

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450297

研究課題名(和文) ナマコ類の成熟を調節する内分泌カスケードの解明：グローバル資源の回復に向けて

研究課題名(英文) Endocrine control of sea cucumber maturation

研究代表者

山野 恵祐 (Yamano, Keisuke)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・瀬戸内海区水産研究所・センター長

研究者番号：10372020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：多種のナマコ類が絶滅の危惧に瀕している。本研究では、ナマコ類の採卵技術の効率化に役立てることを目的として、種々の熱帯性ナマコ類の成熟過程とそれを調節する内分泌カスケードを調べた。

鹿児島県奄美地方において、4種類のナマコ類の繁殖生態調査を実施し、これらの生殖生態を調査した。その結果、いずれも5月から8月に産卵期があったが、正確な産卵期やその期間には種による違いが見られた。またマナモコの産卵誘発ホルモン(クビフリン)や調査対象としたナマコ類の卵巢抽出物の卵成熟誘起作用を調べた。その結果、クビフリンが作用したのは1種のみであったが、種々のナマコ類の卵巢抽出物は広い種の範囲に作用した。

研究成果の概要(英文)：Various sea cucumbers have been listed as a dangerous species. In this study, the reproductive ecology and endocrine controls of maturation of tropical sea cucumber species are examined to obtain basic information for establishing artificial seed production methods for those species.

In Amami area, Kagoshima, the reproductive ecology of 4 sea cucumber species was examined. A spawning season of these species was from May to August, while the exact timing and duration differed among species. Effects of cubifrin, a spawning inducer in the Japanese sea cucumber, and ovarian extracts from these species for inducing oocyte maturation were examined. Cubifrin induced oocyte maturation only in a certain species, whereas ovarian extracts from these species induced it in various species.

研究分野：比較内分泌

キーワード：ナマコ 卵成熟 産卵 種苗生産

1. 研究開始当初の背景

マナマコも含めてナマコ類 16 種 (在来 6 種) が 2013 年に絶滅危惧種として国際自然保護連合レッドリストに登録された。この原因は「干しなまこ」輸出のための乱獲にあり、ワシントン条約会議 (COP16、2013) でも関係各国にナマコ類資源保全の取り組みを推進する旨の勧告が出された。

研究実施者らはマナマコから産卵誘発ホルモン (クビフリン) を発見した。クビフリンの発見以前、マナマコから採卵するときには水温による刺激で産卵を誘発していたが、その確実性は低く不安定な技術であった。一方、クビフリンを用いた確立した産卵誘発方法では、事前に産卵可能個体の選別も可能となり、採卵の確実性は大きく向上し、マナマコ種苗生産の効率化に大きく貢献した。しかしマナマコ以外のナマコ類におけるクビフリンの作用は十分に分かっておらず、種々のナマコ類の採卵技術に適用可能かどうかほとんど検討されていない。

この研究課題では、マナマコでの研究成果を発展させ、種々のナマコ類の成熟過程とそれを調節する内分泌カスケードを解明する。この研究による成果は、種々のナマコ類の採卵技術の効率化に直結し、グローバルなナマコ類資源の回復に貢献しうる。

2. 研究の目的

(1) クビフリン遺伝子の保持と遺伝子発現

数種の *Holothuria* 属を対象にクビフリンの作用検定した結果では卵成熟を誘起しないことが判明している。そこでさらに広範なナマコ類を分子生物学的に解析し、クビフリン遺伝子の存在の有無や種間でのアミノ酸配列の類似性を解明する。また遺伝子の発現状態の解析から遺伝子産物が成熟に関与する機能を持つか否かを推定する。小項目(2)の生理機能の解析と合わせて、クビフリンが成熟を調節している分類学的範囲を明らかにする。

(2) クビフリン及び卵巣因子の卵成熟誘起作用の及ぶ種とその作用機序

世界的にも産業種 (約 60 種) のほぼ全ては楯手目シカクナマコ科およびクロナマコ科に属する。また全ての絶滅危惧種 16 種も両科のいずれかに属する。将来の種苗生産技術の開発を視野に入れ、両科に属するナマコ類を対象として、成熟を調節する内分泌因子の作用の共通性と種特異性を明らかにする。そのために、これらナマコ類の卵巣を使った卵成熟誘起実験で、クビフリンおよび卵巣因子が卵成熟を誘起する種の範囲と卵成熟過程におけるカスケードの存在を明らかにする。

(3) 性成熟過程の解明

成熟機構の解明や採卵技術の開発には、対象種の基本的な繁殖様式の理解が欠かせな

い。しかし、過去にナマコ類で繁殖生理・生態研究が行われたのはマナマコなど極めて少数の種に限られている。そこで種々のシカクナマコ科、クロナマコ科ナマコについて、繁殖期、生殖腺の発達過程や組織学的な特徴などを調べ、両科の性成熟過程の特徴を類型化する。

3. 研究の方法

(1) クビフリン遺伝子の保持と発現

(サンプル収集)

世界的に産業利用されているナマコ類の多くは亜熱帯、熱帯性で、本邦在来の絶滅危惧種もマナマコ以外は奄美大島以南に生息する。そこで本州に加えて鹿児島県、沖縄県から採集、分与依頼等により種々のナマコ類を収集した。

(PCR 法によるクビフリン遺伝子の解析)

予備的な研究から、楯手目ナマコのクビフリン遺伝子については、PCR 法を用いて塩基配列の類似性の高い領域を増幅することが可能と考えられた。そこでマナマコのクビフリン遺伝子配列から複数の PCR プライマーを設計・作成、増幅できた部分的な遺伝子の塩基配列を決定した。次いで RACE 法を用いて遺伝子全域の塩基配列を決定した。この遺伝子配列から推定される演繹アミノ酸配列の種間での相同性について解析した。

(2) 卵成熟誘起因子の種交差性と作用機序

(実験に用いたナマコ類)

小項目(3)において繁殖生態を調査したナマコ類について、繁殖期の十分に熟した雌個体を用いて実施した。

(作用検定法)

研究実施者らはこれまでに、生体外に卵巣を取り出して調製したマナマコ卵巣小片に対して、シャーレやウェル内で試験物質 (液) を作用させ、試験物質 (液) の卵成熟誘起作用の有無を検定する方法を確立している。このアッセイ法を用いて、同種、他種の卵巣小片に対する、クビフリンや種々のクロナマコ科、シカクナマコ科ナマコから調製した卵巣因子の卵成熟誘起作用を調べた。

クビフリンはマナマコで明らかとなっているアミノ酸配列 NGIYW とし、C 末端はアミド化したものを化学合成したものを使用した。卵巣因子としては、成熟卵巣をハサミで細かく切った後に 0.5 倍量の濾過海水と混和、30 分間静置し、その後遠心分離して得た上澄み液を試験液として用いた。

(3) 性成熟過程の特性

(サンプル収集)

楯手目クロナマコ科、シカクナマコ科、繁殖期・非繁殖期、雌雄を含むサンプルを収集することを目的として、まずサンプリング適地とサンプリング可能な種の調査をした。その結果、鹿児島県加計呂麻島において、クロナマコ科クリイロナマコおよびフタスジナ

マコ、シカクナマコ科ヨコスジオオナマコ、シカクナマコが比較的容易に十分数のサンプル採取が可能なが判明したため、これらを調査対象とした。

(成熟状態の解析)

繁殖をカバーするように調査時期を設定し、1～2ヶ月おきに調査を実施した。生殖腺体指数(体重に対する生殖腺重量の比)、生殖腺の外観などの一般的な調査等から、種毎に繁殖時期、成熟サイズ、生殖腺発達の特徴等の概要を把握した。

4. 研究成果

(1) クビフリン遺伝子の保持と遺伝子発現

2種のシカクナマコ科(マナマコ、オキナマコ)および5種のクロナマコ科(ハネジナマコ、イソナマコ、フジナマコ、クロナマコ、ニセクロナマコ)のクビフリン遺伝子の塩基配列を決定し演繹アミノ酸配列を推定した結果、いずれの種もマナマコクビフリン遺伝子と相同性な遺伝子を保有していることが判明した。いずれの種の遺伝子においても、前駆体タンパク質1分子から5分子のクビフリンが切り出される構造となっていることが推定され、クビフリンのアミノ酸配列もハネジナマコの1分子において1アミノ酸置換が見られた以外は全く同じ配列となっていた。このように少なくとも楯手目においては、クビフリン遺伝子は極めて高度に相同性を保持していることが判明した。

(2) 卵成熟誘起因子の種交差性と作用機序

クビフリンの卵成熟誘起作用をシカクナマコ科ヨコスジオオナマコ、クロナマコ科クリイロナマコ、フタスジナマコの卵巣小片を用いて検定した結果、ヨコスジオオナマコの卵成熟は誘起したが、その他のナマコ類の卵成熟は誘起しなかった。また過去に実施した別の数種のクロナマコ科ナマコ類の試験でもクビフリンには卵成熟誘起作用は認められていない。これらの結果と小項目(1)の結果を合わせると、ナマコ類では広く全く同じあるいは極めて類似したアミノ酸配列のクビフリンを有しているにもかかわらず、作用する範囲は狭く、おそらく同属や類縁種にしか作用しないものと推定された。

一方、これらの種の成熟度の高い卵巣から調製した粗抽出液の卵成熟誘起作用を同様のアッセイ法を用いて検定した結果、フタスジナマコ、クリイロナマコの卵巣抽出液は、実験したいずれの種の卵成熟も誘起した。また、ヨコスジオオナマコの卵巣抽出液はフタスジナマコ以外の卵成熟を誘起した。これらの結果から、広範な種に対する採卵手法を開発するには、クビフリンよりも卵巣内に存在する卵成熟誘起物質の方が汎用性、利便性が優れる可能性が高いと考えられた。

(3) 性成熟過程の特性

シカクナマコ、ヨコスジオオナマコ、クリ

イロナマコ、フタスジナマコの成熟生態調査を鹿児島県加計呂麻島で、初年度は春から秋にかけて2ヶ月おきに、2年度目は5月から8月まで1ヶ月おきに、最終年度は5月と7月に実施した。その結果、それぞれの種の産卵期はヨコスジオオナマコ、シカクナマコでは6～7月、クリイロナマコでは5月、フタスジナマコでは5～8月と推定された。いずれの種においても水温上昇に伴い、生殖腺の発達が進行し産卵が起こったことから、水温の上昇が成熟進行に重要な促進因子となっていることが推測された。しかし、種により産卵期や産卵期間の長さに違いが見られ、種毎の特性があることも判明した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Yamano, K. Fujiwara, A. Yoshikuni, M. Induced spawning in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* by neuropeptide, cubifrin (2015) Bulletin of Fisheries Research Agency, 40, 2015 (査読なし)
山野恵祐、マナマコの種苗生産を取り巻く状況 (2015) 海洋と生物、37(1) (査読なし)

[学会発表](計1件)

加藤慎一、大野薫、藤原篤志、山野恵祐、吉国通庸、ナマコ類に共通する新しい産卵ホルモン、第41回日本比較内分泌学会、2016年12月9-11日

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山野 恵祐 (Yamano, Keisuke)
(国研)水産研究・教育機構・瀬戸内海区水産研究所・海産無脊椎動物研究センター・センター長
研究者番号：10372020

(2)研究分担者
藤原 篤志 (Fujiwara, Atushi)
(国研)水産研究・教育機構・中央水産研究所・水産生命情報研究センター・主幹研究員
研究者番号：30443352