

ムラサキイガイ足糸前牽引筋における イガイ抑制性ペプチドについての研究*

藤澤 祐子

広島大学総合科学部人間行動研究講座

Study on *Mytilus* inhibitory peptides in the anterior byssus retractor muscle of the bivalve mollusc, *Mytilus edulis*

Yuko FUJISAWA

Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University,
Higashihiroshima 739, Japan

要 旨

第1章 序 論

筋や分泌腺など効果器の活動は神経系によって支配されている。神経はさまざまな情報伝達物質をその末端から放出して効果器に働きかけ、その活動を適切に調節している。このような効果器調節に関与する神経情報伝達物質のうち、近年注目を集めているのは神経ペプチドである。構造的に無数の可能性があるペプチド性伝達物質は、効果器の微妙な活動調節に大きく寄与するものと想像されている。しかし、これまでに様々な動物から膨大な数のペプチドが単離されているわりに、特定の効果器の活動に対するペプチド性神経支配について体系立った研究はそれほどなされていない。そこで、本研究では軟体動物二枚貝の1種、ムラサキイガイ *Mytilus edulis* の足糸前牽引筋 (anterior byssus retractor muscle, ABRM) を実験系として、筋運動を制御する抑制性神経ペプチドについての研究を行った。

ABRM は典型的なキャッチ筋で、その運動は主としてアセチルコリン作動性の興奮神経とセロトニン作動性の弛緩神経の支配を受けていることが明らかにされている。これらに加えてペプチド性神経が存在する可能性が示唆されたのは、ABRM の主たる支配中枢である足神経節から3種類のペプチドが単離されたことによる。このうち2種類は、Gly-Ser-Pro-Met-Phe-Val-amide と Gly-Ala-Pro-Met-Phe-Val-amide という相同性の高い構造のペプチドで、それまで知られる中で唯一、ABRM の収縮に対して強い抑制効果を示す物質であった。これらはイガイ抑制性ペプチド (*Mytilus* inhibitory peptides, MIPs) と名付けられ、2つの同族体はそれぞれ S²-MIP、A²-MIP と呼ばれた。これらは足神経節から単離され、筋に投与すると収縮抑制効果を示すことから、ABRM において生理的に機能する神経ペプチドであることが期待されてきた。しかし、これを支持する生理学的証拠はない。本研究では、ABRM において MIPs を伝達物質として用いる抑制性

広島大学総合科学部紀要IV理系編、第23巻 (1997)

*広島大学審査学位論文

口頭発表日：1997年1月21日、学位取得日 1997年2月3日

MIP1 :	Gly-Ser-Pro-Met-Phe-Val-amide
MIP2 :	Gly-Ala-Pro-Met-Phe-Val-amide
MIP3 :	Asp-Ser-Pro-Leu-Phe-Val-amide
MIP4 :	Tyr-Ala-Pro-Arg-Phe-Val-amide
MIP5 :	Ala-Ser-His-Ile-Pro-Arg-Phe-Val-amide
MIP6 :	Arg-Ala-Pro-Leu-Phe-Ile-amide
MIP7 :	Arg-Ser-Pro-Met-Phe-Val-amide

図1. ムラサキイガイ ABRM のアセトン抽出物から単離された7種のMIPsのアミノ酸配列

神経支配が存在することを証明することを目的とした。

第2章 ABRM に含まれる MIPs の単離、構造決定と活性の解析

ペプチド性伝達物質は神経節にあるニューロン細胞体で生成され、軸索を通して標的器官の近傍へと輸送され、神経末端部の分泌小胞の中に蓄えられている。そして神経の電気的興奮に応じて放出され、標的器官上の受容体へ作用する。従って、足神経節から単離されたMIPsがABRMを制御する神経ペプチドであるなら、ABRMの表面や内部に分布する神経要素にも存在するはずである。そこでABRMに含まれるMIPsの単離、同定を試みた。ムラサキイガイ10,000個体分のABRMのアセトン抽出物を、C18逆相系のオープンカートリッジにかけて粗精製した後、Sephadex G-15カラムでゲルろ過した。得られた画分について、ABRMの単離標本の収縮に対する効果を調べ、抑制効果をもつ画分を回収した。これをさらに数段階の逆相及びイオン交換HPLCで精製し、最終的に7種類の抑制性ペプチドを単離することができた。構造分析の結果、すべてC末端に-Pro-Xaa-Phe/Ile-amideを共通してもつMIPファミリーペプチドであることがわかった(図1)。7種のMIPsのうち、MIP₁、MIP₂は足神経節から単離されていたS²-MIP、A²-MIPと同一で、残りの5種類は新型のものであった。

これら7種のMIPsのABRMの収縮に対する効果を調べた。すべてのペプチドが電気刺激による一過性収縮を 10^{-10} - 10^{-8} Mを閾値濃度として濃度依存的に抑制した。しかし、効果の強さはペプチドによって異なっていた。7種のMIPsはまた、ABRMの主たる興奮性神経伝達物質であるアセチルコリンや軟体動物の代表的な神経ペプチドの一つであるFMRFamideの投与によって引き起こされるこの筋の収縮をも抑制した。一方、どのペプチドもキャッチ状態の筋に投与しても弛緩をもたらすことはなく、神経刺激によって引き起こした弛緩に対しても全く影響を及ぼさなかった。このように7種のMIPsはABRMに対して専ら抑制という質的に同一の効果を示した。さらに、合成フラグメントペプチドを用いた実験から、C末の保存領域であるPro-Xaa-Phe-Val/Ile-amideがこの収縮抑制効果の発現に重要であることがわかった。

以上の結果は、ABRMには少なくとも7種のMIPsが存在し、それらはすべて共通のシナプス後受容体を介して抑制効果を発現している可能性を示唆するものである。

第3章 ABRM における MIPs の局在と神経刺激による放出

ABRMのアセトン抽出物から単離した7種のMIPsが筋の表面や内部を走行する神経線維に含まれるものであり、さらに、神経の興奮に応じてそこから放出されることを示す実験を行った。まず、

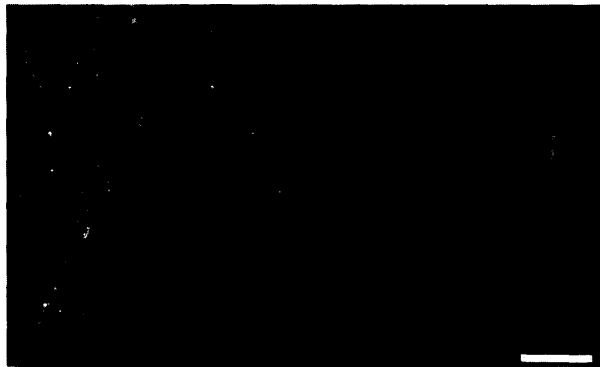


図2. ムラサキイガイ ABRM の表面を覆う結合組織の sheath 上に分布する MIP 免疫陽性神経線維の蛍光顕微鏡写真。スケールは $2\ \mu\text{m}$ 。

MIP₁ をキャリア蛋白 (KLH) に結合させたものを抗原とし、ウサギに免疫して抗血清を得た。抗血清はアフィニティ精製によって抗キャリア蛋白抗体を除去した後、酵素抗体法 (ELISA) によってその特異性を定量的に検定した。その結果、得られた抗体は、抗原とした MIP₁ だけでなく 7 種すべての MIPs をよく認識し、他のファミリーのペプチドは認識しないことが分かった。そこでこの抗体と蛍光標識二次抗体とを用いて ABRM の全載標本の免疫組織化学を行った。その結果、ABRM の表面を覆う sheath と呼ばれる結合組織の膜上に免疫応答性を示す神経線維様の構造が網目状に豊富に分布しているのが観察された (図2)。また、筋束の内部にも、筋線維に近接して走行する免疫陽性線維が見られた。いずれの部位の線維上にも、化学伝達物質の放出部位とされるバリコシティと呼ばれる瘤状の構造が多数存在していた。次いで、足神経節 - ABRM 標本を作成し、足神経節に電気刺激を与えた時に外液中へ放出される MIP 様ペプチドの量を競合 ELISA により測定した。その結果、正常人工海水中では、神経節を電気刺激すると外液中の MIP 様物質の量が刺激前と比べて著しく増大することがわかった。しかし、 Ca^{2+} を含まない人工海水中では、電気刺激を与えても MIP 様ペプチドの放出は全く起こらなかった。

以上の結果は ABRM から単離された 7 種の MIPs はすべて筋を支配する神経線維に含まれており、少なくともそのうちのある部分は神経の興奮に応じて Ca^{2+} 依存的な様式で放出されることを示したものである。

第4章 総合考察

本研究で得られた知見は、ムラサキイガイ ABRM に 7 種の MIPs を伝達物質として用いている抑制神経が存在することを強く支持するものである。ABRM に対する神経支配は古くから調べられてきたが、抑制性の支配はこれまで証明されておらず、本研究によって初めて示されたことになる。また、MIP ファミリーは軟体動物門内に広く分布するペプチドファミリーであることが他の軟体動物種を使った近年の研究から明らかになってきたが、抑制性神経ペプチドとしての生理的役割を証明した実験はなく、本研究が初めてである。

さらに本研究は、一つの効果器を制御するのに、少なくとも 7 種類もの同一ファミリーに属するペプチドが関与している可能性を示唆した点で大きな意義がある。最近、他の動物の神経筋系でも複数のファミリーペプチドの関与する例が示され、この現象はペプチド性神経支配の一般的な特徴ではないかと捉えられるようになってきた。しかし、複数のペプチドがそれぞれ実は異なった機能

を果たしているのか、それともすべて同じ役割をしているのかはまだ結論が出ていない。ABRMにおける7種のMIPsは調べた限り同じ抑制効果を示し、その効果は保存されたC末領域に由来していると考えられることから、活性発現に重要でない部分の構造は少しずつ変化しているが、機能的には一つの分子として振る舞っている可能性が示唆される。今後、7種のMIPsについて生合成経路や受容体レベルでの研究を進めていく必要がある。