

## 軟体動物筋活動の神経性制御機構\*

坂田真理子\*\*

広島大学生物圏科学研究科

### Mechanisms of Neural Regulation of Muscle Movements in Molluscs

Mariko FUJIWARA-SAKATA

Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University

Hiroshima 730, Japan

### 要 旨

動物の筋の活動は多数の情報伝達物質によって複雑に制御されていることが次第に明らかになってきた。

特に無脊椎動物ではこの種の研究が著しく進展しており、いわゆる古典的神経伝達物質に加えて、種々のアミンやアミノ酸、及び多くの神経ペプチドが修飾的に働いている可能性が示されている。

軟体動物前鰓類の一種であるアカニシ (*Rapana thomasi* Crosse) では、これまでに歯舌伸出筋と牽引筋や心筋の収縮に対する神経ペプチドの影響は薬理的に調べられてきたが、生体内でのペプチドの分布やその作用機構については殆んど調べられていない。そこで、本研究ではまずこれらの筋に対する数種の神経ペプチドの作用を生理学的に調べると共に、これらの神経ペプチドの生体内の局在を免疫組織化学的に調べ、実際にそれらのペプチドの単離を試みた。

アカニシのニューロンは小さくて同定できないが、軟体動物有肺類のアフリカマイマイ (*Achatina fulica* Férussac) は、神経節に同定可能な巨大ニューロンを持っており、ニューロンレベルでの研究によく用いられている。また、この動物の神経節や心臓からは心拍動に影響を持つ数種類の神経ペプチドが単離され、様々な筋やニューロンに対する働きも調べられつつあるが、その作用様式については何も知られていない。そこで、更にアフリカマイマイから単離されたこれらの神経ペプチドの生体内の局在を免疫組織化学的に調べ、ペプチド含有ニューロンを同定する事を試みた。

これらの結果から、筋運動の制御における神経ペプチドの生理的な作用機構について考察した。

#### 1. アカニシ歯舌筋

これまでの研究から、歯舌伸出筋ではFMRFamide (H-Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>) が、拮抗筋である牽引筋ではその同族ペプチドであるFLRFamide (H-Phe-Leu-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>) が、各々の筋内の興奮神経終末部に作用して、神経伝達物質のアセチルコリンまたはグルタミン酸それぞれの放出を促進的

---

広島大学総合科学部紀要IV理系編、第19巻(1993)

\* 広島大学審査学位論文

口頭発表日 1993年2月13日、学位取得日 1993年3月3日

\*\*現在の所属：広島大学総合科学部生理学研究室

に制御している事が示唆されている。しかし抑制的に働く神経ペプチドは見つかっていなかった。イガイ足糸前牽引筋の catch 収縮を弛緩させるペプチドとして単離された catch-relaxing peptide (CARP; H-Ala-Met-Pro-Met-Leu-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>) は、多くの動物の種々の筋に多様な効果を示すことが知られているが、本研究により、CARP は伸出筋と牽引筋において、アセチルコリンまたはグルタミン酸による収縮のみならず、神経刺激による一過性収縮を抑制する事がわかった。また、筋の直接刺激によって起こる収縮も、CARP によって抑制された。すなわち、FMRFamide や FLRFamide と異なり、CARP はアカニシ歯舌伸出筋にも牽引筋にも抑制的に働き、かつその作用部位はシナプス後膜側であることが明らかになった。

次に、歯舌筋運動に関与する口球神経節-筋系における FMRFamide 様及び CARP 様ペプチドの局在を、各々のペプチドに対するポリクローナル抗体を用い、ABC 法による間接酵素抗体法で免疫組織化学的に調べた。ホルマリン固定し、ポリエステル・ワックスで包埋した組織は、厚さ 5-10  $\mu$  m に薄切した。口球神経節では FMRFamide 様免疫陽性を示す細胞体が、右口球神経節の口吻側及び左神経節の尾側に局在していたが、そこにはいくつかの CARP 様免疫陽性細胞も存在していた。歯舌筋の運動を支配している運動ニューロンは、口球神経節の右口吻側及び左右の尾側に存在することが報告されているが、FMRFamide 及び CARP 様免疫陽性を示すニューロンもまた存在していた。従って、口球神経節のいくつかのニューロンでは、FMRFamide 及び CARP 様ペプチドが主な伝達物質と共存している可能性が示された。口球神経節から歯舌へと下行する神経や歯舌伸出筋と牽引筋においても、両ペプチドの抗体に対して強い陽性反応を示す神経繊維の存在することが明らかとなった。

さらに実際に歯舌筋に含まれる生理活性ペプチドを探索するために、牽引筋のアセトン抽出物を、イガイ足糸前牽引筋を生物検定系として、高速液体クロマトグラフィーで精製した結果、FMRFamide と、次のようなアミノ酸配列を持つ CARP-myomodulin 系の新型ペプチドを単離した: H-Pro-Met-Gly-Met-Leu-Arg-Leu-(NH<sub>2</sub>)。このペプチドを *Rapana myomodulin* と名付けた。この動物の牽引筋から、FMRFamide と *Rapana myomodulin* が単離されたことは、FMRFamide 様抗体陽性部位と CARP 様陽性部位には、少なくとも FMRFamide と *Rapana myomodulin* を含む神経ペプチドが存在しており、これらのペプチドが主な神経伝達物質と共に歯舌運動の制御において実際に生理的に働いているという考えを強く示唆するものである。

## 2. アカニシ心臓

アカニシ心臓においては、セロトニンと FMRFamide が心拍動の振幅と頻度を増強する。主な抑制性物質はアセチルコリンであると考えられてきた。しかし本研究により、CARP はアセチルコリンよりも強力な心拍動抑制作用を持つことが明らかになった。

CARP は、心拍動の振幅と頻度の両方をアセチルコリンよりも低濃度で抑制した。更にアセチルコリン受容体阻害剤のベンゾキノニウムにより、アセチルコリンによる心拍動抑制は完全にみられなくなるが、CARP による心拍抑制は影響を受けないことから、アセチルコリンと CARP の受容体は異なる事がわかった。心臓神経刺激による心拍動の抑制も、ベンゾキノニウムによって阻害された。つまり、心拍動に対して抑制作用を優位にもつ神経は、主としてコリン作動性であると思われる。しかし、心拍動抑制作用を示す CARP の閾値が非常に低いことから、アカニシ心拍動調節に CARP が実際に関与している可能性は高いと考えられる。そこで心臓を支配する内臓神経節や心臓における CARP 様及び、FMRFamide 様物質の局在を調べた。内臓神経節内には、CARP 様免疫陽性細胞、FMRFamide 様免疫陽性細胞のいずれもが存在していたが、両者は別々の細胞であることがわかった。心臓神経と心房には CARP 様免疫陽性部位、FMRFamide 様免疫陽性部位が共に豊富に存在

した。更に、CARPとFMRFamideの両方の抗体に免疫陽性反応を示す神経繊維が、同一神経束の中にみられた。ところが、心室ではどちらのペプチドに対しても免疫陽性反応は殆どみられなかった。これらの結果は、心臓神経の分枝は心房に豊富に分布するが心室には僅かしか分布しないという、従来の解剖学的な観察と一致する。これらの結果から、心拍動に対して抑制作用を優位にもつ神経は主としてコリン作動性ではあるが、心臓神経内にはペプチド性の増強神経や抑制神経等様々な神経が含まれていて、心拍動を制御していると考えられる。又、これまでのアカニシ心臓におけるFMRFamideの構造-活性関係の結果から、調べた14個のFMRFamide様物質のなかでFMRFamideが最も強力な心拍動増強物質であること、及びこの動物の歯舌筋からFMRFamideと*Rapana myomodulin*が単離されている事から考えて、アカニシ心臓におけるFMRFamide様物質は、FMRFamideそのものであり、CARP様物質は、CARPよりも*Rapana myomodulin*である可能性が高いと思われる。

### 3. アフリカマイマイ

これまでに、この動物の神経節や心臓から心拍動に影響を持つ数種類の神経ペプチドが単離されたが、その作用様式についてはあまり知られていない。そこで、アフリカマイマイから単離された二種類の神経ペプチド：FMRFamideとACEP-1 (H-Ser-Gly-Gln-Ser-Trp-Arg-Pro-Gln-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>)の生体内の局在を免疫組織化学的に調べ、ペプチド含有ニューロンを同定する事を試みた。アフリカマイマイの心臓は、食道下神経節から発する腸神経によって支配されている。そこで、脳神経節、食道下神経節、腸神経及び心臓をFMRFamideとACEP-1の抗体を用いて免疫染色した。ホールマウント標本の場合には、固定後の脱水操作は行わず、目的とする神経ペプチドの一次抗体でインキュベート後、ローダミン標識した二次抗体を用いた。内臓神経節及び右体壁神経節の背側表面付近では、直径30  $\mu$  m以下の多数の小型のニューロン群がFMRFamide様免疫陽性を示した。ACEP-1様免疫陽性ニューロンは、FMRFamide様免疫陽性ニューロンよりは大型で数が少なかった。より腹側に近い部位では、同定可能な数個の巨大ニューロンが陽性となったが、両方のペプチド抗体に共に陽性反応を示すニューロンは存在しなかった。更にこれまでに心拍動増強ニューロンとして同定されている9個のニューロンは、どちらの抗体に対しても陽性を示さなかった。食道下神経節から心房へと下降する腸神経や心房には、FMRFamide様及び、ACEP-1様免疫陽性部位が共に豊富に存在していた。一方、心室の心房側から中央部にかけては、どちらの抗体に対する陽性部位も存在せず、心室動脈端から動脈にかけての狭い範囲にのみ、両ペプチドの抗体に免疫陽性を示す神経繊維がわずかに存在していた。従ってFMRFamide様物質もACEP-1様物質も、神経節内の心拍動運動ニューロン以外のニューロンに含まれ、腸神経によって心房へ輸送されて放出され、それが心室で生理的活性を示すと考えられる。

軟体動物の筋の活動に対して複数の神経ペプチドが伝達物質あるいは修飾物質として実際に働いているという報告はさらに増えつつある。本研究の結果もこれらのペプチドが情報伝達物質として実際に生理的に働いていることをより強く示すものである。