

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22329

研究課題名(和文) 熱帯産シタピラメとの雑種化によりDHAを自ら合成可能なヒラメを作る

研究課題名(英文) introduction of novel fatty acid desaturase activities by hybridization in flatfishes

研究代表者

吉崎 悟朗 (Yoshizaki, Goro)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：70281003

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)：3機能性の脂肪酸不飽和化酵素を保持する淡水種である*Brachirus villosus*の精子をシマウシノシタの未受精卵と海水中で授精させた結果、少数ながら胚体形成が認められた。これらのF1個体が間違いなく雑種であることを確認するため、DNA解析を行った結果、両親種由来の2つのアリルを保持していることを確認した。以上、シマウシノシタの卵と*B. villosus*の精子が海水中で受精することが可能であり、得られた雑種は胚体形成期にまで発生可能であることを明らかにした。しかし、本課題ではその後の成長、さらには脂肪酸代謝活性の検証は行うことができず、今後の課題として残された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来淡水魚の精子は環境浸透圧の低下によって運動を開始するといわれてきたが、本研究では淡水産シタピラメの精子が海水中においても活性化可能であることが示された。この点は精子の活性化機構の全容を理解するうえで極めて意義深い発見である。本課題では生残性の雑種を得ることができなかったが、本課題を発展させることでDHAをALAから合成可能な雑種を作出することができれば、養殖生産時の魚油の使用量を大幅に減少させることが可能である。これは持続的食糧生産に大きく貢献するものとして期待される。

研究成果の概要(英文)：Sperm from *Brachirus villosus*, a freshwater species that retains a trifunctional fatty acid desaturase, were inseminated in seawater with unfertilized eggs of zebra sole, resulting in the formation of embryoid bodies, albeit in small numbers. To confirm that these F1 individuals were definitely hybrids, DNA analysis confirmed that they retained two alleles derived from both parental species. However, subsequent growth and even fatty acid metabolic activity could not be verified in this project, and this remains as a future issue.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：DPA 脂肪酸代謝 異体類 脂肪酸不飽和化酵素 EPA シタピラメ DHA

1. 研究開始当初の背景

ドコサヘキサエン酸 (DHA) は、海産魚に多く含まれ、ヒトの学習機能の向上やアレルギーの抑制効果が示されている。しかし、海産魚は、一般に自ら DHA を合成する能力を持ち合わせておらず、本脂肪酸は海産魚の重要な必須脂肪酸として知られている。植物性油脂に十分量含有されている α -リノレン酸 (ALA; 炭素鎖数: 18) から DHA (炭素鎖数: 22) を作るには 2 段階の炭素鎖数の延長 (18 → 20 と 20 → 22) と 3 か所に二重結合を導入すること (不飽和化) が必要である。また、この不飽和化の各ステップはそれぞれ個別の酵素が触媒することが一般的である。言い換えると海産魚は上記の炭素鎖数の延長と不飽和化を司る酵素類のいずれかを欠損しているため、DHA を自ら合成できないことが知られている。その結果、海産魚を養殖する際には DHA 要求を満たすために、飼餌料に魚油や DHA を含有する藻類を添加することが必要となっている。これには労力やコストを必要とするうえ、いわゆる“魚に魚を食べさせる養殖”からの脱却ができず、養殖業の持続性という観点からも問題が残る。

そこで、本研究では植物油に含有する ALA から DHA を合成可能な海産魚を作出することを目指した。研究代表者は、今までに脂肪酸不飽和化酵素 (以下 FADS) の cDNA を 21 種のヒラメ・カレイ類から単離し、その組換え体の酵素活性解析を精力的に進めてきた。これら一連の研究から、熱帯域に生息するシタピラメの仲間が、ALA から DHA を合成する際に必須な 3 か所 (6、5、4 位) すべてに二重結合を導入する (不飽和化する) 活性を保持した三機能性の FADS を持っていることを発見した。このような三機能性の FADS は、従来いずれの動物種でも認めておらず、今回の発見が全動物種を通じて初めてのものであった (Matsushita et al., 2020)。

2. 研究の目的

三機能性の FADS は ALA から DHA を生産する際に極めて有効なツールになることは明らかであるが、これらの酵素を遺伝子組み換え技術を用いずに養殖対象種に導入する方法の一例として、雑種化による当該アリの食用種への導入を目指した。三機能性の FADS を含む熱帯性のシタピラメゲノムを目的種に導入することができれば、脂肪酸の鎖長を延長する酵素と共同することで、高効率で DHA 合成が可能になると期待される。

そこで、本課題では生残性の雑種が得られる可能性が高いと予想される、同じ科 (ササウシノシタ科) 内での交雑を優先的に進めることで、事前に分子情報より予測した表現型が交雑により得られるか、すなわち本戦略を水産育種に応用することが可能であるかを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

この研究の成功には、まず両親種 (淡水種と海産種) の卵と精子が受精可能であり、得られた雑種が生残性であることが必須である。雑種作出には、三機能性の FADS を持つ熱帯産シタピラメとして *Brachirus villosus* を、本種の交配相手となる食用種としては、シマウシノシタを用いた。なお、本種は種苗生産時の飼餌料に DHA の添加が必要なことが明らかになっているうえ、6 不飽和化酵素を保持していないこと、さらに 5 活性は微弱あるいは欠如していることを確認済みであった。これら両親種からは必要に応

じて各種成熟関連ホルモンを投与することで配偶子を採用し、人工授精により次世代生産を目指した。また、淡水種の精子の活性化には各種人工精漿による精液の培養を試みた。また、淡水産の親魚候補の探索も継続して行った。このためには各候補種から *fads2* および *elovl* をクローニングし、組換え体を作成することでその活性を調査した。

4. 研究成果

産卵期中にシマウシノシタの親魚の収集を行った。しかし産卵期に房総半島沿岸の定置網で活魚の状態に漁獲されたシマウシノシタは雌のみであった。そこで、シマウシノシタを雌親に、ALA から DHA を合成可能な淡水種である *B. villosus* を雄親に用いて雑種作成を試みた。まず、シマウシノシタ雌親魚から安定的に採卵する技法構築を目指し条件検討を行った結果、腹部が膨満し卵黄蓄積が完了したと予測される個体に 500IU/Kg のヒト胎盤性生殖腺刺激ホルモン (hCG) を投与し、42 時間後から経時的に排卵を確認することで良質卵を高率で採取可能であることを見出した。なお、採卵に成功した場合、一個体から 10,000 粒程度の未受精卵の採取が可能であった。

同様の濃度の hCG を *B. villosus* に投与し、成熟精子を搾出することを試みたが、これらの処理個体から精液を得ることはできなかった。そこで、これらの親個体の精巣を外科的に単離した後、PBS 中でミンスすることで精巣精子の採取を行った。さらに、調整した精子懸濁液をシマウシノシタの未受精卵と海水中で授精させた結果、9320 粒のうち 2 粒が胚体形成期に到達した。これらの F1 個体が間違いなく雑種であることを確認するため (単為発生の可能性を否定するため)、DNA を抽出し、*fads2* 遺伝子に対するプライマーを用いた PCR を行った結果、両親種由来の 2 つのアリルを保持していることを確認した。本結果より、これらの胚体はまちがいに両種の雑種であることが判明した。以上の結果より、海産種であるシマウシノシタの卵と淡水種の *B. villosus* の精子が海水中で受精することが可能であり、得られた雑種は胚体形成期にまで発生可能であることを明らかにした。

しかし本雑種卵の受精率が極端に低かったため、海水中での *B. villosus* 精子の運動能の改良を試みた。本種の精子は上述のように精巣から直接調整したものであり、精巣精子が成熟する場である輸精管を通過していない。このことが低受精率の原因である可能性を考慮し、各種人工精漿中で精巣精子を培養することで精子の運動活性が上昇しないかを検証した。その結果、種々の人工精漿のうち、KCl と MgCl₂ を多く含有するクロダイ用の人工精漿 (pH8.2) で前処理を施すことで、わずかながら精子の活性化が可能であることが明らかとなった。

以上のように *B. villosus* を用いた雑種作出が難航したため、新たな雑種作出用の配偶子提供用の親魚候補種の探索を行った。その結果、東南アジア産の淡水型ササウシノシタである *B. harmandi* および *B. panoides*、さらには *Achiroides melanorhynchus* の脂肪酸代謝酵素の解析を進めた。これらはいずれも三機能性と予想されるアミノ酸配列を保持していた。特に、*B. harmandi* の *fads2* はシマウシノシタのそれと 89.89%、セネガルソールのそれと 88.54%、さらにササウシノシタと 86.29% の相動性を示した。また、本種の組み換え体を酵母の宿主系を利用して酵素活性を解析した結果、4,5,6 活性がそれぞれ 7.6、7.6、8.5% であることが明らかとなった。また本種からは鎖長延長酵素 *Elovl5* のクローニングにも成功しており、組み換え体を用いた活性解析を行った。その結果本種の *Elovl5* は C18 から C22 の脂肪酸を基質に鎖長延長が可能であること、特に C18 と C20 に対して高い活性を保持することが明らかとなった。これらの結果から、*B. harmandi* が上述の雑種作出用

の親候補としての条件を満たしていることが明らかになった。

以上、今回の研究では淡水産のシタビラメと海産シタビラメの雑種作出を実現することができなかったが、そのための基盤情報の蓄積には成功しており、今後これらの雑種作出の成功が期待される。

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 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshiyuki Matsushita, Kaho Miyoshi, Naoki Kabeya, Shuwa Sanada, Ryosuke Yazawa, Yutaka Haga, Shuichi Satoh, Yoji Yamamoto, Carlos Augusto Strussmann, John Adam Luckenbach, Goro Yoshizaki	4. 巻 3
2. 論文標題 Flatfishes colonised freshwater environments by acquisition of various DHA biosynthetic pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01242-3	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

1. 著者名 Asano Ishikawa, Naoki Kabeya, Goro Yoshizaki, Jun Kitanoら	4. 巻 364
2. 論文標題 A key metabolic gene for recurrent freshwater colonization and radiation in fishes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 886 ~ 889
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.aau5656	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

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松下芳之・木村隆志・壁谷尚樹・矢澤良輔・宇治督・吉崎悟朗
2. 発表標題 DHAを自ら合成できる海産魚新品種の開発を目指した 魚類脂肪酸不飽和化酵素の機能改変
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松下芳之・壁谷尚樹・千葉瑞萌・矢澤良輔・吉崎悟朗
2. 発表標題 カレイ目ウシノシタ科魚類においてDHA合成酵素遺伝子の独立した遺伝子重複が導いた多機能性獲得への収斂進化
3. 学会等名 第21回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉崎悟朗・木村和紀・松下芳之・鈴木聡志・永倉靖大・木南竜平・野田浩之・高木康次・岡本一利・三輪美砂子・芳賀 穰・佐藤秀一・壁谷尚樹
2. 発表標題 分子情報に基づくキンメダイ飼育技術の構築
3. 学会等名 第21回マリンバイオテクノロジー学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋庭陽介・松下芳之・脇健太郎・壁谷直樹・芳賀穰・佐藤秀一・吉崎悟朗
2. 発表標題 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子ノックアウトゼブラフィッシュの表現型解析
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松下芳之・川村 亘・壁谷尚樹・矢澤良輔・吉崎悟朗
2. 発表標題 海産回遊魚サンマにおけるDHA合成酵素の機能解析：サンマはDHAを自ら合成できる
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshiyuki Matsushita, Goro Yoshizaki
2. 発表標題 Structural basis of the trifunctionality of fatty acid desaturase in the freshwater sole <i>Brachirus villosus</i> from Papua New Guinea
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松下 芳之・川村 亘・壁谷 尚樹・矢澤 良輔・吉崎 悟朗
2. 発表標題 海産肉食性回遊魚であるサンマは完全なDHA合成経路をもつ
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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