

ナマコの卵成長段階を判定する分子指標の探索

北海道大学大学院水産科学研究院 准教授
浦 和寛
修士 2 年 西川奈歩

【本研究事業の概要と目的】

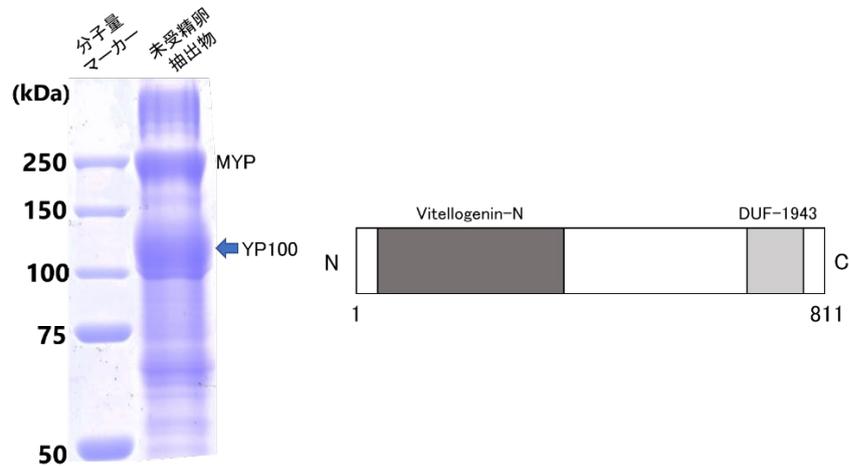
近年、中国の経済発展に伴い中国への乾燥ナマコの輸出量は増加している。北海道各地でナマコの漁獲量は増加している。そのため資源量維持と漁獲量増大のため種苗生産技術の開発が行われ、2008 年ナマコの産卵誘発物質「クビフリン」が発見され、これまでの採卵・採精方法に比べてクビフリンを投与することにより、精子・卵が簡便に採取可能となった。現在では、クビフリンは大量生産され、北海道を含め日本各地の種苗生産現場で使用されている。しかし現場では、十分に卵が成長していない雌ナマコにクビフリンを投与し採卵に失敗することが頻繁に起きている。つまり、クビフリンを投与するタイミングが厳密に判定出来ないためである。魚類を含む卵生動物では、卵中に主要卵黄タンパク質（ビテロジェニン：VTG）が存在することが明らかにされている。魚類では、VTG は肝臓で合成され血中に分泌され成長している卵母細胞に取り込まれることから卵の成長状態を血中 VTG 量の定量により簡便に判定できる技術が開発されている。一方、ナマコの卵中に VTG が存在するかは未だ明らかにされていない。本研究は、雌ナマコの卵の成長段階を判定する技術開発を最終目標とし、雌ナマコの生殖巣において卵の成長段階を厳密に判定できる生物分子指標を探索する。また、特定できた分子に対する特異抗体を作製し、ナマコの体腔液（血液）や粘液における局在および卵成長に伴う量的変化を解析し、種苗生産現場で使用できる簡便な成熟度判定技術開発に向けた基礎的知見の集積を目的とする。

1. 雌ナマコの卵成長の指標となる分子マーカーの探索

【結果】

マナマコ未受精卵抽出物を用いた SDS-PAGE 解析の結果、これまでに同定されているマナマコ MYP のタンパク質バンドおよび MYP より多く卵に蓄積されていると予想される分子質量約 100kDa のタンパク質バンドが認められた（図 1）。本研究では、この分子質量約 100kDa のタンパク質を YP100 と命名した（図 1 矢印）。この YP100 のタンパク質を同定するためゲルからタンパク質バンドを切り出し抽出し、LC/MS/MS 解析により 25 種類のタンパク質断片のアミノ酸配列を決定した。この決定したアミノ酸配列の相同性検索の結果、マナマコと同じ棘皮動物であるヒトデの VTG 様タンパク質との相同性が高かった。このことから、YP100 は、マナマコの VTG 様タンパク質である可能性が示された。次に、マナマコ雌生殖巣から抽出した総 RNA を使用し、次世代シーケンサーを用いて cDNA ライブラリーを作製した。作製したライブラリーを用いて、上記 25 種類のタンパク質アミノ酸配列との相同性検索（tblastn）を行い、YP100 をコードする遺伝子配列を得た。得られた遺伝子配列をもとに PCR 法により全長 cDNA をクローニングした。その結果、開始コドンから停止コドンまで 2436bp の塩基配列を取得し、この塩基配列は、811 残基のアミノ酸配列をコードしている

ことが明らかになった。また、このアミノ酸配列から推定される分子量は、91,238 であり、YP100 と近い分子量であった。得られたアミノ酸配列からモチーフ検索を行った結果、VTG が持つ Vitellogenin-N ドメインおよび DUF1943 ドメインを有していることが明らかになった (図 2)。これらの結果から、YP100 は、マナマコの VTG 様タンパク質で、マナマコ未受精卵に最も多く蓄積されているタンパク質である可能性が示された。また、分子量の差異は、YP100 が他の生物種の VTG と同様に糖や脂質を結合していることによると予測された。

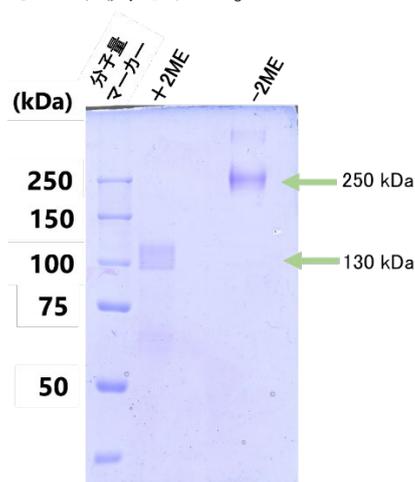


(図 1) マナマコ未受精卵抽出物の SDS-PAGE 像 (図 2) YP100 のドメイン構造

2. YP100 の精製および抗体の作製

【結果】

精製の結果、YP100 のゲル濾過クロマトグラフィーより推定される分子質量は約 790kDa であった。精製 YP100 を還元および非還元条件下で SDS-PAGE に供した結果、還元条件下では、約 130kDa の位置にタンパク質バンドが認められた。非還元条件下では、約 250kDa の位置にタンパク質バンドが認められた (図 3)。このことから、YP100 は、約 130kDa のタンパク質がジスフィルド結合をもつ 6 量体により構成されていると予測された。

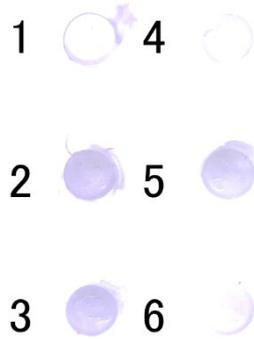


(図 3) 精製 YP100 の還元・非還元条件下での SDS-PAGE 像

3. 雌マナマコにおける卵成長段階の判定方法の検討

【結果】

YP100 の抗体を用いた雌マナマコ体腔液のドットブロット解析像を図 4 に示す。未熟雌 3 個体の内、1 個体陽性反応が認められた（個体番号 5）。卵母細胞がある程度成長した雌個体 3 個体の内、2 個体が強い陽性反応が認められた（個体番号 2, 3）。卵母細胞がある程度成長した 3 個体中 2 個体に強い陽性反応が認められたことから、YP100 は、卵の成長段階を判定する生物指標として用いることが可能と思われる。しかし、未熟と判別した個体で 1 個体に陽性反応が認められたことから、生殖巣の切片を作製後に卵母細胞の直径を計測し、各個体の体腔液をサンプルとして使用したが個体の取り扱いを間違った可能性がある。



(図 4) 卵母細胞がある程度成長した個体 (1-3) および未熟個体 (4-6) の体腔液を用いたドットブロット解析

【まとめ】

マナマコの未受精卵に VTG 様タンパク質が蓄積されていることを初めて明らかにした。また、このタンパク質は体腔液中にもあり、雌マナマコの卵成長段階を判定する生物指標として使用できる可能性が本研究で示された。今後は、多くの個体を用いた解析の必要性が残された。さらに、クビフリンを打つタイミングを厳密に判定するために、VTG 様タンパク質の高感度定量系の開発が必要と思われる。