

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14561

研究課題名(和文)二枚貝における産卵誘起フェロモンの決定と一斉産卵機構の解明

研究課題名(英文) Identification of spawning induced pheromone and clarification of synchronous spawning mechanism in bivalves

研究代表者

栗田 喜久 (Kurita, Yoshihisa)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：40725058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は二枚貝の産卵誘起フェロモンを決定し、一斉産卵という同調行動の内分泌学的基盤の解明を目的とする。複数の二枚貝を用いた解析の結果、産卵誘発フェロモンを介した同調的産卵システムが二枚貝類に広く共通する機構である可能性が示唆された。また、イガイ科の二枚貝を用いて、産卵誘発活性を示す物質の単離・精製を試みた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to determine the spawning induced pheromone of bivalves, and to elucidate the endocrinological basis of synchronous behavior of their spawning. Analysis using multiple bivalve species suggested that a synchronous spawning system via spawning inducing pheromone may be a widely common mechanism for bivalves. We also attempted to isolate and purify substances possessing spawning-inducing activity using Mytilid bivalves.

研究分野：水産増養殖学・胚発生学

キーワード：フェロモン 一斉産卵 精巢 バイオアッセイ HPLC

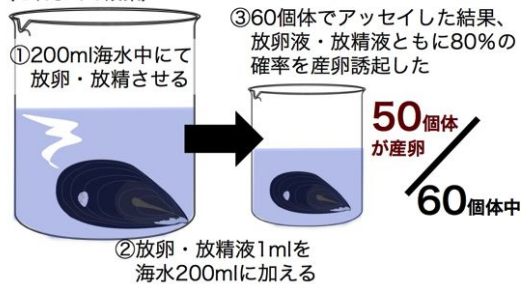
1. 研究開始当初の背景

(1) 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？

(2) 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。一方でこのような環境刺激に依存する仕組みでは、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る。

(3) これまでにムラサキインコガイやアサリで精巢の破碎液を飼育海水に加えることで産卵が誘起される現象を観察しており、生殖巣中の産卵誘起活性物質が産卵時に体外に放出されると考えた。

図1. 二枚貝の放卵放精液には産卵誘起フェロモンが含まれる (これまでの成果)



2. 研究の目的

本研究で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。またフェロモンの機能を他の二枚貝でも解析することで、同調的産卵誘起機構の共通性の検証を試みたい。

3. 研究の方法

(1) 本研究は、精巢破碎液と放卵・放精液が産卵誘起活性を持つことが確認されている3種の二枚貝(図2:アサリ・ムラサキ

ンコガイ・ムラサキイガイ)を用いて、産卵誘起フェロモンを精製し、構造解析を行う。これら3種は数千個体単位の成熟個体を手で採集でき、維持飼育も代表者が所属する東北大学大学院農学研究科女川フィールドセンターの海水供給システムを利用すれば容易である。さらに産卵期が重ならないため、1年を通じていずれかの種で実験が可能である。

産卵誘起活性の判定には、バイオアッセイ系を用いる。フェロモンは摘出精巢から希酢酸によって抽出し、精製にはHPLC、構造解析にはLC-MS/MSを使用する。

(2) 産卵誘起機構の共通性検証

実験には産卵期の各種成熟個体(アカガイ:産卵期7-8月、マガキ:6-8月、ウバガイ:5-7月)を用いた。放卵放精液の採取と調整は、各個体についてまず昇温刺激や生殖巣懸濁液などにより産卵を誘発し、放卵放精液を得た。放卵放精液はフィルター濾過し、-20℃にて凍結することで精子を殺処理した。産卵誘発実験については、昇温刺激がかからないように水温を一定に調整し、個別に水槽内に静置した個体に対して産卵誘発実験を行った。放卵放精液を複数個体に処理し産卵誘発率を算出し、無処理のコントロール区と誘発率を比較した。

4. 研究成果

(1) 産卵誘発物質の単離精製と構造解析
二枚貝類にみられる高度に同調した一斉産卵現象の内分泌的基盤するため、二枚貝類の放卵・放精液が他個体の産卵誘発する機能に着目し、二枚貝の産卵誘発フェロモンの探索を行った。3種の二枚貝について産卵誘発フェロモンの単離・精製を実施した。産卵期のムラサキイガイとムラサキインコガイの成熟オス個体(ムラサキイガイ:150個体、ムラサキインコガイ、300個体)より精巢を摘出し、これを破碎後、超遠心分離と限外濾過により10kDa以下の低分子物質のみを粗精製した。この粗精製液を逆相カラムによるHPLCにて精製し得られた画分を産卵誘発実験に供した。その結果、4段階目の精製画分からは産卵誘発率の顕著に低下したため、それ以上の精製は行うことができず、物質の構造解析を行うには至らなかった。またアサリについては、精巢懸濁液による産卵誘発は確認された一方で、個体間での感受性のバラツキが大きく、バイオアッセイを一定の条件下で実施することができなかった。おそらくアサリの産卵には、誘発物質による刺激以外にもなんらかの条件が必要であることが推察される。

(2) 産卵誘起機構の共通性検証

生殖巣に含まれると考えられるフェロモン様物質による産卵誘発機構が二枚貝類において普遍的にみられる現象であるかどうかを検証するため、系統的に異なる分類群に属

する二枚貝3種（マガキ・アカガイ・ウバガイ）を用いて、精巢破碎液による産卵誘発実験を行った。その結果、全ての種において精巢破碎液処理区では無処理区より有意に高い産卵誘発率を示した。一方で誘発率には種によってばらつきが見られ、例えばムラサキイガイは約80%の個体で産卵が誘発されたのに対して、アカガイでは誘発率50%、ウバガイ、マガキでは誘発率約30%と比較的と感受性が低かった。また種によっては破碎液による産卵誘発率は飼育期間が長くなるにつれて低下する傾向が見られ、個体のコンディションが感受性に大きく影響する可能性も示唆された。



図2. 産卵が誘発されたウバガイ

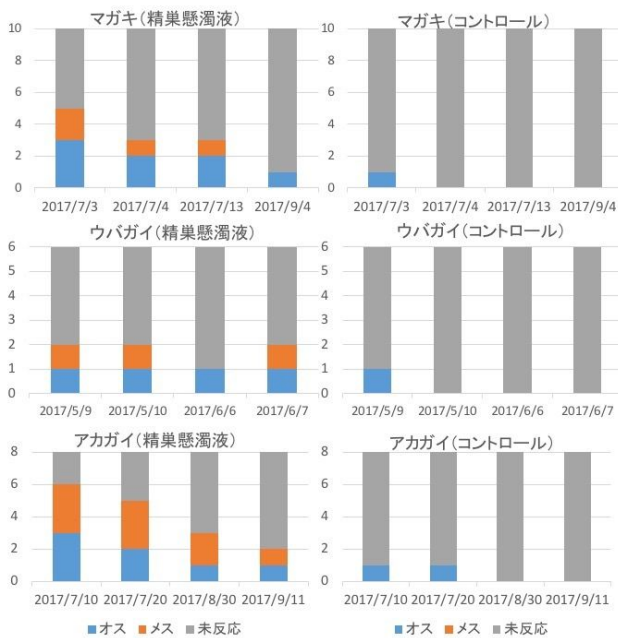


図3. 二枚貝各種における産卵誘発率。

(3) 本研究結果から産卵誘発フェロモンを介した同調的産卵システムが二枚貝類に広く共通する機構である可能性が示唆された。またこの産卵誘発物質は、凍結乾燥や HPLC などを用いた精製過程でも活性を維持する比較的安定的な物質であることが示され、本研究で用いた方法で物質の単離精製は可能であると考えられる。一方で、精製の過程で徐々に活性もしくは物質の量が減少するため、物質の同定には千個体程度の二枚貝精巢が必要であるようだ。また二枚貝の種類によっては、産卵誘発率にばらつきがあり、また

飼育期間が長期化すると誘発率が低下することなどから、成熟個体自体のコンディションも感受性に大きく関わっていることが示唆された。

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 4件)

(1) Kazuki Kanno, Akihiko Koyama, Yoshihisa Kurita. First record of the brachiopod *Lingula reevii* (Brachiopoda, Lingulidae) from the Sea of Japan. *Biogeography* (accepted)

(2) Yoshihisa Kurita. Biological report of a giant deep-sea squid *Onychia robusta* collected from the Sanriku coast, Japan: Implications for low genetic diversity. *Marine Biodiversity*. (2018) vol.48(1), pp685-688.

(3) Yoshihisa Kurita, Naoki Hashimoto, Hiroshi Wada. Evolution of the molluscan body plan: the case of the anterior adductor muscle in bivalves. *Biological Journal of the Linnean Society* (2016) vol.119, pp420-429.

(4) Takuya Okawa, Yoshihisa Kurita, Kazuki Kanno, Akihiko Koyama, Norio Onikura. Molecular analysis of the distributions of the invasive Asian clam, *Corbicula fluminea* (O.F. Müller, 1774), and threatened native clam, *C. leana* Prime, 1867, on Kyushu Island, Japan. *Bioinvasions Records* (2016) vol.5, pp25-29.

[学会発表](計 1件)

(1) Non-invasive molecular methods to identify bivalve species using DNA extracted from the mantle cavity waters. Yoshihisa Kurita, Minoru Ikeda, Akihiro Kijima. The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium "Fisheries Science for Future Generations" Tokyo, Japan (Sep. 2017)

[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

栗田 喜久 (KURITA, Yoshihisa)
東北大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：40725058

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

吉国 通庸 (YOSHIKUNI, Michiyasu)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：50210662

(4) 研究協力者

()