

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19560776

研究課題名（和文）魚類による n-3 系高度不飽和脂肪酸生産系の創製

研究課題名（英文） Construction of Production of n-3 Poly Unsaturated Fatty Acid (PUFA) by Fish

研究代表者 田丸 浩 (Yutaka TAMARU)

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号：50324554

研究成果の概要：実験モデル動物として注目されている小型魚類のゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) に線虫由来の *fat-1* 遺伝子を導入したトランスジェニック個体の作出に成功した。さらに、得られたトランスジェニック系統を用いて脂肪酸組成を分析した結果、野生型と比較してエイコサペンタエン酸 (EPA C20:5) あるいはドコサヘキサエン酸 (DHA C22:6) などの n-3 系高度不飽和脂肪酸を多く含有していた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学、分子生物学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：ゼブラフィッシュ、*Fat-1* 遺伝子、FAE 遺伝子、n-3 系高度不飽和脂肪酸、n-6 系高度不飽和脂肪酸、メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

我が国で最も高い生産量を誇るマダイやブリ類などの海産養殖魚の種苗生産には、イワシなどからの魚粉に加えて、仔稚魚期の飼料にはエイコサペンタエン酸 (EPA) とドコサヘキサエン酸 (DHA) を強化したシオミズツボワムシやブラインシュリンプが給餌される。さらに、栄養強化される EPA や DHA もまた、サーモンなどから抽出されている。一方、近年の水産資源の枯渇にともない、イワシなどの魚粉の原料になっていた漁獲高が激減している (Nature Vol. 405, 1017 (2000))。また、中国などの養殖産業の新興国のあおり

を受けて、魚粉が高騰しているのが現状である。そこで、魚粉の代替飼料の開発ならびにイワシなどの魚粉に含まれる EPA や DHA などの n-3 系高度不飽和脂肪酸の生産系の開発が世界的にも強く望まれている。

一方、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律の規定に基づき、魚粉、ゼラチン、動物性油脂等の動物由来飼料（以下「魚粉等」という。）については、農林水産大臣の確認を受けた製造工程で製造されたものでなければ飼料には含まれてはならないこととなっており、輸入品についても「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の

規定に基づく動物由来たん白質及び動物性油脂の農林水産大臣の確認手続きについて」(平成17年3月11日付け16消安第9574号農林水産省消費・安全局長通知)に規定されており、同様に農林水産大臣の確認を受けることとなっている。これまでグローバルな流通で輸出入が行われてきた「魚粉等」についても法令により、確認申請書や輸入する魚粉等の製造事業場の一覧表、輸入する魚粉等の製造事業場から提出を受けた図面、輸入業者と魚粉等の製造業者との間で製造基準を遵守して魚粉等を製造する等の旨の契約書の写し、などの提出が義務づけられている。このような観点からも、本研究は水産養殖において資源の枯渇化に備えて、近い将来に重要な飼料成分となる「魚粉」を生産する技術開発に繋がるものと考えられる。

また一方、脂質はエネルギー源として必要なだけでなく、身体の機能を維持するために必要な必須脂肪酸や脂溶性物質の供給のためにも適量を摂取することがすすめられている。日本人の食事調査によると、年ごとに内容が変化しており、特に脂質エネルギー比が増加傾向にある。したがって、食事から摂取される脂質が肥満、高脂血症、糖尿病、高血圧あるいはガンの発症に影響を及ぼしていることが知られており、健康の維持と疾病(メタボリックシンドローム)の予防の観点からも脂質栄養を考えることは重要である。また特に、脂質の摂取が発ガンに影響を与えるという研究も多く、ある種の脂肪酸(n-6系多価不飽和脂肪酸またはn-6/n-3比の高い脂肪など)の過剰摂取が、乳ガンや大腸ガン、前立腺ガンの発ガンに促進的に働くことなどが一般に知られている。動物、植物、魚類由来の脂質の摂取割合として4:5:1が目安とされており、これは日本人の平均的摂取量と一致している。その一方で、動物、植物、魚類など食品の種類によって脂質成分が異なり、脂肪酸の種類により、生体に及ぼす影響に違いがあるため、脂質摂取に際しては摂取脂肪酸のバランスに配慮することが大切である。魚介類に含まれている脂肪酸に象徴的なものとして、EPAとDHAが挙げられるが、多価不飽和脂肪酸のなかでもリノール酸が低比重リポ蛋白(LDL)を低下させるのに対して、EPAは主として超低比重リポ蛋白(VLDL)を低下させる作用を有している。そこで本研究では、脂肪酸合成酵素遺伝子を導入したゼブラフィッシュにおける“網羅的トランスクリプトーム解析”と“脂質メタボローム解析”により世界で初めての研究成果が期待できる。

2. 研究の目的

線虫は哺乳動物と同様に、ホスファチジルコリン(PC)およびホスファチジエタノールアミン(PE)を主要なリン脂質とし、

ホスファチジルイノシトール代謝物を細胞内シグナリング伝達のツールとして活用している。また、ショウジョウバエや酵母とは異なり、アラキドン酸(AA, C20:4, n6)やEPA(C20:5, n3)などの高度不飽和脂肪酸(poly unsaturated fatty acid; PUFA)も豊富に含まれることから、リン脂質分子種の多様性を解明するうえで有用なモデル動物と考えられる。さらに、線虫はエサ由来のオレイン酸(C18:1, n9)を原料にPUFAを合成するが、エサとなる大腸菌にはPUFAが全く含まれないことから、各fat変異体では基質となる脂肪酸が蓄積し、それ以降の脂肪酸が存在しない。一方、ヒトを含む哺乳動物ではDHA(C22:6, n3)やアラキドン酸が主要なPUFAであるが、線虫には炭素数20の脂肪酸鎖を基質とする脂肪酸伸長酵素がないため、炭素数22のPUFAは存在せず、EPAがPUFA合成系の最終産物として豊富に含まれている。ゲノムシーケンズプロジェクトが完了したフグや間もなく完了予定のゼブラフィッシュなどの魚類は、ヒトとほぼ同じ遺伝子数を保有することが明らかになっている。したがって、魚類の脂質代謝関連酵素を遺伝子工学的に改変することで、脊椎動物に共通する基本的な脂質代謝のメカニズム解明につながると考えている。また、これまでの線虫由来の*fat-1*遺伝子に関する研究で、本遺伝子をマウスに導入してn-3系PUFAを生産することに成功している(Nature Vol.427, 504 (2004))。また最近では、ブタでの組換えも試行されようとしている。しかしながら、いずれの動物も遺伝子組換え食品の問題から現在のところ商品化が極めて困難な状況である。一方、海産の養殖魚類の場合は自然な食物連鎖を含めてn-3系PUFAを蓄積するための飼料開発が重要な問題となっていることから、n-3系PUFAを生産した魚を開発することでイワシなどの魚粉原料の枯渇化を軽減させることに繋がると考えた。

本研究では、実験モデル動物として注目されている小型魚類のゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)に線虫由来の*fat-1*遺伝子を過剰発現させることで生体内における脂質代謝を改変し、魚類による世界で初めてのn-3系高度不飽和脂肪酸の生産系の創製を目指す。さらには、線虫由来の*fat-1*遺伝子に加えて、ゼブラフィッシュ由来の $\Delta 6$ 脂肪酸伸長酵素($\Delta 6$ Fatty acid elongase; FAE)を高発現する予定であり、その結果としてn-6系脂肪酸を含む飼料だけを摂取したとしても、生体内で合成されるPUFAはEPA(C20:5)あるいはDHA(C22:6)が主要な最終産物となることを想定している。また、Fat-1および $\Delta 6$ 脂肪酸伸長酵素を高発現したトランスジェニック系統を作出・維持する

ことで、脊椎動物における n-3 系 PUFA の代謝ならびに機能解析を目指す。

3. 研究の方法

(1) 線虫 *fat-1* 遺伝子を組込んだ全身発現性プラスミドの構築

①線虫 *Caenorhabditis elegans* の *fat-1* 遺伝子は、国立遺伝学研究所 生物遺伝資源情報研究室の小原雄治博士より、cDNA ライブラリーから yk1430h09 をベクター pME18S-FL3-3 に組み込んだプラスミドを譲渡して頂いた。ゼブラフィッシュ全身発現用ベクターであるプラスミド pXI-EGFP-His・Tag を用いて EGFP 遺伝子部分を制限酵素により切り出し、同部位に *fat-1* 遺伝子を組み込むことで Fat-1 への His・Tag の付加を行った。得られたプラスミドを pXI-1000pro-fat1-His と命名した。

②プラスミド pXI-1000pro-fat1-His の *fat1*-His・Tag 領域をインサートとし、全身発現性のプラスミド pXI-YFP(i) をベクターとして以後の実験に用いた。プラスミド pXI-YFP(i) の 5' 末端付近に認識配列を有する *Not I*、pXI プロモーター直前に認識配列を有する *Asis I*、プラスミドの 3' 末端付近に認識配列を有する *Pac I* をそれぞれ組み合わせることで消化することにより、同プラスミドに組み込まれた遺伝子をプロモーター領域ごとタンデムに連結することが可能である。なお、*Asis I* 切断サイトおよび *Pac I* 切断サイトは互いに compatible である。さらに、プラスミド pXI-1000pro-fat1-His の *fat1*-His・Tag 領域を鋳型とし、制限酵素 *Sfi I* の認識配列を 5' 側に有する 2 種類のプライマーを用いて PCR 法により制限酵素認識配列を付加したインサート DNA の増幅を行った。

③プラスミド pXI-fat1-His(i) をインサートとし、プラスミド pXI-EGFP(i) をベクターとして以後の実験に用いた。プラスミド pXI-EGFP(i) は、*Sfi I* を用いてプラスミド pXI-YFP(i) の YFP 遺伝子領域を EGFP 遺伝子と組換えたプラスミドである。*Asis I* および *Not I* を用いてプラスミド pXI-fat1-His(i) を消化し、インサート DNA とした。また一方、*Pac I* および *Not I* を用いてプラスミド pXI-EGFP(i) を消化し、ベクター-DNA とした。これらをライゲーションすることで、最終的に構築されたプラスミドを pXI-EGFP-pXI-fat1-His(i) と命名した。

(2) ゼブラフィッシュ *fae* 遺伝子を組込んだ全身発現性プラスミドの構築

上記 (1) に示す方法で、プラスミドベクター pXI-DsRed に対して、当研究室で既にクローニングしていたゼブラフィッシュ $\Delta 6$ 脂肪酸鎖伸長酵素 (FAE) 遺伝子 (*ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids like*) を連結し、最終的に構築された

プラスミドを pXI-DSRed-pXI-FAE-myc と命名した。

(3) マイクロインジェクション

構築されたプラスミドのゼブラフィッシュ受精卵への注入は、マイクロインジェクション法にて行った。マイクロインジェクション用の針の作製は、初めにガラスキャピラリー (NARISHIGE 芯入硝子管 1×98mm GD-1) を NARISHIGE PB-7 を用いて針状に引き延ばした。次に、研磨器 NARISHIGE EG-4 を用いて伸ばしたガラス管の先を 30 度の角度で研磨した。最後に、インジェクション針をホルダーにセットし、シリンジで空気を送り込みつつ水中で排出する泡の形状を確認した。加えて、実体顕微鏡にて針先端の形状を確認した。また、マイクロインジェクション用のアガープレートは、スライドガラスをメトリシャーレに立てかけて 2%アガーを固めた。次に、スライドガラスを外し、アガープレートに V 字型の溝をつくった。注入するプラスミド DNA は、滅菌超純水にて 50ng/ μ l に調製し、20 μ l のサンプル溶液に対して 0.5 μ l のフェノールレッド指示薬 (Sigma) により着色した。マイクロインジェクションは、マイクロインジェクション用のアガープレートに受精卵を並べて手動にて行った。なお、インジェクション操作はできる限り 1 細胞の間 (30-40 分以内) に行った。

(4) 蛍光顕微鏡による蛍光タンパク質の観察

プラスミドを注入したゼブラフィッシュ胚を所定の時間 28°C にて培養の後、蛍光顕微鏡にて観察した。蛍光顕微鏡は、ECLIPSE E600 (NIKON) を使用した。EGFP の観察には、B-2A フィルターカセットを使用した。YFP の観察には、YGFP フィルターカセットを使用した。また、DsRed の観察には G-2A フィルターカセットを使用した。

(5) ガスクロマトグラフィーによる全脂肪酸組成解析

①受精後 48 時間のゼブラフィッシュ野生型およびトランスジェニック個体から n-ヘキサンを用いて脂質を抽出し、全脂肪酸をメチルエステル化した後、抽出・精製した。これをガスクロマトグラフィーに供し、得られた結果から成長に伴うゼブラフィッシュ野生型の全脂肪酸組成の変化を解析した。すなわち、採取した胚は HS を除去して n-ヘキサン 0.5mL を添加し、ダウンス型ガラスホモジナイザー (WHEATON 社) を用いて胚が完全に懸濁するまでホモジナイズした。この上清を 10mL 容遠沈管に移し、ホモジナイザーの方には新たに n-ヘキサン 0.5mL を加えて、本体内部やペッセルに付着したホモジナイズ液を再懸

濁した後、この上清も先の遠沈管に移した。これを 25,000rpm にて 2 分間遠心分離した後、上清のみを別の遠沈管に移した。これをデシケーターで室温にて一晩減圧処理し、溶媒を蒸発乾固させた。

②全脂肪酸のメチルエステル化および抽出は、脂肪酸メチル化キット(ナカライテスク)を用いて行った。即ち、溶媒を蒸発乾固させたゼブラフィッシュ全脂質サンプルに、メチル化試薬 A を 0.5mL 添加した。続いて、メチル化試薬 B を 0.5mL 添加し、振盪混和して全脂質を再懸濁した後、37°C にて 60 分間インキュベートした。次に、メチル化試薬 C を 0.5mL 添加し、37°C にて 20 分間インキュベートした。続いて、抽出試薬 1mL を添加し、ボルテックスにてよく攪拌した。これを 25,000rpm にて 3 分間遠心分離し、2 層に分離した上部のヘキサン層を新しい遠沈管に移した。ここにイオン交換水 3mL を添加し、激しく振盪して洗浄した。続いてこのヘキサン層を別の容器に移し、メチル化脂肪酸精製キット(ナカライテスク)を用いて脂肪酸メチルエステルの精製を行った。すなわち、予め前洗浄液 3mL を注入して洗浄した、キット付属のシリカゲルカートリッジに、脂肪酸メチル化キットを用いてメチル化した溶液を注入し、脂肪酸メチルエステルを吸着させた。次に、洗浄液 3mL を注入し、洗浄した。続いて、溶出液 3mL を注入し、カートリッジから溶出する脂肪酸メチルを回収した。これをデシケーターで室温にて一晩減圧処理し、溶媒を蒸発乾固させた後、少量の n-ヘキサンを加えて再懸濁したものをガスクロマトグラフィーに供した。

③ガスクロマトグラフィーによる検出は、以下の条件で行った。

Column : VARIAN Capillary Columns CP-Sil 88 for FAME

Column Temp : 180°C (20min) → 5°C/min → 220°C

Inj Temp : 270°C Det Temp : 300°C

Detector : FID

Injection Method : Split

Injection Volume : 1μL

4. 研究成果

(1) 線虫 *fat-1* 遺伝子導入トランスジェニック個体の作出

レポーターとして GFP 遺伝子をタンデムに連結した *fat-1* 遺伝子全身発現性プラスミドベクターをゼブラフィッシュ受精卵にマイクロインジェクションした結果、24hpf において GFP を発現している受精後 24 時間 (24 hpf) の個体 (F0) が確認できた (Fig. 1)。さらに、得られたトランスジェニック個体 (F0) を飼育して野生型の魚と交配し、再度 GFP 発現個体 (24 hpf) をスクリーニングした。

その結果、F0 世代よりもさらに全身に GFP を発現した F1 世代が得られた (Fig. 2)。

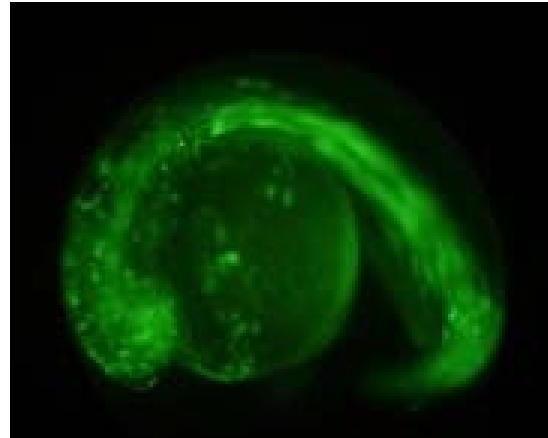


Fig. 1. 線虫 *fat-1* 遺伝子導入個体 (F0)

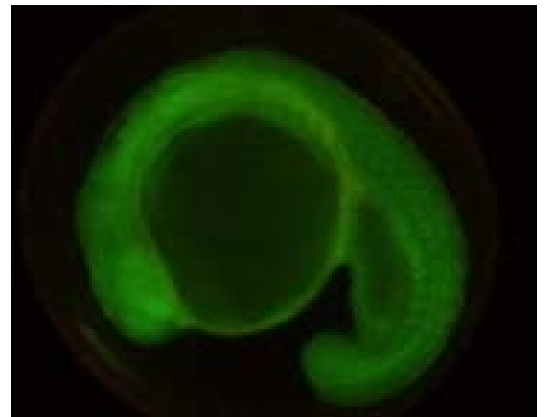
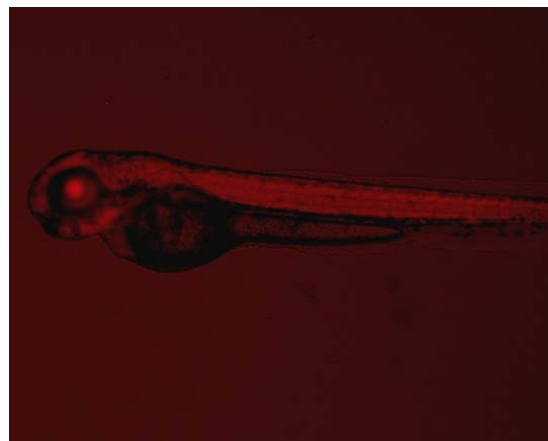


Fig. 2. 線虫 *fat-1* 遺伝子導入個体 (F1)

以上の結果、線虫由来の *fat-1* 遺伝子を保有するトランスジェニック系統の作出に成功した。

(2) ゼブラフィッシュ *fae* 遺伝子導入トランスジェニック個体の作出

上記の線虫由来の *fat-1* 遺伝子と同様に、ゼブラフィッシュ由来の *fae* 遺伝子の導入を試みた。その結果、DsRed を全身で発現するトランスジェニック個体 (48 hpf) の作出に成功した (Fig. 3)。



(3) 線虫 *fat-1* 遺伝子導入トランスジェニック個体における脂肪酸組成の分析

ゼブラフィッシュ野生型 48hpf 胚では、C16:0 のパルミチン酸、C18:2n-6 のリノール酸、C22:6n-3 の DHA が高い割合で蓄積していた。また、5dpf 胚では発生過程において新たに合成された飽和脂肪酸の割合が増加し、C18:1n-9 のオレイン酸およびリノール酸の割合が減少していたが、n-3 PUFA の割合は維持されていた。一方、3mpf の成魚においては n-3 PUFA の割合が大きく減少し、リノール酸ならびに C18:3n-3 の α -リノレン酸の割合が増加していた。

ゼブラフィッシュ野生型 (WT) の脂肪酸組成における n-6 系と n-3 系の構成比は、 $n-6/n-3=0.63$ であった (Table 1) のに対し、線虫 *fat-1* 遺伝子導入胚 (TG) ではその比が 0.47 であった (Table 2)。また、EPA は 0.8% (WT) から 2.7% (TG) に、DHA は 14.7% (WT) から 17.4% (TG) に、それぞれ増加していた。以上の結果より、線虫 *fat-1* 導入ゼブラフィッシュでは導入された Fat-1 酵素の働きにより n-6 系から n-3 系へ変換され、EPA および DHA が WT より増加したと考えられる。

Table 1. 野生型 (WT) の脂肪酸組成

0hpf	C14:0	0.9%	C18:3	4.2%
	C16:0	14.7%	C18:4	2.5%
	C16:1	0.7%	C20:4	3.7%
	C18:0	5.4%	C20:5	1.2%
	C18:1	39.7%	C22:5	0.7%
	C18:2	13.3%	C22:6	6.6%

$$n6/n3 = 1.12$$

48hpf	C14:0	0.5%	C18:3	0.5%
	C16:0	28.3%	C18:4	0.6%
	C16:1	1.5%	C20:4	4.1%
	C18:0	11.0%	C20:5	0.8%
	C18:1	19.3%	C22:5	0.8%
	C18:2	6.9%	C22:6	14.7%

$$n6/n3 = 0.63$$

Table 2. *fat-1* 導入個体 (TG) の脂肪酸組成

48hpf	C14:0	0.3%	C18:3	0.4%
	C16:0	26.6%	C18:4	0.6%
	C16:1	1.2%	C20:4	3.7%
	C18:0	10.5%	C20:5	2.7%
	C18:1	18.4%	C22:5	1.1%
	C18:2	6.7%	C22:6	17.4%

$$n6/n3 = 0.47$$

5. 主な発表論文等

(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 2 件)

(1) 柴田 敏行 (田丸 浩)、n-3 系脂肪酸合成酵素遺伝子 *fat-1* を導入したトランスジェニックフィッシュの創製、日本農芸化学会大会、平成 21 年 3 月 28 日、マリンメッセ福岡

(2) 石川 文啓 (田丸 浩)、n-3 系高度不飽和脂肪酸を合成するゼブラフィッシュの創出、日生化学会・日本分子生物学会合同大会、平成 20 年 12 月 12 日、神戸国際会議場

[その他]

日経産業新聞(全国版)2007 年 11 月 2 日(金)、ベンチャー面「魚使い抗体作製」

読売新聞(全国版)2007 年 11 月 26 日(月)、社会面「ヒト遺伝子の働きを観察」

科学新聞(週刊)2008 年 3 月 21 日(金)、7 面「日本農芸化学会シンポジウムから」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田丸 浩 (Yutaka TAMARU)

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号：50324554

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

柴田 敏行 (Toshiyuki SHIBATA)

三重大学・大学院生物資源学研究科・講師

研究者番号：50380796

三宅 英雄 (Hideo MIYAKE)

三重大学・大学院生物資源学研究科・助教

研究者番号：50362364