

学 位 論 文 題 名

棘皮動物幼生の変態誘起物質

学位論文内容の要旨

海に生活する多くの無脊椎動物は受精後浮遊型幼生となり、変態して成体となる。底棲の無脊椎動物は特に成体期の行動範囲が限定されるため、浮遊型幼生の間に成体で生活する場所を選択することは重要である。その際に底質や化学物質を認識し定着・変態することが示唆されている。ウニは磯焼け地域に密集していることが知られており、ナマコも泥中の有機物を捕食するなど沿岸生態系において重要な位置を占めている。一方、北海道沿岸に生息しているウニ(エゾバフンウニ *Strongylocentrotus intermedius* およびキタムラサキウニ *S. nudus*) は漁業的な価値があることから種苗生産事業が行われている。種苗生産の現場では経験的に緑藻アワビモ *Ulrella lens* を用いてウニ幼生を変態させているが、実際なぜ変態するのかは解明されていない。また、ナマコ幼生変態に関する報告は少なく、付着珪藻や緑藻アワビモによる変態誘起現象が報告されている程度で、物質レベルでの報告はまだない。ナマコは近年中国での需要の増加から日本国内でのナマコ種苗生産事業が進められている。しかし、ウニ種苗生産ほど技術が確立されてはおらず、生活史の解明は重要である。そこで、本研究では棘皮動物のウニおよびナマコ幼生の変態機構の基礎的な知見を得るため、変態誘起物質の探索およびその作用について検討した。

第1章では、マナマコ *Apostichopus japonicus* 幼生の変態誘起物質の探索およびその作用について述べた。マナマコドリオラリア幼生を用いて45種類の生理活性物質の効果を検討した結果、ドーパミン、L-DOPA、L-アドレナリン、L-ノルアドレナリンの4種の化合物に変態誘起活性が認められた。どの化合物でも24時間後には管足が出現し、60時間後から変態個体が出現し始めた。120時間後には10 μ Mの濃度でドーパミンは96%、L-DOPAは98%の幼生の変態を完了させたが、L-アドレナリンは23%、L-ノルアドレナリンは25%の個体しか変態しなかった。ドリオラリア幼生は、24時間以上ドーパミンに曝露されていれば、その後新鮮海水に移しても96時間後に変態を完了した。これらの化合物は幼生に管足の出現を誘起していることが示唆された。次に、ドーパミン受容体のアゴニストおよびアンタゴニストの効果を検討した。まず、D1様受容体アゴニスト(SKf 77434)およびD2様受容体アゴニスト((-)-quinpirole)ともに幼生の変化はなかった。一方、2種のD1様受容体アンタゴニスト(SKf 83566、LE300)は10 μ Mでドーパミンによる変態を阻害したが、D2様受容体アンタゴニスト(sulpiride、nemonapride)は10 μ Mで阻害しなかった。以上より、これらのD1様受容体アンタゴニスト(SKf 83566、LE300)に結合する受容体の存在が示唆された。しかし、これらのアゴニストおよびアンタゴニストは哺乳類の受容体のものなので、マナマコのドーパミン受容体を検討する必要がある。

第2章では、緑藻アワビモ *U. lens* 水抽出物および培養海水からのウニ幼生変態誘起物質の探索に

ついて述べた。水抽出物を得るために緑藻アワビモを付着しているプラスチック板（波板）からはがしホモジナイズ・遠心後、上清を ODS カラムクロマトグラフィーに付した。20 % メタノール溶出画分に活性が認められたので C30 カラムおよび Phenylhexyl カラムを用いて HPLC で分離したところ、1 $\mu\text{g/mL}$ でウニ幼生の変態を誘起する画分が得られた。 $^1\text{H NMR}$ の解析と HPLC による標品との比較から、活性物質をフェニルアラニンと同定した。しかし、水抽出物のアミノ酸分析によりアワビモから変態誘起に必要な十分なフェニルアラニンの分泌はされていないことが示唆された。そのため、フェニルアラニンのみで変態が誘起されるのではなく、他の物質の関与もあってウニ幼生の変態が誘起されることが示唆された。そこで、アワビモ培養海水から変態誘起物質の探索を試みた。アワビモ培養水槽の海水を合成吸着剤アンバーライト XAD-4 樹脂に吸着させ、メタノール溶出部を ODS カラムクロマトグラフィーおよび C18 カラムを用いた逆相 HPLC に付し、3 $\mu\text{g/mL}$ で変態を誘起する画分を得た。この画分の作用は、6 時間程度で変態が完了すること、ウニ原基の積極的な外部への進出の促進が認められたことから、アワビモによる変態誘起作用に非常に近い。

第 3 章では、ウニ幼生に対するフェニルアラニンの作用に加えて各種生理活性物質の作用を述べた。フェニルアラニンの変態誘起作用は、幼生の組織の退縮が先に進み、それからウニ原基が消極的に外反して変態が完了する。フェニルアラニンによる変態完了には 24 時間ほど必要であり、最小有効濃度は 3 μM であった。フェニルアラニンに 1 時間程度曝露すれば、その後新鮮海水に移しても 24 時間後に変態を完了した。また、ヒスチジン、アルギニン、リシン、システインに変態誘起活性が 3-10 μM の濃度で観察された。これら 4 種のアミノ酸は幼生の組織を残しつつウニ原基の外反が観察されたことから、フェニルアラニンとは違うシグナル伝達経路を経ている可能性が示唆された。さらに、ヒスタミンには 10 μM の濃度で管足の出現のみ誘起する活性がみられた。既に報告のあるドーパミンやジプロモメタンを含めて整理すると、幼生の腕の組織の退縮を誘導するもの（フェニルアラニン、ドーパミン）、数時間でウニ原基の出現を誘導するもの（*Ulvelia* 培養海水、ジプロモメタン）、1 日から 2 日ほどでウニ原基の出現を誘導するもの（ヒスチジン、アルギニン、リシン、システイン）、管足の出現を誘導するもの（ヒスタミン）など化合物によって変態様式が違ふことが明らかとなった。

第 4 章では、本研究結果を総括した。本研究はウニ種苗生産現場で幼生の変態誘起に用いられる緑藻アワビモから変態誘起物質を 3 種同定した。特にフェニルアラニンに関しては他のアミノ酸、生理活性物質による変態誘起と比較し、ウニ幼生の変態には様々なシグナルが存在することが示唆された。これらのことから、ウニ幼生の変態にはこれまで報告されている化合物も含めいくつかの要素が複合的に作用していると考えられるが、その解明につながるものが期待される。ナマコ幼生には 4 種の神経伝達物質が変態を誘起することが示され、ナマコ幼生の変態にも化学物質の関与が明らかとなった。今後はナマコの変態機構解明だけでなく、棘皮動物幼生の変態機構の解明につながるものが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 准教授 沖 野 龍 文

副 査 教 授 田 中 俊 逸

副 査 教 授 上 田 宏

副 査 教 授 松 田 冬 彦

副 査 客員研究員 矢 崎 育 子 (首都大学東京大学院

理工学研究科)

学 位 論 文 題 名

棘皮動物幼生の変態誘起物質

棘皮動物は、海藻群落が衰退して植食動物であるウニが集まって食圧をかけることにより衰退した状態が持続する磯焼けや、近年北海道沿岸でみられるヒトデの大量発生などにみられるように沿岸の環境問題に関わっている。これら棘皮動物の生息にあたっては、浮遊型幼生から行動範囲が限定される底棲の成体期へ移る時に、成体で生活する場所を選択して着底・変態する現象が成功するかどうか鍵を握っている。海洋無脊椎動物では、浮遊型幼生が着底・変態する際に着底基質や化学物質を認識することが知られている。本研究では、北海道沿岸に生息し、漁業的価値も高いウニ（エゾバフンウニ *Strongylocentrotus intermedius* およびキタムラサキウニ *S. nudus*）とナマコ（マナマコ *Apostichopus japonicus*）に着目して、変態誘起物質の探索およびその作用を検討した。

まず、マナマコ *Apostichopus japonicus* の幼生に関してはこれまでほとんど研究されていなかった。わずかに、緑藻 *Ulva lens* や付着珪藻が変態を誘起するのみで、その要因は明らかにされておらず、化学物質に関する報告はまったくない。そこで、45種類に及ぶ生理活性物質のドリオラリア幼生に対する効果を網羅的に検討した結果、ドーパミンとL-DOPAに5 μ Mでも強い変態誘起活性が見出された。また、L-アドレナリン、L-ノルアドレナリンにも弱い活性が見出された。ドリオラリア幼生に約24時間暴露していれば、ほぼペンタクチュラ幼生に変態し、その後新鮮海水に移しても96時間後には変態を完了し幼体に変化した。さらに、哺乳類のドーパミン受容体に対するアンタゴニストを用いた実験により、哺乳類のD1様受容体に近い受容体を介して作用することも明らかにした。これらの結果は、マナマコの変態に関与する化学物質について初めて明らかにしたものである。マナマコの種苗生産においては、産卵のコントロール、変態率の向上など課題が山積している。種苗生産の現場からも注目されており、本研究は実用的にも期待されている。

次に、ウニ幼生の変態を誘起する物質を探索した。ウニは、これまで多くの研究者が研究してきた。しかし、実際の海でどのようなことが起きているかは明快に説明されているとは言い難い。種苗生産の現場でも緑藻 *Ulva lens* によって変態が短時間に誘起されるが、このメカニズムははっきりしていない。そこで、*U. lens* から変態誘起物質を単離することを目的とした。まず、*U. lens* の水抽出物を検討したところ、フェニルアラニンが $3\ \mu\text{M}$ で幼生の変態を誘起することが明らかとなった。そこで、他のアミノ酸も調べたところ、フェニルアラニンは幼生の腕の組織の退縮を誘導し、ヒスチジン、アルギニン、リシン、システインは1、2日かけてウニ原基の出現を誘導するが、*U. lens* によって数時間でウニ原基の出現を誘導する現象とは異なることがわかった。そこで、*U. lens* の培養水槽から海水のみ取り出し、*U. lens* から分泌された化学物質について調べた。未精製の培養海水でも数時間でウニ原基の出現を誘導することがわかったので、精製を進めたところ、 $3\ \mu\text{g/mL}$ でウニ幼生の変態を誘起する画分が得られた。この画分の主成分はNMRやMSによりある種のポリマーであると同定された。このポリマーが真の活性物質であるか、この画分に含まれる微量物質が活性物質であるかなどの検討が必要ではあるものの、*U. lens* が分泌した物質から海藻そのものと同じような活性を見出したことは画期的である。従前の研究で多くの化学物質が報告されてきたが、それらは確かに幼生を変態させるものの、*U. lens* によって変態させられる状態とはその過程が異なるものばかりであった。この知見を活かして、本研究により得られた画分から真の活性物質を明らかにすることが将来的に可能と思われ、*U. lens* に含まれる真の変態誘起物質を解明することができると期待される。

以上の通り、申請者は棘皮動物幼生の変態を誘起する化学物質について新知見を得たものであり、沿岸海域における海洋無脊椎動物の生態を理解することに対して貢献する

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。