

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月21日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07584

研究課題名(和文)加熱時の異常軟化を誘発するマナマコ体壁の生息環境依存的生理異常の解明

研究課題名(英文) Physiological disorder of sea cucumber body wall which depends on habitat environment and induces abnormal tenderization on heating

研究代表者

水田 尚志 (Mizuta, Shoshi)

福井県立大学・海洋生物資源学部・教授

研究者番号：30254246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マナマコの真皮をボイルすると収縮・硬化し強固なゲルとなるが、一部の個体で加熱後も異常に脆弱な物性を呈する場合がある。この異常脆弱化は、通常個体に比べ真皮の熱収縮が十分に進行せず、水分の排出が不完全に終わるためであることが明確となった。その要因としてコラーゲン繊維同士の結合度が通常個体に比べて低いため、コラーゲン繊維の熱収縮力が真皮全体に十分伝わらないことが考えられた。電気泳動により構成タンパク質成分の差異について検討したところ、複数のタンパク質が通常個体と脆弱個体の真皮の間で異なるパターンで分布することが示唆された。今後、マナマコ真皮の熱収縮におけるこれらの機能について解析を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナマコ類の真皮はいわゆる可動性結合組織であり、神経支配の下、コラーゲン繊維同士が互いに結合や解離を行うことで結合組織でありながら収縮・弛緩が可能である。本研究はその結合・解離の機構と加熱時の熱収縮との関連性を示唆した点で学術的意義が大きい。また、これらより得られる知見をもとに異常脆弱個体の特異的マーカーを開発できれば脆弱個体を加工前に選別する技術の開発に結びつく。さらに、異常脆弱という形で顕在化した現象が生理異常や生息環境にまで結びつくとすれば、異常脆弱自体が生理異常の検出に役立つ可能性もある。従って、将来的にはナマコの生産(養殖または栽培漁業)を行う環境の構築にも大いに貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：Dermis of Japanese sea cucumber usually contracts to be hard gel after boiling, but some individuals show abnormally tender texture even after boiling. The present investigation clarified this phenomenon occurs due to insufficient heat contraction and water excretion on boiling. In such individuals, heat-contraction force of the dermis may not be fully conveyed to the whole dermis because the degree of the possible interactions among collagen fibers may be lower than normal individuals. Differences in the constituent proteins between normal and abnormal dermises were examined by SDS-PAGE analyses, and it was suggested that some proteins may be distributed in different pattern between them. It is, hereafter, necessary to clarify their functions in the heat contraction of sea cucumber dermis.

研究分野：水産化学

キーワード：ナマコ 体壁 加熱 脆弱化 生理異常 コラーゲン 結合組織 糖タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乾燥ナマコや塩蔵ナマコは主に真皮からなる体壁をボイルし、乾燥または塩蔵した加工品で、いずれも高級食材として中華料理に用いられている。そのため国内で製造されたこれらの製品のほとんどは海外へ輸出され、水産業における重要分野の一つとなっている(2017年度の実績では輸出額200億円を超え、「水産調製品」の中で第1位である)。通常、ナマコの真皮はボイル処理(90、60分程度)によりゴム様の弾力を示すゲルとなり、乾燥によりさらに堅固な乾物状態となる。しかし個体によってはボイル処理後、真皮が異常に脆弱な(軟らかい)物性を示す現象(以下、異常脆弱化)が認められてきている。異常脆弱化を起こした真皮は通常個体に比べてその突き刺し強度(硬さの指標)は1/3以下であり、乾燥しても原型を維持できないため商品価値が著しく低くなる。本現象は、水深40~60m付近に生息し主に桁曳き漁によって漁獲されるナマコに好発するものであり、さらにナマコ体壁の中でも腹側に高頻度で発生するという特徴がある。一例を挙げれば、北海道の利尻地区における異常脆弱化の発生率は桁曳き漁による全漁獲個体のうちの約1割にも及ぶが、同地区にてタモ取り漁によって漁獲される(水深2~4m付近に生息する)ナマコについては異常脆弱化はほとんど見られない。従って、本現象は生息環境またはそれに付随する運動様式に依存した未知の生理異常に帰するものと推察されるため学術的に興味深い。

一般にナマコ類真皮は「キャッチ結合組織」(または「可動性結合組織」)の一つと言われ、収縮と弛緩を繰り返すことで個体の運動に寄与するほか、過度な刺激を加えると防御反応により組織溶解を生じる。よって、生鮮段階においてはその物性は絶えず変動するため測定は難しく、行ったとしても信頼性の高い物性データを得ることはできない。よって、異常脆弱となる個体が生鮮段階で何らかの変化を起こしていたとしてもそれを予め特定することは困難であり、ボイル処理後に初めて認識されるのが現状である。また、発生メカニズムについても現在全く不明であり対策も講じられていない。

2. 研究の目的

本研究では、以下の【1】~【3】について検討する。

【1】化学組成および組織構造 - 生鮮状態およびボイル後の通常個体および脆弱個体の真皮について、組織構造および一般成分組成の違いを見る。

【2】加熱による主要タンパク質成分の溶出挙動 - 正常個体および異常個体について、加熱により外液へ溶出する主要成分(コラーゲン、400kDa 糖タンパク質)の量的割合および存在状態を比較する。

【3】タンパク質の性状比較 - 通常個体と脆弱個体の真皮生鮮試料について、構成タンパク質(コラーゲン、400kDa 糖タンパク質など)の性状の違いを主に生化学的手法(SDS-PAGE等)により明らかにする。

以上の結果を総合して、異常脆弱化が具体的にどのような現象であるのかを明らかにするとともに、本現象の発生メカニズムに関する仮説モデルを提唱する。

3. 研究の方法

異常脆弱化の現象は、これまで主に北海道利尻海域で漁獲されたマナマコに関して報告されている。よって、本研究では全研究期間を通じて北海道利尻海域にて漁獲されたマナマコのみを試料とした。

【実験1】

北海道利尻町沓形にて2013~2016年の6~7月に水揚げされたマナマコについて、体壁部の全部または一部を90で約60分間ボイルし、物性を官能的に評価して脆弱個体の選別を行った。未加熱部より約1cm角の真皮小片を個体別に採取し組織重量に対して5倍量の蒸留水を加えて同様にボイルすることにより、煮熟外液を得た。ボイル・生鮮試料および煮熟外液をSDS-PAGEに供した。また、煮熟外液についてはWoessner法¹⁾に基づき比色定量法によりヒドロキシプロリン(Hyp)の濃度を測定するとともに、塩酸により気相加水分解し、Pico-Tag法によるアミノ酸分析に供した。生鮮試料を化学分析(水分、粗タンパク質、粗灰分、Hyp)に供した。

【実験2】

北海道利尻町沓形にて2016年6月に水揚げされたマナマコを生きた状態で福井県立大学海洋生物資源学部へ輸送し、試料として用いた。体壁を正中線に沿って切断後、左半分を90で約60分間ボイルし、その物性を官能的に評価して脆弱個体の選別を行った。右半分より約1cm角の真皮小片を採取して同様にボイルし、残りは生鮮試料として用いた。正中線切断試料(左側)および小片試料についてボイル歩留りの測定を行うとともに、光学顕微鏡による組織観察を行った。得られた組織像に関して、画像解析ソフト(Win Loof、三谷商事)を用いて、1視野においてコラーゲン繊維が占める面積率を算出し、通常個体と脆弱個体の間で比較した。また、真皮中に豊富に存在する400kDa糖タンパク質の機能推定を目的として、これに対する特異的抗血清を用いて生鮮組織を免疫組織化学的染色に供した。

【実験3】

北海道利尻町沓形にて2017年の6月に水揚げされたマナマコを【実験2】と同様に生きた状態で福井県立大学海洋生物資源学部へ輸送し、試料として用いた。体壁部の一部を約60分間ボイルし、物性を官能的に評価することにより脆弱個体の選別を行った。通常個体の真皮生

鮮試料について2倍量の緩衝液(0, 0.5, 1.0, 1.5または2.0M NaCl含む20mM トリス-塩酸緩衝液, pH8.0)で抽出し、遠心上清をSDS-PAGEに供することにより抽出に最適な塩濃度の検討を行った。さらに、通常個体と脆弱個体(いずれも複数個体)の生鮮試料から得た抽出画分についてSDS-PAGEパターンの比較を行い、脆弱化に関連するタンパク質成分の探索を行った。

4. 研究成果

(1) 実験1

生鮮試料の化学分析

通常個体と脆弱個体の真皮についてHyp化学分析を行ったところ、表1に示すようにこれらはほぼ同様の結果となり、t-検定の結果いずれの項目においても通常個体と脆弱個体の間で有意差は認められなかった($p>0.05$)。

SDS-PAGE

生鮮試料および煮熟外液のSDS-PAGE(7.5%ゲル)では通常個体と脆弱個体いずれにおいても互いに類似したパターンを示し、メタクロマジンを示すコラーゲン性のバンドは見られなかった。主要バンドは200kDa成分(400kDa糖タンパク質の単量体成分)であり、生鮮試料では230kDa成分やその他のマイナー成分がわずかに見られた。データには示さないが、ポイル試料についてもSDS-PAGEパターンは基本的に類似していた。

表1. マナマコ通常個体および脆弱個体真皮の化学組成

	水分	粗タンパク質	粗灰分	ヒドロキシプロリン(Hyp)
	(%)			
通常個体	90.4±1.1	46.0±2.4	32.6±2.3	1.8±0.2
脆弱個体	90.9±1.1	45.3±4.7	35.2±3.5	1.8±0.3

(n=10, 水分以外は無水物換算)

生鮮試料では230kDa成分やその他のマイナー成分がわずかに見られた。データには示さないが、ポイル試料についてもSDS-PAGEパターンは基本的に類似していた。

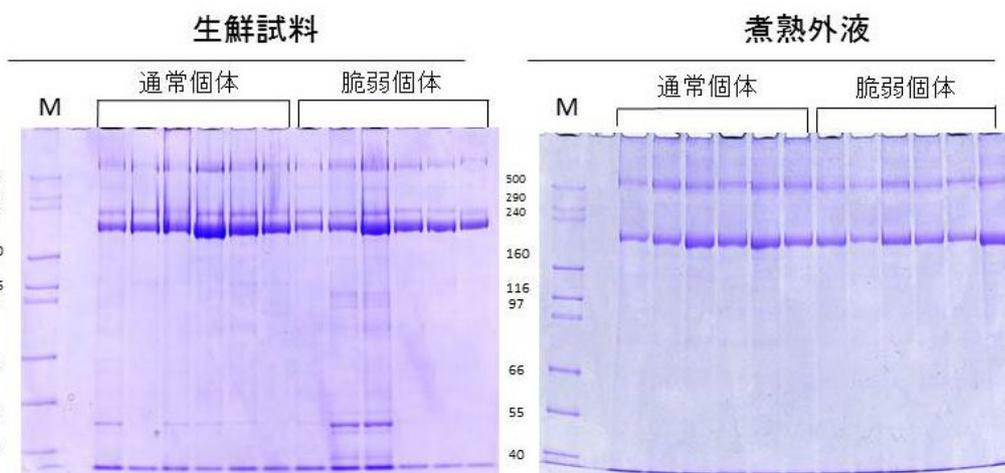


図1. 通常個体および脆弱個体の生鮮試料および煮熟外液のSDS-PAGE

M: 分子量マーカー(左の数値は各成分の分子量を表す)

図中の通常および脆弱個体の各レーンは別々の個体を示す

煮熟外液の分析

煮熟外液へ流出したHypは通常個体と脆弱個体いずれにおいても全Hypの1~2%程度とわずかであった。また、アミノ酸分析の結果、煮熟外液中の成分は400kDa糖タンパク質に類似したアミノ酸組成を示した。ヒドロキシプロリンの相対的割合に関しても1000残基中3~4残基とわずかであった(データ示さず)。これらの結果は、通常個体と脆弱個体いずれにおいてもポイルにより外液へ滲出するコラーゲンの割合が全コラーゲンの1~2%程度であり、コラーゲンのゼラチン化や酵素的分解または熱分解が異常脆弱化に及ぼす影響は著しく小さいことを示唆するものである。

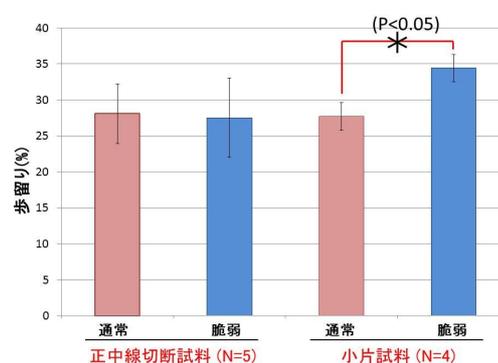


図2. 正中線切断試料および小片試料におけるポイル歩留りの比較

(2) 実験2

ポイル歩留り

正中線切断試料および小片試料についてポイル歩留りを測定し、通常個体と脆弱個体で比較したところ、正中線切断試料では有意差は認められなかったが、小片試料においては通常個体に比べ脆弱個体で有意に高い値を示すことが分かった(図2)。正中線切断試料は真皮以外にも筋肉など他の組織を含んでいる。よって、これらの付着組織の収縮が歩留りに影響しているものと考えられた。これらの結果は脆弱個体の真皮部をポイルした場合、加熱時の収縮が不十分なため、歩留りが高くなることを示唆している。

ポイルした真皮組織の構造

生鮮試料から採取した真皮の組織観察では、通常および脆弱個体いずれにおいてもコラーゲン繊維の形態や密度にほとんど差がなかった(データ示さず)。しかし、ポイル後の試料では、通常個体でコラーゲン繊維の分布密度がほぼ均一であったのに対し、脆弱個体ではコラーゲン繊維の分布が一様ではなく、特に密度の低い領域(低密度領域)が随所に認められた(図3)。

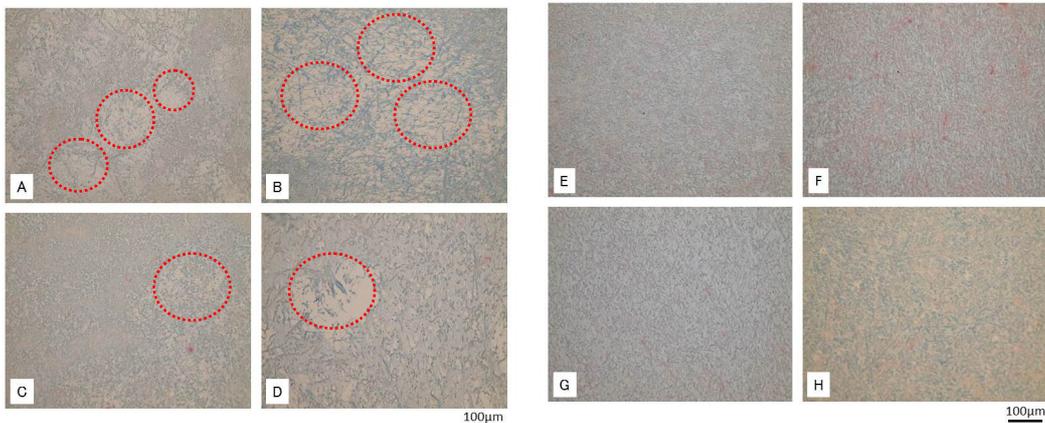


図3 . ポイルした真皮の組織構造の比較 (アザン染色)

A~D, 脆弱個体 (おおよその低密度領域の位置を赤点線で示す)

ポイル後のコラーゲン繊維の低密度領域を中心に画像解析を行ったところ、通常個体に比べコラーゲン繊維の分布密度が有意に低いことが確認された(図4)。ポイル試料では脆弱個体は通常個体に比べ水分が有意に高いことが判明している(データ示さず)。これらの結果から、脆弱個体ではコラーゲン繊維の低密度領域を中心として内部に水分がよく保持されていることが脆弱な物性を呈する一要因であることが示唆された。

400kDa糖タンパク質に対する特異的抗血清を用いて生鮮組織を免疫組織化学的染色に供したところ、コラーゲン繊維部のみならず繊維間隙(液状部)にも広く分布することが判明した。これら結果は、本タンパク質の一部がコラーゲン繊維に結合して隣接する繊維との相互作用に関わっており、それ以外の分子は遊離状態で体液中に溶存し真皮におけるコラーゲン繊維間の分布状態の維持に関わる可能性を示すものである(データ示さず)。

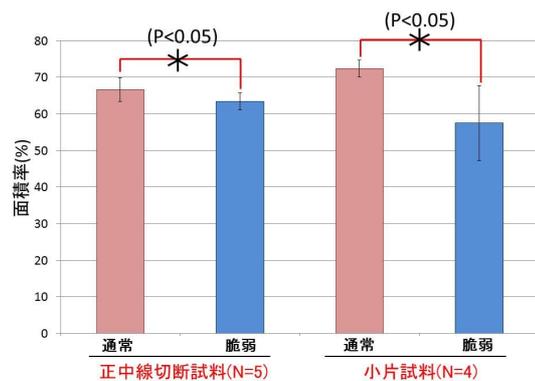


図4 . 画像解析によるコラーゲン繊維の面積率の比較

(3) 実験3

本実験ではマナマコ真皮からのタンパク質の抽出条件を検討し、脆弱化に関連すると考えられるタンパク質(特にニセクロナマコで報告されているテンシリン²⁾やソフテニン³⁾に相当する20~40kDaのタンパク質)の探索を行った。

ナマコ生鮮真皮(通常個体)について抽出を行ったところ、どのNaCl濃度においてもSDS-PAGEパターンに大きな違いが見られなかった。しかし、低塩濃度(0または0.5M)の場合は、全体的に染色強度がやや低く、1.0M以上ではほぼ一定の染色強度となったため、今後は1.0M NaClの条件で抽出を行うこととした(データ示さず)。可溶性画分に認められた主な成分は、200kDa, 116kDa, 80kDa, 45kDa, 38kDa, 36kDaであった。通常個体と脆弱個体について抽出画分のSDS-PAGEパターンを比較したところ、脆弱個体で116kDa成分に富む傾

向が認められた。また、38 kDa および 36kDa 成分に関しては、通常個体ではこれら両方を示す個体または 38kDa のみ示す個体が見受けられたが、脆弱個体では全て 36kDa 成分のみを示した（図 5）。これらの結果から、116kDa 成分の他、38 kDa および 36kDa 成分が異常脆弱化に関わりを持つ可能性が示された。

（４）まとめと今後の展望

干しナマコをはじめとするナマコ調製品は中国において大きな需要があり、世界各地で製造されたこれらのほとんどが中国へと輸出される。「異常脆弱化」はナマコ加工産業に対して、世界的なレベルで多大な損出を与えており、よってそのメカニズムに関する知見は国内外において大きなインパクトがあると考えられる。

本研究により、マナマコ真皮の異常脆弱化は、加熱時の熱収縮不全現象であることが明確になった。つまり、通常個体の場合は真皮を構成するコラーゲン繊維同士の結合状態が正常であるため、加熱時の収縮力が真皮全体に伝播され、水分を効率よく排出するとともに真皮そのものが強く収縮・硬化する。しかし、脆弱個体の場合は何らかの生理的要因によりコラーゲン繊維同士の結合が不十分または弱いために個々のコラーゲン繊維の熱収縮力が真皮全体に伝播しにくく、その結果多くの水分が真皮中にとどまり相対的に

脆弱な物性を示すものと考えられる。通常、コラーゲンは多くの組織においてその物理的な骨格をなし、物性発現に大きく寄与することが分かっている。しかし、ナマコ真皮を加熱した場合のコラーゲンの体外渗出については通常個体と脆弱個体の間でほとんど差がなかった。また、データには示していないが、生鮮真皮におけるコラーゲン繊維の分布状態に関しても両者の間で全く差異が無いことも判明している。よって、本現象においてはコラーゲンそのものの性状というよりはむしろ、コラーゲン繊維同士の結合または相互作用において、何らかの異常が発生しているものと推測される。これらを総合して、マナマコ真皮の熱収縮に関する仮説モデルを作成した（図 6）。ナマコ類の真皮は「可動性結合組織」の一種であり、神経支配の下、収縮・弛緩することによってナマコの運動に寄与している。収縮・弛緩の際には、コラーゲン繊維同士の結合（または架橋）とその解離が調節タンパク質（主にテンシリン²⁾とソフテニン³⁾）によりコントロールされることがニセクロナマコにおいて報告されている（テンシリンはそれ自体がコラーゲン繊維間の架橋結合タンパク質として機能すると考えられている）。本研究ではマナマコにおいてこれらに相当するタンパク質の探索を行い、通常個体と脆弱個体の間で分布パターンの異なる 2 つのタンパク質成分（36kDa および 38kDa 成分）を見出した。さらに、400kDa 糖タンパク質に関しても、抽出溶媒によっては通常個体と脆弱個体の間で生鮮組織からの抽出率に違いが生じることが分かっている（データ示さず）。今後は、*in vitro* におけるコラーゲン繊維凝集のモデル実験系を構築し、これらのタンパク質を含め、コラーゲン繊維間の相互作用に関与する可能性があるタンパク質の単離と性状解析を進め、異常脆弱化の発生メカニズムの解明を目指す。

引用文献

- 1) Woessner JF (1961). Arch Biochem Biophys 93: 440-447.
- 2) Tamori M, Yamada A, Nishida N, Motobayashi Y, Oiwa K, Motokawa T (2006). J Exp Biol 209: 1594-1602
- 3) Takehana Y, Yamada A, Tamori M, Motokawa T (2014). Plos One 9: e85644

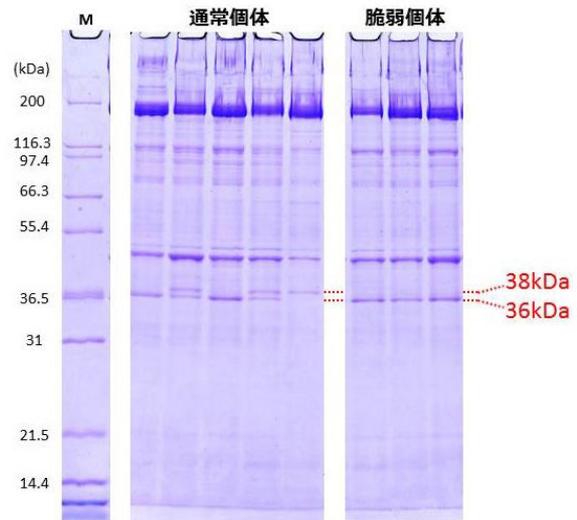


図 5．緩衝液抽出画分の SDS-PAGE 像
M：分子量マーカー（左の数値は各成分の分子量を表す）、図中の通常および脆弱個体の各レーンは別々の個体を示す

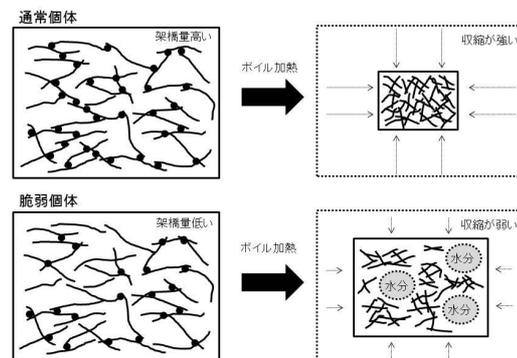


図 6．マナマコ真皮の熱収縮モデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. 水田尚志. 細胞外マトリックスのタンパク質. Foods & Food Ingredients Journal of Japan. 査読なし, 222, 2017, 98-108.

〔学会発表〕(計4件)

1. 水田尚志・岡林佑太・細井公富・横山芳博(福井県大海洋生資)・成田正直(道中央水試). 異常に脆弱な物性を呈するポイルナマコの特性. 平成30年度日本水産学会中部支部大会, 2018年12月, 新潟市.

2. 水田尚志・岡林佑太・細井公富・横山芳博(福井県大海洋生資)・成田正直(道中央水試). ポイル処理時におけるマナマコ真皮の異常脆弱化 - タンパク質の抽出と SDS-PAGE パターンの比較 -. 2018年9月, 平成30年度日本水産学会秋季大会, 東京都(東京海洋大学品川キャンパス).

3. 水田尚志・奥村美穂・細井公富・横山芳博(福井県大海洋生資)・成田正直(道中央水試). 異常に脆弱な物性を呈するポイルナマコの特性 - 真皮におけるコラーゲン繊維の分布状態 -. 平成30年度日本水産学会春季大会, 2018年3月, 東京都(東京海洋大学品川キャンパス).

4. 水田尚志・入江賢・杉浦綾美・奥村美穂・細井公富・横山芳博(福井県大海洋生資)・成田正直(道中央水試). 異常に脆弱な物性を呈するポイルナマコの特性 - 真皮構成タンパク質の分析と熱挙動 -. 平成30年度日本水産学会春季大会, 2018年3月, 東京都(東京海洋大学品川キャンパス).

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。