

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：51601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05757

研究課題名（和文）ナマコ・ウニ種苗生産のための新技術：D-アスパラギン酸を用いた人工催熟法

研究課題名（英文）New Techniques for Sea Cucumber and Sea Urchin Seed Production: Artificial Maturation Using D-Aspartate

研究代表者

柴田 公彦（SHIBATA, Kimihiko）

福島工業高等専門学校・化学・バイオ工学科・准教授

研究者番号：10369928

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ナマコやウニの性成熟を人為的に誘起するためのメカニズムを解明することを目指し、D-アスパラギン酸およびその代謝酵素に注目した。まず、ナマコの生殖腺におけるD-アスパラギン酸含有量およびアスパラギン酸ラセマーゼ活性を測定し、これらが生殖腺の成熟に関与している可能性を示した。また、イトマキヒトデのアスパラギン酸ラセマーゼ遺伝子およびD-アスパラギン酸オキシダーゼ遺伝子を単離し、その遺伝子発現解析に着手した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ナマコやウニの性成熟に関与するメカニズムを分子レベルで解明することを目指している。これにより、水産業における種苗供給の効率化に寄与することが期待される。特に、D-アスパラギン酸とその代謝酵素が性成熟に果たす役割を明らかにすることで、棘皮動物の生理学的理解を深め、これらの資源の持続可能な利用に向けた科学的基盤を提供することができる。また、本研究の成果は、他の水産生物における応用の可能性も示唆しており、広範な社会的意義を持つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the mechanisms underlying the artificial induction of sexual maturity in sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) and sea urchins, focusing on D-aspartate (D-Asp) and its metabolic enzymes. Initially, we quantified the levels of D-Asp and aspartate racemase activity in the gonads of sea cucumbers, indicating the potential involvement of these compounds in gonadal maturation. Additionally, we isolated the genes encoding aspartate racemase and D-aspartate oxidase from the starfish and initiated gene expression analysis.

研究分野：生化学

キーワード：D-アスパラギン酸 アスパラギン酸ラセマーゼ D-アスパラギン酸オキシダーゼ 棘皮動物 ヒトデ ナマコ

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ナマコやウニは水産業において重要な生物であるが、天然資源は減少傾向にある。これらの資源量を回復し、安定した生産を実現するためには、効率的かつ計画的な種苗供給が不可欠である。そのため、性成熟を人為的に誘起する技術の確立が重要な課題となっている。

研究代表者らは、棘皮動物であるイトマキヒトデ組織に存在する D-アスパラギン酸やその合成酵素であるアスパラギン酸ラセマーゼが性成熟に関与している可能性を見出し、さらに D-アスパラギン酸投与が生殖腺指数の上昇を誘起することを発見した¹⁾。この発見が上記の課題を解決できる可能性があると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

棘皮動物であるナマコやウニへの応用展開のためには、D-アスパラギン酸が関わる性成熟メカニズムの詳細を明らかにする必要がある。そこで本研究では、D-アスパラギン酸代謝酵素の遺伝子同定を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 組織中の D-アスパラギン酸の定量

先行研究¹⁾と同様に、マナマコ生殖腺から調製したアミノ酸抽出液を α -フタルアルデヒドおよび *N*-アセチル-L-システインを含む誘導体化試薬と反応させ、蛍光誘導体化した後、HPLC 分析を行った。

(2) アスパラギン酸ラセマーゼ活性の測定

先行研究¹⁾と同様に、マナマコ生殖腺から調製した粗酵素液に基質として L-アスパラギン酸を添加し、インキュベーションを行った。酵素反応によって生成した D-アスパラギン酸の量から酵素活性を算出した。

(3) マナマコへの D-アスパラギン酸投与

先行研究¹⁾を参考に、未成熟のマナマコに D-アスパラギン酸を投与し、一定期間の飼育後に生殖腺指数の変化を測定した。

(4) イトマキヒトデのアスパラギン酸ラセマーゼ遺伝子および D-アスパラギン酸オキシダーゼ遺伝子の単離

イトマキヒトデ精巢の全 cDNA を鋳型とした Degenerate PCR および 3'/5' -RACE PCR を行った。それらの PCR 産物の塩基配列解析を行った。

(5) His-Tag 融合タンパク質の精製と活性測定

大腸菌により His-Tag 融合アスパラギン酸ラセマーゼタンパク質を発現誘導した。大腸菌を破砕し、各種クロマトグラフィーを用いて His-Tag 融合タンパク質の精製を行った。SDS-PAGE および抗 His-Tag 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより目的タンパク質の有無を確認するとともに、(2)と同様に HPLC を用いたアスパラギン酸ラセマーゼの活性測定を行った。

(6) リアルタイム PCR による D-アスパラギン酸代謝酵素遺伝子の発現定量系の最適化

リアルタイム PCR (qPCR) による発現定量系の条件検討を行った。異なる組織や条件下でサンプルを収集し、それぞれ RNA を抽出して cDNA を合成した。次いで、特異的なプライマーを設計し、qPCR を実施して発現量を定量した。発現量は内在性コントロールと比較し

て評価した。

4. 研究成果

(1) マナマコ (*Apostichopus japonicus*) における D-アスパラギン酸およびアスパラギン酸ラセマーゼ活性と生殖腺指数の関係

生殖腺指数によりナマコを複数のグループに分け、生殖腺の総アスパラギン酸に対する D 型の比率 [D/(D+L) %] を比較した。生殖腺指数が低いグループでは D/(D+L) % が約 25% であったのに対し、生殖腺指数が高いグループでは約 40% と有意に高い値 ($p < 0.01$) を示した。アスパラギン酸ラセマーゼ活性も同様に比較したところ、生殖腺指数が高いグループは、生殖腺指数が低いグループよりも 2.4 倍高い活性値 ($p < 0.05$) を示した。これにより、ナマコにおいても生殖腺の成熟に D-アスパラギン酸が関与していることが示唆された。

(2) ナマコへの D-アスパラギン酸投与の効果

ナマコへの D-アスパラギン酸投与の効果を確認するために、ナマコの種類やサイズ、D-アスパラギン酸濃度、投与回数、投与期間などを変えて確認したが、現段階で生殖腺指数が有意に変化するような投与条件が見出せなかった。

(3) イトマキヒトデのアスパラギン酸ラセマーゼ遺伝子および D-アスパラギン酸オキシダーゼ遺伝子の単離

イトマキヒトデとナマコの差異を明確にするため、まずはイトマキヒトデの D-アスパラギン酸に関わる性成熟メカニズム解明に必要なアスパラギン酸ラセマーゼ cDNA の全塩基配列を決定した。その塩基配列から得た推定アミノ酸配列には、ピリドキサルリン酸依存性の酵素に見られるピリドキサルリン酸結合配列などを観察することができた。

またイトマキヒトデ組織において D-アスパラギン酸の分解に関与する D-アスパラギン酸オキシダーゼの cDNA 断片の塩基配列の決定にも成功した。

(4) His-Tag 融合アスパラギン酸ラセマーゼタンパク質の精製と活性測定

大腸菌によりリコンビナントタンパク質を発現し、アフィニティークロマトグラフィーなどを用いて精製した後に活性測定を行なったところ、高いアスパラギン酸ラセマーゼ活性を示した。このことから本研究で明らかにした遺伝子が、アスパラギン酸ラセマーゼ遺伝子であることを確認した。

(5) リアルタイム PCR による D-アスパラギン酸代謝酵素遺伝子の発現定量系の最適化

リアルタイム PCR による D-アスパラギン酸代謝酵素遺伝子の発現定量系の最適化を行い、アスパラギン酸ラセマーゼ遺伝子の発現量を定量することが可能になった。様々な組織や生理的条件における D-アスパラギン酸代謝酵素遺伝子の発現状況の確認に着手しており、引き続き行っていく予定である。

<引用文献>

- 1) Shibata K, Sugaya N, Kuboki Y, *et al* (2020) Aspartate racemase and D-aspartate in starfish; possible involvement in testicular maturation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 84:95-102.
<https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1660614>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木心優, 門井真理乃, 阿部勝正, 柴田公彦
2. 発表標題 イトマキヒトデのアスパラギン酸ラセマーゼ遺伝子の同定
3. 学会等名 第9回 関東磐越地区化学技術フォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 富樫侑生, 柴田公彦
2. 発表標題 マナマコにおける生殖腺成熟とD-アスパラギン酸の関係
3. 学会等名 令和4年東北・北海道地区高等専門学校専攻科産学連携シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富樫侑生, 柴田公彦
2. 発表標題 棘皮動物における生殖腺成熟とD-アスパラギン酸の関係
3. 学会等名 第8回関東磐越地区化学技術フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 門井真理乃, 阿部勝正, 柴田公彦
2. 発表標題 イトマキヒトデのアスパラギン酸ラセマーゼと生殖腺成熟の関係
3. 学会等名 第7回関東磐越地区化学技術フォーラム
4. 発表年 2021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	阿部 勝正 (ABE Katsumasa) (40509551)	函館工業高等専門学校・物質環境工学科・准教授 (50101)	

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