

無酸素条件におけるサルボウガイ (*Scapharca kagoshimensis*)

のアデニンヌクレオチド代謝

【水環境対策チーム】

岩永千歳・宮本 康

1. はじめに

アデニンヌクレオチドのうち、ATP (アデノシン三リン酸) はあらゆる生物の細胞内でエネルギーの通貨として機能する。ATP は生命維持に不可欠であるにも拘わらず、細胞内の総量はわずか 1~2 分間のエネルギー需要を満たすにすぎないため、絶えず供給され続ける必要がある¹⁾。

ATP の供給は細胞呼吸を通じて行われる。陸域のような常に酸素に富む環境では、酸素を用いる好気呼吸により、グルコース 1 mol から ATP 38 mol を生成する。これに対して、水域の底質上/中に生育する二枚貝は、貧酸素環境に晒されることが多く、好気呼吸を行えないことがある。しかし、二枚貝は嫌気呼吸の代謝経路を用いて貧酸素環境でも ATP を生成することができる²⁾。ただし、その効率は悪く、グルコース 1 mol から ATP 6 mol を生成するにすぎない。これまで、数々の二枚貝を対象に、嫌気呼吸の発現メカニズムと ATP 生成能 (アデニンヌクレオチドの代謝) が評価されてきた³⁻⁶⁾。しかし、中海のシンボリックな生物であるサルボウガイに関してはほとんど知見がない⁷⁾。

中海周辺で「アカガイ」と称される本種は、藩政時代より地元の食材として重宝され、かつては中海が国内屈指の生産地であった。しかし、富栄養化の進行と湖底の貧酸素化を背景に、中海における本種の漁獲量は昭和 52 年を最後に漁獲統計から姿を消した。近年、中海がラムサール条約の登録湿地に指定されたことをきっかけに、本種の復活に対する機運が高まった⁸⁾。なお、今日の中海で本種の分布を強く制限している要因は夏季の湖底で生じる貧酸素化であると考えられている⁹⁻¹⁰⁾。

そこで本研究は、中海に生育するサルボウガイを対象に、無酸素条件におけるアデニンヌクレオチド

の代謝を室内実験により明らかにすることを目的とした。

2. 試験方法

1) 無酸素実験

今日、中海のサルボウガイ資源が非常に限られていることを考慮し、本研究では島根県水産技術センターが中海で天然採苗した約 1.5 オの個体を用いた。実験室に持ち帰ったサルボウガイは、夏季の中海湖底を模した 60L 水槽内 (塩分: 30psu・水温: 28) で約 1 週間の馴致を行った。馴致の際にはエアレーションを施した上、珪藻 *Chaetoceros gracilis* を餌として毎日与えた。馴致の後、サルボウガイを無酸素実験に供した。4 個の円柱容器 (1L) に塩分 30psu・水温 28 に調整した室素置換水を入れ、それぞれの中に 4 個体の貝を入れた。貝を収容した容器はただちに密栓し、その後 0.5・1・2・4・7 日目にランダムに選び出した容器より 3 個体を採集した。代謝が活発に行われている閉殻筋を測定部位とし、速やかに閉殻筋を取り出した。加えて、0 日目のサンプルとして、実験開始時に馴致水槽より 3 個体の閉殻筋を採取した。閉殻筋は重量を測定した後、あらかじめ冷却した 3 倍量の 5%TCA 溶液に収容して分析を行うまで冷凍保存した。

2) アデニンヌクレオチドの分析

(1) 試薬等

試薬はすべて和光純薬製を用いた。HPLC 測定に用いた試薬は、HPLC グレードを使用した。

(2) 抽出操作

冷凍保存していたサンプルをシャーベット状になるまで溶かし、氷冷しながらホモジナイザーで粉碎した。3,000 rpm で 5 分間遠心分離した後、上清を

新しい遠沈管に移した。遠心後の残さに5%TCA溶液を加え同様に処理し、上清をあわせた。得られた上清を水酸化カリウム溶液で中性に調整した後、フィルターろ過して試験溶液とした。

(3) HPLC 測定条件

測定条件を表1に示す。

表1 HPLC測定条件

装置	Shimadzu LC 10 (島津製作所)		
カラム	TSK-GEL ODS-100S (250 × 4.6mm) (TOSOH)		
移動相	A) 0.1 mol/L potassium phosphate buffer (pH 7.2) B) アセトニトリル		
グラジエント条件	0分 (A 100%) 6分 (A:B 75:25)	2分 (A:B 95:5) 12分 (A:B 50:50)	4分 (A:B 80:20)
流速	0.6 ml/分		
カラム温度	40		
注入量	10 μL		
測定波長	UV 258nm		

3. 結果

1) HPLC 分析

ATP、ADP、AMPを測定した際のクロマトグラムを図1に示す。ATP、ADP、AMPのピークは完全には分離しなかったが、検量線は0.1~50 nmolの範囲で、相関係数はATP、ADP、AMPともに、0.999~1.000であり良好な直線性を示した。

分析時間は、1サンプルあたりカラムの平衡化の時間を含めても20分以内であり、サンプル数が多い場合でも迅速に分析することができた。

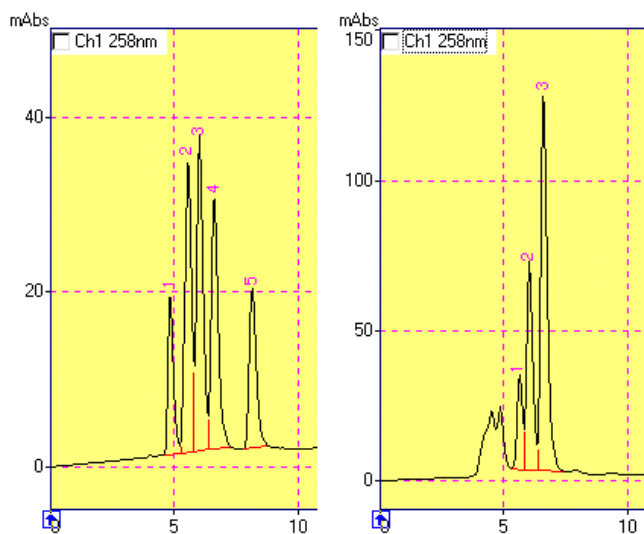


図1 HPLC分析のクロマトグラム

左) 標準品

ピーク番号 2) ATP、3) ADP、4) AMP

右) 0.5日目のサンプル

ピーク番号 1) ATP、2) ADP、3) AMP

2) サルボウガイに含まれるアデニンヌクレオチドの定量

サルボウガイに含まれるATP等の代表的なクロマトグラムを図1に示す。妨害物質は認められず、ATP、ADP、AMPの定量をすることができた。

ATPの含量は、無酸素実験を開始してから0.5日目までに急激に減少した。それと反対にAMPは0.5日目までに急激に増加した。ADPは、1日目までわずかに減少した。(図2) ATP、ADP、AMPともに0.5~1日目以降は、大きな変化はみられずほぼ一定の値を示した。

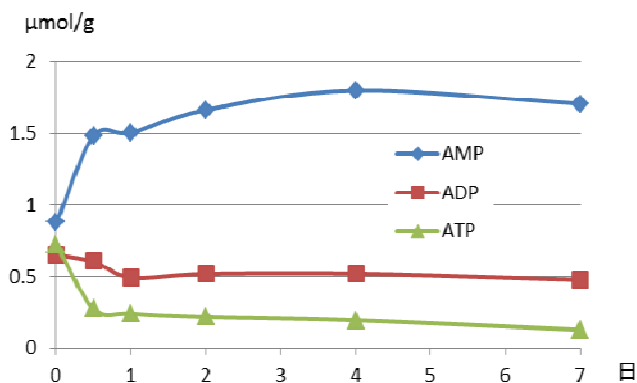


図2 サルボウガイのATP、ADP、AMPの変化

4. 考察

アデニンヌクレオチド組成の変化は、嫌気呼吸に移行する際の判断指標の一つとなる。

二枚貝の嫌気呼吸についての報告例によると、嫌気呼吸に至る過程は、2つの段階にわけることができる⁴⁾。1つめの段階として、好気呼吸から嫌気呼吸への移行期、その後安定する安定期がある。移行期の特徴は、アデニンヌクレオチド組成の劇的な変化、アスパラギン酸が消費され、コハク酸とアラニンが蓄積されること、ATPの代謝率が高いことが挙げられている。安定期には、貯蔵グリコーゲンの消費、プロピオン酸の蓄積、ATPの代謝率が低くなることが挙げられている。

以上のことをふまえ、今回得られた結果を考察すると、アデニンヌクレオチドの代謝は0.5日を境に2つの段階に分けられる。無酸素水に移した直後から0.5日までは、移行期と考えられ、ATPが急激に減少する一方でAMPは急激に増加している。これは、無酸素水に移したことで嫌気呼吸に移行し、ATPの合成速度が低下した反面、ATPの分解速度は高いままであることを示している。0.5日目以降の安定期では、アデニンヌクレオチドの組成に変化は見られず一定であり、ATPの代謝率が移行期よりも低くなっていると考えられる。

以上のことより、サルボウガイは無酸素水にさらされると、すでに報告されている二枚貝^{4・5)}と同様に、アデニンヌクレオチド組成の急激な変化をとともなう移行期を経て、組成が一定となる安定期に至る嫌気呼吸に移行することがわかった。

5. 引用文献

- 1) D ヴォート・JG ヴォート (1996) ヴォート生化学(上) 第2版. 田宮信雄・村松正実・八木達彦・吉田浩(訳), 東京化学同人(東京).
- 2) Hochachka PW (1980) Living without Oxygen. Harvard Univ. Press, Harvard (US).
- 3) Isani G., Cattani O, Carpena E, Tacconi S, Cortesi P (1989) Energy metabolism during anaerobiosis and recovery in the posterior adductor muscle of the bivalve *Scapharca inaequivalvis* (Bruguirre). Comp Biochem Physiol B 93: 193-200.

- 4) Isani G, Cattani O, Zurzolo M, Pagnucco C, Cortesi P (1995) Energy metabolism of the mussel, *Mytilus galloprovincialis*, during long-term anoxia. Comp Biochem Physiol B 110: 103-113.
- 5) de Zwaan A, Isani G., Cattani O, Cortesi P (1995) Long-term anaerobic metabolism of erythrocytes of the arcid clam *Scapharca inaequivalvis*. J Exp Mar Biol Ecol 187: 27-37.
- 6) 中村幹雄 (1998) 宍道湖におけるヤマトシジミ *Corbicula japonica* PRIME と環境との相互関係に関する生理生態学研究. 島根県水産試験場研究報告, 9.
- 7) 本田匡人・郡司掛博昭・松井繁明・諸石淳也・姜益俊・島崎洋平・大嶋雄治 (2010) サルボウガイ (*Scapharca kagoshimensis*) の呼吸代謝に及ぼす低酸素の影響. 九大農学芸誌 65: 31-37.
- 8) 中海自然再生協議会 (2005) 中海自然再生全体構想.
- 9) 中村幹雄・品川明・戸田顕史・中尾繁 (1997) 宍道湖および中海産二枚貝4種の環境耐性. 水産増殖 45: 179-185.
- 10) 鈴木秀幸・山口啓子・瀬戸浩二 (2011) 閉鎖性の高い中海で垂下養殖されたサルボウガイの成長と生残. 水産増殖 59: 89-99.

謝辞

島根県水産技術センターには実験に供したサルボウガイをご提供いただいた。この場を借りて厚く御礼申し上げます。本研究は農林水産技術会議 新たな農林水産施策を推進する実用技術開発事業(環境変化に対応した砂泥域二枚貝類の増養殖生産システムの開発 #21007)として実施した。