

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06227

研究課題名(和文) 二枚貝における産卵誘発フェロモンの同定と高度に同調的な一斉産卵機構の基盤解明

研究課題名(英文) Identification of spawning-inducing pheromones in bivalves and elucidation of the basis for highly synchronous simultaneous spawning mechanisms

研究代表者

栗田 喜久 (Kurita, Yoshihisa)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：40725058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：二枚貝の産卵は、一斉産卵と呼ばれる高度な同調性を示すことが知られる。一方で、このような同調的産卵がどのようなメカニズムで実現されるのかは不明であった。そこで申請者等は二枚貝の産卵時に、配偶子とともに放出される分子の中に多個体の産卵行動を誘発する産卵誘発フェロモンが存在すると仮定し、ムラサキガイの放精液から、フェロモンの単離・精製を試みた。その結果、オープンカラムによる大容量の逆走クロマトグラフィーにより、産卵誘発活性をほぼ損なうことなく高濃度の活性物質を分離・濃縮することができた。現在、フェロモンの分子実体を同定すべく、さらなる単離・精製と質量分析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

二枚貝は多くの水産有用種を含む分類群であるが、その漁獲量は年々減少傾向にあり、新たな資源管理手法の構築は急務となっている。例えば二枚貝の種苗を作出し、放流や養殖を行うことは資源管理の一助となりうるが、一部の二枚貝を除き、ホルモンなどを用いた効果的な採卵手法は未だ開発されていない。本研究により一斉産卵を誘発するフェロモン様の活性物質の存在が示されたことにより、今後二枚貝の容易かつ確実な採卵方法の確立が進むことは間違いない。

研究成果の概要(英文)：Bivalve spawning is known to present a highly synchronous spawning, referred to as simultaneous spawning. On the other hand, the mechanism by which such synchronous spawning is achieved has remained unclear. Therefore, we hypothesized that the spawning-inducing pheromone that induces the spawning behavior of multiple individuals exists in the molecules released with gametes when bivalves spawn, and attempted to isolate and purify the pheromone from the semen of mussels. As a result, we were able to separate and concentrate the active substance with almost no loss of spawning inducing activity by large-volume reverse run chromatography using an open column. Further isolation and purification and mass spectrometry are currently underway to identify the molecular substance of the pheromone.

研究分野：水産増養殖学

キーワード：二枚貝 一斉産卵 フェロモン

1. 研究開始当初の背景

海岸の岩礁域に生息するカキやイガイなどの二枚貝はセメントや足糸といった構造物を分泌し、体を岩などの基質に固定した後はほとんど移動しない。こうした固着性貝類の多くは数千から数万の個体が重なり合ったコロニーを形成し、産卵期においてコロニーのすべての個体が一斉に放卵・放精することが知られている。脊椎動物や節足動物など自由生活型の海洋動物は求愛行動を行うことで放卵・放精のタイミングを合わせることができる。では動かない固着性二枚貝はどのように産卵の同調性を生み出しているのか？

固着性貝類が一斉産卵を引き起こす仕組みについては環境刺激に着目した研究が古くからなされてきた。その結果、多くの貝類が一定温度以上の海水に接した時間や潮汐周期に伴う干出・水没時間の変化、さらに満潮時が昼か夜かという明暗刺激などを組み合わせて感知することで、産卵のタイミングを例えば大潮の日の朝という具合に数日の範囲で同期させると考えられている(York et al. 2012, Front. Zool.)。一方でこのような環境刺激にたよる仕組みだけでは、野外で実際にみられる 1 時間のうちにコロニーの全個体が産卵を開始するような分単位での同調性を実現することは困難であり、一斉産卵における高度な同調性をもたらすメカニズムは海洋動物の繁殖における重要な学問的問いである。

2. 研究の目的

本研究は二枚貝が産卵時に放出する産卵誘起フェロモンを抽出・単離精製することで、高度に同調的な一斉産卵の内分泌学的基盤を解明することを目標とする。本研究の独自性は、一斉産卵を可能とする産卵の同調メカニズムを、従来行われてきた環境刺激の解析ではなく、「産卵誘起フェロモン」という内分泌物質の解析からアプローチする点である。予備実験より、申請者はすでに二枚貝の放卵・放精液中に他個体の産卵を誘発する活性を有する物質が含まれることを発見した。しかもイガイ類やカキ類などの固着性二枚貝だけでなく、アカガイやアサリなどの埋在性二枚貝においても放卵放精液に同様の産卵誘発活性が確認されており、二枚貝に共通する産卵同調機構である可能性が高い。このフェロモンの分子の実体が特定された場合、海産無脊椎動物で初めての事例となり、生物界でもっとも劇的な現象の一つである海洋生物の一斉産卵の原理解明に大きく寄与することが出来る。また本研究により二枚貝の産卵誘発フェロモンが決定されれば、正常な成熟個体であれば簡単かつ高確率で放卵・放精を誘導できるようになり、安定的な種苗生産につながる。さらにこのフェロモン物質が他の軟体動物でも共通する機能を有していた場合、種苗生産や養殖が困難であった種類の人工繁殖への大きな助けとなる。本研究の成果がもたらす技術革新は、人類への軟体動物資源の安定的供給を実現し、絶滅危惧種の系統保存を可能とし、希少種の未知なる産卵生態や発生分野における未来を切り拓く創造的成果となるだろう。

3. 研究の方法

ムラサキイガイを実験材料とする。選定理由は、予備実験において放卵・放精液にて他個体の放卵・放精行動が誘起されることを確認済みで、水産有用種であり、大量の個体を簡単に採集または購入であるためである。

産卵誘発活性の検査は、HPLC で分離された画分などのサンプルに成熟個体を暴露することで産卵が誘発されるかどうかを基準に検定する。検査に用いる個体が換水や水温の変化など添加サンプル以外の刺激により産卵することがあるため、検査個体を別々の容器いれ 22 の 200ml 海水中で 2 時間静置し、その間に放卵放精しなかった個体のみをバイオアッセイに用いる。この前処理により環境変化の刺激で放卵・放精する個体を除くことで、サンプルの効果だけを観察することができる。その後、海水中にサンプルを添加し、2 時間後の産卵個体数を非処理群と比較することで各サンプルに含まれる産卵誘起活性の有無を判定する。予備実験から、放卵・放精はサンプル添加後 30 分から 90 分の間に誘起されることが示されており、添加後 2 時間以降に誘起された例は確認されていない (n=100)。サンプルの効果の比較検定を統計学的に処理するため、1 サンプルにつき 10 個体以上でアッセイを行う。

具体的な手順は以下の通りである。

1. 各種の産卵期に成熟オスを人工海水 200ml 中で放精させる
2. 得られた放精液を超速心分離し、上清を電気透析式脱塩装置より脱塩する
3. 脱塩したサンプル溶液を凍結乾燥後、5ml 程度の超純水に溶解させることで濃縮する。この濃縮放精液を各種 100 個体分調整する
4. 濃縮放精液を 100 個体分全て併せて全量を限外濾過することで分子量 10KDa 以上の高分子のタンパク質などを除去する
5. ペプチドを含む低分子溶液を逆相カラムによる HPLC によって分離する
6. 上述のバイオアッセイ法により産卵誘発活性が検出された HPLC 画分を用いて、次の段階の HPLC による分離・精製を行う。この作業を 2 度繰り返し、フェロモン物質を単離する

4 . 研究成果

3年間でムラサキイガイ約 1000 個体を用いて、放精液を採取し、他個体の産卵を誘発する物質の単離・生成を繰り返し実施した。当初計画で使用を想定していた電気透析式脱塩装置は実際に機能し、産卵誘発活性(以下フェロモン)を示す物質と濃縮の妨げとなる塩類の分離が実現できた。これによりフェロモンの単離精製と物質同定が達成可能に思われたが、フェロモンの作用濃度が想定以上に高く、また物質量が少なかったため、2段階目の HPLC による精製後に産卵誘発活性を指標としたバイオアッセイが行えなくなるという問題が発生した。やむなく活性を保持する1段階目の HPLC 精製産物を用いて質量分析に供したが、多くのタンパク質が画分内に存在したため、フェロモンの候補分子の特定には至らなかった。

電気透析式脱塩装置を用いた手法以上の高濃度かつ大量でインタクトなフェロモンの単離精製が必要であるということが判明した結果を踏まえ、最終年度は脱塩処理を、イオン交換膜を用いた電気透析ではなく、オープンカラムによる逆相クロマトグラフィーを用いることで、従来より短時間で大容量の放精液の脱塩処理が可能となった。その結果として、電気透析による脱塩処理で得られたサンプルに比べて、明らかに強い活性を示す画分を、より精製度の高い活性物質を含む画分の採取に成功した。期間内での分子同定には至らなかったものの、本画分について、質量分析に供するための調整を現在進めている

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 栗田 喜久、 鬼倉 徳雄	4. 巻 6
2. 論文標題 生殖と発生教材としての市販二枚貝の有用性検討	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 九州大学教職課程研究紀要	6. 最初と最後の頁 1-6
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 無
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0件

〔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	大野 薫 (Ohno Kaoru) (10260035)	基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・助教 (63904)	

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