

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510303

研究課題名(和文) ヒトデの自切の分子構造と疼痛機構の関連性に関する研究

研究課題名(英文) Mechanism of starfish's autotomy and a pain were related

研究代表者

鶴飼 和代 (Ukai, Kazuyo)

東北薬科大学・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) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトデの中には、生育環境の悪化や、敵に襲われた際に腕を切り離す種類がある。マヒトデの自切はNMQAとNAの1:1混合物で誘起され、APF (NMQA NAの1:1の混合物) は、ニッポンヒトデとエゾヒトデの自切も誘起するのでヒトデに共通のAPFであると考えられる。

このAPFを用いて自切機構の解明に取り組んでいる過程で時間を要する 'slow autotomy' において、炎症性の機構が関与していること、神経変性保護作用、鎮痛作用を示す阻害剤が自切時間の短縮をもたらすことが分かった。これらの機構を観察したところ、自切時間が短縮された場合、切断した腕の再生には時間が必要なことが観察された。

研究成果の概要(英文)：Autotomy, the capacity to detach a body part, is a very characteristic defense mechanism in starfish. We identified the structure of the autotomy-promoting factor that induces autotomy: a 1:1 mixture of nicotinamide (NA) and N-methylquinolinic acid (NMQA). We characterized the molecular pathways of this process for the first time, using *Asterias amurensis*.

Inflammatory mechanism was related to 'slow autotomy'. Active compounds with protective neurodegeneration brought shortening of arm detachment time.

研究分野：天然物化学

キーワード：ヒトデ 自切 NMDA受容体

1. 研究開始当初の背景

ヒトデの中には、生育環境の悪化や、敵に襲われた際に腕を切り離す種類がある。この自切は腕の長いヒトデに特徴的な生体防御現象である。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、20分～1日以上をかけて自切し（'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。

自切に関与する生体物質の探索はこれまで外国種で行われ、自切誘起因子 (autotomy-promoting factor, APF) と命名されたが、化合物の特定には至らなかった。我々はマヒトデ (*Asterias amurensis*) の APF の探索を行い、加熱して自切させた個体の体腔液から、*N*-メチルキノリン酸 (NMQA) とニコチンアミド (NA) を同定した。NMQA と NA は、1:1 で混合して投与 (1+1 mg / 100 g body weight) した時に 'slow autotomy' を誘起した。この APF (NMQA NA の 1:1 の混合物) は、ニッポンヒトデとエゾヒトデの自切も誘起するのでヒトデに共通の APF であると考えられる。

ヒトデの自切では、NMQA はグルタミン酸神経系 NMDA 受容体に結合することを明らかにした。NMDA 受容体の開口で Ca^{2+} の流入が起こり、リン酸化カスケードが働く。これは下流の PPP1R1B (PP1 制御サブユニット 1B = DARPP-32) にてリン酸化カスケード制御機構を介してドパミン受容体 (D1, D2) やグルタミン酸神経系が関与する興奮性神経系 (+の活動電位) の機構に作用し、PP1 を阻害して自切を引き起こす。

NA は NAD シグナリングに関与すると予測し、NMN に代謝する酵素 Nampt を阻害すると自切が阻害された。一方、NAD より先の代謝に関連するタンパク質 PARP, PARP, CD38, SIRT1 を阻害すると、いずれも自切時間が短縮された。NA はこれらを抑制することから、NA + NMQA と NAD 代謝物を投与すると、代謝段階毎に自切時間が短縮した。詳細を検討し、CD38 が関与するリアノジン受容体を介した小胞体の Ca^{2+} 依存性 Ca^{2+} 放出機構 (CICR) と SIRT1, CD38 (cADPribose 合成機能), PARP の阻害で 'slow autotomy' が起こることが明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究では APF を用いて、ヒトデの 'slow autotomy' の CICR 以降のカスケード、NMDA 受容体からのシグナリング、ガングリオシドが関わる自切機構を解明すること、その上で、まだ未解明な部分の多いほ乳類の疼痛機構の解明へとつながる知見をもたらすことを目指した。

(1) 関連するタンパク質の存在の証明

ヒトデの自切に関与する NMDA 受容体、CD38、キノリン酸産生酵素 3H34DA と同様

のタンパク質がヒトデに存在することを、タンパク質及び遺伝子を確認することで、証明する。

(2) 活性酸素の産生機構の証明

APF による自切では、pH がおよそ 1 低下する体腔液のアシドーシスが観察されるので、何らかの生体内酸化機構が働いている。加熱で自切させた体腔液は、通常の体腔液より pH が 3 も低下する場合がある。加熱体腔液にはキサンチンが存在し、pH の低下に伴いその量が増加する。キサンチンの産生に関与するキサンチンオキシダーゼは、常態では多量には発現しない。しかし NO シンターゼ由来の NO と、ストレス発生時などに産生する活性酸素が結合したパーオキシナイトライト (ONOO⁻) が、キサンチンデヒドロゲナーゼの一部と置換してキサンチンオキシダーゼとなり、火傷患部などで多量に産生する。NO の産生は確認したが、活性酸素の産生は未確認である。そこで、オキシダーゼなどの関与を検討し、活性酸素の産生機序を明らかにする。

(3) ネクローシス様機構の存在の検証

NMDA 受容体などの興奮性神経伝達系が関与する PPP1R1B 機構では、PP1 の阻害 (基質のリン酸化の継続) は興奮を継続させることから、興奮性神経細胞死に類似する機構が示唆される。さらに、ONOO⁻ は変異原性物質で、DNA の二酸化変性をもたらす。DNA チェック、DNA 修復、修復が不能な際のアポトーシス、アポトーシスを中断する形のネクローシスはいずれも PARP が関与する。よって、PARP 制御機構を中心とした自切機構の全体像の解明により、ネクローシス機構や神経伝達機構制御の解明に貢献するものと期待している。

(4) 神経変性保護作用を持つ化合物が自切を促進する意味の解明

マヒトデの自切時間を短縮した阻害剤は、Tautomycetin を除く全てに神経変性保護作用が報告されている。一方、ヒトデの自切では興奮性神経細胞死に類似の機構が示唆され、神経変性の抑制はヒトデ生体の負荷を低減する生体防御機構の可能性がある。そこで、興奮性神経細胞死の機構が予測されるにも関わらず、神経変性保護作用を持つ阻害剤が自切を促進する意味を検討する。

(5) ガングリオシドが関与する自切の分子機構の解明

これまでにガングリオシド粗抽出画分が自切までの時間を短縮することが分かっているので、画分中のガングリオシド分子種を単離・同定する。同定したガングリオシドを用いてガングリオシドが関わる自切の分子機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 生物検定試験および抽出用のマヒトデの採集

東京湾、仙台湾、陸奥湾のマヒトデは漁業従事者からの購入あるいは、スキューバダイ

ピングにより採集する。生物検定に使用するマヒトデはマリンピア松島（宮城郡）の流水水槽で飼育する。生殖巣の発達が見られる1月～4月は自切の再現性が低下するため使用出来ない。

(2) 生物検定試験

試料を海水に溶解し、正常なマヒトデの腕の1本に注射器で注入する。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う。

(3) 遺伝子の発現（研究の目的項目(1)）

グルタミン酸神経系 NMDA 受容体、膜タンパク質 CD38、キノリン酸の産生をもたらす 3H34DA は、ほ乳類で既に確認された遺伝子配列を基にプライマーを設計し、PCR、各種プロットングを実施して、発現を確認する。修飾がかかっている可能性があるため、類似の修飾プライマーも必要に応じて作成し、同様の実験を行う。

(4) ATP の生体内挙動（研究の目的項目(3)）

始めに、APF を用いて自切させるマヒトデの体腔液、管足内液の採取と、自切する付近の口側、反口側の表皮、放射神経の ATP を測定する。放射神経は管足の奥にあり、解剖せずに確認することができるので、まず放射神経の拭き取りから ATP 量の測定が可能であるかどうかを検討する。次に、同一個体による計時的測定が可能かどうかを検討する。不可能であれば必要に応じて、解剖や細胞の採取を行い、細胞内の ATP 量の測定を実施する。ATP 検出には、市販の試薬を用いる。

(5) 活性酸素の影響の検討（研究の目的項目(2)）

はじめに、ラジカルスカベンジャーであるラジカット、エブセレン、レスベラトロールを投与して、自切への影響を調べる。自切が阻害された場合には、NADPH オキシダーゼ、シクロオキシダーゼなどのオキシダーゼの阻害剤を用いて、自切への影響を検討する。また、キサンチンオキシダーゼの阻害剤であるアロプリノールによる自切の阻害の有無を調べ、キサンチンオキシダーゼの自切への関与を確認する。

(6) 自切に関与するガングリオシドの単離・同定（研究の目的項目(5)）

ガングリオシドをカラムクロマトグラフィー、HPLC などを用いて単離・同定し、APF と共に投与する生物検定を実施して、自切に関与する分子種を決定する。

(7) CICR 以降の自切機構（研究の目的項目(2)及び(4)）

始めに、ホスホリパーゼ A₂ 阻害剤としてマノアライドを用い、自切への影響を検討する。また自切への関与が推定されるシクロオキシダーゼについて、その阻害剤を用いて自切への影響を検討する。

(8) ガングリオシドの関与する自切機構（研究の目的項目(5)）

免疫抑制剤、カルシニューリン（PP2B）

阻害剤のシクロスポリン、タクロリムスは CD38 の後にあたるカスケードに関与し、いずれも自切時間の短縮をもたらす。ほ乳類では脂肪細胞の CD38 を阻害し、PP2B の活性を阻害するガングリオシド GM3 分子種が報告されている。単離したガングリオシドを用いて、同様のガングリオシドによる作用が自切を誘起するかどうかを検討する。

(9) 自切関連器官の観察（研究の目的項目(3), (4), (5)）

始めに、APF 投与から自切に至る変化を、それぞれ口側と反口側について顕微鏡で観察する。各器官の詳細を観察し、自切の際の各器官の変化を明らかにする。

(10) サーチュインと自切の関連性（研究の目的項目(2)）

NA はサーチュイン（SIRT1）の阻害剤でもある。SIRT1 阻害剤を用いると自切時間が短縮されることから、SIRT1 の阻害が自切に関与すると判断した。SIRT1 の作用は非常に多く報告されていることから、阻害剤を用いて自切に影響する機構を検討する。始めに、ヒストン脱アセチラーゼ（HDAC）作用に関して、トリコスタチン（HDAC type I, II）と NAD 依存性の HDAC type III（= SIRT1）の阻害剤を用いて検討を実施する。

(11) ネクロシスの自切への関与（研究目的の項目(3)）

活性酸素、ONOO⁻の産生、生体内酸化、PARP の作用、ATP の枯渇が自切に必要な過程である場合は、制御性のネクロシスが起きている可能性がある。そこで得られる実験データから、自切の際にネクロシスが起きているかどうかを検討する。

(12) 自切機構と疼痛機構の関連性と神経変性保護作用の影響（研究の目的項目(4)）

得られたデータから、自切機構の全体像を描く。KEGG などの代謝データベースや文献検索を行い、生合成経路だけでなく、NO 産生の経路などのシグナル経路も合わせて検討することで、生体防御機構としての自切の解明を行う。この中で、疼痛機構に関与すると推定されるカスケードに関しては、ほ乳類で明らかとなっている機構との相同性を検討する。また、自切の全体の機構から、神経変性保護作用を持つ阻害剤が自切を促進する意義を考える。

4. 研究成果

これまでにヒトデの自切経路に関連があると推測された NMDA 受容体のサブユニット NR1、キノリン酸産生酵素 3H34DA は、既知のヒト遺伝子配列から作成したプライマーを用いて、マヒトデの遺伝子の探索を行ったところ、増幅が見られたことから、これらをマヒトデが持つ可能性が示された。CD38 は、ヒト、マウス遺伝子から作成したプライマーを用いたところ、増幅が見られなかった。そこで、類似の機能を持つ CD157 のヒト遺伝子から作成したプライマーを用いて探索を行っ

たところ、増幅が見られたことから、少なくとも CD157 をマヒトデが持つことが示唆された(研究の目的(1))。

キサントキシダーゼ阻害剤を用いたところ、自切時間の短縮が観察された。しかし、キサントキシンの前駆体となるヒポキサントキシンの代謝物の尿酸はいずれも自切を阻害すると共に、キサントキシンは APF の事前に投与すると、自切時間が短縮することが観察された。次に、ラジカルスカベンジャーを用いたところ、自切が阻害されたことから、ラジカルの産生が自切に必要なことが分かった。また、NADPH オキシダーゼは阻害すると自切が起きないことから、自切に必要な経路である可能性が示された(研究の目的(2))。

ラジカル産生が関与する可能性から、その関連機構の関連を検討した。炎症関連経路の検討をした際に、TNF- α を阻害すると自切時間の短縮が観察された。そこで、TNF- α に関連する機構が自切に影響を示すかどうかを検討したところ、制御性ネクロシスの機構を阻害すると、自切時間の短縮が見られた。そこで、さらに関連経路を検討し、カスパーゼ 3 を阻害すると自切時間が短縮することが分かった。カスパーゼ 3 は様々な細胞経路に関わるため、その詳細を調べている(研究の目的(3))。

TNF- α 関連機構を検討した際に、炎症性機構の抑制あるいは NSAIDs の投与で、自切時間の短縮が見られた。また、神経変性保護作用を持つ阻害剤が観察された。'Quick autotomy'では、これらの炎症性機構や神経変性機構はその反応の時間から関与していないことが推測される。'Slow autotomy'では、これらの機構が動くことで自切が起きているあるいは自切関連の機構に影響を与えるものにとらえた。2種類の自切を観察したところ、自切までの反応時間に加えて、切断した腕の再生までの時間が異なることが分かった。その詳細を今後調べることで、自切を促進する化合物の役割を明らかにすることができるのとらえている(研究の目的(4))。

多量のマヒトデの供給ができなかったため、ガングリオシドの単離には至らなかった。産生機構を考慮した際に、前駆体となるセラミド類の影響を調べたところ、セラミド類も自切時間を短縮することが分かった。そこで、ガングリオシド類への産生に至るセラミド類の産生経路を阻害剤で阻害したところ、自切は阻害された。今後さらに機構を詳細に検討する(研究の目的(5))。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

鵜飼和代、マヒトデの自切とガングリオ

シド産生経路、第7回化学生態学研究会、2012年6月29日、湯の川プリンスホテル渚亭(北海道・函館市)

鵜飼和代、マヒトデの自切とガングリオシド産生経路、第9回棘皮動物研究集会、2012年12月8日、東北大学農学部(宮城県・仙台市)

鵜飼和代、ヒトデの自切誘起因子と slow autotomy 機構、第27回海洋生物活性談話会、2013年5月25日、東京海洋大学品川キャンパス、(東京都・港区)

鵜飼和代、ヒトデの自切におけるキサントキシンの影響、日本薬学会第134年会、2014年3月29日、熊本市総合体育館(熊本県・熊本市)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

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

浪越 通夫 (NAMIKOSHI, Michio)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 30189196