

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580194

研究課題名（和文） 人工餌料開発をめざしたウニの栄養吸収および成長機構の解明

研究課題名（英文） Digestive physiology to development the artificial diet for sea urchin.

研究代表者

浦 和寛 (URA KAZUHIRO)

北海道大学・大学院水産科学研究院・助教

研究者番号：90360940

研究成果の概要(和文):北海道はウニの主要な生産地であり、従来天然ウニを漁獲すると共に、生殖巣の発達の悪いウニを良漁場へ移植するなどの対処がなされてきた。そこで、これらのウニを養殖することで生殖巣の増大を図り、商品として有効利用する試みが行われ生殖巣の品質向上に適した餌の開発が必要とされている。養殖事業や中間育成事業を効率良く行うためには、量や品質を管理しやすい人工餌料の開発が重要である。人工餌料の開発にはウニの消化吸収能力に関する基礎的知見の集積が必須であるが、これまで殆ど行われてきていなかった。本研究では、ウニ消化酵素を精製し生化学的特性を明らかにすることを目的とした。その結果、エゾバフンウニの消化酵素はキタムラサキウニに比べ高温に弱いということが明らかになった。

研究成果の概要(英文): Subtilase and cellulase exhibited hydrolytic activity toward carboxymethyl cellulose with optimum temperature and pH at 30 ° C and pH 8.0, respectively. The thermal stability was characterized and temperature at which activity decreased to 50% by the 30 min treatment at pH 7.0 was 32 ° C. The isolated cellulase activity was remained at high level at 5-20 ° C which is growth temperature of the short-spined sea urchin. Thus, we confirmed that a cellulase of the short-spined sea urchin is adaptive enzyme around low water temperature.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1400000	420000	1820000
2011年度	1200000	360000	1560000
2012年度	900000	270000	1170000
年度			
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・生理

キーワード：ウニ・消化酵素・精製・特異抗体・局在

1. 研究開始当初の背景

ウニは古くから食用にされてきた水産重要種である。北海道はウニの主要な生産地であり、従来天然ウニを漁獲するとともに、生殖巣の発達の良いウニを良漁場へ移植するなどの対処がなされてきた。しかし、漁獲量は減少している。そこで種苗生産、育成の技術開発が盛んに行われるようになり、人工種苗生産技術確立された。現在、放流後の種苗の生残率を上げるために種苗生産後もウニを飼育する中間育成事業が行われている。しかし、中間育成を行うためには陸上水槽などの設備が必要であり、ウニの餌となる海藻が減少する冬期間には海藻の代替餌料を確保する必要がある。したがって、養殖事業や中間育成事業を効率的に行うためには、量や品質を管理しやすい人工餌料の開発が重要である。これまで、ウニに魚肉などの高たんぱく質餌料を与えた場合、海藻に比べ摂餌量は少なくなるものの生殖巣は肥大するが生殖巣の苦味が強くなることが知られている。一方、海藻など低タンパク質餌料を与えたウニの生殖巣は、高タンパク質餌料を与えたものに比べて大きさの点では劣るものの、味は優れている。このように生殖巣の発達および味は摂餌物に大きく影響される。このことから養殖事業や中間育成の人工餌料開発にはウニ自身の消化吸収機構の生理学的知見をもとに、ウニの成長や生殖巣の品質に適した餌を開発することが必要である。しかし、現状では、ウニの消化吸収能力、栄養要求、成長機構、成熟機構などの基本的な生理学的情報がまったく不足している。そこで、本研究ではウニの消化吸収と成長機構解析を行う。

2. 研究の目的

ウニは古くから食用にされてきた水産重要種である。北海道はウニの主要な生産地であり、従来天然ウニを漁獲すると共に、生殖巣の発達の良いウニを良漁場へ移植するなどの対処がなされてきた。しかし、漁獲量は減少している。そこで種苗生産、育成の技術開発が盛んに行われるようになり、人工種苗技術が確立された。その結果、ウニの漁獲量は回復傾向にあるが、期待されるほどの漁獲量の増加には至っていない。その要因の一つとして磯焼け漁場の存在が示唆されている。磯焼け漁場ではサンゴモ科の紅藻が優先し、ウニの餌となるコンブなどの大型海藻は生育できない。そのため放流した種苗が餌不足に陥り、種苗放流事業の十分な効果が得られない可能性がある。磯焼け漁場のウニは餌不足のため生殖巣の発達が低くほとんど利用されていない。そこで、これらのウニを養殖することで生殖巣の増大を図り、商品として有

効利用する試みが行われ生殖巣の品質向上に適した餌の開発が必要とされている。また、放流後の種苗の生残率を上げるために種苗生産後も稚ウニを飼育する中間育成事業が行われている。しかし、中間育成を行うためには陸上水槽などの設備が必要であり、ウニの餌となる海藻が減少する冬期間には海藻の代替餌料を確保する必要がある。従って、養殖事業や中間育成事業を効率良く行うためには、量や品質を管理しやすい人工餌料の開発が重要である。人工餌料の開発にはウニの消化吸収能力に関する基礎的知見の集積が必須であるが、これまで殆ど行われてきていなかった。本研究では、エゾバフンウニウニ消化酵素を精製し生化学的特性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

①. ウニ消化酵素の精製と構造決定および特異抗体の作製

水産加工場からエゾバフンウニ加工後の廃棄内臓を採集し、そこから消化酵素である、タンパク質分解酵素および多糖分解酵素を抽出、消化酵素を精製する。精製した酵素について、至適温度、至適 pH および熱安定性などの生化学的特性を明らかにする。また、精製したタンパク質の内部アミノ酸配列を同定し、ウニ消化管から消化酵素 cDNA のクローニングを行い一次構造を明らかにする。また、精製タンパク質を用いてウサギに免疫し特異抗体を作製する。作製した抗体についてウニ消化器官抽出物に免疫陽性反応があるか否かを免疫生化学的解析により明らかにする。

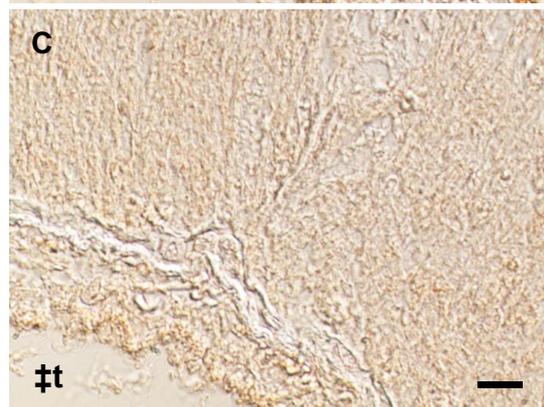
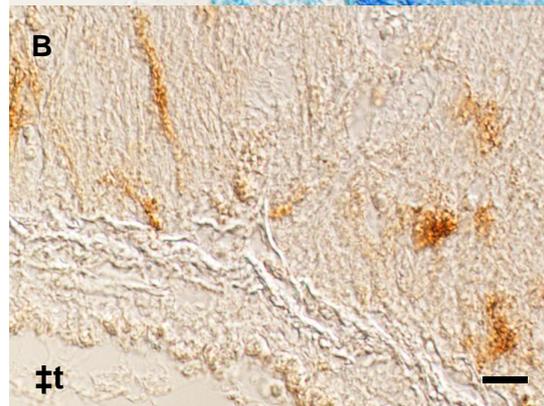
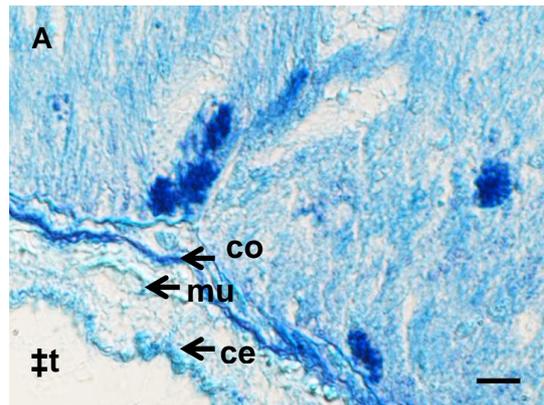
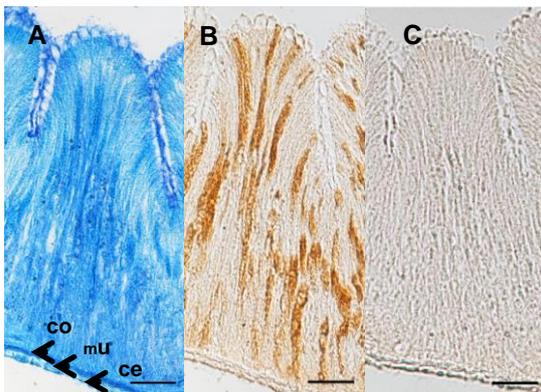
②. ウニ消化管における消化酵素の局在解析

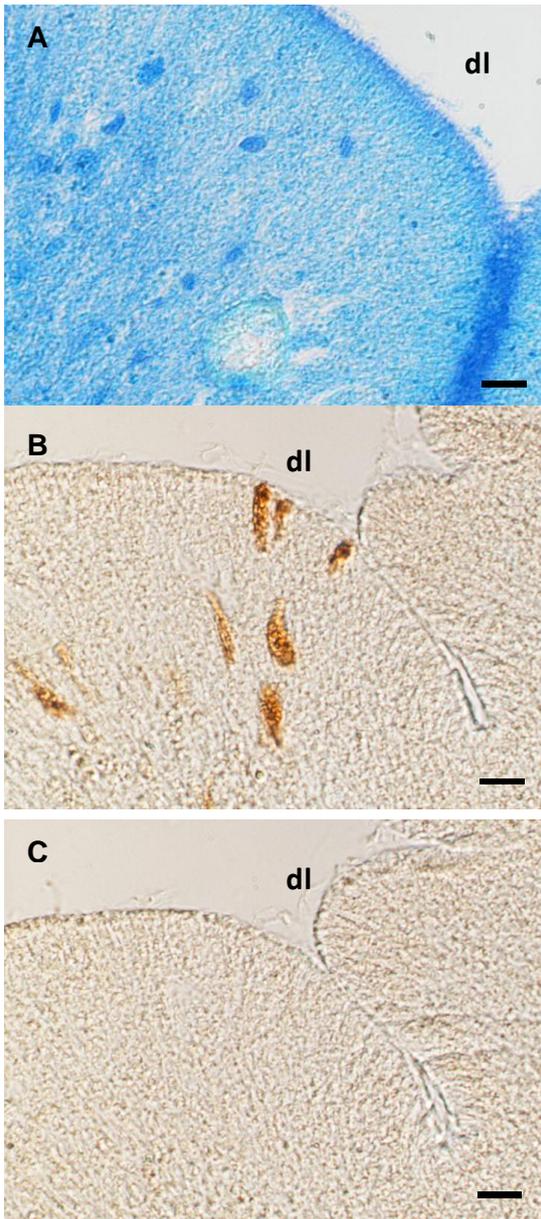
エゾバフンウニを材料とし、定法に従い切片を作製し、1 で作製したタンパク質分解酵素と多糖分解酵素に対する特異抗体を用いて免疫組織学的解析方法により、2 種類の消化酵素の局在を明らかにする。

4. 研究成果

キタムラサキウニ消化管由来のタンパク質分解酵素の一つであるスブチラーゼ cDNA のクローニングを行った。本年度では、エゾバフンウニを用いて消化管由来のスブチラーゼの精製を試みた。エゾバフンウニ消化管を破碎し、ゲル濾過法、陰イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法を用いてスブチラーゼを精製した。精製したタンパク質の N 末端アミノ酸配列を解析した結果、キタムラサキウニスブチラーゼのアミノ酸配列と 90% と高い相同性を

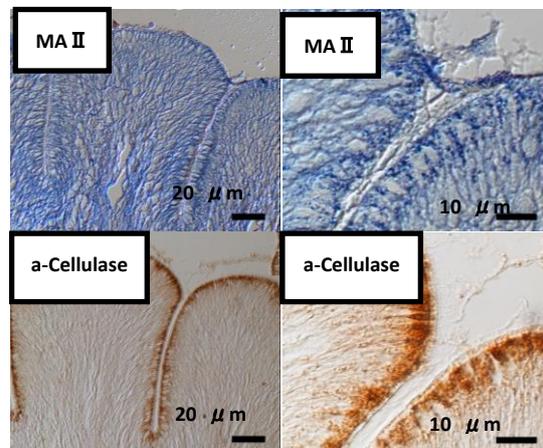
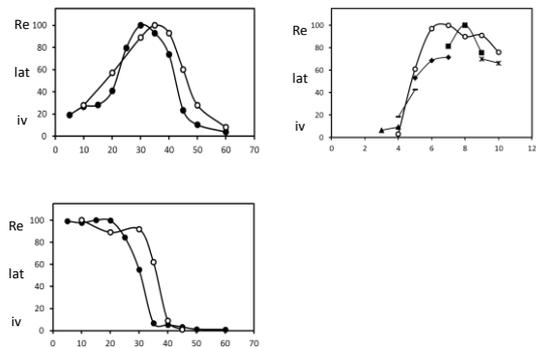
示した。このことから、精製されたタンパク質はエゾバフンウニスブチラーゼであることが確認された。スブチラーゼのcDNAクローニングの結果、スブチラーゼはセリンプロテアーゼの1種類であることが明らかとなった。また、スブチラーゼは主に細菌が持つタンパク質分解酵素であり、ウニ自身がスブチラーゼを合成しているのかを明らかにするため、ウニからゲノムDNAを抽出し、ゲノムDNAにスブチラーゼがコードされているかDNAクローニングを行った。その結果、ウニゲノムDNAにスブチラーゼが存在していることが明らかとなり、ウニの主要なタンパク質分解酵素であるスブチラーゼはウニ自身が合成・分泌していることが初めて証明された。さらに、エゾバフンウニを用いて、消化管における組織観察を行った。その結果、咽頭と食道ではこれまで1種類の顆粒細胞の存在が報告されていたが、本研究により少なくとも2種類の顆粒細胞が存在していることが明らかとなった。また、胃に特異的な顆粒細胞が存在することが明らかになった。スブチラーゼに対する特異抗体を作製し免疫組織化学的解析を行った結果、主に胃に存在する柱状の顆粒細胞に陽性反応が認められ、スブチラーゼは胃で合成・分泌されていることが明らかとなった。

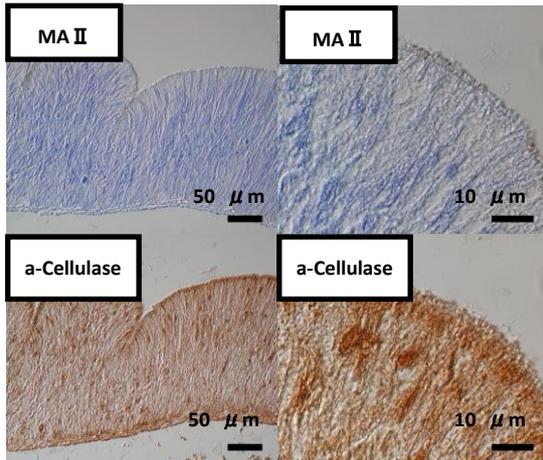




一方、多糖分解酵素であるセルラーゼを精製し生化学的解析を行った。セルラーゼの至的溫度は約 30 ° C で、至的 pH は 8.0 であった。また、酵素の熱安定性を調べた結果、約 32 ° C で 50% の活性に至ることが明らかとなった。さらに、エゾバフンウニの生息溫度 5-20 ° C では、活性は高い値を維持したが 20 ° C を超えると活性が急激に低下することが明らかとなった。これらのことから、エゾバフンウニは 20 ° C 以下の水温で飼育するのが適していることが示唆された。また、ウニセルラーゼの一次構造を明らかにするためにウニ消化管からセルラーゼ cDNA のクローニングを行った。その結果、アワビセルラーゼアミノ酸配列と約 80% の相同性を持つウニセルラーゼ cDNA のクローニングが終了

した。さらに、スブチラーゼと同様にウニセルラーゼがウニゲノム DNA の存在するか否かを明らかにするためウニゲノム DNA を抽出し、ゲノム DNA からセルラーゼ遺伝子のクローニングを行った。その結果、ウニゲノム DNA にセルラーゼが存在することが明らかとなった。また、セルラーゼに対する特異抗体を作製した。この抗体を用いてウニ消化管抽出液を用いて、免疫生化学的解析を行った結果、ウニ消化管には 3 種類のセルラーゼが存在することを示唆する結果を得た。さらに、このセルラーゼに対する特異抗体を用いてエゾバフンウニ消化管における局在解析を行ったところ、咽頭から直腸まで内腔側に局在する顆粒細胞に免疫陽性反応が認められた。





尾島 孝男 (OJIMA TAKAO)
 北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
 研究者番号：30160865

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 2 件)

1. K. Ura, S. Hasegawa, E. Tanaka, T. Gotoh, T. Ojima, Y. Takagi. Immunohistochemical Analysis of the Proteolytic Enzyme Subtilase in the Digestive Organs of the Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *The Anatomical Record* 259(1). 2012. p73-77 査読有

2. S. Hasegawa, K. Ura, H. Tanaka, T. Ojima and Y. Takagi. Purification and biochemical characterization of a cellulase from the digestive organs of the short-spined sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Fish. Sci.* 78(5). 2012 p1107-1115 査読有

[学会発表] (計 1 件)

長谷川嵩人・後藤孝弘・田中恵梨・尾島孝男・都木靖彰・浦和寛 エゾバフンウニ消化管におけるスブチラーゼの局在解析。平成 22 年度日本水産学会秋季大会 (京都大学) 2010 年 9 月 22-25 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦 和寛 (URA KAZUHIRO)

北海道大学・大学院水産科学研究院・助教
 研究者番号：90360940

(2) 連携研究者

都木 靖彰 (TAKAGI YASUAKI)

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
 研究者番号：10212002