

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780212

研究課題名(和文)メスガニ尿中の成熟脱皮関連バイオマーカーの探索

研究課題名(英文)Biomarker targetting on urine of pubertal premolt female crab

研究代表者

神尾 道也(KAMIO, Michiya)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・助教

研究者番号：30578852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：性フェロモンの解明の基礎情報を得るために、「ブルークラブのメスの成熟脱皮に伴う尿中代謝物の変動」を観測して、脱皮に伴って変動する分子N-Acetylglucosamino-1,5-lactoneを同定した。この代謝物の行動生理学上の機能は、NAGLに対するオスガニの反応を行動実験および、オスガニの触覚上の神経生理学の両方の観点から、オスガニにとっての匂い物質であること、すなわち「NAGLは脱皮の匂い」であり、脱皮メスから放出される性フェロモンの成分の一つである可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：To provide a basic information for pheromone research in mating of blue crab *Callinectes sapidus* we tried biomarker targetting in pubertal premolt female which contains sex pheromone. We have found biomarkers in pubertal premolt female urine using 1D and 2D NMR. Among the biomarkers, premolt biomarker was purified using various chromatography and identified as N-Acetylglucosamino-1,5-lactone (NAGL). In behavioral and neurophysiological experiment, NAGL was detected by antennule of male which is olfactory receptor organ of the crab. Thus we have found a smell of molting which is a candidate component of sex pheromone mixture using NMR based biomarker targetting.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：生化学 メタボローム バイオマーカー 甲殻類 フェロモン 脱皮 ブルークラブ

1. 研究開始当初の背景

成熟脱皮直前のメスガニの尿には恒常的な排泄物分子に加え、性フェロモン分子、脱皮関連分子、成熟関連分子などが含まれており、オスはこれらの分子の組み合わせを感知して、メスの成熟を知り、配偶行動を開始する。よって、成熟脱皮前後のメスの尿中にける代謝物の変動を明らかにすると、メスの成熟脱皮の生理、生化学の理解が深まるのと同時に配偶行動におけるケミカルコミュニケーションの理解へとつながる。応用面では、フェロモンの解明は選択的な漁法へ役立ち、脱皮と成熟の生化学の理解は養殖における成長の制御と研究に役立つ。しかしながら、カニ尿中の代謝物の組成はほぼ理解されていない。現在までにクラスタエクジソン、セラミド、UDP などがフェロモン候補化合物として上げられたが、成熟脱皮前のメス尿中に特異的に存在することは確認されておらず、活性の有無も不明である。甲殻類のフェロモンは複数の化合物の混合物として働いているので精製していくと活性が無くなるため、活性試験をしながら単離、同定するのは困難である。そこで、申請者らはフェロモンは成熟脱皮前のメスの尿に特異的に含まれる物質、すなわちバイオマーカーであることに着目し、雌雄の尿を対象にしたバイオマーカー探索によりフェロモンを解明することを考案した。しかし、カニ類は野生の生物であり、バイオマーカー探索のための比較実験に必用な脱皮前、脱皮直後、脱皮間期という特定の生理状態の雌雄の個体の尿を集めるのは困難であった。この問題点を解決するのがブルークラブである。米国のソフトシェルクラブ業者はブルークラブの脱皮前の個体を集め、脱皮させ、脱皮直後の殻の軟らかいソフトシェルクラブを生産するので、このソフトシェル業者を訪れることで各種の脱皮ステージの雌雄の尿を十分量採取することができ、比較実験が可能になった。

2. 研究の目的

本研究はブルークラブの尿中の代謝物(メタボローム)の変動を明らかにし、更に、成熟、脱皮および性に特異的な化合物(バイオマーカー)を同定する。これらの化合物は性フェロモン候補物質なので、同定後バイオアッセイにて活性試験を行う。また、これらの化合物の産生器官を突き止め、甲殻類フェロモン、脱皮、成熟に関する基礎研究を完成する。また、ジョージア州立大学の神経生物学部門との共同研究によって、カニの触角および脳内でのフェロモンに対する反応を探るための研究を進めており、期間内にフェロモンおよび他のバイオマーカーに対する嗅覚応答の神経生物学の研究も開始する。

3. 研究の方法

ブルークラブ尿中の成熟脱皮前メス特異的な化合物の探索、およびブルークラブ尿中の脱皮サイクルと共に変動する化合物の探索、の2つを核磁気共鳴装置(NMR)を用いて行い、メスの成熟と脱皮に特異的なバイオマーカーを探索し、HPLCなどで精製して同定する。

ブルークラブの雌雄の成熟脱皮直前、直後、および脱皮とかけ離れた未成熟個体、そして脱皮後長期間を経た個体の尿の成分を比較し、性別および成熟段階別の比較を行い、脱皮関連物質、性別特異的物質、メスの成熟脱皮直前に特異的な物質を明らかにする。さらにこの物質をオスが匂いとして感知するのかどうかを行動実験と神経生理学的手法を用いて検証した。

4. 研究成果

まず、1次元および2次元 NMR を用いて脱皮前後の雌雄の固体の尿中のメタボロームの比較を行った結果、脱皮前のメスの尿に多く含まれるシグナルが複数観測された。雌雄比較でメスの尿に多く含まれるものも確認できたが、脱皮前に多くなるシグナルの存在量が多く、同定作業が容易であるため、その単離と構造解析を試みることにした。

このシグナルに対応する化合物は非常に極性が高く、通常の C18 逆相クロマトグラフィーには全く吸着しなかったため、限外濾過、C30 逆相クロマトグラフィー、Amide 80 親水性相互作用クロマトグラフィーを組み合わせることで精製し、単離した状態で再度 NMR データを測定し、質量分析の結果と合わせて N-acetylglucosamino-1,5-lactone (NAGL) であることを明らかにした。

NAGL の脱皮ステージと性別による尿中濃度の変動を明らかにするため、脱皮前後の雌雄の成熟個体と未成熟個体の脱皮間期の雌雄の各個体の尿を個体ごとに NMR で測定し、NAGL 濃度を推定したところ、脱皮前の尿中に多く含まれ、脱皮後、脱皮間期には少なくなることが確認できた。

NAGL の標品がオスガニによって匂いとして感知されるかどうかを、確認するために、水槽中に単独で居るオスに NAGL の水溶液を与える実験を行ったところ、顎脚先端の epipod を激しく動かす行動、第一触角を振り動かす行動が観察された。この結果からオスは NAGL をにおいとして感じていることが示唆された。

次に匂い感知器であり、フェロモン受容器である第一触角が NAGL を検出しているのかどうかを触角の切片のカルシウムイメージング実験によって検討したところ、NAGL による刺激に対応してカルシウム濃度が上昇する嗅覚細胞が触角に存在することが確認された。

以上の結果から、NAGLは脱皮の匂いであることを確認でき、フェロモン混合物の一員である可能性が示唆された。今後もメス特異的な物質、更なる脱皮バイオマーカーなどを明らかにしていくことでブルークラブフェロモンの全容を解明することができると期待される。

NAGLはその構造から甲殻類の殻の主成分であるキチンの原材料であるN-アセチルグルコサミンの酸化物であるが、現在までにいかなる生物からも報告されたことがない。しかしながら、有機合成により得られた本化合物はキチン分解酵素の阻害剤として知られている。NAGLの生体内での役割は脱皮に伴うキチンの分解と合成の調整である可能性が考えられ、その検証は甲殻類の脱皮の科学における課題である。また、NAGLがブルークラブ以外の甲殻類や他の生物の体内にも存在するのかどうかも今後検証していくべき課題と、本研究の結果となった。

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 7 件すべて査読有)

Jiang, W., Zhou, W., Uchida, H., Kikumori, M., Irie, K., Watanabe, R., Suzuki, T., Sakamoto, B., Kamio, M., Nagai, H. 2014. A New Lyngbyatoxin from the Hawaiian Cyanobacterium *Moorea producens*. *Marine Drugs* 12: 2748-2759.

Kamio, M., Schmidt, M., Germann, M., Kubanek, J., Derby, C.D. 2014. The smell of moulting: N-acetylglucosamino-1,5-lactone is a premoult biomarker and candidate component of the courtship pheromone in the urine of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Journal of Experimental Biology* 217: 1286-1296.

Uchida, H., Watanabe, R., Matsushima, R., Uchida, N., Nagai, H., Kamio, M., Yasumoto, T., Suzuki, T. 2014. A convenient HPLC method of okadaic acid analogues as 9-anthrylmethyl esters with an automatic column switching cleanup method. *Journal of AOAC International* 97: 391-397

Kawabata, T., Lindsay, D.J., Kitamura, M., Konishi, S., Nishikawa,

J., Nishida, S., Kamio, M., Nagai, H. 2013. Evaluation of the bioactivities of water-soluble extracts from twelve deep-sea jellyfish species. *Fisheries Science* 79: 487-494

Kicklighter C.E.*, Kamio, M.*, Nguyen, L., Germann, M.W., Derby, C. D. 2011. Mycosporine-like Amino Acids are Multifunctional Molecules in Sea Hares and Their Marine Community. *Proceeding of National Academy of Science of USA* 108: 11494-11499. (*equally contributed first author)

Kamio, M., Kicklighter, C. E., Nguyen, L., Germann, M.W., Derby C.D. 2011. Isolation and Structural Elucidation of Novel Mycosporine-like Amino Acids as Alarm Cues in the Defensive Ink Secretion the Sea Hare *Aplysia californica*. Accepted by *Helvetica Chimica Acta*. 94: 1012-1018

神尾道也. 2011. アメフラシ類の化学防御機構: 捕食者と同種個体の化学感覚に働く複数の化学物質. 比較生理化学 29: 11-17. 【表紙に採用】

[学会発表](計 17 件)

「Biomarker targeting to identify candidate component of the courtship pheromone in the urine of the blue crab, *Callinectes sapidus*」Michiya Kamio・Julia Kubanek・Manfred Schmit・Markus Germann・Charles D. Derby The 10th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference 2014年5月4-8日(台湾・台北市)

「脱皮の匂い: ブルークラブ *Callinectes sapidus* の尿中の脱皮バイオマーカーNAGLはフェロモン候補物質である」神尾道也・Manfred Schmit・Julia Kubanek・Markus Germann・Charles D. Derby 平成26年度日本水産学会春季大会 2014年3月27-31日(函館)

「ブルークラブ *Callinectes sapidus* の脱皮マーカー N-acetylglucosamino-1,5-lactone(NAGL)のHPLCによる分析法の開発」永倉靖大・秋山優人・矢野弘奈・永井宏史・

神尾道也 平成 26 年度日本水産学会
春季大会 2014 年 3 月 27-31 日(函館)

「ラン藻 *Moorea* 属から得れた新規
lyngbyatoxin A 誘導体の構造と活性」
丹 智史・内田 肇・江 偉娜・岩・c 恭
江・渡邊 龍一・鈴木 敏之・神尾 道也・
永井 宏史 日本農芸化学会 2014 年度
大会 2014 年 3 月 27-30 日(川崎)

「アマクサアメフラシ *Aplysia*
juliana の海藻由来の代謝物に依存し
た化学防御に関する研究」林原信子・
小山真央・内田 肇・渡邊龍一・鈴木
敏之・永井宏史・神尾道也 第 66 回日
本動物学会関東支部大会 2014 年 3 月
15 日(柏)

「フェロモン研究におけるブルークラ
ブとクリガニのモデル生物としての比
較」神尾道也 日本甲殻類学会第 51 回
大会 2013 年 11 月 30 日-12 月 1 日(札
幌)

「*Callinectes sapidus* のフェロモン
解明を目指した尿中のバイオマーカー
探索」 神尾道也・Manfred Schmit・
Charles Derby 第 8 回 メタボローム
シンポジウム 2013 年 10 月 3-4 日(福
岡)

「NMR が明らかにする緑藻の化学防御
物質 DMSP のアメフラシへの取り込み」
神尾道也 第 27 回 海洋生物活性談
話会 2013 年 5 月 25-26 日(東京)

「クラゲ刺傷被害と刺糸長との相関に
ついての研究」 山田真優・神尾道也・
永井宏史 平成 25 年度日本水産学会
春季大会 2013 年 3 月 26-29 日(東京)

「ラン藻より得られた新規
lyngbyatoxin A 誘導体の構造につい
て」 江 偉娜・周 威・内田肇・渡邊
龍一・鈴木敏之・神尾道也・永井宏史
平成 25 年度日本水産学会春季大会
2013 年 3 月 26-29 日(東京) 発表・
修士 2 年

「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」 百瀬紋乃・神尾
道也・永井宏史 平成 25 年度日本水産
学会春季大会 2013 年 3 月 26-29 日(東
京)

「アマクサアメフラシ *Aplysia*
juliana が海藻から選択的に取り皮膚
に送る二次代謝物質に関する研究」小
山真央・林原信子・内田 肇・渡邊龍
一・鈴木敏之・永井宏史・神尾道也 平
成 25 年度日本水産学会春季大会
2013 年 3 月 26-29 日(東京)

"A new malyngamide from the
cyanobacteria *Lyngbya majuscula*"
Wei Zhou, Wina Jiang, Fuminori Kondo,
Hajime Uchida, Toshiyuki Suzuki,
Ryuichi Watanabe, Michiya Kamio,
Hiroshi Nagai. The 9th Asia-Pacific
Marine Biotechnology Conference
2012 July 13-16 Kochi, Japan (高知、
国際学会)

「沖縄産ラン藻 *Lyngbya* sp. に含まれ
る新規アルデヒド化合物群の単離なら
びに構造決定」ト英悦・内田肇・渡邊
龍一・鈴木敏之・神谷大二郎・神尾道
也・永井宏史 平成 24 年度日本水産学
会春季大会 2012 年 3 月 26-30 日(東
京)

「クラゲによるヒト刺傷時の痛みの
発生機構に関する基礎的研究」北谷龍
樹・神尾道也・永井宏史 平成 24 年度
日本水産学会春季大会 2012 年 3 月
26-30 日(東京) 発表・博士 3 年

「ハブクラゲ刺胞内に存在するアミ
ン・アミノ酸に関する化学的研究」北
谷龍樹・内田肇・渡邊龍一・鈴木敏之・
白井隆明・長島裕二・神尾道也・永井
宏史 平成 24 年度日本水産学会春季
大会 2012 年 3 月 26-30 日(東京) 発
表・博士 3 年

「ヒメニチリンイソギンチャクのペ
プチド毒の一次構造解析」小野義宏・
本間智寛・神尾道也・永井宏史・塩見
一雄 平成 24 年度日本水産学会春季
大会 2012 年 3 月 26-30 日(東京) 18.
「アマクサアメフラシは食物由来の化
合物を体壁へと輸送する」小山真央・
永井宏史・神尾道也 第 25 回海洋生物
活性談話会 2011 年 10 月 8-9 日(三
崎・神奈川) 発表・修士 1 年

〔図書〕(計 1 件)

Approaches to a molecular identification
of sex pheromones in blue crabs. Kamio,
M., Derby, C.D. In T. Breithaupt and M.
Thiel (eds.), Chemical Communication in
Crustaceans, Springer Science+Business

Media, pp.393-412 (2011)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

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

<http://olcr.kaiyodai.ac.jp/db/profile.php?yomi=KAMIO,Michiya>

<http://www2.kaiyodai.ac.jp/~nagai/nagailabhomepage/>

<http://www2.kaiyodai.ac.jp/~mkamio/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神尾道也 (KAMIO, Michiya)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・助教

研究者番号: 30578852

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: