

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：33803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：16K07883

研究課題名(和文) クルマエビの生殖におけるD-グルタミン酸の生理機能の解明

研究課題名(英文) Physiological function of D-Glutamate in the reproduction of kuruma prawn

研究代表者

吉川 尚子 (Yoshikawa, Naoko)

静岡理工科大学・理工学部・准教授

研究者番号：30392533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：クルマエビの生殖におけるD-グルタミン酸(D-Glu)の生理機能を解明するために、生殖刺激がD-Glu含量に及ぼす影響について検討を行った。その結果、片側眼柄切除および水温の上昇により精巣におけるD-Glu含量の増加が認められた。また、性成熟して間もない雄クルマエビの生殖組織では、多量のD-Gluが存在しており、精巣におけるグルタミン酸ラセマーゼ活性も高いことから、積極的にD-Gluが生合成されているものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水生無脊椎動物には他の動物に比べて多量のD-アミノ酸が存在しているが、その生理的役割については未だ解明されていない。本研究によりクルマエビに存在するD-Gluがクルマエビの生殖機能に重要な役割を担っており、受精卵形成に関与しているという新たな知見が得られたが、本研究成果は動物におけるD-アミノ酸の未知なる機能を解明するだけにとどまらず、日本の重要な水産資源であるクルマエビの繁殖技術開発においても貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated changes of D-glutamate (D-Glu) content on reproduction in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. In the testis, content of D-Glu increased in seawater temperature rise or unilateral removal of eyestalk. In addition, the young male prawn contained large amounts of D-Glu in the genital tissue, and the activity of glutamate racemase, which catalyzes the interconversion of D- and L-Glu, was high in the testis. These data indicate that D-Glu biosynthesized actively in the stage.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：D-グルタミン酸 D-アミノ酸 クルマエビ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

D-アミノ酸は、古くから細菌類の細胞壁を構成するペプチドグリカンの必須成分であることが知られていたが、近年の分析技術の向上にともない、動物界においても水生無脊椎動物から哺乳類に至るまで広く存在していることが明らかとなっている。

特に水生無脊椎動物では、D-アラニン(Ala)とD-アスパラギン酸(Asp)が存在していることが報告されており、甲殻類や二枚貝におけるD-Alaは、海水順応過程でL-Alaとともに蓄積されるため、細胞内等浸透圧調節のためのオスモライトの1つであると考えられている。このD-Alaは、D-, L-Alaの相互変換を触媒するアラニンラセマーゼによって生合成されていることが明らかとなっている。申請者は、クルマエビを用いて動物界で初めてアラニンラセマーゼをコードするcDNAのクローニングに成功し、演繹アミノ酸配列を決定した。さらに、クルマエビでは全ての組織においてD-Alaが存在しているが、雄の生殖腺においてのみD-グルタミン酸(Glu)が存在していることを明らかにした。

さらに、雄の生殖腺を、精巣、輸精管および貯精嚢に分けてD-Glu含量を測定したところ、輸精管におけるD-Glu含量が最も高く、全Glu含量にしめるD体の割合は、80%を占めていたが、グルタミン酸ラセマーゼ活性は精巣において検出された。また、D-Gluは精巣のセルトリ細胞と思われる体細胞に局在していることから、精子形成に関わる機能を有するものと考えられ、D-Gluはクルマエビの生殖において重要な役割を果たしているものと考えられた。

2. 研究の目的

クルマエビの雄の生殖腺に存在するD-Gluの生理機能を解明するために、性成熟刺激が雄クルマエビ生殖腺のD-Glu含量に及ぼす影響を明らかにすることとした。すなわち、雌と雄を一緒に飼育することで生殖刺激を与えた際の雄クルマエビ生殖腺のD-Glu含量の変動を明らかにするとともに、眼柄切除がD-Glu含量に及ぼす影響を明らかにすることとした。また、クルマエビの成長過程において、最もD-Glu含量およびグルタミン酸ラセマーゼ活性が高いステージを明らかにし、どのような飼育環境において最もD-Gluが生成されるか検討を行うこととした。さらに、交接器におけるD-Gluの分布を明らかにすることで、クルマエビの生殖におけるD-Gluの役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) クルマエビの生殖刺激がD-Glu含量に及ぼす影響

クルマエビを雄のみで飼育する群と、雌と一緒に飼育する群における雄の生殖腺のD-Glu含量を測定した。さらに、クルマエビは雌が脱皮した直後に交尾を行うため、雌の眼柄を除去して脱皮を誘導させることによって交尾を促し、生殖刺激が雄の生殖腺のD-Glu生合成に及ぼす影響について検討を行った。

(2) 眼柄切除がD-Glu生合成に及ぼす影響

甲殻類では、雌の眼柄神経節のX器官-サイナス腺から卵黄形成抑制ホルモンが分泌されており、卵巣発達を抑制的に調節していることが知られている。したがって、雌の眼柄を切除すると卵巣が発達する。一方、雄の眼柄を切除すると造雄腺の肥大と精巣の発達が報告されていること

から、雄においても眼柄から精巢の発達を抑制するホルモンが分泌されていると考えられている。そこで、雄クルマエビの眼柄切除が D-Glu 含量に及ぼす影響について検討を行った。

(3) 雌の生殖補助器における D-Glu の分布

雌の眼柄神経節の X 器官-サイナス腺からは脱皮抑制ホルモンも分泌されていることから、眼柄切除によって卵巢の発達と同時に脱皮も促進される。そこで、交尾栓を保有する雌クルマエビの眼柄切除を行い、脱皮後の生殖補助器における D-Glu 含量の測定を行った。また、交尾の際に雄から雌に受け渡される精包を貯精嚢から摘出し、D-Glu の分布を明らかにした。

(4) 雄クルマエビの成長過程における D-アミノ酸含量の変動

クルマエビの成長過程において、最も D-Glu 含量およびグルタミン酸ラセマーゼ活性が高いステージを明らかにするために、性別が可能な生物学的最小形とされる体長 10cm の雄クルマエビの生殖組織における D-Glu 含量およびグルタミン酸ラセマーゼ活性の測定を行い、体長 19cm までの個体との比較を行った。

4. 研究成果

(1) クルマエビの生殖刺激が D-Glu 含量に及ぼす影響

雄に生殖刺激を与えた際の D-Glu 含量の変動を明らかにするために、クルマエビを雄のみで飼育する群と、雌と一緒に飼育する群それぞれについて、各生殖組織における D-, L-アミノ酸含量の測定を行った。その結果、D-Glu 含量の変動は認められず、雌と一緒に飼育する群においては、雌と雄の比率を変えてそれぞれ飼育を行ったが、いずれも D-Glu 含量には影響は認められなかった。しかしながら、精巢における D-Ala 含量は、雌と一緒に飼育した群の全てにおいて低下する傾向が見られたことから、雄の生殖組織における D-Glu と D-Ala は異なる挙動を示すことが明らかとなった。

また、クルマエビは、雌が脱皮直後に交尾を行うことから、雌の片側眼柄切除を行い、脱皮を誘導させて交尾を促そうと試みたが、脱皮した雌の個体には交尾栓が認められず、本研究では交尾は確認できなかった。交尾を誘導するには、飼育環境や個体の最適な条件についてさらなる検討が必要であると思われた。

(2) 眼柄切除が D-Glu 生合成に及ぼす影響

雄クルマエビの眼柄切除により、造雄腺の肥大化と精巢が発達することが報告されているため、片側眼柄切除個体の生殖組織における D-Glu 含量の測定を行った。また、雌の卵巢は水温上昇により発達し、産卵が促されるため、眼柄切除を行い、水温を 22~24 に上昇させることで人工催熟が行われていることから、環境水温が D-Glu 含量に及ぼす影響についても検討を行った。その結果、精巢において眼柄切除により D-Glu 含量の増加が認められた。一方、眼柄を切除しなくても、水温を 22 に上昇させて飼育した個体の精巢においても、眼柄切除個体と同程度の D-Glu 含量の増加が認められたことから、眼柄切除および環境水温の上昇により、D-Glu が積極的に生合成されるものと考えられた。

(3) 雌の生殖補助器における D-Glu の分布

クルマエビは、雌が脱皮直後に交尾を行い、雄の精包が雌の貯精嚢に受け渡される。交尾の際に、雄由来の交尾栓が雌の生殖補助器に挿入され、雌は産卵するまで貯精嚢に精包を保持し、産

卵時に精包から精子が放出されて、海水中で受精が起こる。そこで、雄の精包を貯精嚢から摘出し、D-Glu 含量の測定を行ったところ、貯精嚢で検出されていた D-Glu は、精包に分布していることが明らかとなった。したがって、交尾直後の貯精嚢には、D-Glu は存在しないものと考えられた。

また、交尾栓を有する雌の生殖補助器における D-Glu 含量の測定を行ったところ、ほとんどの個体において D-Glu が検出されたが、10 個体中 2 個体の生殖補助器においては D-Glu が検出されなかった。この D-Glu が検出されなかった個体については、産卵後の個体で、精包内の D-Glu がすでに放出されていた可能性が考えられた。一方、交尾栓が見られない雌の生殖補助器において、D-Glu が検出される個体も見られたが、これらについては、衝撃等で交尾栓がとれてしまったものと考えられた。さらに、交尾栓を有する雌の脱皮前後における生殖補助器の D-Glu の分布を確認したところ、脱皮により雄由来の D-Glu は古い生殖補助器とともに脱ぎ捨てられることが確かめられた。

(4) 雄クルマエビの成長過程における D-アミノ酸含量の変動

これまで、体長およそ 14~19cm のクルマエビにおける D-Glu 含量の測定を行ったところ、精巣および貯精嚢においては体長による D-Glu 含量の大きな差は認められなかったが、輸精管においては、15cm 程度の個体に豊富に含まれていることが明らかとなっていた。そこで、性判別が可能な生物学的最小形とされる体長 10cm の雄クルマエビにおける D-Glu 含量の測定を行い、体長 14~19cm のデータと比較を行ったところ、精巣、貯精嚢および輸精管のいずれの組織においても、D-Glu 含量が最も高い値を示したのは 10cm の個体であった。さらに、10cm の個体の精巣におけるグルタミン酸ラセマーゼ活性も、他の大きさのものより高い活性を示したことから、性成熟して間もない若い個体において、D-Glu が積極的に生合成されているものと考えられた。雄のみがどの生育段階で D-Glu を獲得しているのか、今後さらなる検討を行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉川尚子、吉富菜月、仲田一貴
2. 発表標題 眼柄切除によるクルマエビ精巢のD-アミノ酸含量の変動
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉川尚子、遠藤尚人
2. 発表標題 高塩濃度海水順応におけるクルマエビのD-アミノ酸蓄積機構の検討
3. 学会等名 第91回日本生化学会
4. 発表年 2018年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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