

# ムラサキイガイにおける足糸切断メカニズムの解明

2016 年 3 月 自然環境学専攻 海洋生命環境学分野 47-146601 今井さくら

指導教員 教授 井上広滋

キーワード：ムラサキイガイ、足糸、付着機構

## 1. はじめに

海洋付着生物は海洋資源として有用な種も多い反面、船底や発電所の取水口等に付着し被害を与える汚損生物として負の側面も持ち合わせている。付着汚損生物の代表的な一種であるムラサキイガイ *Mytilus galloprovincialis* は、イガイ科に属する二枚貝で、1930 年前後にヨーロッパから船底に付着して、日本に移入してきたと考えられている（石田ら 2005）。イガイ類は独自の付着機構を有しており、足糸と呼ばれるタンパク質の糸を分泌し、海水中で体を固定する。足糸は完全水中において短時間で形成され、金属やプラスチック、岩、コンクリートなど様々な基盤に付着できる（Waite 1992）。さらに、一度付着した足糸は強靱なため人為的に引き剥がすことが困難なほど強固に付着する。これらの理由から水中や多湿環境下で用いることができる接着剤の主成分として開発が期待されており、これまでに多くの研究が行われてきた（井上 2001）。一方で、イガイ類は分泌した強靱な足糸を自ら切り離し移動できることが知られている。その様子は、イガイ類を水槽において飼育している際に時折観察することができる。足糸の構成成分や形成過程については解明が進んでいるのに対し、足糸を切断し移動する行動に関しては全く報告がない。イガイ類の足糸切断のメカニズムを解明できれば、生物の特性を生かした全く新しい付着防除策の開発に寄与できる可能性がある。

そこで本研究では、行動観察によりまず足糸切断を誘起する環境条件の検討を行った。しかし、与えた条件では切断行動を誘起することができなかったため、次に通常飼育条件下でムラサキイガイが切り離した幹を回収し、走査型顕微鏡を用いて切断面の観察を行い、幹切断方法および関与する組織の検討を行った。さらに、足根元組織を用いて次世代シーケンス解析を行い、幹切断に関与する酵素の探索を行った。

## 2. 試料と方法

本研究で用いたムラサキイガイは、千葉県南白亀川河口付近において採集した。採集後はプラスチック水槽中で飼育し、餌として市販の海産植物プランクトン液体餌料（フィトプレックス）を添加した。

行動観察は 2 代のガラス水槽（実験区、対照区）を用いて行った。観察を行う際はそれぞれの水槽に同数のムラサキイガイを入れ、1 晩馴致し、足糸を貼らせた後に種々の刺激を与え、デジタルカメラ（PENTAX WG-2 GPS）を用いてインターバル撮影を行った。撮影した画像は Zeitraffer を用いてタイムラプスムービーとして書き出し、行動観察資料とした。また、通常飼育を行っている水槽にカメラを設置し、足糸切断時の行動を観察した。

足糸切断面の観察は全て幹部分を用い、物理的に切断した幹（メスを用いて切断・ピンセットで引っ張り切断）を用意し、イガイ自ら切断した幹と切比較した。サンプルはそれぞれ、4%パラホルムアルデヒドで2時間固定し、走査型電子顕微鏡（FE-SEM S-4800）を用いて観察を行った。

最後に、幹を形成する足根元付近組織より Total RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析を外部委託した。これより幹切断に関与する酵素の探索を行った。

### 3. 結果と考察

ムラサキイガイを用いて様々な環境への曝露実験を行った結果、足糸切断行動を明らかに誘起する環境条件の特定には至らなかったが、対照区においてより足糸を切断し移動する傾向がみられた。そこで通常飼育条件下で観察を続けた結果、2度の足糸切断行動を確認することができた。それぞれの切断パターンは大きく異なっており、付着しているすべての足糸を束ねる部位である幹を切断するパターンと、1本の足糸のみを切断していることが明らかになった。また、それぞれのパターンにおける切断部位および切断時の行動も異なっていることから、ムラサキイガイの足糸切断には少なくとも2つの方法があることが示唆された。幹は足糸の数百倍の太さであり、ムラサキイガイが物理的に切断できるとは考え難い。これより幹の切断には、酵素が関与している可能性が示唆され、さらに酵素の分泌には幹を形成する部位である足根元付近が関与している可能性が示唆された。一方で、単独の糸のみの切断は、完全に殻の外において起こっており、画像を見る限り足などの組織が切断箇所 접촉している様子も見られない。よって、糸のみの切断には、幹切断時のようにムラサキイガイの組織が直接関与している可能性は低く、物理的に切断していると考えられる。次に、幹切断面の観察の結果、物理的に切断した2種類の幹とイガイ自身が切断した幹の切断面は大きく異なっていることが明らかになった。また、イガイ自身が切断した幹切断面を90000倍で観察した結果、網目状の構造をしており、構成成分であるコラーゲンが溶け再び結合したような様子が確認できた。これより幹部分の切断には酵素を用いていることが有力であると考えられた。最後に、次世代シーケンサーを用いて RNA-seq を行い、足根元付近より幹切断に関与する酵素の探索を行った結果、足糸を構成する主成分のコラーゲンを分解するコラゲナーゼ様配列の単離に成功した。しかしながら、今回得られたコラゲナーゼ様配列が足糸切断に関与しているかは明らかにできておらず、その機能や発現部位、活性については今後の課題である。

### 引用文献

石田 惣, 岩崎 敬二, 桑原 康裕 (2005) ムラサキイガイの初侵入年代と分布拡大過程: 古川田溝氏の標本による推断. *Journal of the Malacological Society of Japan*, p.64:151-159.

井上 広滋 (2001) 足糸タンパク質の構造から見たムラサキイガイ類の種分化—黒装束の侵入者外来付着性二枚貝の最新学. 恒星社厚生閣, 87-105.

J. H. Waite (1992) The formation of mussel byssus: Anatomy of a natural manufacturing process. *Springer*, 19: 27-54. *Venus*

# The study of detachment mechanisms of *Mytilus galloprovincialis*

Mar.2016

Department of Natural Environment Science Studies

Marine Life Science and Environment

47-146601 Sakura Imai

Supervisor, Professor Koji Inoue

Keyword : *Mytilus galloprovincialis*, byssus, attachment mechanism

## 1. Introduction

Although marine sessile organisms include many commercially valuable species, many of them have negative impact on maritime business, for example, by attaching to the ship bottom or the intake of power plants. It is suggested that a representative species, the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae) has been introduced to Japan by ocean-going vessels around 1930 (Ishida et al. 2005). Mussels have a unique attachment mechanism and secrete a thread made of proteins called byssus in order to secure the body. The byssus is formed in a short period and completely in the seawater. It can attach to many types of substrates such as metals, plastics, rocks, and concrete. From these reasons, it is expected to become a main component of the adhesive that can be used in underwater or humid environments, and a number of studies have been reported (Inoue 2001). Meanwhile, mussels are known to be able to relocate by detaching the byssi; such behavior is occasionally observed in the aquarium. Whereas the components and the forming process of the byssus have been studied actively, there is no report on detachment mechanisms. If the detachment mechanisms of the byssus are revealed, such information is expected to contribute to the development of entirely new antifouling techniques utilizing the characteristics of the sessile organisms. In this study, I tried to find the environmental conditions that can induce the mussels to start detachment behavior. I also performed SEM (scanning electron microscope) observation of the stem (the part that bundles the byssal threads), cut by a mussel, which was found by continuous observation of the aquaria without any stimuli, and presumed the responsible tissues for stem cutting. Furthermore, I searched of the enzymes related to stem detachment by RNA-seq analysis using next generation sequencer on the foot root tissue.

## 2. Materials and Methods

*M. galloprovincialis* was collected at the estuary of Nabakigawa River in Chiba Prefecture. The sample was housed in a plastic aquarium, and fed with a marine phytoplankton liquid diet

(Phyto-plex). The behavioral observation was carried out using two glass aquariums (for treatment and control groups). The same number of mussels was placed in each aquarium, and was left for one night. After they created the byssi, experimental conditions (temperature and salinity etc.) were applied, and mussel behavior was recorded as time-lapse photos using a digital camera (PENTAX WG-2 GPS). Record of the behavior under normal condition was continued after the exposure experiments, and cutting behavior was recorded twice. The stem cut by the mussels and that cut physically (by pulling by tweezers or cut using a scalpel) were fixed for 2 hours in 4% paraformaldehyde, and were observed using a scanning electron microscope (FE-SEM S-4800). For RNA-seq analyses, I extracted the total RNA from the foot root near the tissue forming the stem, and outsourced the RNA-seq analysis using next-generation sequencer. Using the sequences obtained, I searched for the enzymes related to stem cutting.

### 3. Results and Discussion

Although I exposed the mussels to a variety of conditions, no specific factor could induce cutting behavior, which was more frequent in control rather than the experimental groups. By continuous recording under usual condition, cutting behavior was observed twice. Each cutting pattern was different, i.e., the stem was cut in one case and only one of the byssal threads in the other case, suggesting that there are at least two ways to cut the byssus. The stem is several hundred times thicker than the thread, and it is unlikely that mussels can cut it by the muscle tension only. It is probable that enzymatic reaction is involved in the system of cutting the stem, and if it is the case, the tissue near the foot root is the most probable site of enzyme secretion. On the other hand, in the case of the single thread cutting, it completed at the outside of the shell, and any tissues like the foot did not touch the part to be cut as long as I checked the image. Thus, in case when the mussel cut a single thread, it is considered that they cut it physically.

Observation by SEM revealed that there is a major difference between the stem surface that was cut physically and that by the mussel. The stem surface that was cut by the mussel had a net-like structure, with fibrous components, that are presumed to be the result of melting and re-bonding. This result suggests that mussels use enzymes to cut the stem. To identify the enzyme used to cut the stem, which is mainly composed of collagens, RNA-seq analysis using a next-generation sequencer was performed. From the sequences obtained, four types of collagenase-like sequences were obtained. However, at present, it is not clear that these collagenase-like sequences are involved in the detachment mechanism. To confirm their role in the detachment process, functions, expression sites, and enzymatic activities should be examined in the future.