

令和元年6月18日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01919

研究課題名(和文) 自切したヒトデ腕における腕の再生機構の解明

研究課題名(英文) Regeneration of sea star's autotomized arm

研究代表者

鵜飼 和代 (UKAI, Kazuyo)

東北医科薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60433512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトデの腕の自切は、長い腕を持つヒトデに見られる生体防御機構で、腕の脱離までの時間により、外敵からの攻撃などに対する短時間での自切と、細菌感染や環境の悪化時における時間を要する自切に分類される。短時間での自切は時間を要する自切に比べてその後の腕の再生に時間を要する。自切を誘起する化合物を用いて自切から腕の再生を観察したところ、自切断面が反口側の軟化した組織に覆われた後に摂餌を再開した。一時的に体重が減少した後に、体重が増加すると共に、放射神経が切断された部分に再生芽が形成され、腕の再生が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトデの腕の自切は非常に特徴的な現象である。その後に腕が再生した個体は自然環境下の観察でしばしば見られる。我々はマヒトデの自切誘起因子を同定しており、この化合物を用いて、自切から再生までの観察を行った。ここで、自切までの時間が短い場合は、腕の再生に時間を要し、自切までの時間が長い場合には再生の時間が短いことを明らかとした。

自切の段階で、再生にも関わると予想されるオートファジーを化合物を用いて阻害すると腕の再生に時間を要したが、オートファジーを活性化する化合物を用いた場合には、再生に影響が見られなかった。

研究成果の概要(英文)：Autotomy, the capacity to detach a body part, is a characteristic defense mechanism of a sea star. When the Japanese sea star, *Asterias amurensis*, is attacked by a predator, it has the ability to detach one or more arms within seconds to 10 min. In contrast, the arm can require between an hour to overnight to separate when it is wounded or is subjected to an unfavorable environment. When fast detached of arm, it need long time for arm regeneration. We observed regeneration from detached of sea star's arm using autotomy promoting factor. At first, autotomized side was covered by organization softened on aboral. The weight increased temporarily after the weight decreased. Reproduction blastemal was formed on detached radial nerve.

研究分野：天然物化学

キーワード：ヒトデ 自切 再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトデには、生育環境の悪化や、敵に襲われた際に自ら腕を切り離す種がある。これはヒトデの腕の自切であり、長い腕を持つヒトデに特徴的な生体防御現象である(図1)。この自切は、ヒトデ盤面付近の腕付根の一定の部分で生じ、自切後の自切箇所では続いて腕の再生が行われる。我々はヒトデの自切の化学生態学的研究を行っており、pHの低下やエアレーション不足等の環境悪化や細菌感染等では10分~1日以上をかけた自切し('slow autotomy')、捕食者の攻撃では直ちに腕を切り離す自切('quick autotomy')を行うことを発見した。

我々はこの自切に関与する生体物質である自切誘起因子(autotomy-promoting factor, APF)のうち、'slow autotomy'を誘起する因子を、マヒトデ(*Asterias amurensis*)の加熱体腔液中からニコチンアミド(NA)とN-メチルキノリン酸(NMQA)の1:1の混合物であると同定した。マヒトデの腕への投与(each 1mg/arm/100g body)では投与後約1時間で腕の自切を再現し、ニッポンヒトデやエゾヒトデへの投与でも自切は再現したことからこの混合物を'slow autotomy'を誘起するAPFであると決定した。なお、投与量を増やしても、自切に要する時間は短縮せず、自切する腕の数が増加した。続いてAPFを用いた自切機構の解明を行ってきた。これまでにグルタミン酸神経系NMDA受容体を介した興奮神経系の機構と、NAD関連代謝機構(PARP, CD38, SIRT1)が関与することが明らかとなった。

この研究の過程でAPFを用いて自切させたマヒトデの一部を継続して飼育した際にも、自切した腕の再生が起きることを観察した。また、複数の化合物を用いて誘起した'quick autotomy'や、APFと阻害剤などを併用して自切時間を短縮させた場合には、腕の再生が遅くなる傾向が見られた。また、1本の腕のみ自切したマヒトデと比べて、2本以上自切させた個体の腕の再生も遅くなった。

2. 研究の目的

本研究ではマヒトデ(*Asterias amurensis*)と自切誘起因子(APF)を用いて、'slow autotomy'を中心としたヒトデの腕の自切を誘起し、続く腕の再生機構を自切直前から継続観察し、その機構を明らかとする。特に自切時間を短縮させることで、再生時間が長くなる現象に着目し、生体防御機構としては腕の脱離という非常に大きな代償を払う自切と、続く再生の機構を解明し、未解明な部分の多い再生の知見を得ることを目指す。中でも自切段階から再生の段階のどこかで成体を構成していた分化した細胞が新たな腕を形成する際に未分化の状態に戻るか、未分化の細胞が新たに増加して新たな腕を形成することが予想されるので、この脱分化がどの段階で起きるのかを明らかとすることを目指す。

(1) グルコースと再生

'Slow autotomy'ではヒトデの動きが鈍くなることから、エネルギー供給の影響を検討するために、グルコース投与試験を行った。この投与量を糖尿病判定に使用される75gグルコース負荷試験の1/10相当の投与(12.5mg/100g body)で、自切時間が10分間の遅延、グルコース負荷試験相当量(125mg/100g body)で自切が阻害された。また自切した場合の腕の体腔液のpHを測定したところ、pH 5.8とアシドーシスを示し(正常時pH 7.4)、糖尿病性様アシドーシスの可能性が生じた。

‘Slow autotomy’の自切時には、反口側の表皮様組織が軟化した。この組織は棘皮動物独自の表皮様のキャッチ結合組織（骨片＋筋肉＋表皮の役割を果たす反口側を覆う組織）である。この硬軟はpHで制御されており、酸性下では軟化する。アシドーシスによる酸性下で軟化したキャッチ結合組織は反口側の多くを覆っており、軟化することで、より早く自切面を組織が覆う一助となる可能性がある。自切時間が遅延した1/10相当量のグルコース投与時と、APFのみ投与した際の自切後の再生を比較観察することで、グルコースによる再生への影響を検討する。

（2） ganglion と再生

ganglion 産生経路はAPFの一つであるニコチンアミド（NA）により活性化されることから、この産生系を阻害すると自切は起こらなかった。一方ganglion の前駆体アナログであるL-PDMPは、自切時間は変化しないが、切れる腕の数を増加させた。ganglion には神経突起伸長作用など細胞成長の活性化をもたらす可能性がある。このL-PDMPの抗体を用いて、自切面付近のL-PDMPの結合領域を探索し、ganglion が自切のみならず再生にも関わる可能性を検討する。

（3）オートファジーと再生

カスパーゼ3を経由するアポトーシス、cyclic ADP ribose が介する制御性ネクローシス経路の抑制は、‘slow autotomy’の自切時間を短縮した。この際の再生の仕方の変化を観察する。

また自切腕の放射神経のATPを測定すると、一定量のATPの減少後に自切は生じた。ATP減少が機構の開始の鍵となるオートファジーが自切ならびに再生に関与する可能性を検討する。はじめにオートファジー阻害剤を用いた検討を実施する。

3. 研究の方法

（1）自切誘起試験

APFによる自切誘起は、海水で溶解したNMQA＋NAを、1:1(1+1 mg/100 g body weight) 正常なマヒトデの腕の1本に注射器で注入した。1時間の経過観察を行い、自力で自切していない場合は腕の自切面を触診し自切の有無を確認する。その後、2時間まで経過の観察を行った。阻害剤などの投与は、APF投与の5分前に行った。NMQAは、キノリン酸をメチル化して供給した。

（2）再生実験マヒトデの飼育

実験使用前のマヒトデは流水水槽で飼育を行った。

個体識別が必要な再生観察のマヒトデは、個別飼育での飼育場所の確保が難しいため、砂ろ過を併用した循環水槽の使用を検討した。水温が低ければ海水の交換を実施せずに、約1か月の飼育が可能であるが、流水水槽との再生の速度の違いがあるかどうかを確認した後に循環水槽での使用を実施した。

マヒトデにはインクでのマーキング、身体の一部の切除、針金などを穿刺しての個体識別を実施することが出来ない（自切してしまうことがあるため）。また、体内の海水に近い成分である体腔液を吐き出して体重が10g前後変化することもある。今回は、盤の穿孔盤を目印に、自切腕の場所によって、個体を識別する方法をとり、個体識別は3匹までは可能となった。そのため、一水槽(45 x 24 x 30 cm)に3匹までのマヒトデ

を飼育した。

(3) 再生実験マヒトデの観察

ヒトデ本体の自切断面キャッチ結合組織により覆われるまでの期間を調査した。その後は、自切断面に再生腕が生えてくるため、この再生腕の大きさを記録する。必要に応じて、再生腕ならびにその付近の組織の鏡検を実施した。

(4) グルコース投与による再生への影響

自切時間が遅延した 12.5 mg/100 g body の投与を行い、特に自切直後の再生開始段階の観察を実施した。各段階で必要に応じて鏡検を実施した。自切腕側のアシドーシスは確認しているが、自切腕付近のマヒトデ本体側では確認していないので、どの様に推移するのかの測定を実施した。

(5) オートファジーと自切

はじめに、オートファジー阻害剤 3-メチルアデニンの投与を実施し、自切から再生にかけての観察を実施した。あその結果に応じて各オートファジー機構の再生への影響を阻害剤投与により検討した。アポトーシスや制御性ネクローシスの抑制も自切ならびに再生にどの様に影響を与えるのかの検討も合わせて実施した。これらの結果を踏まえて、再生機構に影響を与える機構の解明を実施した。

(6) 再生に關与する器官の特定

再生の観察において、顕微鏡観察により、関与が示唆された器官において、再生時のみ発現したのものについては、その機能の詳細な解析を実施した。平常時にも発現しているものについては、その器官の発現量と、再生スピードに関係が見られるかどうかを観察した。必要に応じて、免疫染色などを実施し、観察を行った。

4. 研究成果

(1) グルコースと再生

自切時間が投与量により遅延するグルコースを APF と共に投与して、再生時の影響を調べた。遅延したものと、APF のみを投与して自切したものの再生の過程を観察したところ、再生には影響をもたらさなかった。いずれも軟化した反口側の組織が自切面を覆い、覆った後に摂餌を再開した。全ての個体で一時的体重の減少が観察された後、体重の増加が観察された。傷が覆われた後に、環状神経から放射神経が切断された部分周辺が盛り上がり再生芽を形成した。再生芽の先端には後日赤い眼点が生じ、見分けることが容易となる。徐々に新しい腕として成長し始めるが、再生腕は他の健常なものとは比べて小さなままであった。

(2) オートファジーと再生

オートファジー誘導因子でもあるラパマイシンは APF との投与で自切時間が遅延した。逆にオートファジー阻害因子の 3-メチルキサンチンでは自切時間が短縮した。この 2 種と、APF のみの投与の場合の自切後の腕の再生を観察したところ、ラパマイシンでは APF の過程と違いは見られなかった。3-メチルキサンチンでは自切断面が塞がって、再生芽が形成するまでの初期では遅い経過となったが、それ以降はいずれも変わりがなく、再生初期のスピードのみが影響を受けた。

(3) 自切と再生の機構

自切時間の短縮、遅延の場合を APF のみの投与を指標とし比較したところ、いずれも再生までの順序に変わりはなかった。自切時の体重を基準とすると、一度体重が減少した後に増加が観察された。この体重の増加に関連して、自切断面が覆われた後に摂餌を再開し、体重の増加がみられた。自切時間が短縮した場合には、反口側の軟化が見られないため、自切断面が覆われるまでに時間を要し、再生までの時間を要した。自切時間を短縮するものの中で、タクロリムスの投与は傷が塞がるまでに 20 日以上かかることもあり、再生時間に時間を要した。関連する機構として cADP リボースを投与した場合、自切時間が遅延したが、その再生では要する時間は APF と変わらなかった。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

Kazuyo Ukai, Michio Namikoshi, Identification of autotomy-promoting factor from a Japanese sea star *Asterias amurensis* and mechanism of autotomy, 16th International Echinoderm Conference, Nagoya, 2018

鷓飼 和代, 浪越 通夫, ヒトデの自切の分子機構、日本動物学会第 89 回札幌大会、札幌、2018

鷓飼 和代, 浪越 通夫, ヒトデ腕の自切遅延時の再生への影響、第 57 回日本薬学会東北支部大会、仙台、2018

鷓飼 和代, 浪越 通夫, ヒトデの腕の自切機構、第 13 回棘皮動物研究集会、東京、2016

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：浪越 通夫

ローマ字氏名：(NAMIKOSHI, Michio)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。