

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450282

研究課題名(和文) 甲殻類尿中の成熟脱皮関連バイオマーカーの普遍性を探る

研究課題名(英文) Search of molting biomarkers in Crustacea

研究代表者

神尾 道也 (Kamio, Michiya)

東京海洋大学・学術研究院・助教

研究者番号：30578852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はブルークラブの尿中で脱皮前に高濃度となる脱皮前バイオマーカー且つフェロモン候補物質であるNAGLが、他の甲殻類(十脚目)でも尿中脱皮前バイオマーカーであるのかどうかを検証した。同じカニ類であり、ブルークラブ同様にメスの脱皮後に交尾を行うクリガニのメスの尿を調べた結果、NAGLは尿中に存在し脱皮前に濃度が最大となった。一方、脱皮と関係なく交尾を行うイセエビの尿中にはNAGLは検出されなかった。また、NAGLをモデル化合物として超高極性のフェロモンを精製するための方法の構築も行った。本研究の結果は脱皮の予測とフェロモンを用いた交尾行動の制御法の開発の基礎となるものである。

研究成果の概要(英文)：N-acetylglucosamino-1,5-lactone (NAGL) is a molting biomarker in the blue crab *Callinectes sapidus*. The concentration of this compound in urine is highest at the premolt stage. Since sexually mature premolt females release sex pheromone in their urine, NAGL is a candidate sex pheromone molecule in *C. sapidus*. This compound has not been reported in other species. In the present study, we found that the concentration of NAGL in the urine increases toward the day of molting and decreases after molting in females of the helmet crab *Telmessus cheiragonus*, but NAGL was not found in Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. This is the first report of NAGL as a molting biomarker in a species other than *C. sapidus*. We assume that NAGL is part of a pheromone bouquet in these two species. We also developed method to partially desalt the sex pheromone in the urine. These result will lead to development of method to evaluate molting stage of crabs and control method of mating of the crabs.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：フェロモン 脱皮 甲殻類 水産化学 天然物化学 生理化学 交尾

## 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、誘引フェロモンの解明は選択的な漁法と脱皮に伴って起こる共食いの抑制へ、脱皮と成熟の生化学の理解は養殖における成長の制御の研究へと役立つ。しかしながらフェロモンは同定されていない。フェロモンが同定されない理由の一つは、カニ類のフェロモンは複数の化合物の混合物であるので精製すると活性が無くなり、活性試験をしながら単離、同定するのは困難なことである。二つ目は、化合物の極性が非常に高く、一般的なクロマトグラフィーでは簡単には生成できないことである。そこで、申請者らはカニの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と考え、各種の生理状態の尿の成分を比較して成熟脱皮前のメスの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。バイオマーカーの検出法としては分離せずに生体液体試料中の代謝物を一斉に測定できる核磁気共鳴装置を用いた。カニ類は室内での長期飼育と繁殖が難しく、成分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るが、産業的に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産業がある米国のブルークラブで可能となった。ブルークラブの各種の脱皮ステージの雌雄

の尿を採取し、以下の成果を得た。

(1) 脱皮前のメス尿のフェロモンは複数の高極性低分子混合物である (*Kamio and Derby. Chemical Communication in Crustaceans. 2011*)。 (2) 脱皮前に尿中で高濃度となるバイオマーカー *N-Acetylglucosamino-1,5-lactone* を発見し、オスが匂い物質として感じることを行動実験  $Ca^{2+}$  イメージング実験で確認した (*Kamio et al. J Exp Biol* 審査中)。 (3) メス特異的成分を脱皮前のオスとメスの 2 次元 NMR (HSQC) スペクトルの比較により確認している (*Kamio 2009. The Crustacean Society Summer Meeting*)。 (4) 脱皮前に濃度が低くなる化合物も尿中に確認した (未発表)。

## 2. 研究の目的

上記の背景とこれまでの研究成果をもとに、本研究はブルークラブで見つかった成熟、脱皮および性に特異的な化合物 (バイオマーカー) が、国内における甲殻類フェロモン研究のモデル生物であるクリガニをはじめとする日本産の甲殻類の尿中代謝物群 (メタボローム) にも含まれるのかどうかを検証し、甲殻類全体における普遍性を探る。また未同定なバイオマーカー分子についてはブルークラブの尿を用いて構造を明らかにし、その代謝経路を考察する。これらの化合物は性フェロモン候補物質なので、フェロモン活性試験が実験可能なクリガニとブルークラブにおいては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。

## 3. 研究の方法

本研究では、日本産甲殻類のクリガニ、ケガニ、オオバウチワエビ、イセエビなどを対象に「ブルークラブ脱皮前マーカー-NAGL」が、尿中に存在するのかの検証、「ブルークラ

ブ尿中の成熟メス特異的バイオマーカーク群」が、尿中に存在するのかの検証を行いメスの成熟脱皮特異的バイオマーカークの甲殻類全体における普遍性を検証する。

日本産甲殻類の脱皮前後および脱皮しない時期の尿中の成分を NMR および HPLC で分析し、ブルークラブの脱皮前バイオマーカーク NAGL の存在の有無を検証する。同様に、メス特異的マーカーク群の存在を 2 次元 NMR にて検証する。メス特異的マーカークは未同定分子なのでブルークラブの尿を用いて同定する。同定した後は、NAGL と共に微量検出法を確立し、各代謝物の成熟、脱皮サイクル、性別にともなう変動をそれぞれの種で解析する。また、各臓器に含まれるバイオマーカーク濃度の測定を行い、それぞれのバイオマーカーク産生器官を明らかにする。

#### 4 . 研究成果

本研究はブルークラブの尿中で脱皮前に高濃度となる脱皮前バイオマーカーク且つフェロモン候補物質である N A G L が、他の甲殻類（十脚目）でも尿中脱皮前バイオマーカークであるのかどうかを検証した。同じカニ類であり、ブルークラブ同様にメスの脱皮後に交尾を行うクリガニのメスの尿を調べた結果、N A G L は尿中に存在し脱皮前に濃度が最大となった。一方、脱皮と関係なく交尾を行うイセエビの尿中には N A G L は検出されなかった。また、N A G L をモデル化合物として超高極性のフェロモンを精製するための方法の構築も行った。本研究の結果は脱皮の予測とフェロモンを用いた交尾行動の制御法の開発の基礎となるものである。

#### 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）

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Kamio M. and Derdy C.D. 2017 Finding food: how marine invertebrates use chemical cues to track and select food. Natural Product Reports 34, 514-528.

2. Yano, H., Kamio, M., Nagai H. 2016. Premolt biomarker metabolite N-acetylglucosamino-1,5-lactone in female urine of the helmet crab *Telmessus cheiragonus*. Biological Bulletin 230: 143-151.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 「Studies on sex pheromones in helmet crabs and blue crabs」Michiya Kamio International symposium entitled “Fisheries Science for the Future Generations” 平成 29 年 9 月 22-24 日(東京)

2. 「カニ類の脱皮バイオマーカーク NAGL の尿中での状態」神尾道也・矢野弘奈 平成 28 年度日本水産学会春季大会 2016 年 3 月 26-30 日(東京)

3. 「クリガニ成熟メスの脱皮の兆候」矢野弘奈・長田拓己・神尾道也・永井宏史 日本甲殻類学会第 53 回大会 2015 年 10 月 11-12 日(東京)

4. 「Studies on sex pheromones in helmet crabs and blue crabs using a combination of approaches」(和訳 複数の手法の組み合わせによるクリガニとブルークラブの性フェロモンの研究)Michiya Kamio The 8th Asia-Pacific Association of Chemical Ecologist 2015 年 9 月 23-26 日(カルフォルニア・USA)

5. 「クリガニ成熟メス脱皮前後尿中の NAGL

濃度」矢野弘奈・神尾道也・永井宏史 日  
本動物学会第 86 回大会 2015 年 9 月 17-19  
日 (新潟)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

神尾 道也 (KAMIO MICHIIYA)

研究所属機関名・部局・職名：

東京海洋大学・学術研究院・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：

### (4) 研究協力者

( )