

## 刺胞動物ヒドラの生理活性ペプチドの同定及びその機能の研究\*

高橋 俊雄\*\*

広島大学大学院生物圏科学研究科

### Study on identification and functions of bioactive peptides in the cnidarian *Hydra magnipapillata*

Toshio TAKAHASHI

Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University,  
Higashihiroshima 739, Japan

#### 要 旨

淡水産の刺胞動物であるヒドラは単純な体制と限られた細胞種からなり、強力な再生能力を持つ生物で、形態形成のメカニズムを研究する上での理想的な小動物である。従来の研究で様々なシグナル分子がヒドラの出芽、再生、細胞分化などのダイナミックな発生過程の制御や神経情報伝達に関与していると示唆されている。しかしながら、多大な努力にも関わらずヒドラのシグナル分子の実体はほとんど明らかにされていない。唯一、11個のアミノ酸残基からなり頭部形成を促進するペプチド Head activator (pGlu-Pro-Pro-Gly-Gly-Ser-Lys-Val-Ile-Leu-Phe) が同定されているだけである (Schaller and Bodenmüller, 1981)。実体が明らかにされていない主な理由は、シグナル分子の組織内含量が非常に少なく、しかも精製過程における生物活性検定に多大な労力と時間を要することにある。この点を克服するために、従来の方法とは異なる新しいアプローチ方法を開発し、ヒドラの発生過程や神経情報伝達を制御するペプチド性シグナル分子を大規模かつ系統的に単離し、その構造及び機能を解明する目的で研究を始めた。対象をペプチド性シグナル分子に限定した理由としては、容易に単離、構造決定及び化学合成ができ、また、前駆体遺伝子の同定を行うことによりペプチドの発現調節機構の解析までもが可能であることによる。この新しいアプローチ方法は下記の4段階に分けて推進した。

#### (1) ペプチド分離

大量に培養したチクビヒドラ (*Hydra magnipapillata*) からペプチド性画分を分画した。本研究では、ヒドラからのペプチド性成分の抽出には熱酢酸法及び冷アセトン法の2種類の方法を試みた。次に、HPLCを用いて系統的にペプチドを分離精製した。この段階では生物活性検定を行わない。

#### (2) 活性スクリーニング

各精製ペプチドにつき、Differential Display (DD)-PCR法 (Liang and Pardee, 1992) を用いて、ヒドラの遺伝子発現パターンに変化を与えるペプチド (シグナル分子) を選択した。出芽や再生な

---

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2月6日、学位取得日 1997年3月26日

\*\*現在の所属: 国立遺伝学研究所 (日本学術振興会特別研究員)

どの形態形成に際しては様々な遺伝子の発現が起こっていると考えられる。そこで分離精製したペプチドでヒドラを処理して4時間または20時間後に mRNA を抽出した後 cDNA を作成し、ランダムなプライマーを用いて PCR で増幅し、電気泳動によるバンドパターンを無処理ヒドラのものと比較して mRNA の発現様式が変化したものをピックアップした。

### (3) 構造決定及び化学合成

(2) でシグナル候補分子であると思われるペプチドにつき、アミノ酸配列分析、アミノ酸分析及び質量分析を行い、ペプチドの構造を推定した。推定した構造をもとにペプチドを合成した。そして、合成ペプチドと天然物との HPLC 上での挙動を比較し、一致したらその構造が正しいと判定した。

### (4) 生体内機能検定

最終段階では、構造決定し、化学合成したペプチドを用いてヒドラにおける生物活性を調べた。

第1章では、本法により現在までに329種のペプチド性と思われる物質を単離し、200種のアミノ酸配列分析を行い、45% (56/124) のペプチド性物質にヒドラの遺伝子発現に影響を及ぼす活性がみられた。この結果から、単純に計算して、ヒドラ組織中には約600種のペプチド性シグナル分子が含まれていることを示す。また、DD-PCR法を用いたスクリーニングの方法は、数多くのペプチド性シグナル分子と思われる物質を効率よくスクリーニングすることができることが示された。現在までに27種のペプチドの構造を決定しており、これらペプチドのうち、ペプチド族を形成する2つのグループを同定した(表1)。ひとつはLWamide族ペプチド(LWamides)で、これまでにヒドラから7種の同族体を単離、同定している。LWamidesの構造上の特徴として、C-末側にGly-Leu-Trp-NH<sub>2</sub>構造を共通に持つ。Leitzら(1994)によりイソギンチャクから単離、同定され、海産のカイウミヒドラのプラヌラ幼生変態を促進する生理活性ペプチドMetamorphosin A (pGlu-Gln-Pro-Gly-Leu-Trp-NH<sub>2</sub>) (MMA)もこのペプチド族に属する。もう1つはPW族ペプチド(PWs)で、このペプチド族は現在までにどの動物門からも単離されていない新型のペプチド族であった。これまでにヒドラから4種のPWsを単離、同定した。4種のペプチドは、5残基から8残基のアミノ酸残基からなり、共通構造としてC-末側にLeu (or Ile) -Pro-Trpを持つ。また、PWsのHym-33H (Ala-Ala-Leu-Pro-Trp)を除く3種のペプチドはN-末側から2残基目にPro(X-Pro)を持つ構造をしており、このことは、これらペプチドが分解酵素により分解されにくく、比較的安定な構造のペプチドであることを示唆する(Carstensen et al., 1992)。

Hym-330、Hym-346と仮に名付けたペプチドは、Hoffmeister(1996)によりヒドラ(*Hydra vulgaris*)から足部再生を促進する活性を持つ因子として同定されたペプチドpedin、pedibinとC-末のGlu残基を欠く構造と同一のペプチドであった。同定した2種のペプチドがpedin、pedibinと同様、足部再生を刺激する活性を持つことが明らかとなった。Glu残基の欠如の原因として、ペプチドの抽出段階かまたはHPLCによる精製段階で切除された可能性も否定できないが、*H. vulgaris*と*H. magnipapillata*という種差による可能性が大きい。この点は今後、Hym-330、Hym-346をコードしている遺伝子を単離することにより明らかにする必要がある。

その他、ヒドラの頭部形成及び神経分化を促進するペプチドであるHead activatorと相同性の高いペプチド(Hym323)、C-末側にPro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>構造を持ち、生理活性を持つと考えられるペプチド等を見いだしている。

第2章では、第1章で述べた新しいアプローチ方法により単離、同定した7種のLWamidesの種々の刺胞動物における活性について論述した。ヒドラから単離したこれらペプチドもMMAと同様、調べたものについてはカイウミヒドラ(*Hydractinia serrata*)の幼生変態促進効果を示すことが明らかとなった。LWamidesがヒドラの遺伝子発現に影響を及ぼすことから、これらペプチド

表1. チクビヒドラより単離、同定した27種のペプチドの一次構造

ペプチド族	ペプチド名	一次構造
LWamides	Hym-53	NPYPGLWamide
	Hym-54	GPMTGLWamide
	Hym-248	EPLPIGLWamide
	Hym-249	KPIPGLWamide
	Hym-331	GPPPGLWamide
	Hym-338	GPPhPGLWamide
	Hym-370	KPNAYKGKLPiGLWamide
PWs	Hym-33H	AALPW
	Hym-35	EPSAAIPW
	Hym-37	SPGLPW
	Hym-310	DPSALPW
	Hym-1	FRKYFPTF
	Hym-6	Ac-ANTNPVILA
	Hym-31	VSWQL
	Hym-36	YLVGL
	Hym-60	MRLVPKLL
	Hym-99	WPWQ
	Hym-126	WKRLTLFG
	Hym-223	MTYDLHGIW
	Hym-301	KPPRCYLNGYCSPamide
	Hym-304	APTWVE
	Hym-311	FW
	Hym-323	KWVQGKPTGEVKQIKF
	Hym-330	EELRPEVLPDVS
	Hym-346	AGEDVSHELEEKEKALANHS
	Hym-355	FPQSFLPRGamide
	Hym-373	VAPEEHPVLL

hP: ヒドロキシプロリン。Ac-A: アセチル化アラニン。

が同じ効果を持ち、同じ遺伝子発現に影響を及ぼすかどうかを6種のLWamidesを用いてDD-PCR法で調べた結果、これらペプチドが同じ遺伝子発現のパターンを変化させることが明らかとなった。このことから、LWamidesはヒドラにおいて同じ機能を持つペプチド族であると推察される。

ヒドラにおける作用として、LWamidesが出芽体基部の括約筋を特異的に収縮させ、親個体からの出芽体の解離を引き起こすことがわかった。また、同じ刺胞動物であるミドリイソギンチャクの牽引筋の収縮も引き起こした。しかし、他の動物門に属する動物の筋では活性を示さなかった。このことから、このペプチド族は刺胞動物門に限って分布していると考えられる。

LWamidesの刺胞動物における効果をまとめると、LWamidesは刺胞動物において幼生期では変態促進物質として、成体期では神経伝達物質あるいは神経修飾物質として働いていると思われる。すなわち、LWamidesは脊椎動物におけるサブスタンスPやオピオイド・ペプチドのように多機能な生理活性ペプチドであると考えられる。

カイウミヒドラの幼生変態及びイソギンチャクの牽引筋に対するLWamidesの構造活性相関を

調べた結果から、Gly-Leu-Trp-NH<sub>2</sub>が活性の発現に必要な最小構造であり、C-末のアミド化が受容体との作用に重要であることが示唆された。

LWamides に特異的な抗体を作成し、この抗体を用いての免疫組織化学の結果から、ミドリイソギンチャクでは牽引筋の表面に網目状に分布する神経細胞に免疫陽性反応が、またチクビヒドラでは、個体全体に不均一に分布する神経網に免疫陽性反応がみられた。この結果からも、これらペプチドは成体期では神経ペプチドとして働いていることを示唆する。

第3章で、PWsの刺胞動物における機能について述べた。主としてPWsの一員であるHym-33Hを用いて実験が行われたが、PWsはヒドラの多分化能幹細胞から神経細胞への分化を特異的に抑制する効果を持つことがわかった。PWsが幹細胞から神経細胞への分化のどの過程に作用しているかについては現在不明であるが、幹細胞から神経細胞への分化を決定する過程、または神経細胞分化過程に作用しているのではないかと想像される。また、幹細胞から神経細胞への分化の決定を受けた神経前駆細胞は、ヒドラの胴体部から頭部または足部へ移動し、神経細胞となることが示唆されている (Teragawa and Bode, 1995)。もしかしたら、PWsが神経前駆細胞の移動を抑制している可能性も考えられるが、この点についても現在のところ不明である。

結論として、PWsは幹細胞から神経細胞への分化を抑制し、神経細胞分化に対し抑制因子として働き、神経システムの恒常性を維持するためのシグナル分子である可能性が考えられる。さらに、PWsに対する受容体が分離されれば、シグナル分子から受容体、細胞内情報伝達経路、標的遺伝子を経て、最終的には神経細胞形成に至る分子回路を明らかにできると期待される。現在、PWsの抗体を作成中で、抗体ができれば、PWsのヒドラにおける局在がわかり、幹細胞から神経細胞分化の発生活動態の解明の糸口となると思われる。

これまでの研究成果からみて、本法はヒドラのペプチド性シグナル分子の分離に極めて有効であることが証明された。本研究によって、ヒドラのペプチド性のあらゆるシグナル分子が包括的に同定され、今後、ヒドラの形態形成のメカニズムや神経機能のメカニズムの研究に大きく役立ち、また、他の動物においてもこの新しいアプローチ方法は利用可能であると思われる。

## 参 考 文 献

- Carstensen, K., Rinehart, K. L., McFarlane, I. D. and Grimmelikhuijzen, C. J. P. (1992) Isolation of Leu-Pro-Pro-Gly-Pro-Leu-Pro-Arg-Pro-NH<sub>2</sub> (Antho-RPamide), an N-terminally protected, biologically active neuropeptide from sea anemones. *Peptides*, **13**, 851-857.
- Hoffmeister, S. A. H. (1996) Isolation and characterization of two new morphogenetically active peptides from *Hydra vulgaris*. *Development*, **122**, 1941-1948.
- Leitz, T., Morand, K. and Mann, M. (1994) Metamorphosin A: A novel peptide controlling development of the lower metazoan *Hydractinia echinata* (Coelenterata, Hydrozoa). *Dev. Biol.*, **163**, 440-446.
- Liang, P. and Pardee, A. B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, **257**, 967-971.
- Schaller, H. C. and Bodenmuller, H. (1981) Isolation and amino acid sequence of a morphogenetic peptide from hydra. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7000-7004.
- Teragawa, C. K. and Bode, H. R. (1995) Migrating interstitial cells differentiate into neurons in hydra. *Dev. Biol.*, **171**, 286-293.