

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 26 年度博士課程入学

氏名 Zenith Gaye Almeda Orozco

指導教員名 金子 豊二

論文題目 Nutri-physiological studies on amino acid absorption mechanisms in the intestine of

Mozambique tilapia

(モザンビークティラピア腸管におけるアミノ酸吸収機構に関する栄養生理学的研究)

すべての生物にとって、体外環境から自らの体組織の構成成分となる各種物質を取込むことは、その生存・成長と不可分である。体外から取込まれて生体内で活用される物質は栄養物質と総称される。それらの中でもアミノ酸は、魚類を含むすべての動物の体組織の大部分を構成するタンパク質の構成成分であり、最も重要なものの一つである。タンパク質の構成成分として利用される主要なアミノ酸は 20 種であり、生体内で必要量が合成できるか否かで必須アミノ酸と非必須アミノ酸に大別される。必須アミノ酸は体外から取込むことが必要不可欠だが、非必須アミノ酸についても生合成よりも吸収の方がはるかに効率的である。また真骨魚が生息する水圏環境では、栄養源として利用できる餌生物に糖質を豊富に含有するものがほとんど存在しないため、哺乳類と比べてエネルギー源としてもタンパク質・アミノ酸への依存度が高く、体成長のみならず、種々の代謝作用にもアミノ酸吸収の重要度が高いといえる。アミノ酸類は消化管を有する生物では主にタンパク質の形で摂餌され、消化により短鎖ペプチドおよび遊離アミノ酸まで分解されて、腸で吸収、体内で種々の生理活動に利用される。腸における短鎖ペプチドおよび遊離アミノ酸の吸収は、アミノ酸輸送体分子群を介して行われる。当研究室の先行研究で、モザンビークティラピアにおけるアミノ酸輸送体候補遺伝子群の部分配列の同定が行

われ、92種の候補配列のうち35種の輸送体遺伝子が腸で発現することが示されており、一部のものについては腸管特異的に発現することが明らかになっている。以上のことから、真骨魚においても腸管での栄養吸収にアミノ酸輸送体群が重要な役割を果たすことが強く示唆されている。これまで水産養殖の現場では飼料中のタンパク質含量や質の適正化を図った研究や、植物性タンパク質の利用、遊離アミノ酸の添加等が盛んに行われてきた。しかし、こうした試みは、成長実験等を通して飼料成分が生育に与える直接的な影響を検証したものが多く、魚類において栄養条件と栄養吸収機構との関連について詳細に検討した研究はこれまで行われていない。そこで本博士論文研究ではモザンビークティラピアを用いて、消化管におけるアミノ酸吸収機構に関与すると考えられる輸送体遺伝子群に着目し、腸管各部位での発現分布および変動を解析し、絶食や餌料成分等、栄養条件に対する応答を詳細に検討した。

モザンビークティラピアの腸管はマクロ形態および走行パターンから hepatic loop (HL)、proximal major coil (PMC)、gastric loop (GL)、distal major coil (DMC)、terminal segment (TS)の5部位に分けられる。腸上皮の形態的特徴から HL および PMC は前腸、DMC と TS は後腸にあたり、GL はその移行部に相当する。また今回以下の 35 種のアミノ酸輸送体遺伝子群について研究を行なったが、要旨では腸管特異的な発現を示す *slc15a1a*, *slc6a19a*, *slc6a19b*, *slc7a9*, *slc3a1* に主に着目して述べる。いずれの輸送体の哺乳類におけるホモログも腸管および腎臓で特異的な発現を示し、アミノ酸欠乏症状を引き起こす疾病の原因遺伝子となるものも含まれている。*slc15a1a* は短鎖ペプチド輸送体であり、 H^+ と共にジ・トリペプチドを輸送することが予想される。ペプチドを構成するアミノ酸の組合わせに依らず輸送することが他生物種で示されており、アミノ酸吸収の基盤を担うと考えられている。*slc6a19a* および *slc6a19b* は Na^+ 共輸送型の中性アミノ酸輸送体であることが予想され、ヒトではトリプトファン欠乏症であるハートナップ病の原因遺伝子として知られる。*slc7a9* と *slc3a1* はヘテロダイマーを形成し、塩基性アミノ酸を中性アミノ酸との対向輸送により取込むことが予想され、シスチン尿症の原因遺伝子として知られる。なお 5 種の輸送体遺伝子については当研究室の先行研究において全長配列が同定されており、腸上皮細胞に特異的に発現することも *in situ hybridization* により確認されている。

第1章

まず各種アミノ酸輸送体遺伝子について腸管各部位における発現パターンの解析を行なった結果、*slc15a1a* は HL および PMC で発現が見られ、GL 以降の部位では発現が見られなかった。

また *slc6a19a* が後腸で発現し、前腸で発現が見られなかったのに対して、*slc6a19b* は前腸で高発現し、後腸では発現しないことが示された。*slc7a9* と *slc3a1* は PMC および GL で高発現し、その他の部位でも広範に発現するもの後腸では発現が低い傾向にあるといった共通のパターンを示した。先行研究において後腸ではすべてのアミノ酸濃度が顕著に減少したことから、前腸がアミノ酸吸収の主たる場であることが示唆されており、多くのアミノ酸輸送体が前腸で高発現を示すことと一致した結果であるといえる。また、前腸と後腸の移行部では中性アミノ酸が比較的高い濃度で残存していることも示されており、このことは前腸における *slc7a9* と *slc3a1* の高発現と *slc6a19a* の後腸での高発現と符合すると考えられる。他のアミノ酸輸送体についても前腸で高発現するものと後腸で高発現するものが見られ、アミノ酸吸収機構の特性が前腸と後腸で異なることが示唆された。

次に給餌後のアミノ酸吸収機構の応答について検討するため、給餌直後(0.5-1 時間後)、3、6、12、24 時間後での腸管各部位におけるアミノ酸輸送体遺伝子群の発現変動解析を行なった。その結果、前腸前部(HL)において *slc15a1a* および *slc6a19b* は給餌直後から 12 時間後ではほぼ一定の発現を示したが、内容物が減少した 24 時間後では上昇傾向が見られた。またこれらの遺伝子では給餌前(給餌後 24 時間)と比較して給餌直後で顕著な発現の低下が見られ、摂餌に鋭敏に応答することが示された。また部位によってもその応答が異なることから、内分泌系等による包括的な調節というよりも、腸内栄養環境に応答する局所的調節系により制御されていることが考えられる。

第 2 章

長期間の絶食は生物の栄養吸収機構にも大きな影響を与えることが考えられ、そこから得られる知見は慢性的な栄養欠乏状態への順応を考える上で有用である。そこで 2 週間の絶食実験を行ない、継時的に発現解析を行なった。またその後の再給餌への応答についても検討を行なった。その結果、アミノ酸輸送体の発現変動パターンは顕著な変動が見られなかったものを除いて、絶食開始後から低下するもの、上昇するもの、一過的上昇もしくは低下するものの 3 つに分けられた。腸管特異的発現を示すアミノ酸輸送体遺伝子は絶食 2 週間後には発現が低下傾向を示すものがほとんどだった。*slc15a1a* については一過的上昇を絶食 1-2 日にかけて示した後、4 日目以降は低下に転じた。またその傾向は PMC においてより顕著だった。また再給餌実験の結果、遺伝子発現が低下したものについては、ほとんどのものが再給餌 3 日目までに上昇に転じたが、絶食前を上回るレベルまで回復しなかった。特に再給餌 1 日目においては絶食後と比較して発現が変化しないものが多くみられた。このことはある一定の絶食期間の後には体内の栄養状態を反映して、アミノ

酸吸収機構全体に対する抑制が行われて、その抑制作用は再給餌後も体内の栄養条件が回復するまで継続する可能性が示唆された。

第3章

特定のアミノ酸が欠乏した餌料に対する腸管のアミノ酸輸送機構の長期的応答を検証するため、大豆タンパク濃縮物(SPC)をタンパク源としたメチオニン欠乏餌料を作成し、2週間の飼育実験により、市販餌料との比較を行なった。筋肉中遊離アミノ酸濃度を測定したところ、SPC 餌料群でメチオニン濃度が顕著に低いことが示され、メチオニン欠乏状態に実験魚があったことが確認された。市販餌料と SPC 餌料で 2 週間飼育した後の腸管でのアミノ酸輸送体遺伝子群の発現を検討した結果、SPC 給餌群で *slc7a9-1* および *slc15a1a* が低下傾向を示し、*slc6a19b* が顕著に低下した。また肥満度は両群で顕著な差は見られなかったものの、比肝重値は SPC 群で低く、栄養状態が市販餌料と比較して悪かったことが示唆された。SPC 餌料に対するアミノ酸輸送体発現の応答は絶食状態でみられた変動と類似しており、摂餌の有無に関わらず、長期的な栄養不良状態はアミノ酸輸送体遺伝子の発現抑制を招くことが示唆された。市販餌料と SPC 餌料ではメチオニン含量以外にも多くの差があり、一概にメチオニン欠乏による影響とは結論づけられないため、SPC+メチオニン(SPC+M)餌料を作成し、再度 SPC 餌料との比較実験を行なった。その結果、筋肉中遊離メチオニン濃度は顕著に SPC 群で低いことが確認され、餌料へのメチオニン添加によってメチオニン欠乏状態からは脱却可能であることが示された。しかし、比肝重値および肥満度についてはメチオニン添加による上昇は見られず、体内の栄養状態はメチオニン欠乏以外、非添加群と同様であることが示唆された。アミノ酸輸送体遺伝子群の発現についても両群の間で顕著な差は見られなかった。これらのことから SPC を主原料とする精製餌料の長期摂取によるアミノ酸輸送体遺伝子の発現抑制は、メチオニン添加によっても改善されないことが示された。

本博士論文研究の結果、モザンビークティラピア腸管におけるアミノ酸輸送体遺伝子群の餌料に対する短期的・長期的応答が明らかとなった。また慢性的な栄養欠乏状態においてはアミノ酸輸送体遺伝子群の発現低下が見られ、腸管の栄養吸収能が低下することが示唆された。つまり栄養欠乏餌料を与えることで消化管機能も減退するといった負のスパイラルが生じる可能性を示しており、今後はアミノ酸吸収を含めた消化管機能の活性化機構の検討が必要と考えられる。