

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：34428

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K19290

研究課題名（和文）ディスカス保育因子の特定とその種苗生産への応用

研究課題名（英文）Identificatin of discus nursing facitors and application to fish production

研究代表者

豊原 治彦（Toyohara, Haruhiko）

摂南大学・農学部・教授

研究者番号：90183079

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ディスカスミルクに含まれる哺育因子の特定を目的として、遺伝子発現を網羅的に解析できる次世代シーケンサーを利用したRNAシーケンス解析によりディスカス親魚の粘液中で誘導される遺伝子の探索を行った。その結果、哺育因子の候補として免疫グロブリンを見出し、その仔魚体内での動態から免疫グロブリンがこれまで長年にわたって探し求めていた哺育因子である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、ディスカスの仔魚は免疫グロブリンをディスカスミルクからmRNAの形で摂取し、自身の体内に取り込んだ後にタンパク質に翻訳している可能性が示唆された。仔魚が親魚表皮の粘液をついばんだ後に消化管内で小胞中において翻訳が誘導される分子機構を解明することにより、すでに実用化されている種苗生産現場における健苗育成技術として活用することができるだけでなく、仔魚期の生残率が低く種苗生産の困難なウナギ等の養殖魚の初期飼料への応用に寄与することも期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, in order to identify mammalian growth factors in discus milk, we searched for genes induced in the mucus of discus parent fish by RNA sequencing analysis using a next-generation sequencer that can comprehensively analyze gene expression. As a result, immunoglobulins were found as candidates for mammalian growth factors, and their dynamics in the hatchlings suggested that immunoglobulins may be the mammalian growth factors that have been sought for many years.

研究分野：海洋生物機能学

キーワード：哺育因子 ディスカス ディスカスミルク 免疫グロブリン

1. 研究開始当初の背景

乳腺の起源はアポクリン腺と呼ばれる皮膚の分泌腺とされており、本来の機能は種間のコミュニケーションのためにフェロモン様物質を分泌することにあつたとされている (Nature, 226, 762, 1970)。おそらく魚類においても皮膚から分泌されるフェロモン様物質が群形成や繁殖行動に寄与していると考えられるが、報告者はそれらの物質の一部が栄養成分として仔魚に利用されていると予想した。多くの魚類において、孵化直後の仔魚の行動が親魚の皮膚から分泌されているフェロモン様物質に着目した点が本研究構想に至った背景である。

報告者は長く自分自身でディスカスを飼育し、親魚のペア形成、繁殖、人工孵化の経験があり、本研究も長い間手掛けたいと考えていたテーマであった。しかし、個人の飼育規模レベルでは通年、繰り返し散乱させることは困難であり、バイオアッセイに必要な仔魚の確保が研究を実行するうえの障害となっていた。しかし、ディスカスブリーダーである石橋健次氏の協力が得られることになったため安定した仔魚の確保が困難となり、初めて本研究にチャレンジすることが可能となった。さらに、バイオアッセイで得られた情報をもとに、DMNF の特定のために *in silico* の研究技術に精通する京都大学情報学研究科の前川真吾博士と偶然にゼブラフィッシュのセミナーで議論する機会を得たことが本研究に至ることができた経緯である。

2. 研究の目的

ディスカスミルクに含まれる哺育成分を特定し、脊椎動物の泌乳現象の起源を解明するとともに、仔魚期の減耗低減に利用することを目的とする。仔魚の生残率を指標としたバイオアッセイにより哺育成分を絞り込み、熱耐性、酵素処理耐性、分子量などの情報から成分を予想するとともに、ゼブラフィッシュ仔魚とウナギ仔魚への投与により、魚種を超えた哺育機能の普遍性を検討する。さらにトランスクリプトーム解析、メタボローム解析、プロテオーム解析、トラフグ・メダカ・ゼブラフィッシュなどのゲノムデータベース解析などにより哺育成分を特定し、その構造・機能解析ならびに発現解析を行うことで、有効成分の作用機構を解明する。本研究の結果から、ウナギなど種苗生産が困難な魚種の仔魚期の減耗率の低減が期待される。

3. 研究の方法

2017年度は、哺育期の親魚(雄)から孵化後1日目の仔魚を別の3つ水槽に移し(各10~20尾)哺育期の親魚の飼育水(試験区)、同系統の非哺育期のディスカスの飼育水(対照区)及びディスカスを飼育していない水(プランク区)の3区について1週間後の生残数を調べた。

2018年度は、前年度に引き続き哺育因子の生化学的特定を進めるとともに哺育因子の機能が魚種を越えて広く保存されているのかを明らかにする目的で、ゼブラフィッシュ仔魚に対する哺育機能を上記と同じ方法で検討した。ゼブラフィッシュ仔魚は京都大学農学研究科で飼育中のものを用いた。哺育因子のアミノ酸配列及び塩基配列の情報ならびに質量分析の結果をもとに既知の泌乳成分等との構造比較を行い、特に免疫機能、細胞増殖機能、生体防御機能関連物質等との類似性を調べた。

2019年度以降は、抗体を用いた免疫組織化学、RNAプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションなどの組織学的手法、及びRT-PCRやウエスタンブロット分析などの生化学的手法を用いて、DMNFの発現解析を行った。

4. 研究成果

ディスカス成魚組織の *in situ hybridization* 解析により免疫グロブリン mRNA の発現を調べた結果、哺育期成魚の表皮において非哺育期成魚の表皮では見られない散在性のシグナルが多数観察された。この結果は、RNAシーケンスで得られた哺育期の成魚の皮膚において免疫グロブリンの mRNA の発現が誘導されたという結果を裏付けるものであった。発現誘導された mRNA は表皮内に散在的に発現していたことから、何らかの顆粒内において特異的に発現している可能性が示唆された。次に、免疫グロブリンのタンパク質レベルでの発現を確認するために、免疫組織学的ならびに生化学的分析を行った。哺育期と非哺育期の成魚の皮膚における免疫グロブリンの発現を比較したところ、意外なことに免疫染色によってもウエスタンブロットディスカス成魚組織の *in situ hybridization* 解析により免疫グロブリン mRNA の発現を調べた結果、哺育期成魚の表皮において非哺育期成魚の表皮では見られない散在性のシグナルが多数観察された。この結果は、RNAシーケンスで得られた哺育期の成魚の皮膚において免疫グロブリンの mRNA の発現が誘導されたという結果を裏付けるものであった。発現誘導された mRNA は表皮内に散在的に発現していたことから、何らかの顆粒内において特異的に発現している可能性が示唆された。次に、免疫グロブリンのタンパク質レベルでの発現を確認するために、免疫組織学的ならびに生化学的分析を行った。哺育期と非哺育期の成魚の皮膚における免疫グロブリンの発現を比較したところ、意外なことに免疫染色によってもウエスタンブロットによっても免疫グロブリンのタンパク質

レベルの発現に差は見られなかった。

トラフグやカサゴを始めとする数種類の硬骨魚類の仔魚は消化管でタンパク質を直接消化せずに、飲作用により高分子の状態で体内に取り込むことが報告されている。また、孵化後2日のサヨリ仔魚は後部腸管で飲作用により物質を取り込むことが明らかにされている。そこでディスカス仔魚の消化管内における免疫グロブリンタンパク質の取り込みを調べた結果、ディスカスマルクのみを摂取して成育した孵化後3~5日の仔魚の消化管内において、免疫グロブリンタンパク質を含む顆粒が観察された。この顆粒については親魚由来(ディスカスマルク由来)か、あるいは仔魚由来のものである二つの可能性考えられたが、ディスカスと同じシクリッド科に属するカワスズメ *Oreochromis mossambicus* については仔魚前期は親魚由来の免疫グロブリンに依存しており仔魚自身の免疫機能はまだ機能していないことが報告されていることから、本実験で確認されたディスカス仔魚の消化管内の免疫グロブリンは親魚由来のものである可能性が示唆された。また、ゼブラフィッシュを用いた研究においても仔魚期の獲得免疫機能は未熟であり、仔魚由来の適応免疫系が機能するには4~6週間かかると報告されている。これらのことから、本実験での仔魚の消化管内で検出された免疫グロブリンは仔魚自身の免疫システム由来ではなく、親魚由来つまりディスカスマルク由来の可能性が高いと考えられ、卵黄吸収前の仔魚前期においては、親から受け取った免疫グロブリンを用いて自身の免疫能力を向上させている可能性が示唆された。

哺育期の親魚の皮膚において免疫グロブリンの mRNA が検出されたにもかかわらず親魚の皮膚においてそのタンパク質の明瞭な増加を検出することはできなかった。しかし、ディスカスマルクを摂取した孵化後3~5日の仔魚の消化管内において、免疫グロブリンタンパク質を含む顆粒が検出された。この結果は、仔魚は免疫グロブリンをディスカスマルクから mRNA の形で摂取し、自身の体内に取り込んだ後にタンパク質に翻訳している可能性を示唆するものであった。

次に免疫グロブリンが哺育因子として機能している可能性を検討するために、ディスカスマルク摂取期間の長短により仔魚の体内の免疫グロブリンの発現や仔魚の体サイズに差が認められるのかを調べた。ディスカスマルクを1週間及び3週間摂取した仔魚の比較を行った結果、孵化後90日までにおいてディスカスマルクを1週間しか摂取していない仔魚はすべて死亡した。ディスカスマルクを3週間摂取した仔魚の鰓においては免疫グロブリンの発現量が有意に上昇していたことから、仔魚はディスカスマルク摂取によって免疫グロブリンを取り込み、生残率を上昇させている可能性が示唆された。これは、孵化後すぐに親魚と分離して飼育された仔魚は一週間以内に全滅したという先行研究を支持する結果であった。これらのことから、ディスカスマルク中の真の哺育因子のひとつが免疫グロブリンである可能性が高いことが示唆された。しかし、孵化後3週間の仔魚に関してはすでに免疫システムができあがっていることから仔魚自身で免疫グロブリンを産生することが可能である。そのため、ディスカスマルクに含まれる何らかの栄養成分により仔魚自身の栄養状態が良くなり、免疫グロブリン産生が活発になったという可能性も排除できない。本研究の結果から、ディスカスの仔魚は親魚のディスカスマルクを介して免疫グロブリンの mRNA を受け取り、仔魚消化管内においてそれを翻訳し自身の免疫に役立っているという可能性が示唆された。この機構は、哺乳類の母乳による子どもへの受動免疫機構とプロラクチンで誘導されるという点において類似している。抗体を合成する能力がないヒトの新生児は母体から初乳を通じて IgA を経口的に受動免疫として受けることが知られている。また、母乳中にはエクソソームと呼ばれる細胞外小胞が存在することが知られており、エクソソームの中に含まれる miRNA が乳児の T 細胞や B 細胞を活性化させて免疫機能を高める作用があるということが分かっている。本研究において *in situ hybridization* によりディスカス親魚の表皮中に確認された免疫グロブリン mRNA のシグナルも顆粒中に含まれている可能性が示唆されていたことから、ディスカス表皮の免疫グロブリン mRNA もエクソソーム様の小胞の中に存在し、仔魚の免疫機能活性に役立てられているのではないかと推察される。現在ではエクソソームは母乳の成分としてだけではなく細胞間の情報伝達に重要な役割を果たすことが知られており、がんの転移や炎症反応など種々の生体内イベントにおいてエクソソームを介した細胞間の情報伝達を果たす役割に注目が集まっている。

魚類のエクソソームについてはこれまで報告がないことから、哺乳類のエクソソーム検出に用いられる抗体を用いて、哺育期のディスカス表皮粘液におけるエクソソームの検出を試みた。その結果、古典的エクソソームの認識抗体では検出することはできなかった。しかし最近では、古典的エクソソームに属さない多様な細胞外小胞の存在が報告されており、ディスカス表皮粘液の顆粒についてこれらの認識抗体を用いてそれらに分類されるのかどうかを調べる必要がある。ディスカスマルクは仔魚に親魚由来の免疫機能を付与する機能を有すること、また母乳と同様にプロラクチンにより分泌誘導されることから、ディスカスマルクが脊椎動物の乳の原型である可能性が考えられる。しかし、単なる収斂進化の可能性もあり、泌乳機構の出現の起源とその進化過程を明らかにするためには、今後、哺育行動を行うシクリッド科のマウスブルーダーにおける粘膜分泌性の免疫グロブリンの分布と哺育の関係性を調べる必要がある。さらには、哺乳類は両生類から爬虫類を経ることなく出現したと考えられることから、両生類、特に子育て過程における同様の因子の分布と哺育の関係性について分子進化学的な観点から調べる必要があると考える。本研究の結果、ディスカスの仔

魚は免疫グロブリンをディスカスマルクから mRNA の形で摂取し、自身の体内に取り込んだ後にタンパク質に翻訳している可能性が示唆された。仔魚が親魚表皮の粘液をついばんだ後に消化管内で小胞中において翻訳が誘導される分子機構を解明することにより、すでに実用化されている種苗生産現場における健苗育成技術として活用することができるだけでなく、仔魚期の生残率が低く種苗生産の困難なウナギ等の養殖魚の初期飼料への応用に寄与することも期待される。

近年、魚類の粘液における生体防御に特化した新しい免疫グロブリンのアイソタイプである IgT がニジマスで発見された。IgT はディスカスの近縁種であるティラピア (*Oreochromis niloticus*) でもその存在は確認されており、魚類の皮膚における生体防御において重要な役割を果たしていることが示唆されている。IgT は、IgA とは進化系統的には全く異なるものの、皮膚粘膜において哺乳類の IgA と同様の働きをすることが知られていることから、IgT もディスカスマルクの重要成分である可能性が考えられる。本実験ではディスカスの IgM の定常部位の mRNA に対するプローブを用いたため IgT を検出することはできなかった。今後、哺育期の成魚表皮や仔魚体内での IgT の発現を確認することも、ディスカスの受動免疫機構を考える上で重要と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐橋 菜太・豊原 治彦
2. 発表標題 ディスクス粘液中の哺育因子の探索
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	前川 真吾 (Maegawa Shingo) (30467401)	京都大学・情報学研究科・助教 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------