

アミノ酸から誘導される神経系内在性物質の機能解析—新規有用生理活性物質の創製を目指して

尾添嘉久・藤本正昭・高島育雄

目 的

アミノ酸は、タンパク質の構成単位、エネルギー源、栄養素、あるいは生理活性物質として生体内で重要な役割を果たしているだけでなく、生体内で酵素によって他の生理活性物質に変換され利用されている。本研究プロジェクトでは、アミノ酸から誘導される神経系内在性物質の新たな機能を解析し、その結果に基づいてさらに有用な生理活性物質を創製することを目的として、チロシンから誘導される生体アミン・チラミン、トリプトファンから生合成されるアミド・メラトニン、およびペプチド C-RFa (図 1) に焦点を当てて研究を行った。

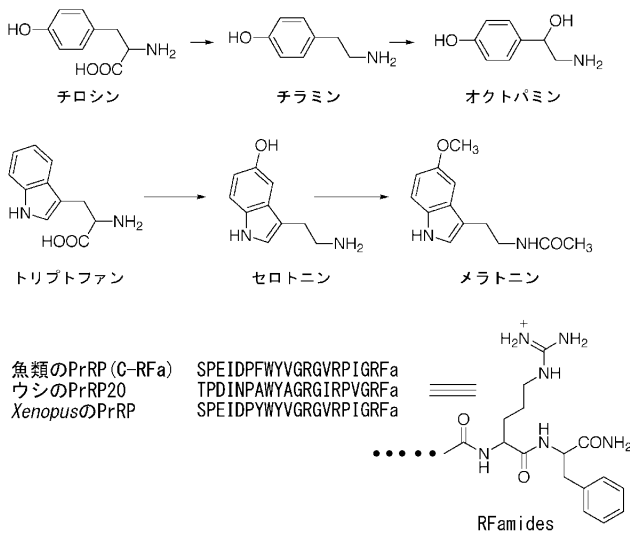


図 1 アミノ酸から誘導される情報伝達分子 (PrRP についてはアミノ酸 1 文字表記と C 末端構造を示した)。

チラミンは、無脊椎動物特有の生理活性アミン・オクトパミンの生合成前駆体であり、生理学的な役割についてはあまり知られていない。そこで、チラミン受容体遺伝子をクローニングして、培養細胞に発現させた実験系を構築し、チラミン受容体に特異的に作用する生理解析リガンドを創製することを目的とした。

メラトニンに関しては、その血中量変動のリズムや摂餌行動に及ぼす効果を調べ、外来種であるミシシッピーアカミミガメの繁殖を抑えるための基礎研究とすることを目的とした。

ギンブナの脳から単離・同定されたペプチド C-RFa は、哺乳類のプロラクチン (PRL) 放出促進ペプチド (PrRP) と高い相同性を有する「魚類の PrRP」である (図

1) (Sakamoto et al., 2003)。PRL は魚類では淡水適応に関与している。PrRP の投与は PRL に依存する機能を亢進させると考えられるが、両生類・爬虫類の水分調節に及ぼす作用については詳しい報告がない。そこで本研究では、魚類の PrRP である C-RFa および抗 C-RFa 抗体が、キンギョの鱗の粘膜層、イモリの皮膚粘液細胞、さらにはカナヘビの筋肉内水分含量に及ぼす効果を検討した。

材料および方法

1. チラミン受容体安定発現細胞の作製とリガンド合成

カイコ幼虫神経組織から調製した mRNA を用いて、RT-PCR によって cDNA を合成した。これを鋳型としてデータベースに登録されている機能未知遺伝子 B96Bom を PCR によって増幅した。この DNA をベクター pcDNA3 に挿入し、ヒト胎児腎臓由来細胞 HEK293 にトランスフェクトした。ジェネティシン存在下でセクションし、RT-PCR によってチラミン受容体安定発現細胞の構築を確認した。機能を調べるため、細胞内 cAMP レベルの測定と $[^3\text{H}]$ チラミンを用いたリガンド結合実験を行った。リガンドとして、ベンゼン誘導体の Friedel-Crafts アシル化反応、アミノ化、カルボニル基の還元、水酸基の修飾・置換によって合成したフェネチルアミン類縁体 (ラセミ体) を用いた。

2. ミシシッピーアカミミガメのメラトニンの定量と摂餌行動の測定

明暗条件下と恒条件 (薄明) 下で飼育したカメから 4 時間毎に採血し、血清中のメラトニン濃度をラジオイムノアッセイにより測定した。カメから摘出した松果体を明暗条件下と恒暗条件下で培養した。0 時と 12 時の前後 2 時間の間に培養液中に分泌したメラトニン量を測定した。摂餌行動は、赤外線センサーを利用して餌場に行った回数を測定して評価した。餌はいつでも摂取できる状態にしておき、最初は明暗条件下で測定し、引き続き恒明条件下で測定した。その後、16 時から 18 時の間の餌をメラトニン入りの餌に置き換えて測定した。

3. ペプチド C-RFa の生理機能解析

キンギョの実験では生理食塩水 (生食水) に溶解した C-RFa (100 μM) または抗 C-RFa 抗体 (原液) をそれぞれ 10 μl /匹、アカハライモリの実験では C-RFa (50 μM) または抗 C-RFa 抗体 (2 倍希釈) をそれぞれ 5 μl /匹、1

日1回4日間腹腔内投与した。これらの処置後、キンギョの鱗およびイモリの皮膚の顕微鏡標本をH・E染色により作製した。また、ニホンカナヘビの実験はイモリと同様で投与量を10 μ l/匹とした。4日目に両側の大腿部から筋肉を摘出し、湿重量より乾燥重量を差し引いて水分量を求めた。

結果および考察

1. チラミン受容体の機能解析とアゴニスト・アンタゴニストの創製

HEK293細胞に安定発現させたチラミン受容体は、0.1 μ M以上のチラミンに反応して細胞内cAMPレベルを低下させた。オクトパミンやドーパミンなどのアミンは2~3オーダー低い活性であった。また、チラミンはnMオーダーの受容体高親和性を示したが、他のアミンの親和性は3オーダー低かった。合成リガンドの親和性を求めたところ、2-chloro-2-(4-chlorophenyl)ethylamineはチラミンに次ぐ親和性を示したが、アゴニストではなく、チラミンの作用を阻害するアンタゴニスト活性を示した。しかし、この化合物のベンゼン環パラ位の塩素原子を水酸基に変換した類縁体は、親和性は低かったが、アゴニスト活性を示した(Ohta et al., 2005)。今後、この化合物がチラミン受容体に対して選択的なアゴニストであるか調べる必要がある。

2. メラトニンと摂食行動

ミシシッピアカミミガメの血中メラトニン濃度は、光に同調して明期に低く暗期に高かった。恒条件(薄明)下で飼育したカメの血中メラトニン濃度は24時間より少し短い周期で変化するサーカディアンリズムを示した。

哺乳動物では摂食中枢と満腹中枢は主時計のある視交叉上核と神経連絡があり、この視交叉上核がメラトニンによって調節されている(Luiten and Room, 1980)。今回の研究でカメでも摂食行動にサーカディアンリズムが見られたということは、摂食系と体内時計が直接ないしは間接的に関係していることを意味しており、そのリズムがメラトニン投与に同調することがそのことを裏づけている。今回の結果より、松果体でのメラトニン合成は直接光によって調節されていることがわかる。ミシシッピアカミミガメでは、夜に血中メラトニン濃度が高くなる

と、このメラトニンが直接ないしは間接的に摂食中枢を抑制し満腹中枢を活性化し、摂食行動が抑制されると考えられる。

3. ペプチドC-RFaの生理学的役割

キンギョの鱗の粘液細胞層はC-RFa投与により肥厚した。イモリの皮膚粘液分泌腺の大きさは、C-RFa投与により、背側・腹側共に有意なサイズの減少が見られ、抗C-RFa抗体では、腹側で増大がみられた。サイズの減少は粘液放出の促進状態を示しており、PRL投与の効果と同じ方向の変化である。これら粘液は体表を覆い、水分流入の障壁となると考えられる。カナヘビの実験では、C-RFa投与群のみに水分の有意な増加が観察された。抗体投与は水分の減少を招くが、生命維持のための他の器官による補償作用のため有意な差が出なかったものと考えられる。これらの結果は、PrRPは、魚類だけではなく両生類、爬虫類に対しても、体内水分制御機能を有しているという根拠を示すものである。

今後の展開

チラミンはオクトパミンの生合成前駆体であるだけでなく、固有の受容体を持つ生体アミンである。受容体研究から生理学研究に展開することにより生物制御剤の創製が可能となる。メラトニンは、体内時計と摂食系をつなぐケミカルメッセンジャーとして働き、有害外来生物の行動制御などに応用することができる。C-RFa(PrRP)は、下等脊椎動物の水分調節に深く関与しており、そのメカニズムが判明すれば、人体における水分調節の研究に応用し、貢献することが期待される。

引用文献

- Luiten, P. G. M. and Room, P. (1980) Interrelations between lateral, dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei in the rat. An HRP study. *Brain Res.*, 190: 321-332.
- Ohta, H., Khan, M. A. A., Nagai, I., Umemoto, N., Hamasaki, T. and Ozoe, Y. (2005) Responses of the silkworm tyramine receptor to 2-phenylethylamines and 5-phenyloxazoles. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 59: 150-160.
- Sakamoto, T., Fujimoto, M. and Ando, M. (2003) Fishy tales of prolactin-releasing peptide. *Int. Rev. Cytol.*, 225: 91-130.