

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15163

研究課題名（和文）陸棲カニ類の半月周性繁殖リズムを制御する分子基盤の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms underlying semi-lunar reproductive rhythms in sesamid crabs

研究代表者

豊田 賢治 (Toyota, Kenji)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・特任助教

研究者番号：00757370

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：アカテガニの日本海側集団の繁殖リズムの再調査とオスの繁殖リズムの有無を調べることを目的に、佐渡島において毎晩一定の時間内に出現した個体を全て捕獲し、雌雄の割合と抱卵の有無を記録した。その結果、佐渡島集団も太平洋側と同様に月周性を示すこと、そのリズムには明瞭な雌雄差があることを見出した。

本種の月周繁殖リズムの創出機構の解明を目指し、眼柄をターゲットにRP-HPLCとRNAseqから候補因子選抜を実施した。その結果、RP-HPLCから新月・満月特異的に検出されるペプチドホルモンを、RNAseqから別の内分泌経路に関する遺伝子群が新月・満月をピークにする約2週間周期の発現動態を示すことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでアカテガニに見られる月周繁殖リズムは潮汐差の乏しい日本海側個体群では観察されないと考えられてきた。しかし、本研究によって、佐渡島個体群では満月と新月にピークを有する明確な月周繁殖リズムを示すこと、さらにそのリズムには明確な雌雄差があることを初めて示した。本研究成果は、従来の定説を覆すものであると同時に、アカテガニの繁殖に関わる行動リズムに明瞭な雌雄差があることを世界で初めて示した。

研究成果の概要（英文）：To investigate the reproductive rhythms of the Japanese Sea population of the sesamid crab and determine the presence of such rhythms in males, field survey on Sado Island were conducted. The results revealed that, like their Pacific counterparts, the Sado Island population exhibits lunar-related rhythms, with clear sex-specific differences. In pursuit of understanding the mechanisms underlying the lunar-dependent reproductive rhythms of this species, candidate factors were selected through RP-HPLC and RNAseq targeting the eyestalk. The studies identified peptides specific to new and full moons using RP-HPLC, while RNAseq revealed a group of endocrine pathway genes that peak during new and full moons, showing a biweekly expression pattern.

研究分野：生理生態学

キーワード：アカテガニ 月周期繁殖リズム 眼柄

1. 研究開始当初の背景

動物は生息環境の変化に合わせてそれぞれ独自の繁殖戦略を獲得してきた。その戦略の一つに生殖リズムがある。温帯域の動物の多くは、一年の中のある特定の時期や時刻に生殖を行なう。一部の動物では、これら季節や時刻などの情報が神経内分泌系を介して周期的に調節されていることが明らかになりつつあるが、未だその多くが現象の記載に留まっている。

アカテガニは北海道・青森を除く日本各地に広く分布する陸棲甲殻類であり、普段は海岸や河川に近い里山に生息している。繁殖期は6-10月で、満月・新月の大潮とその前後の夜の満潮前に海岸に移動して集団で幼生を放出する。すなわち、アカテガニの繁殖リズムは、半月周期性(2週間周期)と潮汐性(12.4時間周期)、日周期性(朝か夜)の3つの異なる体内時計から形成される。一般にこれらのリズムは、内因性の体内時計とそれを同調させる環境要因によって形成されるが、体内時計の分子機構が明らかになっているのは、明暗サイクルに同調した概日時計(約24時間周期)のみである。アカテガニを含めた多くの海洋生物が持つと考えられる月齢や潮汐に同調した概半月周時計や概潮汐時計の分子実体は未だ不明である。

アカテガニの幼生放リズムは地域によって異なることが示されている。太平洋に面する伊豆半島では潮汐の影響を受けずに日周成分の影響が大きいのに対し(Saigusa 1981)、瀬戸内海の集団は潮汐リズムに強く支配される(Saigusa 1982)。また、潮汐差の少ない日本海に囲まれた佐渡島では月齢と潮汐リズムの影響を受けないことが報告されている(北見ら 1981)。このように同種他地域の集団で異なる幼生放リズムを有しているアカテガニは、概半月周時計や概潮汐時計の分子基盤を調べる上で有用なモデル動物になる可能性を秘めている。十脚目甲殻類の複眼を支える眼柄内には、サイナス腺-X器官というペプチドホルモンの神経内分泌系が存在し、アカテガニの眼柄を外科的に切除すると幼生放出が抑制される(Saigusa 2002)。これはサイナス腺由来の神経ペプチド類がアカテガニの幼生放リズムに関与していることを示唆しているが、詳細な解析は行なわれていなかった。

これまでのアカテガニの繁殖行動は全てメスの幼生放出現象のみ調べられており、オスの行動パターンについては報告がなかった。そこで申請者は、北見ら(1981)と同じ佐渡島内の調査地において、毎晩一定の時間内に出現したアカテガニを全て捕獲し、雌雄の割合と抱卵の有無を記録した。2020年の調査から、(1)先行研究と異なりメスの繁殖行動には明瞭な半月周期性と日周期性(日没後)があること、(2)オスには半月周期性の行動リズムが見られないこと、(3)雌雄ともに潮汐の影響を受けないことを明らかにした。さらに、繁殖期の体色には明確な雌雄差があること(オスは黒灰色、メスは赤色)を見出した。アカテガニの幼生放出現象は日没後に行なわれるため、生息場所は月光のみの暗闇である。そのためアカテガニが体色を頼りに交配相手を探しているとは考え難く、体色の性差には別の生態・生理学的要因があるのではないかと着想した。カニ類の体色は色素胞の拡散と凝集で調節されており、主な色素因子としてサイナス腺由来の神経ペプチドである色素拡散ホルモン(pigment-dispersing hormone: PDH)と赤色素凝集ホルモン(red pigment-concentrating hormone: RPCH)が知られている。興味深いことに、PDHは昆虫類において概日リズムのペースメーカーとしての機能を担っていること、また、RPCHの発現パターンは日内変動を示すことが複数の甲殻類で報告されている(Strauss & Dircksen 2010)。このことから、これら2因子を含むサイナス腺由来のペプチドホルモンがアカテガニの半月周期性の繁殖リズムの形成に関与している可能性は十分考えられる。事実、申請者の野外調査から佐渡島集団のメスは明瞭な概半月周と概日リズムを示すが、オスは概日リズムしか示さないこともこの仮説に説得力を与えている。

2. 研究の目的

本研究では、アカテガニの半月周期性の繁殖リズムの分子機構を解明するために佐渡島集団をモデルとして、雌雄のサイナス腺-X器官を含む眼柄神経節の時系列トランスクリプトームを実施する。そして半日周期および半月周期で発現変動する遺伝子群の探索とそれらの共発現遺伝子ネットワークの構築を第一の目的とする。さらに、液体クロマトグラフィーによるサイナス腺抽出物中の神経ペプチドホルモン類の定性・定量分析から周期的な増減・消長パターンを示す各種ペプチド類を明らかにすることを第二の目的とする。これらの解析から得られた半月周期性を示す鍵因子の機能解析を通して、アカテガニの概半月周リズムを形成する時計遺伝子ネットワークと神経内分泌機構のクロストークを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、眼柄神経節の時系列トランスクリプトーム解析とペプチドホルモンの液体クロマトグラフィー分析から半月周期性を示す因子群を探索し、それらの機能解析を通して半月周期性繁殖リズムを創出する時計遺伝子と神経内分泌系の分子基盤を明らかにする。

1. 概半月周期を示す時計遺伝子群の抽出：繁殖期間中の1ヶ月の中で大潮と小塩でそれぞれ2時点ずつ、合計4時点でサンプリングを実施する。雌雄各5個体ずつ片眼から眼柄神経節を摘出しRNAseqへ、もう片眼からサイナス腺を摘出しHPLC分析を実施する。
2. サイナス腺由来の神経ペプチドホルモン類の定性・定量分析：サイナス腺ペプチドは脱皮や卵成熟の制御因子も含まれるため水産重要種のエビ・カニ類を中心に古くから研究されてきた。液体クロマトグラフィーによって1個体分のサイナス腺抽出物からペプチドホルモン類の定性・定量分析が可能である。
3. 候補因子の機能解析：カニ類では二重鎖RNAの腹腔内注射によるRNA干渉法が有効であることが示されている。また、サイナス腺ペプチド類は有機化学合成やin vitro合成が可能であり、合成ペプチドの生体注射も有効である。本研究では候補因子のRNA干渉やペプチド注射実験によって、抱卵メスの飼育環境下で半月周性の幼生放出リズムを規準に機能解析を実施する。

4. 研究成果

アカテガニの日本海側集団の繁殖リズムの再調査とオスの繁殖リズムの有無を調べることを目的に、佐渡島において毎晩一定の時間内に出現した個体を全て捕獲し、雌雄の割合と抱卵の有無を記録した。その結果、佐渡島集団も太平洋側と同様に月周性を示すこと、そのリズムには明瞭な雌雄差があることを見出した。

本種の月周繁殖リズムの創出機構の解明を目指し、眼柄をターゲットにRP-HPLCとRNAseqから候補因子選抜を実施した。その結果、RP-HPLCから新月・満月特異的に検出されるペプチドホルモンを、RNAseqから別の内分泌経路に関する遺伝子群が新月・満月をピークにする約2週間周期の発現動態を示すことを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kenji Toyota, Haruna Watanabe, Masashi Hirano, Ryoko Abe, Hitoshi Miyakawa, You Song, Tomomi Sato, Shinichi Miyagawa, Knut Erik Tollefsen, Hiroshi Yamamoto, Norihisa Tatarazako, Taisen Iguchi	4. 巻 243
2. 論文標題 Juvenile hormone synthesis and signaling disruption triggering male offspring induction and population decline in cladocerans (water flea) : Review and adverse outcome pathway development.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aquatic Toxicology	6. 最初と最後の頁 106058
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aquatox.2021.106058.	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 Shouzo Ogiso, Kazuki Watanabe, Yusuke Maruyama, Hiroshi Miyake, Kaito Hatano, Jun Hirayama, Atsuhiko Hattori, Yukina Watabe, Toshio Sekiguchi, Yoichiro Kitani, Yukihiro Furusawa, Yoshiaki Tabuchi, Hajime Matsubara, Mana Nakagiri, Kenji Toyota, Yuichi Sasayama, Nobuo Suzuki.	4. 巻 13
2. 論文標題 daptation to the shallow sea floor environment of a species of marine worms, <i>Oligobrachia mashikoi</i> , generally inhabiting deep-sea water.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-33309-6	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 -
1. 著者名 Kenji Toyota, Takashi Ichikawa, Nobuo Suzuki, Tsuyoshi Ohira	4. 巻 -
2. 論文標題 Dietary effects on larval survival and development of three sesarmid crabs.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plankton and Benthos Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Ryoya Kawamura, Muhammad Rafiuddin Ahya, Kenji Toyota, Masato Honda, Thumronk Amornsakun, Yoshiaki Tabuchi, Atsuhiko Hattori, Tatsuo Harumi, Jun Hirayama, Makoto Urata, Kyoko Matsumoto, Sogo Nishimoto, Ajai Kumar Srivastav, Nobuo Suzuki, Hajime Matsubara.	4. 巻 9
2. 論文標題 Fluorene is highly toxic to zoea larvae of the red-clawed crab <i>Chiromantes haematocheir</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Zoological Investigations	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Aika Sekimoto, Tsuyoshi Ohira, Atsushi Shigematsu, Takuji Okumura, Miyuki Mekuchi, Yoishiro Kitani, Toshio Sekiguchi, Kenji Toyota, Hiroyuki Mishima, Ryoya Kawamura, Kaito Hatano, Umi Kawago, Thumronk Amornsakun, Jun Hirayama, Atsuhiko Hattori, Hajime Matsubara, Nobuo Suzuki.	4. 巻 559
2. 論文標題 Functional analysis of a matrix peptide involved in calcification of the exoskeleton of the kuruma prawn, <i>Marsupenaeus japonicus</i> .	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aquaculture	6. 最初と最後の頁 738437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aquaculture.2022.738437	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 -

1. 著者名 Kenji Toyota, Masaki Yasugi, Norihisa Tatarazako, Taisen Iguchi, Eiji Watanabe	4. 巻 337
2. 論文標題 Laterally biased diffusion of males of the water flea <i>Daphnia magna</i> .	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Zoology Part A	6. 最初と最後の頁 626-638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jez.2595.	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 -

1. 著者名 Hidekazu Katayama, Kenji Toyota, Haruna Tanaka, Tsuyoshi Ohira.	4. 巻 122
2. 論文標題 Chemical synthesis and functional evaluation of the crayfish insulin-like androgenic gland factor.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 105738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bioorg.2022.105738	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 -

1. 著者名 Kenji Toyota, Haruna Watanabe, Masashi Hirano, Ryoko Abe, Hitoshi Miyakawa, You Song, Tomomi Sato, Shinichi Miyagawa, Knut Erik Tollefsen, Hiroshi Yamamoto, Norihisa Tatarazako, Taisen Iguchi.	4. 巻 243
2. 論文標題 Juvenile hormone synthesis and signaling disruption triggering male offspring induction and population decline in cladocerans (water flea) : Review and adverse outcome pathway development.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aquatic Toxicology	6. 最初と最後の頁 106058
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aquatox.2021.106058.	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 該当する

1. 著者名 Kenji Toyota, Masaki Yasugi, Norihisa Tatarazako, Taisen Iguchi, Eiji Watanabe.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Laterally biased diffusion of males of the water flea <i>Daphnia magna</i> .	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Zoology Part A	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jez.2595.	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 -

1. 著者名 Kenji Toyota, Kazuki Usami, Kanta Mizusawa, Tsuyoshi Ohira.	4. 巻 61
2. 論文標題 Effect of blue light on the growth of the red swamp cray fish <i>Procambarus clarkii</i> larvae - seasonal and sexual differences-.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zoological Studies	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.6620/ZS.2022.61-03.	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 -

1. 著者名 Fumihiro Yamane, Katsuyoshi Suitoh, Takuji Okumura, Kenji Toyota, Naoaki Tsutsui, Tsuyoshi Ohira.	4. 巻 88
2. 論文標題 Annual reproductive cycle of the greasyback shrimp <i>Metapenaeus ensis</i> in Ise Bay, Japan.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 63-73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-021-01569-8.	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 -

1. 著者名 Hidekazu Katayama, Kenji Toyota, Haruna Tanaka, Tsuyoshi Ohira.	4. 巻 122
2. 論文標題 Chemical synthesis and functional evaluation of the crayfish insulin-like androgenic gland factor.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 105738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bioorg.2022.105738	査読の有無 無
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22件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kenji Toyota.
2. 発表標題 Marine crustaceans as model species of marine pollution research
3. 学会等名 K-INET International Symposium "Joint Usage/Joint Research on Transboundary Pollution and its Impact on Social Environment" (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊田賢治
2. 発表標題 動物の性差構築メカニズム 甲殻類の研究紹介
3. 学会等名 立教大学生命理学研究センターセミナー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 豊田賢治, 伊藤丈浩, 森島海斗, 花崎 烈, 片山秀和, 岡野桂樹, 大平 剛.
2. 発表標題 寄生性甲殻類フクロムシによるイワガニの疑似メス化メカニズムの解析
3. 学会等名 第6回 富山湾研究会 (能登大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊田賢治.
2. 発表標題 甲殻類の性分化と繁殖形質を中心とした比較生理学
3. 学会等名 奈良女子大学
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊田賢治.
2. 発表標題 甲殻類の性分化や繁殖機構の理解を目指した生態生理学
3. 学会等名 九州大学国際農業教育研究・推進センター(CPIER)公開セミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊田賢治.
2. 発表標題 甲殻類における幼若ホルモンと眼柄ホルモンの生理機能解明に関する研究
3. 学会等名 第46回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊田賢治.
2. 発表標題 好奇心駆動型の研究道 ~ 甲殻類研究から見えてきたオモシロ生命現象 ~
3. 学会等名 ヒューマンネットワーク高専(HNK) 月例会(2022年10月度)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊田賢治.
2. 発表標題 アカテガニの月周性繁殖リズム
3. 学会等名 日本動物学会第93回早稲田大会 シンポジウム"行動を操る脳ホルモン -比較神経内分泌学研究は面白すぎる!!!"
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊田賢治.
2. 発表標題 スナモグリの生態を学ぶ
3. 学会等名 加茂湖環境セミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊田賢治.
2. 発表標題 佐渡の海辺でみかける甲殻類の不思議な生態
3. 学会等名 令和4年度 市民環境講座
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊田賢治, 市川卓, 竹内謙, 山本岳男, 若林香織, 大平剛.
2. 発表標題 有用水産甲殻類のサイナス腺ホルモンの比較解析
3. 学会等名 第46回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊田賢治, 若林香織, 大平剛.
2. 発表標題 ウチワエビとイセエビの眼柄ホルモンの生理機能解析
3. 学会等名 日本甲殻類学会第60回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenji Toyota.
2. 発表標題 Molecular mechanisms underlying environmental sex determination In the water flea Daphnia
3. 学会等名 Joint Usage/Joint Research Symposium on Integrated Environmental Studies (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊田賢治
2. 発表標題 甲殻類の加齢トピック
3. 学会等名 The 78th Scienc-ome 加齢なる一族 老化の生物多様性と進化生物学
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊田賢治
2. 発表標題 甲殻類の比較生理学 ~ 性分化・生殖 ~
3. 学会等名 岡山大学牛窓臨海実験所セミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊田賢治
2. 発表標題 甲殻類の比較生理学
3. 学会等名 東北大学セミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊田賢治, 近藤裕介, 鈴木信雄, 大平剛, 安東宏徳.
2. 発表標題 アカテガニの半月周性繁殖リズムの生理機構の理解に向けて
3. 学会等名 日本甲殻類学会第59回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊田賢治.
2. 発表標題 眼柄ホルモン研究への誘い
3. 学会等名 日本甲殻類学会若手の会 第3回自由集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊田賢治
2. 発表標題 甲殻類のオスとメスの形の科学 -寄生種による擬似メス化-
3. 学会等名 2021年度 形の科学研究センター シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenji Toyota
2. 発表標題 Comparative Biology of Crustaceans
3. 学会等名 第31回 遺伝子制御学研究部, 発生医学セミナー, 和歌山県立医科大学
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊田賢治, 大平剛, 安東宏徳.
2. 発表標題 佐渡島におけるアカテガニの半月周性繁殖リズム
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会オンライン大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊田賢治, 山本岳男, 宮川信一, 井原賢, 森友子, 重信秀治, 大平剛.
2. 発表標題 幼若ホルモンがズワイガニのオスらしさを決める?
3. 学会等名 第92回日本動物学会, オンライン米子大会
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
---------	---------