

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14801

研究課題名(和文)貝の引っ越し機能を利用する付着生物防除法開発

研究課題名(英文) Development of a method to prevent biofouling utilizing the translocation mechanisms of mussels

研究代表者

井上 広滋 (Inoue, Koji)

東京大学・大気海洋研究所・教授

研究者番号：60323630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：代表的な付着汚損生物であるイガイ類は、一旦付着したのちも、付着装置である「足糸」を切断して移動(引っ越し)できる。本研究の目的は、移動を引き起こす条件や、足糸を切断する仕組みを解明して、新たな付着防除策の開発に寄与することである。ムラサキイガイを様々な条件(温度、塩分、干出、捕食者との共存等)に曝露する実験を行ったところ、移動せずに殻を閉じ「我慢する」行動をとる条件と、移動が活発になる条件があることが示唆された。移動の際、足糸の切断には1本ずつ引きちぎる方法と、まとめて切断する方法があることがわかった。後者に関与する可能性のある酵素のcDNAの単離も実施した。

研究成果の概要(英文)：Mussels, known as major fouling animals in the sea, can change position by cutting byssus, the attachment apparatus, after they attached to a substrate. The purpose of this study is to contribute to the development of new anti-biofouling methods, by identifying the conditions that can induce the translocation and also the mechanisms to cut the byssus. Results of exposure experiments to various conditions (temperature, salinity, air exposure, existence of predators, etc.) suggested that some conditions induce translocation but some other conditions rather induce withdrawal into their shells. When they cut the byssus, two different methods were observed; one is just to tug a single byssus and the other is to digest the stem connecting multiple byssi. Cloning of cDNAs encoding enzymes that may be involved in stem digestion were also conducted.

研究分野：分子海洋生物学

キーワード：付着生物 足糸 酵素 生理 イガイ コラゲナーゼ マトリックスメタロプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

イガイ類に代表される付着生物は、一部の種は食用に利用されるものの、その多くは船舶や養殖施設等に付着して水産業や増養殖業に被害を与える。例えば、船底に付着すると燃費効率や操作性を低下させ、養殖施設への付着は、通水性の阻害による養殖対象種のへい死、餌の競合、施設の沈下等を引き起こす。しかも、一旦付着してしまえば、付着力の強さ故にその除去は容易ではなく、海に関わる多くの産業にとって大きなコスト負担となっている。従って、付着生物の有効な防除策の開発は、海に関わる多くの産業にとって重要な課題である。

これまでに考案されてきた主な防除策は、付着生物の忌避する物質の塗布である。しかし、忌避物質の多くは生物に対する毒性を持ち、生態系に重大な影響をもたらす。従って、より生態系への負荷が軽く、防除対象種に対する特異性の高い防除方法の開発が求められている。

申請者は、過去にイガイ類の付着機構の研究を行い、イガイ類が付着のために用いる足系の構成成分を解明した(例: J. Biol. Chem. 270, 6698, 1995)。その過程で、水槽中で飼育しているイガイ類が、時々移動(引っ越し)することに気付いた。移動するためには、張り巡らした足系を一旦切って捨てる必要がある。実際、移動後には切られた足系の一部が残っていることが多い。しかし、これまで足系を切断するメカニズムについては全く報告がなかった。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、生物自身が持つ「引っ越し」の機能を利用して付着生物を防除する技術の開発である。そのために、イガイ類の行動観察、組織学、分子生物学的な手法を用いて足系切断と移動のしくみを解明し、その結果から、生態系への負荷が軽く、特異性の高い付着防除法の開発に寄与することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 研究材料の入手

イガイ類の中で最も代表的な種であるムラサキイガイ (*Mytilus galloprovincialis*) と、移動が頻繁に起こることがすでに観察されているシチヨウシンカイヒバリガイ (*Bathymodiolus septemdierum*) を主な材料とした。ムラサキイガイ小型個体は、千葉県長生郡白子町の海岸や東京都お台場海浜公園において採集した。中型個体は、市販されている個体を購入した。それぞれ、東京大学大気海洋研究所の飼育施設内で、天然海水または人工海水を用い、19 に馴致してから実験に供した。シチヨウシンカイヒバリガイは、海洋研究開発機構「新青丸」研究航海 KS-16-5 において、深海探査艇ハイパードルフィンを用いて採集した。採集後、新江ノ島水族館に

おいて天然海水を用いて 5~10 で維持管理しながら適宜実験に供した。

(2) ムラサキイガイの移動実験

ムラサキイガイを低塩分、高塩分、高温、干出、捕食者(カニ)存在下などのストレス環境に 12 時間以上曝し、移動を誘起する条件をインターバル撮影により観察した。また、その結果から、条件を絞り込み 48 時間、さらに一部の条件については週単位の継続観察による確認を行った。

(3) ムラサキイガイの足系切断法の観察

ムラサキイガイを水槽に付着させ、その後の移動の様子を継続的に観察し、移動の様子をインターバル撮影した。

(4) 切断されたムラサキイガイ足系の観察

上記の実験において、切断された足系をグルタルアルデヒドで固定し、走査型電子顕微鏡観察を行った。

(5) RNA-seq 解析

ムラサキイガイの足を根元から先端まで 3 分割し、Illumina シーケンサーによる mRNA の網羅的解読を行った。得られた配列について BLAST 検索を行い、コラーゲン分解に関わる可能性のある配列を同定した。

(6) cDNA クローニング

同定された配列について、足からの cDNA クローニングを行った。単離された配列がコードするアミノ酸配列について、既知の類似配列との関係を知るために、分子系統解析を行った。また、ムラサキイガイの種々の組織における発現を逆転写 PCR により検出した。

(7) シチヨウシンカイヒバリガイの行動観察

シチヨウシンカイヒバリガイについても、水槽壁面に付着している個体について、継続的にインターバル撮影による行動観察を行った。行動の背景を探るために、センサー(Biol Open. 5, 1752-1757, 2016)による心拍分析や遊離アミノ酸分析も並行して行った。

4. 研究成果

(1) ムラサキイガイの移動条件

ムラサキイガイについては、捕食者や干出などの効果は明らかにならなかったが、温度や塩分については、移動を止めて殻を閉じ、外界の影響を遮断して「我慢する」行動をとる条件と、移動が活発になる条件があることが示唆された。絞り込んだ条件について 48 時間、1 週間の観察を行い、移動が活発になる条件下では移動距離が有意に増加することを明らかにした。移動の際には、足系の合成と切断を何度も繰り返すことも観察された。

(2) ムラサキイガイの足系切断法

足系切断行動の観察では、すでに張った足系の伸長限度を超えて無理に移動することにより、1本ずつ足系をちぎる方法と、足系を束ねている「幹」の部分の切ること、既存の足系を一度に切り捨てる方法の2種類の行動が観察された。後者では、切断を行う組織が足の根元の部分である可能性が示唆された。

(3) 切断された足系の観察

幹から切断された足系の走査型電子顕微鏡による観察においては、切断部位の表面が滑らかであることがわかった。この結果は、切断への酵素の関与を示唆する。

(4) 酵素 cDNA の探索と発現部位

足の根元の部分から、4種類のマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 様タンパク質をコードする cDNA が単離できた。分子系統解析を行った結果、4つのうちのひとつは既知の「コラゲナーゼ」に近い配列であることがわかった。足系の成分であるコラーゲンを分解している可能性がある。4種の遺伝子の発現部位を調べた結果、いずれも足の根元は主要発現部位のひとつであったが、そのほかの種々の組織でも強く発現しており、少なくともこれら4種のMMP様タンパク質は、足系切断専用の酵素ではないことが示唆された。

(5) シチヨウシンカイヒバリガイの観察

シチヨウシンカイヒバリガイは、従来の知見通り、足系の合成・切断を繰り返しながら水槽内を活発に移動した。その移動の様子は、ムラサキガイと類似していた。研究航海時の海況が悪く、十分な個体数を確保できなかったため、実験に使える個体数が限られ、様々な条件を試すことはできなかったが、センサーによる心拍測定や、「我慢する」行動を支える遊離アミノ酸を測定する方法の検討はできたため、今後も移動との関係を解明していきたい。

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 4件)

Nagasaki T, Koito T, Nemoto S, Ushio H, Inoue K. (2018) Simultaneous analysis of free amino acids and taurine-related compounds in deep-sea mussel tissues using reversed-phase HPLC. *Fish Sci* 84: 127-134.

Nakamura-Kusakabe I, Nagasaki T, Kinjo A, Sassa M, Koito T, Okamura K, Yamagami S, Yamanaka T, Tsuchida S, Inoue K. (2016) Effect of sulfide, osmotic, and thermal stresses on taurine transporter mRNA levels in the gills of the hydrothermal

vent-specific mussel *Bathymodiolus septemdiemum*. *Comp Biochem Physiol A* 191: 74-79.

Ikuta T, Takaki Y, Nagai Y, Shimamura S, Tsuda M, Kawagucci S, Aoki Y, Inoue K, Teruya M, Satou K, Teruya K, Shimoji M, Tamotsu H, Hirano T, Maruyama T, Yoshida T. (2016) Heterogeneous composition of key metabolic gene clusters in a vent mussel symbiont population. *ISME J* 10: 990-1001.

Koito T, Liu W, Morimoto S, Inoue K, Toyohara H. (2016) Comparison of taurine related compounds in deep- and shallow-water mussel species. *Plankton Benthos Res* 11: 81-86.

[学会発表](計 4件)

瀬尾絵理子・北嶋円・杉村誠・佐治俊幸・瀬尾芳輝・井上広滋・小島茂明 (2018) 硫化物曝露時におけるシチヨウシンカイヒバリガイの心拍変化 *ブルーアースサイエンス・テク* 2018.

北嶋円・瀬尾絵理子・井上広滋 (2018) 飼育下で観察されたシチヨウシンカイヒバリガイの運動について *ブルーアースサイエンス・テク* 2018.

佐々三依子・井上広滋 (2017) 海産動物特有の新規金属輸送体の機能解析. *ブルーアース* 2017.

今井さくら・佐々三依子・井上広滋 (2015) ムラサキガイの足系切断機構. 日本水産学会秋季大会.

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

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

<http://darwin.aori.u-tokyo.ac.jp/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 広滋 (INOUE, Koji)

東京大学・大気海洋研究所・教授

研究者番号：60323630

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

今井 さくら (IMAI, Sakura)

長崎 稔拓 (NAGASAKI, Toshihiro)

佐々 三依子 (SASSA, Mieko)

金城 梓 (KINJO, Azusa)

高林 優司 (TAKABAYASHI, Yuji)

瀬尾 絵理子 (SEO, Eriko)