

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06204

研究課題名(和文) 高品質真珠生産へ向けて - 挿核前の母貝の免疫抑制が真珠形成に与える影響解明

研究課題名(英文) To high-quality pearl production - Research of the effects of immunosuppression on mother pearl before implantation

研究代表者

佐野 菜採 (Sano, Natsumi)

三重大学・生物資源学研究所・学術研究員

研究者番号：50636545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：真珠養殖では、挿核前に母貝を過密飼育などで生理的な抑制をする「仕立て」という行程がある。本研究は、仕立ての指標を提示することを目的として行われた。仕立ての有無での外套膜の遺伝子発現の比較をRNA-seqにより行い、仕立てにより、msi31 やPrismarin-14の稜柱層形成に関連する遺伝子発現が低下し、活性酸素分解酵素(SOD)の発現が上昇した。しかし、これらの遺伝子の真珠袋での発現動態は仕立ての有無で顕著な差はなく、真珠品質の向上との関連は認められなかった。SOD活性も仕立てで変動することが分かり、指標の候補となることが考えられた。さらに、SODは夏季外套萎縮症での上昇も明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

挿核前に母貝を過密飼育などで生理的な抑制をする「仕立て」により真珠品質が向上すると考えられているが、その反面、疾病に対する抵抗性が落ちることが知られている。真珠品質を保ちながら抵抗性を低下させ過ぎない仕立ての指標を探索することを目的として、真珠形成に用いられる真珠袋を形成する外套膜組織でのいくつかの遺伝子の顕著な変動を明らかにした。その中でも、組織を採取せず、酵素活性として測定できる活性酸素分解酵素が指標となりうる結果を得た。また、この酵素が2019年から全国の真珠養殖場で問題となっている夏季外套萎縮症で上昇することを明らかにし、今後、この病気の問題解決に繋がる結果を得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：In pearl culture, there is a process called "Shitate" in which mother oysters are physiologically controlled by overcrowding before the insertion. The purpose of this study was to provide an index of "Shitate". We compared the gene expression in the mantle of the pearl oyster with and without "Shitate" by RNA-seq and found that "Shitate" causes a decrease in genes related to the formation of prismatic layer (msi31 and Prismarin-14) and an increase in reactive superoxide dismutase(SOD). However, the kinetics of expression of these genes in the pearl sac did not differ significantly between "Shitate" and non-"Shitate", and there was no association between "Shitate" and improved pearl quality. However, SOD was also found to vary with "Shitate" as an enzyme activity, suggesting that it may be a candidate for an indicator. Furthermore, SOD was also found to be elevated in summer mantle atrophy.

研究分野：水産増殖

キーワード：アコヤガイ 真珠 外套膜 殻体基質タンパク質 活性酸素分解酵素 SOD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

真珠養殖では、母貝を挿核前に過密飼育する等して生理状態を抑制し、挿核に適した状態にする「仕立て」が行なわれている。「仕立て」により真珠品質が向上すると考えられているが、その反面、疾病に対する抵抗性が落ちることが知られている。近年、漁場の悪化や感染症の蔓延で生産性が安定しない真珠養殖業では、真珠品質を保ちながら抵抗性を低下させ過ぎない「仕立て」を科学的に推定することは喫緊の課題である。

## 2. 研究の目的

真珠はアコヤガイの生殖巣に移植された他個体の外套膜が移植核を取り囲み（真珠袋）、貝殻基質タンパク質を分泌し、核表面に炭酸カルシウム結晶が形成されたものである。貝殻基質タンパク質の分泌には挿核される母貝の生理状態が影響すると考えられるため、母貝の免疫抑制である「仕立て」が挿核後の真珠袋における貝殻基質タンパク質および真珠袋を取り囲む母貝の血球の遺伝子発現にどのように影響するか明らかにし、適正な「仕立て」とその指標を提示する。

当初の目的に加え、この課題に取り組んだ時期に、三重県の英虞湾を始め全国の真珠養殖場での真珠養殖場で「外套膜委縮症」が問題となった。この養殖現場では、仕立てにより発症しやすくなると言われている。仕立ての網羅的発現解析で発現変動遺伝子として検出され、さらに挿核後の経時的変化でも有意差が認められた活性酸素分解酵素（SOD）の夏季外套膜委縮症での動態を明らかにすることも試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) ELISA によるガレクチンの測定

アコヤガイガレクチンに対する特異抗体を配列から予想されるペプチドを抗原にして作製した。96 穴マイクロプレートに抗原を固相化し、抗ガレクチンウサギ抗体を一次抗体とし、抗ウサギ IgG 抗体を二次抗体としたペルオキシダーゼの発色系の ELISA の構築を試みた。仕立てをした貝としていない貝、それぞれに挿核し、経時的にサンプリングし、血しょう中のガレクチン量を構築した ELISA で測定した。

### (2) 網羅的発現解析（RNA-seq）による仕立ての有無での遺伝子発現の比較

仕立ての有無で 3 個体ずつの外套膜辺縁部 (ME) と縁辺部 (MP) から RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。得られたリードカウントデータについて、階層的クラスタリング解析、主成分分析、比較群間で発現量が顕著に異なる遺伝子 (DEG) の検出等を行った。

### (3) DEG の挿核後の動態

「仕立て」を行った貝，行っていない貝の2群の貝から，挿核直前，挿核2週間後，8週間後に各8個体ずつ採取し，外套膜のME部とMP部からRNAを抽出し，DEGの中でアコヤガイで機能が研究されているME部では6種類，MP部では8種類の遺伝子の発現を定量PCRにより比較した。

また，2群の挿核2週間後と8週間後の真珠袋からもRNAを抽出し，これらの遺伝子の定量PCRを行った。さらに，回収した真珠のシミを観察し，シミの程度を評価し，遺伝子発現との関連を解析したが，有意な差は認められなかった。

#### (4)SODの酵素活性への仕立ての影響

(3)の測定結果から有意差のあったSODについて，仕立てをした貝とそうでない貝のヘモリンパ中のSODの酵素活性の測定を行った。同時に外タンパク濃度も測定した。養殖現場では，挿核前の2週間程度仕立てを行う「夏抑制」の他に，秋から挿核までの約半年の間仕立てを行う「秋抑制」という仕立ても行われている。そこで，秋抑制，夏抑制の両方のサンプルの測定を行った。

#### (5)SODのアコヤガイ夏季外套膜委縮症における動態

夏季外套膜委縮症の原因ウイルスを接種後，外套膜ME部のSOD遺伝子の発現量と外套膜外液中のSODの酵素活性を経時的に測定した。接種18日目まで3日ごとに8個体の左右それぞれの外套膜と外套膜外液をサンプリングした。

### 4. 研究成果

#### (1)仕立ての有無によるガレクチンの動態

抗体濃度，反応時間等を検討し，ELISAを構築できた。仕立ての有無による差は認められなかった。しかし，構築したELISAは今後の研究に役立つと考えられる。

#### (2)RNA-seqによるDEGの検出

RNA-seqの階層的クラスタリング解析とPCAの結果，仕立ての有無で異なるグループが形成された。よって，仕立てが外套膜縁部の遺伝子発現に影響している事が明らかに

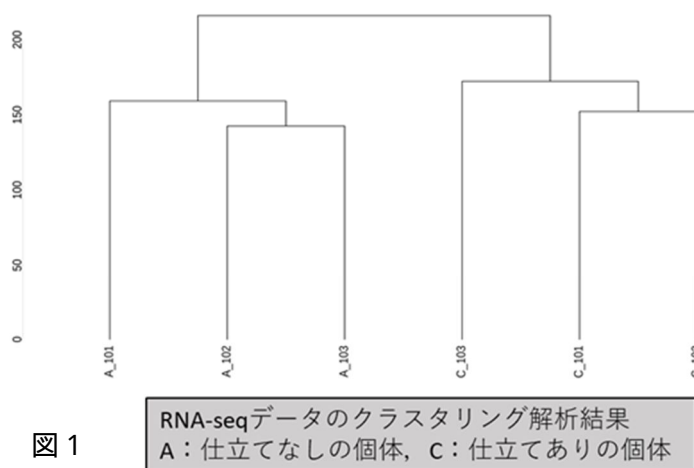


図1

なった。FDR (偽発見率) = 0.1 での割合は 1.25% で DEG が検出された (図 1, 表 1)

### (3) DEG の挿核後の動態

挿核直前の DEG の発現量は, ME 部では仕立て有りの群では無しの群に比べ, 稜柱層の形成に關与する msi31 と Prismarin-14 は発現量が低く, アラゴナイトの結晶化を阻害する遺伝子である pf44, および活性酸素分解酵素である Cu/Zn pfSOD は高かった。また, これらの遺伝子は挿核後 8 週間後には仕立て無しの群と同等の発現量になった。

MP 部では仕立て有りの群では無しの群に比べ, msi31, Prismarin-14, および免疫関連遺伝子の CTL, C1q, pfty1 などの発現が低かった。経時的な測定では仕立ての影響が見られたのは, msi60 と CTL のみであった。

真珠袋での発現に仕立ての有る無しでの有意な差は認められず, シミの程度による差も認められなかった。

### (4) SOD の酵素活性への仕立ての影響

秋抑制では SOD 活性は仕立てをした群で有意に低かった。タンパク濃度も低かったことから, 仕立てにより貝のタンパク合成能力が低下しており, SOD 活性も低下していると考えられた。夏抑制では有意差が認められなかった。夏抑制では, 遺伝子発現は上昇しているにもかかわらず, 酵素活性には有意差がなかったことは, SOD 活性が一つの遺伝子の発現のみによるものではないと考えられ, 今後, 解明する必要があると考えられた。

### (5) 夏季外套膜萎縮症における SOD の動態

外套膜での SOD 遺伝子の発現は 3 日後に接種前の約 2 倍になった後, 一旦低下し 12 日後から再び緩やかに上昇した。外套膜外液の SOD 活性はウイルス接種 6 日後まで低下し, その後, 急激に上昇し 12 日後に最高値となった (図 2) 以上の結果から, アコヤガイの夏季外套膜萎縮症では, 原因ウイルスの感染により外套膜や外套膜外液中で活性酸素が増加し SOD 活性が上昇するこ

表 1

DEGの中でアコヤガイの遺伝子として同定されている遺伝子

DEG of ME	DEG of MP
OT-47	msi31
msi31	Prismarin-14
Prismarin-14	SOD
pf44	FREF
SOD	TLR
HSP	CTL
	C1q
	pfty-1

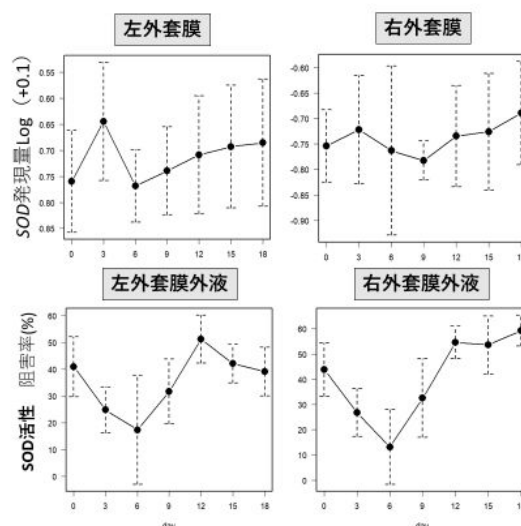


図2 夏季外套膜萎縮原因ウイルス接種後の日数

とが、遺伝子発現量と酵素活性の両方の動態から推定された。

## まとめ

- ・ 研究計画時に先行研究から「仕立て」と関連すると推定していたアコヤガイの液性生体防御因子のガレクチンは関連が認められなかった。
- ・ RNA-seq と qPCR の結果、アコヤガイ外套膜中の発現遺伝子の中で、仕立てにより、稜柱層の形成に関与する msi31, prismaticin-14 と免疫関連遺伝子の CTL, C1q, pfty1 の発現量の低下すること、アラゴナイトの結晶化を阻害する遺伝子である pf44, および活性酸素分解酵素である SOD の発現が上昇することが明らかになった。
- ・ これらの遺伝子の真珠袋での発現に仕立ての有る無しでの有意な差は認められず、シミの程度による差も認められなかった。
- ・ SOD 活性は、秋抑制では低下、夏抑制では有意差無しとなり、仕立ての指標に利用するにはさらなる研究が必要と考えられた。
- ・ 夏季外套膜萎縮の原因ウイルス感染により、SOD が上昇することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sano N, Kuriyama I, Tanaka S, Komaru A	4. 巻 69
2. 論文標題 Effects of low-salinity and no-feed post-operative care during pearl sac formation on the expression profiles of shell matrix protein genes in the Akoya pearl oyster, <i>Pinctada fucata</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aquacultic Science	6. 最初と最後の頁 231-234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐野菜採・栗山功・古丸明
2. 発表標題 真珠養殖の挿核前の行程「仕立て」が アコヤガイ外套膜の遺伝子発現に与える影響
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐野菜採・松山知正・井上誠章
2. 発表標題 アコヤガイ夏季外套膜萎縮症の貝殻症状のEPMA解析と外套膜の遺伝子発現解析
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐野菜採・松山知正
2. 発表標題 アコヤガイの夏季外套膜萎縮症原因ウイルスの感染試験における活性酸素分解酵素（SOD）の動態
3. 学会等名 令和4年度日本水産増殖学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担者	古丸 明  (komaru akira)  (10293804)	三重大学・生物資源学研究科・教授   (14101)	

	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
研究 協力者	栗山 功  (kuriyama isao)	三重県水産研究所	現所属は三重県県庁

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
---------	---------