

学位論文題名

クロアワビ *Haliotis discus discus* における
消化酵素の特性と微生物の初期餌料効果に関する研究

学位論文内容の要旨

日本における大型アワビ類の漁獲量は 1970 年以降減少している。現在では種苗の安定的生産が可能になり、各地の漁場に積極的に放流されてきたが、クロアワビ資源の漁獲量は年間 2,000 トン前後の低水準にとどまっている。放流種苗が大きく減耗する要因は食害、飢餓および低水温などいくつか考えられるが、特に幼生・稚貝期での餌不足は、後の生残に大きな影響を及ぼすと考えられ、食性が変化する時期に適切な餌料がないと死亡しやすいと考えられている。そのため、天然の生息場における稚貝の餌料とその栄養生理について明らかにすることは、アワビ類の初期減耗の実態とその機構を明らかにするのに必要不可欠である。本研究ではクロアワビの幼生・稚貝期の消化生理の解明を目的として、クロアワビの消化盲嚢における消化酵素の多様性並びに成長初期段階における消化能の発達過程を生化学的および分子生物学的方法を用いて調べた。また、着底稚貝においてアルギン酸リアーゼ遺伝子の発現が予想以上に早い段階で生じていることを見出したため、初期餌料としてのバイオフィーム形成細菌の効果も検討した。

第一章では、アワビ類の消化生理研究に必要な、同一個体における消化酵素活性の経時変化や消化管内細菌群集の変動を解明する上で必要となる、非致死かつリアルタイムな消化管内容液 (DF) 採取方法を開発した。また、この方法を用い、DF に含まれる消化酵素の多様性解析を行い、その中でも強い全活性を有するアルギン酸リアーゼ、セルラーゼおよび β -1,4-マンナーゼの精製とそれらの酵素学的性状解析を行った。

第一節では、非致死な DF 採取法を、採取位置を綿密に検討しながら開発した。この方法で採取した DF の消化酵素比活性は従来法で調製した試料の比活性と比べ高かった。また、生菌数は従来法よりも少なく、消化液中の細菌叢のみを反映していたことから、DF はアワビ類の消化能を研究するための材料に適し、消化管全体の細菌叢の指標に成り得る

ものと考えられた。

第二節では、クロアワビの消化酵素の多様性を定量的に測定した。クロアワビの DF および消化盲嚢ホモジネート (DH) から脂質, タンパク質, および糖質の代謝に関与する酵素活性が検出され, 中でもアルギン酸リアーゼ, セルラーゼおよび β -1,4-マンナーゼの活性が高かった。これらの結果は, クロアワビの海藻に対する嗜好性と一致していた。次にクロアワビのアルギン酸リアーゼ, セルラーゼおよび β -1,4-マンナーゼを単離精製した。このアルギン酸リアーゼとセルラーゼの酵素化学的特性は, エゾアワビのものと類似していたが, その β -1,4-マンナーゼはエゾアワビのものとは異なる性質を示した。

第二章では, クロアワビ由来の主要な多糖分解酵素遺伝子の塩基配列を決定し, それらの遺伝子の発現をクロアワビの成長段階ごとに調べることにより, アワビ自身の消化能の発達過程を検討した。これにより, アワビ類の幼生~稚貝期における消化機構の発達に関する新知見を得ることを目的とした。

第一節では, クロアワビ消化盲嚢から調製した mRNA を鋳型としアルギン酸リアーゼ, セルラーゼおよび β -1,4-マンナーゼの遺伝子をクローニングし, その塩基配列を決定し, それらの演繹アミノ酸配列を明らかにした。また, いずれのアミノ酸配列においてもエゾアワビ由来の各アミノ酸配列との同一性が 97%以上と高かった。

第二節では, 得られた塩基配列を利用しクロアワビの幼生・稚貝期における消化酵素遺伝子の発現動態を解析した結果, 発現が早い順に, キモトリプシン様プロテアーゼ (殻長 0.54 mm) >アルギン酸リアーゼ (殻長 1 mm) >アミラーゼ (殻長 1.26 mm) >セルラーゼ・ β -1,4-マンナーゼ (殻長 1.5 mm) であった。キモトリプシン様プロテアーゼは着底直後からその遺伝子発現が観察されたことから, 卵黄吸収直後の着底稚貝はタンパク質代謝が活発であることを示すものと考えられた。また, 海藻摂餌時期の一か月以上前からアルギン酸リアーゼの発現が開始されることが明らかになったことは, アルギン酸リアーゼがその他の多糖分解酵素に比べ, 幼生・稚貝期のクロアワビにとってより重要な役割を担っている可能性を示すものである。

以上の結果から, クロアワビ自身の有する酵素遺伝子の発現動態解析が可能になり, 消化管微生物との協調的役割に関する比較研究が可能になるものと考えられる。これにより, 従来の研究では明確にできなかったクロアワビ自身が産生する消化酵素と消化管内微生物が協同するクロアワビの消化機構の形成過程を詳細に捉えられるようになる。

第三章では、殻長 1 mm の着底稚貝でアルギン酸リアーゼ遺伝子の発現が観察された理由を明らかにするために、クロアワビ生息環境である岩礁表面に生息するバイオフィーム形成細菌に焦点を当て、この中に菌体外多糖としてアルギン酸を産生する細菌が存在するか否かを検討した。また、その細菌のクロアワビに対する餌料効果を検討した。さらに、その細菌の性状を明らかにするとともに、菌体外多糖 (EPS) 産生に及ぼす培養条件を検討した。

クロアワビの生息環境等から分離した 72 株の中から 7 株のバイオフィーム形成細菌を分離した。その 7 株の中で、クロアワビ着底稚貝の成長および生残性に効果を示したのは 2 株見いだされた。この中で AIB03 株の EPS を赤外分光分析および酵素分析したところアルギン酸である可能性が示唆された。また、本株は *Agarivorans* 属に属し、5%スクロースを添加した 1/2 ZoBell 2216E 培地において 20°C で 200 rpm の速度で振盪しながら培養することで、菌体当たりの EPS 産生量が向上することが明らかになった。

暖流系アワビ類について、近年研究が目覚ましく進展し、初期生態が明らかになりつつあるが、まだ初期減耗要因を特定し、初期減耗の改善を目的とした種苗放流技術の開発には至っていない。本研究でクロアワビ初期成長段階における主要な消化酵素遺伝子の発現動態を明らかにし、幼生・稚貝期の生息環境から餌料となるバイオフィームの存在を初めて明らかにすることができたが、今後、本研究で得られた知見を基にクロアワビの減耗要因の解明並びにアワビ類資源の増大を目指した研究を展開する必要がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 澤 辺 智 雄
副 査 教 授 吉 水 守
副 査 教 授 尾 島 孝 男
副 査 准教授 中 川 聡
副 査 場 長 青 野 英 明 (宮古栽培漁場センター)

学 位 論 文 題 名

クロアワビ *Haliotis discus discus* における 消化酵素の特性と微生物の初期餌料効果に関する研究

我が国において、クロアワビはエゾアワビに次いで重要なアワビ類資源である。クロアワビの資源量は積極的な放流が続けられてきたにも関わらず、現在も低水準にとどまっている。この資源の減耗は主に食害によるものと考えられているが、幼生・稚貝期における餌不足も後の生残に大きな影響を及ぼすと考えられ始めている。本種は、幼生から稚貝期にかけてダイナミックに変態を繰り返すが、この初期発生期における栄養生理学的な知見は少ない。そこで、本研究ではクロアワビの幼生・稚貝期の栄養生理に関する知見を得ることを目的に、消化酵素の特性、初期発生期における消化酵素遺伝子の発現動態、及び初期飼料としてのバイオフィルムの効果を明らかにしたものである。特に評価される成果は以下の通りである。

1. アワビ類の消化機構の発達を調べるには、各発生段階にある動物個体の消化盲嚢を切除しそのホモジナイズ試料を用いる方法が一般的であるため、同一個体の消化酵素活性やその消化管に生息する微生物叢の変化をモニタリングすることはできなかった。そこで、個体ごとにクロアワビの消化酵素活性の変化を調べることができるよう、動物を生かしたまま消化液を採取するための簡便で新しい採取法を開発した。その方法を用いてクロアワビの消化酵素を調べたところ、アルギン酸リアーゼ、セルラーゼ及び β -1,4-マンナーゼを始めとする多糖分解酵素に加え、酸性フォスファターゼ、エラスターゼ及びエラスターゼリパーゼの活性が高いことを示した。

2. クロアワビの消化液からアルギン酸リアーゼ、セルラーゼ及び β -1,4-マンナーゼを精製し、これらの酵素化学的特徴を明らかにした。アルギン酸リアーゼとセルラーゼの活性は、既報のエゾアワビのものと、その分子量、至適反応温度及び pH は類似していた。しかし、 β -1,4-マンナーゼは、エゾアワビから精製された酵素とは分子量は類似していたものの、反応温度及び pH の依存性及び $MnCl_2$ に対する応答で、その性質が相違することを見いだした。
3. 既報のアワビ類の多糖分解酵素遺伝子の塩基配列に基づいて設計した新規プライマーを用い、クロアワビの消化盲嚢由来の cDNA ライブラリーから、アルギン酸リアーゼ (*alyHDD*)、セルラーゼ (*celHDD*) 及び β -1,4-マンナーゼ (*manHDD*) 遺伝子の塩基配列を決定した。*alyHDD* 遺伝子、*celHDD* 遺伝子及び *manHDD* 遺伝子の ORF 及びそれから演繹されるアミノ酸はそれぞれ、822 bp 及び 273 残基、1,785 bp 及び 594 残基、及び 1,134 bp 及び 377 残基であった。いずれの遺伝子ともエゾアワビ由来の各酵素遺伝子から演繹されたアミノ酸の配列と 97%以上が一致した。
4. クロアワビの幼生・稚貝期における 3 種の多糖類分解酵素遺伝子の発現動態を RT-PCR 法により解析したところ、殻長 1.02 mm (孵化後 36 日目) の個体から *alyHDD* 遺伝子の発現が観察された。*celHDD* と *manHDD* 遺伝子は殻長 1.55 mm (孵化後 66 日目) 以降の個体でその発現が始まった。同時に、キモトリプシン及びアミラーゼ遺伝子の発現動態も調べ、それぞれ殻長 0.54 mm (孵化後 13 日目) 及び 1.26 mm (孵化後 45 日目) の個体で発現していた。特に、アルギン酸リアーゼ遺伝子の発現は、一般的にクロアワビが海藻を摂餌し始める時期よりも 1 ヶ月以上前であった。
5. アルギン酸リアーゼ遺伝子が殻長 1 mm の個体で既に発現している理由を検討するため、クロアワビ生息環境に生息するバイオフィーム形成細菌のクロアワビの稚貝に対する餌料効果を調べたところ、アルギン酸の産生能を有する *Agarivorans* 属の細菌を見いだした。また、本株は 5%スクロースを添加した 1/2 ZoBell 2216E 培地において 20°C で 200 rpm の速度で振盪しながら培養することで、菌体外多糖の産生量が向上した。

以上の成果は、エゾアワビに比べ知見の乏しかったクロアワビの消化酵素の特性とその遺伝子の一次構造を明らかにしただけでなく、クロアワビの初期発生期における主要な多糖分解酵素遺伝子の発現動態を始めて明らかにしたものである。さらに、クロアワビの稚貝にとって補助的な餌料と成り得るアルギン酸を産生する海洋細菌を分離した。これらの知見は、クロアワビの栄養生理学の構築と進展に大きく寄与するものである。今後、この研究成果に基づきアワビの初期発生を考慮した資源管理や回復施策の提案につながることを期待される。よって審査員一同は申請者が博士(水産科学)の学位を授与される資格のあるものと判定した。