

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05782

研究課題名（和文）チョウザメのメタボロミクスに基づいた肉・卵の高付加価値化に関する研究

研究課題名（英文）Metabolomics-based production of high value-added sturgeon meats and eggs

研究代表者

長沼 毅（Naganuma, Takeshi）

広島大学・統合生命科学研究科（生）・教授

研究者番号：70263738

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：初年度はベステルチョウザメの仔魚（1歳魚）を用いて、対照区には市販ニジマス餌を投与し、実験区には市販餌に乳酸あるいはベタインを添加した餌を投与して2回採血し、メタボローム解析に供し、代謝産物の網羅的データを得た。2年目は2回の採血および2回目の採血後に肉・脂の組織を採取し、メタボローム解析に供した。3年目は食品産業からの副産物、具体的には乳酸菌培養の「培養上清」およびテンサイ製糖の「廃糖蜜」を添加した餌を投与した。これらの実験区について血液・肉・脂を採取し、メタボローム解析に供した。現在、その解析結果の整理ならびに考察を行っているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チョウザメのメタボローム解析は本邦初である。予備的な解析からチョウザメの代謝産物（メタボライト）に乳酸とベタインが含まれることが分かったので、本研究ではチョウザメ餌料への乳酸あるいはベタインの添加効果を見ようとしたが、このような実験も本邦初である。さらに、乳酸あるいはベタインの供給源として、試薬だけでなく、産業副産物を用いたことに社会的意義がある。具体的には、乳酸源として乳酸菌培養液の培養上清を用い、ベタイン源としてテンサイ製糖における廃糖蜜を用いた。これらバイオ・アグリ事業からの副産物を利用することで循環型社会の構築への寄与も可能となった。

研究成果の概要（英文）：In the first year, 10 fish in experimental and control areas were fed either a commercial rainbow trout diet or the same diet enriched with 5% lactic acid or 5% betaine. Blood samples underwent metabolomic analysis.

In the second year, lactic acid and betaine were administered, with blood collected twice and metabolomic analysis conducted. After the second blood collection, meat and fat tissues were gathered from both experimental and control areas for further metabolomic analysis.

Third-year food was supplemented with food industry by-products, such as "culture supernatant" from commercial lactic acid bacteria culture and "waste molasses" from sugar beet processing, in place of lactic acid and betaine. Samples of blood, meat, and fat were taken from experimental areas, and samples of waste molasses or lactobacillus culture supernatant were added before being subjected to metabolomic analysis. We are currently organizing and debating this analysis's findings.

研究分野：環境バイオテクノロジー

キーワード：チョウザメ メタボライト メタボローム メタボロミクス

## 1. 研究開始当初の背景

チョウザメは、ダーウィンが『種の起源』で「生きた化石」と呼んだ硬鱗魚類の代表例である。2020年のチョウザメ類における初のアノテーション付ゲノム解析論文(コチョウザメ、<https://doi.org/10.1038/s41559-020-1166-x>)の冒頭でもチョウザメは frozen in time と評された。セキツイ動物では一般に全ゲノム重複が3~4回起きたことに対し、チョウザメ類では2回しかなく、セキツイ動物の祖先形質がよく保存されているからである。その一方、チョウザメ類(チョウザメ科の27ないし28種)では、多様で複雑な染色体異数化によるゲノム異数性がゲノム解析を困難にしている。実際、チョウザメ類の染色体数は、最少のコチョウザメ(120)から最多のシベリアチョウザメ(~437)まで大きく変動し、同種内での変動も小さくない。

チョウザメは長命の上、生きている間はずっと成長し続け、>100歳、体長>8mの個体もいる一方で、人為的な環境変動に弱いことに加え、高級食材であるキャビア(卵)や肉を狙った乱獲・密猟により天然個体数が激減している。そのため、チョウザメの養殖に大きな期待がかけられているが、チョウザメは成長と性成熟が遅く、孵化からキャビア生産まで十年以上かかる。そこで、①全メス化、②チョウザメ成長の加速、③チョウザメ肉・キャビアの高付加価値化の3点が養殖の普及(=天然個体群の保護)に向けて求められている。

- ① 全メス化は2019年12月、近畿大学チームがシベリアチョウザメにヒト女性ホルモンを添加した餌を与えて成功しており、植物エストロゲンを用いた研究も行っている。
- ② 成長加速については、餌に微生物を添加するプロバイオティクスあるいは成長が速い系統の選抜・育種が国内外で試みられている。また、腸管壁を構成するキチン質を増強するための昆虫由来の餌の投与も試みられている。
- ③ 肉・キャビアの高付加価値化については、基礎生物学的な研究開発は国内外でほとんど未着手であり、これに取り組む最初の一步として、チョウザメ肉・キャビアの高付加価値化に資する代謝特性の把握が、本研究の核心をなす学術的「問い」であった。

本研究に先立ち、本研究代表者は、本研究の申請に向けて自己資金で、国内初のチョウザメ・メタボロミクスをシベリアチョウザメの肉・脂・卵について予行した。その結果、水溶性メタボライトのうちアラニン、乳酸、ベタインなどが相対的に多く存在することが分かり、本研究の構想に資する知見となった。

## 2. 研究の目的

本研究はチョウザメの肉・卵の高付加価値化への新たな方向性として将来的な「メタボロミクスに基づいた代謝エンジニアリング」を想定し、チョウザメ・メタボロミクスの基礎知見を得ることを目的とした。代謝エンジニアリングを指向したゲノミクス(ゲノムマイニング)、すなわち、ゲノム情報からのトップダウン的な代謝マップ推定は上述の理由(染色体異数性、ゲノム異数性)による困難さが伴う一方、メタボロミクスに基づいてボトムアップ的に代謝マップを推定するところに将来性があり、そのための基礎知見を得ようとするものである。

具体的には予行的なメタボロミクスの知見に基づいて乳酸あるいはベタインを添加した餌をチョウザメに投与し、そのメタボロミックな効果の解析を目的とした。また、乳酸やベタインの供給源として試薬だけでなく、循環型社会構築への寄与を期して、バイオ・アグリ産業からの副産物を用いた同様の投与実験についてもメタボロミック効果の解析も目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3. 1. チョウザメ

チョウザメのメタボローム解析には、雌のペルーガ(*Huso huso*)と雄のコチョウザメ(*Acipenser ruthenus*)の雑種であるベステルチョウザメの2つの年齢群を用いた。年長魚は2019年4月に、年少魚は2020年4月に孵化し、研究開始時(2021年7月)にはそれぞれ約2.3歳と1.3歳であった。ベステルチョウザメは広島市内の広島蝶鮫から購入した。卵(キャビア)

を持っていることが明らかなメス個体 (>6 歳魚) は希少かつ高額であるため、研究に十分な個体数を入手できないと判断し、卵を持つ前(雌雄判別が可能になる前)で比較的安価な低齢魚を十分数購入することを選択した。その結果、当初目的であった「肉・卵の高付加価値化」については「肉」に焦点を合わせることとなった。一方、卵の代わりに血液と脂を分析対象とし、肉と共に食用に供される「脂」の高付加価値化を目指した基礎データの取得を期した。

### 3. 2. 餌の調製

対照区の年長魚と年少魚には、それぞれ速沈性の円柱状ペレット「4.5P」(幅約 2mm、長さ約 4.5mm)と「2P」(幅約 1mm、長さ約 2mm)を与えた。これらのペレットは株式会社科学飼料研究所製で、フィッシュミール、小麦粉、大豆オイルミール、コーングルテンミール、米ぬかオイルミール、リン酸カルシウム、飼料酵母、炭酸カルシウムから作られたものである。その成分は、粗タンパク質 45.0%以上、粗脂肪 6.0%以上、粗繊維 3.0%未満、粗灰分 15.0%未満、カルシウム 1.60%以上、リン 1.20%以上であった。

実験区のチョウザメには乳酸添加したペレットあるいはベタイン添加したペレットを与えた。乳酸添加ペレットは、最終的にペレット：乳酸の重量比が 10:1 となるように、株式会社武蔵野化学研究所のムサシノ乳酸 F(50% w/w L-乳酸)をペレットに添加し乾燥させて調製した。ベタイン添加ペレットは、最終的にペレット：ベタインの重量比が 10:1 となるように、試薬特級のベタイン溶液 (50% w/w) をペレットに添加し乾燥させて調製した。

実験開始から 577 日目に乳酸とベタインの供給源を変えた。バイオ・アグリ産業からの副産物として、乳酸については商業的な乳酸菌培養の培養上清液を用い、ベタインについてはテンサイ糖の製糖工程で発生する廃糖蜜を用いた。乳酸菌培養上清には約 10%の乳酸ならびに 0.1%未満のコハク酸、マロン酸などが含まれていた。テンサイ廃糖蜜には約 46%のベタインならびに 0.1%未満のマロン酸、シュウ酸などが含まれていた。乳酸菌培養上清液・テンサイ廃糖蜜はともに北海道糖業株式会社よりご提供いただいた。これらの乳酸・ベタイン供給源にシフトしてから 294 日後にチョウザメの血液、肉、脂を採取した。

### 3. 3. サンプル採取

2021 年 7 月 26 日を Day 0 として、血液および肉・脂のサンプルは以下の日程で採取した。

- Day 101 血液
- Day 169 血液
- Day 427 血液
- Day 546 血液、肉、脂
- Day 578 乳酸・ベタインの供給源シフト
- Day 872 血液、肉、脂 (シフト後 294 日目)

### 3. 4. メタボローム解析

血液サンプルは-80℃で保存され、標的メタボロミクス用にフレーク状ドライアイスで BGI (旧 北京ゲノム研究所、中国深圳) に輸送し、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析器 (LC-MS/MS) を用いて、以下の検出パネルで分析した。各パネル間で検出対象メタボライトが少しずつ異なるので、全体を通しての比較検討には各パネルに共通のメタボライトのみを比較した。

Day101 HM350、Day169 HM350、Day427 HM400、Day546 HM400、Day872 HM700

### 3. 5. バイオインフォマティクス

メタボロームデータは統計解析前に正規性を高めるために対数変換した。血液、肉、脂肪メタボロームプロファイルの関連性を可視化するために、主成分分析 **principal component analysis (PCA)** と階層的クラスタリング分析 **hierarchical clustering analysis (HCA)** および「潜在構造に対する直交射影 部分的最小二乗回帰 判別分析」**“orthogonal projections to latent structures” “partial least squares regression” “discriminant analysis” (OPLS-DA)** OPLS-DA を行った。これらの解析は LC-Bio Technologies Co. Ltd. のサーバーを用いてオンラインで実施した (<https://www.omicstudio.cn>)。また、2 つ以上のグループを比較し、各グループのバイオマーカーを見つけるために、ハーバード大学 T. H. Chan 公衆衛生大学院 (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/lefse/>) の生物統計学部 Huttenhower 研究室のサーバーを用いて、線形判別分析 **linear discriminant analysis (LDA)** に基づいた群間比較ツール「LEfSe」**linear discriminant analysis effect size** をオンラインで実施した。

## 4. 研究成果

メタボロミクスで得られるデータは網羅的で大量であり、公開データベースに登録したりオンラインサーバーを利用したりするためのデータの整理（不適当なデータの除去、フォーマットの調整など）に時間がかかる。また、大量のメタボロームデータを解析するためのバイオインフォマティクスにおいては、新しい解析ツールが日進月歩で開発されているので、それらの利用にはある程度の習熟期間が必要である。そのため、現時点で報告できる内容には限りがあることを前提として、以下に本研究の成果を Day101 (HM350)、Day169 (HM350)、Day427 (HM400)、Day546 (HM400) について報告する。

### 4. 1. 得られたメタボロームデータの概要

まず、検出パネル HM350 からは Day101 と Day169 でまったく同じ 244 種類のメタボライトが検出された。一方、検出パネル HM400 からは Day427 と Day546 でおおむね共通するが一部異なるメタボライトが検出されたので、それぞれのデータセットを HM400-1 (234 種類のメタボライト) および HM400-2 (266 種類のメタボライト) と名付けて区別した。これら HM350、HM400-1、HM400-2 におけるメタボライト種類数の分布（固有性と共通性）をベン図で示す（図 1）。

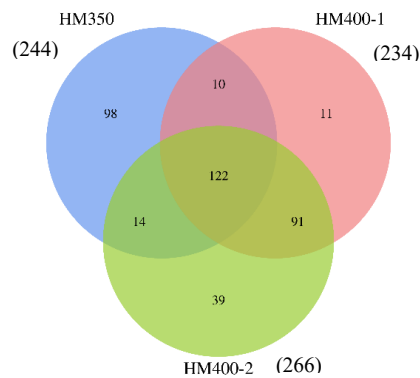


図 1. 3つのデータセット（HM350、HM4001-1、HM400-2）におけるメタボライト種類数の分布

これら3つのデータセットにおいて「検出されたすべてのメタボライト種類」（overall、385種類）と「すべてのデータセットに共通するメタボライト種類」（shared、122種類）について、メタボローム解析で標準的な分類（カテゴリー分け）を適用した結果の概要をサンバースト図で示す（図2、図3）。このサンバースト図における階層構造では、中央部にメタボライト種類数の合計値、最内環に大分類（super-class）、そのすぐ外に中分類（class）、再外環に小分類（sub-class）を示してある。図2左の「検出されたすべてのメタボライト種類」（overall、385種類）は8個のsuper-classes、22個のclasses、47個のsub-classesに分類された。また、図2右の「すべてのデータセットに共通するメタボライト種類」（shared、122種類）は7個のsuper-classes、13個のclasses、24個のsub-classesに分類された。

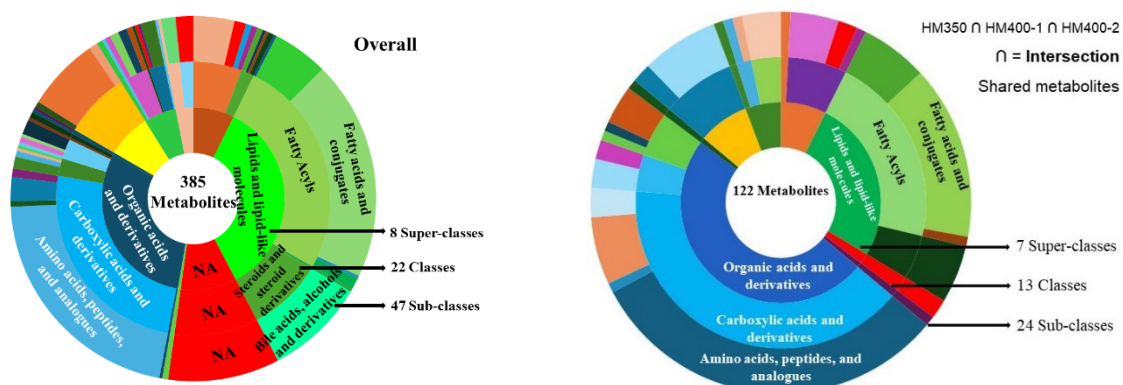


図 2. 3つのデータセットにおいて、（左）検出されたすべてのメタボライト種類（overall、385種類）の分類の概要、および（右）すべてのデータセットに共通するメタボライト種類（shared、122種類）

得られたメタボロームデータのバイオインフォマティクス解析には、図3の「3つのデータセットにおいて、すべてのデータセットに共通するメタボライト種類 (shared、122種類)」を用いた。

#### 4. 2. 得られたメタボロームデータの統計的解析

3つのデータセットには、計16個のサブセットが含まれている。サンプリング4回 (Day101、Day169、Day427、Day546)、添加物2種 (ベタイン、乳酸)、実験区と対照区の2区ということで、 $4 \times 2 \times 2 = 16$ である。理屈の上ではそれぞれの「対照区」は合一してもよいところだが、異なる水槽において大きさの異なるペレット餌で飼育したこともあり、ここでは別々に扱うこととする。これら16個のデータサブセットについて、主成分分析 principal component analysis (PCA) や階層的クラスタリング分析 hierarchical clustering analysis (HCA) により大まかなクラスタリング (クラスター解析) を行った。

本研究ではさらにバイオマーカー探索を考慮して「潜在構造に対する直交射影 部分的最小二乗回帰 判別分析」“orthogonal projections to latent structures” “partial least squares regression” “discriminant analysis” (OPLS-DA) という新手法を用いた。その結果について、16個のデータサブセットのうち、8個のデータサブセットがまとめられている HM350 のデータセット (Day101 と Day169) の4群\* について OPLS-DA を適用した。この結果によると、対照区同士は分離が大きく合一しがたいことが分かった。また、各添加物において実験区と対照区は分離できていることも分かった。これらの群を分離させている要因となるメタボライト (バイオマーカー・メタボライト) について、次節で検討する。

\* Day101&169 をまとめたベタイン実験区と対照区、および、Day101&169 をまとめた乳酸実験区と対照区の計4群

#### 4. 3. 得られたメタボロームデータのバイオインフォマティック解析

メタボロミクスに適用できるバイオインフォマティクスの解析ツールは多種多様であり、日進月歩で新手法が開発されている。ここでは線形判別分析 linear discriminant analysis (LDA) に基づいた群間比較ツール「LEfSe」linear discriminant analysis effect size を適用した結果について報告する。LEfSe では各群におけるバイオマーカーを見つけることができる。本研究では16個のサブセットのそれぞれについて指標となるメタボライトを見つけることができる。あるいは、たとえば、各サンプリング回の指標でもよいし、ベタイン実験区の指標でもよい。ここでは、8個のサブセットが含まれる HM350 (Day101 と Day169) の4群について、それぞれについての指標メタボライト (バイオマーカー・メタボライト) について LEfSe を適用した結果を報告する。

線形判別分析 (LDA) の閾値スコアを1.0にした場合のバイオマーカー・メタボライトのトップ1、2位を以下に挙げる：

Day101&169 ベタイン実験区：ホモバニリン酸 (HVA)、パラアミノ安息香酸 (PABA)

Day101&169 ベタイン対照区：4-ヒドロキシマンデル酸、イタコン酸

Day101&169 乳酸実験区：オレイルカルニチン

Day101&169 乳酸対照区：L-プロリン、ドコサヘキサエン酸 (DHA)

実験区のバイオマーカー・メタボライトは「ベタインあるいは乳酸の添加により上昇したメタボライト」である。一方、対照区のバイオマーカー・メタボライトは「ベタインあるいは乳酸の添加により下降したメタボライト」である。これは上昇したから良い、下降したから悪いというものではなく、それらのメタボライトを生成あるいは消費する代謝経路に変化が生じたことを示す指標である。つまり、バイオマーカー・メタボライトは「代謝経路の変化の指標」であり、今後は対象となる代謝経路の抽出とその変化が意味することの考察を行うことになるが、この成果報告においてはまだそこに至っていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Liu Qi, Naganuma Takeshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Tissue-specific Biomarker Metabolites of Meat, Fat and Egg of Siberian Sturgeon	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Food and Nutrition Research	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12691/jfnr-12-1-1	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 -

1. 著者名 Naganuma Takeshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Profile of Lipids in Meat, Fat, and Egg of Siberian Sturgeon	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Food and Nutrition Research	6. 最初と最後の頁 642~654
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12691/jfnr-10-10-2	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 -

1. 著者名 Takeshi Naganuma	4. 巻 9
2. 論文標題 Profile of aqueous metabolites in Siberian sturgeon	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Food and Nutrition Research	6. 最初と最後の頁 648 - 656
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12691/jfnr-9-12-5	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長沼 毅
2. 発表標題 シベリアアチョウザメの水溶性メタボロームの予察的解析
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

〔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
---------	---------