

令和元年5月20日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07842

研究課題名(和文) 低塩分飼育による真珠の「キズ・シミ」軽減メカニズムの解明

研究課題名(英文) Inference of low salinity to hemolymph hemagglutinin of the pearl oysters in post-operative care of the implantation

研究代表者

佐野 菜採 (Sano, Natsumi)

三重大学・生物資源学研究科・学術研究員

研究者番号：50636545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：真珠養殖の挿核後の「養生」期間に低塩分で飼育すると真珠のキズ・シミが軽減できることが知られている。そのメカニズムとして次の結果を得た。血リンパの凝集力価は挿核により上昇し、その上昇は低塩分飼育により抑制された。アコヤガイのレクチンに対する特異抗体により凝集阻害が認められ、凝集力価はこれらのレクチンによるものであると考えられた。特異抗体による解析の結果、挿核後にレクチン産生血球の割合が増加することが明らかになった。また、血球中のガレクチンの転写量は低塩分飼育により減少した。よって、レクチン産生が抑制されることが「低塩分養生」によるキズ・シミ軽減のメカニズムのひとつであると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、挿核に対する生体防御の反応をコントロールすることで真珠の品質を向上させられる可能性が示唆された。真珠産業は漁場の環境悪化や人手不足により厳しい状況にある。効率よく高品質の真珠が生産できるようになれば、それらの改善につながり、日本が誇る産業のひとつである真珠養殖の振興に寄与できる。一方、学術的には無脊椎動物の生体防御で重要な役目を果たしているレクチンに関して、近年、二枚貝でも遺伝子レベルではそれらの存在や刺激で転写が上昇する等は解明されているが、タンパク質や細胞レベルでの研究は少なく、本研究の結果は新規性の高いものであり、今後のこの分野の研究に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Pearl deformities and blemishes can be alleviated by holding Akoya pearl oyster *Pinctada fucata* in low salinity seawater during the post-operative period just after implanting a pearl nucleus. To reveal the mechanisms, we first investigated effect of low salinity rearing on hemagglutination (HA) activity mostly due to lectins in hemolymph as an innate immune response. HA raised after nucleus implantation and decreased at salinity of 25 psu. Next, we investigated gene expression of Pogal, a galactose specific lectin of the pearl oyster. Downregulation of Pogal was observed in operated and unoperated oyster reared at 25 psu. Additionally, we gained anti-pearl oyster lectins antibodies, and carried out FACS analysis of hemocytes using these antibodies. The ratio of lectin-positive hemocytes increased after the implantation. The results suggest that one of the mechanisms of the alleviation in low salinity rearing can be downregulation of lectins in hemocytes.

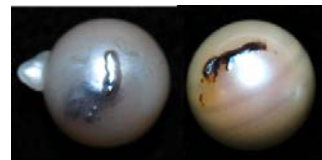
研究分野：水圏資源生物学

キーワード：真珠養殖 アコヤガイ レクチン 血リンパ 血球 凝集反応 pearl oyster hemagglutination

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1)真珠の表面の凹凸であるキズや、真珠層への有機質の沈着であるシミは真珠の商品価値を無くす。近年、アコヤガイを挿核手術（真珠核と他個体の外套膜片を母貝の生殖巣に挿入すること）後の養生と呼ばれる手術からの回復期間に低塩分海水で飼育すると、キズ・シミ珠の出現率が軽減されることが明らかに



キズ・シミ珠

なり、「低塩分養生」として、三重県水産研究所でその普及が進められている。しかし、そのメカニズムは明らかでは無かった。

(2) 養生期間中に、挿入された外套膜片が真珠核の周囲に伸展し真珠袋を形成する。キズ・シミ形成の原因のとして、真珠袋形成時の生体防御反応による炎症が関連していることが推察されてきた。無脊椎動物である二枚貝には、脊椎動物のようなリンパ球と抗体を中心とした免疫システムが存在しておらず、血球による貪食作用、包囲化、またレクチンやリゾチームなどの液性因子が生体防御反応の中心となっていると考えられている。アコヤガイにもこれらの因子が存在することが報告されている。

2. 研究の目的

「低塩分養生」によるキズ・シミ軽減のメカニズムを明らかにすることが本研究の目的である。生体防御能の指標としてアコヤガイ血リンパのヒツジ赤血球に対する凝集力価（レクチン活性）を測定するという予備実験の結果、レクチン活性がキズ・シミの軽減に関与していることが推察された。そこで、本研究では「低塩分養生」をより適正に行えるようにするために、キズ・シミ形成とレクチンの関連に注目し、この養生方法による真珠の「キズ・シミ」軽減のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)「低塩分養生」のアコヤガイ血リンパの凝集力価および血球におけるレクチン遺伝子転写量への影響

- ・アコヤガイ血リンパの凝集力価をヒツジ赤血球を使って測定した。
- ・アコヤガイのレクチンであるガレクチン（遺伝氏名 *Pogal*）の血球中および中腸腺の RNA 転写量をリアルタイム PCR で測定した。
- ・ガレクチンの遺伝子配列から RNA を合成し、アコヤガイに接種し RNA 干渉を試みた。

(2)アコヤガイレクチンに対する抗体によるアコヤガイ血球の解析

・アコヤガイで報告されている 2 種のレクチンの遺伝子配列から予想されるペプチドに対してウサギ抗血清を作成し、ペプチドカラムにより精製した。

・これらの抗体を用いてアコヤ血球を 2 重染色しフローサイトメーターによる解析を行い、「養生」および挿核前の真珠養殖の工程である「仕立て」の影響を調べた。

・アコヤガイ血リンパの中で凝集力価を示す物質の精製をムチンを結合させたカラムにより行った。

4. 研究成果

(1)挿核したアコヤガイを従来の養生方法である海上筏、陸上水槽で通常海水と同じ塩分 33 および低塩分である塩分 25 の 3 区で飼育した。挿核後 4 日、8 日に血リンパを採取し、凝集力価を測定した。その結果、凝集力価は従来法では上昇するが、陸上飼育では 8 日後に減少に転じた（図 1）。この結果から、陸上飼育の影響はあるものの、「低塩分養生」により挿核の刺激で上昇したアコヤガイ血リンパ中の凝集力が抑制されることが明らかになった。

(2)(1)と同様の試験系でガレクチンの転写量を定量した結果、8日後の血球中の転写量は挿核した海上筏区で塩分 25 の挿核区および未挿核区より高い値を示した(図2)。このような傾向は中腸線では認められなかった。つまり、「低塩分養生」により抑制されているガレクチンの活性はアコヤガイの血球中で発現していることが推定された。

(3)(2)の結果を受けて、ガレクチンを RNA 干渉し、真珠のキズ・シミへの関与を証明しようとした。

ガレクチンの遺伝子配列に相補的な約 400bp の 2 種類の二本鎖 RNA を作成した。これらを実験系に接種し、経時的に血球中のガレクチンの転写量を測定したが、コントロールとの差は認められなかった。接種濃度等を詳細に検討する必要があると考えられた。

(4)アコヤガイのレクチンとして報告されているガレクチンおよび F type レクチンに特異的な抗体を作成し、アコヤガイ血リンパに対するウエスタンブロット、血球の蛍光染色を行い、これらの抗体も特異性を確認した。さらに、両抗体によるアコヤガイ血リンパの凝集力価の阻害試験を行った。その結果、阻害が認められ、ヒツジ赤血球を凝集している物質がレクチンであることが明らかになった。

(5)(1),(2)と同様の実験区を設定した。採取した血球を 2 種レクチンのそれぞれに特異的な抗体で二重染色し、フローサイトメトリーにより解析し、両レクチン産生血球数の割合を算定した。また、通常真珠養殖では挿核前に「仕立て」を行うため、対象として「仕立て」を行っていない貝も解析した。両レクチンの転写量も測定した。両レクチンともに陽性血球率は挿核前に比べ 4 日後に増加し、8 日後には減少していた。

また、「仕立て」をしていない貝では「仕立て」をした貝より産生細胞数が顕著に多かった。これらの結果から、「仕立て」によりレクチン産生血球は減少し、養生期間に入ると増加することが示唆された。

(6)アコヤガイ血リンパのヒツジ赤血球に対する凝集力価はムチンで強く阻害される。ムチンを固定化したゲルを用いて凝集素を分離した。分離された赤血球凝集素の SDS-PAGE を行なった結果、分子量は約 250kDa であり、そのバンドの質量解析を行った結果、アコヤガイゲノムアセンブリ(ver. 2.0)の 1 つのタンパクに同定され、fibronectin3, kringle domain および lipocalin の構造を持っていた。アコヤガイにはレクチン以外にも凝集活性を示す物質がある可能性が示唆された。今後、詳細な検討が必要であろう。

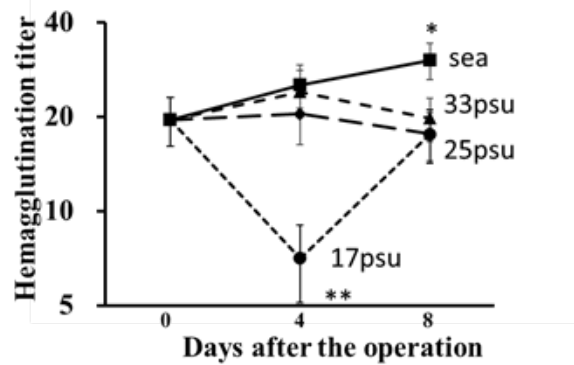


図1 養生中の凝集力価

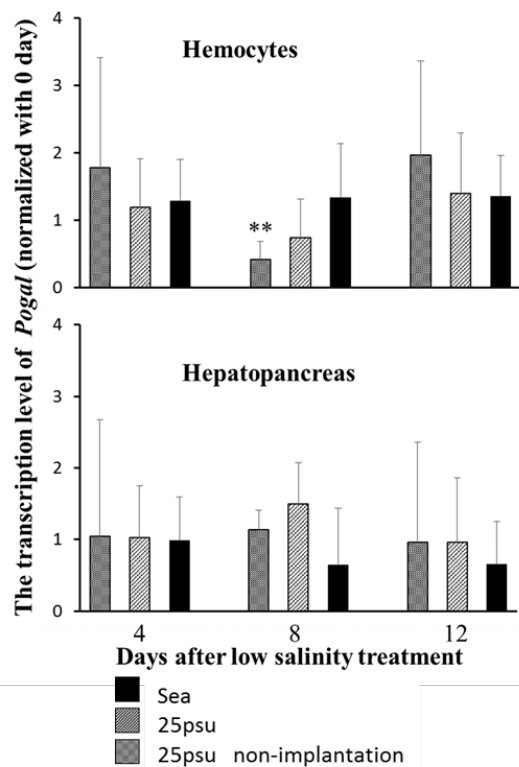


図2 養生中のレクチンの転写量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

① Natsumi Sano, Takashi Atsumi, Shinji Tanaka & Akira Komaru (2017)

Hemolymph haemagglutination activity of pearl oysters *Pinctada fucata* in post-operative care. *Aquaculture Research* 48, 5690-5692. doi/full/10.1111/are.13370 (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

① 佐野菜採・栗山功・田中真二・古丸明

真珠養殖の行程「養生」期間のアコヤガイ血球でのガレクチンとF type レクチンの発現
平成31年度日本水産学会春季大会 2019年3月26日～29日、会場：東京海洋大学品川キャンパス(東京都港区)

② Natsumi Sano, Takashi Atsumi, Shinji Tanaka & Akira Komaru

Influence of low-salinity post-operative care on hemagglutination in the hemolymph of akoya pearl oyster *Pinctada fucata*.

Asian-Pacific Aquaculture 2018年4月23日～2018年4月26日 Taipei International Convention Center (Taipei, Taiwan)

③ Natsumi Sano, Takashi Atsumi, Shinji Tanaka & Akira Komaru

Hemolymph hemagglutinin of pearl oysters *Pinctada fucata* involved in postoperative care of the implantation. 12th Japan-Korea, Korea-Japan symposium on Aquaculture
2016年11月3日～2016年11月5日 三重大学(三重県津市)

④ 佐野菜採・渥美貴史・田中真二・古丸明

真珠のキズ・シミに関連するアコヤガイ血リンパ中の赤血球凝集素

日本比較免疫学会第28回学術集会 2016年08月18日～2016年08月20日 東京医科歯科大学(東京都文京区)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：古丸 明

ローマ字氏名：(Komaru, Akira)

所属研究機関名：三重大学

部局名：生物資源学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：10293804

(2)研究協力者

研究協力者氏名：田中 真二

ローマ字氏名：(Tanaka, Shinji)

研究協力者氏名：栗山 功

ローマ字氏名：(Kuriyama, Isao)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。