

博士論文 (要約)

アミノ酸による魚類脂質代謝制御に関する研究

吉永 葉月

目次

目次	ii
序論	3
謝辞	9
略号一覧	10
第一章　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	14
第二章　リシン欠乏飼料投与による魚類脂質代謝の変化	15
第三章　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	16
総括的考察	17
参考文献	20

序論

脂質は生体内で構成成分としてだけでなく、エネルギーの貯蔵物質としても重要な役割を果たしている。魚体内では経口摂取された脂質が、腸管に分泌された抱合胆汁酸の存在下で乳化され、リパーゼによる分解を受ける。その加水分解産物である遊離脂肪酸やアシルグリセロール類などを含むミセルが、腸管の上皮細胞から吸収される (鹿山, 1978)。吸収された脂質は組織に輸送され、エネルギー源や構成成分として蓄積および利用される。魚類の体内において、脂質は主に筋肉や肝臓、脂肪組織に蓄積し、必要に応じて組織間で輸送される。また、脂質は摂餌に由来するほか、糖やアミノ酸から生体内で合成される経路も存在し、魚類においても酢酸からの脂肪酸の生合成が認められている (Kanazawa et al., 1980)。脂肪酸は、 β 酸化によるアセチル CoA の合成、TCA 回路および電子伝達系を介してエネルギー生産に寄与する。魚類組織の脂質含量は、脂質の合成や消費、異化、他臓器への輸送および他臓器からの取り込みのバランスによって決定される。

炭水化物含量の高い飼料による給餌は養殖魚の成長遅滞や飼料効率の低下を引き起こすことが知られており (示野, 1983)、魚類は経口的に摂取した糖質に対して反応性が低く、グルコース不耐性であると考えられている (Moon, 2001)。飼料へのタンパク質要求量は魚種や食性によって異なり、肉食魚であるニジマス *Oncorhynchus mykiss* とマダイ *Pagrus major* はそれぞれ 40% と 50%、雑食魚であるコイ *Cyprinus carpio* は 38% であるのに対して (Wilson, 1986)、マウス *Mus musculus* やブタ *Sus scrofa domestica* ではそれぞれ 18% と 14% である (Becker et al., 1954; NRC, 1995)。加えて、飼料中のタンパク質要求量が飼料の脂質含量によって影響を受けることが知られており、これは脂質の摂取量の増加に伴ってエネルギー源としてのアミノ酸消費が減少するためであると考えられている。これらのことから、哺乳類に比べて魚類はタンパク質と脂質に大きく依存したエネルギー代謝系を持ち、アミノ酸と脂質の代謝は密接に連携するものと考えられる。

哺乳類と同様に、魚類におけるエネルギー代謝制御の主要因子として、インスリンや成長ホルモンが挙げられる。魚類では、それらのホルモンの分泌にアミノ酸の摂取が強く影響する。Andoh (2007) は、マツカワ *Verasper moseri* に各アミノ酸を投与したところ、アルギニン投与時にインスリンの分泌が強く誘導されたことを報告している。ニジマスにおいてもアルギニンやリシンの摂取がインスリンやグルカゴン、成長ホルモンの分泌に影響を及ぼすことが明らかになっている (Navarro et al., 2002; Plisetskaya et al., 1991; Pohlenz et al., 2013)。また、細胞内シグナル伝達においても target of rapamycin (TOR) や general control nonderepressible 2 (GCN2) などのシグナル伝達関連タンパク質のリン酸化にアミノ酸が影響を及ぼすことが、哺乳類だけでなく、魚類でも示唆されている (Chotechuang et al., 2009; Dai et al., 2013; Wang et al., 2016)。Lansard et al. (2010a) は、ニジマスの肝細胞においてロイシンがインスリン存在下で AKT や S6 のリン酸化を増強し、脂質合成関連遺伝子の発現を制御することを明らかにした。これらのシグナル伝達は各組織における脂質代謝関連遺伝子の発現量や酵素活性などを制御することで、脂質代謝の動態を決定づける。様々な脂質代謝関連遺伝子の発現を制御するステロール調節エレメント結合タンパク質 (sterol regulatory element-binding proteins, SREBPs) や、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (peroxisome proliferator activated receptors, PPARs) といった転写因子が、インスリンシグナル伝達の下流に位置し、脂質代謝の制御に関与することがわかっている。SREBPs には SREBP-1a、-1c および-2 のアイソフォームが生体内に存在し、SREBP-1a および-1c が脂肪酸代謝を制御する (Eberle et al., 2004)。SREBP-1 は脂肪酸合成酵素 (fatty acid synthase, FAS)、アセチル CoA カルボキシラーゼや、ステアロイル CoA デサチュラーゼなどの酵素の転写を制御する。PPARs にはいくつかのアイソフォームが存在し、リポタンパク質リパーゼ (lipoprotein lipase, LPL)、脂肪酸輸送体 (cluster of differentiation 36, CD36)、アシル CoA オキシダーゼや、カルニチンパルミトイル基転移酵素 (carnitine palmitoyltransferase, CPT) などの転写を制御する。アミノ酸の摂取量がこれらの細胞内および細胞間シグナル伝達を介して脂質代謝を制御する可能性がある。

また、魚体内ではエネルギー代謝に関与する様々な誘導体がアミノ酸から合成される (Li et al., 2009)。リシンやメチオニンはカルニチンの生合成に利用される。カルニチンは、ミトコンドリア内への脂肪酸の輸送に必須の物質であり、輸送された脂肪酸は β 酸化により消費される。メチオニンから生合成されるタウリンは、肝臓において胆汁酸の抱合や分泌の際に要求される物質で、タイセイヨウサケにおいてメチオニンの摂取量が肝臓のタウリン含量と線形関係にあることが示されている (Espe et al., 2008)。また、アルギニンが代謝されることによって生じる一酸化窒素 (nitric oxide, NO) はエネルギー代謝を制御する細胞内シグナル伝達に影響を及ぼすことが示唆されている (Sarkar et al., 2011; Tripathi et al., 2013)。

これらのことから、魚類にとってアミノ酸がタンパク質の産生やエネルギー源としてだけでなく、内分泌応答やシグナル伝達などを介してエネルギー代謝に大きく影響を及ぼす物質であると考えられる。先行研究では、ゼブラフィッシュにおいてリシン欠乏飼料投与が筋肉脂質含量の増加を引き起こすことが明らかになっているが (大場, 2014)、魚類においてアミノ酸摂取量が脂質代謝に及ぼす影響に関して十分な知見は得られていない。

魚類筋肉中の脂質量は魚肉の食感に大きく影響する要素であり、脂質含量が高いほど魚肉は柔らかくなる。養殖魚においては、筋肉脂質含量が多くなることがマダイ *Pagrus major* (Hatae et al., 1989) やマアジ *Trachurus japonicus* (Kunisaki et al., 1986) で報告されており、飼育環境の狭さや大量の給餌に起因すると考えられている。また、天然魚では季節によって脂質量が大きく変動する。イワシ *Sardina pilchardus* は6月から10月ごろには15%程度の脂質含量であるが、それ以外の時期には2%程度に低下する (Bandarra et al., 1997)。魚類筋肉の脂質量は、様々な要因に影響を受け、魚類の食品としての品質を左右する。そのため、魚類筋肉の脂質含量の調節技術を確立することは、安定した養殖生産に貢献し得る。

本研究ではサケ科に属する肉食性淡水魚であるニジマス *Oncorhynchus mykiss* と代表的なモデル生物であるコイ科魚種のゼブラフィッシュ *Danio rerio* を用いた。ニジマスの養殖は世界中で盛んに行われており、他のサケマス類の養殖量も増加傾向にある。ニジマスは養殖魚としての研究が

進んでいるだけでなく、これまでの魚類の代謝研究において重要視されてきた魚種の一つであり、本研究においてニジマス进行研究することによって、養殖への応用をより現実的なものにするともに、学術的な知識の蓄積に寄与することが期待される。また、ゼブラフィッシュでは全ゲノム配列が解明されており、遺伝情報が豊富であるとともに、世界的に養殖量の多いコイ科のハクレン *Hypophthalmichthys molitrix*、コクレン *Hypophthalmichthys nobilis* やマゴイ *Cyprinus carpio* などとも近縁であり、研究成果が養殖技術に反映されることが期待される。そのため、ゼブラフィッシュで研究を行うことによって、これまでの代謝研究や遺伝学的なアプローチを用いた研究と関連づけることが可能であるとともに養殖への技術の応用が容易であると考えられる。

そこで本研究は飼料中のアミノ酸量を調節することによって人為的に魚類筋肉の脂質含量を制御する技術を確立するとともに、飼料中のアミノ酸量の変化による魚類脂質代謝制御に関する知見を得ることを目的とした。まず、タンパク質含量の低い飼料と、メチオニンおよびリシンの含量が低い飼料を作製してニジマスでの飼育試験を行った。本研究では実際の魚類養殖における利用を想定し、大豆タンパク質およびコーングルテンミールをタンパク質源として利用することで引き起こされるメチオニン欠乏およびリシン欠乏に着目し、その影響を検討した。その結果、リシン欠乏飼料の投与時に筋肉脂質含量の顕著な増加が認められたため、さらに詳細に検討するためにリシン欠乏時の脂質代謝関連遺伝子発現量および脂質成分の解析を行い、リシン欠乏飼料投与が脂質代謝に及ぼす影響を検討した。また、リシン含量が著しく高い飼料を用いた飼育試験を行い、リシンの過剰摂取が脂質代謝に及ぼす影響についても検討した。本論文では以上の成果を3章にまとめ、4章で総括的考察を行った。成果の概要は以下の通りである。

第一章では、総タンパク質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、ニジマスへの飼料投与試験を行った。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 (triacylglycerol,

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。全試験区で体重、体長、肥満度における差はなかったが、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。また、メチオニン欠乏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。メチオニン欠乏飼料投与区では 14 日目における *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筋肉 TAG 含量の減少に関与した可能性があるかと推察された。

第二章では、リシン欠乏飼料投与が魚類脂質代謝に及ぼす影響を詳細に検討するために、ニジマスにリシン欠乏飼料を投与し、筋肉と肝臓の脂質成分および脂質代謝関連遺伝子の発現を解析した。脂質源としては魚油および大豆油を使用し、対照飼料における魚粉由来の脂肪酸を考慮して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、脂質クラス解析ならびに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。また、筋肉の n-3 系脂肪酸総量および 22:6n-3 含量がリシン欠乏飼料投与 4 日目に有意に増加した。肝臓では飽和脂肪酸総量および一価不飽和脂肪酸総量が増加した。同時に、Day 4 では肝臓における $\Delta 5$ 不飽和化酵素 (*delta 5 desaturase, d5d*) の発現量が有意に増加した。これらの結果から、リシン欠乏飼料投与時には肝臓での脂肪酸の新規合成、鎖長延長および不飽和化が亢進されたことが示唆された。さらに、いくつかの脂質代謝関連遺伝子の発現量に変化が見られたことから、その転写制御に関与する SREBP や PPARs などの転写因子にリシン欠乏飼料投与が作用し、肝臓および筋肉の脂質含量の増加に寄与したと推察された。

続いて奇数鎖脂肪酸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を目的とし、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 含量が増加する傾向を示し、肝臓においては2日目に有意に増加した。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や肝臓に輸送されることが示唆された。

第三章では、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投与試験では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。ニジマスおよびゼブラフィッシュの両魚種で、3日目にLys (++) 区の肝臓と筋肉における*srebp-1* や*fas* などの脂質合成に関与する遺伝子の発現量が減少する傾向が見られた。このことから、リシン過剰時には脂質合成に対して抑制的な機構が働いた可能性があり、それが筋肉TAG 含量の減少に関与したと考えられる。最後に第4章では、これらの結果を総括し、研究の展望について記した。

なお、本論分の一部について既に報文として発表済みである。

Yoshinaga H, Ushio H, Haga Y, Satoh S (2018) Pre-harvest Modulation of N-3 Long-chain Polyunsaturated Fatty Acids in Rainbow Trout Meat for Human Consumption. J Food Process Technol 9: 716.

謝辞

本研究に関して、研究の機会を与えていただき、その遂行にあたって終始ご指導ご鞭撻頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科 潮 秀樹教授に深甚なる謝意を表します。

東京大学大学院農学生命科学研究科 浅川修一教授、木下滋晴准教授には本研究の遂行において様々な便宜を図っていただくとともに、有益なご指導を賜りました。また、東京大学大学院農学生命科学研究科 金子豊二教授、松永茂樹教授にこの論文の細部に渡り、ご指導賜りました。厚く御礼申し上げます。

東京海洋大学 佐藤秀一教授、芳賀 穰准教授には本研究においてご指導いただくとともに、飼育試験のための様々なご協力と便宜を図っていただきました。ここに深く感謝申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科 中谷操子技術専門員には様々なご協力とご助言を賜りました。心より感謝申し上げます。本研究の遂行にあたって、東京大学大学院農学生命科学研究科 水産化学研究室の各位および卒業生の皆様には日頃より実験やデータ解析、考察など様々な点で有益なご助言、ご指導を頂くとともに、常日頃より温かい励ましを賜りました。ここに記して深謝致します。

略号一覧

本論文では以下の略号を用いた。

Ala: alanine

ApoA2: apolipoprotein A II

ApoC2: apolipoprotein C II

Arg: arginine

Asn: asparagine

Asp: aspartic acid

C17: heptadecanoic acid, C17:0

CAT: cationic amino acid transporter

CD36: cluster of differentiation 36

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

Cit: citrulline

CPT1a: carnitine palmitoyltransferase I A

CPT1b: carnitine palmitoyltransferase I B

Cys: cysteine

Cysthi: cystathionin

d5D: delta 5 desaturase

d6D: delta 6 desaturase

d9D: delta 9 desaturase

DHA: docosahexaenoic acid

DPA: docosapentaenoic acid

ECL: equivalent chain length

EF-1a: elongation factor 1 alpha

ELOVL2: fatty acid elongase 2

ELOVL5: fatty acid elongase 5

EPA: eicosapentaenoic acid

FAME: fatty acid methyl ester

FAS: fatty acid synthase

GC-FID: gas chromatography-flame ionization detector

GCN2: general control nonderepressible 2

GH: growth hormone

Gln: glutamine

Glu: glutamic acid

Gly: glycine

HDL: high-density lipoprotein

His: histidine

HPLC: high performance liquid chromatography

HSI: hepatosomatic index

HSL: hormone sensitive lipase

Ile: isoleucine

LDL: low-density lipoprotein

Leu: leucine

LPC: lysophosphatidylcholine

LPL: lipoprotein lipase

Lys: lysine

Met: methionine

MUFA: monounsaturated fatty acid

n-3 LCPUFA: n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid

NL: nonpolar lipid

NO: nitric oxide

Orn: ornithine

PC: phosphatidylcholine

PCR: polymerase chain reaction

PE: phosphatidylethanolamine

Phe: phenylalanine

PI: phosphatidylinositol

PL: polar lipid

PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma

PPARs: peroxisome proliferator-activated receptors

Pro: proline

PS: phosphatidylserine

PUFA: polyunsaturated fatty acid

RNA: ribonucleic acid

RPL8: ribosomal protein L8

Sar: sarcosine

SE: sterol ester

Ser: serine

SFA: saturated fatty acid

SREBP-1: sterol regulatory element-binding protein 1

ST: sterol

TAG: triacylglycerol

Tau: taurine

Thr: threonine

TLC: thin-layer chromatography

TOR: target of rapamycin

Trp: tryptophan

Tyr: tyrosine

Val: valine

VLDL: very low-density lipoprotein

第一章 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

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

第二章 リシン欠乏飼料投与による魚類脂質代謝の変化

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

第三章 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

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

総括的考察

本研究によって、リシン欠乏飼料投与が筋肉中の総脂質量および n-3 系脂肪酸量の増加を引き起こし、リシン過剰飼料投与時には筋肉脂質含量が減少することが明らかになった。これらの変化は短期間の飼料投与によって引き起こされたことから、リシン含量を調節した飼料を短期間投与することによって魚類養殖の最終段階で脂質量をコントロールし、魚肉の品質を調整することが可能であると考えられる。また、先行研究と合わせて、ニジマスおよびゼブラフィッシュの両魚種でリシン欠乏およびリシン過剰飼料投与による筋肉脂質含量の増減が認められたため、幅広い魚種で脂質含量の調整技術として利用できる可能性が示された一方で、魚種間での影響の差異も示唆された。組織脂質含量が魚体内のエネルギー代謝のバランスによって決定されるため、魚種や食性の違いによる代謝効率の違いとともに、他の飼料成分、栄養状態、飼育環境や成熟状態なども同時に脂質含量に影響を及ぼす。そのため、魚種やその他の要因に合わせて飼料の組成や飼育期間などの飼育条件を最適化することが、脂質含量調整技術として実用化するために重要である。

魚類においては、摂餌によって体内に取り込まれたアミノ酸がインスリンの分泌を強く誘導すると考えられる (Andoh, 2007)。インスリン存在下では、体内の脂質分解が抑制されるとともに、肝臓での脂質合成や脂肪細胞における脂肪酸の取り込みが促進され、魚体全体での脂質量や脂肪組織の増加などが引き起こされる。アミノ酸はインスリン分泌やインスリンシグナル伝達下流に存在するシグナル伝達分子に働きかけることによって、体内の同化や異化のバランスを制御すると考えられる。第二章の結果から、リシン欠乏時には肝臓における脂肪酸の *de novo* 合成、不飽和化や鎖長延長が亢進されるとともに、筋肉や肝臓への脂質輸送が起こったことが示唆された。また、遺伝子発現量の変化から、リシン欠乏が何らかのシグナル伝達を介して SREBP や PPARs などの脂質代謝に関連する転写因子を制御することが示唆されるとともに、いくつかの遺伝子発現傾向からリシン欠乏飼料投与時には肝臓や脂肪組織、筋肉において同化が促進されたことが示唆された。以上のことから、リシン欠乏飼料投与時に認められた脂質含量の増加には、魚体内全体での脂質の同化の促進が寄与した可能性がある。それに対して、リシン過剰飼料の投与 3 日目には、筋肉や

肝臓での脂質合成の抑制や脂肪組織からの脂肪酸の動員が起こったと推察された。また、6日目にはリシン過剰飼料投与区で肝臓からの脂質輸送が抑制されたことが推察されたため、リシン過剰時には魚体内全体での脂質合成の抑制と、筋肉への脂質輸送の抑制が筋肉 TAG 含量の減少を引き起こしたと考えられた。また遺伝子発現量の変化から、リシン過剰時にも SREBP などの転写因子がシグナル伝達によって制御され、脂質合成の抑制など魚体内での異化の亢進に寄与したと推察された。

これらの結果から、リシン欠乏および過剰飼料投与がシグナル伝達を介して脂質代謝を制御しており、欠乏時には同化、過剰時には異化の亢進が起こった可能性が示唆された。しかしながら、リシン欠乏時と過剰時の脂質量の増減が単純に同じ機構のみで制御されたとは考えにくい。大場 (2014) は、カルニチンをリシン欠乏飼料に添加することによって、リシン欠乏飼料投与時の筋肉脂質含量の増加が一部抑制されることを報告している。これはリシン欠乏時に引き起こされる脂質量の増加には、カルニチン量の減少に伴う脂肪酸の β 酸化の抑制が寄与する可能性を示唆している。よって本研究においても、肝臓や脂肪組織からの脂質の輸送と同時に、脂肪酸の β 酸化の抑制も脂質量や脂肪酸含量に影響を及ぼした可能性がある。また、リシン過剰飼料投与時には他のアミノ酸の取り込みや代謝に対して、過剰なリシン摂取が影響を及ぼすことが予想され、他のアミノ酸やその代謝物などが脂質代謝に影響を及ぼした可能性がある。

第一章では、リシン欠乏飼料投与区において筋肉脂質含量の増加が認められたが、メチオニン欠乏飼料や低タンパク質飼料区では脂質量の変化が認められなかった。これらの結果はアミノ酸ごとに代謝に及ぼす影響が大きく異なることを示している。本研究によって単一のアミノ酸の欠乏や過剰が魚類の脂質代謝に影響を及ぼすことが示唆されたが、その制御機構については未だ明らかでない。その代謝制御機構として考えられるものの一つが TOR 経路である。本研究においては *srebp-1* の発現量および SREBP-1 下流の *fas* の発現量が減少したことから、TOR を介した脂質代謝の制御が示唆されたが、その上流は不明である。インスリン分泌においてもアミノ酸が重要な誘導因子であり、インスリンは AKTなどを介して TOR のリン酸化に関与する。また、インスリンと

アミノ酸が TOR の活性化に相互作用を持ち、制御していることも示唆されている (Lansard et al., 2010b)。さらに、TOR を介した脂質代謝の制御は、SREBP だけでなく、PPARs などの他の脂質代謝関連の転写因子にも及ぶと考えられている (Laplane and Sabatini, 2009)。したがって、本研究において、リシンの摂取量が TOR シグナル伝達を介してエネルギー代謝全体を制御し、脂質含量の変化を引き起こした可能性がある。

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、特にリシンの欠乏および過剰に焦点を当てたが、他のアミノ酸も脂質代謝をはじめとするエネルギー代謝全体に様々な経路を介して影響を及ぼすものと考えられる。アミノ酸がエネルギー代謝の中枢制御因子として働くことは、ホルモン分泌やシグナル伝達への影響から明らかである。特に魚類においては前述のとおり、アミノ酸がエネルギー代謝の制御に及ぼす影響が哺乳類以上に大きいと予想されるが、その全容は未だ明らかになっていない。よって、リシンの摂取量が魚類体内において細胞内および細胞間シグナル伝達に及ぼす影響をさらに詳しく検討するとともに、各アミノ酸やアミノ酸同士のバランスがエネルギー代謝制御に及ぼす影響について明らかにすることが、魚類におけるアミノ酸の生理機能の解明のために必要であると考えられる。

参考文献

1. Anderson, T.R. (1970). Temperature adaptation and the phospholipids of membranes in goldfish (*Carassius auratus*). *Comp Biochem Physiol* 33, 663-687.
2. Andoh, T. (2007). Amino acids are more important insulinotropins than glucose in a teleost fish, barfin flounder (*Verasper moseri*). *Gen Comp Endocrinol* 151, 308-317.
3. Aoyama, Y., and Ashida, K. (1972). Effect of excess and deficiency of individual essential amino acids in diets on the liver lipid content of growing rats. *J Nutr* 102, 1025-1032.
4. Bandarar, N.M., Batista, I., Nunes, M.L., Empis, J.M., and Christie, W.W. (1997). Seasonal changes in lipid composition of sardine (*Sardina pilchardus*). *J Food Sci* 62, 40-42.
5. Bartlett, G.R. (1959). Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 234, 466-468.
6. Becker, D.E., Ullrey, D.E., and Terrill, S.W. (1954). Protein and amino acid intakes for optimum growth rate in the young pig. *J Animal Sci* 13, 346-356.
7. Bergan-Roller, H.E., Ickstadt, A.T., Kittilson, J.D., and Sheridan, M.A. (2017). Insulin and insulin-like growth factor-1 modulate the lipolytic action of growth hormone by altering signal pathway linkages. *Gen Comp Endocrinol* 248, 40-48.
8. Berge, G.E., Bakke-McKellep, A.M., and Lied, E. (1999). In vitro uptake and interaction between arginine and lysine in the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 179, 181-193.
9. Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.
10. Bo, Y., Zhang, X., Wang, Y., You, J., Cui, H., Zhu, Y., Pang, W., Liu, W., Jiang, Y., and Lu, Q. (2017). The n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation improved the cognitive function in the Chinese elderly with mild cognitive impairment: a double-blind randomized controlled trial. *Nutrients* 9.
11. Bouraoui, L., Cruz-Garcia, L., Gutierrez, J., Capilla, E., and Navarro, I. (2012). Regulation of lipoprotein lipase gene expression by insulin and troglitazone in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) adipocyte cells in culture. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 161, 83-88.
12. Breslow, J.L. (2006). n-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 83, 1477s-1482s.
13. Calabretti, A., Cateni, F., Procida, G., and Favretto, L.G. (2003). Influence of environmental temperature on composition of lipids in edible flesh of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Sci Food Agric* 83, 1493-1498.
14. Carlson, S.E., Colombo, J., Gajewski, B.J., Gustafson, K.M., Mundy, D., Yeast, J., Georgieff, M.K., Markley, L.A., Kerling, E.H., and Shaddy, D.J. (2013). DHA supplementation and pregnancy outcomes. *Am J Clin Nutr* 97, 808-815.

15. Chapman, M.J., Goldstein, S., Mills, G.L., Leger, C., Lagrange, D., and Tylaur, C.E. (1978). Distribution and characterization of the serum lipoproteins and their apoproteins in the rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Biochemistry* 17, 4455-4464.
16. Chotchuang, N., Azzout-Marniche, D., Bos, C., Chaumontet, C., Gausseres, N., Steiler, T., Gaudichon, C., and Tome, D. (2009). mTOR, AMPK, and GCN2 coordinate the adaptation of hepatic energy metabolic pathways in response to protein intake in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E1313-1323.
17. Choudhury, M., Yamada, S., Komatsu, M., Kishimura, H., and Ando, S. (2009). Homologue of mammalian apolipoprotein A-II in non-mammalian vertebrates. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 41, 370-378.
18. Christie, W.W. (1988). Equivalent chain-lengths of methyl ester derivatives of fatty acids on gas chromatography A reappraisal. *J Chromatogr A* 447, 305-314.
19. Craig, P.M., and Moon, T.W. (2013). Methionine restriction affects the phenotypic and transcriptional response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to carbohydrate-enriched diets. *Br J Nutr* 109, 402-412.
20. Dai, W., Panserat, S., Mennigen, J.A., Terrier, F., Dias, K., Seiliez, I., and Skiba-Cassy, S. (2013). Post-prandial regulation of hepatic glucokinase and lipogenesis requires the activation of TORC1 signalling in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 216, 4483-4492.
21. Denstadli, V., Bakke, A.M., Berge, G.M., Kroghdahl, A., Hillestad, M., Holm, H., and Ruyter, B. (2011). Medium-chain and long-chain fatty acids have different postabsorptive fates in Atlantic salmon. *J Nutr* 141, 1618-1628.
22. Dong, X., Tan, P., Cai, Z., Xu, H., Li, J., Ren, W., Xu, H., Zuo, R., Zhou, J., Mai, K., *et al.* (2017). Regulation of FADS2 transcription by SREBP-1 and PPAR- α influences LC-PUFA biosynthesis in fish. *Sci Rep* 7, 40024.
23. Eberle, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferre, P., and Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86, 839-848.
24. Enser, M., Hallett, K., Hewitt, B., Fursey, G.A., and Wood, J.D. (1996). Fatty acid content and composition of english beef, lamb and pork at retail. *Meat Sci* 42, 443-456.
25. Eslick, G.D., Howe, P.R., Smith, C., Priest, R., and Bensoussan, A. (2009). Benefits of fish oil supplementation in hyperlipidemia: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol* 136, 4-16.
26. Espe, M., Andersen, S.M., Holen, E., Ronnestad, I., Veiseth-Kent, E., Zerrahn, J.E., and Aksnes, A. (2014). Methionine deficiency does not increase polyamine turnover through depletion of hepatic S-adenosylmethionine in juvenile Atlantic salmon. *Br J Nutr* 112, 1274-1285.
27. Espe, M., Hevrøy, E.M., Liaset, B., Lemme, A., and El-Mowafi, A. (2008). Methionine intake affect hepatic sulphur metabolism in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 274, 132-141.

28. Espe, M., Rathore, R.M., Du, Z.Y., Liaset, B., and El-Mowafi, A. (2010). Methionine limitation results in increased hepatic FAS activity, higher liver 18:1 to 18:0 fatty acid ratio and hepatic TAG accumulation in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Amino Acids* 39, 449-460.
29. Farkas, T., Csengeri, I., Majoros, F., and Oláh, J. (1978). Metabolism of fatty acids in fish. II. Biosynthesis of fatty acids in relation to diet in the carp, *Cyprinus carpio* Linnaeus 1758. *Aquaculture* 14, 57-65.
30. Fiske, C.H., and Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66, 375-400.
31. Flores, H., Sierralta, W., and Monckeberg, F. (1970). Triglyceride transport in protein-depleted rats. *J Nutr* 100, 375-379.
32. Foretz, M., Guichard, C., Ferré, P., and Foulfelle, F. (1999). Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 12737-12742.
33. Galt, N.J., Froehlich, J.M., Meyer, B.M., Barrows, F.T., and Biga, P.R. (2014). High-fat diet reduces local myostatin-1 paralog expression and alters skeletal muscle lipid content in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol Biochem* 40, 875-886.
34. Gelineau, A., Corraze, G., Boujard, T., Larroquet, L., and Kaushik, S. (2001). Relation between dietary lipid level and voluntary feed intake, growth, nutrient gain, lipid deposition and hepatic lipogenesis in rainbow trout. *Reprod Nutr Dev* 41, 487-503.
35. Goldberg, I.J., Eckel, R.H., and Abumrad, N.A. (2009). Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *J Lipid Res* 50, S86-S90.
36. Gomes, E.F., Rema, P., Gouveia, A., and Teles, A.O. (1995). Replacement of fish meal by plant proteins in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect of the quality of the fishmeal based control diets on digestibility and nutrient balances. *Water Science and Technology* 31, 205-211.
37. Gopakumar, K., and Rajendranathan Nair, M. (1971). Phospholipids of five indian food fishes. *Fishery Technology* 8, 171-173.
38. Greene, D.H., and Selivonchick, D.P. (1987). Lipid metabolism in fish. *Prog Lipid Res* 26, 53-85.
39. Gregory, M.K., Collins, R.O., Tocher, D.R., James, M.J., and Turchini, G.M. (2016). Nutritional regulation of long-chain PUFA biosynthetic genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br J Nutr* 115, 1721-1729.
40. Gregory, M.K., and James, M.J. (2014). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Elovl5 and Elovl2 differ in selectivity for elongation of omega-3 docosapentaenoic acid. *Biochim Biophys Acta* 1841, 1656-1660.

41. Halver, J.E., and Hardy, R.W. (2003). 14 - Nutrient Flow and Retention. In *Fish Nutrition* (Third Edition) (San Diego: Academic Press), pp. 755-770.
42. Hamid, N.K.A., Carmona-Antonanzas, G., Monroig, O., Tocher, D.R., Turchini, G.M., and Donald, J.A. (2016). Isolation and functional characterisation of a *fads2* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with *delta5* desaturase activity. *PLoS One* 11, e0150770.
43. Hatae, K., Lee, K.H., Tsuchiya, T., and Shimada, A. (1989). Textural properties of cultured and wild fish meat. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55, 363-368.
44. Hazel, J.R., and Sellner, P.A. (1979). Fatty acid and sterol synthesis by hepatocytes of thermally acclimated rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Exp Zool* 209, 105-114.
45. Hedrick, M.S., Hillman, S.S., Drewes, R.C., and Withers, P.C. (2013). Lymphatic regulation in nonmammalian vertebrates. *J Appl Physiol* 115, 297-308.
46. Hevia, P., Kari, F.W., Ulman, E.A., and Visek, W.J. (1980). Serum and liver lipids in growing rats fed casein with L-lysine. *J Nutr* 110, 1224-1230.
47. Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109, 1125-1131.
48. Iyoda, J., and Noguchi, S. (1972). Fatty acid composition of various fish oils. *J Home Econ Japan* 23, 452-459.
49. Jones, J.D. (1964). Lysine-arginine antagonism in the chick. *J Nutr* 84, 313-321.
50. Jones, J.D., Wolters, R., and Burnett, P.C. (1966). Lysine-arginine-electrolyte relationships in the rat. *J Nutr* 89, 171-188.
51. Kamalam, B.S., Médale, F., Larroquet, L., Corraze, G., and Panserat, S. (2013). Metabolism and fatty acid profile in fat and lean rainbow trout lines fed with vegetable oil: effect of carbohydrates. *PLoS ONE* 8, e76570.
52. Kanazawa, A., Teshima, S., and Imai, K. (1980). Biosynthesis of fatty acids in *Tilapia zillii* and the puffer fish. *Mem Fac Fish, Kagoshima Univ* 29, 313-318.
53. Kaneko, G., Shirakami, H., Yamada, T., Ide, S., Haga, Y., Satoh, S., and Ushio, H. (2016). Short-term fasting increases skeletal muscle lipid content in association with enhanced mRNA levels of lipoprotein lipase 1 in lean juvenile red seabream (*Pagrus major*). *Aquaculture* 452, 160-168.
54. Katsumata, M. (2011). Promotion of intramuscular fat accumulation in porcine muscle by nutritional regulation. *Anim Sci J* 82, 17-25.
55. Katsumata, M., Kobayashi, S., Matsumoto, M., Tsuneishi, E., and Kaji, Y. (2005). Reduced intake of dietary lysine promotes accumulation of intramuscular fat in the Longissimus dorsi muscles of finishing gilts. *Anim Sci J* 76, 237-244.
56. Kaushik, S.J., and Fauconneau, B. (1984). Effects of lysine administration on plasma arginine and on some nitrogenous catabolites in rainbow trout. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 79, 459-462.

57. Kiessling, K.H., and Kiessling, A. (1993). Selective utilization of fatty acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) red muscle mitochondria. *Can J Zool* 71, 248-251.
58. Kim, J., Lee, K.S., Kwon, D.H., Bong, J.J., Jeong, J.Y., Nam, Y.S., Lee, M.S., Liu, X., and Baik, M. (2014). Severe dietary lysine restriction affects growth and body composition and hepatic gene expression for nitrogen metabolism in growing rats. *J Anim Physiol Anim Nutr* 98, 149-157.
59. Kirchner, S., Kaushik, S., and Panserat, S. (2003). Low protein intake is associated with reduced hepatic gluconeogenic enzyme expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Nutr* 133, 2561-2564.
60. Knipprath, W.G., and Mead, J.F. (1966). Influence of temperature on the fatty acid pattern of mosquitofish (*Gambusia affinis*) and guppies (*Lebistes reticulatus*). *Lipids* 1, 113-117.
61. Kremmyda, L.S., Vlachava, M., Noakes, P.S., Diaper, N.D., Miles, E.A., and Calder, P.C. (2011). Atopy risk in infants and children in relation to early exposure to fish, oily fish, or long-chain omega-3 fatty acids: a systematic review. *Clin Rev Allergy Immunol* 41, 36-66.
62. Kunisaki, N., Takada, K., and Matsuura, H. (1986). On the study of lipid contents, muscle hardness and fatty acid compositions of wild and cultured horse mackerel. *Nippon Suisan Gakkaishi* 52, 333-336.
63. Kupke, I.R., and Zeugner, S. (1978). Quantitative high-performance thin-layer chromatography of lipids in plasma and liver homogenates after direct application of 0.5-microliter samples to the silica-gel layer. *J Chromatogr* 146, 261-271.
64. Lansard, M., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Dias, K., Seiliez, I., and Skiba-Cassy, S. (2010a). L-leucine, L-methionine, and L-lysine are involved in the regulation of intermediary metabolism-related gene expression in rainbow trout hepatocytes. *J Nutr* 141, 75-80.
65. Lansard, M., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Seiliez, I., and Skiba-Cassy, S. (2010b). Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: role of TOR. *Amino Acids* 39, 801-810.
66. Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2009). An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr Biol* 19, R1046-1052.
67. Li, P., Mai, K., Trushenski, J., and Wu, G. (2009). New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids* 37, 43-53.
68. Lin, H., Romsos, D.R., Tack, P.I., and Leveille, G.A. (1977). Effects of fasting and feeding various diets on hepatic lipogenic enzyme activities in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* (Walbaum)). *J Nutr* 107, 1477-1483.
69. Lovern, J.A. (1964). The lipids of marine organisms. *Oceanograph Mar Biol; Annual Review* 2, 169-191.

70. Madani, S., Prost, J., and Belleville, J. (2000). Dietary protein level and origin (casein and highly purified soybean protein) affect hepatic storage, plasma lipid transport, and antioxidative defense status in the rat. *Nutrition* 16, 368-375.
71. Mai, K., Lu, Z., Ai, Q., Duan, Q., Zhang, C., Li, H., Wan, J., and Liufu, Z. (2006). Dietary lysine requirement of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture* 258, 535-542.
72. Matsuzaka, T., Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Yoshikawa, T., Hasty, A.H., Tamura, Y., Osuga, J., Okazaki, H., Iizuka, Y., *et al.* (2002). Dual regulation of mouse Delta (5)- and Delta (6)-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPARalpha. *J Lipid Res* 43, 107-114.
73. McGarry, J.D., and Brown, N.F. (1997). The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 244, 1-14.
74. Meghelli-Bouchenak, M., Boquillon, M., and Belleville, J. (1987). Time course of changes in rat serum apolipoproteins during the consumption of different low protein diets followed by a balanced diet. *J Nutr* 117, 641-649.
75. Miles, E.A., and Calder, P.C. (2017). Can early omega-3 fatty acid exposure reduce risk of childhood allergic disease? *Nutrients* 9.
76. Milner, J.A., and Perkins, E.G. (1978). Liver lipid alterations in rats fed arginine deficient diets. *Lipids* 13, 563-565.
77. Molfino, A., Gioia, G., Rossi Fanelli, F., and Muscaritoli, M. (2014). The role for dietary omega-3 fatty acids supplementation in older adults. *Nutrients* 6, 4058-4073.
78. Moon, T.W. (2001). Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 129, 243-249.
79. National Research Council Subcommittee on Laboratory Animal, N. (1995). 3. Nutrient requirements of the mouse. In *Nutrient Requirements of Laboratory Animals: Fourth Revised Edition, 1995* (Washington (DC): National Academies Press (US) (c) 1995 by the National Academy of Sciences. All rights reserved.).
80. Navarro, I., Rojas, P., Capilla, E., Albalat, A., Castillo, J., Montserrat, N., Codina, M., and Gutiérrez, J. (2002). Insights into insulin and glucagon responses in fish. *Fish Physiol Biochem* 27, 205-216.
81. Norambuena, F., Morais, S., Emery, J.A., and Turchini, G.M. (2015). Arachidonic acid and eicosapentaenoic acid metabolism in juvenile Atlantic salmon as affected by water temperature. *PLoS One* 10, e0143622.
82. Ogino, C. (1980). Requirements of carp and rainbow trout for essential amino acids. *Nippon Suisan Gakkaishi* 46, 171-174.
83. Ohshima, T., Wada, S., and Koizumi, C. (1983). Estimation of possible fatty acid combinations in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine of cod. *Nippon Suisan Gakkaishi* 49, 123-130.

84. Plagnes-Juan, E., Lansard, M., Seiliez, I., Médale, F., Corraze, G., Kaushik, S., Panserat, S., and Skiba-Cassy, S. (2008). Insulin regulates the expression of several metabolism-related genes in the liver and primary hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 211, 2510-2518.
85. Plisetskaya, E.M., Buchelli-Narvaez, L.I., Hardy, R.W., and Dickhoff, W.W. (1991). Effects of injected and dietary arginine on plasma insulin levels and growth of pacific salmon and rainbow trout. *Comp Biochem Phys* 98, 165-170.
86. Pohlenz, C., Buentello, A., Miller, T., Small, B.C., MacKenzie, D.S., and Gatlin, D.M., 3rd (2013). Effects of dietary arginine on endocrine growth factors of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 166, 215-221.
87. Polakof, S., Médale, F., Skiba-Cassy, S., Corraze, G., and Panserat, S. (2010). Molecular regulation of lipid metabolism in liver and muscle of rainbow trout subjected to acute and chronic insulin treatments. *Domest Anim Endocrinol* 39, 26-33.
88. Rasband, W.S. ImageJ; US National Institutes of Health: Bethesda, MD, USA, 1997–2016. Available online: <http://imagej.nih.gov/ij/> (accessed on 11 May 2017).
89. Rathore, R.M., Liaset, B., Hevrøy, E.M., El-Mowafi, A., and Espe, M. (2010). Lysine limitation alters the storage pattern of protein, lipid and glycogen in on-growing Atlantic salmon. *Aquac Res* 41, e751-e759.
90. R Core Team. (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
91. Reinitz, G. (1983). Relative effect of age, diet, and feeding rate on the body composition of young rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 35, 19-27.
92. Rodriguez, C., Henderson, R.J., Porter, A.E., and Dick, J.R. (1997). Modification of odd-chain length unsaturated fatty acids by hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing fish oil or olive oil. *Lipids* 32, 611-619.
93. Rogie, A., and Skinner, E.R. (1981). Some aspects of lipid transport in the rainbow trout. *Biochem Soc Trans* 9, 59.
94. Rummer, J.L., Wang, S., Steffensen, J.F., and Randall, D.J. (2014). Function and control of the fish secondary vascular system, a contrast to mammalian lymphatic systems. *J Exp Biol* 217, 751-757.
95. Ruxton, C.H., Calder, P.C., Reed, S.C., and Simpson, M.J. (2005). The impact of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on human health. *Nutr Res Rev* 18, 113-129.
96. Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., Gómez-Requeni, P., Médale, F., Kaushik, S., and Pérez-Sánchez, J. (2005). Molecular characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) lipoprotein lipase. Transcriptional regulation by season and nutritional condition in skeletal muscle and fat storage tissues. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 142, 224-232.

97. Saito, M., Kobatake, Y., Tagaya, K., Yoshida, T., Yamazaki, H., Nishide, E., and Innami, S. (1985). Fatty acid composition of fish lipid. *Japanese J Nutr Diet* 43, 301-318.
98. Sanchez-Gurmaches, J., Cruz-Garcia, L., Gutierrez, J., and Navarro, I. (2012). Adiponectin effects and gene expression in rainbow trout: an in vivo and in vitro approach. *J Exp Biol* 215, 1373-1383.
99. Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., and Hardy, R.W. (2003). 4-The Lipids. In *Fish Nutrition* (Third Edition), J.E. Halver, and R.W. Hardy, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 181-257.
100. Sarkar, S., Korolchuk, Viktor I., Renna, M., Imarisio, S., Fleming, A., Williams, A., Garcia-Arencibia, M., Rose, C., Luo, S., Underwood, Benjamin R., *et al.* (2011). Complex Inhibitory Effects of Nitric Oxide on Autophagy. *Mol Cell* 43, 19-32.
101. Schlenk, H. (1972). Odd-numbered and new essential fatty acids. *Fed Proc* 31, 1430-&.
102. Seakins, A., and Waterlow, J.C. (1972). Effect of a low-protein diet on the incorporation of amino acids into rat serum lipoproteins. *Biochem J* 129, 793-795.
103. Shen, Y., Lindberg, A., and Olivecrona, G. (2000). Apolipoprotein CII from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is functionally active but structurally very different from mammalian apolipoprotein CII. *Gene* 254, 189-198.
104. Sheridan, M.A. (1988). Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 90, 679-690.
105. Shils, M.E., De Giovanni, R., and Stewart, W.B. (1955). Fatty liver of portal type: effects of choline, methionine, and vitamin B12. *J Nutr* 56, 95-106.
106. Skiba-Cassy, S., Geurden, I., Panserat, S., and Seiliez, I. (2016). Dietary methionine imbalance alters the transcriptional regulation of genes involved in glucose, lipid and amino acid metabolism in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 454, 56-65.
107. Stephens, F.B., Constantin-Teodosiu, D., and Greenhaff, P.L. (2007). New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J Physiol (Lond)* 581, 431-444.
108. Stránský, K., Jursík, T., and Vitek, A. (1997). Standard equivalent chain length values of monoenic and polyenic (methylene interrupted) fatty acids. *J High Resol Chromatogr* 20, 143-158.
109. Sugiura, S., Higashitani, A., and Sasaki, T. (2011). Effects of dietary phosphorus restriction on fillet fat deposition and hepatic lipid metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and crucian carp (*Carassius auratus grandoculis*). *Aquacult Sci* 59, 109-122.
110. Suseno, S.H., Hayati, S., and Izaki, A.F. (2014). Fatty acid composition of some potential fish oil from production centers in Indonesia. *Oriental J Chem* 30, 975-980.
111. Takahashi, K., Hirano, T., Takama, K., and Zama, K. (1982). Molecular species of fish muscle lecithin. *Nippon Suisan Gakkaishi* 48, 1803-1814.

112. Tanphaichitr, V., and Broquist, H.P. (1973). Lysine deficiency in the rat: concomitant impairment in carnitine biosynthesis. *J Nutr* 103, 80-87.
113. Trbovic, D., Vranic, D., Djinovic-Stojanovic, J., Matekalo-Sverak, V., Djordjevic, V., Spiric, D., Babic, J., Petronijevic, R., and Spiric, A. (2012). Fatty acid profile in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as influenced by diet. *Biotech Anim Husbandry* 28, 563-573.
114. Tripathi, D.N., Chowdhury, R., Trudel, L.J., Tee, A.R., Slack, R.S., Walker, C.L., and Wogan, G.N. (2013). Reactive nitrogen species regulate autophagy through ATM-AMPK-TSC2-mediated suppression of mTORC1. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, E2950-2957.
115. Tucker, H.F., and Eckstein, H.C. (1937). The effect of supplementary methionine and cystine on the production of fatty livers by diet. *J Biol Chem* 121, 479-484.
116. Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., and Leunissen, J.A. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 35, W71-74.
117. Usui, S., Hara, Y., Hosaki, S., and Okazaki, M. (2002). A new on-line dual enzymatic method for simultaneous quantification of cholesterol and triglycerides in lipoproteins by HPLC. *J Lipid Res* 43, 805-814.
118. Usydus, Z., Szlinder-Richert, J., Adamczyk, M., and Szatkowska, U. (2011). Marine and farmed fish in the Polish market: comparison of the nutritional value. *Food Chem* 126, 78-84.
119. Wang, C., Harris, W.S., Chung, M., Lichtenstein, A.H., Balk, E.M., Kupelnick, B., Jordan, H.S., and Lau, J. (2006a). n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 84, 5-17.
120. Wang, J., Zhao, S.M., Song, X.L., Pan, H.B., Li, W.Z., Zhang, Y.Y., Gao, S.Z., and Chen, D.W. (2012). Low protein diet up-regulate intramuscular lipogenic gene expression and down-regulate lipolytic gene expression in growth-finishing pigs. *Livest Sci* 148, 119-128.
121. Wang, Y., Botolin, D., Xu, J., Christian, B., Mitchell, E., Jayaprakasam, B., Nair, M.G., Peters, J.M., Busik, J.V., Olson, L.K., *et al.* (2006b). Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J Lipid Res* 47, 2028-2041.
122. Wang, Z., Mai, K., Xu, W., Zhang, Y., Liu, Y., and Ai, Q. (2016). Dietary methionine level influences growth and lipid metabolism via GCN2 pathway in cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 454, 148-156.
123. Weber, P.C., and Sellmayer, A. (1992). Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. *J Nutr Sci Vitaminol* 38, 144-147.
124. Wilson, R.P. (1986). Protein and amino acid requirements of fishes. *Annu Rev Nutr* 6, 225-244.
125. Yamashita, K., and Ashida, K. (1971). Effect of excessive levels of lysine and threonine on the metabolism of these amino acids in rats. *J Nutr* 101, 1607-1613.

126. Yao, K., Yin, Y.L., Chu, W., Liu, Z., Deng, D., Li, T., Huang, R., Zhang, J., Tan, B., Wang, W., *et al.* (2008). Dietary arginine supplementation increases mTOR signaling activity in skeletal muscle of neonatal pigs. *J Nutr* 138, 867-872.
127. Şener, E., and Yıldız, M. (2003). Effect of the different oil on growth performance and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792) juveniles. *Turk J Fish Aquat Sci* 3.
128. 大場萌未 (2014). 魚類の脂質代謝制御に関する研究. 東京大学大学院農学生命科学研究科修士論文.
129. 示野貞夫 (1983). 1. 糖代謝系. 永山文男 (編) 魚類の物質代謝, 恒星社厚生閣, pp. 9-22.
130. 示野貞夫・細川秀毅・竹田正彦・梶山英俊 (1980). 配合飼料のカロリー・タンパク質比がハマチの成長, 飼料効率および体成分に及ぼす影響. *日本水産学会誌* 46, 1083-1087.
131. 竹内俊郎・渡辺武 (1982). コイおよびニジマスの体組成および脂肪酸組成に及ぼす絶食および水温の影響. *日本水産学会誌* 48, 1307-1316.
132. 鹿山光 (1978). 1. 魚類の脂質代謝. 日本水産学会 (編) 養魚と飼料脂質, 日本水産学会編, 恒星社厚生閣, pp. 7-22