

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658182

研究課題名(和文)トランスクリプトーム解析による二枚貝の浸透圧調節分子機構の解明

研究課題名(英文)Research on the bivalve osmoregulatory system by transcriptome analysis

研究代表者

渡部 終五(Watabe, Shugo)

北里大学・海洋生命科学部・教授

研究者番号：40111489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：茨城県におけるヤマトシジミの主要漁場である涸沼川下流域は潮汐の影響を強く受けるのに対し、涸沼では影響が少ない。汽水性無脊椎動物の環境塩分変化に対する遺伝子発現制御や代謝調節の機構解明のため、メタボロームおよびトランスクリプトーム解析を行った。満潮時および干潮時の涸沼川および涸沼からヤマトシジミ雌雄を採取し、解析した結果、 $\alpha$ -アラニンやオルニチンなどの代謝産物量や代謝関連酵素をコードする遺伝子のmRNA蓄積量は塩分変化により変動することが明らかとなった。以上の結果から、ヤマトシジミは環境塩分の変化に対応して種々の代謝物質が変化し、その変化が遺伝子で制御されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The major fishing ground of the brackish water clam in Ibaraki Prefecture is located in the Hinuma Lake and Hinuma River. Water salinity in the Hinuma Lake is low and stable, whereas that in the downstream of the River varies daily. We collected the male and female clam from these areas and subjected to metabolome and transcriptome analyses. As a result, the concentrations of metabolites such as  $\beta$ -alanine and ornithine were found to be changed in association with salinity. In addition, the levels of mRNAs encoding metabolic enzymes were also changed depending on salinity alteration. It is suggested that the brackish water clam changes a variety of metabolites in response to the alteration of environmental salinity, which is controlled by metabolite-related genes.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：ヤマトシジミ メタボローム解析 トランスクリプトーム解析 塩分 涸沼 涸沼川 潮汐 cDNAライブラリー

## 1. 研究開始当初の背景

二枚貝やエビ類などの水産無脊椎動物は開放血管系を有しているため、塩分変化に伴い、遊離アミノ酸などの低分子有機物質の濃度を変動させて、細胞内の浸透圧調節を行っている。しかしながら浸透圧調節の分子機構には関しては不明な点が多い。茨城県酒沼川水系のヤマトシジミ *Corbicula japonica* を対象に、生息域に基づく遊離アミノ酸組成の違いを比較したところ、高塩分の酒沼川下流域の試料であっても必ずしも遊離アミノ酸量が多くなかった。この原因として、日周期的および季節的な潮汐の変化が、ヤマトシジミの浸透圧調節機構に複雑な影響を及ぼしていると考えられた。したがって、本研究では、環境中の塩分変化とヤマトシジミの代謝との関連性について調べることにした。

## 2. 研究の目的

茨城県におけるヤマトシジミの主要漁場は酒沼川と酒沼からなる酒沼川水系にある。酒沼川下流域は海岸域からの距離が近いいため、潮汐の影響を強く受けるのに対し、酒沼ではその距離が約 7.5 km と遠く影響が少ない。しかしながら、ヤマトシジミも含めて汽水性無脊椎動物の環境塩分の変化に対する遺伝子発現や代謝の調節機構は不明な点が多い。そこで、本研究ではまず、満潮および干潮時の酒沼川および酒沼から採取したヤマトシジミの鰓および足筋を用いてメタボローム解析を行った。次に、上述の条件で採取した酒沼川産個体の鰓を対象にトランスクリプトーム解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) ヤマトシジミのメタボローム解析

#### 試料

2012年6月7日にヤマトシジミの採取を行った。採取地の酒沼川における塩分および水温は、満潮時で 20.5 ‰および 18.0 °C、干潮時で 4.0 ‰、21.7 °C であった。一方、酒沼では潮汐の影響がなく、それぞれ 2.8 ‰、22.4 °C と一定であった。満潮時および干潮時の酒沼川および酒沼からヤマトシジミ雌雄それぞれ5個体を採取し、各個体から鰓および足筋を摘出した。摘出した各組織は液体窒素による瞬間凍結を行い、分析に供するまで -80 °C で保存した。

#### メタボローム解析

雌雄各5個体のヤマトシジミ鰓および足筋をそれぞれ約 0.15 g ずつ採取し、雌雄、採取場所および満潮、干潮ごとに一つにまとめた。次に、これらの試料ごとに50倍量の100%メタノールでホモジナイズした後、2,300 g、4 下で5分間の遠心を行い、代謝産物を抽

出した。上清を分取し、9,100 g、4 で120分の限外濾過に供し、濾過物を乾燥させた。さらに、乾燥物を50 μLの蒸留水で再溶解させ、分析用試料とした。各試料をキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析(CE-TOFMS)に供し、代謝産物の解析を行った。なお、分析には Agilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) を用いた。

### (2) トランスクリプトーム解析

#### 試料

酒沼川の満潮時および干潮時に採取した雌各5個体の鰓を摘出し、全RNA抽出まで RNA later (Ambion) 中、-20 °C で凍結保存した。

#### cDNA ライブラリー作製

ヤマトシジミ雌の鰓から ISOGEN II (ニッポンジーン) を用いて全RNAを抽出し、満潮区および干潮区ごとに一つにまとめた。それぞれの全RNAに対し、DNase I 処理を行い、溶液中に混入した gDNA の分解を行った。次に Poly(A)<sup>+</sup> Isolation Kit from Total RNA (ニッポンジーン) により mRNA 精製を行った。次に、Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Life Technologies) を用いて、精製した mRNA から cDNA ライブラリーの作製を行った。cDNA ライブラリーのサイズおよび濃度はバイオアナライザを用いて測定した。

#### トランスクリプトーム解析

作製した cDNA ライブラリーにつき、Ion PGM Template OT2 200 Kit (Life Technologies) および Ion PGM Sequencing 200 Kit (Life Technologies) を用いてテンプレートの調製を行った。次に、テンプレートを Ion 318 Chip (Life Technologies) にロードし、Ion Torrent PGM 次世代シーケンサ (Life Technologies) を用いてトランスクリプトーム解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) メタボローム解析

メタボローム解析により、遊離アミノ酸、ペプチドおよび有機酸などを含む200種類以上の代謝産物が確認された。主成分分析の結果、1日を通して塩分および水温の変化が大きい酒沼川下流では、満潮および干潮時の試料において代謝産物の蓄積量に差がみられた(図1)。また、1日を通して塩分および水温変化が小さい酒沼において採取された試料の代謝産物蓄積量は、酒沼川干潮時採取試料の蓄積量に近かった。さらに、足筋および鰓においても蓄積量に差異が認められた。

次に、特定の代謝産物に着目し、その代謝経路における関連代謝産物の蓄積量を調べ

た。まず、 $\beta$ -アラニンの代謝経路を調べた結果、鰓および足筋ともに涸沼川採取試料の方が、涸沼採取試料より  $\beta$ -アラニン蓄積量が多かった(図2)。沼川採取試料と比較すると、満潮時の方が干潮時よりその蓄積量は多かった。しかし、その前駆物質であるアスパラギン酸量には大きな違いは認められなかった。さらに、ヤマトシジミでは報告例の少ないカルノシンも検出された。

オルニチンの蓄積量は、涸沼川満潮時に採取した試料の方が、干潮時および涸沼採取試料と比べて多かった。また、オルニチンから合成されるシトルリンの蓄積量においても同様の傾向がみられたが、オルニチンの前駆物質であるアルギニンは干潮時に蓄積量が増加する傾向にあった。

コリンの蓄積量は、涸沼川満潮時に増加し、干潮時に減少する傾向にあった。これに対して、コリンから生成するアセチルコリンおよびホスホリルコリンはともに干潮時に蓄積量が増加し、満潮時に減少した。

機能性成分として知られる GABA の蓄積量は満潮で多く、干潮と比較して4倍以上であった。さらに、鰓より足筋の方が多く蓄積する傾向にあった。それに対して前駆物質の蓄積量は涸沼川においては塩分に関わらずほぼ一定であった。

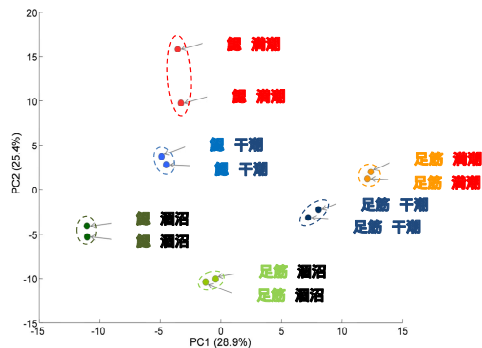


図1. ヤマトシジミの主成分分析結果。涸沼川満潮、干潮時および涸沼にて採取した雌雄の個体から鰓および足筋を採取し、解析を行った。採取場所および組織により違いが認められたが、雌雄間では大きな差はみられなかった。

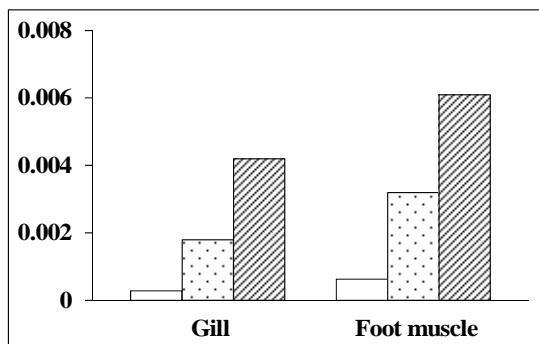


図2.  $\beta$ -アラニンの蓄積量。

左側が鰓、右側が足筋での蓄積量を相対値で表している。バーは左から涸沼、涸沼川干潮および涸沼川満潮での蓄積量を示している。塩分が増加するにしたがって、 $\beta$ -アラニンの蓄積量が増加している。

## (2) トランスクリプトーム解析

次世代シーケンサによる解析結果を表1に示した。300 bp 以上のコンティグに対し blastx 検索を行った結果、満潮、干潮時採取試料ともに 28% のコンティグが既知の遺伝子と高い同一率を示した。さらに各遺伝子の発現量を調べたところ、 $\beta$ -アラニンの代謝経路においては、アスパラギン酸から  $\beta$ -アラニンへの代謝を触媒するグルタミン酸脱炭酸酵素および  $\beta$ -アミノプロピオンアルデヒドから  $\beta$ -アラニンへの代謝を触媒するアルデヒド脱水素酵素の mRNA 蓄積量が明らかとなった。グルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子は干潮時に多く発現していたのに対し、アルデヒド脱水素酵素遺伝子は満潮時に多く発現していた。

オルニチンの代謝経路をみると、オルニチン生成酵素アルギナーゼをコードする遺伝子の mRNA 蓄積量は、満潮時の方が 4.4 倍多いことが明らかとなった。また、オルニチンからプロレシンの代謝に関連するオルニチン脱炭酸酵素の mRNA も満潮時の方が蓄積量が多かった。

コリンの代謝経路では、アセチルコリンからコリンへの代謝を触媒するアセチルコリンエステラーゼの mRNA が干潮時のみ発現することが明らかとなった。

表1. 干潮および満潮時採取ヤマトシジミ(雌、鰓)のシーケンス結果

項目	数量	
	干潮	満潮
リード数	2,791,923	5,605,314
平均リード長 (bp)	116.5	120.33
コンティグ数	60,541	109,910
平均コンティグ長 (bp)	218	211
最大	3,291	5,143
最小	17	17

CE-TOFMS を用いて代謝産物の蓄積量を測定し、主成分分析を行った結果、採取地点により代謝産物の蓄積量に違いがみられることから、環境中の塩分変動に対応し、代謝産物量が変化すると考えられた。

また、 $\beta$ -アラニンは高塩分で増加することから、浸透圧調節に関連していることが示唆された。オルニチンは高塩分で増加するのに対し、その前駆物質であるアルギニンは減少していることから、塩分が高くなるとアルギニンはオルニチンに変換されると考えられた。次に、コリンの代謝経路に着目すると、高塩分でコリンは増加するが、低塩分ではア

セチルコリンおよびホスホリルコリンが増加していることから、塩分が低下するとコリンからアセチルコリンおよびホスホリルコリンが生成され、塩分が高くなると逆反応が働き、コリンが生成されて蓄積されるものと考えられた。

GABA も高塩分で多く蓄積していたが、その前駆物質であるプトレシンは塩分に関わらず蓄積量はほぼ同じであったので、塩分が高くなるとプトレシンから GABA への代謝が活発に進むことが考えられた。

さらに、 $\gamma$ -アラニン、オルニチンおよびコリン代謝関連酵素の mRNA 蓄積量を調べた結果、塩分によりその蓄積量が変化することが明らかとなった。とくにオルニチンの代謝経路ではオルニチンの蓄積量とアルギナーゼの発現量とに相関関係がみられた。したがって、ヤマトシジミは環境塩分の変化に対応して種々の代謝物質を変化させ、その変化が遺伝子で制御されている可能性が示唆された。しかし、遺伝子の発現量のみでは塩分による代謝産物の増減は説明できない部分も多いことから、今後より詳細な解析が必要であると考えられる。

## 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)

[学会発表](計 2 件)

小山寛喜、大須賀允彦、神保充、岡本成司、渡邊直樹、星野尚重、陳盈光、浅川修一、安元剛、渡部終五「ヤマトシジミの塩分依存的な遺伝子発現および代謝産物蓄積の解析」日本水産学会秋季大会、502、三重県津市、2013年9月

小山寛喜、岡本成司、陳盈光、浅川修一、安元剛、神保充、渡部終五「塩分を異にするヤマトシジミの遺伝子発現および代謝関連物質の解析」日本水産学会春季大会、713、東京都港区、2013年3月

[その他]

渡部終五 (2013). 「おいしいシジミを育てる - 浸透圧調節機構の利用」北里大学海洋生命科学部だより 39, 11-12.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

渡部 終五 (WATABE, Shugo)  
北里大学・海洋生命科学部・教授  
研究者番号：40111489