

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月6日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14982

研究課題名(和文) 魚類の還元的カロテノイド代謝に関わる新奇酵素の探索

研究課題名(英文) Studies on enzymes concerned with the reductive metabolism of carotenoids in fish

研究代表者

岡田 茂 (Okada, Shigeru)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：00224014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：一部の魚類は、アスタキサンチンという赤色カロテノイドを、ゼアキサンチンやルテインという黄色カロテノイドへと還元的に変換し、蓄積する代謝経路を有している。本研究では、この魚類におけるカロテノイドの還元的代謝に関与する酵素を明らかにすることを試みた。当該酵素の基質特異性に関する知見を得るため、ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対し、アスタキサンチンの三種立体異性体を個別に投与したところ、いずれもゼアキサンチンおよびルテインへと変換された。このことから当該酵素は、アスタキサンチンの立体構造の違いを認識せず、基質として用いることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、魚類に存在するアスタキサンチンの還元的代謝に関与する酵素の一部特性を知ることができた。この成果を基に、当該酵素が特定されれば、その反応メカニズムを解析することで、魚類におけるカロテノイド代謝を分子レベルで解明することが可能となり、魚類生化学、生理学への貢献度は非常に大きいものがあると考えられる。さらに、カロテノイドの還元的代謝経路を活性化させた魚を作り出すことができれば、餌にビタミンAの添加をしなくても健全な生育が可能な、ビタミンA要求性の低い新規養殖魚の作出も可能になる。

研究成果の概要(英文)：Several species of fish have a reductive pathway of carotenoids in which astaxanthin is converted into zeaxanthin or lutein. In this study, identification of enzymes concerned with the reductive metabolism of carotenoids in fish was tried. In order to obtain some information on substrate specificity of the enzyme that converts astaxanthin into zeaxanthin or lutein, medaka (*Oryzias latipes*) was fed with either of three stereoisomers of astaxanthin. As fishes fed with any stereoisomer of astaxanthin could accumulate more zeaxanthin and lutein than the control fish, it was suggested that the enzyme concerned with reductive conversion of astaxanthin does not distinguish stereoisomers of astaxanthin and can use them as its substrate.

研究分野：水産化学

キーワード：カロテノイド 魚類 代謝 酵素 還元 酸化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

各種魚類に特徴的な体色の発現には、多様な色素が関与している。中でもカロテノイド類は、魚体の色調を決定する重要な成分である。魚類は自身でカロテノイドを生合成できないことから、餌由来のカロテノイドを、様々な分子種に変換して蓄積している。そのため、投与される餌に依存して生育する養殖魚では、餌中のカロテノイド量が不足することにより、天然魚に比べ体色が劣化し、商品価値が下がることが過去には認められた。そこで養殖魚介類の体色改善を目的として、餌にカロテノイドを添加する「色揚げ」が行われ、それに伴う魚体のカロテノイド組成の変化が、詳細に調べられた。その結果、カロテノイド分子にケト基や水酸基等、酸素原子を含む官能基を導入することで、様々な分子種へと変換する「酸化代謝経路」が存在することが明らかになった。この酸化代謝経路は魚類以外でも、バクテリア、植物に共通して見られ、それらの生物では当該変換酵素遺伝子が特定されている。一方、ブリ等の魚種では、カロテノイド分子中の β -イオン環の 4 位にケト基を有している赤色カロテノイドである、アスタキサンチンを摂取すると、4 位のケト基がメチレンに還元されたツナキサンチンや、ゼアキサンチンという黄色カロテノイドに変換し、体表に蓄積することが知られている。哺乳類等では、 β -イオン環が酸化修飾を受けているカロテノイドを、プロビタミン A として利用することができないが、上記「還元的代謝経路」を有する魚種では、酸化修飾を受けている各種カロテノイドを、最終的には β -カロテンと同じ β -イオン環を有する分子種まで還元することで、プロビタミン A として利用できることが知られている。このカロテノイド分子中のケト基をメチレンへと変換する「還元的代謝」は、魚類以外の生物では希な経路であり、その変換に関与する酵素に関する情報は皆無であった。

2. 研究の目的

本研究では今までに全く知見の無い、魚類におけるカロテノイドの還元的変換に関する酵素遺伝子の同定を目的とする。ティラピアという魚種では、餌に含まれるカロテノイドの種類により、カロテノイドの酸化代謝と還元的代謝が切り替わる事が知られている。そこで、酸化度の低いカロテノイド、あるいは高いカロテノイドをそれぞれ含有する餌で飼育することにより、カロテノイド組成の変化したティラピア間において、mRNA の網羅的発現解析を行い、カロテノイドの還元的代謝に関与する酵素遺伝子の探索を行う。

本研究により、世界に先駆けてカロテノイドの還元的代謝に関与する、全く未知の酵素に関する情報が得られることになり、基礎科学上の意義は非常に大きいものと考えられる。また、当該酵素および反応メカニズムを明らかにすることにより、クレメンゼン還元代替として化学工学的に利用できる可能性がある。さらに組換え DNA 生物の利用に関するコンセンサスが必要ではあるが、当該還元型代謝酵素を過剰発現させることにより、異なる体色を持つという特徴の他、アスタキサンチン等のケトカロテノイドからプロビタミン A への変換能力を有し、ビタミン A 要求性が低い、「飼い易い」養殖魚の作出という水産増養殖業への展開も期待できる。

3. 研究の方法

(1) 魚体に蓄積するカロテノイドの一斉分析法の確立

魚類の各組織に存在するキサントフィル類は、一部の例外を除いて、脂肪酸エステルとして存在する。同一のキサントフィルであっても、異なる脂肪酸の分子種と結合したエステルは、順相クロマトグラフィーにおいても逆相クロマトグラフィーにおいても、互いに微妙に異なる挙動を示す。結果として、含有しているカロテノイド分子種が同一であっても、複数のピークに分離してしまい、同定および定量が困難となる。そこで、通常は水酸化カリウム等を用いたケン化反応を行い、カロテノイドの脂肪酸エステルを、遊離型のカロテノイドに変換した後に分析が行われる。しかしながら、アスタキサンチンの様に、 β -イオン環の 3 位に水酸基、4 位にケト基を有するカロテノイドでは、ケン化の際に元のカロテノイド分子種とは異なる化合物に変換されてしまう。これを防ぐために、コレステロールエステラーゼを用いた酵素処理法により、アスタキサンチン脂肪酸エステルを遊離型アスタキサンチンへと効率良く変換し、カロテノイド組成の分析を行う方法が報告されている(小河原ら, 2010)。そこで同法を参照し、順相系的高速液体クロマトグラフィーによる、アスタキサンチン、ゼアキサンチンおよびルテインの一斉分析法の確立を試みた。乳鉢と乳棒を用い、供試魚を無水硫酸ナトリウムとともに磨砕し、アセトンで繰り返し抽出を行った。抽出液は全て合一し、減圧濃縮後、アセトンで定容した。コレステロールエステラーゼ (*Pseudomonas* sp.由来) を 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) に溶解して酵素溶液を調製し、これを上記カロテノイドアセトン溶液に添加して、37 °C のウォーターバス中で振とうしながら反応を行った。反応終了後、*n*-ヘキサンを加えてカロテノイドを有機相に回収し、減圧濃縮後、アセトンで定容した。得られた試料液を、Phenomenex Luna 3 μ Silica カラム (150 mm x 4.6 mm) を用いた順相系高速液体クロマトグラフィーに付し、*n*-ヘキサン : アセトン (82 : 18) を移動相として、各カロテノイドの分離を行った。検出波長 450 nm におけるクロマトグラム上のピーク面積から、各カロテノイド量を求めた。なお、その際、アスタキサンチン、ルテインおよびゼアキサンチン標品を用いて検量線を作成した。

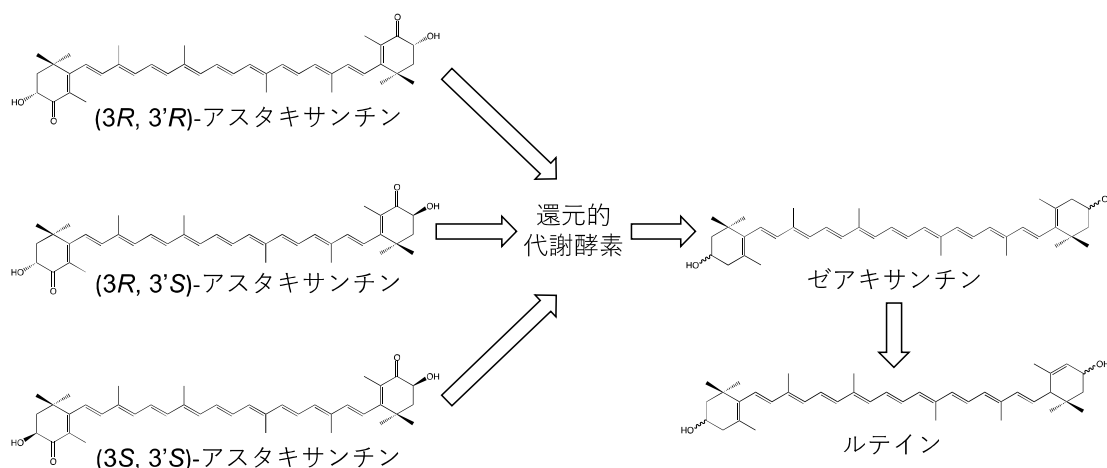
(2) アスタキサン還元酵素の基質認識性の確認

ティラピアという魚種では、餌に含まれるカロテノイドの種類により、カロテノイドの酸化代謝と還元的代謝が切り替わる事が知られている。そこで当初、酸化度の低いカロテノイド、

あるいは高いカロテノイドをそれぞれ含有する餌で飼育することにより、カロテノイド組成の変化したティラピア間において mRNA の網羅的発現解析を行い、カロテノイドの還元的代謝に関与する酵素遺伝子の探索を行うことを計画した。しかし、ティラピアを適切に飼育することができなかったため、同様に還元的なカロテノイドの代謝経路を有するヒメダカ (*Oryzias latipes*) を材料とすることにした。実際に、合成アスタキサンチンをヒメダカに投与し、ルテインやゼアキサンチン等が蓄積することを確認した研究は、すでに行われている(塩出・中田, 2017)。しかしながら、市販されている合成アスタキサンチンには、(3*R*, 3'*R*) 体、(3*R*, 3'*S*) 体および(3*S*, 3'*S*) 体という、-ヨノン環の 3 および 3' 位に存在する水酸基の立体化学が異なる、三種の立体異性体が混ざっており、アスタキサンを還元する酵素が、これらの立体構造の違いを認識し、各立体異性体間で基質としての利用効率が異なる可能性も考えられた。これに関連しギンザケでは、筋肉へのアスタキサンチンの蓄積率は、三種の立体異性体間で異なることが報告されている (Mori *et al.*, 1989)。そこで、当該アスタキサンチンの還元反応に関わる酵素の基質認識性、特にアスタキサンチンの立体化学に対する認識の有無を確認するため、アスタキサンチンの三種立体異性体を個別にヒメダカに投与した。ヒメダカ 100 尾を、カロテノイドを含有しない餌料で予め 3 週間飼育した後、25 尾ずつ個別の水槽に移し、アスタキサンチンの三種の立体異性体、(3*R*, 3'*R*) 体、(3*R*, 3'*S*) 体、および(3*S*, 3'*S*) 体それぞれを、餌料 100g 当たり 10 mg 含む餌を投与した「RR 群」、「Meso 群」、「SS 群」、およびカロテノイドを含有しない通常の餌料を投与した「対照群」の計 4 群を設定した。各群につき、当該餌料で 5 日間飼育した後、消化管に残存する餌料由来のカロテノイドの影響を排除するため、24 時間絶食させてからカロテノイド分析を行った。なお、ヒメダカには、雌雄で色素蓄積能が異なる系統が存在することが知られているため、より色素蓄積能が高い雄魚のみを供試魚とした。供試魚は断頭により即殺し、内臓を除去して体幹部のみを分析に供した。乳鉢と乳棒を用い、無水硫酸ナトリウムとともに試料を磨砕し、アセトンで繰り返し抽出を行った。抽出液は全て合一し、減圧濃縮後アセトンで定容し、分光光度計により可視部吸収スペクトルを測定することで、総カロテノイド量を求めた。

4. 研究成果

アスタキサンチンを投与した試験群の魚では、アスタキサンチンの立体化学の違いによらず、対照群の魚よりカロテノイド含量が高かった。また、本研究において飼育されたヒメダカにおいて、アスタキサンチン投与群および対照群ともに、アスタキサンチンは検出されなかったが、ゼアキサンチンおよびルテインが検出された。なお、異なるアスタキサンチンの立体異性体を投与した試験群間において、ゼアキサンチンおよびルテインの組成比に大きな差は認められなかった。これらのことから下図に示す様に、ヒメダカが有するアスタキサンチンの還元的代謝に関与する酵素は、アスタキサンチンの立体構造を認識せずに基質として利用できることが示唆された。



今回、アスタキサンチンを投与した魚体の体幹部から、分析の検出限界以上のアスタキサンチンが認められなかったことから、アスタキサンチンからゼアキサンチンやルテインへの変換は、色素胞を含む体表や筋肉中では無く、内臓部で行われている可能性が示唆された。したがって、適切な組織から得られた mRNA を用いてトランスクリプトーム解析を行うことで、アスタキサンチンの還元的な代謝に関与する酵素遺伝子を特定できる可能性があり、引き続き検討を行っていく予定である。

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〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。