

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：58001

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14661

研究課題名(和文) 神経伝達物質に着目したサンゴ産卵誘発メカニズムの解明と応用研究

研究課題名(英文) Neurotransmitters in hermatypic coral, *Acropora* spp., and its contribution to synchronous spawning during reproductive event

研究代表者

平良 淳誠 (Junsei, Taira)

沖縄工業高等専門学校・生物資源工学科・教授

研究者番号：20462153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミドリイシ属サンゴの群体は、水温、月光、潮汐、日没などの様々な環境からの刺激で、一斉産卵を行うことが知られている。しかしながら、一斉産卵が起こる生理機構についてはほとんどわかっていない。本研究は生殖にも関与する神経伝達物質に着目した。はじめに、ミドリイシ属サンゴの群体の神経伝達物質(ドーパミン、エピネフリン、ノルエピネフリン)の抽出法並びにLC/MSによる微量分析法検出方法を確立した。

本分析法を用いて、サンゴの一斉産卵日の前後及び産卵誘発する過酸化水素刺激による神経伝達物質の動態を明らかにし、神経伝達物質が産卵に重要な役割を担っていること、また産卵時期予測の指標物質になることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Synchronous spawning as mass reproduction is well known to occur in many hermatypic corals, which is one of the mysterious life birth events. First, the determination method of the neurotransmitters in coral was established by LC/MS in the selective ion mode together with a solid phase extraction method. As a result, the similar contents of the neurotransmitters for dopamine (DA), adrenaline (AD) and noradrenaline (NR) were detected in both the hermatypic corals of *A. intermedia* and *A. digitifera*. These neurotransmitters increased through the reproductive event during the synchronous spawning of *A. intermedia*, particularly, remarkable changes in the NR and DA were observed. In addition, hydrogen peroxide is known as the spawning stimulant, which was exposed to *A. digitifera*, then the neurotransmitters increased as well as those of the synchronization of spawning. All of the results suggested that the neurotransmitters contribute to the synchronous spawning in the hermatypic corals.

研究分野：生物有機化学

キーワード：神経伝達物質 ミドリイシサンゴ アドレナリン ドーパミン ノルアドレナリン サンゴの産卵 LC/MS

1. 研究開始当初の背景

ミドリイシ属サンゴの群体は、水温、月光、潮汐、日没などの様々な環境からの刺激で、一斉産卵を行うことが知られている⁽¹⁻²⁾。しかしながら、一斉産卵が起こる生理機構についてはほとんどわかっていない。海洋性脊椎及び無脊椎動物の生殖に、神経伝達物質が関与していることが報告されている⁽³⁻⁵⁾。本研究は、サンゴの産卵においても神経伝達物質が関与していることを推察し、研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究では *Acropora* (ミドリイシ属) サンゴの一斉産卵現象のメカニズムを明らかにするため、生殖に関与するサンゴの神経伝達物質の抽出法と分析法を確立すること、及び本法を用いて一斉産卵における神経伝達物質の関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Acropora intermedia (一斉産卵のサンゴ試料) と *Acropora digitifera* (過酸化水素 (H₂O₂) 処理したサンゴ試料) の両ミドリイシ属サンゴの神経伝達物質の抽出は、粉末状にしたサンゴ試料 (50 mg) に、1ml のリン酸緩衝液 (10mM, pH 8.5) を添加した懸濁液を遠心分離して、その上清に含まれるモノアミンである神経伝達物質の Dopamine (DA)、Adrenaline (AD) 及び Noradrenaline (NA) を固相抽出した。固相カラムは、1%トリフルオロ酢酸を含む 30%アセトニトリル溶液で平衡化後に試料を添加して、5%アセトニトリル含有のリン酸緩衝液で洗浄を行い、1%トリフルオロ酢酸含有 30%アセトニトリル溶液で、目的の神経伝達物質を溶出させた。

溶出試料は LC/MS を用いて選択的イオンモード (SIM) で検出し、各々標準物質の保持時間と質量数の一致で同定を行い、定量は、各標準物質の検量線から求めた。

4. 研究成果

(1) サンゴ神経伝達物質の検出

図 1 にサンゴ抽出物より検出した各種神経伝達物質のトータルイオンクロマトグラム (TIC) (DA, *m/z* 154 ; AD, *m/z* 184 ; NA, *m/z* 170) を示した。また、各神経伝達物質の標準物質より、検量線を作成した (図 2)。各々の DA、AD 及び NA の検量線の相関係数 (R²) は、

0.999、0.9991、0.9994 となり、高い相関を示した。また、各々の神経伝達物質の定量下限値は、DA < 2.54 nM、D < 1.42 nM、NA < 32.17 nM となり、本分析法が試料中の低濃度の神経伝達物質を定量できることが示された。試料中の神経伝達物質は、各種標準物質で作成した検量線から求め、タンパク質 (g) 当たりの伝達物質の含有量 (mg) で表示した。本研究で確立したサンゴ試料の神経伝達物質の定量法は、固相抽出した微量成分を選択的に高感度に検出でき、また他の海洋脊椎及び無脊椎生物においても汎用できる分析法であることが示された。

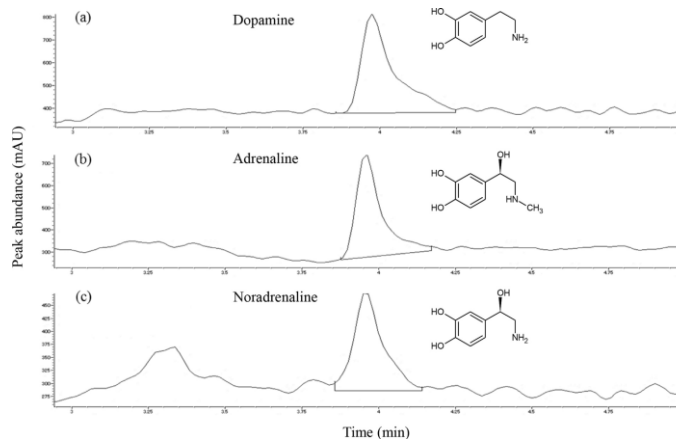


図 1 サンゴ *Acropora* から検出された各種神経伝達物質のトータルイオンクロマトグラム

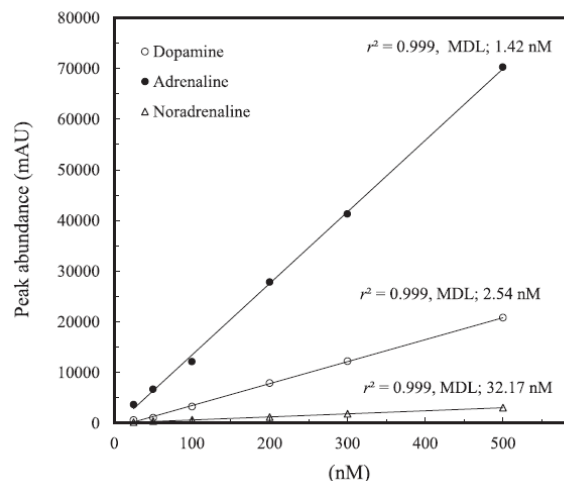


図 2 神経伝達物質の検量線と定量下限値

(2) 一斉産卵前後での神経伝達物質の変動

サンゴの生殖活動は一斉産卵を伴うことがよく知られている⁽¹⁻²⁾。図 3 に群体ごとの

産卵前後の神経伝達物質の変動を示した。産卵と関係ない時期（コントロール）の神経伝達物質は産卵直前に増加し、産卵後の数日間も増加した。特に、NR と DA の変動は顕著に観察された。この結果は、サンゴの一斉産卵に神経伝達物質が関与していることをはじめて示唆した。

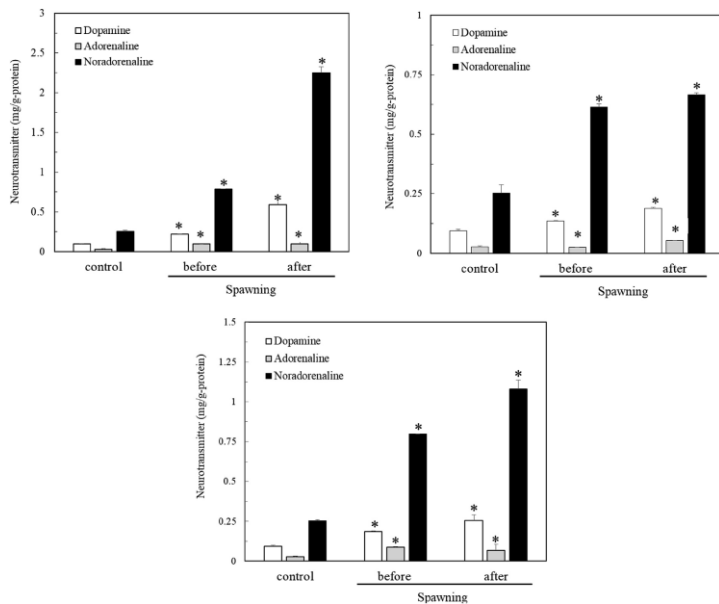


図3 サンゴ *A. intermedia* の一斉産卵に伴う神経伝達物質の変動
* $p < 0.01$ 、コントロールに対する有意差

(3) 過酸化水素刺激に伴う神経伝達物質の変動

H_2O_2 はサンゴの産卵誘発剤として知られ、また神経伝達物質の分解酵素モノアミンオキシダーゼ (Monoamine oxidase, MAO) の代謝副産物として生成する。本研究において 5 mM H_2O_2 で30分間処理した *A. digitifera* では、図3の一斉産卵における神経伝達物質の動態と同様に、 H_2O_2 刺激により増加し、また、NR と DA の変動は顕著であった(図4)。 H_2O_2 刺激によりサンゴの産卵が誘発することが知られている⁽⁶⁾。また、神経伝達物質のモノアミンオキシダーゼ (MAO) による代謝分解に伴い、副産物として H_2O_2 が生成する⁽⁶⁾。従って、光や水温などの環境ストレスにより増加した神経伝達物質は、代謝分解を受けて生

じた H_2O_2 が刺激となり、産卵が誘発されたものと推察された(図5)。

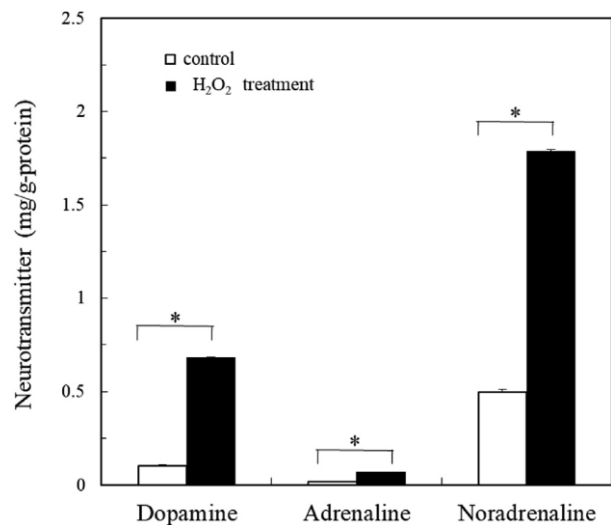
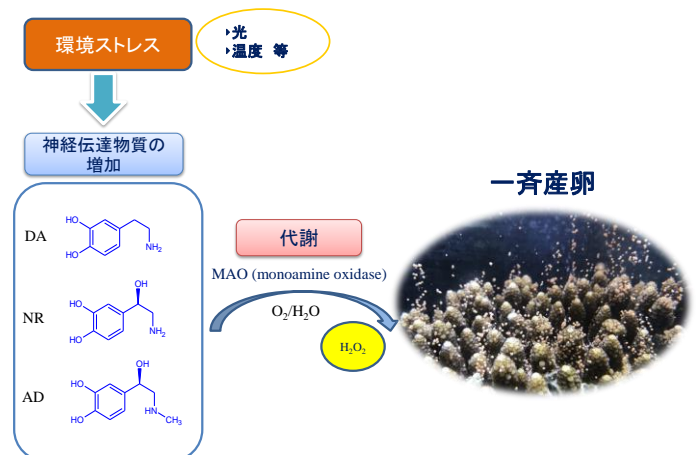


図4 過酸化水素刺激による *A. digitifera* の神経伝達物質の変動
* $p < 0.01$ 、 H_2O_2 処理と未処理（コントロール）における神経伝達物質の有意差



DA, Dopamine; NR, noradrenaline; AD, adrenaline.

図5 神経伝達物質と過酸化水素によるサンゴの一斉産卵の提案される機構

(4) 総括

本研究では、サンゴ神経伝達物質の固相抽出による選択的イオンモードの LC/MS による分析法を確立した。本法は海洋性脊椎及び無脊椎動物の生活史及び環境ストレスに伴う神経伝達物質の研究に幅広く適用できる。また、神経伝達物質と H_2O_2 は、造礁サンゴの一斉産卵及び生殖に重要な役割を担っていることが示唆された。

<引用文献>

- [1] Babcock, R.C., Bull, G.D., Harrison, P.L., Heyward, A.J., Oliver, J.K., Wallace, C.C. Willis, B.L. Synchronous spawnings of 105 scleractinian coral species on the Great Barrier Reef, *Mar. Biol.* 90 (1986) 379e394.
- [2] Harrison, P.L., Babcock, R.C., Bull, G.D., Oliver, J.K. Wallace, C.C. Willis, B.L. Mass spawning in tropical reef corals, *Science* 223 (1984) 1187e1188.
- [3] Bonar, D.B., Coon, S.L., Walch, M., Weiner, R.M. Fitt, W. Control of oyster settlement and metamorphosis by endogenous and exogenous chemical cues, *Bull. Mar. Sci.* 46 (1990) 484e498.
- [4] Pechenik, J.A., Wei, L., Cochrane, D.E. Timing is everything: the effects of putative dopamine antagonists on metamorphosis vary with larval age and experimental duration in the prosobranch gastropod *Crepidula fornicata*, *Biol. Bull.* 202 (2002) 137e147.
- [5] Khotimchenko, Y.S. Effect of noradrenaline, dopamine and adrenolytics on growth and maturation of the sea urchin, *Strongylocentrotus nudus* Agassiz, *Int. J. Invertebr. Reprod. Dev.* 4 (1982) 69e373.
- [6] Hayashibara, T., Iwao, K., Omori, M. Induction and control of spawning in Okinawan staghorn corals, *Coral Reefs* 23 (2004) 406e409.
- [7] Pizzinat, N., Copin, N., Vindis, C., Parini, A. Reactive oxygen species production by monoamine oxidases in intact cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 359 (1999) 428-431.

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1件)

Junsei Taira, Itsuki Higa, Eito Tsuchida, Naoko Isomura, Akira Iguchi, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 501, 2018, 80-84

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.170>

[学会発表] (計1件)

平良 淳誠、サンゴ産卵期における神経伝達物質の動態日本サンゴ礁学会 第20回大会 (東京) 2016年

[その他]

新聞 (沖縄タイムス) 2018年、掲載予定

<https://sites.google.com/site/junseitaira/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

沖縄工業高等専門学校・生物資源工学科・

教授

平良 淳誠 (TAIRA, Junsei)

研究者番号 : 20462153

(2)研究分担者

国立研究開発法人産業技術総合研究所・地質調査総合センター・主任研究員

井口 亮 (IGUCHI, Akira)

研究者番号 : 50547502