平成 30 年度水産学奨励賞

水産動物の長鎖多価不飽和脂肪酸生合成酵素の多様性とその利用^a壁 谷 尚 樹^b

東京大学大学院農学生命科学研究科

Diversification of enzymes for biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in aquatic animals:
Implications for aquaculture.

NAOKI KABEYA^b*Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo, 113-8657, Japan*

1. はじめに

エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) といった名前をどこかで耳にしたことがある人は少なくないだろう。特に近年ではその健康効果に対する注目度の高まりから、水産生物とりわけ魚類に豊富に含まれる栄養素としてだけでなく、サプリメント等としても市販されている。この EPA や DHA とは結局何なのか？ というと、脂肪酸の一種、その中でも特に長鎖多価不飽和脂肪酸 (Long-Chain PolyUnsaturated Fatty Acid, LC-PUFA) と呼ばれるものの一種であると答えるのがシンプルであろう。LC-PUFA は分子中に二重結合を二つあるいは三つ以上持ち、炭素鎖長が 20 以上の脂肪酸と定義されることが多く、EPA や DHA 以外にも、アラキドン酸 (ARA) 等もその一種である。さて、この LC-PUFA であるが、1850 年代には当時工業的に重要だった鯨油等に含まれる成分として認識されていたようである。¹⁾ その後、1900 年代前半から水産動物の特異な脂肪酸成分を興味を中心として集中的に研究を行った例が見受けられるようになる。1918 年の著書、辻本満丸「水産動物油」には、『不飽和脂肪酸は海産動物油の主要なる成分なり。』と記されている。²⁾ この特異な不飽和脂肪酸は、その化学式も合わせて EPA や DHA として改めて定義されるわけだが、³⁾ このよう

も世界中の研究者や一般消費者が注目する物質であるというのは周知の事実である。

このように LC-PUFA については、多くの研究者が研究対象としてきた。筆者もまさにその一人であり、学生時代からその生合成経路に着目した研究を継続してきた。本稿では、筆者がこれまで興味を中心としてきた魚類の LC-PUFA 生合成経路の多様性について最新の研究成果も交えて詳説し、その基礎的知見の水産への応用法の一つとして遺伝子導入技術を用いた魚類の LC-PUFA 生合成能改変について紹介する。さらに、近年開始した無脊椎動物を対象とした研究についても、その脊椎動物との大きな違いを交えながら概説したい。

2. 様々な魚種における LC-PUFA 代謝酵素遺伝子のレパートリーの解析

水産増養殖と LC-PUFA との関係に着目すると、最もよく知られているものの一つとして、海産魚における EPA・DHA 要求性の発見が挙げられるかと思う。海産魚の EPA・DHA 要求に関する研究は 1980 年代後半から 1990 年代にかけて集中して行われ、シマアジやマダイなどの海産魚において EPA や DHA が飼餌料中に必須であるということが解明された。^{4,5)} また生化学的な研究から、この原因が LC-PUFA 生合成経路の部分的な欠損によるものであることが明らかとなった。^{6,7)} LC-PUFA はリノール酸 (LA) や α リノレン酸 (ALA) からそれぞれ各種の中間産物を経て段階的に合成されるわけだが、魚類では、いくつかの種で一部の遺伝子を欠損していることが報告されており、LC-PUFA 生合成能が

多様化している。筆者らは、この遺伝子欠損が魚類の進化の過程で生じたものと仮定し、日進月歩で蓄積されている魚類のゲノム情報から網羅的に LC-PUFA の生合成に関わる遺伝子を探索することにした。その結果、解析した真骨類 Teleostei に属する魚類のうち、カライワシ上目 Elopomorpha を除くグループに属する種は、二重結合を導入する不飽和化酵素をコードする二種の遺伝子のうち片方を欠損していた。⁸⁾ さらに、真骨類の中でも棘鱗類 Acanthomorpha に属する種はこの不飽和化酵素遺伝子に加え鎖長延長酵素遺伝子の一種も欠損していることが見出された。⁹⁾ すなわち、LC-PUFA 生合成能の差異は、対象とする種が属する分類群が重要である可能性が高いことが判明したのである。

さて、ここで当然生まれてくる疑問は、これら遺伝子を欠損しているはずの魚種中には LC-PUFA 要求性の低いニジマスやナイルティラピア *Oreochromis niloticus* などの種も多数存在しているということである。これまでの研究と筆者らが行った研究結果を統合し簡単に説明すると、これらの魚種では欠損した酵素の機能を補完するかたちで、保持している酵素が新たに機能を獲得するように進化を遂げていたり、既知の経路とは全く異なるバイパス経路を構築している例が見受けられた。¹⁰⁻¹³⁾ 一方で海産棘鱗類の多くでは、上述したような経路の補完は起こっておらず、そのため LC-PUFA 生合成経路が不完全となっているわけである。しかし、ここで重要なのは海産魚全ての LC-PUFA 生合成経路が不完全というわけではなく、例えばカライワシ上目には海産魚も多数存在しているが、それらの種は上述の網羅的遺伝子探索の結果より LC-PUFA 生合成経路に必要な全ての酵素遺伝子を保持しているものと予想される。⁸⁾ このように、ゲノム情報を利用すれば、これまで一度も飼育実績のない魚種においても飼餌料中に要求する脂肪酸を大方予測することが可能であり、今後はさらに酵素のアミノ酸配列とその活性との関係性などを詳細に解析することで、より精度の高い LC-PUFA 生合成能の予測法を確立したいと考えている。

3. 遺伝子導入技術を用いた海産魚の LC-PUFA 代謝能改変

養殖飼料の低コスト化、およびその持続可能性を高めるため、動物性原料をいかにして価格や供給の安定した植物性原料に代替するかという課題は、飼料栄養学分野において長年に渡り世界中の研究者が取り組んできた。特に、魚油を植物油に代替する研究は盛んであるが、この技術の一番の問題点は、魚油と植物油の脂肪酸組成の相違にある。2 節で述べたように、魚種によっては LC-PUFA 生合成経路が不完全であり、LC-PUFA を含まない植物油に飼料中の油脂源を完全代替した場合、その欠

乏症が引き起こされることは明白である。筆者らは、この問題に対して、異なる方向からのアプローチ、飼餌料ではなく魚の方を改良する方法での解決を試みてきた。すなわち、LC-PUFA 生合成経路の不完全な魚種に、その経路を補完するための酵素遺伝子を他種から単離し導入した遺伝子導入 (TG) 系統の作出である。

ヒラメやマグロといった水産上重要な海産棘鱗類と同様の特性を持ち、遺伝子導入技術が確立されているニベ *Nibea mitsukurii* を LC-PUFA 生合成能の低い魚種のモデルとして用い、ヤマメから単離した LC-PUFA 生合成酵素遺伝子の導入を試みた。¹⁴⁾ 実際に、得られた TG 系統の脂肪酸組成を野生型 (WT) と比較すると、EPA から DHA への経路に存在する各種中間産物の組成が大幅に変化することが明らかとなった。¹⁴⁾ しかし、DHA を生合成させるところまでは未だ至っておらず、^{14,15)} 今後は 2 節で紹介したバイパス経路を利用するなどして、LC-PUFA 生合成能を付与した TG 系統を作出したいと考えている。また、現在はゲノム編集技術も利用可能であり、例えば内在性酵素のアミノ酸配列を一部置換することで機能の改変や追加を行うことも十分に現実的であろう。これらの点を踏まえると、将来的には単に LC-PUFA 生合成能を付与するだけでなく、特定の脂肪酸、例えば DHA を増加させるような改変を施すことも可能になるのではないかと期待している。

4. 無脊椎動物からの新規 PUFA 代謝酵素遺伝子の網羅的単離

さて、ここまで魚類の LC-PUFA 生合成について説明してきたわけだが、本節では筆者らが近年精力的に取り組んでいる無脊椎動物の脂肪酸代謝について紹介したいと思う。無脊椎動物と一口に言っても、その中には多種多様な分類群が含まれており、近年、その脂肪酸代謝系を解明する試みが増加傾向ではあるものの、¹⁶⁾ 多くの動物群に関してその脂肪酸代謝能は未知であるため、全容を掴むのは至難の業である。筆者らは、その一端を解明するため、ここでもゲノムやトランスクリプトームといった大規模シーケンスデータを利用することにした。ターゲットにする酵素は、以下に説明する「 ω x 不飽和化酵素」である。

魚類の LC-PUFA 生合成経路では、LA や ALA を基質として ARA や EPA, DHA が生合成されると説明した。では、この LA や ALA というのはどうやって生合成されるのだろうか？その答えが ω x 不飽和化酵素である。一般に、ほぼ全ての生物がパルミチン酸やステアリン酸といった二重結合を持たない飽和脂肪酸 (Saturated Fatty Acid, SFA) を体内でまず生合成し、そこに最初の二重結合を導入することで、例えばステアリン酸からはオレイン酸といった一価不飽和脂肪酸 (Mono Un-

saturated Fatty Acid, MUFA) を生合成することが可能である。ここから先の経路が大きく分けて動物と植物で異なると言われており、植物ではこの後さらに ω x 不飽和化酵素によってオレイン酸に二重結合を導入し LA や ALA を生合成可能であるのに対し、ほとんどの動物はこの ω x 不飽和化酵素を保持しないが故に、LA や ALA を体内で生合成することができないと言われている。つまりこれが、LA や ALA が多くの動物にとって食物中に要求する必須脂肪酸である原因なのだが、この共通認識はもちろん全ての動物を解析した結果形成されたものではない。実際に、線虫の一種 *Caenorhabditis elegans* からは ω x 不飽和化酵素が見出されており、¹⁷⁾ これが特別の例外なのか、あるいはもっと多くの動物がこの遺伝子を保持しているのかははっきりとしていない。もし、仮に水産上有用種がこの遺伝子を保持していた場合、飼料開発において今までとは全く異なる原料からの飼料作成等が可能になる潜在力を秘めており、筆者も大いに興味を持っていた。

そこで筆者らは、 ω x 不飽和化酵素遺伝子の有無を、できる限り多くの生物において解析し、その分布を明らかにすることにした。すなわち、データベースに登録された全生物のシーケンスを対象とした、 ω x 不飽和化酵素遺伝子様配列の大規模な探索である。各種のバイオインフォマティクス的手法を用いた相同性検索、系統解析の結果、実際に様々な無脊椎動物がこの ω x 不飽和化酵素遺伝子を保持することが明らかとなった。¹⁸⁾ 具体的には、刺胞動物、線形動物、節足動物(カイアシ類のみ)、輪形動物(ヒルガタワムシ類のみ)、環形動物、軟体動物にわたる、実に合計 80 種の生物が ω x 不飽和化酵素遺伝子を保持することが判明した。¹⁸⁾ 一方で、脊椎動物や棘皮動物を含む後口動物からは 700 種以上のゲノムを探索したにも関わらず ω x 不飽和化酵素遺伝子は一切見出されなかった。¹⁸⁾ 実際に、 ω x 不飽和化酵素遺伝子が見出された生物群から代表的な種をそれぞれ選定し、各酵素の活性を解析したところ、オレイン酸から LA や ALA を合成する活性を保持しており、これら無脊椎動物は、脊椎動物で必須脂肪酸とされる LA や ALA を自ら合成可能であると強く示唆された。¹⁸⁾ ω x 不飽和化酵素遺伝子が発見されたグループには、アワビやイカ、タコのような水産上有用種も含まれており、今後これら生物の飼料開発において基礎的な情報として役立つことを大いに期待している。また、水圏生態系において、LA や ALA を供給可能な一次生産者は主に微細藻類や原生生物を含む微生物のみであると長年信じられてきたが、魚類などの高次消費者にとって餌生物として重要なカイアシ類等が ω x 不飽和化酵素遺伝子を保持するという今回の解析結果は、上述の説に一石を投じるものであると確信している。

5. おわりに

これまで必須栄養素を求める研究においては伝統的に、給餌試験を繰り返し行いその結果のフィードバックを次の給餌試験へと活かすことで最適な飼料を検討してきた。今回の筆者の研究はとりわけ脂肪酸代謝、特に LC-PUFA 代謝に的を絞っているが、一連の研究でツールとして利用した分子生物学、あるいは生化学的な解析から得られる情報を統合すれば、実際に生物を飼育する前の段階で、最適な飼料を絞り込むことがある程度可能であると考えている。また、これから種苗生産を新たに開始する種においても、事前にその体内における各種栄養素の代謝能が自明であれば、その種の特異性に合わせた飼料開発の手助けとなることは容易に想像できる。もちろん、実際の飼育結果を合わせたさらなる絞り込みは必要であるが、分子の情報をうまく利用すれば、コストと時間を大幅に削減しつつ、最適な飼料を選択・新規開発することが今まで以上に容易になると確信している。今後は、標的を不飽和脂肪酸だけに絞らず、様々なことに挑戦しながら、新しい時代の水産栄養学を切り開いていく所存である。

謝 辞

一連の研究は、多くの方々の多大なるご指導、ご助言のおかげで遂行されました。東京海洋大学の吉崎悟朗先生、竹内裕先生(現 金沢大学)、矢澤良輔先生、山本洋嗣先生、佐藤秀一先生、芳賀穰先生には、研究室に配属された当初から継続して多くのご指導、ご協力を賜りました。深く御礼申し上げます。また、東京海洋大学水族生理学研究室および水族栄養学研究室の卒業生、在学生の皆様にも深く御礼申し上げます。学生時代に長期滞在していた東京海洋大学・館山ステーションの皆様には、生活面含め大変お世話になりました。深く感謝申し上げます。博士課程在学中にオーストラリア・University of Sunshine Coast に短期滞在し、ここでの経験がその後の海外ポスドクにおいて非常に活かされました。Prof. Abigail Elizur, Dr. Scott Cummins の両人に深く感謝申し上げます。学振特別研究員として所属しておりました東京大学では、水産化学研究室の潮秀樹先生にご指導賜りました。新しい技術への挑戦の機会や、これまでの自分に無い視点を与えてくださり、大変感謝しております。また、長期間の海外出張や、海外の学生を研究室に呼ぶことなど、非常に柔軟に対応していただきました。深く御礼申し上げます。研究室の皆様も、私の不在期間が長期に渡ったにも関わらず、研究室の一員として迎えて下さりありがとうございます。共同研究者の英国・University of Stirling の Prof. Douglas R. Tocher, Dr. Óscar Monroig (現 IATS-CSIC), Institute of Aquaculture の皆様、ポルトガル・University of Porto の Prof.

L. Filipe C. Castro, Dr. Miguel M. Fonseca (現 BIAL) および英国・University of St. Andrews の Prof. David E. K. Ferrier とは大変刺激的な日々を過ごし、素晴らしい成果もあげることができました。深く御礼申し上げます。また、本研究の一部は日本学術振興会・科学研究費補助金の助成を受けて実施いたしました。この場を借りてお礼申し上げます。

文 献

- Hofstdter PG. Untersuchung des Fettes des Kopfes des Pottwalls (*Physeter macrocephalus* Shaw). *Annalen der Chemie und Pharmacie* 1854; **91**: 177–185. doi: 10.1002/jlac.18540910206.
- 辻本満丸. 「海産動物油」丸善株式会社, 東京, 1918.
- Brown JB, Beal GD. The highly unsaturated fatty acids of fish oils. *J. Am. Chem. Soc.* 1923; **45**: 1289–1303. doi: 10.1021/ja01658a025.
- Watanabe T, Arakawa T, Takeuchi T, Satoh S. Comparison between eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficiency in juvenile striped jack *Pseudocaranx dentex*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1989; **55**: 1989–1995.
- Takeuchi T, Toyota M, Satoh S, Watanabe T. Requirement of juvenile red seabream *Pagrus major* for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1990; **56**: 1263–1269.
- Ghioni C, Tocher DR, Bell MV, Dick JR, Sargent JR. Low C₁₈ to C₂₀ fatty acid elongase activity and limited conversion of stearidonic acid, 18:4 (n–3), to eicosapentaenoic acid, 20:5 (n–3), in a cell line from the turbot, *Scophthalmus maximus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; **1437**: 170–181. doi: 10.1016/S1388–1981(99)00010–4.
- Tocher DR, Ghioni C. Fatty acid metabolism in marine fish: Low activity of fatty acyl Δ5 desaturation in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cells. *Lipids* 1999; **34**: 433–440. doi: 10.1007/s11745–999–0382–8.
- Lopes-Marques M, Kabeya N, Qian Y, Ruivo R, Santos MM, Venkatesh B, Tocher DR, Castro LFC, Monroig O. Retention of fatty acyl desaturase 1 (*fads1*) in Elopomorpha and Cyclostomata provides novel insights into the evolution of long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in vertebrates. *BMC Evol. Biol.* 2018; **18**: 157. doi: 10.1186/s12862–018–1271–5.
- Machado A, Trresen O, Kabeya N, Couto A, Petersen B, Felcio M, Campos P, Fonseca E, Bandarra N, Lopes-Marques M, Ferraz R, Ruivo R, Fonseca M, Jentoft S, Monroig O, da Fonseca R, Castro LFC. “Out of the Can”: A draft genome assembly, liver transcriptome, and nutrigenomics of the European sardine, *Sardina pilchardus*. *Genes* 2018; **9**: 485. doi: 10.3390/genes9100485.
- Li Y, Monroig O, Zhang L, Wang S, Zheng X, Dick JR, You C, Tocher DR. Vertebrate fatty acyl desaturase with Δ4 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010; **107**: 16840–16845. doi:10.1073/pnas.1008429107.
- Castro LFC, Tocher DR, Monroig O. Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of Fads and Elovl gene repertoire. *Prog. Lipid Res.* 2016; **62**: 25–40. doi: 10.1016/j.plipres.2016.01.001.
- Oboh A, Kabeya N, Carmona-Antoanzas G, Castro LFC, Dick JR, Tocher DR, Monroig O. Two alternative pathways for docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n–3) biosynthesis are widespread among teleost fish. *Sci. Rep.* 2017; **7**: 3889. doi:10.1038/s41598–017–04288–2.
- Kabeya N, Yoshizaki G, Tocher DR, Monroig O. Diversification of Fads2 in finfish species: Implications for aquaculture. In: Cruz-Suarez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Nieto-Lpez MG, Villarreal-Cavazos DA, Gamboa-Delgado J, Lpez Acna LM, Galaviz-Espinoza M (eds). *Investigacin y Desarrollo en Nutricin Acucola*. Universidad Autonoma de Nuevo Len, Nuevo Len. 2017; 338–362.
- Kabeya N, Takeuchi Y, Yamamoto Y, Yazawa R, Haga Y, Satoh S, Yoshizaki G. Modification of the n–3 HUFA biosynthetic pathway by transgenesis in a marine teleost, nibe croaker. *J. Biotechnol.* 2014; **172**: 46–54. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.12.004.
- Kabeya N, Takeuchi Y, Yazawa R, Haga Y, Satoh S, Yoshizaki G. Transgenic modification of the n–3 HUFA biosynthetic pathway in nibe croaker larvae: improved DPA (docosapentaenoic acid; 22:5n–3) production. *Aquac. Nutr.* 2015; **22**: 472–478. doi:10.1111/anu.12273.
- Monroig O, Kabeya N. Desaturases and elongases involved in polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic invertebrates: a comprehensive review. *Fish. Sci.* 2018; **84**: 911–928. doi: 10.1007/s12562–018–1254–x.
- Spychalla J, Kinney A, Browse J. Identification of an animal ω–3 fatty acid desaturase by heterologous expression in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; **94**: 1142–1147. doi: 10.1073/pnas.94.4.1142.
- Kabeya N, Fonseca MM, Ferrier DEK, Navarro JC, Bay LK, Francis DS, Tocher DR, Castro LFC, Monroig O. Genes for de novo biosynthesis of omega–3 polyunsaturated fatty acids are widespread in animals. *Sci. Adv.* 2018; **4**: eaar6849. doi:10.1126/sciadv.aar6849.