

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32702

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21342

研究課題名(和文)なぜ淡水モクズガニを海水に入れても死なないのか？高次浸透圧調節ホルモンの探索

研究課題名(英文) Isolation and characterization of a crustacean osmoregulatory hormone (COH) from Japanese mitten crab *Eriocheir japonica*

研究代表者

大平 剛 (Ohira, Tsuyoshi)

神奈川大学・理学部・教授

研究者番号：10361809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：モクズガニは降海産卵型の通し回遊を行うことから、高い浸透圧調節能力を持つ。本研究では、モクズガニのサイナス腺から浸透圧調節ホルモン候補分子を精製した。浸透圧調節ホルモン候補分子のアミノ酸配列を決定したところ、カニ類の血糖上昇ホルモンと相同性を示した。そこで、浸透圧調節ホルモン候補分子の血糖上昇活性を測定したところ、有意な活性が観察された。一方、浸透圧調節ホルモン候補分子の浸透圧調節活性は、生物検定系に問題があり結果を得ることができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エビやカニなどの甲殻類の浸透圧を上位で制御する浸透圧調節ホルモンが単離・精製された例はない。そのため、本研究によるモクズガニの浸透圧調節ホルモン候補分子の同定は世界最初の報告例である。モクズガニは通し回遊を行うカニ類として有名であるが、甲殻類の回遊を研究した例は皆無であり、降海や遡河の行動を促すホルモンは不明である。そのため、本研究の成果は甲殻類の回遊制御機構に切り込む世界初の知見となる可能性がある。また、エビやカニなどの甲殻類は高級水産食品として盛んに養殖されていることから、浸透圧の変化によるストレス評価手法の確立にも繋がる成果といえる。

研究成果の概要(英文)：Japanese mitten crab *Eriocheir japonica* has high osmoregulatory ability due to their catadromous migration to estuary for spawning. In this study, a crustacean osmoregulatory hormone (COH) was purified from the sinus gland of *E. japonica* and its amino acid sequence was determined. Since the sequence showed homology to the known crustacean hyperglycemic hormones from crabs, we examined hyperglycemic activity of *E. japonica* COH. As a result, this molecule exhibited significant hyperglycemic activity. On the other hand, osmoregulatory activity of *E. japonica* COH could not be detected due to problems with bioassay used in this study.

研究分野：甲殻類生理学

キーワード：浸透圧調節ホルモン 甲殻類 モクズガニ サイナス腺

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エビやカニなどの甲殻類は高級水産食品として盛んに養殖されている。しかし、高ストレス環境下での養殖は、品質の低下や死亡する可能性がある。そのため、種苗生産や育成などそれぞれの目的に適した飼育環境を作ることが重要である。甲殻類の養殖は主に海岸線で行われていることから、降雨や河川からの淡水の影響により塩分濃度の低下が起き易い。この様に、養殖されているカニやエビは外部浸透圧の変化によるストレスを受けやすく、そのため甲殻類の浸透圧調節に関する知見は非常に重要である。これまでに、甲殻類の能動輸送による体液浸透圧の調節機構や、組織中のオスモライト量を変化させる細胞内等浸透圧調節機構に関する研究が行われてきた。一方、甲殻類の浸透圧を上位で制御する浸透圧調節ホルモンが単離・精製された例はない。モクスガニは降海産卵型の通し回遊を行うカニ類であり、高度な浸透圧調節能力を備えていることが明らかとなっている。これらの背景を受けて、本研究ではモクスガニの浸透圧調節ホルモンを探索することにした。

2. 研究の目的

モクスガニは、イワガニ科に属するカニの1種であり、日本全国に広く分布している。モクスガニは淡水域の川で生息しているが、産卵をするために海水域に移動する。このようにモクスガニは降海産卵型の通し回遊を行うことから、高い浸透圧調節能力を持っている。実際に、完全な淡水に生息しているモクスガニを海水に移動させても生存できる。しかし、内分泌系の中核である眼柄を切除し、そのモクスガニを海水に移動させると死亡することから、眼柄内でモクスガニの浸透圧を調節するホルモンが合成・分泌されていると考えられる。本研究では、モクスガニを海水に入れてから短時間で変動する眼柄内因子を探索することで、浸透圧調節ホルモンを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)浸透圧調節ホルモン候補分子の探索

北海道網走市の網走湖でモクスガニを採集し、淡水で飼育を行った。そのモクスガニを海水に入れてから4時間後に眼柄を切除して冷凍した(海水眼柄)。対照群はモクスガニを淡水の入った別の容器に入れてから4時間後に眼柄を切除して冷凍した(淡水眼柄)。海水眼柄と淡水眼柄から、ホルモンを貯蔵しているサイナス腺を摘出した。摘出したサイナス腺はホモジナイザーを用いて破碎し、遠心分離を用いて上清と沈殿に分けた。沈殿に対してこの操作をもう一度行い、2回分の上清を合わせたものをサイナス腺抽出物とした。得られたサイナス腺抽出物を固相抽出に供し、眼柄ホルモンの部分精製を行なった。そして部分精製産物を逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)に供し、海水眼柄と淡水眼柄のクロマトグラムを比較した。

(2)浸透圧調節ホルモン候補分子の構造決定

(1)の実験で特定したピーク産物をMALDI-TOF/MSを用いた質量分析に供した。また、(1)の実験で特定したピーク産物をPfu Pyroglutamate Aminopeptidaseによる酵素消化に供した後、再度RP-HPLCを用いて精製し、アミノ酸シーケンサを用いてN末端アミノ酸配列を決定した。

(3)浸透圧調節ホルモン候補分子の浸透圧調節活性の測定

眼柄を切除した淡水モクスガニに、(1)で特定した浸透圧調節ホルモン候補分子を注射した後、海水に移して4時間後に採血した。対照群には生理食塩水を注射し、同様に採血を行った。採血した浸透圧を測定し、それらの値を比較することで、浸透圧調節ホルモン候補分子の活性を評価した。

(4)浸透圧調節ホルモン候補分子の血糖上昇活性の測定

(1)で特定した浸透圧調節ホルモン候補分子を、両眼柄を切除したモクスガニに1尾あたり1サイナス腺分注射した。対照群には生理食塩水を注射した。注射前と注射2時間後の血糖値を測定し、注射後の血糖値の変化量を求めた。

4. 研究成果

(1)浸透圧調節ホルモン候補分子の探索

海水眼柄と淡水眼柄のクロマトグラムを比較した結果、海水眼柄で小さくなるピーク産物が観察された(図1)。これは、海水に入れたモクスガニが体内浸透圧を急激に調節する必要があるため、眼柄から浸透圧調節ホルモンを血中に分泌したためと考えられる。そのため、このピーク産物がモクスガニの浸透圧調節ホルモン候補分子と考えられた。

(2)浸透圧調節ホルモン候補分子の構造決定

(1)で同定した浸透圧調節ホルモン候補分子をN末端アミノ酸配列解析に供したが、アミノ酸配列は得られなかった。MALDI-TOF/MSを用いた質量分析に供した結果、既知のカニ類の血糖上

昇ホルモンの分子量と近い値が検出された。既知のカニ類の血糖上昇ホルモンは N 末端がピログルタミン化されていることから、モクズガニの浸透圧調節ホルモン候補分子の N 末端もピログルタミン化されていると推定し、Pfu Pyroglutamate Aminopeptidase による酵素消化を行った。消化産物を RP-HPLC で精製し、再度、浸透圧調節ホルモン候補分子の N 末端アミノ酸配列を決定した。その結果、34 残基目までのアミノ酸配列を決定できた。このアミノ酸配列を BLAST 解析に供した結果、予想通りカニ類の血糖上昇ホルモンと相同性を示した (図 2)。

(3)浸透圧調節ホルモン候補分子の浸透圧調節活性の測定

(1)で同定した浸透圧調節ホルモン候補分子の浸透圧調節活性を調べた結果、浸透圧調節ホルモン候補分子注射群と生理食塩水注射群の浸透圧の変化量に有意な差は観察されなかった (図 3)。しかし、生理食塩水注射群の浸透圧が上昇していないことから、本研究の実験条件が良くないと考えられた。予備実験として、モクズガニを淡水から海水に移してから 24 時間後の浸透圧を測定したところ、浸透圧が有意に上昇した (data not shown)。この結果より、モクズガニを海水に移動させてからの時間を 4 時間よりも長くする必要があると考えられた。

(4)浸透圧調節ホルモン候補分子の血糖上昇活性の測定

(2)の実験により、浸透圧調節ホルモン候補分子は、既知の甲殻類血糖上昇ホルモンとアミノ酸配列がよく似ていることが明らかとなった。そこで、浸透圧調節ホルモン候補分子の血糖上昇活性を調べてみたところ、浸透圧調節ホルモン候補分子注射群で血糖値が有意に上昇した (図 4)。この結果より、浸透圧調節ホルモン候補分子は血糖上昇ホルモンとして働いている可能性も考えられた。

図1. モクズガニの浸透圧調節ホルモン候補分子の生成

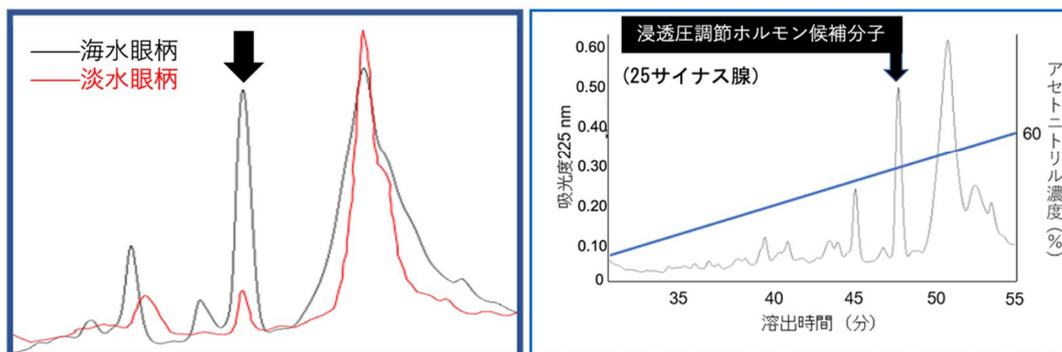


図2. モクズガニの浸透圧調節ホルモン候補分子のアミノ酸配列

モクズガニ浸透圧調節ホルモン候補分子： AYDRSCKGI YDRSLFSKLE HVCDDCFNLY RSSHV
 アオガニCHH： pEIIDSSCKGV YDRAIFNELE HVCDDCYNLY RNSRV
 タイワンガザミCHH： pEIIDSSCKGV YDRAIFSELE HVCDDCYNLY RTSRV
 ケガニCHH： pEIIDTSCKGV YDRGLFSDLE HVCDDCYNLY RNSHV

図3. モクズガニの浸透圧調節ホルモン候補分子の浸透圧調節活性

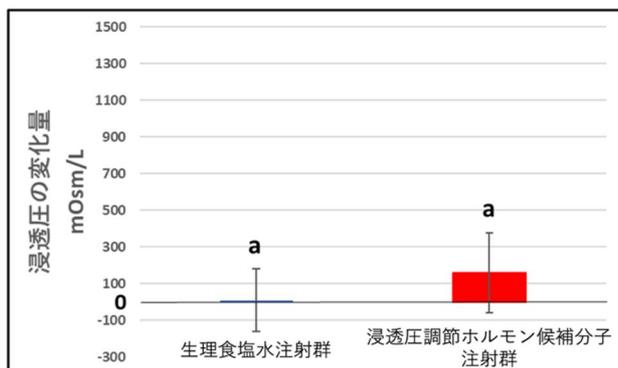
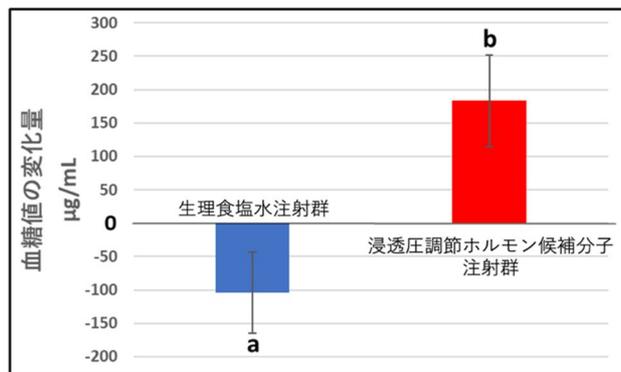


図4. モクズガニの浸透圧調節ホルモン候補分子の血糖上昇活性



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 星合志樹、萩原裕大、豊田賢治、市川卓、大平剛 |
| 2. 発表標題 甲殻類の浸透圧調節ホルモンの探索 |
| 3. 学会等名 第92回日本動物学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 市川 卓 (Ichikawa Takashi) (20443393) | 東京農業大学・生物産業学部・准教授 (32658) | |
| 研究分担者 | 豊田 賢治 (Toyota Kenji) (00757370) | 新潟大学・佐渡自然共生科学センター・特任助教 (13101) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|