

氏 名(本籍) 松 谷 武 成

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 312 号

学位授与年月日 昭和 61 年 9 月 11 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 ホタテガイの産卵機構に関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 野村 正 教授 川崎 健

教授 正木 淳二

論文内容要旨

二枚貝類（斧足類）には、水産上重要な種が多く、その生殖に関する生理生態学的研究は古くから行われてきた。しかし、二枚貝類の産卵（放卵および放精）機構に関しては不明な点が多く、同じ軟体動物部に属する腹足類（巻貝類）にみられるような神経分泌性の産卵誘発ホルモンもこれまで報告されていない。

一方、二枚貝類は体外受精を行うが、ホタテガイ *Patinopecten yessoensis* をはじめ、卵巣から直接とりだした卵では受精しない種が少なくない。そこで、こうした種に対して、さまざまな産卵誘発法が用いられてきた。例えば、温度、電気、アルカリ、紫外線照射海水、過酸化水素などの産卵誘発法がよく知られている。しかし、これらの産卵誘発刺激の作用機序は明らかではない。

このように、二枚貝類の産卵がいかなる情報伝達系によって制御されているのか不明であり、その解明は生物学的興味のみならず、二枚貝類の増養殖技術の発展にとって重要な課題のひとつであると考えられる。

そこで、本研究では、ホタテガイを材料とし、その産卵機構を検討した。

第一にホタテガイの産卵を誘発する情報伝達物質を明らかにしたいと考え、検討の結果、神経伝達物質のひとつとして知られるセロトニン（5-hydroxytryptamine；5-HT）が、顕著な産卵誘発作用を示すことが明らかになった。第二に、種々のモノアミン拮抗薬やアスピリンなどを用いて産卵機構を *in vivo* で検討し、ホタテガイの産卵機構には、5-HT だけでなくドーパミンやプロスタグランジン（PG）も関与している可能性が示唆された。第三に、放卵に及ぼす5-HTやPGなどの影響を *in vitro* で検討した。第四にホタテガイの中樞神経系と生殖巣域における5-HTとカテコールアミンの分布を組織化学的に検討した。

そして、以上の結果をもとにホタテガイの産卵機構を制御する情報伝達系を考察し、ホタテガイの産卵機構を総括した。

1. 産卵誘発物質の検索

はじめに、産卵誘発作用のある神経分泌ホルモンの存在を検討するため、神経節懸濁液を生殖巣に注射し産卵誘発を試みた。その結果、神経節懸濁液は顕著な放精誘発作用を示したが、放卵は誘発しなかった。

神経節懸濁液の放精誘発作用は、頭部神経節、足部神経節、内臓神経節のすべての神経節に認められ、神経節提供個体の雌雄による差も認められなかった。各神経節に存在するこの放精誘発因子は、1%トリプシン（37℃、2時間）、および、0.5%ペプシン（37℃、1~4時間）処理を行っても失活しなかった。

次に、種々の神経伝達物質の産卵誘発効果を検討した。その結果、本研究に用いた神経伝達物質のなかで5-HTだけが顕著な産卵誘発作用を示した（Table 1）。雌では 2×10^{-4} M、雄では

2×10^{-6} M以上の 5-HT を 0.4 ml 注射すると、雌では平均66分後、雄では平均25分後にそれぞれ放卵放精するのが観察された。5-HT 注射の産卵誘発で得られた卵は、100% 近い高受精率を示し、観察を行った胞胚期までは正常に発生した。

以上のことから、各神経節に含まれる放精誘発因子が何であるかは不明であるが、ホタテガイでは 5-HT が産卵を誘発する情報伝達物質として機能している可能性が考えられた。

2. *in vivo* における産卵機構の検討

5-HT 注射、紫外線照射海水、加温の産卵誘発作用に対する 5-HT 拮抗薬、ドーパミン拮抗薬、アスピリンなどの影響を *in vivo* で検討した。

その結果、5-HT 注射、紫外線照射海水、フルオキセチン (5-HT 取込み阻害薬)・加温の各放卵誘発作用は、メチセルジド (5-HT 拮抗薬) により有意に抑制された (Tables 2, 3)。従って、ホタテガイの雌では、5-HT は 5-HT 受容体を介して放卵を誘発し、紫外線照射海水やフルオキセチン・加温による刺激も 5-HT 作動性機構を介して放卵を誘発するものと考えられた。また、5-HT 注射の放卵誘発作用はドーパミン拮抗薬で抑制されなかったが、紫外線照射海水やフルオキセチン・加温刺激の放卵誘発作用はドーパミン拮抗薬で有意に抑制されたことから、紫外線照射海水や加温刺激はドーパミン作動性機構を介して 5-HT の放出を促し、放卵を誘発するものと推察された。そして、5-HT 注射の放卵誘発作用がアスピリンで顕著に抑制されたことから、ホタテガイの放卵機構に PG も関与している可能性が考えられた。

しかし、雄の場合は、5-HT 注射やフルオキセチン・加温の放精誘発作用に対して、本研究で用いた種々のモノアミン拮抗薬やアスピリンはまったく抑制作用を示さなかった。

3. *in vitro* における産卵機構の検討

5-HT が *in vitro* でも放卵を誘発するかどうかを検討し、*in vivo* の実験で放卵機構に関与している可能性が示唆された PG の作用を *in vitro* で検討した。

その結果、5-HT は *in vitro* でも放卵を誘発し、卵巣片から放出された卵は、媒精すると正常な初期発生を開始した。5-HT の *in vitro* での放卵誘発作用は、 10^{-6} M で最大を示した (Fig. 1)。メチセルジドは *in vitro* においても 5-HT の放卵誘発作用を抑制した。また、アスピリン (10^{-4} M) やインドメサシン (10^{-4} M, 10^{-6} M) は 5-HT の放卵誘発作用を有意に抑制した。

そこで、PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂ の放卵に及ぼす影響を検討した。その結果、各 PG には放卵誘発作用は認められなかったが、PGF_{2α} は 5-HT の放卵誘発作用を抑制し (Fig. 2),

PGE₂は5-HTの放卵誘発作用を増強する傾向が認められた。そしてPGE₂の存在下では、アスピリンおよびインドメサシンは5-HTの放卵誘発作用を抑制せず、少量のインドメサシンを添加した実験区では、PGE₂ (10⁻⁶M)は5-HTは放卵誘発作用を有意に増強した (Fig. 3)。

従って、5-HTは直接卵巢に作用して放卵を誘発し、その作用はPGF_{2α}による抑制、PGE₂による促進という調節をうけているものと考えられた。

4. モノアミンの組織化学的検討

ホタテガイの産卵機構への関与が示唆された5-HTとカテコールアミンの、中枢神経系と生殖巣域における分布を、グリオキシル酸による蛍光組織化学的方法と、5-HTモノクローナル抗体 (YC5/45 HL)を用いた免疫組織化学的方法により検討した。

その結果、以下のようなモノアミンの分布が明らかになった。

1) 中枢神経系 (Figs. 4, 5-A, B, 6-A, B)

5-HT神経細胞：頭部神経節前葉・後葉，足部神経節，副神経節

カテコールアミン神経細胞：頭部神経節前葉，内臓神経節側葉

2) 生殖巣域 (Figs. 5-C, D, 6-C, D, E)

5-HT神経繊維：生殖巣表皮下組織，筋組織，生殖輪管上皮下組織，生殖上皮，頭部内臓縦連合

カテコールアミン神経繊維：生殖巣表皮，生殖巣表皮下組織，筋組織，生殖輪管上皮，腸管上皮，頭部内臓縦連合

このように、ホタテガイの中枢神経系および生殖巣域に5-HT神経，カテコールアミン神経が豊富に分布することが明らかになった。そして、中枢神経系のどの部位の5-HT神経細胞が生殖巣域を支配しているのかは明らかではないが、顕著な産卵誘発作用を示す5-HTが神経組織に局在し、とくに、産卵との関連が深いと考えられる生殖輪管や生殖上皮にも5-HT神経繊維が分布するのが観察されたことは、少なくともこれらの5-HT神経の一部から放出される5-HTが、ホタテガイの産卵機構において重要な役割を果たしている可能性を組織化学的に支持するものと考えられた。

5. 総括

本研究の結果を総括すると、ホタテガイの雌では Fig. 7 に示すように、温度変化などの何らかの外部からの刺激が、ドーパミン作動性機構，5-HT作動性機構を介して放卵を誘発し、5-HTの放卵誘発作用は卵巢においてPGF_{2α}による抑制，PGE₂による促進という調節をうけ

ているものと考えられた。また、生殖巣域では、生殖輸管上皮下組織、生殖上皮、筋組織など、産卵に関連が深いと考えられる組織に 5-HT 神経繊維の分布が認められたことから、これらの 5-HT 神経系の一部から放出される 5-HT が産卵に関与している可能性が考えられた。

一方、雄の場合、本実験条件下では、5-HT 拮抗薬、ドーパミン拮抗薬、アスピリンなどは有意な影響を示さなかった。しかし、放卵誘発有効濃度の約 1/100 の濃度の 5-HT で、放精が誘発されることから、少なくとも、放精機構においても 5-HT が主要な役割を果たしているものと考えられた。

Fig. 7 に示した放卵機構に関する情報伝達物質のうち、5-HT 以外の物質の作用についてはまだ、他の二枚貝類で検討されていないが、本研究で初めて明らかにされた 5-HT の産卵誘発作用は、現在まで内外 19 種の二枚貝で報告あるいは確認されている。従って、5-HT は広く二枚貝類の産卵機構に関与しているものと考えられる。

このように、二枚貝類の産卵機構に関与する情報伝達系が初めて示唆されたことは、二枚貝類の産卵生理を理解するうえで、また、二枚貝類の増養殖技術、遺伝・育種学的研究における基礎技術への応用の面からも意義のあるものと考ええる。

Table 1. Induction of spawning by the possible neurotransmitters in *P. yessoensis*.

Treatment	Concentration (mM)	Animals spawning / Animals tested	
		Female	Male
Serotonin	2	11/15*	11/11*
Dopamine	2	0/9	2/5
Noradrenaline	2	0/5	0/5
Adrenaline	2	0/5	0/5
Acetylcholine	2	0/5	2/5
γ-Aminobutyric acid	1	-	0/5
Control (filtered seawater)		1/9	0/5

* Significantly more successful at causing spawning than the control ($P < 0.005$, one-tailed Fisher exact probability test).

Table 2. Effects of various chemicals on the induction of spawning by 5-HT in *P. yessoensis*.

Treatment	Animals spawning / Animals tested	
	Female	Male
Methysergide & 5-HT	2/8*	5/5
LY53857 & 5-HT	8/8	-
Sulpiride & 5-HT	3/5	5/5
GHBA & 5-HT	4/5	-
Control-1 ASW & 5-HT	7/8**	5/5
Control-2 ASW & ASW	1/8	-

Each animal was injected with 0.4 ml of 10^{-4} M 5-HT or ASW 1h after the injection of methysergide (0.3 mg/0.4 ml), LY53857 (0.3 mg/0.4 ml), sulpiride (1 mg/0.4 ml), γ-hydroxybutyric acid (GHBA, 0.15 mg/0.4 ml), or ASW (0.4 ml).

* $P < 0.05$: significantly different from the control-1.

** $P < 0.01$: significantly different from the control-2.

Table 3. Effects of methysergide and sulpiride on the induction of spawning by thermal stimulations (Therm) following fluoxetine injections in *P. yessoensis*.

Treatment	Animals spawning / Animals tested	
	Female	Male
Methysergide Fluoxetine & Therm.	1/5*	4/6*
Sulpiride, Fluoxetine & Therm.	0/5**	4/5*
Control-1 Fluoxetine & Therm.	5/5***	5/5**
Control-2 ASW, ASW & Therm.	0/5	0/5

Each animal was injected with fluoxetine (0.2 mg/0.4 ml) or ASW (0.4 ml) 15 min before thermal stimulations. The animals, except the control-1, were injected with methysergide (0.24 mg/0.4 ml), sulpiride (1 mg/0.4 ml), or ASW (0.4 ml) 1 h before the treatments described above.

Female

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: significantly different from the control-1.

*** $P < 0.01$: significantly different from the control-2.

Male

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: significantly different from the control-2.

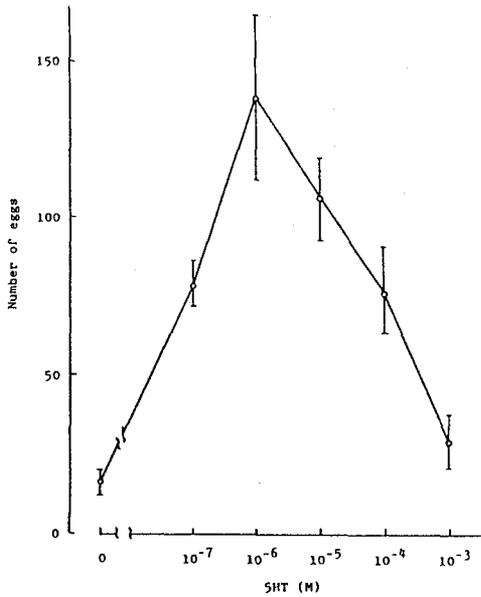


Fig. 1. Effect of 5-HT on the release of mature eggs from the ovarian pieces of *P. yessoensis*. Each ovarian piece was incubated for 90 min at 10°C with different concentrations of 5-HT. The number of mature eggs released / 10 mg ovarian tissue (wet weight) was ascertained. Each point represents the mean \pm S.E. of five experiments.

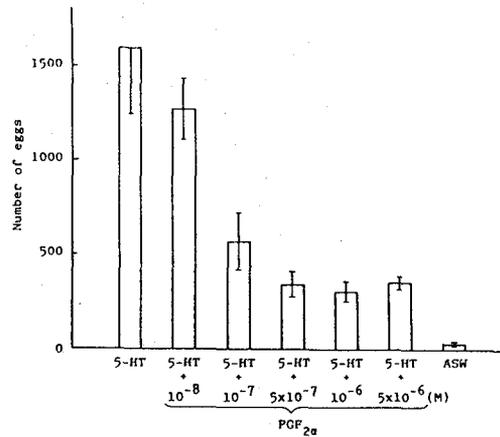


Fig. 2. Dose dependence of the PGE_{2α} inhibition from releasing mature eggs from the ovarian pieces of *P. yessoensis* induced with 5-HT. Each ovarian piece was incubated for 90 min at 10°C with 10⁻⁶M 5-HT and different concentrations of PGE_{2α}. The number of mature eggs released / 10 mg ovarian tissue (wet weight) was ascertained. Each value represents the mean \pm S.E. of five experiments.

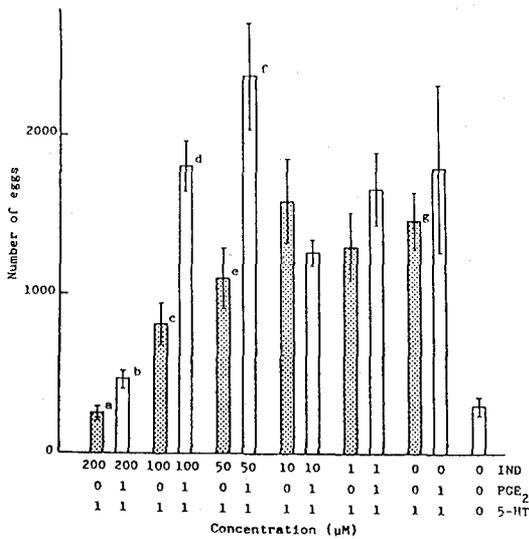


Fig. 3. Dose dependence of inhibition by indomethacin (IND) from releasing mature eggs from ovarian pieces induced with 5-HT, and effect of PGE₂ on the inhibition in *P. yessoensis*. Each ovarian piece was incubated for 15 min at 10°C with different concentrations of IND, and was then incubated for 90 min at 10°C in the preincubation medium to which 5-HT (10⁻⁶M), or PGE₂ (10⁻⁶M) and 5-HT (10⁻⁶M) were added. The number of mature eggs released / 10 mg ovarian tissue (wet weight) was ascertained. Each value represents the mean \pm S.E. of five experiments.

^bp < 0.05: significantly different from ^a.
^dp < 0.01: significantly different from ^c.
^fp < 0.05: significantly different from ^c and ^h.

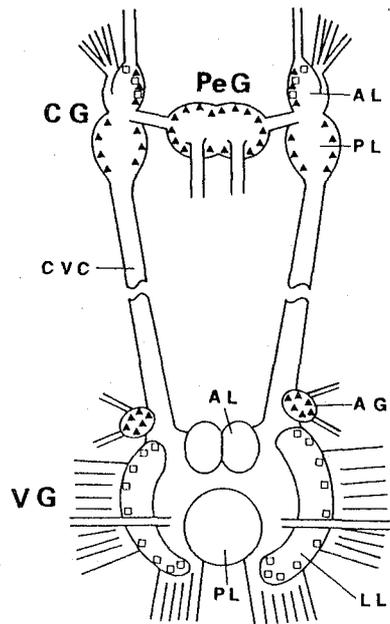


Fig. 4. Schematic drawing of the distribution of the monoamine cells in the central nervous system of *P. yessoensis*. CG, cerebral ganglion; PeG, pedal ganglion; VG, visceral ganglion; AG, accessory ganglion; AL, anterior lobe; PL, posterior lobe; LL, lateral lobe; CVC, cerebrovisceral connective; Δ , serotonin cells; \square , catecholamine cells.

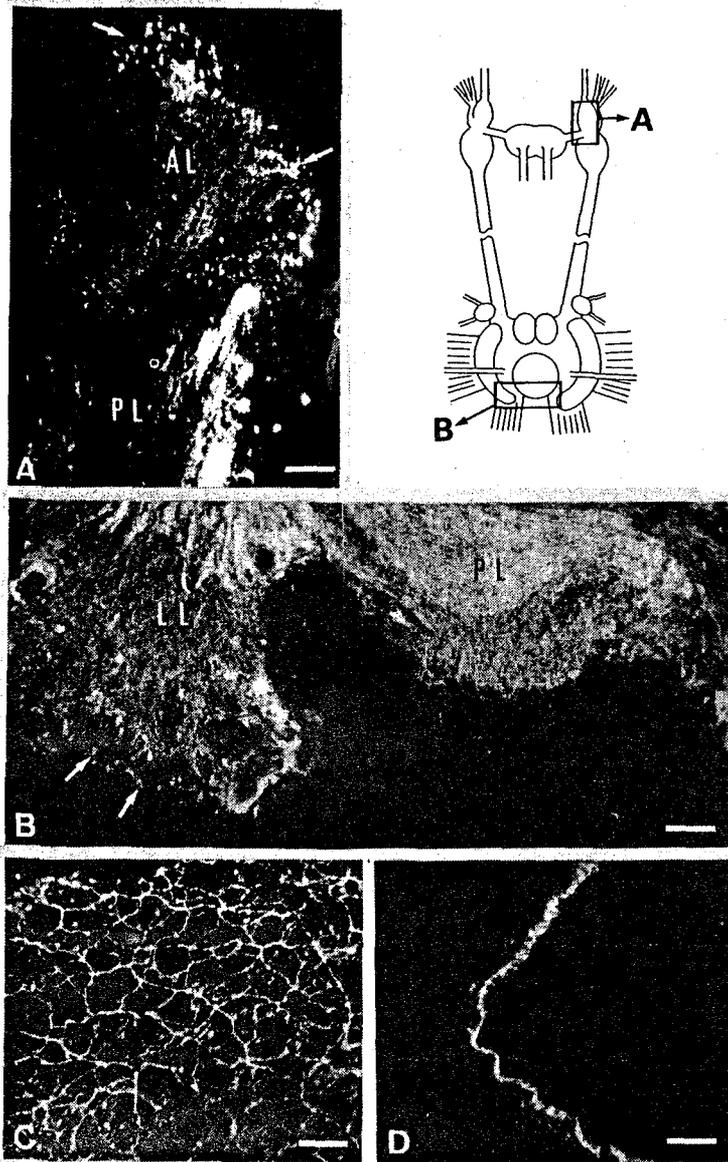


Fig. 5. Monoamine histofluorescence in *P. yessoensis*.

A Cerebral ganglion. Arrows indicate fluorescent nerve cell bodies situated at the anterior lobe (AL). PL, posterior lobe. Scale bar, 100 μm .

B Visceral ganglion. The neuropil of the anterior lobe (AL) and the posterior lobe (PL) shows intense fluorescence, while fluorescent nerve cell bodies (arrows) are distributed only in the lateral lobe. Scale bar, 100 μm .

C Dense network of fluorescent varicose fibers in the gonadal epidermis. Scale bar, 50 μm .

D Transverse section of the intestine. Network of fluorescent fibers stretches along the base of the intestinal epithelium. Scale bar, 50 μm .



Fig. 6. 5-HT immunohistochemistry in *P. yessoensis*.

A Pedal ganglion. Immunoreactive nerve cell bodies and immunoreactive varicose fibers in the neuropil. Scale bar, 50 μm .

B Accessory ganglion possessing many immunoreactive nerve cell bodies. Scale bar, 100 μm .

C Transverse section of the cerebrovisceral connective containing many immunoreactive fibers. Arrows indicate bundles of immunoreactive fibers near the cerebrovisceral connective. Scale bar, 100 μm .

D Fine immunoreactive fibers (arrows) along the germinal epithelium. Scale bar, 50 μm .

E Transverse section of bundles of immunoreactive fibers (arrows) around the gonoduct. Scale bar, 50

μm .

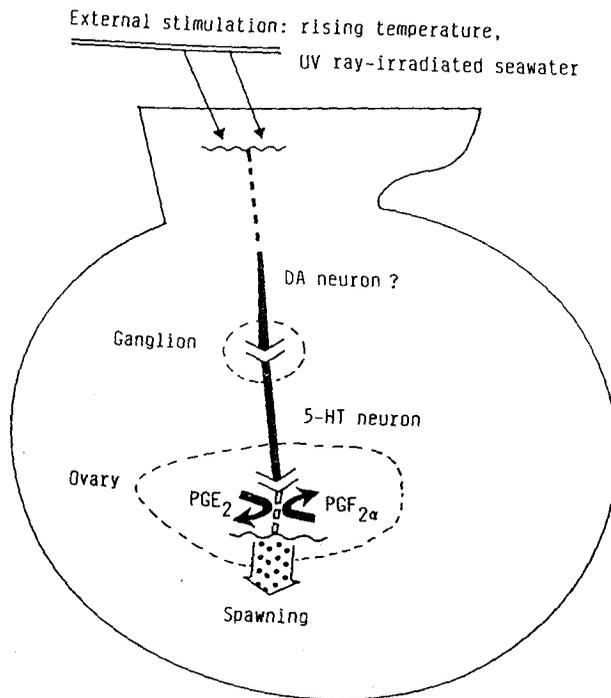


Fig. 7. Schematic diagram illustrating a hypothesis on the mechanism of induction of spawning in females of *P. yessoensis*.

審査結果の要旨

交尾を行う腹足類については産卵ホルモンの存在やプロスタグランジン関与説が提出され、産卵のメカニズムの研究がみられているのに対し、配偶子を直接海中に放出し、水中で受精する斧足類（二枚貝類）の産卵機構についてはほとんど明らかにされていない。

本研究は有用海産二枚貝ホタテガイを材料とし、産卵誘発物質の検索を行い、はじめてセロトニンによる産卵誘発現象を発見し、その作用機序の一端を解明したものである。

まず、雌雄各神経節中に産卵誘発因子が存在することを明らかにし、この因子は蛋白分解酵素により失活しないことから、ペプチドホルモンの寄与は少ないものと考え、検討の上、二枚貝における神経伝達物質の候補の一つであるセロトニンの産卵誘発作用を見いだした。放卵と放精の誘起時間には差異があるが、受精率は高く、受精卵は正常に発生した。セロトニン注射、紫外線照射海水および加温による刺激に対するセロトニン拮抗薬、ドーパミン拮抗薬およびプロスタグランジン合成阻害剤の影響を検討し、それらによる抑制作用を確認、雌雄による誘発機構が若干異なる点があることを明らかにした。また、紫外線照射海水や加温刺激による産卵誘発はドーパミン拮抗薬により抑制されたことから、これらの場合にはドーパミン作動機構を介してセロトニンの放出が促進されるものと考察した。

in vitro の実験においても結論的に同様の結果を得ているが、プロスタグランジン E_2 、 $F_2\alpha$ および D_2 それぞれ単独投与には産卵誘発効果がないこと、プロスタグランジン $F_2\alpha$ によりセロトニンの放卵誘発作用は抑制されること、プロスタグランジン E_2 の存在下ではセロトニンによる放卵誘発作用は増強されることが認められた。

ついで、モノアミンの中樞神経系と卵巢域における分布を免疫組織化学的方法および蛍光組織化学的方法により精査、その分布像を明らかにし、産卵機能との関連性を形態学的に証明した。

以上のように卵巢、神経節における内生的生理活性物質のうち、ホタテガイでは主としてセロトニンやドーパミンの作動によって放卵が誘発され、この作用はプロスタグランジンにより調節されている可能性を指摘した。

本研究は海産二枚貝類においてはじめて産卵誘発機構を提案したものであり、セロトニンによる産卵誘発は水産増養殖技術や、バイオテクノロジーの展開に貢献できる基礎的研究として評価し、ここに農学博士を受くるに充分値するものと判定した。