

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：33803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05774

研究課題名(和文) クルマエビの発生および成長過程におけるD-グルタミン酸の機能解析

研究課題名(英文) Physiological function of D-glutamate in kuruma prawn during the growth stage

研究代表者

吉川 尚子 (Yoshikawa, Naoko)

静岡理科大学・理工学部・教授

研究者番号：30392533

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)：クルマエビの雄性生殖組織に特異的に存在するD-グルタミン酸(D-Glu)の生理機能を解明するために、クルマエビの成長過程におけるD-Gluの分布を明らかにした。その結果、D-Gluは受精卵からは検出されず、孵化後の各ステージにおいても検出されなかったが、精巣が形成された80mm程度の個体の精巣において検出された。したがって、性成熟にともないD-Gluが精巣で生合成されていることが明らかとなった。また、精包を人工摘出すると、D-Glu含量の増加が認められたことから、精包の再生過程においてD-Gluが積極的に生合成されているものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甲殻類や二枚貝においては、古くからD-アミノ酸が存在することが知られているが、その生理機能については未だ明らかにされていない。クルマエビでは、諸組織中にD-アラニンおよびD-アスパラギン酸が存在しているが、雄性生殖組織においてのみD-Gluが存在することから、D-Gluは生殖機能に重要な役割を担っているものと考えられる。したがって、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)：To elucidate the physiological roles of D-glutamate (Glu) in the reproductive tissues of male kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*, we investigated the distribution of D-Glu during the growth stages. D-Glu was not detected in the fertilized eggs, the stage of nauplius, zoea and mysis of the prawn. In the stage of postlarvae, we confirmed the presence of D-Glu in the testis at 80mm in the male prawn according to sexual maturation. Moreover, the D-Glu content increased in the seminal receptacle due to remove the spermatophore from the seminal receptacle. This suggests that D-Glu in the reproductive tissues of the prawn is positively synthesized in process of reproducing spermatophore.

研究分野：水生生物化学

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

細菌類の細胞壁を構成するペプチドグリカンの構成成分として、数種の D-アミノ酸が存在することが古くから知られているが、D-アミノ酸は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、甲殻類や二枚貝に検出される D-Ala は、高塩濃度海水順応過程で 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。D-Ala の生合成経路としては、クルマエビにおいては 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、神経組織や卵巣等に D-Asp が存在していること、雄の生殖組織においてのみ D-グルタミン酸(Glu)が存在していることを明らかにした。

D-Glu は、雄の生殖組織である精巣、輸精管および貯精嚢に存在しているが、特に輸精管に最も豊富に含まれており、全 Glu 含量に占める D 体の割合は、80%程度を占めている。さらに、貯精嚢には交尾の際に雄から雌に受け渡される精包が存在しているが、精包を摘出したところ、D-Glu は精包に局在していることが明らかとなった。したがって、D-Glu はクルマエビの発生過程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組織に特異的に存在する D-Glu の生理機能を解明するために、クルマエビの受精卵から孵化後の稚エビが性分化し、雄のみが D-Glu を獲得するまでの各成長段階における D-Glu の分布を明らかにすることとした。また、D-Glu はこれまでクルマエビの雄性生殖組織においてのみ検出されていることから、他の十脚目のエビ・カニ類における D-Glu の分布についても明らかにすることとした。さらに、雄の精包を人工的に摘出し、精包が再生される過程における D-Glu 含量の変動を明らかにすることで、D-Glu の生合成機構を解明し、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) クルマエビの発生および成長過程における D-Glu の分布

産卵直前まで卵巣が発達した天然の親エビを用いて、自然産卵後の受精卵における D-, L-アミノ酸含量の測定を行った。また、孵化後のノウブリウス期、ゾエア期、ミス期、さらには、ポストラーバ期の各ステージにおける D-, L-アミノ酸含量の測定を行い、D-Glu の分布を明らかにした。さらに、産卵後の親エビの卵巣の大きさから、完全放卵、部分放卵および未放卵の各個体に分け、それぞれの卵巣および受精嚢における D-, L-アミノ酸含量の測定についても行った。

(2) クルマエビの近縁種を含むエビ・カニ類における D-Glu の分布

甲殻類や二枚貝の諸組織中においては、D-Ala および D-Asp が存在することが報告されているものの、多量の D-Glu が検出されているのはクルマエビのみである。そこで、クルマエビと

同じ十脚目であるウシエビ、クマエビ、ヨシエビ、さらに、トゲノコギリガザミ、タイワンガザミおよびワタリガニの諸組織中の D-, L-アミノ酸含量の測定を行い、クルマエビと同様に雄の生殖組織に D-Glu が検出される種がみられるか検討を行った。

(3) 精包の再生過程における D-Glu 含量の変動

貯精嚢に存在している精包は、交尾の際に雌に受け渡されると再生される。貯精嚢で検出されている D-Glu は、精包に局在していることから、精包が放出されると、D-Glu も積極的に生合成されることが予想される。そこで、人工的に片側の精包を摘出し、精包が再生される過程における各生殖組織の D-, L-Glu 含量の変動を明らかにし、D-Glu 生合成機構について検討を行った。

4. 研究成果

(1) クルマエビの発生および成長過程における D-Glu の分布

クルマエビは、交尾により雄の精包が雌の受精嚢に挿入される。雌は産卵するまで、精包に含まれる精液成分を受精嚢に保持しており、産卵時に放卵と同時に精液成分を放出することで、海水中で受精が起こる。精包に局在する D-Glu も交尾後の雌の受精嚢から検出されていることから、D-Glu は受精卵形成に寄与しているものと考えられたが、受精卵からは D-Glu は検出されなかった。また、孵化後のノウプリウス期、ゾエア期およびミスリス期においても D-Glu は検出なかったため、ポストラバ期以降も継続してサンプリングを行ったところ、体長 70mm 程度の個体において雄性交接器が確認された。さらに、精巣の形成は、体長 80mm 程度の個体で確認され、この精巣から D-Glu が検出された。したがって、D-Glu は雄の性成熟にともない生合成されることが明らかとなった。

また、本研究では、卵巣が発達した産卵直前の親エビを用いたが、放卵後の卵巣の大きさから、完全放卵、部分放卵および未放卵の各個体が存在していたことが確認された。そこで、産卵直後の親エビの受精嚢における D-Glu 含量の測定を行ったところ、完全放卵個体では 4 個体中 1 個体に D-Glu が検出されたものの、他の個体では検出されなかったことから、放卵と同時に D-Glu も放出されているものと考えられた。一方、部分放卵個体では 4 個体中 2 個体、未放卵個体では 5 個体中 4 個体に D-Glu が検出された。したがって、雌の受精嚢に残存する D-Glu 含量は、産卵の程度によって異なることが明らかとなった。

(2) クルマエビの近縁種を含むエビ・カニ類における D-Glu の分布

これまでのところ、動物組織において多量の D-Glu が検出されているのは、クルマエビの雄性生殖組織のみであった。そこで、クルマエビの近縁種を含む同じ十脚目であるエビ・カニ類における D-Glu の分布を明らかにすることとした。その結果、本研究で用いた試料の中では、クルマエビの近縁種であるウシエビおよびクマエビを含めて D-Glu が検出された種は認められなかった。一方、試料として用いた全ての個体において、D-Ala が検出され、一部の組織中に D-Asp および D-Ser が検出された。また、本研究で用いたヨシエビ、トゲノコギリガザミおよびタイワンガザミの雌の個体の中には、卵巣が発達した個体が認められたが、これらの個体は、D-Ala 含量が低い傾向が認められた。

(3) 精包の再生過程における D-Glu 含量の変動

片側の精包を人工的に摘出し、3、7 および 10 日後の各生殖組織における D-, L-Glu 含量の測定を行ったところ、いずれの組織においても 7 および 10 日後の D-Glu 含量は増加傾向が認めら

れた。特に精包が存在する貯精嚢においては、D-Glu 含量の著しい増加が認められ、3 日後までは全 Glu 含量に占める D 体の割合は 50%を下回っていたが、7 日後以降では L 体を上回っていた。一方、精巣および輸精管においては、精包の再生にともない L-Glu 含量の低下がみられ、特に精巣においてこの傾向は顕著であった。精子は精巣で形成されると直ちに輸精管に輸送されると考えられている。精包を摘出したことで、貯精嚢において精包が再生されるために精巣で精液成分が積極的に生合成されていると考えられるが、D-Glu も同様に積極的に生合成されているものと考えられた。さらに、精巣において精包の再生過程で D-Glu 含量の増加にともない L-Glu 含量が著しく減少したことから、L-Glu は D-Glu の生合成に利用されているものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Naoko Yoshikawa, Natsuki Yoshitomi, Kazuki Nakada and Naomi Sawada	4. 巻 5
2. 論文標題 Distribution and role of D-glutamate, a novel D-amino acid identified in animals, in the reproductive tissues of male kuruma prawn <i>Marsupenaeus japonicus</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 95-100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvad072	査読の有無 有
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3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、清水一輝、吉川康夫、山梨靖行、鈴木吉典、岡本一利
2. 発表標題 クルマエビの発生過程におけるD-グルタミン酸の分布
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉川尚子、吉富菜月、仲田一貴
2. 発表標題 クルマエビ生殖腺におけるD-アミノ酸含量の変動
3. 学会等名 第16回D-アミノ酸学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉川尚子、吉富菜月、仲田一貴、澤田直美
2. 発表標題 クルマエビの成長過程におけるD-アミノ酸含量の変動
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021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
---------	---------