

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82708

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658169

研究課題名(和文)アコヤガイ外套膜上皮細胞移植による真珠生産法と真珠黄色度調節技術の開発

研究課題名(英文) Pearl production by transplantation of outer epithelial cells of mantle and a novel technology to control yellowness of pearls.

研究代表者

淡路 雅彦 (Awaji, Masahiko)

独立行政法人水産総合研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：20371825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：真珠養殖ではアコヤガイの外套膜(貝殻を作る組織)の小片(ピース)を、貝殻で出来た小球(真珠核)と共に別のアコヤガイの体内に移植する。するとピースに含まれる外面上皮細胞が真珠核をとりまく濾胞(真珠袋)を作り、真珠核表面に真珠を形成する。この研究ではピースに換えて外面上皮細胞を移植して真珠を生産する技術を開発し、黄色度の異なる真珠を形成する外面上皮細胞を混合して移植することで、生産される真珠の黄色度が人為的に調節できることを明らかにした。この結果は品質が優良な真珠を形成する外面上皮細胞を混合移植することで、優良品質を併せ持つ真珠を生産できる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：In pearl culture, a small piece of mantle tissue is implanted into a gonad of a pearl oyster in adjacent to a shell bead that is implanted concomitantly. Then outer epithelial cells of the mantle fragment start to migrate along the surface of the bead, which leads to the formation of follicular structure surrounding the bead and subsequent formation of pearl layers on the surface of the bead. In this study, techniques for pearl formation by the transplantation of the outer epithelial cells were developed. Moreover, transplantation of the blended outer epithelial cells which produce pearls with different yellowness enabled control of the yellowness of the pearls. These results imply future possibilities of pearl production by blending of different types of outer epithelial cells that can produce pearls with differing superior qualities.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：真珠 細胞培養 色素 アコヤガイ 外套膜

1. 研究開始当初の背景

アコヤガイをはじめとする真珠貝を用いた真珠養殖では、真珠を生産するために、貝殻を作る組織である外套膜の薄片(ピース)を貝殻製の小球(真珠核)とともに真珠貝の体内に移植(挿核)する。すると移植されたピースに含まれる外套膜外面上皮細胞が真珠核を取り巻く濾胞状構造(真珠袋)を作り、やがて真珠核表面に真珠層を形成し始め、最終的に商品となる真珠が生産される。

真珠の品質は漁場環境、養殖技術、貝の生理状態など様々な要因の影響を受け、特に挿核に伴って生じる傷や組織屑により貝の体内で引き起こされる炎症反応は真珠品質を左右する大きな要因である。たとえば移植されたピースのうち外面上皮細胞以外の組織は、貝の体内で組織屑として排除され、炎症反応の一因となる。

また真珠の品質を決める重要な要因である真珠の黄色度は、真珠層に含まれる黄色色素の含有量によって決まり、真珠層への黄色色素の分泌は外面上皮細胞の遺伝的性質により決まることが知られている。すなわち貝殻真珠層黄色度の高い個体から得たピースを移植すると黄色度の高い真珠が形成され、逆に貝殻真珠層黄色度の低い個体から得たピースを移植すると黄色度の低い真珠が形成される。

真珠を作るのは真珠袋を構成する外面上皮細胞であるので、ピースに換えて外面上皮細胞のみを移植しても真珠袋が形成され、真珠が生産できると考えられる。もしそれが可能になれば、組織屑として排除される組織を移植しないので、炎症反応を低減し真珠品質の向上に結び付くと予想される。また貝殻真珠層黄色度の高い個体と低い個体から得た外面上皮細胞を適切な比率で混合して移植すれば、好みの黄色度の真珠を生産できると予想される。

さらに外面上皮細胞を培養条件下で増殖させる事が出来れば、高品質な真珠を生産する外面上皮細胞を選抜し、その細胞を移植して真珠を生産することも可能になると予想される。そして真珠黄色度を左右する黄色色素の産生に関わる遺伝子等が解明されれば、色素産生機能を改良した外面上皮細胞を移植することが可能となるかもしれない。

しかし研究開始当初において、外面上皮細胞を移植して真珠を養殖する技術は確立されておらず、培養条件下での上皮細胞の増殖条件も明らかでなかった。またアコヤガイ真珠層黄色色素の産生に関わる遺伝子も解明されていなかった。

2. 研究の目的

この研究は真珠を作るアコヤガイ外套膜外面上皮細胞を培養し、その培養細胞を移植して真珠を生産する技術を開発する事と、真珠の品質を決める重要な要因である真珠黄色度について、その実体である黄色色素とその産生に関わる遺伝子を解明することを目

的とした。

3. 研究の方法

(1) 外面上皮細胞の移植法の検討

外面上皮細胞の分離

アコヤガイ切り出した外套膜縁膜部を1mg/mL 硫酸カナマイシンを含む海産貝類用生理塩類液(BSS, pH7.5)で洗浄後, 1.25mg/mL ディスパーゼ・0.5mg/mL コラゲナーゼを含むBSS (0.1mg/mL 硫酸カナマイシン含有) に入れ 25℃ で6時間緩やかに振とうし, 処理後の外套膜組織片から実体顕微鏡下でピンセットを用いて外面上皮を剥離した。得られた外面上皮を 0.4mg/mL ヒアルロニダーゼ BSS で洗浄し, それにより分散された外面上皮細胞を遠心し, 得られた沈殿を BSS に懸濁した。

注射による移植

2011年5月末にアコヤガイ2年貝の「うかし」と呼ばれる部位に真珠核(直径4.5mm)1個を挿核した。挿核後13日目に材料貝を20個体ずつ4区に分け, 外面上皮細胞を0.46, 4.6, 46×10^4 細胞/mLの3種の濃度で5mg/mL ザイモザンを含む20mM ヘペス含有BSS(ヘペスBSS, pH7.5)に懸濁し, 20 μ L/個体を3区の材料貝の真珠核周囲に注射した。また残る1区にはザイモザンを含まないヘペスBSSに細胞を 4.6×10^4 細胞/mLの濃度で懸濁させた液を注射した。注射3か月後に試験貝を開殻し, 生残個体数, 脱核個体数を計数し, 得られた真珠の表面を実体顕微鏡で観察し, 真珠層が形成されている珠(真珠層真珠), 真珠層以外の結晶や沈着物が形成されている珠(非真珠層真珠), 真珠核表面に何も形成されていない珠(白珠)に区別して計数した。

穴あき核による移植

真珠核(直径4.5mm)にあらかじめ真珠用穴あけ機で直径1mm深さ0.5から1.0mmの穴を一つあけておき(穴あき核), 挿核時には穴に外面上皮細胞懸濁液1 μ Lを入れて用いた。2011年10月中旬にアコヤガイ2年貝150個体を25個体ずつに分け, 各個体のうかしに外面上皮細胞を入れた穴あき核1個を挿核した。細胞懸濁液は細胞を5mg/mL ザイモザン・ヘペスBSSまたはそれにアコヤガイコラーゲンを濃度1%で加えて粘性を高めた液に懸濁し, 細胞濃度0.1, 0.5, 1.0×10^4 細胞/ μ Lに調整して合計6区の実験区を設定した。2012年1月初めに試験貝を開殻し, 各区の生残個体数, 脱核個体数を計数し, 得られた真珠の表面を正立型金属顕微鏡で観察し, 真珠層真珠, 非真珠層真珠, 白珠に区別して計数した。

(2) 外面上皮細胞の混合移植

2012年7月中旬に, ミキモト真珠研究所で選抜飼育されている貝殻真珠層黄色アコヤガイ(黄色個体)15個体および貝殻真珠層白色アコヤガイ(白色個体)6個体から, 外面上皮細胞を分離してBSSに懸濁し, 細胞数を計数して10 μ Lで一晩保存した。翌日に黄色個体と白色個体の外面上皮細胞をその比率が3:0, 2:1, 1:2, 0:3となるように混

合し、各混合液を遠心して得られた沈殿を 6.0×10^5 細胞/ μL となるように 1% 豚ゼラチン・5mg/mL ザイモザン・ヘペス BSS に懸濁した。そして穴あき核（直径 4.5mm）に 1 核あたり $1 \mu\text{L}$ の細胞懸濁液を入れ、各区 30 個体のアコヤガイ 2 年貝のうかしに 1 個挿核した。挿核約 5 か月後の 12 月初めに試験貝を開殻し、生残個体数、脱核個体数を観察した。そして得られた真珠を実顕顕微鏡で観察し、真珠層真珠、非真珠層真珠、白珠に区別して計数した。真珠層真珠については、真珠表面のシミの面積が全体の 30% 未満の真珠の巻きと真珠黄色度を測定した。また外面上皮細胞の分離に用いたアコヤガイの貝殻真珠層の黄色度も測定した。

(3) 外面上皮細胞の培養法の検討

培養液、培養基質の検討

外面上皮細胞の培養液として海産貝類用生理塩類液（BSS）、Pf35、TC199、L15、GIT を選定し、培養に伴う細胞数の変化、培養器底への接着性を比較した。市販の培養液には無機塩類濃度がアコヤガイ体液とほぼ同等となるように塩類を添加し 22 で 7 日間培養した。また GIT 培養液に 10% アコヤガイ血清、 $4 \mu\text{M}$ 牛インスリンを添加して細胞数の変化を測定した。培養基質の検討では市販の基質コート済みプレートに L15 に懸濁させた外面上皮細胞を植え込み、コラーゲン type 、コラーゲン type 、フィブロネクチン、ラミニン、ポリリジンが細胞の器底への接着に及ぼす効果を検討した。

凍結保存法の検討

外套膜から外面上皮細胞を分離し、凍結保護剤として DMSO（濃度 2M/BSS）を用い、 -2 /分で -75 まで緩慢凍結した後、液体窒素で凍結保存した。凍結 1 か月後に細胞を急速解凍し、BSS で洗浄した後、穴あき核を用い 1 万細胞/核で移植した。約 5 か月後に回収して真珠核表面を観察し、真珠層真珠、非真珠層真珠、白珠に区別して計数した。

培養細胞の移植

外套膜から外面上皮細胞を分離し、L15 培養液を用い 22 で培養した。培養には 24 ウェルプレートを用い、事前にアコヤガイ血球をウェルに植え込み血球シートを形成させたプレートも準備して培養に用いた。培養 2 週間および 4 週間後に培養細胞を回収し、穴あき核を用いて移植した。しかし血球シートの有無によらず回収できた細胞が少なかつたため、移植細胞数は 3 から 4 千細胞/核となった。約 5 か月後に真珠核を回収して真珠核表面を観察し、真珠層真珠、非真珠層真珠、白珠に区別して計数した。

濾胞状構造の形成条件と形態の検討

アコヤガイ外套膜から外面上皮細胞を分離し、それを分散した細胞塊を L15、TC199、GIT 培養液および BSS を用い 20 で最長 43 日間 24 穴プレートで培養した。そして細胞小塊から形成された濾胞数の変化を記録するとともに、濾胞の一部を 4% グルタルアル

デヒド、1% 四酸化オスミウムで固定し、樹脂包埋して顕微鏡レベルの組織構造を観察した。

(4) アコヤガイ貝殻真珠層からの黄色色素の抽出・精製

黄色色素の抽出

浜揚げされたアコヤガイ母貝のうち、黄色度の強いアコヤガイ貝殻の真珠層を黄色系貝殻真珠層、黄色度の極めて低い白色系統のアコヤガイの貝殻真珠層を白色系貝殻真珠層として実験に用いた。各貝殻の稜柱層をディスクグラインダーで完全に除去後、真珠層を粉末化した。黄色系および白色系貝殻真珠層粉末 100 g を 0.5 M EDTA (pH 8.0) で脱灰し、遠心分離により脱灰液 (F1) と残渣に分けた。残渣についてはさらに、90% アセトン抽出に供し、遠心分離により 90% アセトン抽出液 (F2) と残渣に分けた。残渣についてはさらに塩酸-メタノール (HCl-MeOH) 抽出に供し、遠心分離により HCl-MeOH 抽出液 (F3) と残渣に分けた。

黄色色素の分離・精製

黄色色素を含む F3 の液性を中性から塩基性に変化させたところ、黄色色素の沈殿化が認められた。そこで、黄色色素の沈殿化する条件について検討し、得られた沈殿を薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析に供し、黄色色素の分離・精製を試みた。黄色系貝殻真珠層から調製した F3 に対して水酸化ナトリウム (NaOH) 水溶液を添加し、pH 7.5 としたときに生じた沈殿 (P1) を遠心分離によって回収した。また、遠心分離後の上清に対して NaOH 水溶液を添加し、pH 11.5 としたときに生じた沈殿 (P2) を遠心分離によって回収した。さらに、F3 に対して NaOH 水溶液を添加し、pH 11.5 としたときに生じた沈殿 (PA) を遠心分離によって回収した。各沈殿を凍結乾燥後、HCl-MeOH に再溶解して TLC 分析に供した。なお、TLC にはセルロース担体を塗布したガラスプレートを用い、展開溶媒は HCl 飽和ブタノール (HCl-BuOH) 溶液とした。

(5) 黄色色素の化学分析

各種溶媒に対する溶解性

黄色色素沈殿 (PA) の凍結乾燥粉末に対し、各種溶媒を終濃度 1 mg/mL となるように添加した。なお、溶媒には塩酸濃度の異なる HCl-MeOH 溶液、HCl-エタノール (HCl-EtOH) 溶液および HCl 水溶液、10 N 酢酸-MeOH 溶液、0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) 含有および不含アセトン、0.1% TFA 含有および不含アセトニトリル、ジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。さらに、PA を 6N HCl で加水分解後、終濃度 1 mg/mL となるように各種溶媒を添加して溶解性を調べた。

光および熱に対する安定性

黄色色素沈殿 (PA) の凍結乾燥粉末を、終濃度 0.5 mg/mL となるように HCl-MeOH で再溶解し、室温、強光 (27,000 lx) 条件下または 40 °C、遮光条件下で 28 日間静置した。静置 1, 7, 14, 28 日後の色素溶液の吸収スペクトルを測定すると共に、色調変化を調べ

た。

化学構造解析

黄色色素の凍結乾燥粉末 P1 (主成分 E2) および P2 (主成分 E1) を 6 N HCl で加水分解後、高速液体クロマトグラフィーを用いたアミノ酸分析に供した。また黄色色素の化学構造を明らかにするために、黄色色素粉末 P1 および P2 につき、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量 (MALDI-TOF MS) 分析、走査型電子顕微鏡-エネルギー分散型 X 線 (SEM-XMA) 分析、顕微赤外分光 (FT-IR) 分析、レーザーラマン分光分析、固体核磁気共鳴 (NMR) 分析に供した。

(6) 黄色色素の産生に関わる遺伝子の単離・同定

黄色色素の産生に関わる遺伝子のスクリーニング

黄色系および白色系アコヤガイ外套膜から各外套膜の cDNA ライブラリーを構築した。各 cDNA ライブラリーと PCR-Select cDNA Subtraction Kit を用いて cDNA サブトラクション処理を行い、両 cDNA ライブラリー間で蓄積差のある遺伝子 cDNA プールを調製した。各 cDNA プールを挿入したプラスミドベクターで大腸菌を形質転換後、選択培地上に生育した大腸菌コロニーをランダムに選抜し、コロニー-PCR により挿入 cDNA を増幅した。増幅 cDNA をナイロンメンブレンに転写後、DIG 標識した cDNA プロブをハイブリダイズさせ、各 cDNA の発現解析を行った。

発現解析結果から、サブトラクション区に用いた cDNA ライブラリー間で蓄積差のある遺伝子 cDNA を特定し、それらの塩基配列を決定後、塩基配列データのアセンブルを行った。得られたコンティグ配列データから黄色色素の産生に関わる候補遺伝子を同定した。

候補遺伝子の発現解析

発現解析データと cDNA 塩基配列データを基に、10 種類の候補遺伝子を選択した。各候補遺伝子の発現解析には、リアルタイム PCR を用いた。解析試料として黄色系アコヤガイ (3 個体) および白色系アコヤガイ (2 個体) の外套膜からリアルタイム PCR 用 cDNA を合成し、各外套膜 cDNA を鋳型としたリアルタイム PCR により、各候補遺伝子の相対定量解析を行った。

4. 研究成果

(1) 外面上皮細胞の移植法の検討

注射による移植

試験終了時の生残個体数、脱核個体数は、各実験区間で差があるとは言えなかった。形成された真珠の表面を実体顕微鏡で観察し真珠層真珠、非真珠層真珠、白珠に区別した結果、 4.6×10^4 細胞を注射しザイモザンの有無が異なる 2 区では白珠の出現率に有意な差があり、ザイモザンを含む場合は白珠の出現率が低くなった (危険率 5%)。ザイモザンを含む注射液を用い細胞濃度を変えた場合、注射した細胞数が多くなるに従い真珠層真珠の出現率が有意に高くなり (危険率 1%) 46×10^4

細胞を注射した場合 60% が真珠層真珠であった。このように十分な数の外面上皮細胞を注射することで真珠が形成できることが明らかとなった。しかし 46×10^4 細胞を注射した区では、白珠が採取された 2 個体と脱核していた 1 個体の体内に微小な真珠層真珠 (ケシ真珠) が観察された。これは注射された細胞のうち真珠核と接触できなかった細胞が形成したと考えられ、効率的な真珠形成には細胞と真珠核が確実に接触することが重要と考えられた。

穴あき核による移植

試験終了時の生残個体数、脱核個体数には各実験区間で差があるとは言えなかった。採取された真珠の表面を顕微鏡観察し真珠層真珠、非真珠層真珠、白珠に区別した結果、ザイモザン 5mg/mL を含む BSS に細胞を懸濁させて移植した場合、移植細胞数が増加するに従い真珠層真珠の形成率が有意に高まり (危険率 1%)、 1.0×10^4 細胞/核を移植した場合 45% が真珠層真珠であった。一方、細胞懸濁液にザイモザン 5mg/mL とともにアコヤガイコラーゲンを濃度 1% で加えた場合、ザイモザンのみの場合と比較して同じ移植細胞数でも真珠層真珠の形成率が有意に低くなり (危険率 5%)、 1.0×10^4 細胞/核の場合真珠層真珠は 14% であった。以上のように注射による移植より穴あき核を用いたほうがはるかに少ない細胞数で真珠形成が可能であり、約 1 万細胞/核の移植で真珠形成が可能となった。

(2) 外面上皮細胞の混合移植

外套膜外面上皮細胞の分離に用いたアコヤガイの貝殻真珠層の黄色度 (YI) の平均値 ± 標準偏差は、黄色個体が 33.0 ± 6.6 、白色個体が 10.7 ± 5.7 となり、YI に有意な差が認められた (危険率 0.1%)。この差は目視による観察でも判別可能であった。実験の結果、脱核個体数、結晶形成の状況、シミの面積において、混合移植した各区間で有意な差があるとは言えなかった。また巻きの厚さは黄色個体と白色個体由来の外面上皮細胞の混合比を 2:1 とした区の平均値がやや高かったが、他の混合移植区と有意な差があるとは言えなかった。そしてシミの面積が少なく品質 A と評価された真珠層真珠の黄色度を測定したところ、黄色個体と白色個体由来の外面上皮細胞の混合比に応じて真珠黄色度が有意に変化し (危険率 5%)、黄色個体由来細胞の比率が高い区の真珠黄色度が高くなる傾向が認められた。特に黄色個体由来細胞と白色個体由来細胞の混合比を 2:1 とした区は、白色個体由来細胞のみの区より真珠黄色度が有意に高くなった (危険率 5%)。この黄色度の差は目視による観察でも判別可能であった。以上のように真珠層黄色色素産生能の異なる 2 種の細胞を混合すると混合比に応じて黄色度が変化したことは、真珠形成に関し異なる特徴を持つ外面上皮細胞を混合移植することで、両方の特徴を合わせ持つ真珠を

生産できる可能性を示しており興味深い。

(3) 外面上皮細胞の培養法の検討

培養液、培養基質の検討

検討した培養液および添加物では外面上皮細胞の増殖や培養器底への接着が促進されることはなく、細胞は浮遊した状態を続け、BSS、L15 ではやがて小細胞塊を形成した。基質コート済みプレートで培養した場合、ポリリジンのみで培養器底への接着が促進され、約 60% の細胞が器底に接着した。しかし増殖が促進されることは無かった。培養条件下での外面上皮細胞の増殖条件は明らかにできなかったが、今後生体での傷の治癒過程などをモデルとして、外面上皮細胞の増殖や伸展、遊走に関わる因子を検討する予定である。

凍結保存法の検討

凍結保存した外面上皮細胞は解凍後の生残率が低く、穴あき核を用いて 1 万細胞/核で移植した場合、真珠形成率は約 12% と低かった。凍結保護剤の種類や濃度を再検討し、凍結保存条件を改善する必要がある。

培養細胞の移植

移植約 5 か月後に真珠核を回収したところ、各区共に脱核した個体が 70 から 80% と多かった。血球シートを形成させた培養 4 週間目および 2 週間目の区では、真珠形成率は 10% 以下と低い、回収された真珠核のうち少数に真珠層の形成が認められた。以上のように少数ではあるが真珠が形成されたことは、培養条件下でも一部の外面上皮細胞は生残し、真珠形成能を維持していることを示すと考えられる。

濾胞状構造の形成条件と形態の検討

外面上皮細胞を培養すると小細胞塊が生じ、そこに濾胞が形成された。濾胞は主に 1 層から数層の外面上皮細胞で形成されていた。濾胞を形成する上皮細胞は極性を有し、一部を除き頂端側が培養液側を向いていた。濾胞は L15 培養液および BSS 中で多数形成されたが、119 や GIT 培養液中では形成数が少なく、培養液による差が認められた。以上のように培養条件下でも外面上皮細胞は上皮細胞としての極性を維持し、何らかの物質輸送機能を発揮していた。

(4) アコヤガイ貝殻真珠層からの黄色色素の抽出・精製

黄色色素の抽出

黄色系および白色系貝殻真珠層から調製した各抽出液および残渣を比較したところ、F3 において黄色度に顕著な差が認められたため、本画分に黄色色素が含まれていることが考えられた。黄色系貝殻真珠層から調製した F3 の吸収スペクトルを測定したところ、240~360 nm において複数の特異な吸収極大が認められた。

黄色色素の分離・精製

TLC 分析の結果、PA については 3 つの有色成分 (E1~E3) が分離され、黄色色素の主成分は E1 および E2 であること、E3 は非常に含量が低い成分であることが明らかとなった。

一方、P1 からは有色成分 E2、P2 からは有色成分 E1 が分離された。したがって、F3 の pH を変化させると主成分 E1 および E2 はそれぞれ、塩基性および中性条件下で沈殿すること、この特性を利用して両主要色素を分離できることが分かった。

(5) 黄色色素の化学分析

各種溶媒に対する溶解性

黄色色素の凍結乾燥粉末 (PA) の各種溶媒に対する溶解性を調べたところ、0.5 N 以上の HCl を含む水、MeOH または EtOH に対して可溶であったが、これら溶媒以外に対しては、不溶あるいは難溶であった。一方、PA の酸加水分解物の各種溶媒に対する溶解性を調べたところ、水溶性となった。

光および熱に対する安定性

黄色色素の凍結乾燥粉末 (PA) の HCl-MeOH 溶液は、強光に対して著しく不安定であり、14 日後に完全に退色した。一方、高温に対しては安定であり、28 日後においても黄色の色調を呈しており、吸収スペクトルの変化も認められなかった。

化学構造解析

黄色色素の凍結乾燥粉末 P1 (主成分 E2) および P2 (主成分 E1) の酸加水分解物についてアミノ酸分析を行ったところ、アミノ酸由来のピークは認められず、両色素の構成成分にアミノ酸が含まれないことが明らかとなった。各種構造解析の結果、黄色色素は従来の研究から予想されていた物質とは化学構造が大きく異なることが推察された。なお、SEM-XMA 分析および顕微 FT-IR 分析の結果から、主成分 E1 は C, O, Fe を主要構成元素とし、酸化鉄や水酸化鉄を主成分とする無機色素、主成分 E2 は C, N, O を主要構成元素とし、脂肪族 CH 結合やアミド結合などを含むポリアミドを主成分とする有機色素であることが考えられた。

(6) 黄色色素の産生に関わる遺伝子の単離・同定

黄色色素の産生に関わる遺伝子のスクリーニング

黄色系および白色系アコヤガイの外殻膜からそれぞれ PfY および PfW cDNA ライブラリーを作製し、両ライブラリー間で cDNA サブトラクション処理を行った。白色系アコヤガイ外殻膜と比較して黄色系アコヤガイ外殻膜で高発現している遺伝子 cDNA プールを PfY-FS、黄色系アコヤガイ外殻膜と比較して白色系アコヤガイ外殻膜で高発現している遺伝子 cDNA プールを PfY-RS とし、各 cDNA プールを各々プラスミドベクターにサブクローニング後、大腸菌を形質転換させた。PfY-FS については 960 個、PfY-RS については 576 個、cDNA が挿入されたプラスミドベクターを含む大腸菌コロニーを選抜し、各 cDNA のドットプロット解析により、サブトラクション区に用いた cDNA ライブラリー間で蓄積差のある遺伝子 cDNA、すなわち黄色色素産生に関わる約 600 種の候補遺伝子 cDNA を特定

した。

特定した cDNA の塩基配列を決定しアセンブルを行ったところ、約 260 種類の配列データが得られた。各配列データは約 100 種類に統合され、うち約 60 種類については既知遺伝子との類似性が認められた。

候補遺伝子の発現解析

黄色系および白色系アコヤガイ外套膜の間では、種々の nacre-like protein, mantle gene, protease inhibitor, glycoprotein, fibrinogen-like protein の他, hypothetical protein, unknown 遺伝子に発現差のあることが示唆された。そこで、4 種類の nacre-like protein 遺伝子、2 種類の mantle gene、2 種類の hypothetical protein 遺伝子、2 種類の unknown 遺伝子を候補遺伝子として選定し、発現定量解析を行った。その結果、3 種類の遺伝子 (nacre-like protein contig-23 および contig-38, mantle gene contig-2) については、黄色系アコヤガイ外套膜で高発現している傾向が認められたものの、発現には大きな個体差がみられた。黄色系外套膜で高発現していた 3 種類の候補遺伝子は、黄色色素の産生に直接あるいは間接的に関与していると考えられるが、外套膜細胞内における黄色色素の生合成から真珠層への分泌までの一連の機構を解明するためには、他の候補遺伝子の発現特性を明らかにすると共に、各遺伝子の細胞内機能解析を進めていく必要がある。

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 4 件)

淡路雅彦・山本貴志・柿沼 誠・永井清仁・渡部終五 アコヤガイ外套膜から分離した外面上皮細胞の移植による真珠形成。日本水産学会誌, 80: 印刷中(2014)
淡路雅彦 シンポジウム記録 外套膜外面上皮細胞の移植による真珠形成。日本水産学会誌, 80: 110 (2014)
柿沼 誠 シンポジウム記録 黄色系アコヤガイ真珠の色素とその特性。日本水産学会誌, 80: 108 (2014)

Masahiko Awaji・Akira Machii, Fundamental studies on in vivo and in vitro pearl formation- Contribution of outer epithelial cells of pearl oyster mantle and pearl sacs. Aqua-Bioscience Monographs, 4: 1-39 (2011), doi: 10.5047/absm.2011.00401.0001

[学会発表](計 8 件)

淡路雅彦 アコヤガイ外套膜外面上皮細胞が作る濾胞状構造の形態とその形成に培養液が及ぼす影響, 第 8 回バイオミネラルセッションワークショップ, 2013 年 11 月 30 日, 東京大学。

淡路雅彦 外套膜外面上皮細胞の移植による真珠形成((シンポジウム・真珠研究の最前線 - 真珠養殖技術の革新を目指し

て -), 平成 25 年度日本水産学会秋季大会, 2013 年 9 月 19 日, 三重大学。

柿沼 誠, 黄色系アコヤガイ真珠の色素とその性状(シンポジウム・真珠研究の最前線 - 真珠養殖技術の革新を目指して -), 平成 25 年度日本水産学会秋季大会, 2013 年 9 月 19 日, 三重大学。

三谷花代・前山 薫・服部文弘・永井清仁・淡路雅彦・渡部終五・幹 渉・柿沼 誠, アコヤガイ貝殻真珠層の黄色色素の性状と構造解析, 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 2013 年 3 月 27 日, 東京海洋大学。

淡路雅彦・山本貴志・永井清仁・柿沼 誠, アコヤガイ外套膜外面上皮細胞の移植による真珠形成法の検討, 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 2013 年 3 月 27 日, 東京海洋大学。

Kayo Mitani・Kaoru Maeyama・Fumihiro Hattori・Kiyohito Nagai・Shugo Watabe・Wataru Miki・Makoto Kakinuma, Extraction and characterization of a yellow pigment in the nacre of pearl oyster shells, The International Symposium on Pearl Research, 2011 年 10 月 5 日, 東京大学。

Masahiko Awaji, Primary culture of the outer epithelial cells of pearl oyster mantle, The International Symposium on Pearl Research, 2011 年 10 月 6 日, 東京大学。

三谷花代・前山 薫・服部文弘・永井清仁・渡部終五・幹 渉・柿沼 誠, アコヤガイ貝殻真珠層の黄色色素の性状, 平成 23 年度日本水産学会秋季大会, 2011 年 9 月 29 日, 長崎大学。

[図書](計 1 件)

Masahiko Awaji The outer epithelial cells of pearl oyster mantle - Morphology, functions, and primary culture methods. In Watabe S, Maeyama K, Nagasawa H eds, "Recent Advances in Pearl Research", 195-206 (2012)

[産業財産権] なし

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

淡路雅彦 (AWAJI, Masahiko)

独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所・グループ長

研究者番号: 20371825

(2) 研究分担者

柿沼 誠 (KAKINUMA, Makoto)

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号: 60303757

(3) 連携研究者

渡部終五 (WATABE, Shugo)

北里大学海洋生命科学部

研究者番号: 40111489