

令和 4 年 10 月 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06189

研究課題名(和文) 同種貝殻由来のマガキ幼生付着誘起物質の探索に関する研究

研究課題名(英文) Characterization of the settlement inducing compound from conspecifics of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*

研究代表者

サトイト シリルグレンペレス (Satuito, Cyril Glenn)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授

研究者番号：40363478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マガキ幼生の付着には同種貝殻からGigasins-6 X1/X2アイソフォーム及びStains-allで染色した酸性タンパク質の貝殻マトリックスタンパク質(SMPs)が幼生付着フェロモンタンパク質複合体(CGSPPC)として関与し、SMPsの新たな機能として見出した。幼生の付着に付着誘起物質の糖鎖部位が関わっており、幼生にはレクチン様受容体及び内因性リガンドが局在することも分かった。幼生と稚貝では、貝殻形成に関わる遺伝子は数種のホルモン受容体、神経伝達物質・ニューロペプチド受容体の相互作用に関わる遺伝子調節ネットワークと密接な関連性を示し、付着にエクジソンシグナル伝達経路の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、いくつかのマガキゲノム由来のタンパク質配列に対して構造、機能及び生物学的注釈データを初めて示した。また、幼生の同種に対する識別について、付着誘起物質にある複数の糖鎖部位の関与が示され、今後の群居性の化学的根拠の解明に意義ある成果と考える。さらに、本種幼生の付着・変態は内分泌系伝達経路にバイオミネラル化関連成分の影響が示された。本研究で解明された幼生と同種由来の付着誘起物質の相互作用は海産無脊椎動物幼生の付着機構研究において新しい知見である。本研究成果は、優良品種の高効率な採苗方法の開発に応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Gigasins-6 X1/X2, stains-all stainable acidic proteins (with a 48kDa major band) and surface protein P12p-like played synergistic roles in larval settlement induction of *Crassostrea gigas* through supramolecular action within the shell; a novel functional role for these shell matrix proteins (SMPs) as a settlement inducing cue. Sugar moieties of the settlement cue also influenced larval settlement, while endogenous ligands were also present in the larval chemoreceptors, and this may allow the larva greater selectivity during site selection. Genes related to shell formation showed closely linked dynamics with a gene regulatory network that may involve the interplay of various hormone receptors, neurotransmitters and neuropeptide receptors working together in a coordinated manner in both larval and post larval stages. Results also suggested a possible involvement of an ecdysone signaling pathway during *C. gigas* settlement.

研究分野：ライフサイエンス/水圏生産科学

キーワード：マガキの付着誘起物質 貝殻マトリックスタンパク質 Gigasins-6 X1/X2アイソフォーム 付着フェロモン 超分子相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マガキは世界中で盛んに養殖されている有用二枚貝である。日本では、本種の養殖のほとんどは天然採苗を用いて行うが、人工種苗生産による養殖もある。海外では後者が主流であるため、付着メカニズムの解明及び採苗効率の向上に関心がある。

本種は、幼生期にプランクトン生活を送るが、適切な基盤に付着して成体へと成長する。本種及びその近縁種の幼生の付着は、微生物被膜及び同種個体によって誘起されることが知られており、研究例も多数報告されている。微生物被膜について、特定のバクテリア株¹⁾及びその培養上清²⁾の付着誘起効果が報告されているが、その物質は不明である。一方同種個体について、貝殻³⁾、軟体部⁴⁾、殻内液に含まれるタンパク質⁵⁾の付着誘起効果が報告されているが、いずれの場合も付着誘起物質は特定されていない。アメリカマガキの成体飼育水からは、分子量 500 ~ 1000Da の付着誘起物質⁶⁾が分離されたが、マガキ成体飼育水の幼生付着誘起について平田^{7,8)}はアンモニアの関与を報告した。

研究代表者らは、本種幼生に種々の貝殻を与えた結果、同種の貝殻が最も高い付着誘起効果を示し、幼生の付着に同種貝殻由来の化学物質の関与を示唆した⁹⁾。

2. 研究の目的

本研究は、本種幼生の付着メカニズムを解明するための一環として、本種貝殻由来の付着誘起物質の特定を目的とした。これまで多くの研究者は本種の付着誘起物質に関してバクテリア及び同種個体由来の水溶性物質に焦点を当ててその特定を目指していた。本研究では、同種個体由来の付着誘起物質として、貝殻に含まれる基盤結合型のケミカルシグナルの解明に着目した。

本研究の成果により、本種の群居性の化学的根拠が解明されるだけでなく、幼生の付着メカニズム解明の糸口を開くと期待される。また、貝殻などに含まれる基盤結合型の付着誘起物質が解明できれば、優良品種の人工種苗の採苗の効率向上につながると考えている。

3. 研究の方法

(1) 同種個体由来の付着誘起物質の精製及び特定

粉碎した同種貝殻より EDTA 抽出液を調製し、付着誘起物質を限外濾過、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製を試みた。種々処理した画分について、質量分析などプロテオミクス解析により付着誘起物質を同定した。

(2) 幼生付着に対する糖の影響

マガキ幼生を数種の糖に暴露して付着に対する影響を調べた。幼生の付着に対するレクチングリカン相互作用について、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 及び N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) と小麦胚凝集素 (WGA) を用いて調べ、幼生を染色し相互作用の局在も確認した。

(3) トランスクリプトーム解析による幼生付着に関わる分子メカニズムの解明

マガキ幼生が付着誘起物質 (EDTA 抽出液に含まれる CGSPPC) を感知して付着した際の根本的な分子メカニズムを調べるために、EDTA 抽出液に暴露する前の幼生及び暴露後に変態した稚貝を回収・処理し、DNBseq-G400RS high-throughput sequencing 技術を用いて遺伝子発現及びトランスクリプトームの違いを比較し変化を調べた。

4. 研究成果

(1) 同種個体由来の付着誘起物質の特定

本種貝殻について、付着誘起物質の抽出方法を検討し、その結果エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) が付着誘起物質を効果的に抽出した。EDTA 抽出液 (CgSE) は限外濾過において > 50K 画分が高い活性を示し、WGA アフィニティークロマトグラフィーにおいて活性が WGA 結合と WGA 非結合の両画分にみられた。

CgSE に含まれる付着誘起物質を生物試験を伴う精製・生化学的処理の結果、Gigasin-6 X1/X2 アイソフォーム、Surface タンパク質 P12p 様及び Stains-all で染色した酸性タンパク質が相乗作用しマガキ幼生付着フェロモンタンパク質複合体 (CGSPPC: *Crassostrea gigas* Larval Settlement Pheromone Protein Components) として幼生の付着に関与していることが分かった (図 1、表 1)。Gigasin-6 及びそのダイマーは N-及び O-グリカンとリン酸化する箇所を有し、WGA と結合する等の性質を示し、Gigasin-6 X1/X2 アイソフォームの相対的発現量が稚貝で著しく増加していることより、主要な付着誘起物質であることが分かった。また、Gigasin-6 X1/X2 アイソフォームは付着における幼生・稚貝の相互関係に関与する可能性も示された。Stains-all で染色された酸性タンパク質は補因子及び足場タンパク質として他の SMPs (Shell Matrix Proteins) を集合体につながり止め保護する機能を担うと考えられた。一方、Surface タンパク質 P12p 様はクリコシル化・リン酸化が少しみられ、WGA と結合しないことが分かった。

本種では、同種による幼生の付着誘起は複雑なシステムによって認識され、幼生は複数のグリカン、ジスルフィド結合、アミノ酸、及びリン酸化クロストークの相互作用によって付着することが示唆された。また、幼生の付着は CGSPPC の複数の伝達分子によって誘起されることが示

唆された。

なお、本成果は Int. J. Mol. Sci. に 2022 年に発表した¹⁰⁾。

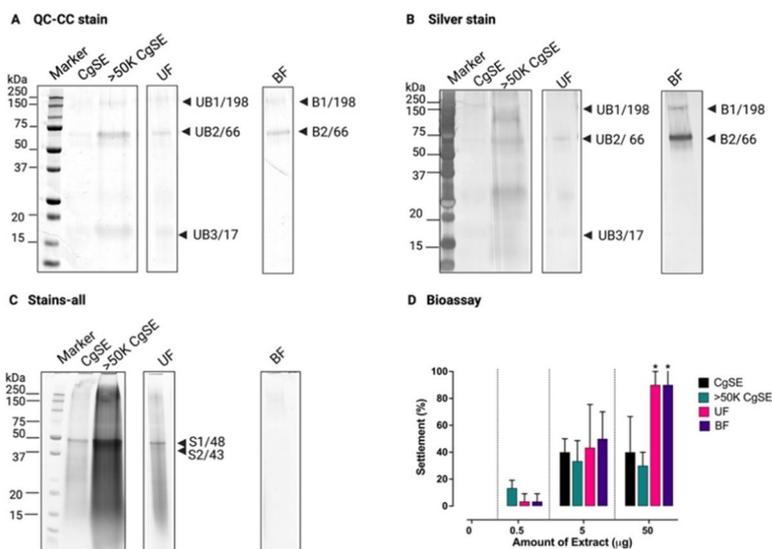


図 1 . 異なる染色法における CgSE 及び WGA アフィニティークロマトグラフィーより得た画分の SDS-PAGE プロフィール (A - C) と各種画分の幼生に対する付着誘起活性 (D)。省略：UF, Unbound 画分; BF, Bound 画分; UB1-UB3, B1, B2, S1, 及び S2 バンドは質量分析法で表 1 に示したタンパク質に対応する。

表 1 . UF 及び BF 画分で見られたバンドのペプチドマスフィンガープリンティング分析 (PMF) より特定したタンパク質。Band No. は図 1 に示す各バンドに対応する。

Band No.	Protein name ^a	Accession Number ^a	Theoretical mass (kDa)	Observed mass (kDa)	PS/NMP ^b	SC ^c (%)
Unbound fraction components						
UB1	Gigasins-6 isoform X2	XP_011449648.2	63	198	79/15	20
	Gigasins-6 isoform X1	XP_011449647.2	64	198	78/15	19
UB2	Gigasins-6 isoform X2	XP_011449648.2	63	66	85/15	21
	Gigasins-6 isoform X1	XP_011449647.2	64	66	84/15	20
UB3	Surface protein P12p-like	XP_034321529.1	15	17	80/8	37
	Surface protein P12p-like	XP_034319527.1	15	17	80/8	37
S1	Unidentified Stains-all stainable acidic protein	N/A	N/A	48	N/A	N/A
S2	Unidentified stains-all stainable acidic protein	N/a	N/A	43	N/A	N/A
Bound fraction components						
B1	Gigasins-6 isoform X1	XP_011449647.2	64	198	97/17	21
	Gigasins-6 isoform X2	XP_011449648.2	63	198	96/17	22
B2	Gigasins-6 isoform X1	XP_011449647.2	64	66	63/13	18
	Gigasins-6 isoform X2	XP_011449648.2	63	66	63/13	18

(2) 幼生の付着に関わる糖の役割

12 種の糖は全て幼生に対して付着誘起効果を示さなかった。一方、幼生の CgSE への付着に対して糖は阻害する傾向を示し、ラクトース、GlcNAc、Neu5Ac が暴露時間 2 時間で幼生の付着を阻害した。

マガキ幼生を FITC 標識 WGA で染色した結果、幼生の足、外套膜及び面盤が蛍光を示し、幼生の化学受容体にはレクチンの WGA 様受容体及び内因性リガンドが局在していることを示唆した。幼生の化学受容体と CgSE に含まれる付着誘起物質が相補的に作用することによって幼生が付着場所探索の際に高い選択性が可能になる。

本成果は Int. J. Mol. Sci. に 2021 年に発表した¹¹⁾。

(3) トランスクリプトーム解析による幼生付着に関わる分子メカニズムの解明

CGSPPC を介した付着誘起に伴う幼生の応答におけるトランスクリプトーム変化の解析を行った。付着可能なペデイベリジャー幼生 (Pedi) と CGSPPC によって付着した稚貝 (PL) のトランスクリプトームを比較した結果、合計 2,383 の候補遺伝子群を特定し、幼生は付着後に遺伝子群のうち 740 が発現上昇し 1,643 が減少した (図 2)。GO (Gene Ontology) 解析の結果、発現変動を検出した合計 43 トランスクリプトは GO 機能的アノテーションが付けられており、これらトランスクリプトについて分子機能と細胞成分の 2 つの機能カテゴリーに割り当てられた。全体として、26 遺伝子、すなわち 9 遺伝子がキチン結合と 17 遺伝子が Ca イオン結合の分子機能プロセスに分類され、17 遺伝子が細胞成分プロセスの細胞外領域に分類された。7 遺伝子が分子機能と細胞成分の両カテゴリーで確認した (表 2)。つまり、Pedi と PL の両ステージにおいてキチン結合の活性化、カルシウムイオン結合、細胞外領域での諸過程が確認された。また、6 つの候補遺伝子群の発現変動が定量リアルタイム PCR でも一致していた。Pedi と PL では、貝殻形成関連の遺伝子群発現変動は複数のホルモン受容体、神経伝達物質、神経ペプチド受容体の相互作用に関わる遺伝子調節ネットワークと連係した作用機序が示された。さらに、本種の付着は、エクジソン信号伝達経路の関与が示唆され、神経内分泌 バイオミネラル化クロストークとの関連も示唆された。

本成果は Diversity に 2022 年に発表した¹²⁾。

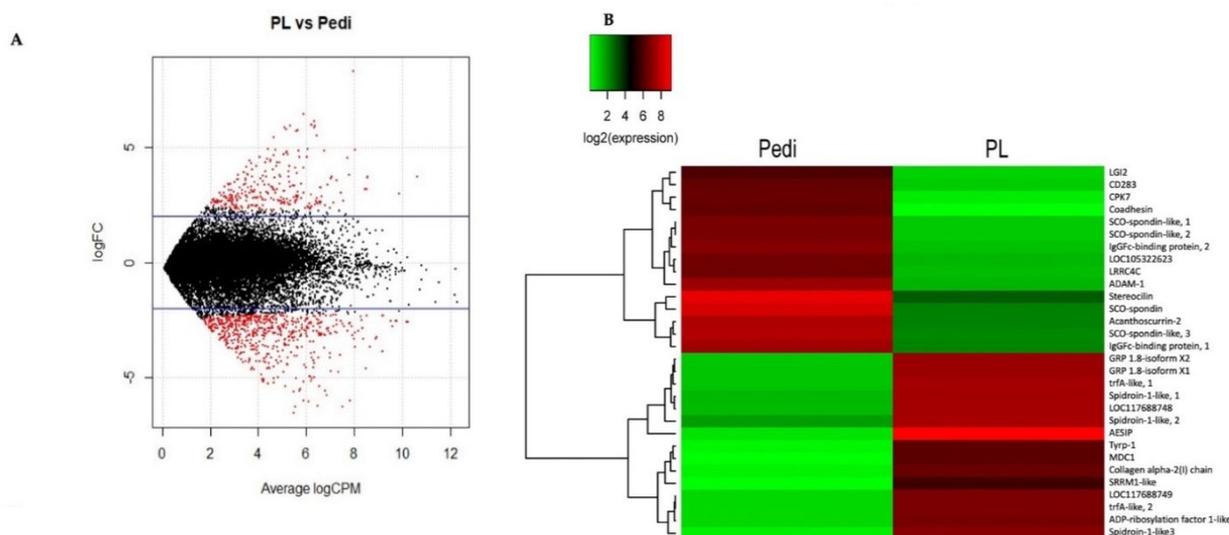


図 2. マガキ幼生 (Pedi) 及び 24h 稚貝 (PL) での発現変動遺伝子 (DEGs) の MA-plot (A) と、上位 30 DEGs の発現パターン (B)

(A) 青線は DEGs 閾値の log-fold change(logFC)が ≥ 2 (FDR < 0.01) .Positive logFC に記した赤点は Pedi で発現レベルが有意に高い遺伝子を示し、Negative logFC に記した赤点は PL で発現レベルが有意に高い遺伝子を示す。CPM: count per million. (B) もっと高い logFC と低い偽発見率 (FDR) 値を示した上位 30 DEGs : 緑から赤への色の強度は低いから高い発現の logFC を示す。

表 2. 幼生及び稚貝での DEGs の遺伝子オントロジー (GO) 解析。

下線は 2 つの GO カテゴリーで確認した遺伝子。

Description	Chitin-binding	Calcium ion binding	Extracellular region
GO ID	GO:0008061	GO:0005509	GO:0005576
FDR value	8.13×10^{-05}	0.0024	5.67×10^{-06}
Ontology	Molecular function (MF)	Molecular function (MF)	Cellular component (CC)
Count	9	17	17
Gene	<u>cgPif97</u> (↑), <u>Peritrophin-44</u> (↓), <u>Lactadherin</u> (↓), <u>Collagen alpha 1 (XII) chain</u> (↓), <u>Peritrophin-1-like,1</u> (↓), <u>Peritrophin-like,2</u> (↓), <u>Cleavage and polyadenylation factor 1</u>	DNA ligase 1 (↓), EF-hand domain-containing protein 1 (↓), Calmodulin-4 (↓), Calcium-binding protein E-63-1-like (↓), Calmodulin-A isoforms (↓), Leucine-rich repeat-containing protein 74B (↓), Sarcoplasmic calcium-binding protein (↑), Myosin	<u>Poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase C</u> (↓), <u>cgPif97</u> (↑), <u>Trithorax group protein osa-like</u> (↑), <u>NPC intracellular cholesterol transporter 2</u> (↓), <u>Mammalian cependymin-related protein 1</u> (↓), <u>Peritrophin-44</u> (↓), <u>Lactadherin</u> (↓), <u>Golgi-associated plant</u>

subunit 1 (Clip1) (↑), Putative chitinase 1 precursor (↑), Putative chitinase (↑)	(↑), EGF-like repeat and discoidin-I domain-containing protein 3 (↓), <u>Mammalian ependymin-related protein 1</u> (↓), EF-hand domain-containing family member B (↓), Sarcoplasmic calcium-binding protein (↑), Neurocalcin homolog,1,(↓), Neurocalcin homolog,2 (↑), Regucalcin,1 (↓), Regucalcin,2 (↓), Annexin A4 (↓)	pathogenesis-related protein 1 (↓), Collagen alpha 1 (XII) chain (↓), Dermatopontin (↓), Metalloproteinase inhibitor 3 (↓), <u>Peritrophin-1-like, 1</u> (↓), <u>Peritrophin-1-like, 2</u> (↓), inactive pancreatic lipase-related protein 1 (↓), pancreatic lipase-related protein 2 (↓), adenosine deaminase AGSA (↓), von Willebrand factor C domain-containing protein 2-like (VWC2L) (↓)
--	---	--

(4) 総括

マガキ幼生の同種個体への付着には Gigasin-6 X1/X2 アイソフォーム、Stains-all で染色したタンパク質及び Surface タンパク質 P12p 様の貝殻マトリックスタンパク質 (SMPs) が付着フェロモンタンパク質複合体 (CGSPPC: *Crassostrea gigas* larval Settlement Pheromone Protein Components) として関与していることが分かった。すなわち、マガキ貝殻においてこれらの SMPs は超分子相互作用 (supramolecular interaction) によって幼生の付着を誘起すると考えられた。これは SMPs の新たな機能として見出した。CGSPPC のうち、Gigasin-6 X1/X2 アイソフォームは主要の付着誘起要素であることが分かった。一方、幼生の付着には付着誘起物質の糖鎖部位が関わっており、幼生にレクチン様受容体及び内因性リガンドが局在することも分かった。幼生と稚貝では、貝殻形成に関わる遺伝子は数種のホルモン受容体、神経伝達物質・ニューロペプチド受容体の相互作用に関与する遺伝子調節ネットワークと密接な関連性を示し、幼生の付着にエクジソンシグナル伝達経路の関与が示唆された。今後、CGSPPC の全構造及びその受容体を特定できれば、本種の進化・個体群動態・ケミカルコミュニケーションへの理解の向上につながる。

引用文献

- 1) Weiner R, et al. J. Shellfish Res. 1989; 8: 117-123.
- 2) Fitt W, et al. Mar Biol. 1990; 106: 389-394.
- 3) Crisp D. J Animal Ecol. 1967; 36: 329-335.
- 4) Bayne B. J mar biol Ass UK. 1969; 49: 327-356.
- 5) Veitch F and Hidu H. Chesapeake Sci. 1971; 12: 173-178.
- 6) Zimmer-Faust R and Tamburri M. Limnol Oceanogr. 1994; 39: 1075-1087.
- 7) 平田 靖 . 日水誌 1998; 64: 610-617.
- 8) 平田 靖ら . 日水誌 2008; 74: 1017-1023.
- 9) Vasquez HE, et al. Plos One. 2013; 8(12): e82358.
- 10) Sedanza MG, Satuito CG (6 番目), et al. Int. J. Mol. Sci. 2022; 23(17): 9816.
(<https://doi.org/10.3390/ijms23179816>)
- 11) Sedanza MG, Satuito CG (6 番目), et al. Int. J. Mol. Sci. 2021; 22(6): 3273.
(<https://doi.org/10.3390/ijms22063273>)
- 12) Sedanza MG, Satuito CG (7 番目), et al. Diversity. 2022; 14(7): 559.
(<https://doi.org/10.3390/d14070559>)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mary Grace Sedanza, Hee-Jin Kim, Xerxes Seposo, Asami Yoshida, Kenichi Yamaguchi, Cyril Glenn Satuito	4. 巻 22
2. 論文標題 Regulatory Role of Sugars on the Settlement Inducing Activity of a Conspecific Cue in Pacific Oyster <i>Crassostrea gigas</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22063273	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Mary Grace Sedanza, Jalal Alshaweesh, Yi-Li Gao, Asami Yoshida, Hee-Jin Kim, Kenichi Yamaguchi, Cyril Glenn Satuito	4. 巻 14
2. 論文標題 Transcriptome Dynamics of an Oyster Larval Response to a Conspecific Cue-Mediated Settlement Induction in the Pacific Oyster <i>Crassostrea gigas</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diversity	6. 最初と最後の頁 559
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/d14070559	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Mary Grace Sedanza, Asami Yoshida, Hee-Jin Kim, Kenichi Yamaguchi, Kiyoshi Osatomi, Cyril Glenn Satuito	4. 巻 23
2. 論文標題 Identification and Characterization of the Larval Settlement Pheromone Protein Components in Adult Shells of <i>Crassostrea gigas</i> : A Novel Function of Shell Matrix Proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9816
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23179816	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mary Grace Sedanza, Asami Yoshida, Hee-Jin Kim, Cyril Glenn Satuito
2. 発表標題 Partial purification of a larval settlement inducing cue in Ethylenediaminetetraacetic acid extract (EDTA-ex) from conspecific shells of Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i>
3. 学会等名 8th World Fisheries Congress（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mary Grace Sedanza, Asami Yoshida, Hee-Jin Kim, Kenichi Yamaguchi, Kiyoshi Osatomi, Cyril Glenn Satuito
2. 発表標題 Supramolecular action of oyster shell proteins as a larval settlement pheromone
3. 学会等名 第44回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム (長崎)
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	吉田 朝美 (Yoshida Asami)	長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・准教授	
	(80589870)	(17301)	

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