

ウナギの浸透圧調節に関与しているペプチドの単離とその作用*

上坂 敏弘**

広島大学大学院生物圏科学研究科

Functions of osmoregulatory peptides isolated from the eel gut

Toshihiro UESAKA

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

要 旨

ウナギは、淡水中 (0.1mOsm/1) でも、海水中 (1,000mOsm/1) でも、その血液浸透圧を、ほぼ350mOsm/1と一定に保っている。この血液浸透圧の恒常性の維持には、鰓・腸・腎臓といった浸透圧調節器官だけでなく (Smith, 1930)、食道や心臓も関与していることがわかってきた (Hirano and Mayer-Gostan, 1976 ; Nagashima and Ando, 1994 ; 安田と坂口, 未発表)。

しかしながら、これらの器官において、どのような因子が関与し、どのようにして血液浸透圧の恒常性を維持しているのかはまだほとんど知られていない。ウナギの浸透圧調節器官の内、腸は鰓や腎臓と比べて構造が単純で、イオンと水の輸送を測定することが比較的容易である。また同様に生物検定系に適しているものとして心房が挙げられる。ウナギの心房は摘出しやすく、単離した心房は長時間一定の拍動を続けるという特徴を持つ (Yasuda *et al.*, 1996)。本研究は、海水ウナギの腸における Cl⁻の能動輸送によって生じる漿膜側陰性の経上皮電位 (PD) と Cl⁻の能動輸送速度を反映する短絡電流 (I_{sc}) を指標にし、また、ウナギの単離した心房の拍動を生物検定系に用いて、ウナギの腸の抽出液から腸のイオン輸送や心房の拍動に影響を及ぼす因子を単離し、その因子の作用について調べたものである。

第1章では、PDを高める物質としてウナギの腸から単離した6種類の somatostatin-related peptides (SS) の構造と作用について述べる。6種類のSSの内、アミノ酸25残基からなるペプチド (Ser-Val-Asp-Asn-Gln⁵-Gln-Gly-Arg-Glu-Arg¹⁰-Lys-Ala-Gly-Cys-Lys¹⁵-Asn-Phe-Tyr-Trp-Lys²⁰-Gly-Pro-Thr-Ser-Cys²⁵) とそのN末端側から20残基目の Lys がヒドロキシル化したペプチドは Conlon *et al.* (1988) によってヨーロッパウナギの膵臓から単離された eSS-25II と eSS-25I と同一のアミノ酸配列であった。残りの4種類のペプチドは、eSS-25II のN末端側から5残基目もしくは6残基目の Gln が Glu に置換されたものと、eSS-25II や eSS-25I のC末端側14残基からなるSSで、これらペプチドの報告はまだないので、それぞれ [Glu⁵] eSS-25II, [Glu⁶] eSS-25II, eSS-14II, eSS-14I と名付けた。これらのSSはいずれも、海水ウナギの腸を serotonin (5-HT),

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: 岡崎国立共同研究機構 生理学研究所 機能協働部門 (日本学術振興会特別研究員)

methacholine (cholinergic agonist)、IBMX (cAMP phosphodiesterase 阻害剤) で処理して I_{sc} を低く抑えた条件下で、拮抗的に働いて I_{sc} を濃度依存的に高めた。 I_{sc} を上昇させる効果は、単離してきた SS の中で、eSS-25II が一番低濃度で活性を示した。eSS-25II は、tetrodotoxin (TTX) で予め神経の興奮を抑えておいても、また adrenaline (AD) による I_{sc} 増大効果を yohimbine で完全に遮断しておいても、 I_{sc} 増大効果を示したので、SS の効果は神経や AD 放出を介してはいないと思われる。海水ウナギの腸における NaCl や水の正味の吸収量について調べたところ、eSS-25II によって実際に NaCl や水の吸収が高められることが明らかになった。SS と同様な効果を示す物質として、ウナギの腸から neuropeptide Y related peptide (eNPY) も単離した (第 2 章)。SS と eNPY は、5-HT や acetylcholine によって腸のイオンと水の吸収が低下した際に、それを元のレベルに回復させる作用を持っているものと考えられる。

eNPY はまたウナギの心臓にも存在し、心房の収縮力を濃度依存的に高めることを明らかにした (第 3 章)。ウナギの心臓には AD が存在し、同様に収縮力を増大させる効果を持つことが知られているが (Pennec and Le Bras, 1984)、eNPY は、betaxolol で AD の効果を完全に抑えた状態でも、収縮力を高めたことから、eNPY は AD 放出を介してはいないと思われる。ウナギの心房に eNPY と AD を同時に投与すると、収縮力増強効果に関しては、低濃度では eNPY の効果は AD の効果の上に乗るが、高濃度では AD 単独の効果以上の収縮増強効果はみられなかった。このことから、eNPY と AD の収縮力を高める効果はシグナルトランスダクション経路を共有していると思われる。共通のシグナルトランスダクション経路の一つとして、細胞内 Ca^{2+} が考えられるので、心筋細胞内の Ca^{2+} レベル ($[Ca^{2+}]_i$) に及ぼす eNPY と AD の影響を調べたところ、eNPY と AD によって $[Ca^{2+}]_i$ が増大することがわかった。心拍動に対する eNPY と AD の効果は Ca^{2+} -free Ringer 液中や verapamil (Ca^{2+} チャネル阻害剤) 存在下では抑えられることから、eNPY や AD による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は外液からの Ca^{2+} の流入によると考えられる。eNPY と AD は共に心房の $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させ、収縮力を高めるが、それぞれの効果の時間経過には違いがみられた。AD では、速やかに収縮力が上昇し、投与後 5 分後に最大効果がみられ、その後次第に減衰するのに対して、eNPY では、ゆっくりと収縮力が上昇し、16 分後に最大効果を示し、その後もその効果は持続した。eNPY と AD を同時に作用させると、協調的に働いて速やかにかつ持続的に収縮力を高めた。eNPY も AD も共にウナギの心臓に存在することから、これらの因子が協調的に働いている可能性は高いと思われる。

ウナギの腸の抽出液から eNPY のようにウナギの心房の拍動に影響を及ぼす因子を探索したところ、アミノ酸 36 残基からなるペプチド (His-Ser-Gly-Gly-Thr⁵-Phe-Thr-Asn-Asp-Tyr¹⁰-Ser-Lys-Tyr-Leu-Glu¹⁵-Thr-Arg-Arg-Ala-Gln²⁰-Asp-Phe-Val-Gln-Trp²⁵-Leu-Met-Asn-Ser-Lys³⁰-Arg-Ser-Gly-Gly-Pro³⁵-Thr) を単離できた (第 4 章)。このアミノ酸配列はこれまでに報告されていないものであったが、ヒトの oxyntomodulin (OXM) と 75% の相同性がみられたので、ウナギの OXM (eOXM) であると考えられる。eOXM はウナギの単離した心房に対して収縮力と拍動数を共に濃度依存的に高めた。この増強効果は、betaxolol 存在下でも得られたので、eOXM の効果は AD 分泌を介してはいないと思われる。心房の $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼす eOXM の効果を調べたところ、eOXM によって $[Ca^{2+}]_i$ 振動の振幅が高められることがわかった。eOXM の収縮力増強効果は、 Ca^{2+} -free Ringer 液中や verapamil 存在下で抑えられることから、eOXM は外液からの Ca^{2+} の流入を高め、 $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させることによって、心房の収縮力を高めていると考えられる。

ウナギの腸に存在する eOXM がホルモンとして心臓に作用するということはまだ証明していないが、哺乳類では、OXM が腸の L-cell から血中に分泌されていることが報告されている (Kervran et al., 1987) ので、ウナギにおいても eOXM がホルモンとしてはたらいっている可能性は

ある。eOXM と相同性が高い glucagon が killifish の鰓での Cl^- 分泌を促進することが示唆されており (Foskett *et al.*, 1982)、eOXM が鰓での NaCl の排出を促進するように働いている可能性も考えられる。eOXM は、心臓では心拍出量を増大させ、鰓では NaCl の排出を促進させ、血中の余分な NaCl を取り除くように働いているのかもしれない。同様に鰓での NaCl の排出を促進しているものとして atrial natriuretic peptide (ANP) が考えられる (Scheide and Zadunaisky, 1988)。ウナギの心房からの eANP の分泌は、血中の塩濃度の上昇や心房の膨張によって促進されることが知られているので (Eskay *et al.*, 1986; Kaiya and Takei, 1995)、高濃度の NaCl を含む血液が心臓に達したり、eNPY や eOXM が作用することにより心房の収縮高が増大すると、eANP の分泌が刺激され、鰓からの NaCl の排出が eANP によってさらに促進されると思われる。さらに eANP が腸に達すると、腸からの NaCl の吸収が抑えられ (Ando *et al.*, 1992)、全体として eANP は血液中の NaCl 量を減らすようにはたらくと思われる。今後、他の浸透圧調節器官 (鰓・食道・腎臓) から調節因子を単離し、その作用を明らかにし、その因子の放出機構を明らかにすることができれば、ウナギが複数の調節器官を巧みに調節することによって血液の恒常性を維持している仕組みを理解できる。

参 考 文 献

- Ando, M., Kondo, K. and Takei, Y. (1992). *J. comp. Physiol.* **B 162**, 436-439.
- Conlon, J. M., Deacon, C. F., Hazon, N., Henderson, I. W. and Thim, L. (1988). *Gen. comp. Endocr.* **72**, 181-189.
- Eskay, R., Zukowska-Grojec, Z., Haas, M., Dave, J. R. and Zamir, N. (1986). *Science* **232**, 636-639.
- Foskett, J. K., Hubbard, G. M., Machen, T. E. and Bern, H. A. (1982). *J. comp. Physiol.* **146**, 27-34.
- Hirano, T. and Mayer-Gostan, N. (1976). *Proc. natn. Acad. USA* **73**, 1348-1350.
- Kaiya, H. and Takei, Y. (1995). *Zool. Sci.* **12 Suppl.**, 11.
- Kervran, A., Blache, P. and Bataille, D. (1987). *Endocrinology* **121**, 704-713.
- Nagashima, K. and Ando, M. (1994). *J. comp. Physiol.* **B164**, 47-54.
- Scheide, J. I. and Zadunaisky, J. A. (1988). *Am. J. Physiol.* **254**, R27-R32.
- Smith, H. W. (1930). *Am. J. Physiol.* **93**, 480-505.
- Yasuda, M., Uesaka, T., Furukawa, Y. and Ando, M. (1996). *Comp. Biochem. Physiol.* **113A**, 165-172.