

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19217

研究課題名（和文）魚類の黄色の発色メカニズムをニシキゴイから探る

研究課題名（英文）Investigating the mechanism of yellow coloration in the koi carp

研究代表者

水澤 寛太（Mizusawa, Kanta）

北里大学・海洋生命科学部・教授

研究者番号：70458743

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、赤模様をもつ紅白と黄色模様をもつ黄白という2種類のニシキゴイに着目し、これらの品種における赤・黄色系の色素と、色素の代謝・生合成に関わる遺伝子を調べた。その結果、黄白は餌に多く含まれる黄色系のカロテノイドであるゼアキサンチンをそのまま皮膚に蓄積するが、紅白は吸収したゼアキサンチンを赤色のアスタキサンチンに代謝し、そのエステル体を皮膚に蓄積することが示唆された。本研究ではさらに、別の赤・黄色系色素であるプテリジンを魚類の皮膚から抽出し分析する方法を決定した。また、各品種のニシキゴイの皮膚に発現する遺伝子を比較し、カロテノイド代謝とプテリジン生合成に関わる遺伝子の候補を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ニシキゴイの体内におけるカロテノイドの代謝・蓄積メカニズムに基づいた、新たな色揚げ飼料の開発の基盤となる知見が得られた。また、ニシキゴイの皮膚に含まれるプテリジンを分析することにより、今後、色揚げ餌によらない赤・黄色系の色揚げ技術が生まれることが期待される。また、カロテノイド代謝とプテリジン生合成に関わる遺伝子の発現に関わる環境要因や品種間の遺伝子の違いを解明することによって、体色への影響を考慮した飼育環境の改善や、遺伝子判別に基づいた新たな選抜育種法の開発が進むことが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study focused on two varieties of koi carp: the red-patterned Kohaku and the yellow-patterned Kijiro. It investigated the red and yellow pigment components in these varieties and the genes involved in the metabolism and biosynthesis of the pigments. As a result, it was found that Kijiro accumulates zeaxanthin, a yellow-colored carotenoid abundant in their diet, directly in their skin. In contrast, Kohaku converts zeaxanthin to astaxanthin, a red-type carotenoid that accumulates the ester forms of astaxanthin in their skin. A method was also determined for extracting and analyzing pteridine, a red/yellow pigment different from carotenoids, from fish skin. Furthermore, by comparing genes expressed in the skin of koi carp varieties, we found several candidate genes involved in carotenoid metabolism and pteridine biosynthesis.

研究分野：魚類生理学

キーワード：ニシキゴイ 体色 皮膚 色素 カロテノイド プテリジン 液体クロマトグラフィー質量分析法 色素

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

ニシキゴイ(錦鯉)は日本発祥の大型観賞魚である。海外において富裕層を中心に人気を集めており、生産量の8割以上が海外に輸出される。近年、ニシキゴイは政府の輸出重点品目に指定され、品質の向上と生産・流通体制の高度化が急務となっている。ニシキゴイの価値は大きさ、形、色模様、ならびに色の鮮やかさによって決まる。

魚類の赤や黄色の体色を生み出す色素は主にカロテノイドである。魚類はカロテノイドを体内で生合成できないが、餌に含まれるカロテノイドを体内で代謝し、皮膚に蓄積する。したがって、カロテノイドを多く含む材料を餌に加えることにより、ニシキゴイの赤色を鮮やかにすることができる。ニシキゴイの代表的な品種である紅白では、スピルリナのような餌原料に多く含まれるゼアキサンチンをアスタキサンチンに代謝して、皮膚に蓄積することが知られている。しかし、その代謝・蓄積過程はよくわかっていなかった。近年、新潟県が開発した黄白という新品種は、紅白に似たまだら模様を持つが、模様の色が黄色い。この黄色の元となる色素は不明であった。少なくともその主成分は、赤いカロテノイドであるアスタキサンチンではないと考えられる。

魚類では、カロテノイド以外の色素として、プテリジンもまた、赤や黄色の体色発現に関与することが知られている。プテリジンは体内で生合成可能であるが、ニシキゴイにおけるプテリジンの合成経路に関する知見はほとんどなかった。

## 2. 研究の目的

紅白は、餌から吸収したゼアキサンチンを体内でアスタキサンチンに変換することによって赤い体色を生み出す。したがって紅白における発色のメカニズムを解明するためには、その代謝酵素を同定する必要がある。黄白は赤い体色を持たないことからゼアキサンチンからアスタキサンチンを生合成する経路を持たないことが想定された。このことから、紅白と黄白を比較することにより、カロテノイドの代謝経路を明らかにできると考えられる。そこで本研究では、紅白と黄白の皮膚に含まれるカロテノイド類とプテリジン類、ならびにカロテノイドの代謝とプテリジンの生合成に関わる酵素遺伝子を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、1)紅白と黄白の組織に含まれるカロテノイドの同定、2)魚類に含まれるプテリジンの抽出方法の検討、3)カロテノイドの代謝に関わる遺伝子の同定、ならびに4)プテリジンの生合成に関わる遺伝子の同定に取り組んだ。

### 1) 紅白と黄白の組織に含まれるカロテノイドの同定

黄白と紅白の色模様部分の鱗を採取し、0.01%ジブチルヒドロキシルトルエン(BHT)を含むエタノールまたはメタノールを用いて抽出した液を窒素ガスにより乾固、濃縮した後、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS)によりカロテノイド標品とともに分析した。また、飼育に用いた色上げ餌に含まれるカロテノイドについても同様の方法で抽出し、LC/MSにより分析した。

次に、紅白と黄白を、ゼアキサンチンを含む色揚げ餌を与えて3週間飼育した後、上記の方法に従って鱗からカロテノイドを抽出した。また、血漿に0.01%BHT入り冷クロロホルム:メタノール=2:1を加えて攪拌し、遠心して上清を分取し、0.88%KCLや超純水を加えて攪拌・遠心分離し

てクロロホルム層を分取する作業を繰り返してカロテノイドを精製した。得られたカロテノイド試料を LC-MS を用いて分析した。

## 2) 魚類の皮膚に含まれるプテリジンの抽出方法の検討

本研究では、大量の皮膚を入手できるマコガレイを材料として用いた。マコガレイの有眼側表皮に対して 20 倍量の 25 mM TEA-HCl (pH 7.4) およびエタノールによりプテリジンを抽出し、抽出物を 1 M HCl を用いて濃縮、溶解して高速液体カラムクロマトグラフ (HPLC) 法により分析した。カラムは HILIC カラム (Luna 5  $\mu$ m NH<sub>2</sub> 100A)、溶媒は 0.3% ギ酸を含む 10 mM 酢酸アンモニウムとアセトニトリルを用いて条件を検討した。カラムの温度は 40  $^{\circ}$ C、流速は 1.0 ml/min として、蛍光検出器により励起波長 353 nm、蛍光波長 438 nm を検出した。標準品としてネオプテリン (NP) および 2-アミノ-3H-プテリジン-4-オン (プテリン:P) を用い、0.01-10  $\mu$ g/ml とした。標準品の各濃度のピーク面積から 2 次式もしくは 5 次式で検量線を作成した。

## 3) カロテノイドの代謝に関わる遺伝子の同定

紅白と黄白の鱗において、赤～黄色系の色素であるカロテノイド分子の中央部分のポリエン部を切断する酵素  $\beta$ -カロテンモノオキシゲナーゼの遺伝子 (*bco*) ならびにゼアキサンチンをアスタキサンチンに変換することが想定される遺伝子 A が皮膚に発現するか否かを、逆転写 PCR 法により調べた。

## 4) プテリジンの生合成に関わる遺伝子の同定

大正三色とマゴイの鱗において、プテリジン合成の律速酵素である GTP-CH の遺伝子 (*gch*) が皮膚に発現するか否かを、逆転写 PCR 法により調べた。

# 4. 研究成果

## 1) 紅白と黄白の組織に含まれるカロテノイドの同定

黄白の黄色鱗と白色鱗、および紅白の白色鱗からゼアキサンチンが検出された。しかし、紅白の赤色鱗からは検出されなかった。紅白の赤色鱗からは微量のアスタキサンチンが検出されたが、赤色の主成分は、アスタキサンチンと吸光スペクトルが類似するものの、分子量が異なる別の色素であることが示唆された。

餌からは標準品カロテノイドと一致するゼアキサンチンと  $\beta$ -カロテンが検出された。以上の結果は、黄白の黄色鱗と白色鱗、および紅白の白色鱗には餌に含まれるゼアキサンチンがそのまま蓄積されるが、紅白の赤色鱗ではゼアキサンチンが代謝され、アスタキサンチンに類似した未知の赤色の色素が鱗に蓄積されることを示唆する。

紅白と黄白の血漿を抽出したところ、紅白の血漿は赤く、黄白の血漿はオレンジ色に呈色することを偶然発見した。この現象は、消化管においてカロテノイドが吸収される際のカロテノイドの代謝メカニズムが紅白と黄白とで異なることを示唆する。

ゼアキサンチンを豊富に含む色上げ餌を与えた紅白の血漿、皮膚および消化管から、保持時間と吸光スペクトルが標品ゼアキサンチンと一致する物質が検出された。また、紅白の血漿と皮膚からアスタキサンチンと吸光スペクトルが一致するが保持時間がより長くアスタキサンチンのモノエステル体と推定される物質が検出された。一方、黄白では血漿、皮膚および消化管から保持時間と吸光スペクトルが標品ゼアキサンチンと一致する物質が検出されたが、アスタキサン

チンまたはそのモノエステル体と推定される物質は検出されなかった。以上の結果は、紅白では消化管で吸収されたゼアキサンチンが体内を循環する過程でアスタキサンチンモノエステル体に変換され選択的に皮膚に蓄積されるか、ゼアキサンチンが選択的に皮膚に蓄積されてからアスタキサンチンモノエステル体に変換されること、黄白では消化管から吸収されたゼアキサンチンが変換されないまま血液を介して皮膚に蓄積することを示唆する。しかし、紅白においてアスタキサンチンとエステル結合する脂肪酸は不明である。

## 2) 魚類に含まれるプテリジンの抽出方法の検討

まず、標準品を用いて HPLC の分析条件を検討した。次に濃度を変えた標準品の検出シグナルのピーク面積から複数の方法で検量線を作成し、標準品の設定濃度に近い数値を算出できる検量線を採用した。さらに、抽出物の溶解と濃縮に用いる溶液を検討し、抽出効率が良かった HCl を用いることとした。同様に抽出物の濃縮時の溶液も検討し、HCl を用いることとした。以上の条件を用いて、マコガレイの表皮からプテリジン抽出物を得ることに成功した。しかしながら、表皮抽出物の主成分の溶出時間は、用いた 2 種のプテリジン標準品とは異なっていたことから、マコガレイの皮膚に含まれる主なプテリジンは、ネオプテリンおよび 2-アミノ-3H-プテリジン-4-オンではないことが示唆された。本研究で用いたプテリジンの抽出・分析法は、ニシキゴイの皮膚に含まれるプテリジンの分析に有用であると考えられる。

## 3) カロテノイドの代謝に関わる遺伝子の同定

8 種類の *bco* サブタイプのすべてが紅白の赤鱗または黄白の黄鱗のいずれかで発現するが、これらの *bco* サブタイプのほとんどが白鱗では発現しないことが明らかとなった。また、*bco1aL* は紅白の赤鱗には発現するが黄白の黄鱗では発現しないことが明らかとなった。以上の結果は、紅白と黄白において *bco* が色素形成に関与すること、ならびに紅白において *bco1aL* が皮膚におけるゼアキサンチンの代謝に関与する可能性を示唆する。

紅白の遺伝子 A に比べて黄白の遺伝子 A の方が、マゴイに比べて多くの塩基が置換されていること、ならびに遺伝子 A の転写産物には複数のバリエーションが存在し、その一部は紅白の鱗では発現するが黄白の鱗では発現しないことが明らかとなった。以上の結果は、黄白において、遺伝子 A が発現しないか、もしくは遺伝子 A の突然変異によってゼアキサンチンがアスタキサンチンに代謝されなくなっていることを示唆する。しかし、遺伝子 A がコードする酵素が紅白において機能的かどうかは不明であり、今後さらなる研究が必要である。

## 4) プテリジンの生合成に関わる遺伝子の同定

2 つの *gch* サブタイプのうち、マゴイの鱗と大正三色の赤鱗、白鱗、黒鱗において *gch1* が発現すること、ならびにマゴイの鱗と大正三色の赤鱗、黒鱗において *gch2* が発現することが明らかになった。以上の結果は、*gch1* は色素胞以外の細胞において発現すること、ならびに *gch2* は黄色素胞および黒色素胞に発現することを示唆する。以上の結果から、コイにおいて黄色系の色素であるプテリジンの合成に必要な遺伝子の候補が明らかになった。ニシキゴイの赤～黄色系の色素の主成分はカロテノイドであるが、プテリジンもまた赤～黄色系の色合いに寄与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shinohara Y, Kasagi S, Amiya N, Hoshino Y, Ishii R, Hyodo N, Yamaguchi H, Sato S, Amano M, Takahashi A, Mizusawa K	4. 巻 13
2. 論文標題 Taisho-Sanshoku koi have hardly faded skin and show attenuated melanophore sensitivity to adrenaline and melanin-concentrating hormone.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 3363
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2022.994060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yang Tingshu, Kasagi Satoshi, Takahashi Akiyoshi, Mizusawa Kanta	4. 巻 41
2. 論文標題 Effects of Water Temperature on the Body Color and Expression of the Genes Related to Body Color Regulation in the Goldfish	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 117-123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/zs230062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 水澤寛太, 六鹿比斗志, 山川将輝, 大野佑紀, 佐藤 将, 高橋明義
2. 発表標題 マゴイとニシキゴイにおける液性体色調節因子の作用の比較
3. 学会等名 第36回日本下垂体研究会学術集会（2022年8月8-10日, 東海大学山中湖セミナーハウス）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yukari Shinohara, Satoshi Kasagi, Noriko Amiya, Yukihiro Hoshino, Ryo Ishii, Noriyuki Hyodo, Hiroaki Yamaguchi, Shoh Sato, Masafumi Amano, Akiyoshi Takahashi, Kanta Mizusawa
2. 発表標題 Weak sensitivity of hormones in the scale melanophores contributes to the vivid black color of a Koi carp
3. 学会等名 International Symposium on Aquatic Animal Physiology（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水澤寛太
2. 発表標題 魚類のメラニン凝集ホルモンとプロオピオメラノコルチン
3. 学会等名 第41回内分泌代謝学サマーセミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水澤寛太
2. 発表標題 ニシキゴイの鮮やかさとホルモン
3. 学会等名 日本動物学会関東支部公開講演会「動物の色にまつわる色々」（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Amano H, Horiuchi K, Uryu J, Okazaki N, Yasumoto K, Jimbo M, Takahashi E, Yamaha E
2. 発表標題 Measurement of carotenoids in female masu salmon <i>Oncorhynchus masou</i> during vitellogenesis and spawning
3. 学会等名 International Symposium on Aquatic Animal Physiology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 天野春菜, 富山寛太, 瓜生純也, 岡崎希, 安元剛, 神保充, 高橋英佑, 山羽悦郎
2. 発表標題 産卵期に面向かう雌雄サクラマスにおける各組織のカロテノイド量の比較
3. 学会等名 第23回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 天野春菜, 堀内健太郎, 瓜生純也, 岡崎希, 安元剛, 神保充, 高橋英佑, 山羽悦郎
2. 発表標題 卵黄形成期から産卵期におけるサクラマス雌魚のカロテノイドの動態
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

魚類分子内分泌学研究室HP <a href="https://www.kitasato-u.ac.jp/mb/lab/bunshi/">https://www.kitasato-u.ac.jp/mb/lab/bunshi/</a> プレスリリース「大正三色ニシキゴイが鮮やかな墨色を保つホルモン機構を解明」 <a href="https://www.kitasato.ac.jp/jp/news/20230125-03.html">https://www.kitasato.ac.jp/jp/news/20230125-03.html</a>
--

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	天野 春菜  (Amano Haruna)  (50431341)	北里大学・海洋生命科学部・講師    (32607)	

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