

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 7 月 31 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380123

研究課題名(和文)海産魚への脂肪酸代謝酵素遺伝子群の導入：植物油で魚を作る

研究課題名(英文) Modification of the fatty acid biosynthetic pathway by transgenesis in a marine teleost

研究代表者

吉崎 悟朗 (YOSHIZAKI, Goro)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授

研究者番号：70281003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：海水魚の多くは必須脂肪酸としてEPAやDHAを要求するため、魚油を飼餌料に添加する作業が行われている。本研究では魚油を用いず、植物油のみで海水魚を養殖することを最終的な目標とし、脂肪酸代謝酵素遺伝子を個体に導入することで、その脂肪酸代謝系を改変可能であるかを解析した。ヤマメから単離した脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子を二べに導入することで二べの肝臓におけるDPA含量が通常個体の2.28倍に増加した。さらに、通常は検出されないTPAが遺伝子導入個体では常時検出され、外来の鎖長延長酵素が予想通り個体内で機能したことが明らかとなった。以上、遺伝子導入系により脂肪酸代謝系の改変が可能であることが確認された。

研究成果の概要(英文)：Marine fishes are generally unable to produce sufficient eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). It is therefore necessary to supplement cultured marine fish species diets with fish oils to supply EPA and DHA. Given that freshwater fishes can synthesize both EPA and DHA, they presumably express all of the enzymes required for this pathway. Therefore, we used marine fish, nibe croaker to produce a transgenic line carrying the elongase gene isolated from masu salmon. Fatty acid analysis revealed that the liver EPA content in the transgenic fish was lower. However, docosapentaenoic acid content in the transgenic fish was 2.28-fold higher than in non-transgenic fish. Further, tetracosapentaenoic acid was specifically detected in the transgenic fish. We therefore conclude that the development of transgenic fish lines with these fatty acid-metabolizing enzymes could be a powerful tool for manipulating fatty acid metabolic pathways in fish.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：脂肪酸代謝酵素 海産魚 遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

海産魚養殖においては、飼料中の油脂源として、魚油を添加する操作が必須となっている。しかし、魚油の生産量は原料の漁獲量に依存しているため非常に不安定であり、より安定的に供給可能な油脂源である植物油への代替が急務である。ところが、植物油には多くの海産魚にとって必須脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA, 20:5n-3) およびドコサヘキサエン酸 (DHA, 22:6n-3) といった高度不飽和脂肪酸が含まれておらず、現状では植物油のみを使用した飼料で海産魚を養殖することは困難である。海産魚がこれら脂肪酸を要求する理由として、EPA・DHA 生合成経路に必須である脂肪酸代謝酵素遺伝子のいずれかを欠損あるいはその活性が非常に弱いためであると考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、これら海産魚に EPA・DHA の合成を可能にさせるための脂肪酸代謝酵素遺伝子を導入し、自ら EPA・DHA 合成が可能な遺伝子導入海産魚系統を作出することを目指した。

3. 研究の方法

各種脂肪酸代謝酵素はヤマメおよびアイゴの肝臓から PCR 法の組み合わせによりその cDNA 全長をクローニングした。得られたクローンについては、サイクルシーケンシング法で全塩基配列を決定した。

遺伝子導入実験には、多くの有用海産魚種と同様に、飼料中に DHA を要求することが既に明らかとなっているニベ *Nibea mitsukurii* を海産魚のモデルとして用いた。

またニベへと導入するベクターに用いるプロモーターの選定はニベ肝臓の Expressed sequence tag により高発現遺伝子を同定することで行った。またこの配列はベクトレット PCR により単離した。これらの脂肪酸代謝酵素遺伝子とプロモーターを組み込んだ発現ベクターをマイクロインジェクション法によりニベの受精卵に導入した。得られた遺伝子導入個体は成熟まで飼育し、配偶子の PCR により生殖系列へと遺伝子導入されている個体を同定した。

給餌試験は遺伝子導入ニベと正常個体を交配することで得られた F2 集団を用い、試験後に、得られた個体を用いてガスクロマトグラフィーによる脂肪酸分析を行った。

各種脂肪酸代謝酵素の活性測定用の組換え体は酵母を宿主に用いて生産した。

4. 研究成果

まず、多くの海産魚が欠損していると考えられている長鎖不飽和脂肪酸鎖長延長酵素 2 (*elovl2*) 様遺伝子を淡水魚であるヤマメから単離した。単離した遺伝子を酵母で発現させ、その脂肪酸代謝能力を解析した結果、EPA

をドコサペンタエン酸 (DPA, 22:5n-3) へ、さらに DPA をテトラコサペンタエン酸 (TPA, 24:5n-3) へと転換する能力を有していることが明らかとなった。次に、生体内の主な脂肪酸代謝の場である肝臓で高発現している遺伝子が、14 kDa Apolipoprotein 遺伝子 (*Apo-14*) に高い相同性を示す遺伝子であると特定し、この遺伝子の上流 3 kb の領域とヤマメ *elovl2* 遺伝子を接続したヤマメ *elovl2* 遺伝子肝臓高発現ベクターを構築した。このベクターをニベ受精卵へ顕微注入し、得られた親魚の交配試験によってヤマメ *elovl2* 遺伝子導入ニベ系統を樹立した。

続いて、4ヶ月齢の各組織において *elovl2* 遺伝子の発現解析および脂肪酸分析を行った。その結果、*elovl2* 遺伝子導入個体においては、肝臓で特に高い *elovl2* 遺伝子の発現が認められた。脂肪酸分析の結果、*elovl2* 遺伝子が発現していない組織も含めた全組織から、非遺伝子導入個体では検出されなかった TPA (24:5n-3) が検出された。また、眼球、肝臓、精巣においては DPA (22:5n-3) の割合が非遺伝子導入個体と比較して上昇した (順に 1.6% vs 0.9%、4.1% vs 1.8%、3.4% vs 2.6%)。一方、DHA は非遺伝子導入個体と遺伝子導入個体間に有意な差異は認められなかった。

次に、ヤマメ *elovl2* 遺伝子導入系統の DHA 必須性について解析した。EPA・DHA の含有量に応じて三種類のアルテミアを用意し (未強化区、EPA 強化区、EPA・DHA 強化区) 26 日齢のニベ稚魚に 25 日間給餌した。その結果、生残率は非遺伝子導入個体、遺伝子導入個体に関わらず未強化区、EPA 強化区では EPA・DHA 強化区と比べて著しく低下し、ヤマメ *elovl2* 遺伝子導入系統は餌料中に DHA を要求することが明らかとなった。一方で、餌料に全く含まれていなかった DPA がいずれの給餌区においても遺伝子導入個体では増加しており、特に、餌料に DHA が含まれていない区の方が、DHA が含まれている区に比べて DPA の増加率は上昇していた。

ここまでの結果より、ヤマメ *elovl2* 遺伝子導入ニベ系統は少なくともアルテミア期においては餌料中に DHA を要求することが明らかとなった。しかし一方で、アルテミア期の稚魚では検出されなかった TPA は 2ヶ月齢から 4ヶ月齢の肝臓において増加傾向であり (1.3% vs 5.0%) 体内で、TPA が蓄積している可能性が示唆された。TPA の体内における機能的な解析はこれまで報告がなく、増加した TPA が DHA と類似の機能を保持する可能性が考えられたため、脂質クラス (中性脂質・極性脂質) ごとの脂肪酸組成を分析することで、TPA と DHA の存在様式を解析した。その結果、DHA の多くが極性脂質に偏在しているのに対し、TPA はそのほとんどが中性脂質に偏在しており、両者の機能的な差異が強く示唆された。以上より、DHA を合成可能な系統を作出しない限り、必須脂肪酸欠乏状態において生残率を改善することはできないこと

が強く示唆された。

しかし、蓄積した TPA をテトラコサヘキサエン酸 (THA, 24:6n-3) に代謝可能である 6 不飽和化酵素は現在までにその存在の報告がなく、TPA を介した DHA 合成の促進は困難であると考えられた。そこで、DHA と比べその存在量は非常に少なく、また存在様式も異なるが、給餌試験においていずれの区でも増加が認められた DPA に着目し、DPA を効率的に DHA へと転換可能な脂肪酸代謝酵素遺伝子の単離を試みた。具体的には、海藻食性の海産魚であるアイゴから、2 種類の不飽和化酵素遺伝子を単離し、その活性を解析した。その結果、一方の不飽和化酵素が 4 不飽和化活性を有していることが明らかとなった。今後は、この酵素を用いることで、ヤマメ *elov12* 導入系統で増加していた DPA を直接 DHA へと転換可能であると期待される。

以上、本研究ではヤマメから単離した *elov12* 遺伝子を二倍に導入し、その脂肪酸組成を改変することに成功した。将来的には、新規に単離した 4 不飽和化酵素遺伝子が導入された新たな系統と本研究で得られているヤマメ *elov12* 遺伝子導入系統を交配することで、EPA・DHA を自ら合成可能な系統を作出し、最終的には飼料中の油脂源を全て植物油に代替しても飼育可能な系統の樹立を目指したい。

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)

[雑誌論文](計 6 件)

N. Kabeya, Y. Takeuchi, Y. Yamamoto, R. Yazawa, Y. Haga, S. Satoh, G. Yoshizaki, (2014) Modification of the n-3 HUFA biosynthetic pathway by transgenesis in a marine teleost, nibe croaker. *J. Biotechnol.* 172, 46-54. 査読有

S. Boonanuntanasarn, A. Jangprai, G. Yoshizaki, (2012) Characterization of neuropeptide Y in snakeskin gourami and the change in its expression due to feeding status and melanocortin 4 receptor expression. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 279, 184-195. 査読有

A. Jangprai, S. Boonanuntanasarn, G. Yoshizaki. (2011) Characterization of melanocortin 4 receptor in Snakeskin Gourami and its expression in relation to daily feed intake and short-term fasting. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 173, 27-37. 査読有

Md. Al-Amin Sarker, Y. Yamamoto, Y. Haga, Md. Shah Alam Sarker, M. Miwa, G. Yoshizaki and S. Satoh. (2011)

Influences of low salinity and dietary fatty acids on fatty acid composition and fatty acid desaturase and elongase expression in red sea bream *Pagrus major*. *Fish. Sci.*, 77, 385-396. 173, 27-37. 査読有

Y. Yamamoto, N. Kabeya, Y. Takeuchi, K. Higuchi, T. Yatabe, K. Tsunemoto, R. Yazawa, T. Kawamura, G. Yoshizaki. (2011) Establishment of a stable transgenic strain in a pelagic egg spawning marine teleost, Nibe croaker *Nibea mitsukurii*. *Aquaculture*, 313, 42-49. 査読有

N. Phumyu, S. Boonanuntanasarn, A. Jangprai, G. Yoshizaki, U. Na-Nakorn. (2011) Pubertal effects of 17 α -methyltestosterone on GH-IGF-related genes of the hypothalamic-pituitary-liver-gonadal axis and other biological parameters in male, female and sex-reversed Nile tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 177, 278-292. 査読有

[学会発表](計 8 件)

Naoki Kabeya, Yutaka Takeuchi, Ryosuke Yazawa, Yutaka Haga, Shuichi Satoh, Goro Yoshizaki. Functional characterization of 6 desaturase from nibe croaker (*Nibea mitsukurii*). XVI International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, Australia, 28, May 2014.

Tomoko Itoh, Yutaka Haga, Reiji Masuda, Yohei Indei, Hikari Ohtoshi, Naoki Kabeya, Mizumo Chiba, Goro Yoshizaki, Shuichi Satoh. Gene expression of DHA and taurine synthesizing enzymes in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* juveniles fed on rotifers and *Artemia nauplii* enriched with DHA and taurine. XVI International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, Australia, 28, May 2014.

千葉瑞萌・壁谷尚樹・芳賀穰・佐藤秀一・矢澤良輔・竹内 裕・吉崎悟朗「アイゴの脂肪酸不飽和化酵素における二重結合導入位置の選択に関わる領域の探索」日本水産学会, 828, 北海道, 3月29日・2014年

Naoki Kabeya, Yutaka Takeuchi, Yoji Yamamoto, Ryosuke Yazawa, Yutaka Haga, Shuichi Satoh, Goro Yoshizaki. Modification of EPA/DHA biosynthetic

pathway by transgenesis in a marine teleost, nibe croaker. 10th International Marine Biotechnology Conference, Australia, 13, November 2013.

伊藤智子・芳賀穰・益田玲爾・印出井遥平・大歳光・壁谷尚樹・千葉瑞萌・吉崎悟朗・佐藤秀一「DHA・タウリン強化餌料がヒラメ仔稚魚のDHAおよびタウリン合成酵素の発現に及ぼす影響」日本水産学会, 321, 三重, 9月20日・2013年

壁谷尚樹・竹内裕・矢澤良輔・芳賀穰・佐藤秀一・吉崎悟朗「脂肪酸代謝酵素遺伝子導入二への作出-2 各組織における外来遺伝子の発現と脂肪酸組成」日本水産学会春季大会, 917, 東京, 3月28日・2013年

Naoki Kabeya, Yutaka Takeuchi, Yoji Yamamoto, Ryosuke Yazawa, Yutaka Haga, Shuichi Satoh, Goro Yoshizaki. Modification of fatty acid metabolic pathway by transgenesis in the nibe croaker (Nibea mitsukurii). XV International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, Norway, 6, June 2012.

壁谷尚樹・竹内裕・山本洋嗣・矢澤良輔・芳賀穰・佐藤秀一・吉崎悟朗「肝臓高発現ベクターを用いた脂肪酸代謝酵素遺伝子導入二への作出」日本水産学会秋季大会, 257, 長崎, 10月1日・2011年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 1 件)

名称： 4、 5 及び 6 脂肪酸不飽和化酵素、該酵素の製造方法、及び、該酵素を用いた不飽和脂肪酸の製造

発明者： 吉崎悟朗・矢澤良輔・千葉瑞萌・壁谷尚樹・竹内裕

権利者： 国立大学法人東京海洋大学

種類： 特許

番号： 特願 2014-64168

出願年月日： 平成 26 年 3 月 26 日

国内外の別： 国内

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉崎悟朗 (YOSHIZAKI, Goro)
東京海洋大学・大学院海洋科学技術研究科・教授
研究者番号： 70281003

(2) 研究分担者

佐藤秀一 (SATO, Shuichi)
東京海洋大学・大学院海洋科学技術研究科・教授
研究者番号： 80154053

芳賀穰 (HAGA, Yutaka)
東京海洋大学・大学院海洋科学技術研究科・准教授
研究者番号： 00432063

(3) 連携研究者

なし