

機関番号：31305

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19710190

研究課題名（和文）ヒトデ類の自切の分子機構に関する研究

研究課題名（英文）Identification of Autotomy-Promoting Factor from Sea stars and Molecular mechanism of Autotomy

研究代表者

鵜飼 和代 (UKAI KAZUYO)

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60433512

研究成果の概要（和文）：日本沿岸種のマヒトデにおいて、腕の長いヒトデが自ら腕を切り離す生体防御機構である自切を誘起する化合物(APF)が、ニコチンアミドと *N*-メチルキノリン酸 1:1 の混合物であることを同定し、自切を再現した。APF を用いて、自切機構の解明を行ったところ、生体内で複数の機構が同時に進行し、その中の一つとしてほ乳類の NMDA 受容体と同様の機構が存在することが、明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Japanese *Asterias amurensis* is known to have this ability of autotomy. The body fluids of scalded *A. amurensis* induced an arm autotomy of the intact *A. amurensis* by intracoelomic injection in an arm. A mixture of nicotinamide and *N*-methylquinolinic acid (NMQA) were assigned in this fraction as the inducers of autotomy. NMQA has been revealed to be a substrate of NMDA glutamate receptor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,300,000	630,000	3,930,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：マヒトデ、*Asterias amurensis*, 自切、自切誘起因子、APF、ニコチンアミド、*N*-メチルキノリン酸、NMDA 受容体

1. 研究開始当初の背景

ヒトデの自切は、腕の長いヒトデが捕食者による攻撃や、修復不能な傷を負った際に、自ら腕を切り離す非常に特徴的な生体防御機構である。人為的に火傷をさせた個体の体腔液を正常な個体に投与すると、自切を誘起することから、何らかの生体内物質が、自切を誘起すると報告された。しかし長年海外のヒトデを用いて、自切を誘起する因子の探索が行われていたが、自切誘起因子は不明であった。自切の後には、腕の再生が行われることから、自切誘起因子を解明することは、自切から再生への分子機構を解明する第一歩

として期待される。

2. 研究の目的

日本沿岸種のヒトデの自切を誘起する自切誘起因子(APF)を同定し、自切の分子機構を明らかとする。これまでの研究により、APF は一種類ではなく複数であることが、予測される。

3. 研究の方法

(1) マヒトデの採集と自切生物検定を確立する。

(2) マヒトデの加熱体腔液中に存在する自切誘起因子 (APF) を単離・構造決定する。

(3) APF を合成し、自切を再現する。

(4) ニッポンヒトデ、エゾヒトデの APF の単離・構造決定を行う。

(5) マヒトデ APF の受容体を探索する。

4. 研究成果

観察により、マヒトデにおける自切機構は、'slow autotomy' と 'quick autotomy' の二つ存在することが分かった。

(1) 東京湾、仙台湾、陸奥湾のマヒトデをスキューバダイビングによる採集あるいは漁業従事者から入手し、流水水槽で飼育した。検定試料は、滅菌海水あるいは滅菌海水:滅菌水 (1:1) で調製した。マヒトデは幅長 3.5 cm、腕ディスク付け根の幅 1.0 cm 以上の個体を用いた。海水で湿らせたプラスチック製のバットにマヒトデを入れ、腕の先から幅長の 1/3 のところに検定液を注射した。投与後 60 分以内に投与腕の自切が始まるかどうかを確認した。自切していない個体はさらに 120 分後まで観察を行った。

生殖巣が発達を始める時期 (11~12 月) から産卵を終えるまで (4~5 月) の間は、自切が著しく抑制されるため、この期間は生物検定試験を行うことが出来なかった。

(2) 加熱して自切させたヒトデ個体から得られる体腔液を他の正常個体の腕に投与すると自切を引き起こす。そこで、マヒトデをオートクレーブバッグに入れて 76~100 °C に加熱し、腕が軟らかくなって外れ始めた段階で加熱を止め、オートクレーブバッグ中に滲出した体腔液を採取した。それを遠心分離して上清 (APF 粗抽出液) を採り、凍結乾燥して APF 粗抽出物を得た。これをゲル濾過クロマトグラフィー、HPLC (ODS) で分画したところ、Fr. 6-2 が 'slow autotomy' を誘起 (10 mg/arm) した。Fr. 6-2 を HPLC で精製を繰り返すと、Fr. 6-1 に含まれる茶褐色の物質が増加した。Fr. 6-3 も褐色変化を示した。NMR、UV、FABMS などから Fr. 6-2 にはニコチンアミド様化合物が含まれると推定した。そこでニコチンアミド (NA) の投与実験を行ったが、10 mg/arm でも自切は起こらなかった。Fr. 6-2 の NMR には、*N*-メチル基に由来するシグナルも観察されたので、分解等により褐色変化を起こす NA 関連物質の検出を各フラクションについて行った結果、Fr. 6-2 には NA の他にピコリン酸と未同定の *N*-メチル基を持つ化合物が含まれ、Fr. 6-1 にホマリン (*N*-メチルピコリン酸)、*N*-メチルニコチンアミドおよびトリゴネリン (*N*-メチルニコチン酸)、Fr. 6-3 にキノリン酸が含まれることを確認した。また、Fr. 6-4 はスペクトルデータよりキササンチンと同定した。市販あるいは合成した標品で自切誘起活性を検討したが、同定した化合物はいずれも単独では活性を示さなかった。Fr. 6-2 に含まれるピコリン酸と NA の混合物 (1:1) を投与しても自切は起こらなかったが、NA と未同定の *N*-

メチル化合物の混合物 (1:1) が自切を誘起した。ここで観察された自切は Fr. 6-2 により誘起される活性と同じで、'slow autotomy' である。また、ピコリン酸と未同定の *N*-メチル化合物の混合物は活性を示さなかった。NA と未同定の *N*-メチル化合物の混合物に、同定した他の化合物を加えても自切に要する時間は短縮されなかった。そこで、未同定 *N*-メチル化合物の構造決定を行ったところ、*N*-メチルキノリン酸 (NMQA) であることが分かった。この化合物は不安定で、比較的速やかに褐色変化を示す。

(3) キノリン酸をヨウ化メチルにより *N*-メチル化した *N*-メチルキノリン酸 (NMQA) と市販品のニコチンアミド (NA) の 1:1 の混合物を用いて、'slow autotomy' を再現したことから、NMQA と NA の混合物が、'slow autotomy' を引き起こす因子であると同定した。

(4) ニッポンヒトデ、エゾヒトデを安定して入手することが困難であった。マヒトデの APF である NA と NMQA の混合物が、'slow autotomy' を再現したことから、マヒトデと同じ機構が存在する可能性が示唆された。

(5) ① 'slow autotomy' の分子機構

1) グルタミン酸神経系 NMDA 受容体の関与

NMQA はエビ筋肉ホモジナイズ中でキノリン酸を処理すると直ちに生成することが報告されているが、その役割は不明である。また、生物の抽出物中にその存在を確認したのは本研究が初めてである。一方、NMQA の前駆体と考えられるキノリン酸は酵素 3H34DA の発現により産生される。3H34DA は海綿、酵母からヒトに至るまで広範囲の生物で発現する酵素で、ほ乳類などでは脊椎の損傷時、海綿などでも損傷を受けた箇所が発現することが知られている。キノリン酸は神経毒性物質で、グルタミン酸神経系の NMDA 受容体に結合する。そこで、NMDA (*N*-メチル-D-グルタミン酸) と NA 各 1 mg を投与したところ、'slow autotomy' が観察された。NMDA のみでは自切が起こらなかった。NMQA+NA および NMDA+NA による自切は、NMDA 受容体のオープンチャンネルブロッカーである MK801 により抑制された。また、NMDA 受容体の阻害剤であるマグネシウムイオンも自切を抑制する。これらのことから、マヒトデの自切にはグルタミン酸神経系の NMDA 受容体が関与し、その基質は NMQA であると考えられる。

生殖期のイトマキヒトデの神経抽出物から、マヒトデの産卵を制御する物質として L-グルタミン酸が同定されている。そこで、マヒトデに L-グルタミン酸 1 mg を投与した後に NA と NMQA 各 1 mg を投与したところ、自切が抑制された。生殖巣の発達に伴って、

自切が起こりにくくなる現象は、このことによつて説明できる。

よつて、'slow autotomy'には、グルタミン酸神経系が関与していると考えられるが、これまで放射神経系である棘皮動物がグルタミン酸受容体を持つという報告はなく、本知見により新たな進展が期待できる。

2) ニコチンアミド/ニコチン酸が関与する経路

NA の代わりにニコチン酸 (NAC) を NMQA と共に投与した場合にも、自切が起こる。NA と NAC は生体内で相互に変換される化合物 (ナイアシン、ビタミン B₃) で、補酵素 (NAD, NADP) を形成するが、これらの補酵素やその還元体 (NADH, NADPH) と NMQA を投与した場合には自切は起こらなかった。

NA と NAC は、ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ (Namt) により、ニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) に変換され、さらにニコチンアミド/ニコチン酸モノヌクレオチドトランスフェラーゼ (Nmnat) により NAD が合成される経路に利用されることがほ乳類などで知られている。ほ乳類では、NAD はポリ (ADP リボース) や cyclic ADP リボースの産生に使われることが知られている。これらの反応の際に、NA が遊離する。ヒトデ類がこれらの経路を持つことは、まだ確認されていない。

Namt の阻害剤である APO866 (FK866) が、NA + NMQA による自切を抑制したので、この酵素の働きが自切に関与していることが分かった。NA の代わりに NMN を NMQA と共に投与したが、自切は起こらなかった。よつて NA/NAC から Namt あるいは類似酵素による反応により生成される化合物 (NMN 類縁体?) が自切に関与していると考えられることから、現在、この化合物の同定とその機能の解析を進めている。

以上のことから、'slow autotomy'は NMDA 受容体を介した興奮性神経伝達系の賦活と NA/NAC が関与する経路が同時に作動したときに起こると推定した。

② 'quick autotomy'の分子機構

APF 粗抽出液を凍結乾燥して保存すると、自切に要する時間が長くなる。よつて、凍結乾燥あるいは冷凍保存中に 'quick autotomy'を誘起する因子の活性が低下していると考えた。また、APF 粗抽出液を調整する際に、加熱時間が長くなると 'quick autotomy'が誘起されなくなることから、熱に不安定なペプチドやタンパク質が関与する可能性が考えられる。

'Slow autotomy'に関与する NMDA 受容体は繰り返す刺激による電位の増強や立ち上がりの遅い電位に関連する。そこで、'quick autotomy'には、グルタミン酸神経系の立ち

上がりの早い電位に関係する受容体 (AMPA 受容体) の賦活が関与しているのではないかと考えた。AMPA 受容体の基質として、海洋無脊椎動物ではアメフラシの神経ペプチド FMRFamide が報告されている。FMRFamide は無脊椎動物に分布しており、ヒトデ類ではこのペプチドの類縁ファミリーである SALMFamide が存在するが、その役割はまだよく分かっていない。

ヒトデ類に共通の SALMFamide を使用して種々の条件で 'quick autotomy'の誘起を検討した結果、SALMFamide S1 と NA + NMQA およびその他の複数の生体成分を投与することにより、1.5 分で自切する活性を再現できるようになった。なお、SALMFamide S2 は自切を誘起しなかった。現在、その他の複数の生体成分の同定とそれらの化合物が関与する複数の経路の解明を行っている。

以上のことから、'quick autotomy'では 'slow autotomy'と同じグルタミン酸神経系の NMDA 受容体と共に、AMPA 受容体が連動する興奮性神経伝達系の賦活が起こっていると推定される。このことは、ヒトデ類にグルタミン酸受容体が存在することをさらに強く示唆すると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 8 件)

① 鶴飼和代ら、マヒトデ (*Asterias amurensis*) の自切の分子機構における N-メチルキノリン酸の役割、日本薬学会第 131 回年会、2011 年 3 月 31 日、ツインメッセ静岡

② Ukai Kazuyo et al, Identification of Autotomy-Promoting Factor from *Asterias amurensis* and Molecular Mechanism of Autotomy, PACIFICHEM 2010, 2010 年 12 月 19 日、ホノルル コンベンションセンター

③ 鶴飼和代ら、マヒトデの自切の分子機構、第 5 回化学生態学研究会、2010 年 6 月 11 日、函館 湯の川プリンスホテル渚亭

④ 鶴飼和代ら、マヒトデ (*Asterias amurensis*) の自切の分子機構、第 6 回棘皮動物研究集会、2009 年 12 月 12 日、東京 東京工業大学大岡山キャンパス

⑤ Ukai Kazuyo, Mechanism of Autotomy of *Asterias amurensis*, The 25th NAITO CONFERENCE on Chemical Biology II -An Emerging Field Inspired, 2009 年 9 月

9日、札幌 シャトレーゼガトーキングダム

⑥ 鵜飼和代、ヒトデの自切の化学(2) マヒトデの自切の分子機構、第4回化学生態学研究会、2009年6月13日、函館 湯の川プリンスホテル渚亭

⑦ 鵜飼和代ら、マヒトデ (*Asterias amurensis*)の自切の分子機構、日本薬学会第129回年会、2009年3月27日、京都国際会館

⑧ 鵜飼和代ら、マヒトデ (*Asterias amurensis*)の自切の分子機構、第50回天然有機化合物討論会、2008年9月30日、福岡国際会議場

[図書] (計1件)

① Ukai Kazuyo, Nakazawa Takahiro, Namikoshi Michio, Taylor & Francis, Echinoderms: Proceedings from the 12th International Echinoderm Conference, 2010年、3ページ (p547-549)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鵜飼 和代 (UKAI KAZUYO)

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60433512

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：