

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 26 年 5 月 25 日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 年度～2012 年度

課題番号：23658176

研究課題名（和文） 魚類のタウリン合成酵素の単離ならびに浸透圧による制御機構の解明

研究課題名（英文） Isolation of taurine synthetic enzyme genes from fishes and mechanism of osmotic regulation

研究代表者

佐藤秀一（SATO SHUICHI）

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授

研究者番号：80154053

研究成果の概要（和文）：マダイ、ブリ CSD 遺伝子の単離と、マダイ、ブリ、スズキ、マツカワの CSD 遺伝子の発現解析を行った。ダイおよびブリ CSD 遺伝子の全塩基配列を決定し、マダイおよびブリ CSD は、88.8%の相同性を示し、ナイルティラピア、プラティ等と近縁であることを示した。また、マダイ、ブリ、スズキ、マツカワの CSD の発現を解析し、魚種ごとに差はあるものの、CSD の発現は主に幽門垂と肝臓で強く発現する傾向を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Cysteine sulfinic acid decarboxylase (CSD) genes are isolated from red sea bream and yellowtail. Expression analysis was also conducted in bastard halibut, red sea bream, seabass, and yellowtail. Total length of CSD was successfully isolated from red sea bream and yellowtail and deduced amino acid sequences from both species showed 88.8 % homology and closely associated to CSD from Nile tilapia and platy, etc. Expression of CSD was commonly observed in liver and pyloric caecae from different species.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：タウリン，合成酵素，魚類，塩分

1. 研究の背景

近年、魚粉に代わるタンパク質源として、大豆油粕などの植物性原料を配合した、魚粉代替飼料の研究が進んでいる。しかし、海水魚に植物性原料飼料を給餌すると、成長不良や緑肝症の発症が報告されている。これは、

植物性原料にタウリンがほとんど含まれていないことが原因であり、海水魚用の植物性タンパク質を主体とした飼料にはタウリンの添加が必須である。タウリン生合成の主要な経路で、システインスルフィン酸は、システインスルフィン酸脱炭酸酵素によりタウリン前駆物質であるヒポタウリンに変換され

る。海水魚はシステインスルフィン酸脱炭酸酵素活性が低いため、体内でタウリンを合成する能力が乏しく、経口摂取する必要がある。システインスルフィン酸脱炭酸酵素の発現を人為的に制御できれば、タウリン添加は不要となると考えられる。そのためには、まず、海水魚のシステインスルフィン酸脱炭酸酵素遺伝子を単離し、その発現機構を解明する必要がある。しかし、魚類のシステインスルフィン酸脱炭酸酵素の配列については、ゼブラフィッシュ *Danio rerio*、メダカ *Oryzias latipes*、コイ *Cyprinus carpio*、ウナギ *Anguilla japonica*、イトヨ *Gasterosteus aculeatus*、プラティ *Xiphophorus maculatus*、ナイルティラピア *Oreochromis niloticus*、などがジーンバンクに登録されているのみで、海水魚に関する報告は少ない。

2. 研究の目的

本研究では、マダイ、ブリシステインスルフィン酸脱炭酸酵素遺伝子の全塩基配列の決定を行った。また、スズキおよびマツカワのシステインスルフィン酸脱炭酸酵素遺伝子の部分配列を単離して、構想解析を行うとともにどの組織で発現しているかを解析した。

3. 研究の方法

1) マダイおよびブリ肝臓におけるシステインスルフィン酸脱炭酸酵素遺伝子の部分塩基配列の解析

マダイは、全長 15 cm の 0 歳魚を水温 20-24 °C で配合飼料を与えて飼育したもの、ブリは、全長 10.5 cm の 0 歳魚を生け簀でモイストペレットを与えて飼育したものをを用いた。スズキは、釣果により東京湾で全長 15 cm の魚を採取し、肝臓を採取した。マ

ツカワは、北海道で飼育された全長 13 cm の魚を凍結保存したものから肝臓を採取して使用した。マダイとブリから肝臓をサンプリングし、RNA later 中で保存した。マダイおよびブリの肝臓を 1000 μ L の TRIzol 試薬により RNA を抽出した。全 RNA 濃度を分光光度計で確認後、DNase により DNA を除去した。Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit を用いて、実験プロトコールに沿って RNA から cDNA を合成した。

マダイおよびブリのシステインスルフィン酸脱炭酸酵素の発現を解析するために、システインスルフィン酸脱炭酸酵素塩基配列が明らかになっているトラフグ *Takifugu rubripes*、ミドリフグ *Tetraodon nigroviridis*、イトヨ *Gasterosteus aculeatus*、メダカ *Oryzias latipes*、コイ *Cyprinus carpio* およびゼブラフィッシュ *Danio rerio* の 6 魚種のシステインスルフィン酸脱炭酸酵素塩基配列を比較して、相同性が高い配列に対して、システインスルフィン酸脱炭酸酵素-F1、システインスルフィン酸脱炭酸酵素-F2、およびシステインスルフィン酸脱炭酸酵素-R1、システインスルフィン酸脱炭酸酵素-R2 のプライマーを設計した。また、内部標準として β アクチン遺伝子のプライマーマダイとブリの既報の論文を参考に設計した。

設計したプライマーを用い、精製した cDNA を鋳型として PCR 反応を行った。反応は 94 °C で 5 分間保温した後、94 °C で 30 秒間、55 °C で 30 秒間、72 °C で 30 秒間を 1 サイクルとして、35 サイクル行い、最後に 72 °C で 5 分間保温して反応を終了した。さらに、PCR 反応で得られた PCR 産物を 100 倍希釈して鋳型とし、Nested PCR を行った。SDW で 100 倍希釈した PCR 産物 に対して、反応液を 94 °C で 5 分間保温した後、94 °C で 30

秒間、55 °Cで30秒間、72 °Cで30秒間の反応を35サイクル行い、最後に72 °Cで5分間保温して反応を終了した。PCR反応終了後、1%のアガロースゲルを用い電気泳動してUV下で遺伝子断片の増幅を確認した。

アガロースゲルから目的のバンドを得るために、ゲル断片からPCR産物を抽出した。ゲル抽出には、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kitを用いて行った。

得られたPCR産物の濃縮物の塩基配列を決定するために、pGEM®T-Easy Vectorを用いてベクターDNAへのライゲーションを行った。

得られたライゲーション産物とともにコンピテントセル 50 µL (大腸菌 *Escherichia coli* JM109 株)培養した。培養後、インサートを含むプラスミドDNAを持つ細胞により形成した白色コロニーを選別した。白色プラークに関しては pGEM®T-Easy ベクターのマルチクローニングサイト中の配列 M13 を利用してインサートの挿入を確認した。すなわち M13 プライマー (Table 1. No. 9, 10) を用いて、白色コロニーを形成した菌体を鋳型としてPCRを行った。

PCRの反応は、M13 プライマーを用いて行い、PCR産物を1%アガロース電気泳動してインサートのバンドが確認された菌体を選別した。

組換え体プラスミドDNAの調製は、GenElute™ plasmid miniprep Kitを用いて行った。その後、DNA濃度を分光光度計で測定し、各サンプル中の double-strand cDNA が 200 ng となるよう調製した。

M13 プライマーおよび Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit によって蛍光標識した二本鎖 cDNA に、3.2 µM の M13 プライマー 各 1 µL、5×Big Dye Sequencing Buffer 3.5 µL、Big Dye Terminator Ready Reaction Mix 1 µL の混合液に SDW を加えて全量 20 µL の反応液

を調製した。反応液を 95 °C で 1 分間保温した後、95 °C で 10 秒間、50 °C で 5 秒間、60 °C で 4 分間の反応を 25 サイクル行い、DNA を蛍光標識した。標識した DNA は、ABI PRISM 3100 genetic analyzer によりその配列を決定した。

2. RACE 法によるシステインスルフィン酸脱炭酸酵素遺伝子の全塩基配列決定

3-1). で得られた部分配列から、Primer 3 を用いて、RACE 法に使うプライマーを設計した。マダいのシステインスルフィン酸脱炭酸酵素遺伝子の部分配列から、SB システインスルフィン酸脱炭酸酵素-F1、R1 を設計し、ブリのシステインスルフィン酸脱炭酸酵素遺伝子の部分配列からシステインスルフィン酸脱炭酸酵素-3' F、5' -R を設計した。

マダいの肝臓およびブリの幽門垂の RNA を用いてシステインスルフィン酸脱炭酸酵素塩基配列を決定する実験を行った。Smarter RACE Kit を用いて、RACE 法用の cDNA を合成した。生成した cDNA に Tricine-EDTA Buffer を 100 µL 添加して調製した。

【RACE PCR 反応】

Kit 添付のアダプタープライマー UPM および 10 µM のプライマー システインスルフィン酸脱炭酸酵素-F2、R2 を使用して PCR を行った。PCR 反応は、94 °C で 5 分間保温した後、94 °C で 30 秒間、55 °C で 30 秒間、72 °C で 2 分間の反応を 35 サイクル行った。

Kit 添付のアダプタープライマー NUP と、マダいには SB システインスルフィン酸脱炭酸酵素-F1、R1 プライマーを使用し、ブリにはシステインスルフィン酸脱炭酸酵素-3' F、5' R プライマーを使用して Nested PCR を行った。得られた PCR 産物を 1%アガロースゲル電気泳動に供し、システインスルフィン酸脱炭酸酵素遺伝子の増幅を確認した。

プライマー-NUP と、マダイには 10 μ M の SB システインスルフィン酸脱炭酸酵素-F1、R1 プライマー、ブリには 10 μ M のシステインスルフィン酸脱炭酸酵素-3' F、5' -R プライマーを用いた PCR 反応により得られた PCR 産物をゲル抽出してクローニングを行った。大腸菌の形質転換、インサートチェック、組換え体プラスミド DNA の調製、塩基配列の決定は 3-1). の方法を用いた。

3) 構造解析

RACE 法により決定したシステインスルフィン酸脱炭酸酵素遺伝子の塩基配列から求めた演繹アミノ酸配列を、他の生物のシステインスルフィン酸脱炭酸酵素遺伝子のアミノ酸配列を比較し、GENETYX Ver.9 を用いて近隣結合法により、分子系統樹を作成した。なお、比較した生物は、ゼブラフィッシュ *Danio rerio*、メダカ *Oryzias latipes*、コイ *Cyprinus carpio*、トラフグ *Takifugu rubripes*、ミドリフグ *Tetraodon nigroviridis*、ウナギ *Anguilla japonica*、イトヨ *Gasterosteus aculeatus*、プラティ *Xiphophorus maculatus*、ナイルティラピア *Oreochromis niloticus*、ヒト *Homo sapiens*、アカゲザル *Macaca mulatta*、スマトラオランウータン *Pongo abelii*、ゴリラ *Gorilla gorilla*、チンパンジー *Pan troglodytes*、ホオジロテナガザル *Nomascus leucogenys*、ウシ *Bos taurus*、ブタ *Sus scrofa domestica*、ハツカネズミ *Mus musculus*、ドブネズミ *Rattus norvegicus*、ネコ *Felis catus*、イヌ *Canis lupus familiaris*、ウマ *Equus caballus* およびヒツジ *Ovis aries* の 23 種である。

全長決定したシステインスルフィン酸脱炭酸酵素遺伝子の塩基配列より求めた演繹アミノ酸配列について、Pfam を用いてドメイ

ン検索を行った。また、GENETYX を用いて、他魚種のシステインスルフィン酸脱炭酸酵素の演繹アミノ酸配列と比較した。

4. 研究成果

本実験により、マダイおよびブリシステインスルフィン酸脱炭酸酵素遺伝子の完全長の配列決定に成功し、各々 1882 bp および 1821 bp であり、演繹アミノ酸配列はともに 508 残基であることが分かった。両者のアミノ酸配列および塩基配列は、各々 85% および 88.8% の相同性を示し、近隣結合法による分子系統樹解析の結果、既報のすべての魚類の者と同じクレードに分類され、中でもナイルティラピアおよびプラティ等と近縁であり、コイ科魚類やウナギとは類縁関係がやや低いことが示された。さらに、マダイおよびブリから単離されたシステインスルフィン酸のドメイン構造を Pfam により解析すると、ビタミン B6 結合タンパクに見られる配列が保存されていたことから、本酵素の補酵素としてビタミン B6 が必要である可能性も示唆された。また、このドメインには NPHK モチーフと呼ばれるピリドキサルリン酸 (PLP) 結合部位のことであり、豚の DOPA 脱炭酸酵素や、ネコのグルタミン酸脱炭酸酵素やコイおよびウナギシステインスルフィン酸脱炭酸酵素でも同モチーフが発見されていることから、多くのシステインスルフィン酸脱炭酸酵素塩基配列に共通してみられる NPHK モチーフがブリおよびマダイのシステインスルフィン酸脱炭酸酵素にも含まれていると考えられた。今後、飼料中のタンパク源を植物性タンパクのみとした場合のタウリン要求とピリドキシン要求の相互作用の有無なども検討することが必要である。

マダイシステインスルフィン酸脱炭酸酵素は、脳、心臓、胃、幽門垂、肝臓、脾臓、

腎臓で強く発現し、筋肉では発現が見られなかった。ブリシステインスルフィン酸脱炭酸酵素は、幽門垂、肝臓で強く発現し、鰓、心臓、胃、胆嚢、筋肉では発現が見られなかった。スズキシステインスルフィン酸脱炭酸酵素は、胃、幽門垂、肝臓、腎臓で強く発現し、心臓では発現が見られなかった。マツカワシステインスルフィン酸脱炭酸酵素は、心臓、幽門垂、胆嚢で強く発現した。

本研究より、魚種によって発現組織はやや異なるが、いずれの魚種でも共通に幽門垂と肝臓で強く発現する傾向があることが明らかとなった。魚類のタウリン合成酵素の活性は、肝臓以外にも、脳、腎臓および心臓でも認められている。また、ウナギでは、精子形成の際にCSDの活性の増加が見られることから、タウリンが浸透圧調節などに利用されている可能性も考えられている。本実験においても、肝臓以外の臓器でCSD遺伝子が発現されたことから、肝臓以外でもタウリン生合成が行われていることが示唆された。調べた4魚種の中ではマダイの発現組織が最も多く、ブリの発現組織が少なかった。これは両魚種の、タウリン欠乏への感受性の差を表しているのかもしれない。また、スズキおよびマツカワにおいて、個体によってシステインスルフィン酸脱炭酸酵素遺伝子の発現組織が異なる傾向が見られた。これは、本実験で使用したプライマーの塩基配列とスズキおよびマツカワで発現するシステインスルフィン酸脱炭酸酵素遺伝子の塩基配列の相同性が高くない可能性が考えられる。そのため、スズキおよびマツカワにおいてもシステインスルフィン酸脱炭酸酵素遺伝子を単離し、全塩基配列を決定し、再度スズキとマツカワのシステインスルフィン酸脱炭酸酵素遺伝子を発現解析する必要がある。なお、マダイの肝臓および幽門垂において In situ

hybridization を行って CSD 遺伝子の発現部位を確認しようと試みたが、CSD シグナルを検出できなかった。抗タウリン抗体などを用いた免疫染色法等を応用して、どの細胞でタウリン合成が起こっているかを解明できれば、魚類 CSD の人為制御技術の開発に役立つ知見が得られる可能性がある。

5. 研究発表

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

海産魚類のタウリン合成酵素の単離および発現解析に関する研究. 芳賀 穰、熊谷彩花、近藤秀裕、佐藤秀一. 平成 25 年日本水産学会秋季大会 (津市) にて発表予定 (9 月)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授
佐藤秀一 (SATO SHUICHI)

研究者番号 : 80154053

(2) 研究分担者

近藤 秀裕 (KONDO HIDEHIRO)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・准教授
研究者番号 : 20314635

芳賀 穰 (HAGA YUTAKA)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・准教授
研究者番号 : 00132063