

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻
平成 27 年度博士課程進学
氏名: 吉永葉月
指導教員: 潮 秀樹

論文題目 アミノ酸による魚類脂質代謝制御に関する研究

脂質は生体内においてエネルギー源や構成成分として不可欠である一方で、魚類の食品としての品質を決定する重要な因子の一つである。筋肉脂質含量の増減が魚肉のテクスチャーを左右し、脂肪酸は呈味に影響を及ぼすことが知られている。また、魚肉に含まれるドコサヘキサエン酸 (DHA, 22:6n-3) やエイコサペンタエン酸 (EPA, 20:5n-3) などの n-3 系脂肪酸が、健康作用を示すとして近年注目を集めている。魚類における総脂質や脂肪酸の含量は、水温や飼料組成、成熟、生息環境に因って変動するため、脂質量や脂肪酸組成を人為的にコントロールすることが安定した養殖生産に貢献し得る。

魚類は一般的に糖耐性が低く、タンパク質や脂質に依存したエネルギー代謝経路を持つと考えられている。魚類では、インスリンの分泌をグルコースよりもアミノ酸が強く誘導することも、魚類エネルギー代謝におけるアミノ酸の重要性を示している。また、魚類においてもアミノ酸がいくつかのエネルギー代謝に関連したシグナル伝達経路を間接的および直接的に制御することが、先行研究によって示唆されている。アミノ酸の代謝産物が多くのエネルギー代謝に利用されることから、アミノ酸の摂取量が代謝物の増減を引き起こし、他の代謝を制御する可能性もある。このように、魚類においてアミノ酸が重要なエネルギー生産の基質であるとともに、様々な経路でエネルギー代謝を制御する可能性があるが、実際に脂質代謝にアミノ酸の摂取量が及ぼす影響については未だ明らかになっていない。そこで本研究では、魚類においてアミノ酸の摂取が脂質代謝制御に及ぼす影響について検討することを目的とした。

1. アミノ酸欠乏飼料の投与がニジマスの脂質代謝に及ぼす影響

魚類においてアミノ酸の摂取量が脂質代謝に及ぼす影響を検討するために、タンパク質量およびメチオニン、リシンの量が欠乏した飼料の投与試験を行った。タンパク質総量を対照飼料に比べて半分程度に減らした低タンパク質飼料、メチオニンおよびリシンの量のみが要求量を満たさないように設計したメチオニン欠乏飼料およびリシン欠乏飼料を作製し、ニジマス *Oncorhynchus mykiss* への飼料投与試験を行った。大豆タンパク質およびコーングルテンミールのアミノ酸組成は、魚類のアミノ酸要求量と比較するとそれぞれメチオニンおよびリシンが欠乏しているため、これらの植物性飼料原料をメチオニンおよびリシンの欠乏飼料の主なタンパク質源とした。7 日間の試験飼料投与の後、さらに 7 日間対照飼料給餌を行った。未処理、2 日目、4 日目、7 日目、14 日目にそれぞれ 5 個体ずつをサンプリングし、筋肉および肝臓を採取した。得られた組織のトリアシルグリセロール (TAG) 含量および脂質代謝に関連する遺伝子の発現量変動を解析した。全試験区において体重、体長、肥満度において差は認められなかったが、リシン欠乏飼料投与 2 日目に筋肉における有意な TAG 含量の増加が認められた (Dunnett 法、 $p<0.05$)。低タンパク質飼料投与区では、2 日目および再給餌後の 14 日目で肝臓での TAG 含量の増加傾向が見られたが、統計学的に有意差は認められなかった。また、メチオニン飼料投与区においては、再給餌後の 14 日目に筋肉の TAG 含量が有意に減少した。14 日目における脂肪酸合成酵素 (FAS) の遺伝子発現量が減少したことから、脂質合成経路の抑制が関与した可能性があると推察される。

本研究では、低タンパク質飼料およびメチオニン欠乏飼料投与期間での筋肉と肝臓の TAG 含量の有意な変化が認められなかったが、リシン欠乏飼料の投与は筋肉の脂質含量の有意な増加を引き起こした。これらの結果から、アミノ酸による脂質代謝の制御はそれぞれのアミノ酸ごとに異なり、栄養状態や給餌期間などの様々な要因によって影響を受けるものと推察された。

2. リシン欠乏飼料が魚類の脂質代謝に及ぼす影響

リシン欠乏飼料投与が脂質代謝に及ぼす影響を明らかにするために、ニジマスにリシン欠乏飼料を投与し、筋肉および肝臓の脂質成分ならびに脂質代謝関連遺伝子の発現を解析した。リシン欠乏飼料はコーングルテンミールを主なタンパク質源として作製し、脂質源としては魚油および大豆油を用いた。この際、対照飼料における魚粉由来の脂肪酸を考慮し、両飼料の脂肪酸組成がそろるように調整した。4 日間のリシン欠乏飼料の給餌試験を行い、未処理、2 日目および 4 日目に速筋と肝臓を採取した。組織から総脂質を抽出し、総脂質量と TAG 含量の測定、薄層クロマトグラフィーによる脂質クラス解析ならびにガスクロマトグラフィーでの脂肪酸分析を行った。その結果、リシン欠乏飼料投与 4 日目に、筋肉と肝臓の総脂質含量および TAG 含量が有意に増加した (Dunnett 法、 $p<0.05$)。また、筋肉の n-3 系脂肪酸および 22:6n-3 含量が 4 日目に有意に増加し、22:5n-3 や 20:5n-3 含量の増加傾向も認められた。また、肝臓では 14:0 や 16:0、18:0 などの飽和脂肪酸量が増加し、16:1n-7 や 16:1n-9、18:1n-7、18:1n-9、20:1n-9 などの一価不飽和脂肪酸量も増加した。同時に、肝臓における FAS の発現量や、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素、鎖長延長酵素 2 および 5 の発現量が増加した。これらの結果から、リシン欠乏飼料投与時に、肝臓の脂肪酸の新規合成および鎖長延長、不飽和化が亢進される可能性が示唆された。また、これらの

遺伝子発現はステロール調節エレメント結合タンパク質 (SREBP) やペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) などの転写因子によって制御されることから、リシン欠乏飼料投与がこれらの転写因子に作用し、肝臓の脂質含量の増加を引き起こしたと推察された。

さらに、脂肪酸代謝の動態を解析するために、奇数鎖脂肪酸を用いたリシン欠乏飼料投与試験を行った。生体内の脂肪酸はほとんどが偶数鎖脂肪酸であり、通常、魚類体内には食事や腸内微生物に由来する奇数鎖脂肪酸が微量に存在するのみである。奇数鎖脂肪酸は偶数鎖脂肪酸と同様に鎖長延長や不飽和化などの代謝に取り込まれ、各組織に輸送や蓄積がされると考えられており、奇数鎖脂肪酸を飼料に添加し、その代謝物を追跡することで脂肪酸の代謝動態の一端を解明することが可能になると考えられる。そこで、本研究では奇数鎖脂肪酸であるヘプタデカン酸 (17:0) を添加した飼料を用いたリシン欠乏飼料投与試験をゼブラフィッシュ *Danio rerio* で行った。対照飼料 (Control) およびリシン欠乏飼料 (Lys (-))、ならびに 17:0 を添加した対照飼料 (Control + C17) およびリシン欠乏飼料 (Lys (-) + C17) の 4 種の飼料を作製した。5 日間の Control + C17 飼料投与の後、Lys (-) 飼料および Control 飼料を投与したところ、Lys (-) 飼料投与 1 日目に筋肉における 17:0 含量が増加した。この結果から、リシン欠乏飼料投与時には他の組織に蓄積されていた脂質が筋肉に輸送される可能性が示唆された。

3. リシン過剰飼料がニジマスおよびゼブラフィッシュの脂質代謝に及ぼす影響

リシンは、細胞内シグナル伝達や代謝産物であるカルニチンを介して脂質代謝を制御することが予想される。また、リシン摂取量がアルギニンなどの他のアミノ酸取り込みにも影響を及ぼし、アルギニンは魚類においてホルモンの分泌やシグナル伝達を制御する。そのため、リシンの過剰投与は様々な経路を介して脂質代謝を調節する可能性がある。本研究では 魚類脂質代謝に対してリシン過剰飼料が及ぼす影響を検討するため、L-リシン塩酸塩を 15% (Lys (+)) および 20% (Lys (++)) 添加したリシン過剰飼料によるゼブラフィッシュの飼育試験を行った。2 種のリシン過剰飼料および対照飼料によって 6 日間飼育し、未処理時、3 日目、6 日目に筋肉と肝臓組織を採取した。それらの組織の TAG 含量を測定し、遺伝子発現解析を行った。ニジマスにおいても同様に Lys (+) および Lys (++) 飼料を作製し、ゼブラフィッシュと同じスケジュールで飼育試験を行った。ニジマスから筋肉、肝臓および脂肪組織を採取し、TAG 含量の測定と遺伝子発現解析を行った。その結果、ゼブラフィッシュおよびニジマスの両魚種の飼育試験において、対照区に対する体重の有意な差は見られなかった。ゼブラフィッシュのリシン過剰飼料試験では 6 日目の Lys (++) 区で筋肉 TAG 含量が減少する傾向が見られた。ニジマスにおいても同様の傾向が認められ、6 日目の Lys (++) 区の筋肉 TAG 含量が有意に減少した (Dunnett 法、 $p < 0.05$)。その際、ニジマスおよびゼブラフィッシュで Lys (++) 区の 3 日目および 6 日目で筋肉における SREBP や FAS などの脂質合成に関与する遺伝子の発現量の減少傾向が見られた。このことから、リシン過剰時には、アミノ酸によるシグナル伝達が脂質合成に関与する遺伝子発現を制御することによって、筋肉の脂質蓄積に関与し、筋肉 TAG 含量の減少を引き起こしたと考えられる。

本研究で、リシン欠乏飼料の投与によって筋肉中の総脂質量および n-3 系脂肪酸量の増加が認められ、リシン過剰飼料の投与では筋肉の脂質含量が減少した。これらの変化は一週間程度の短期間の飼

料投与で引き起こされたことから、養殖生産の最終段階での脂質量のコントロールを可能にし、魚肉の品質の調整技術としての応用が可能であると考えられる。また、本研究の結果からリシンの摂取量がシグナル伝達を介して魚類の脂質代謝を制御すると推察され、魚類におけるアミノ酸を介した脂質代謝制御機構の存在が強く示唆された。本研究では、特にリシンの欠乏及び過剰に焦点を当てたが、他のアミノ酸やアミノ酸同士のバランスなども脂質代謝をはじめとするエネルギー代謝全体に影響を及ぼすものと考えられる。