

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：88003

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K04064

研究課題名(和文) サメ胎仔の糞から追う、脊椎動物の「授乳」の起源

研究課題名(英文) Evolution of milk secretion inferred from elasmobranch embryonic feces

研究代表者

富田 武照 (Tomita, Taketeru)

一般財団法人沖縄美ら島財団(総合研究センター)・総合研究センター 動物研究室・主任研究員

研究者番号：90774399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：板鰓類の子宮ミルクは、脊椎動物で最古の授乳システムである可能性があるが、その進化は十分に解明されていない。本研究では、子宮ミルクを分泌することが疑われているアカエイ類とネズミザメ類を調査した結果、彼らが出生前まで腸内に大量の糞を溜め込むことが明らかとなった。さらに、この糞は炭酸カルシウムの結晶を大量に含んでいることが明らかとなった。この炭酸カルシウムの結晶は、胎仔の腸内がアルカリ性に保たれている可能性を示唆する。これは、胃がまだ機能しておらず、胎仔の腸内細菌叢が親と異なることによって説明できる。腸内結晶は、地層中で長期的に保存されることから、授乳の進化を解明する直接証拠になりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、一般的に化石証拠として残りにくいと考えられる脊椎動物の授乳システムについて、初めて化石証拠として残りうる可能性を示した点で重要である。さらに、本研究を通して、未だ不明なことが多い板鰓類の子宮ミルクについて、ミルク分泌を行う子宮とミルク摂取を行う胎仔の両面から研究を行い、そのメカニズムの一部が解明されたことに意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Uterine milk in elasmobranchs may be the oldest lactation in vertebrates, but its evolutionary process is not fully understood. In this study, we examined Myliobatid stingrays and Lamniform sharks, both of which are suspected to secrete uterine milk. We found that they have large-sized intestine and accumulate large amounts of embryonic feces in their intestines. These feces contains calcium carbonate crystals, suggesting that the intestines of the fetuses may be kept alkaline. This can be associated with the observation that the stomach is not yet functioning and the intestinal flora of the fetus differs from that of the parents. Intestinal crystals is known to be stably preserved for a long time the may provide direct evidence to clarify the evolutionary process of lactation in vertebrates.

研究分野：魚類学

キーワード：授乳 子宮ミルク 板鰓類 炭酸カルシウム 胎仔便 進化

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物において、子宮で胎子を育てて産み落とす、胎生という仕組みは複数の系統で繰り返し進化してきた。最もシンプルな胎生の仕組みは、卵黄の栄養のみを使って子宮中で胎子が育成する方法であるが、一部のグループにおいては母体から胎子に卵黄以外の追加の栄養供給を行う方法を獲得ことが知られている。本研究で着目したアカエイ類とネズミザメ類は、板鰓類(サメ・エイ類)に含まれる。近年の研究によりこれらの動物は妊娠中に子宮から脂質を多く含む液体(子宮ミルク)を分泌し、胎子は子宮の中でその液体を摂取することによって、元々の卵黄サイズを大きく超える出生サイズまで成長することが知られている。これは、哺乳類で知られている「授乳」の仕組みに類似するものであるが、哺乳類が出生後の新生児にミルクを与えるのに対し、アカエイ類とネズミザメ類では出生前の胎子にミルクを与えるという点で異なっている。この子宮ミルクの仕組みは、脊椎動物で現在知られている中で最も原始的な「授乳」の仕組みである可能性があるが、その仕組みや進化過程は十分に理解されていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、(1)アカエイ類とネズミザメ類における授乳の仕組みを組織学的に解明すること、(2)胎子の腸内便中の結晶についてその正体を明らかにすること、(3)腸内結晶が形成する仕組みについてその仮説を提示すること、(4)腸内結晶が授乳の起源を解明する上で数少ない化石証拠になりうる可能性について議論すること、四点において研究を行なった。

3. 研究の方法

(1)授乳のメカニズムの研究: 沖縄周辺海域や瀬戸内海でのこれまでに調査によって収集した子宮や胎子のサンプルを組織学的、さらに東京大学海洋研究所の透過型電子顕微鏡を用いて調査を行い、ミルク分泌および、胎子の栄養摂取の仕組みについて研究を行なった。

(2)胎子便中の結晶に関する研究: 気仙沼漁協で水揚げされるネズミザメの胎子をサンプリングし、その胎子の腸内から結晶を分離し、琉球大学にてX線結晶解析を行うことで、その結晶の正体を明らかにした。

(3)糞便中で結晶が生成するメカニズムに関する研究: 上記の結果を踏まえ、糞便中の環境の分析から、糞便中で結晶が生成するメカニズムについて仮説を提唱し、授乳と腸内結晶の関係性を明らかにした。

(4)以上の結果を踏まえて、胎子の腸内結晶が授乳の仕組みの進化を解明する上で有用な証拠となる可能性について考察を行なった。

4. 研究成果

(1) 授乳メカニズムの研究

沖縄県読谷村の2015年に混獲された妊娠初期のホホジロザメ(ネズミザメ科)で最終した子宮の固定標本の組織切片を、光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡で調査し、ミルク分泌の仕組みを哺乳類の乳腺と比較した。その結果、ホホジロザメのミルク分泌は、まず子宮上皮細胞中への脂肪の蓄積し、その細胞の核凝縮とそれに引き続く細胞の破裂によって、細胞内部の脂肪が子宮内に拡散するというメカニズムによって可能になっていることが明らかとなった(図1)。この分泌様式は、全分泌と呼ばれる。このミルク分泌様式は哺乳類の方法(アポクリン分泌)とは異なっており、むしろ哺乳類の皮脂腺が脂を分泌する方法に近い。一方で、過去の研究では、アカエイ類のミルク分泌様式がアポクリン分泌である可能性が示唆されており、同じ板鰓類のミルク分泌においてもグループ間の違いがある可能性が示唆された(Tomita et al., 2022a)。

さらに、ミルク摂取をする胎子側の適応を解明するために、瀬戸内海で採集されたアカエイの胎子の腸を調査した。その結果、彼らは相対的に親の8倍の大きい腸を持つことが明らかとなり、しかもその後半に大量の糞便を蓄積していることが明らかとなった。直腸は出産直前まで開通しておらず、この特徴は、授乳によって発生した大量の消化残渣

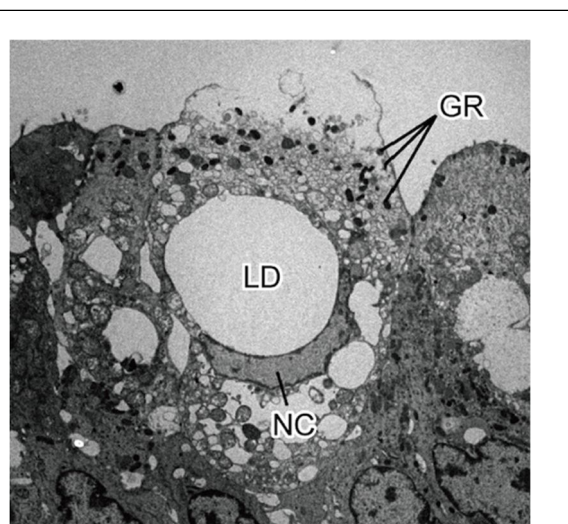


図1:ホホジロザメの子宮上皮細胞の透過型電子顕微鏡写真。脂質(LD)を含んだ細胞が破裂しているところの写真を示す。

この特徴は、授乳によって発生した大量の消化残渣

を糞として溜め込むための適応であると考えられた(Tomita et al., 2020)。この仮説は、哺乳類の大腸に似て腸の後半に水の吸収に関わるとされるゴブレット細胞が多く分布していることも整合的である。このような大きな腸は、ネズミザメ類のホホジロザメやネズミザメの胎仔でも確認しており、彼らの子宮ミルクを摂取する特殊な生態と関連していることを示している。

(2) 糞便中に生成する結晶の分析

今回我々は、子宮ミルクを摂取した胎仔の腸内に大量の結晶が含まれていることを確認した。その結晶を調査するために、まず糞便より結晶を単離する方法の確立を行なった。我々は、気仙沼漁港に水揚げされるネズミザメから糞便を採取し、それを次亜塩素酸溶液中に溶かして数日間放置することで結晶以外の有機物を分解し、それを70%エタノールで繰り返し洗浄することで結晶を単離した。この結晶を乾燥させたのちに、光学顕微鏡で観察したところ、0.05ミリメートルほどの結晶が多数確認できた。さらに、その結晶を沖縄美ら島財団が所有する走査型電子顕微鏡で観察したところ、小さい結晶が集合した球形であることが明らかとなった(図2)。

さらに、この結晶を琉球大学のX線結晶分析装置にて調査したところ、この結晶が、純粋な炭酸カルシウム結晶であることが明らかとなった。また、その結晶構造から、この炭酸カルシウム結晶はカルサイトと少量のダークライトの混合物であることが明らかとなった。この分析結果は、結晶が酢酸などの弱酸によって発泡および溶解することとも整合的である。

同様の処理を親の腸内便に行なってもこの結晶が見つかることはなく、胎仔の特徴と考えられる。このような腸は、ネズミザメ類のホホジロザメや、アカエイ類のヒョウモンオトメエイの胎仔でも確認されており、これらの結果は、この腸内結晶が授乳と密接な関係があることを示唆する。

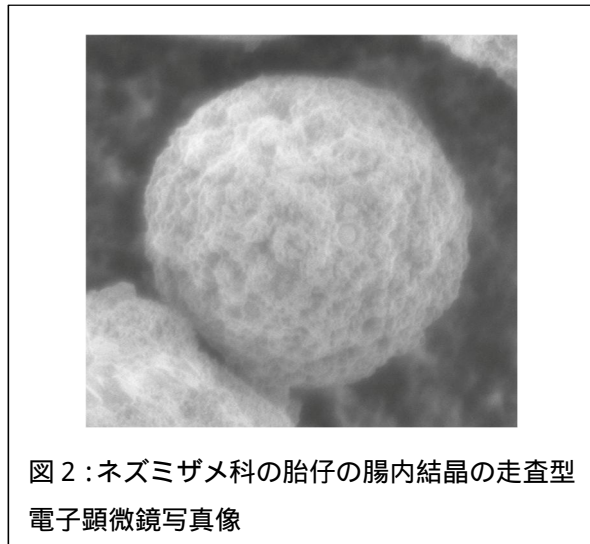


図2:ネズミザメ科の胎仔の腸内結晶の走査型電子顕微鏡写真像

(3) 結晶生成メカニズムの解明

腸内結晶の正体が明らかとなったことで、この結晶生成メカニズムに関して考察を行なった。炭酸カルシウムは弱酸由来の塩であり、酸性条件下では安定して維持されず、生成にはアルカリ環境が必要である。一般的に、脊椎動物の腸内環境は中性から弱酸性で維持されており、これは、強酸性の胃液と混ざった消化物が、腸内で分泌される強アルカリ性の膵液によって中和されることによる。

ネズミザメ類やアカエイ類の胎仔の腸内環境がアルカリ性に保たれているとすれば、これを説明する一つの仮説として、彼らに想定される特殊な消化プロセスが考えられる。両者の糞便の色から、すでに胆汁の分泌が胎仔の段階で開始していると考えられる。通常の腸内の消化プロセスが胎仔の段階ですでに開始されている可能性を示唆する。一方、ネズミザメ胎仔の段階の胃は極めて薄くミルクの貯蔵タンクとして機能しており、胃液の分泌も始まっていないと考えられる。このことから、腸内環境は、膵液の液性に強く影響を受け、その結果として腸内がアルカリ性に保たれている可能性がある。

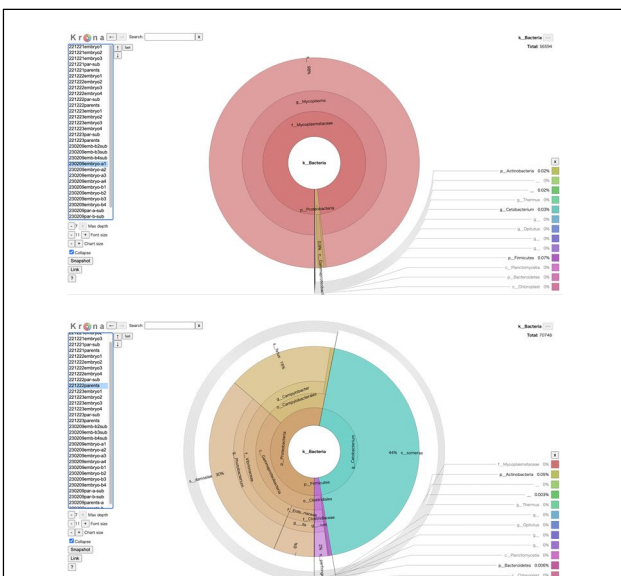


図3:ネズミザメの胎仔の腸内細菌叢(上)、大人の細菌叢(下)と異なり、90%以上をマイコプラズマ属が占める。

もう一つの仮説として、この腸内結晶に微生物が関わっている可能性がある。自然界では、特定の微生物によって炭酸塩が作られることがあり、球形の結晶が生成される例も報告されている。今回炭酸カルシウム結晶として、カルサイトの他、無機的に生成されにくいダークライトが含まれていることもこの仮説を支持しているように思われる。本研究では、ネズミザメの胎仔の糞便中の細菌叢をメタバーコーディングの手法で解析を行なって、親と胎仔の間で明確な細菌叢の違いが明らかとなった。胎仔の腸内

細菌叢は、その90%以上がマイコプラズマに独占されていることで特徴づけられ、ほとんどマイコプラズマを割合として含まない親の腸内細菌叢とは対照的である(図3)。このマイコプラズマは種レベルでの特定はできておらず、この腸内細菌叢の違いが腸内結晶の生成とどのような関連があるのか(あるいは無関係なのか)解明することは今後の課題である。

(4) 腸内結晶は「授乳」進化の解明に有用か

今回、胎仔の腸内から発見される腸内結晶は、ミルク摂取を受ける板鰐類に特異的に見られることが強く示唆された。このことは、腸内結晶の発見が、子宮内授乳の証拠となりうる可能性を示唆する。さらに、今回その腸内結晶の成分を分析したところ、カルサイトとダーライトの結晶であることが明らかとなり、その色や形状にも地質中で無機的にできる炭酸カルシウム結晶とは異なる特徴があることが明らかとなった。化石種の授乳については、その多くが化石証拠として残されない一方で、これら炭酸塩の結晶は長期的に保存されると考えられる。胎仔化石の腸内でこの結晶の発見をすることが、これまで得ることができなかった授乳の物証となると期待される。

さらに、今回の研究は現在我々が行なっているサメの人工子宮装置を用いることで、将来検証実験が可能である。現時点では、ミルク摂取を行わないヒレタカフジクジラというサメの胎仔の人工環境下での飼育を行っている(Tomita et al., 2022b)。その胎仔は出生サイズまで飼育してもごくわずかの糞便しか蓄積せず、その糞便からも腸内結晶は確認されていない。今後、ミルク摂取をする板鰐類の胎仔を人工子宮装置内で飼育することができるようになることで、その胎仔を用いた腸内結晶生成過程についてより実験的なアプローチが可能になると考えられる。

<引用文献>

- Taketeru Tomita, Masaru Nakamura, Yasuhisa Kobayashi, Atsushi Yoshinaka, Kiyomi Murakumo, Viviparous stingrays avoid contamination of the embryonic environment through faecal accumulation mechanisms, *Scientific reports*, 10, 2020, 7378-7378
- Taketeru Tomita, Masaru Nakamura, Ryo Nozu, Nobuhiro Ogawa, Minoru Toda, Keiichi Sato, Mode of uterine milk secretion in the white shark, *The Anatomical Record*, 305, 2022, 1724-1731
- Taketeru Tomita, Minoru Toda, Kiyomi Murakumo, Atsushi Kaneko, Nagisa Yano, Masaru Nakamura, Keiichi Sato, Five-Month Incubation of Viviparous Deep-Water Shark Embryos in Artificial Uterine Fluid, *Frontiers in Marine Science*, 9, 2022, 825354

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tomita Taketeru, Toda Minoru, Murakumo Kiyomi, Kaneko Atsushi, Yano Nagisa, Nakamura Masaru, Sato Keiichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Five-Month Incubation of Viviparous Deep-Water Shark Embryos in Artificial Uterine Fluid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Marine Science	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmars.2022.825354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tomita Taketeru, Nakamura Masaru, Kobayashi Yasuhisa, Yoshinaka Atsushi, Murakumo Kiyomi	4. 巻 10
2. 論文標題 Viviparous stingrays avoid contamination of the embryonic environment through faecal accumulation mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-64271-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tomita Taketeru, Nakamura Masaru, Nozu Ryo, Ogawa Nobuhiro, Toda Minoru, Sato Keiichi	4. 巻 305
2. 論文標題 Mode of uterine milk secretion in the white shark	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Anatomical Record	6. 最初と最後の頁 1724 ~ 1731
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ar.24860	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

産まれるまでうちは我慢！？胎生エイの胎仔の排泄システムに関する論文が掲載されました
https://churashima.okinawa.ocrc/marine_organisms/report/1590548027/

「授乳」をするサメ ホホジロザメに新発見‼ ミクロな観察からミルク分泌の仕組みが明らかに！
<https://churashima.okinawa/pressrelease/1643333620/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------