



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Validation of insulin-like growth factor-I and its binding proteins as physiological growth indices in salmonid species [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	金子, 信人
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第12857号
Issue Date	2017-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67557
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Nobuto_Kaneko_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）

氏名：金子 信 人

学 位 論 文 題 目

Validation of insulin-like growth factor-I and its binding proteins
as physiological growth indices in salmonid species

(サケ科魚類におけるインスリン様成長因子-I および
その結合蛋白の生理学的な成長指標としての有用性の検討)

サケ属 *Oncorhynchus* は、太平洋に広く分布し、沿岸国において有用な漁業資源として利用されている。本属は河川で孵化後、一定期間を淡水で生活し降海する。本属の海洋生活初期においては、個体の成長に依存した大規模な減耗が起きることが知られている。そのため、成長状態を正確に推定・評価することは非常に重要である。

近年、成長のプロセスに関わる因子を成長の指標として用いる方法が注目されている。そのうち、RNA/DNA 比はいくつかの魚種において個体成長率と相関をもつことが報告され、生化学的な指標として利用されている。また、魚類の成長制御に関わるホルモンであるインスリン様成長因子-I (IGF-I) は、栄養状態の変化に鋭敏に反応し、かつ成長率と高い相関を示すことから、生理学的な指標として期待されている。一方で、各指標の安定性はストレス下で乱れることもわかっている。そのため、これらをより効果的に利用するには、新しい指標を組み合わせることが有効であると考えられる。IGF 結合蛋白 (IGFBP) は IGF-I の活性を制御する蛋白質である。サケ科魚類の血中には3種類の IGFBP が存在し、それぞれ IGFBP-1a、-1b および -2b と同定された。このうち、IGFBP-1a および -1b は絶食やストレス下においてそれぞれ異なる感度で血中に誘導され、かつ成長率と負の相関を示すことから、負の成長指標としての有用性が期待される。しかしながら IGFBP-1b に関しては実験室レベルの研究がいくつかあるのみで、IGFBP-1a に関しては測定系も確立されていない。

シロザケ (*O. keta*) は我が国の重要な漁獲対象である。そのため、北海道では盛んに孵化放流が行われており、また多くの生態学的研究が行われている。しかしながら、生理学のアプローチにより野外のシロザケの成長を評価した例はない。本研究はシロザケをはじめサケ科魚類の成長を定量的に評価することを目的として、上述の成長指標候補の有用性を飼育実験で検証するとともに、野外調査で成長評価を行った。

まず、シロザケにおける RNA/DNA 比および IGF-I の成長指標としての有用性を検証した。シロザケ稚魚を個体標識して 10 日間給餌または絶食を行った。0 および 10 日目に体サイズを測定し、瞬間成長率 (SGR) を求めた。採取した筋肉からは蛍光法により RNA/DNA 比を、血清からは時間分解蛍光免疫測定法 (TR-FIA) により IGF-I 量を測定した。また、野外のシロザケ稚魚の成長を評価するため、北海道網走川流域および沿岸において、本種の降海時期である 5-6 月にかけて稚魚を採集した。採集は河川・河口・港・沿岸で行い、筋肉 RNA/DNA 比および血中 IGF-I 量を測定した。飼育実験の結果、筋肉 RNA/DNA 比お

よび血中 IGF-I 量は 10 日間の絶食で減少し、それぞれ成長率と正の相関を示した。一方で、絶食による減少の度合いや相関の強さは血中 IGF-I 量の方が高かった (RNA/DNA 比 : $r^2=0.26$ 、IGF-I : $r^2=0.90$)。このことから、シロザケ稚魚において血中 IGF-I はより強く成長率を反映していると考えられた。野外調査の結果、筋肉 RNA/DNA 比は地点間で特徴的な変化が見られなかった。血中 IGF-I 量は、調査期間を通して河口で低く、また 6 月においては沿岸で高い傾向にあった。このことから、低成長のシロザケ稚魚は河口に滞留し、高成長の個体は沿岸に移動すると考えられた。

次に、異なる指標を用いてシロザケ稚魚の成長を評価するため、IGFBP-1b に着目して飼育実験ならびに野外調査を行った。飼育実験では新たに再給餌群 (5 日間の絶食後 5 日間の再給餌) を、野外調査では新たに沖合の定点を設け、先述の分析を行った。その結果、血中 IGFBP-1b 量は絶食により増加し、再給餌で減少した。また血中 IGFBP-1b 量は成長率と負の相関を示した ($r^2=0.41-0.62$)。野外調査の結果、血中 IGFBP-1b 量は 5 月において沖合でのみ高く、6 月において河川から沿岸まで徐々に減少した。このことから、シロザケ稚魚は 5 月に成長が悪いまま、6 月に良い成長状態で沖合を離れたと考えられた。

IGFBP-1b により成長を負の側面からも評価できると考えられたため、沿岸のギンザケ (*O. kisutch*) の成長を評価した。調査は過去に IGF-I による成長評価が行われている、カナダ南西岸の Strait of Georgia および Johnstone Strait を含む 11 海域で行った。採集したギンザケ幼魚の IGFBP-1b 量を測定し、IGF-I と組み合わせて評価した。その結果、血中 IGFBP-1b 量は Johnstone Strait で高い値を示した。本海域は基礎生産量が低いことで知られ、ギンザケ幼魚は低栄養状態にあったと考えられる。また、IGFBP-1b は胃充満度および水温と負の相関を示したことから、IGFBP-1b は個体の異化状態を反映していると考えられた。

複数の指標を組み合わせた成長の評価が有効であると考えられたため、さらに新しい指標として IGFBP-1a に着目し、TR-FIA の確立を行った。組換えサケ IGFBP-1a を家兎に免疫し抗血清を得た。また、組換えサケ IGFBP-1a をビオチンで標識し、競合法による TR-FIA の確立を行った。なおシグナルは Avidin-Eu の蛍光を検出した。測定系の感度は、 ED_{50} が 61.5 ng/ml、 ED_{80} および ED_{20} がそれぞれ 18.1 および 226.9 ng/ml となり、検出限界は 9.2 ng/ml となった。アッセイ内およびアッセイ間の変動係数はそれぞれ 5.3 および 8.1%と計算された。また血清に既知濃度の IGFBP-1a を加えたところ、96.3%が回収できた。IGFBP-1b および -2b との交差性はそれぞれ 1.5 および 3.6%であり、サクラマスとニジマスの血清がスタンダードと平行であったことから、サケ科魚類の IGFBP-1a に特異的かつ広く用いられる TR-FIA が確立できた。次に、IGFBP-1a の成長の指標としての有用性を確認した。サクラマス (*O. masou*) 1 年魚を個体標識して 6 週間の給餌または絶食、4 週間の絶食の後 2 週間の再給餌を行った。6 週目における各群の SGR を求め、血中 IGFBP-1a 量を測定したところ、絶食・再給餌で変化せず、成長率と相関を示さなかった。これは IGF-I を用いたりガンドプロッティングの結果と矛盾している。可能性として、血中 IGFBP-1a のフラグメントも認識していることが考えられ、IGF-I と結合能をもつ IGFBP-1a のみを特異的に検出する手法が必要であると考えられた。

本研究は、生理学的アプローチによって野外のシロザケ稚魚の成長ベクトルを評価した初めての研究である。またこれら指標がギンザケをはじめとして他のサケ科魚類にも応用できること、複数の指標を用いることで大きく環境が変化する野外においても正確に成長を評価できることを示唆した。本研究の成果はサケ科魚類の成長に依存した減耗を理解するうえで有用なツールを提供するものである。