

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

外来遺伝子導入による海産魚の脂肪酸代謝系の改変

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2014-06-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 壁谷, 尚樹 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/994

博士学位論文内容要旨
Abstract

専攻 Major	応用生命科学	氏名 Name	壁谷 尚樹
論文題目 Title	外来遺伝子導入による海産魚の脂肪酸代謝系の改変		

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。そこで、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。本研究では、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 *Nibe mitsukurii* を海産魚のモデルとして用いた。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 $\Delta 6$ 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 $\Delta 4$ 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 *elovl2* 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 *elovl2* 遺伝子をニベに導入し、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 $\Delta 4$ 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 *elovl2* 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。