

水産動物の多価不飽和脂肪酸生合成能の解明

壁谷尚樹 (東京海洋大学 学術研究院)

naoki.kabeya@kaiyodai.ac.jp

エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などのオメガ (ω) 3 長鎖多価不飽和脂肪酸 (Long-Chain PolyUnsaturated Fatty Acid; LC-PUFA) は、炭素鎖 20 以上かつ複数の二重結合を有する生理学的に重要な脂肪酸である。特に海洋生物にはこれら脂肪酸が豊富に含まれるが、肉食性魚類など高次消費者の ω 3 LC-PUFA 生合成能は、著しく低いことが知られている。そのため、海洋生態系においては微細藻類などが ω 3 LC-PUFA やその基質である各種 PUFA を一次生産しており、ほとんどの消費者はそれらを食物連鎖の過程で体内に濃縮しているに過ぎないとされてきた。PUFA は、各種の酵素により段階的に生合成されるため、基本的に PUFA の生合成能はこれら酵素をコードする遺伝子の有無およびその酵素活性によって規定される。本発表では、PUFA 生合成関連遺伝子のバイオインフォマティクス的手法による大規模探索と、各種酵素遺伝子の機能解析結果から得られた水産動物における多様な PUFA 生合成経路について紹介する。

無脊椎動物からの新規 PUFA 代謝酵素遺伝子の網羅的単離

生体内で LC-PUFA の基質となる脂肪酸は炭素鎖 18 の PUFA であるリノール酸 (LA) や α -リノレン酸 (ALA) であるが、これら脂肪酸は ω x 不飽和化酵素と呼ばれる酵素の働きにより、二重結合を一つだけ有するオレイン酸 (OA) から段階的に生合成される (PUFA の *de novo* 生合成、**図 1**)。これまで、海洋生態系における PUFA の一次生産は、この ω x 不飽和化酵素を有する微細藻類や菌類、原生生物によって行われていると考えられてきた。一方で、実際の海洋生態系においては、一次生産者と高次消費者だけではなく、その間にも無数の無脊椎動物が低次消費者として存在しているが、これら生物の PUFA 生合成能は、一部の水産上有用種を除いてほとんど分かっていない。80~90 年代に行われた放射性同位体標識による PUFA 代謝実験から、数種の無脊椎動物において *de novo* 生合成経路の存在が示唆されていたが、この手法においては、混在あるいは共生している細菌や原生生物による PUFA 生合成の可能性を完全に否定することが不可能であった。そのため基本的に、ごく一部の種 (線虫) を除いて、動物は ω 3 PUFA を *de novo* 生合成することができないという説が長く信じられてきた。そこで本研究では、 ω x 不飽和化酵素遺伝子を標的とし、各種核酸データベースに登録された全配列を対象にした大規模な相同性検索と、得られた配列の最尤法・ベイジ法を用いた系統樹作成により、本遺伝子の生物種ごとの分布を解析した。その結果、様々な無脊椎動物が 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 (**図 2**)。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

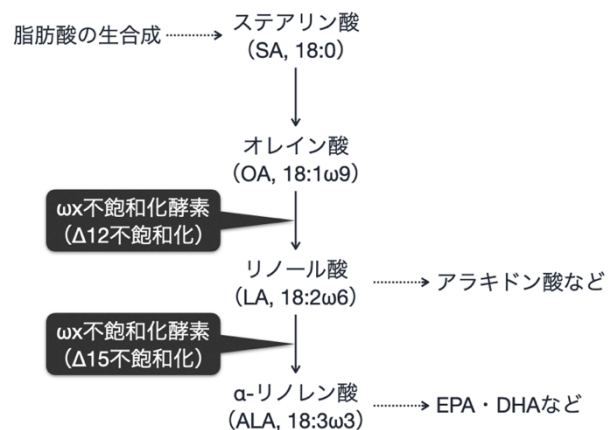


図 1. PUFA の *de novo* 生合成経路



図 2. ωx 不飽和化酵素の系統樹

るところだが、上記結果に加えて、これら遺伝子の多くがイントロンを持たないことから、我々は動物の ωx 不飽和化酵素遺伝子の獲得・進化には遺伝子の水平伝搬 (Horizontal Gene Transfer; HGT) が関わっている可能性が高いと考えている。

無脊椎動物の ωx 不飽和化酵素遺伝子の機能解析

続いて、我々は単離された新規 ωx 不飽和化酵素が真に PUFA を *de novo* 生合成可能な活性を示すか明らかにするため、得られた ωx 不飽和化酵素の機能解析を行った。これまでに機能解析を行った種としては、刺胞動物からハイマツミドリイシ *Acropora millepora*、節足動物からサケジラミ *Lepeophtheirus salmonis*、輪形動物からヒルガタワムシの一種 *Adineta vaga*、環形動物からイソツルヒゲゴカイ *Platynereis dumerilii*、セイヨウカワゴカイ *Hediste diversicolor*、軟体動物からセイヨウカサガイ *Patella vulgata*、マダコ *Octopus vulgaris* が挙げられる。

酵母発現系を用いた酵素機能の解析から、これまでに得られた ωx 不飽和化酵素活性について図 3 にまとめた。生物種ごとに有する遺伝子数や、基質特異性が高度に多様化しているものの、全ての生物が OA を LA へと転換する Δ12 不飽和化活性および、LA を ALA へと転換する Δ15 不飽和化活性を示す酵素を保持することが明らかとなった¹⁻³⁾。すなわち、これら生物は脊椎動物が不可能である一価の不飽和脂肪酸から PUFA への *de novo* 生合成を可能にする酵素を保持することが示された。このことから、これら生物は海洋生態系において、微細藻類などと同様、PUFA の一次生産者として機能する可能性が強く示唆された。さらに、解析した酵素遺伝子のうちいくつかにおいては、様々な ω6 PUFA を対応する ω3 PUFA へと転換する Δ15、Δ17、Δ19 不飽和化活性が検出された (図 3)。特に、生理学的に重要であるアラキドン酸 (ARA) を EPA へと転換する活性はこれまで一部の微細藻類や原生生物からのみ報告されており、複雑な体構造を有する動物において当該活性がどのような生理学・生化学的意味を持つのか解明が待たれる。また、図 3 にも示した通り、一部の種を除き多くの無脊椎動物において PUFA から LC-PUFA への生合成系が未解明であり⁴⁻⁵⁾、今後はこれら経路を担う酵素遺伝子の網羅的単離や機能解析を展開することで、無脊椎動物が PUFA の一次生産のみならず LC-PUFA も一次生産可能であることを示してい

体動物が当該遺伝子を有することが判明した¹⁾。一方で、脊椎動物や棘皮動物を含む後口動物からは、当該遺伝子は一切見出されなかった。また、ここで興味深いのは、これら無脊椎動物の遺伝子は単系統性を示さないという点である (図 2)。特に、刺胞動物を含むクレード 2、および冠輪動物 (輪形・環形・軟体) と節足動物を含むクレード 3 は、完全に新規の ωx 不飽和化酵素遺伝子群として特定された。これら新規遺伝子の進化的ルーツに関しては議論のあ

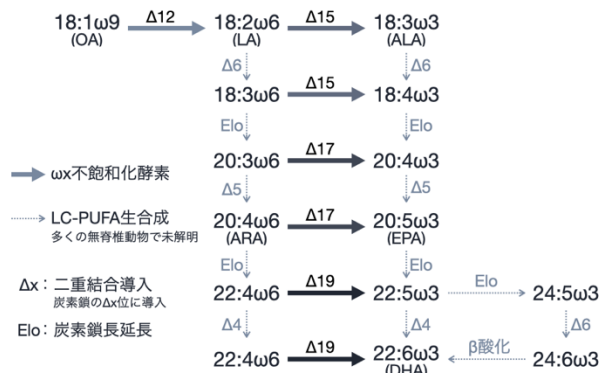


図 3. PUFA・LC-PUFA 生合成経路 (一部)

きたい。これら一連の結果は、海洋生態系における PUFA 生産機構の定説を根本的に覆すものであり、陸上動物とは大きく異なる水産動物における PUFA 生合成系の多様性が示された。

魚類における LC-PUFA 生合成酵素遺伝子の欠損と機能多様化

魚類においては、これまで水産上有用種を中心とした栄養要求性の研究や、生化学的な解析により、淡水魚は LC-PUFA 生合成能が高く、海水魚では低いという説が一般的となっている。この原因は、種々の海水魚において LC-PUFA 生合成を担う脂肪酸不飽和化酵素 (Fatty acid desaturase; Fads) および長鎖脂肪酸鎖長延長酵素 (Elongation of very long chain fatty acids protein; Elovl) の一部が欠損しているためである。我々は、この遺伝子欠損の魚類全体における分布を把握するため、公開データベース上に登録された魚類ゲノム配列全てを対象として相同性検索を実施した。その結果、**図 4** に示す通りアロワナ上目以降の真骨類において $\Delta 5$ 不飽和化を担う Fads1 が欠損しており、棘鰭類においてはさらに炭素鎖 20 から 24 への鎖長延長を担う Elovl2 が欠損していることが明らかとなった⁶⁻¹¹⁾。一方で、真骨類の中でもカライワシ上目は LC-PUFA を生合成するために必要な遺伝子を全て保持しており、このグループに属する種は海産種であっても LC-PUFA 生合成能を有することが示唆された。一方で、Fads1 を欠損するグループ及び Fads1 と Elovl2 の両方を欠損するグループにおいては、淡水種を中心として、Fads2 遺伝子の重複や多機能化、新機能の獲得などを通して LC-PUFA 生合成能を保持する種が多数見つかっている (**図 5**)。これら進化的現象は、各種の有する食性や生息環境に対応しており、外部から得られる脂肪酸の組成に応じて種々の適応が起こったものと推測される。近年は同種内においても、外部環境から得られる DHA が少ない状況に晒される系統においては酵素遺伝子の大規模な重複が発生し、DHA 生合成能が向上していることも明らかにした¹²⁾。

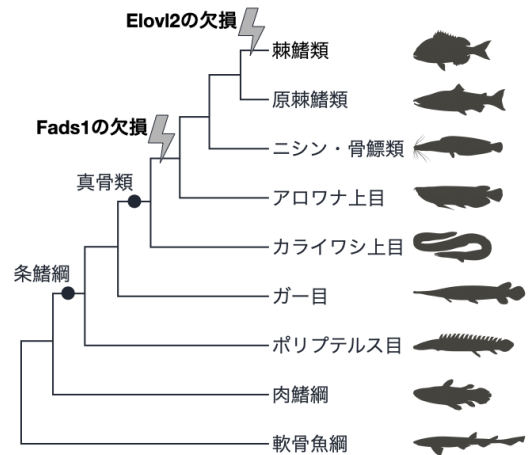


図 4. 魚類の Fads1・Elovl2 遺伝子欠損

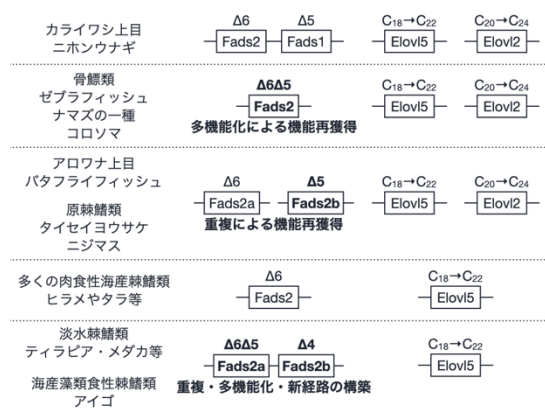


図 5. 魚類 Fads2 遺伝子の多様性

まとめ

EPA や DHA などの $\omega 3$ LC-PUFA はその生理学的重要性から非常に注目されている栄養素である。そのため、これまでは養殖魚の飼料成分としての利用が中心となっていたものの、近年では人間が直接的にサプリなどとして利用することも多い。しかし、現状その供給のほとんどは海洋由来となっており、今後持続的に利用していくためにも、海洋生態系におけるこれら脂肪酸の生産機構を解明することが重要である。本研究では、PUFA の生合成に関わる酵素遺伝子の網羅的な探索と、その機能解析を組み合わせることで、海洋動物における多様な PUFA 生合成系を示した。特に、これまで動物では不可能と考えられていた PUFA の *de novo* 生合成を多くの無脊椎動物

物が可能であるという結果は、海洋生態系における PUFA 生産機構を根本的に見直すきっかけを与えるものと確信している。今後は、各種無脊椎動物の PUFA 生合成能の解析をさらに進めることで、基礎情報の一層の充実および餌料生物や飼料原料としての利用を模索していきたい。

謝辞

本賞にご推薦頂きました公益社団法人日本水産学会会長 金子豊二教授と、学会関係の諸先生方に深く感謝申し上げます。東京海洋大学 吉崎悟朗教授、佐藤秀一教授には学生時代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、東京大学 潮秀樹教授、スターリング大学 Douglas R. Tocher 教授、Óscar Monroig 博士（現トレ・デ・ラ・サル養殖研究所）、ポルト大学 L. Filipe C. Castro 教授にはポストドク期間から継続して大変お世話になっており、心より感謝を申し上げます。最後に、一連の研究に関わって頂いた全ての共同研究者・学生皆様に深く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Kabeya N., Fonseca M.M., Ferrier D.E.K., Navarro J.C., Bay L.K., Francis D.S., Tocher D.R., Castro L.F.C. and Monroig Ó.: *Science Advances* 4:eaar6849 (2018).
- 2) Garrido D., Kabeya N., Hontoria F., Navarro J.C., Reis D.B., Martín M.V., Rodríguez C., Almansa E. and Monroig Ó.: *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1864:1134-1144 (2019).
- 3) Kabeya N., Gür İ., Oboh A., Evjemo J.O., Malzahn A., Hontoria F., Navarro J.C. and Monroig Ó.: *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 375:20190654 (2020).
- 4) Kabeya N., Sanz-Jorquera A., Carboni S., Davie A., Oboh A. and Monroig Ó.: *PLOS ONE* 12:e0169374 (2017).
- 5) Monroig O. and Kabeya N.: *Fisheries Science* 84:911-928 (2018).
- 6) Kabeya N., Yamamoto Y., Cummins S.F., Elizur A., Yazawa R., Takeuchi Y., Haga Y., Satoh S. and Yoshizaki G.: *Comparative Biochemistry and Physiology B* 188:37-45 (2015).
- 7) Kabeya N., Chiba M., Haga Y., Satoh S. and Yoshizaki G.: *Comparative Biochemistry and Physiology B* 214:36-46 (2017).
- 8) Lopes-Marques M., Kabeya N., Qian Y., Ruivo R., Santos M.M., Venkatesh B., Tocher D.R., Castro L.F.C. and Monroig Ó.: *BMC Evolutionary Biology* 18:157 (2018).
- 9) Kabeya N., Yevzelman S., Oboh A., Tocher D.R. and Monroig Ó.: *Aquaculture* 488:199-206 (2018).
- 10) Oboh A., Kabeya N., Carmona-Antoñanzas G., Castro L.F.C., Dick J.R., Tocher D.R. and Monroig Ó.: *Scientific Reports* 7:3889 (2017).
- 11) Machado A.*, Tørresen O.*, Kabeya N.*, Couto A., Petersen B., Felício M., Campos P., Fonseca E., Bandarra N., Lopes-Marques M., Ferraz R., Ruivo R., Fonseca M., Jentoft S., Monroig Ó., da Fonseca R. and Castro L.F.C.: *Genes* 9:485 (2018). *equally contributed authors.
- 12) Ishikawa A., Kabeya N., Ikeya K., Kakioka R., Cech J.N., Osada N., Leal M.C., Inoue J., Kume M., Toyoda A., Tezuka A., Nagano A.J., Yamasaki Y.Y., Suzuki Y., Kokita T., Takahashi H., Lucek K., Marques D., Takehana Y., Naruse K., Mori S., Monroig Ó., Ladd N., Schubert C.J., Matthews B., Peichel C.L., Seehausen O., Yoshizaki G. and Kitano J.: *Science* 364:886–889 (2019).