

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06190

研究課題名(和文)メタボローム解析による養殖魚の卵質評価に有効なバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Biomarker exploration for evaluating egg quality of farmed fish by metabolome analysis

研究代表者

長野 直樹 (Nagano, Naoki)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：50437943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、飼育実験による卵質評価手法と生体内に存在する代謝産物の網羅的解析の組み合わせから、卵質を評価するために有効なバイオマーカー候補を探索することを目的とした。異なる飼料で養成したマサバ親魚から受精卵を採取し、ふ化率を比較した。また親魚の血清等から脂溶性および水溶性成分を抽出し、血清中の代謝産物の探索を行った。最終的に、複数のサンプル間で代謝物リストの比較を行い、サンプル間で大きく差異が認められる化合物の特定を試みた。採卵試験の結果、飼料の脂肪酸組成により受精卵のふ化率が異なった。代謝物について代謝経路のエンリッチメント解析を行ったところ、脂肪酸代謝系に違いがみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マサバの親魚に給餌した飼料の脂肪酸組成および体内における脂肪酸代謝経路が受精卵の卵質に影響を及ぼすことが示唆された。マサバの卵質の評価方法は確立されておらず、本研究で行った卵質に影響を及ぼす因子の特定は、良質な受精卵を安定的に採取するための基礎知見となり、養殖用種苗の生産効率の向上に大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to search for effective biomarker candidates for evaluating egg quality by combining egg quality evaluation methods by breeding experiments and comprehensive analysis of metabolites existing in vivo. Fertilized eggs were collected from chub mackerel raised on different diets, and the hatching rates of fertilized eggs were compared. Fat-soluble and water-soluble components were extracted from the serum of the chub mackerel, and metabolites in the serum were searched. Finally, metabolite lists were compared between multiple samples and attempted to identify compounds that showed significant differences between the samples. As a result, the hatching rates of fertilized eggs differed depending on the fatty acid composition of the diet. Enrichment analysis of metabolic pathways of metabolites revealed differences in fatty acid metabolism.

研究分野：水産学

キーワード：養殖 種苗生産 卵質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

動物性タンパク源としての水産物に対する需要が世界的に年々増加する中、養殖による魚類の安定生産が食糧生産に果たす役割は大きい。魚類養殖に用いる種苗(稚魚)は、天然種苗と人工種苗に大別されるが、稚魚の生産が困難で天然資源への依存度が高いウナギ等の魚種を除くと、種苗生産は親魚から卵を採って人工孵化させた種苗を育成する方式に移行している。また、現時点で天然種苗の資源量に余裕がみられる種類についても、天然資源の不安定さから人工種苗の導入率が増えている。さらに、人工種苗を親魚に養成し、その親から採卵・種苗生産を繰り返す完全養殖も主流になりつつある。しかし、マダイ、トラフグ、ヒラメ以外の人工種苗生産の歴史が浅い魚種では、安定した生産技術は確立されておらず、この要因の一つとして、受精卵の数的・質的な問題があげられる。卵質の良し悪しはふ化した仔魚の生残および成長に大きく影響することから、良質な受精卵の安定確保は養殖分野における重要課題の一つである。

卵質には様々な要因が影響を及ぼすことが知られているが、その一つとして、雌親魚の栄養状態(餌の栄養)が挙げられる。ふ化後の仔魚は成長に必要な栄養を卵成分に依存するので、卵の栄養成分組成は卵質に大きな影響を及ぼす。卵質に影響を与える栄養成分として脂肪酸、アミノ酸、ビタミン類が多く魚種で報告されているが、いずれの化合物も現在の種苗生産現場では卵質評価の指標とされていない。このことから卵質の評価にどの生物学的方法が最適なのかを再検討するとともに、最先端の生化学的手法を用いて卵質評価の新基準となる化合物(バイオマーカー)を網羅的に探索することに本研究の意義がある。

### 2. 研究の目的

本研究は近年特に市場価値が高まり、西日本を中心に養殖生産量が急速に増加しているマサバを材料として、メタボローム解析による卵質評価に有効なバイオマーカーの探索を目指す。メタボローム解析とはガスクロマトグラフ-質量分析装置(GC-MS)や高速液体クロマトグラフ-質量分析装置(LC-MS)を用いて、細胞内に含まれる糖、アミノ酸、有機酸、および脂肪酸などの低分子代謝産物(メタボローム)を包括的かつ網羅的に解析する手法である。これら代謝産物は遺伝子やタンパク質に比べて種類が少なく、表現型に直結した影響を与えることから近年この分野の注目度は高く、医療分野においては代謝経路の解明などの基礎研究に加え、疾患の診断するためのバイオマーカーの発見にも実用化されている。また、農業分野ではイネやお茶などの農産物の品質にかかわる低分子化合物の発見に応用されているが、水産分野での研究は緒についたばかりである。

現在、種苗生産現場における卵質の評価には、ふ化率やふ化後の無給餌生残指数等の生物学的手法が用いられている。従来の生物学的手法に加え、生体内に存在する代謝産物を網羅的に解析可能なメタボローム解析により卵質の評価をより正確なものにすることを目的とする。このことは安定的・効率的な人工種苗の生産技術を必要とする生産現場の課題解決に直結する。

### 3. 研究の方法

従来から行われてきた飼育実験による卵質評価手法(生物学的手法)と生体内に存在する代謝産物のメタボローム解析(生化学的手法)の組み合わせから卵質評価に有望なバイオマーカー候補を探索し、卵質に影響を及ぼす要因を総合評価する。

マサバ親魚は異なる脂肪酸組成に調整した配合飼料で3か月間飼育した。その後、受精卵はホルモン投与により排卵を促した後、人工授精により得た。得られた受精卵の卵質評価は、ふ化率から判断した。メタボローム解析に用いるサンプルはマサバ親魚の血清から得られた。血清から水溶性と脂溶性の代謝物を抽出し、LC-MS/MSにより分析した。その後LC-MS/MSのクロマトグラムから、化合物の同定を行い、サンプル間の代謝物の比較を行った。

### 4. 研究成果

採卵試験の結果から、魚粉を主原料とした飼料を給餌したコントロール群(G1)よりも飼料に $\gamma$ -リノレン酸を多く含む飼料を給餌した実験群(G2)において、受精卵のふ化率が高い傾向がみられた。

血清のサンプルにおいてLC-MS/MSのクロマトグラムから、総計5021種の化合物が検出され、そのうちの1595種の代謝物が同定された(図1)。これらの代謝物の多くはKEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)データベースにおいて、脂質代謝系およびアミノ酸代謝系に関連付けられていた(図2)。

魚粉を主原料とした飼料をコントロール群(G1)、飼料に $\gamma$ -リノレン酸を多く含む実験群(G2)として主成分分析を行ったところ、各群の分布に違いがみられ(図3)、コントロール群と実験群に含まれる代謝物の性質が異なることが示唆された。有意に差がある代謝物についてKEGGデータベースを基として、代謝経路のエンリッチメント解析を行ったところ、大幅に変化した代謝経路が確認された。図4および図5にp値が最も小さい10の代謝経路をしめす。それぞれの代謝経路に割り当てられた代謝物のうち、リノール酸代謝系では4つの代謝物( $\gamma$ -linolenic

acid;9-oxo-10(e),12(e)-octadecadienoic acid;Linoleic acid;(-)-pinellic acid) -リノレン酸代謝系では3つの代謝物(12-oxo phytodienoic acid;13(s)-hotre;13(s)-hpotre) 脂肪酸合成系では2つの代謝物(Gamma-linolenic acid;Linoleic acid) Arginine、proline 代謝系では2つの代謝物(4-acetamidobutanoate;4-guanidinobutyric acid)で有意差がみられた(図4)。これらの代謝物はG2群において発現傾向が上昇することが示された(図5)。飼育実験とメタボローム解析の結果から、飼料由来の -リノレン酸が卵質に影響を及ぼしたと推測された。

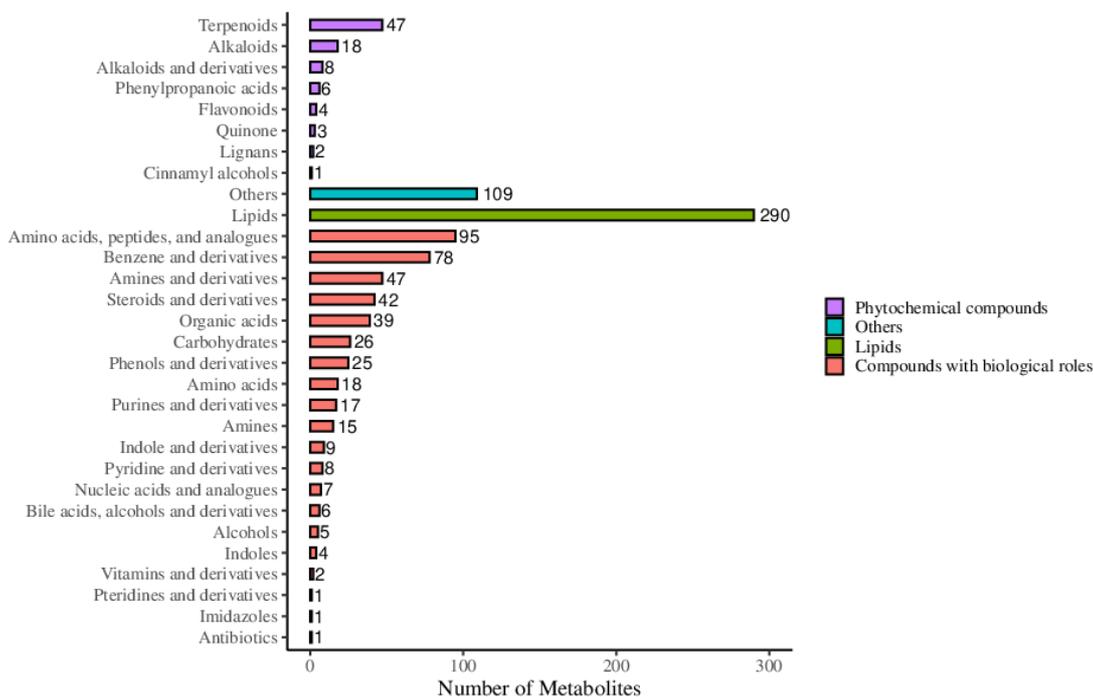


図1：各分類群に属する同定された代謝物の数

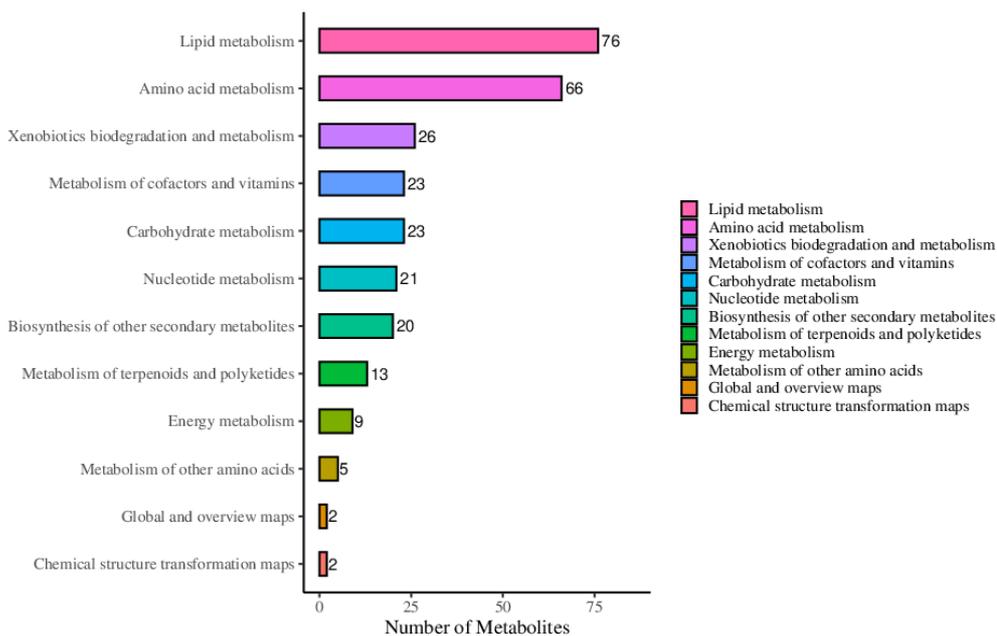


図2：各代謝系に属する代謝物の数

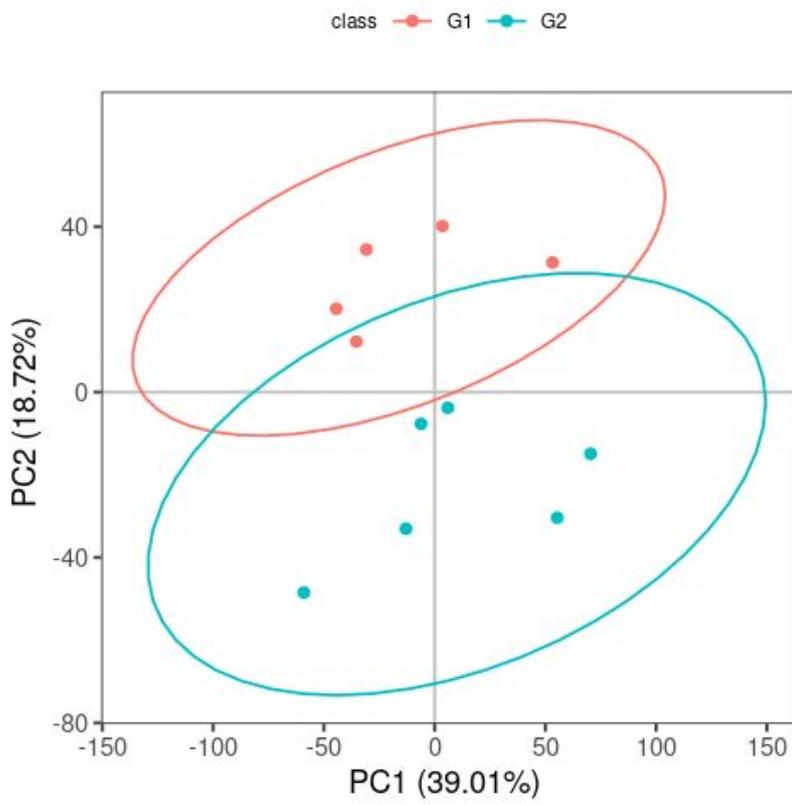


図 3 : PCA 分析による試験区間の比較

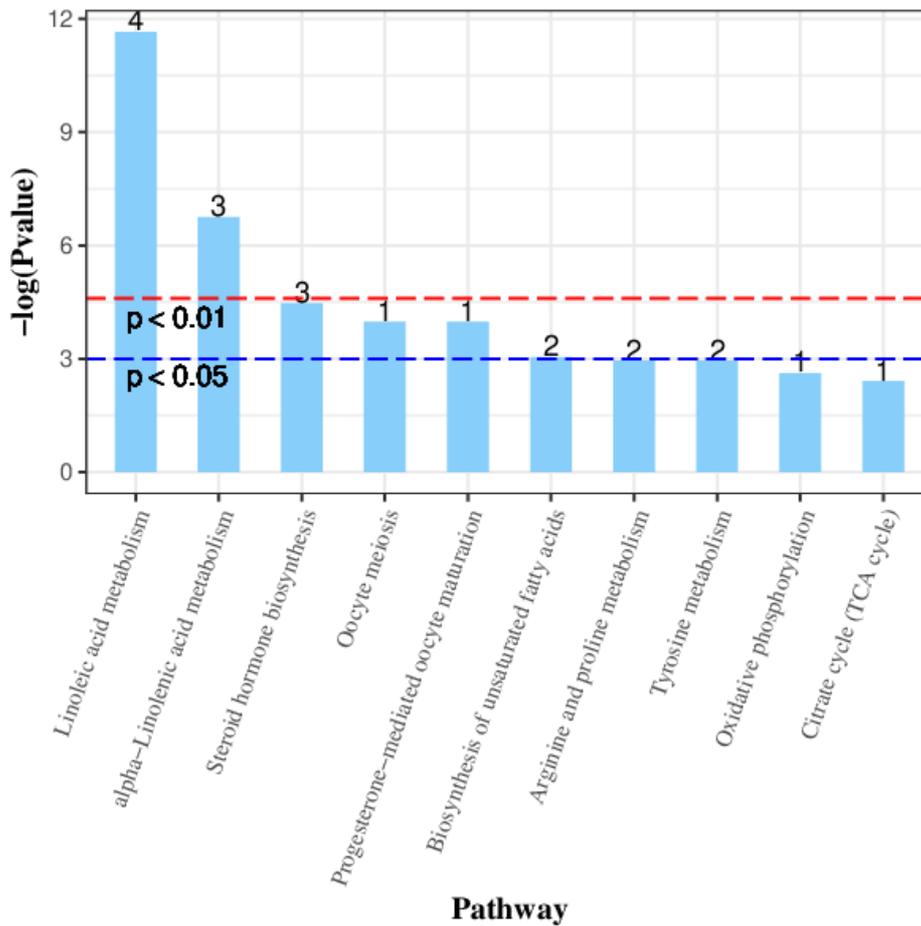


図 4 : 試験区間で差異の見られた代謝経路のエンリッチメント解析。棒グラフ上の数字は代謝物の数をしめす。

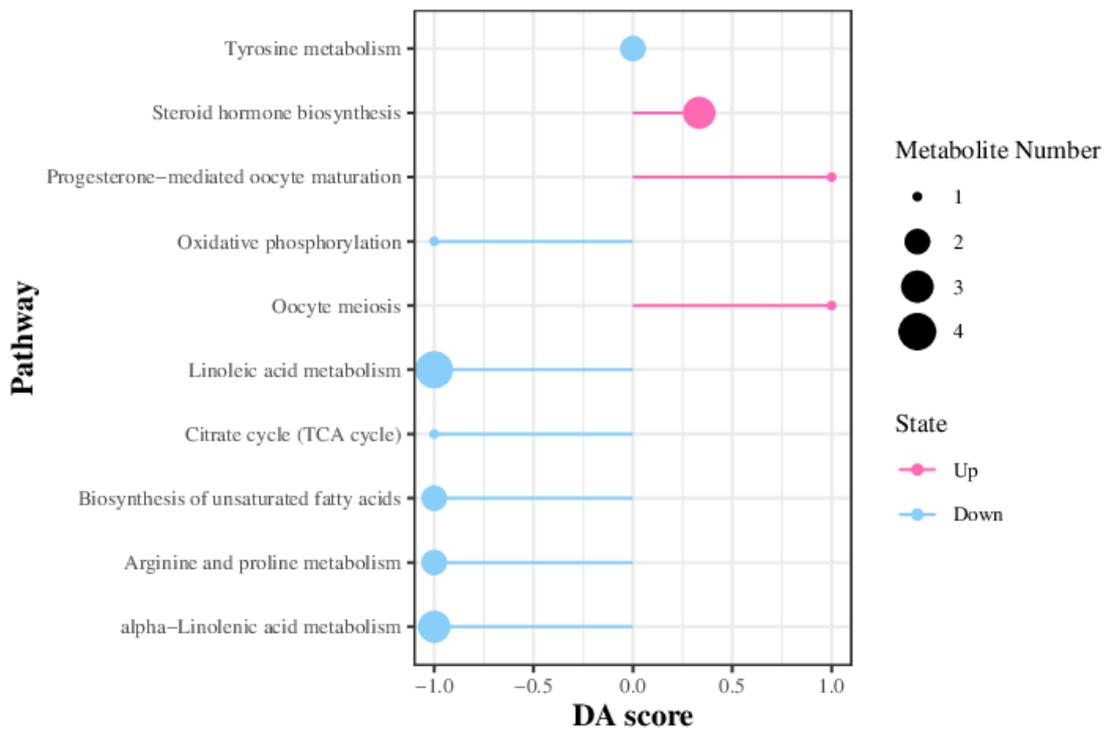


図 5 : 試験区間で差異の見られた代謝経路のエンリッチメント解析。Differential Abundance スコア(DA スコア)が 1 の場合、パスウェイ内の代謝物質の発現傾向が上昇することを示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------