノールを添加しホモジナイズした。そこにクロロホルムと蒸留水 (MilliQ 水)を加え攪拌し、遠心分離した。その上層の水-メタノール層を限外ろ過フィルター(分画分子量 5,000 Da)により限外ろ過し、ろ液を遠心濃縮したものを適宜蒸留水で希釈して分析用試料として用いた。

イオン性一次代謝産物は、キャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-TOFMS、アジレント社製)により定法に従い網羅的に分析した。

(3) ミトコンドリア機能の解析:

組織からミトコンドリア画分を調製することなく細かく刻んだ組織を試薬により処理しミトコンドリア機能解析用試料を調製した。それを用い、高感度酸素電極を備えたミトコンドリア呼吸活性測定装置(ウロポロスオキシグラフ、ウロポロスインスツルメンツ社)により基質による酸素消費量を測定しミトコンドリアの機能を評価した。

4. 研究成果

(1) 栄養状態が代謝産物に及ぼす影響

組換え魚と非組換え普通魚の代謝産物についてメタボローム解析したところ、給餌状態ではGH 遺伝子組換え魚の筋肉で解糖系の活性が増大していることが分かった。さらに絶食させると解糖系における変化がより大きくなった。一方、肝臓では、筋肉のような大きな変化は認められなかった。また、給餌制限した組換え魚を制限なしの給餌状態に切り替えても、数週間の給餌期間では代謝産物のレベルはあまり変わらず、飼育開始時より給餌していた組換え魚の代謝状態に簡単にはならないことが分かった。

(2) ミトコンドリア機能に及ぼす GH 遺伝子組換えの影響

即殺後の生体組織より調製した組織片に呼吸鎖複合体と電子伝達系・酸化リン酸化共役の阻害剤を加え、酸素消費速度を連続測定した。その結果、ミトコンドリアの機能が組換え魚では亢進していることが分かった。また、ミトコンドリアの機能に対する組換えの影響は普通筋肉においてのみ認められ、肝臓では組換えによる影響はほとんど認められなかった。すなわち、ミトコンドリアの機能に及ぼす組換えの影響は、組織特異的であることが分かった。

(3) 化学的ストレスの影響

GH 組換え魚では体内で酸化ストレスの発生が認められている。そのメカニズムを解析することは、組換え魚における高成長発現のメカニズムを解明する上で有益な情報となり得る。組換え魚と比較するため非組換え普通魚を用い、養殖現場で汎用される抗生物質の一つオキシテトラサイクリン(OTC)による化学的ストレスの影響を調べた。経口投与された OTC は生体内で酸化還元状態やストレスタンパク質の発現に影響を及ぼしたことから、体内では酸化ストレスを誘発するものと推察される。従って、OTC により体内で誘導される酸化ストレスを一つのモデルとして、組換え魚における酸化ストレスの発生のメカニズムを解明することができると思われる。

(4) 総合考察

一般に肉食性のサケ科魚類では炭水化物の利用能が低いといわれている。しかし、GH 遺伝子の組換えはギンザケの筋肉において高い成長に必要なエネルギーの生産を増大させていると考えられる。そしてエネルギーの産生にはミトコンドリアの機能亢進が一部関わっていると推察される。

今後は代謝経路やミトコンドリアの機能に関わる酵素の活性の変動や成長に關与する遺伝子の発現、酸化ストレスの影響などに

ついてさらに検討することにより GH 組換え魚における高成長のメカニズムの解明とその養殖技術への応用が期待される。

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6件)

1. T. Nakano, H. Shirakawa, G. Yeo, R. H. Devlin, T. Soga: Metabolome profiling of growth hormone transgenic coho salmon by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. T. Komatsu, H.-J. Ceccaldi, Y. Hénocque, P. Prouzet and J. Yoshida (eds), "The sea under human and natural impacts", (Springer Publishing AG, Switzerland), pp. 249-260 (2017)
 2. 中野俊樹 : 魚類におけるストレスとその防御に関する研究(総説), 日水誌, 82, 278-281 (2016) (査読あり)
 3. 中野俊樹 : 水産物などの食品における微生物の検査法について - 微生物の種類と簡易, 迅速な検査法 - (総説). 冷凍(日本冷凍空調学会), 91, 415-421 (2016) (査読あり)
 4. T. Nakano, S. Hayashi, N. Nagamine: Effect of excessive doses of oxytetracycline on stress-related biomarker expression in coho salmon. Environ. Sci. Pollut. Res. (Official J. Eur. Assoc. Chem. Mol. Sci. published by Springer), doi:10.1007/s11356-015-4898-4 (2015) (査読あり)
 5. H. Wu, A. Aoki, T. Arimoto, T. Nakano, H. Ohnuki, M. Murata, H. Ren, H. Endo: Fish stress become visible: A new attempt to use biosensor for real-time monitoring fish stress. *Biosens. Bioelectron.*, **67**: 503-510 (2015) (査読あり)
 6. T. Nakano: Rising to the challenge of reconstructing the coastal fisheries environment following the massive tsunami in Japan: the national 10-year "Tohoku Ecosystem-Associated Marine Sciences (TEAMS)" project. H.-J. Ceccaldi, Y. Hénocque, Y. Koike, T. Komatsu, G. Stora, M.-H. Tusseau-Vuillemin (eds) Marine Productivity (Springer Publishing AG, Switzerland), 63-68 (2015) (査読あり)
- [学会発表](計8件)
1. T. Nakano: Can we use a good stress for

cultured fish? Lorentz Center International Work Shop on Innate Immunity of Crops, Livestock and Fish (The University of Leiden, Leiden, The Netherlands, Sep. 19-23, 2016)

2. 中野俊樹：魚類におけるストレスとその防御に関する研究、日本水産学会 2016 年度春季大会（東京海洋大学品川キャンパス、東京、2016 年 3 月 26 日～30 日）
3. 中野俊樹、長嶺慶美、山口敏康、落合芳博：化学物質がギンザケのストレス関連バイオマーカーに及ぼす影響について、日本水産学会 2016 年度北海道・東北合同支部大会（北海道大学函館キャンパス、函館、2016 年 10 月 22 日～23 日）
4. T. Nakano, H. Shirakawa, T. Yamaguchi, Y. Ochiai, G. Yeo, R. H. Devlin, T. Soga: Quantitative metabolome profiling of growth hormone transgenic coho salmon, 16th Colloque franco-japonais d'Océanographie (Shiogama, Miyagi and Tokyo, Japan, Nov. 17-21, 2015)
5. T. Nakano: Is stress free good for fitness of fish? -Topics of physiology and probiotics in fish -, The 1st International symposium on food and agricultural immunology (Tohoku University, Kawauchi-kita campus, Sendai, Japan, Dec. 12, 2015)
6. T. Nakano, H. Shirakawa, T. Yamaguchi, Y. Ochiai, G. Yeo, R. H. Devlin, T. Soga: Effects of stress on metabolome profiling in growth hormone transgenic and non-transgenic fish, Biochemistry and Molecular Biology (BMB) 2015 (Kobe Convention Center, Kobe, Japan, Dec. 1-4, 2015)
7. 中野俊樹、白川 仁、山口利康、落合芳博、佐藤 実、G. Yeo, R.H. Devlin、曾我朋義：成長ホルモン遺伝子組換えギンザケの代謝産物に及ぼすストレスの影響について、日本水産学会 2015 年度秋季大会（東北大学川内北キャンパス、仙台、2015 年 9 月 22 日～25 日）
8. 中野俊樹、長嶺慶美、林 聡司、山口敏康、佐藤 実：ギンザケの肝機能に及ぼすオキシテトラサイクリンの影響について、日本水産学会 2015 年度春季大会（東京海洋大学品川キャンパス、東京、2015 年 3 月 27 日～31 日）

〔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)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：40206280

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

R. H. デブリン (R. H. DEVLIN)
カナダ水産海洋省国立ウエストバンクーバー研究所・遺伝子工学部門・部長

曾我 朋義 (SOGA TOMOYOSHI)
慶應義塾大学・先端生命科学研究所・教授