

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510294

研究課題名(和文) 未利用海洋生物資源に由来する「刺胞」からの新規機能性分子の創出

研究課題名(英文) Searching for novel compounds from the nematocysts.

## 研究代表者

永井 宏史 (Nagai, Hiroshi)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授

研究者番号：50291026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ハブクラゲ *Chironex yamaguchii* の刺胞からペプチド毒素の単離に成功した。本毒素はスジエビに対する致死活性を有していた。我が国のクラゲからペプチド毒素を単離したのは本研究が初めてである。各種クラゲのもつ刺胞の刺糸(毒針)の長さを比較検討した結果、毒性が強いとされるクラゲは毒針がより長いことが認められた。刺胞動物に広く存在する新規化合物 cnidarin 類を単離し、その構造決定を行った。

研究成果の概要(英文)：A peptide toxin was isolated from the nematocysts of *Chironex yamaguchii* (Japanese Name; Habu-kurage). The toxin showed lethality to the shrimp *Palaemon paucidens*. We compared lengths of the discharged nematocyst tubules of harmful and harmless jellyfish species. The results showed that the needle of harmful jellyfish was long enough to penetrate human epidermis and to mechanically stimulate pain receptor neuron and inject venom into corium tissue. On the other hand, less or none pain causing harmless jellyfish species has shorter needle which is not long enough to penetrate the epidermis. We concluded that difference in the length of the needle makes difference of degree of the pain in the jellyfish sting. The new compounds, cnidarins, were isolated from the Cnidarians and elucidated their structures.

研究分野：海洋天然物化学

キーワード：刺胞動物 毒素 刺糸 毒性 構造決定

## 1. 研究開始当初の背景

刺胞動物のヒトへの刺傷被害は世界中の海、特に沿岸域で主に発生している。刺胞動物のうち、数十種の生物はヒトへの激しい刺傷能力のために海洋危険生物とみなされている。刺胞は、すべての刺胞動物に備わった捕食と防御を担う 5-100  $\mu\text{m}$  ほどの相手に毒を注入することに特化したカプセル状の器官である。つまり、すべての刺胞動物は多かれ少なかれ毒を持っている。刺胞動物の刺傷被害は、刺胞の発射にともなう刺系の皮膚組織への貫通ならびに毒液の注入によって引き起こされ、一般的に刺傷は瞬間的な痛みと引き続いておこる長時間の痛みやかゆみ、腫れを伴う症状で知られている。また、重篤な刺傷例として、ハブクラゲやカツオノエボシではショック症状や心停止による死亡例も報告されている。刺傷被害の直接的な原因となる刺胞は、堅い外壁中に毒液と裏返しに収納された刺系を持ち、発射時は刺系が反転しながら伸張して対象物に刺さり毒液を注入する。刺胞の発射のスピードは生物界で最も速く、発射完了まで約 3 ms とされている。つまり、発射された刺胞は一瞬にして刺系を対象物の皮膚に貫通させて毒液を注入する。これまで、刺胞について刺傷時におこる刺系による物理的な皮膚への影響と、刺傷被害で共通してみられる症状、特に瞬間的で強烈な痛みの関係を説明する具体的な試みは未だなされていない。一方で、刺胞内の毒液を探索源とした毒物学的、化学的な知見が若干報告されている。たとえば、*Physalia* 属のクラゲ刺胞からは 24 kD 溶血・致死性のタンパク質毒素が単離され、

ハブクラゲ刺胞からは 44 kDa の溶血性主要タンパク質毒素 CqTX-A が単離されている。そのほか、アンドンクラゲ刺胞からは 43 kDa の溶血性タンパク質毒素 CrTX-A が単離されその化学的性状が明らかにされ、CrTX-A がアンドンクラゲ刺傷時の皮膚の炎症の原因物質であることが示された。しかし、それらタンパク質毒素の性状だけでは刺傷動物による刺傷で引き起こされる共通の症状、特に痛みについては直接的な原因を説明するのに十分ではない。また、現在までに刺胞内から直接的に刺傷時の痛みやかゆみなど症状を引き起こす証拠となるような化合物の探索はなされていなかった。

## 2. 研究の目的

これまでの刺胞の性質と刺胞内成分の研究では、刺胞動物のヒトへの刺傷で共通してみられる痛みなどの症状の発生を十分に説明することができなかった。そこで本研究では刺胞動物の刺傷によって引き起こされる症状に関して物理的、化学的な原因を考察することで、刺傷による痛みをはじめとした刺傷被害のメカニズムを考察することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 刺傷時に痛いと言われる刺胞動物の刺胞における刺系長を測定し、痛みとの関係について考察した。日本近海のクラゲで刺傷時の痛みが強いハブクラゲおよびカツノエボシ、刺傷時に強くはないが十分な痛みを感じるアカクラゲ、無痛であるミズクラゲについて、それぞれの刺系長を測定し

た。

(2) ハブクラゲ刺胞内に存在する遊離アミノ酸と痛み関連物質の定量ならびに化学的研究をおこなった。刺傷時の痛みについては、瞬間的におこる痛み以外にも持続性の痛みがあることが知られている。持続性の痛みの発生の原因を探索するために、刺傷被害が数多く報告されるハブクラゲについて、刺胞内のアミノ酸、生理活性アミンの探索と定量分析をおこなった。

(3) 刺胞内から、アミンやアミノ酸以外の低分子成分について探索した。つまり LC-MS を用いてハブクラゲ刺胞内の低分子化合物の探索ならびに単離をおこなった。ここで単離した未知化合物群について核磁気共鳴 (NMR)、質量分析などを用いて構造決定をおこなった。

#### 4. 研究成果

(1) アカクラゲ、ハブクラゲ、カツオノエボシ、アンドンクラゲ刺傷でおこる皮膚の痛みは、刺糸が物理的に表皮下神経叢付近ないしは真皮神経叢付近の A $\delta$  線維の自由終末を物理的に刺激するために発生していることが推測された。一方、ミズクラゲの平均刺糸長は、それら神経叢を刺激するほど長くないため、刺傷時に痛みを感じないことが推測された。

(2) 痛みに関与する神経伝達物質であるグルタミン酸、ヒスタミン、コリン、アセチルコリン誘導体は他の組織と比較して特に刺胞内に偏在していた。これらがハブクラゲ刺傷において一回の刺傷で注入される量は、痛み惹起の原因物質として機能することが示された。コリンは表皮に分布する神経の末端

でアセチルコリンに変換され、結果的に皮下に注入されるアセチルコリンの総量は増える。これら各種神経伝達物質の刺傷時の皮下への注入は、痛み惹起のみならず痙攣など他の神経性症状への関与も示唆された。

(3) 複数の  $\gamma$ -グルタミン酸によって構成される新規環状ペプチド群 cnidarines を見出した。さらに cnidarines は刺胞動物の全 4 綱にわたるすべての試験した生物種の刺胞内液中に存在が確認された。そのため cnidarines は刺胞動物の刺胞内に特異的に含まれる物質群であると考えられた。

以上の 3 つの成果をとりまとめると、今回の研究でクラゲ刺傷によって引き起こされる痛みに関して、初めて物理的・化学的な原因を一部明らかにすることができた。物理的な要因として、刺胞の刺糸が直接ヒトの侵害受容器に刺激を与えて刺胞時の瞬間的な痛みを引き起こしていることが考察された。化学的な要因として大量のグルタミン酸が皮下で痛み物質として作用していることが推測された。さらに、著量のアセチルコリンやヒスタミンが皮下で直接かゆみや痛み増幅に関連し、大量のコリンが刺傷部の皮下神経終末においてアセチルコリンに変換され、痛みないしはショック症状を誘起する要因となっていることも推測された。さらに、単離された新規ペプチドである cnidarines については刺胞動物の全 4 綱にわたって分布する刺胞動物に特異的な物質であることが示された。この cnidarines の存在意義の解明は今後の興味深い検討課題である。

<引用文献>

Fenner PJ and Williamson JA. 1996.

Worldwide deaths and severe envenomation from jellyfish stings. MJA 165:658-661.

Tardent T. 1995. The cnidarian cnidocyte, a high-tech cellular weaponry. BioEssays 17:351-362.

Fenner PJ. 1998. Dangers in the Ocean: The traveler and marine envenomation. I. Jellyfish. 1998. J Travel Med 5:135-141.

沖縄県衛生環境研究所 2001. 平成 13 年度海洋危険生物対策事業報告書, 1-6.

Stein MR, Marraccini JV, Rothschild NE, Burnett JW. 1989. Fatal Portuguese man-o-war (*Physalia physalis*) envenomation. Ann Emerg Med 18:312-315.

Holstein T and Tardent P. 1984. An ultrahigh-speed analysis of exocytosis: nematocyst discharge. Science 223:830-833.

Tamkun MM, Hessinger, DA. 1981. Isolation and partial characterization of a hemolytic and toxic protein from the nematocyst venom of the Portuguese Man-of-War, *Physalia physalis*. Biochim Biophys Acta 667:87-98.

Nagai H, Takuwa-Kuroda K, Nakao M, Oshiro N, Iwanga S, Nakajima T. 2002. A novel protein toxin from the deadly box jellyfish (sea wasp, Habu-kurage) *Chiropsalmus quadrigatus*. Biosci Biotechnol Biochem 66:97-102.

Nagai H, Takuwa-Kuroda K, Nakao M, Ito E, Miyake M, Noda M, Nakajima T. 2000. Novel proteinaceous toxins from the box jellyfish (sea wasp) *Carybdea rastoni*. Biochem Biophys Res Commun 275:582-588.

#### 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)

[雑誌論文](計 10 件)

Comparison of cytotoxicity among pectenotoxin-2 and other oxidized pectenotoxins in a rat myoblast cell line (L6) and a human rhabdomyosarcoma cell line (RD). Ryoji Matsushima, Saori Kikutsugi, Ryuichi Watanabe, Hajime Uchida, Takeshi Yasumoto, Hiroshi Nagai, Masaki Kaneniwa, Toshiyuki Suzuki. Fundamental Toxicological Sciences 2, 49-54 (2015) (査読有)  
(DOI: 無し)

Two New Lyngbyatoxin Derivatives from the Cyanobacterium *Moorea producens*.

Weina Jiang, Satoshi Tan, Yusuke Hanaki, Kazuhiro Irie, Hajime Uchida, Ryuichi Watanabe, Toshiyuki Suzuki, Bryan Sakamoto, Michiya Kamio, Hiroshi Nagai. Marine Drugs 12, 5788-5800 (2014) (査読有)

(DOI: 10.3390/md12125788)

A New Lyngbyatoxin from the Hawaiian Cyanobacterium *Moorea producens*. Weina Jiang, Wei Zhou, Hajime Uchida, Masayuki Kikumori, Kazuhiro Irie, Ryuichi Watanabe, Toshiyuki Suzuki, Bryan Sakamoto, Michiya Kamio, Hiroshi Nagai. Marine Drugs 12, 2748-2759 (2014) (査読有)

(DOI: 10.3390/md12052748)

A convenient HPLC method of okadaic acid analogues as 9-anthrylmethyl esters with an automatic column switching cleanup method. Hajime Uchida, Ryuichi Watanabe, Ryoji Matsushima, Naoyuki Uchida, Hiroshi Nagai, Michiya Kamio, Takeshi Yasumoto, Toshiyuki Suzuki. Journal of AOAC International 97, 391-397 (2014) (査読有)

(DOI: 10.5740/jaoacint.SGEUchida)

Effects of the methoxy group in the side chain of debromoaplysiatoxin on its tumor-promoting anti-proliferative activities. Ryo C. Yanagita, Hiroaki Kamachi, Masayuki Kikumori, Harukuni Tokuda, Nobutaka Suzuki, Kiyotake Suenaga, Hiroshi Nagai, Kazuhiro Irie. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 23, 4319-4323 (2013) (査読有)

(DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.05.096)

LC-MS/MS analysis of palytoxin analogues in blue humphead parrotfish *Scarus ovifrons* causing human poisoning in Japan. Toshiyuki Suzuki, Ryuichi Watanabe, Ryoji Matsushima, Kenji Ishihara, Hajime Uchida, Saori Kikutsugi, Tomoko Harada, Hiroshi Nagai, Masao Adachi, Takeshi Yasumoto, Masakazu Murata. Food Additives & Contaminants 30, 1358-1364 (2013) (査読有)

(DOI: 10.1080/19440049.2013.790085)

Evaluation of the bioactivities of water-soluble extracts from twelve deep-sea jellyfish species. Takenori Kawabata, Dhugal J. Lindsay, Minoru Kitamura, Satoshi Konishi, Jun Nishikawa, Shuhei Nishida, Michiya Kamio, Hiroshi Nagai. Fisheries Science 79, 487-494 (2013) (査読有)

(DOI: 10.1007/s12562-013-0612-y)

Structure-activity studies on the spiroketal moiety of a simplified analogue of debromoaplysiatoxin with antiproliferative activity. Masayuki Kikumori, Ryo C. Yanagita, Harukuni Tokuda, Nobutaka Suzuki, Hiroshi Nagai, Kiyotake Suenaga, Kazuhiro Irie. *Journal of Medicinal Chemistry* 55, 5614-5626 (2012) (査読有)  
(DOI: 10.1021/jm300566h)  
LC-MS/MS analysis of novel ovatoxin isomers in several *Ostreopsis* strains collected in Japan. Toshiyuki Suzuki, Ryuichi Watanabe, Hajime Uchida, Ryoji Matsushima, Hiroshi Nagai, Takeshi Yasumoto, Takamichi Yoshimatsu, Shinya Sato, Masao Adachi. *Harmful Algae* 20, 81-91 (2012) (査読有)  
(DOI: 10.1016/j.hal.2012.08.002)  
Synthesis and structure-activity studies of simplified analogues of aplysiatoxin with anti-proliferative activity like bryostatin-1. K. Irie, M. Kikumori, H. Kamachi, K. Tanaka, A. Murakami, R.C. Yanagita, H. Tokuda, N. Suzuki, H. Nagai, K. Suenaga and Y. Nakagawa. *Pure Appl. Chem.* 84, 1341-1351 (2012) (査読有)  
(DOI: 10.1351/PAC-CON-11-08-22)

〔学会発表〕(計 14 件)

赤木拓也・滝本彩佳・鈴木秀和・神尾道也・永井宏史「新規な付着珪藻生育阻害試験法について」平成 27 年度日本水産学会春季大会 2015 年 3 月 27-31 日  
堤 美葵・内田 肇・根平達夫・渡邊龍一・鈴木敏之・神尾道也・永井宏史「沖縄産ラン藻 *Moorea producens* から得られた化合物群について」平成 27 年度日本水産学会春季大会 2015 年 3 月 27-31 日 (東京)  
鈴木靖子・神尾道也・近藤裕介・大塚攻・永井宏史「凍結乾燥したクラゲ刺胞の毒性評価」平成 27 年度日本水産学会春季大会 2015 年 3 月 27-31 日 (東京)  
江偉娜、丹智史、周威、内田肇、菊森将之、入江一浩、渡邊龍一、鈴木敏之、神尾道也、永井宏史「ラン藻 *Moorea producens* より単離した新規 Lyngbyatoxin A 誘導体の構造および生物活性」第 56 回天然有機化合物討論会 2014 年 10 月 15-17 日 (高知)  
W. Jiang, W. Zhou, H. Uchida, M. Kikumori, K. Irie, R. Watanabe, T. Suzuki, B. Sakamoto, M. Kamio, H. Nagai「12-Epi-Lyngbyatoxin A, a New Toxic Substance from the Cyanobacteria *Moorea producens*」W The 10th IST Asia Pacific Conference on Animal, Plant and Microbial Toxins 2014 年 6 月 14-18

日 (国際学会・中国・長沙)  
永井宏史「クラゲ刺胞研究の新たな展開について」第 28 回海洋生物活性談話会 2014 年 5 月 10-11 日 (福岡県・福津市)  
丹 智史・内田 肇・江 偉娜・岩田 恭江・渡邊 龍一・鈴木 敏之・神尾 道也・永井 宏史「ラン藻 *Moorea* 属から得られた新規 lyngbyatoxin A 誘導体の構造と活性」日本農芸化学会 2014 年度大会 2014 年 3 月 27-30 日 (川崎)  
山田真優・神尾道也・永井宏史「クラゲ刺傷被害と刺糸長との関連についての研究」平成 25 年度日本水産学会春季大会 2013 年 3 月 26-29 日 (東京)  
江 偉娜・周 威・内田肇・渡邊龍一・鈴木敏之・神尾道也・永井宏史「ラン藻より得られた新規 lyngbyatoxin A 誘導体の構造について」平成 25 年度日本水産学会春季大会 2013 年 3 月 26-29 日 (東京)  
百瀬紋乃・神尾道也・永井宏史「エチゼンクラゲ刺胞由来のタンパク質毒素に関する研究」平成 25 年度日本水産学会春季大会 2013 年 3 月 26-29 日 (東京)  
永井宏史「クラゲの毒に関する研究の現状」平成 24 年度日本水産学会水産増殖懇話会第一回講演会 2012 年 9 月 14 日 (下関・招待講演)  
永井宏史「ある種のクラゲに刺されると痛いのはなぜか? クラゲ刺傷時の痛みのメカニズム解明に向けて」第 59 回トキシシンポジウム 2012 年 8 月 30-31 日 (帯広)  
Hiroshi Nagai "Protein toxins of the marine animals" The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference 2012 July 13-16 Kochi, Japan (高知、国際学会・招待講演)  
Wei Zhou, Wina Jiang, Fuminori Kondo, Hajime Uchida, Toshiyuki Suzuki, Ryuichi Watanabe, Michiya Kamio, Hiroshi Nagai "A new malyngamide from the cyanobacteria *Lyngbya majuscula*" The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference 2012 July 13-16 Kochi, Japan (高知、国際学会)

〔図書〕(計 1 件)

Hiroshi Nagai Marine protein toxins. In "Handbook of Marine Natural Products" Eds. E. Fattorusso, W.H. Gerwick, O. Tagilialatela-Scafati, Springer-Verlag, pp.1389-1420 (2012)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)  
名称: キレート機能を有する新規化合物、その製造方法及び用途  
発明者: 永井宏史、北谷龍樹  
権利者: 東京海洋大学

種類：特許  
番号：特願 2014-95406  
出願年月日：平成 26 年 5 月 2 日  
国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

[http://www2.kaiyodai.ac.jp/~nagai/nagai\\_labhomepage/](http://www2.kaiyodai.ac.jp/~nagai/nagai_labhomepage/)

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

永井 宏史(NAGAI, Hiroshi)  
東京海洋大学・大学院海洋科学技術研究  
科・教授  
研究者番号：50291026