

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05837

研究課題名(和文) 魚類腸管における栄養素認知とその消化誘導機構の解明

研究課題名(英文) Nutrient sensing and digestive function in fish gastrointestinal tract

研究代表者

村下 幸司 (Murashita, Koji)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(南勢)・主任研究員

研究者番号：60597649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：魚粉に頼らない新規養魚飼料の開発へ向けた基盤研究として、魚類腸管での栄養素認知とその消化誘導機構の解明を目的に、栄養素受容体として知られるcalcium-sensing receptor (CaSR)欠損魚(メダカ)を作出した。CaSR欠損魚は野生型と比較して、消化酵素分泌量が少ない、成長成績が劣る、仔魚期の代謝活性が高いという特徴がみられ、CaSRは魚類においても栄養素の認知と続く代謝に重要な役割を担っていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これからの養魚飼料では植物性原料などの魚粉以外の原料を積極的に利用しなければならないが、植物性原料では魚の消化機構がうまく働かずに十分に利用することができない。これは魚の腸管では植物性原料が「栄養素」として認識されづらいことに一因があると考えられるが、魚類の栄養素認知機構は不明な点が多い。本研究では、ほ乳類で栄養素受容体として知られるCaSRに着目し、CaSRが欠損したモデル魚(メダカ)を作出した。作出したCaSR欠損魚を解析することで、魚類においてCaSRが栄養素の認知と続く代謝に重要な役割を担うことを明らかにし、また魚類特有の機能も示唆された。

研究成果の概要(英文)：Calcium-sensing receptor (CaSR) is known to have a wide range of physiological functions including nutrient (amino acids and peptides) sensing in the gut, and sensing is required for subsequent digestion in mammals whereas the function of CaSR in fish is still obscure. In this study, CaSR knockout medaka was generated using genome editing technique of CRISPR/Cas9 system. The CaSR knockout medaka exhibited lower digestive enzymes secretion, lower growth performance and higher metabolic activity (respiration at larval stage) compared to those of wild type fish. These suggest that fish CaSR also has a wide range of functions for nutrient sensing and subsequent digestion. The generated CaSR knockout fish will be a powerful tool to reveal the function of fish nutrient sensing and metabolism in the future.

研究分野：魚類栄養生理

キーワード：魚類 CaSR 栄養素認知 消化 養魚飼料

1. 研究開始当初の背景

世界的に養殖生産量が増大する一方で、主要な飼料原料である「魚粉」の供給量（原料魚の漁獲量）はこれ以上増やすことができない。今後、魚粉の入手は益々難しくなると予想され、植物性原料などの魚粉以外の原料を積極的に利用していかなければならない。しかし、植物性原料を使用した場合、一般的な栄養要求量は満たしているにも関わらず魚の成長が低下してしまう。

これまでの研究から、植物性原料の給餌では消化酵素分泌が誘導されず、消化の遅延が成長低下の原因の一つになっていることが分かってきた（図1）。魚類において植物性原料が消化機構を誘導しないのは、それが魚の腸管で「栄養素」として認識されていないためだと考えられる。ほ乳類では、腸管での栄養素認知が消化機能の誘導に重要であることが明らかにされてきており、腸管の内分泌細胞表面に存在する栄養素センサーの一つである CaSR（Calcium-sensing receptor）がペプチド・アミノ酸を検知し、同じ細胞に局在する消化促進ホルモン（CCK: コレシストキニン）を分泌させることで続く消化機能を誘導する（図2）。

魚類においても *casr* が腸管前部に存在することや（研究協力者 Gomes and Rønnestad, 未発表データ）摂餌や特定の栄養素（タンパク質や脂質）によって腸管 *cck* の発現と消化酵素の分泌が誘導されることなどから、ほ乳類と類似した栄養素認知システムを有していると考えられる。一方で、申請者らの予備的な検討によって魚種によっては複数の *casr* ホモログ遺伝子が存在することが明らかになっており、その機構はほ乳類の場合と比べてより複雑で詳細は異なると予想される。魚類腸管における CaSR を介した栄養素の認知機構に関する報告はこれまでに無く、上記の予備的な知見以外のことは不明であった。

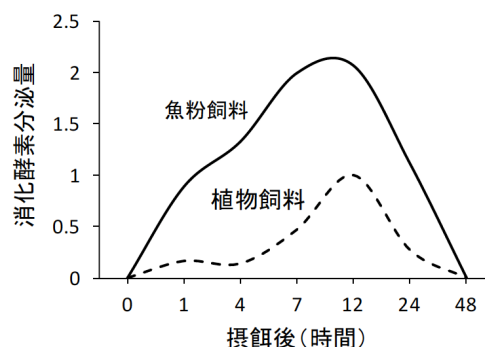


図1. マダイへ魚粉飼料と植物飼料を給与した際の消化酵素分泌量の違い

腸前方内容物中のトリプシン活性を消化酵素分泌量の指標とした。魚粉飼料に比べて、植物飼料を給与した魚の消化酵素分泌量は大きく劣る。

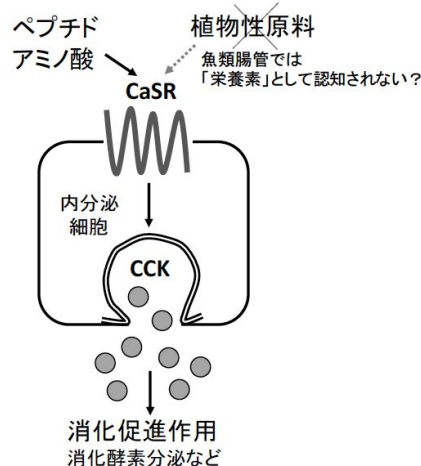


図2. CaSRによる栄養素の認知と消化誘導作用
ほ乳類ではCaSRがペプチドやアミノ酸を検知して消化促進ホルモンCCKを分泌させる。魚類にて植物性原料が消化を誘導しないのはそれが「栄養素」として認知されないからと考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では魚粉に頼らない新規養魚飼料の開発へ向けた基盤研究として、魚類腸管でのCaSRによる栄養素認知とその消化誘導機構に関する知見を得るため、CaSR欠損魚を作出して消化や栄養代謝に関する表現型を解析した。

3. 研究の方法

(1) メダカ *casr* 遺伝子の単離と発現解析

まず対象魚であるメダカにおける *casr* 遺伝子の基礎的な情報を得るため、cDNA 塩基配列を決定し、リアルタイム PCR 法による遺伝子発現量測定系を確立した。また、確立した測定系を用いて脳、下垂体、眼、舌、鰓、皮膚、筋肉、心臓、胆のう、肝臓、脾臓、腎臓、生殖腺、腸前腹部、腸中部、腸後腹部の 16 組織について、組織発現分布を明らかにした ($n = 8$)。

(2) CaSR 欠損体の作出

上記(1)-1 で明らかにした *casr* の塩基配列を基に single guide RNA (sgRNA) を設計・作製し、Cas9 タンパクと共に 1 細胞期のメダカ受精卵に顕微注入した。sgRNA は異なるエキソン上に 2 種を設計し、HRM 法(High-Resolution Melting analysis)にて変異導入効率を確認することでより高効率に変異導入が可能なものを実際の変異体作出に用いた。sgRNA/Cas9 を顕微注入した F0 個体はモザイクに変異を有することから、野生型(wt)と掛け合わせることで単一の変異をヘテロに有する F1 個体を作成し、HRM およびシーケンス解析により選別することで、機能欠損が予測される変異個体を単離した。単離したヘテロ変異体を掛け合わせ、さらに選別することで目的変異をホモに有する個体を作成した。

(3) CaSR 欠損体の表現系解析

オフターゲットの影響を排除するため、作出した CaSR 欠損体は wt と掛け戻した(ヘテロ化)後に再度ホモ化し、その次世代を供試魚に用いた。

(3)- 消化酵素分泌への影響

wt と CaSR 欠損魚のそれぞれについて、体重の 2.5% の市販配合飼料を給餌し、3 時間および 6 時間後に腸内容物を採取した。採取した腸内容物の消化酵素活性(トリプシン、キモトリプシン、リパーゼ)を測定することで、腸管内へ実際に分泌された消化酵素量を調べた ($n = 8$)。

(3)- 栄養組成が異なる飼料で飼育した際の成長の比較

CaSR 欠損魚と wt の間に栄養特性の違いがあるかを確認するため、栄養組成が異なる飼料を用いて成長を比較した。飼料には、高蛋白/低脂質飼料(HP/LL)、中蛋白/中脂質(MP/ML)および低蛋白/高脂質(LP/HL)の 3 種を用いた。同一日に孵化した wt と CaSR 欠損魚を試験魚とし、1 水槽に 25 尾を収容して孵化後 3 週目から 10 週目まで試験飼料を用いて飽食飼育(2 回/日)した(2 系統、3 飼料、3 重試験: 計 18 水槽)。

(3)- 代謝活性への影響

CaSR が欠損することによってメダカの代謝量に違いが現れるかを確認するため、受精後 5 日目(卵) 孵化後 1 日、3 日、7 日、14 日および 21 日目の個体における呼吸量(酸素消費量)を測定した。呼吸量の測定は、非接触センサーを用いた光学式酸素モニター(FireSting O₂, Pyroscience, Germany)を使用し、25 の一定温度下の密閉式バイアル内で実施した ($n = 14$)。

(3)- 栄養代謝調節に関わる各種遺伝子発現への影響

栄養代謝調節への影響を広く調べるため、摂食や消化、代謝調節に関わる遺伝子 25 種類について、各成長段階の部位別に測定した。受精後 5 日の卵、孵化後 0 日、孵化後 10 日、孵化後 5

週および孵化後 8 ヶ月の魚をそれぞれサンプリングし、0 日齢と 10 日齢の仔魚については頭部と体部、5 週齢と 8 ヶ月齢の魚については、脳と腸管を摘出し、腸管はさらに前方部、中部および後方に分割して測定に使用した ($n = 6$)。

4. 研究成果

(1) メダカ *casr* 遺伝子の単離と発現解析

メダカ *casr* 遺伝子について、タンパク質コード領域の cDNA 塩基配列を決定した。また、決定した配列を基にリアルタイム PCR 法によって、組織発現分布を調べたところ、*casr* 遺伝子は全身で発現が確認され、特に腸管で強く発現していたことから、栄養素認知に関する役割が示唆された。

(2) CaSR 欠損体の作出

変異体作出に用いた *casr* 遺伝子を標的とした sgRNA の F0 個体への変異導入効率は 100%であった (図 3)。また、変異導入が確認された F0 から次世代への変異伝達率は 56%であった。得られた F1 の標的領域のシーケンスを解析することで、フレームシフトによる完全な機能欠損が予想される変異 (19 塩基欠損) を単離し、さらに単離した変異をホモ化することで CaSR 欠損メダカを作出した (F2)。

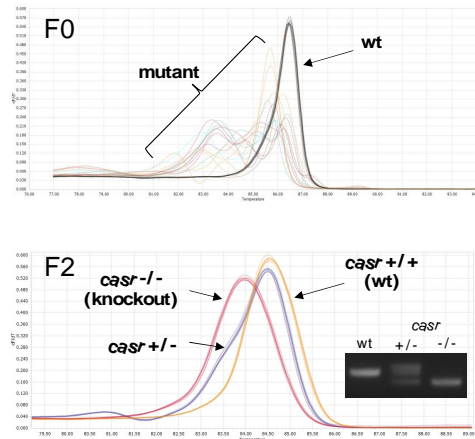


図3. HRM 解析による変異体の検出

F0変異体では多数のピークが検出され、モザイク状に多くの変異が導入されていることを示している (上)。

F2では単離した単一の変異が検出される (下)。

(3) CaSR 欠損体の表現系解析

(3)- 消化酵素分泌への影響

摂餌後の腸内容物中の消化酵素活性を比較したところ、測定した 3 種類の消化酵素いずれにおいても摂餌後 3 時間では wt と CaSR 欠損魚に差はみられなかった。一方、摂餌後 6 時間目には CaSR 欠損魚の腸内容物消化酵素活性は wt よりも劣っており、CaSR が欠損することで消化酵素の分泌量が減少したものと考えられた。

(3)- 栄養組成が異なる飼料で飼育した際の成長の比較

栄養組成が異なる 3 種類の飼料を用いて wt と CaSR 欠損魚の成長を比較したところ、HP/LL 飼料の飼育では wt と CaSR 欠損魚ともに他飼料よりも成長が劣っていた。wt は MP/ML 飼料での飼育成績が最も良く、次いで LP/HL 飼料も同等の高成長を示した。一方、CaSR 欠損魚は、LP/HL 飼料での成長が wt の MP/ML 飼料よりも良く、MP/ML 飼料での成長成績は HP/HL 飼料と同程度に劣っていた。また、MP/ML 飼料での飼育においては CaSR 欠損魚の成長は wt に対して大きく劣っており、CaSR 欠損魚では飼料タンパク質の利用能力が低下していたと考えられる。ほ乳類の CaSR は、アミノ酸やペプチドを検知して消化を誘導することが知られており、魚類においても同様のメカニズムが存在することが示唆される。また、試験飼料による飼育を開始するまでの期間 (孵化後 20 日まで) は、同条件で飼育していたにも関わらず、CaSR 欠損魚の肥満度が wt よりも小さく、卵黄吸収期における代謝活性の違いが示唆された。

(3)- 代謝活性への影響

上記(3)-2 の飼育試験において wt と CaSR 欠損魚の間に代謝活性の違いが示唆されたことが

ら、実際の代謝量を確認するため、受精後から孵化後 21 日目までの個体における呼吸量（酸素消費量）を測定した。その結果、孵化直後 CaSR 欠損魚の呼吸量は wt よりも大きく、CaSR が欠損することで仔魚期の代謝活性が増加し、卵黄吸収が早まることで肥満度が減少するものと推測された。

(3)- 栄養代謝調節に関わる各種遺伝子発現への影響

栄養代謝調節への影響を広く調べるため、摂食や消化、代謝調節に関わる遺伝子発現量を測定した。wt に対して CaSR 欠損魚では幼魚期または成魚期の頭部（または脳）では摂食関連遺伝子の発現量が増加しており、CaSR 欠損によって食欲が亢進することが示唆された。体部または腸管部における *cck* 等の消化や代謝関連遺伝子の発現量は CaSR 欠損魚で低い傾向にあり、消化や代謝が抑制されることが示唆された。ただし、遺伝子の種類によっては仔魚期と幼魚期または成魚期とでは傾向が異なる場合があり、成長に応じて役割を一部変化させているのかもしれない。また、CaSR とは別の栄養素受容体の発現量も比較したところ、wt に対して増加しているものが確認され、CaSR が欠損することで栄養素認知に補償機構が働いているものと推察された。

(4) その他の副次的成果

ほ乳類では CaSR 欠損によって重篤な障害を発症するが、副甲状腺ホルモン (PTH) を同時に欠損させることでその障害がレスキューされる。本研究においても CaSR 欠損による障害対策として、PTH 欠損魚の作出も同時に進めていた。魚類では CaSR 欠損によって目立った障害は確認されず、結果的に PTH 欠損魚は不要となったが、本過程で魚類では PTH 欠損によると思われるこれまでに報告のない障害が確認された。魚類における PTH 欠損による影響の詳細な解析は今後の課題となるが、本研究課題の副次的成果として当初予想していなかった知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Gomes Ana S., Vacca Francesca, Cinquetti Raffaella, Murashita Koji, Barca Amilcare, Bossi Elena, Ronnestad Ivar, Verri Tiziano	4. 巻 318
2. 論文標題 Identification and characterization of the Atlantic salmon peptide transporter 1a	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C191 ~ C204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00360.2019	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 該当する
1. 著者名 Vacca, F; Bossi, E; Gomes, AS; Cinquetti, R; Barca, A; Verri, T; Murashita, K; Ronnestad, I;	4. 巻 227
2. 論文標題 Functional analysis, properties and kinetics of a PepT2-type di/tripeptide transporter of the Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>) highly expressed in midgut and hindgut	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACTA PHYSIOLOGICA	6. 最初と最後の頁 5-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/apha.13366	査読の有無 無
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 該当する
1. 著者名 Vacca, F; Bossi, E; Gomes, AS; Cinquetti, R; Barca, A; Verri, T; Murashita, K; Ronnestad, I;	4. 巻 227
2. 論文標題 Slc15a1 transporters in teleosts fish: PepT1a and PepT1b, comparative functional studies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACTA PHYSIOLOGICA	6. 最初と最後の頁 50-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/apha.13366	査読の有無 無
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 該当する
1. 著者名 Verri, T; Bossi, E; Barca, A; Del Vecchio, G; Mazzei, A; Piccinno, P; Vacca, F; Cinquetti, R; Murashita, K; Gomes, AS;	4. 巻 227
2. 論文標題 Diversity in proton movement and coupling to substrate in vertebrate PepT1 proteins: filling the gaps through the 'phylogenetic' approach	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACTA PHYSIOLOGICA	6. 最初と最後の頁 50-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/apha.13366	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Piccinno, G; Del Vecchio, G; Barca, A; Mazzei, A; Vacca, F; Cinquetti, R; Murashita, K; Gomes, AS; Bossi, E; Ronnestad, I;	4. 巻 227
2. 論文標題 SoLute Carrier (SLC) genes expression along the rostro-caudal axis of adult teleost fish gut: a publicly available datasets analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACTA PHYSIOLOGICA	6. 最初と最後の頁 112-112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/apha.13366	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Ana S. Gomes, Ivar Ronnestad, Koji Murashita, Francesca Vacca, Raffaella Cinquetti, Amilcare Barca, Anders Aksnes, Elena Bossi, Tiziano Verri	4. 巻 33
2. 論文標題 Comparative Characterization of the Atlantic salmon, <i>Salmo salar</i> L., Di/Tripeptide Transporters PepT1a and PepT1b	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 村下 幸司	4. 巻 70
2. 論文標題 植物性原料主体飼料が養殖魚の消化機構に及ぼす影響	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 農村と都市をむすぶ	6. 最初と最後の頁 44-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Francesca Vacca, Ana S. Gomes, Koji Murashita, Raffaella Cinquetti, Roseti Cristina, Amilcare Barca, Ivar Ronnestad, Tiziano Verri, Elena Bossi	4. 巻 600.1
2. 論文標題 Functional characterization of Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i> L.) PepT2 transporters	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 2377-2400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP282781	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Ana S. Gomes, Ivar Ronnestad, Koji Murashita, Francesca Vacca, Raffaella Cinquetti, Amilcare Barca, Anders Aksnes, Elena Bossi, Tiziano Verri
2. 発表標題 Comparative Characterization of the Atlantic salmon, <i>Salmo salar</i> L., Di/Tripeptide Transporters PepT1a and PepT1b
3. 学会等名 Experimental Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Vacca, F; Bossi, E; Gomes, AS; Cinquetti, R; Barca, A; Verri, T; Murashita, K; Ronnestad, I;
2. 発表標題 Functional analysis, properties and kinetics of a PepT2-type di/tripeptide transporter of the Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>) highly expressed in midgut and hindgut
3. 学会等名 A Joint International Meeting Celebrating the 70th Anniversary of the Italian Physiological Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Piccinno, G; Del Vecchio, G; Barca, A; Mazzei, A; Vacca, F; Cinquetti, R; Murashita, K; Gomes, AS; Bossi, E; Ronnestad, I;
2. 発表標題 SoLute Carrier (SLC) genes expression along the rostro-caudal axis of adult teleost fish gut: a publicly available datasets analysis
3. 学会等名 A Joint International Meeting Celebrating the 70th Anniversary of the Italian Physiological Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Vacca, F; Bossi, E; Gomes, AS; Cinquetti, R; Barca, A; Verri, T; Murashita, K; Ronnestad, I;
2. 発表標題 Slc15a1 transporters in teleosts fish: PepT1a and PepT1b, comparative functional studies
3. 学会等名 A Joint International Meeting Celebrating the 70th Anniversary of the Italian Physiological Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Verri, T; Bossi, E; Barca, A; Del Vecchio, G; Mazzei, A; Piccinno, P; Vacca, F; Cinquetti, R; Murashita, K; Gomes, AS;
2. 発表標題 Diversity in proton movement and coupling to substrate in vertebrate PepT1 proteins: filling the gaps through the 'phylogenetic' approach
3. 学会等名 A Joint International Meeting Celebrating the 70th Anniversary of the Italian Physiological Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Murashita
2. 発表標題 Comparison of aquaculture systems between Japan and Norway
3. 学会等名 Seminars on sustainable aquaculture, resource enhancement and conservation of salmon and other species (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ana S. Gomes, Ivar Ronnestad, Koji Murashita, Francesca Vacca, Raffaella Cinquetti, Amilcare Barca, Anders Aksnes, Elena Bossi, Tiziano Verri
2. 発表標題 Comparative Characterization of the Atlantic salmon, <i>Salmo salar</i> L., Di/Tripeptide Transporters PepT1a and PepT1b
3. 学会等名 Experimental Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>村下 幸司、「成長のカギは養殖にあり！」低魚粉飼料実用化のカギ - 腸の栄養センサー解明へ、水産経済新聞 2020年10月16日</p>

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
研究協力者	ロンネスタッド イーバル (Ronnestad Ivar)	ベルゲン大学・教授	
研究協力者	ゴメス アナ (Gomes Ana S.)	ベルゲン大学・研究員	

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			
ノルウェー	University of Bergen			