

多様な神経ペプチドによる軟体動物筋運動制御機構の解析

Analysis on the mechanism regulating the molluscan muscle activity by a variety of neuropeptides

藤澤 祐子

広島大学総合科学部・助手

Yuko FUJISAWA

Research Associate, Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

Seven isoforms of *Mytilus*-inhibitory-peptide (MIP) family have been isolated from the extract of the anterior byssus retractor muscle (ABRM) of the bivalve mollusc, *Mytilus edulis*. The seven peptides have the highly homologous structure and show the similar inhibitory effect on the ABRM contraction. In the present study, an attempt was made to establish that all the seven MIPs play physiological roles as neuropeptides regulating the ABRM. Immunohistochemical study using the anti-MIP antibody that recognizes all of the seven isoforms revealed the rich innervation of the MIP-immunoreactive fibers both in the surface and inside of the ABRM. Furthermore, MIP-like substances were shown to be released from the neuromuscular preparation in a Ca^{2+} -dependent manner in response to neural stimulation. These results support the physiological involvement of the seven MIPs as neuropeptides regulating the muscle. Receptor binding study is now in progress to examine the possibility that the seven MIPs interact with the single receptor subtype, which might lead to the conclusion that the structural variation in multiple neuropeptide isoforms has no functional significance.

研究目的

神経ペプチドは、神経系が最初に出現したとされるヒドラのような刺胞動物から哺乳類に至るまで、あらゆる動物の神経系に見い出され、神経情報伝達物質として大きな役割を果たしていると考えられている。これらペプチド性伝達物質の大きな特徴は、構造上無数のバリエーションが可能であるという点だが、私は軟体動物二枚貝の一種、ムラサキイガイの足糸前牽引筋 (ABRM) の運動調節に関与する神経ペプチドを調べてきて、この筋の抽出物の中にき

わめて相同性の高い構造をしたファミリーペプチドが7種類も存在するという興味深い事実を見い出した。これらは *Mytilus* inhibitory peptides (MIPs) と名付けられたペプチドで、C末端に Pro-Xaa-Phe-Val/Ile-amide という共通の配列を有する (図1)。これらのペプチドを、単離した ABRM 標本に作用させると、いずれもその収縮を著しく抑制する効果を示し、さらにC末の保存領域がその抑制効果発現に重要であることがわかった。果たしてこれらはすべて ABRM の生理的な抑制性伝達物質

MIP ₁ :	GSPMFVamide
MIP ₂ :	GAPMFVamide
MIP ₃ :	DSPLFVamide
MIP ₄ :	YAPRFVamide
MIP ₅ :	ASHIPRFVamide
MIP ₆ :	RAPLFIamide
MIP ₇ :	RSPMFVamide

図1. ムラサキイガイ ABRM から単離された 7 種の MIPs のアミノ酸配列

なのであろうか。だが、構造も機能もよく似た 7 種類ものファミリーペプチドが、たった一つの筋の活動制御に関与しているというような系はこれまでに確立されていない。さらに、もしすべてが神経ペプチドとして機能しているのであれば、7 種はそれぞれ少しずつ異なった機能を果たしているのか、あるいは、機能的には同一の分子として振る舞っているのか、という疑問が生じる。言い替えれば、7 種の同族体が存在することに積極的な生理的意義があるのか、それとも 7 種は中立的な遺伝子進化の産物に過ぎないのか、ということになる。本研究ではこれらの問題に迫るため、7 種類の MIPs がすべて生理的に機能する神経ペプチドであることを確立し、さらにこれらが機能分子として同一の振る舞いをしているかどうかを、受容体と生合成経路の点から明らかにしようとするものである。

研究経過

MIPs が生理的に機能する神経ペプチドであれば、筋を支配する神経線維に含まれ、神経の電気的興奮に際して細胞外へと放出されなければならない。これはペプチドに限らず、ある物質が神経伝達物質であると証明するための criteria としてあげられる条件である。実験では 7 種の MIPs を検出する手段として抗体を用いることにした。抗体はすでに MIP₁ を抗原としてす

に作成していたが、これが 7 種すべての MIPs を認識することを確認する必要があるため、定量的な競合 ELISA 法を確立した。この方法により、抗体が抗原とした MIP₁ だけでなく、MIP₂₋₆ もよく認識することを定量的に示した。そこでこの MIP 抗体を用いて、ABRM の免疫組織化学ならびに放出実験を行うことにした。免疫組織化学では、筋の全載固定標本を作製し、蛍光標識二次抗体を用いて免疫染色した。放出実験では、ABRM の支配中枢である神経節をつけたままの神経-筋標本を作成し、神経節を電気刺激することによって外液中に放出されるペプチドを Ca²⁺ の存在/非存在下で調べた。この時、上述の競合 ELISA 法の実験条件を最適化して検出限界を 0.1 pmol (MIP₁ として) 以下にまで下げることに成功し、1 個体の神経節-筋標本から放出される MIPs の量を測定することが可能になった。

次に、7 種の MIPs が同一の受容体に結合して作用している可能性を探るため、受容体結合実験を試みた。生理活性を有したまま ¹²⁵I 放射標識されたペプチドが必要であるため、標識条件を検討し、Tyr 残基をもつ MIP₄ を、失活させることなく高放射活性標識することができた。現在これを用いて筋における受容部位を探索しているところである。

研究成果

7 種の MIPs を認識する抗体を用いて行った免疫組織化学実験の結果、MIPs は ABRM をとりまく結合組織の膜 (sheath) 上を走行する神経線維と筋線維に接して走行する線維に局在することが明らかになった (図 2)。これらの線維には神経伝達物質の放出部位と考えられている varicosity と呼ばれるビーズ状の構造が数多く見られ、そこには強い免疫応答性が見られた。特に sheath 上の線維は網目状に高密度に分布し

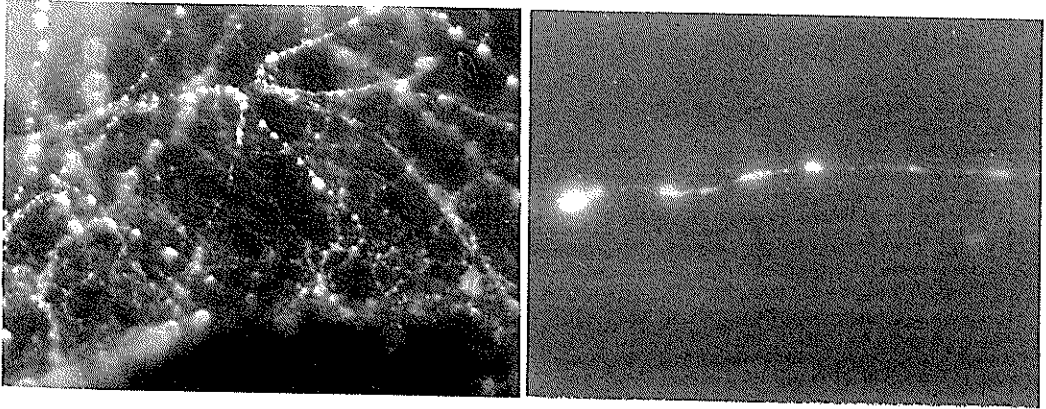


図2. MIP抗体で染色された神経線維の蛍光顕微鏡写真。(左) ABRMの表面を覆う結合組織の膜上に網目のように分布しているMIP含有神経線維。(右) 筋束の内部を筋線維に接して走行するMIP含有神経線維。

ており、これらから放出されたペプチドは筋全体に作用することが考えられた。なお、筋細胞にはまったく免疫応答性は見られなかった。次いで放出実験では、ABRMの支配中枢とされる足神経節を電気刺激すると、MIPsが外液中に放出されることが分かった。しかもこの放出は外液に Ca^{2+} が存在するときでなければ起こらず、MIPsの放出が生理的なメカニズムによるものであることを示唆している。以上の結果は、そもそも ABRM の抽出物から単離された7種の MIPs がすべて筋を支配する神経に由来するものであり、神経興奮によって放出されて働く情報伝達物質であることを強く支持するものである。すなわち、構造、活性ともにきわめて相同性の高い7種のファミリーペプチドがすべて生理的な神経ペプチドとして用いられていることになる。ここまでの結果は日本動物学会、日本比較生理生化学会の大大会において口頭発表され、さらに原著論文として Zoological Science 誌に受理、掲載された。

次に受容体結合実験であるが、7種の MIPs のうち、 ^{125}I 放射標識に必要な Tyr 残基を含む MIP₁ を用いて標識トレーサーを調製した。非放射性性ヨードを用いた予備

実験から、標識ペプチドは未標識ペプチドと同等の筋収縮抑制活性をもつことがわかった。そこでこれを用いて受容体結合実験を試みているが、現在までのところ、筋の粗膜標品を使った実験では、MIPs に対する特異的結合部位が検出されていない。もちろん MIPs の受容体結合実験は本研究が初めてであるが、無脊椎動物では神経ペプチド全般について受容体結合研究の報告自体が非常に少なく、現在さまざまな実験条件を手探りで検討している段階である。

以上が当初計画に基く実験の結果であるが、これらとは別に、本研究から派生して新たな知見を得ることができた。本研究で MIPs を定量するためのアッセイ系として開発した競合 ELISA 法が神経組織の抽出物など未知試量中の MIPs を検出するのにも適用できることがわかり、これまでに MIP ファミリーペプチドがとられていなかった軟体動物腹足類のアメフラシの中枢神経節抽出物から複数の MIPs とその関連ペプチドを単離・精製し、構造決定することに成功したのである。アメフラシは同定可能な大きなニューロンをもっており、神経生物学の

実験材料としてもっともよく研究されている動物であるが、抑制性神経ペプチドはこれまでほとんど見つかっておらず、今回発見した MIPs と関連ペプチドがその主要なグループになるものと思われる。現在、他の研究室と共同で、発見したペプチドの生理活性を調べるなど、発表へむけて準備を進めつつある。

今後の課題と発展

本研究で複数のファミリーペプチドが単一の筋の制御に関わっている例が確立された。この系をもちいて、今後も引き続き受容体結合実験を継続し、7種のファミリーペプチドが同一の受容体に結合していることを証明したいと考えている。ムラサキイガイ ABRM 以外にも複数のファミリーペプチドが存在するという神経-筋系が見つかったが、それらではペプチドの見かけの効果が濃度に依存して興奮性と抑制性の二相性を示し、解析を複雑なものにしている。その点、MIPs は質的にすべて同じ抑制効果を示すので、より解析が容易な実験系といえる。さらに、今回は遂行できな

かった生合成経路を明らかにする実験も行う予定である。7種の MIPs が同時に合成され、放出されて、すべて同じ受容体に作用することを示すことによって、MIPs に見られる構造のバリエーションは生理的意義をもたない、中立的なものであると結論づけられるはずである。これは他の神経ペプチド全般とその受容体の共進化の機構の本質に関する事柄であり、ぜひ引き続き発展させていきたい。

発表論文リスト

- 1) Y. Fujisawa (1996) Immunohistochemical localization and Ca^{2+} -dependent release of *Mytilus* inhibitory peptides in the ABRM of *Mytilus edulis*. Zool. Sci. 13, 795-801.
- 2) 藤澤祐子 (1996) 「イガイ足糸前牽引筋における MIP ファミリーペプチドの免疫組織化学的局在と神経刺激による放出」第7回日本比較生理生化学会大会
- 3) 藤澤祐子 (1996) 「イガイ抑制性ペプチド (MIP) の ABRM における免疫組織化学的局在と神経刺激による放出」第67回日本動物学会大会 (1996)