

インドヒラマキガイからの生理活性ペプチドの単離

藤本正昭¹・早矢仕みか²・松島 治²・宗岡洋二郎³・
南方宏之⁴・野本享資⁴

Structure and actions of some neuropeptides isolated from the
freshwater pulmonate, *Indoplanorbis exustus*

Masaaki FUJIMOTO¹, Mika HAYASHI², Osamu MATSUSHIMA², Yojiro MUNEOKA³,
Hiroyuki MINAKATA⁴ and Kyosuke NOMOTO⁴

¹Department of Biological Science, LES, Shimane University

²Department of Biological Science, Faculty of Science, Hiroshima University

³Physiological Laboratory, Faculty of Integrated Arts and Sciences
Hiroshima University

⁴Suntory Institute for Bioorganic Research, Osaka

Abstract Eight bioactive peptides were purified from the pulmonate snail *Indoplanorbis exustus* using the isolated crop of another pulmonate snail, *Euhadra congenita*, as bioassay system. Amino acid sequences of these peptides were the same as or homologous to those of peptides so far reported, including FMRFamide, SCP and buccalin family peptides. All these peptides showed inhibitory effects on spontaneous contractions of the crop. It seems that GDPFLRFamide serves as a representative peptide of FMRFamide family in this species.

Key words: pulmonate snail, bioactive peptide, FMRFamide, SCP, buccalin

¹島根大学生物資源科学部生物科学科

²広島大学理学部生物科学科

³広島大学総合科学部生理学研究室

⁴サントリー生物有機科学研究所

はじめに

軟体動物腹足類の神経節細胞には大きいものが多く、その位置や色、大きさによる同定が比較的容易なため神経生物学の研究によく用いられている。有肺類の中樞神経系である食道神経環には通常11個の神経節が含まれており、各神経節からは軸索が神経束となって伸び、各々体の特定の部域を支配している。その内、内臓神経節 (visceral ganglion) は胃、肝臓、腎臓、生殖器、心臓などを神経支配している。

これらの神経系においては、通常中樞神経系において最も一般的であると考えられている伝達物質はもとより、神経ペプチドが重要な生理作用を行っており、Price and Greenberg (1977)によるFMRFamideの単離以来、様々

なペプチドが単離されている。軟体動物のペプチドには、FMRFamideファミリーの他、MIPファミリー (*Mytilus* inhibitory peptide family)、BUCファミリー (buccalin f.)、myomodulin-CARPファミリー (catch-relaxing peptide f.)、SCPファミリー (small cardioactive peptide f.)がある (Hirata *et al.*, 1989; Cropper *et al.*, 1988; Hirata *et al.*, 1987; Morris *et al.*, 1982; Kobayashi and Muneoka, 1990)。

これら神経ペプチドは同族体として軟体動物に広く分布しているが、個々の種についてはそれぞれ特有のアミノ酸配列をもつ同族体が存在し、神経生理学的実験を行うにはそれらその動物に実際に働いているペプチドを単離同定して用いる必要がある。そこで、軟体動物有肺類のインドヒラマキガイの中樞神経系の機能を調べるにあ

たり、生理活性ペプチドの単離・同定を試み、内臓神経節内の同定神経細胞V5の自発的バースト発射に及ぼす作用を検討した。

材料及び方法

1. 材料と神経環標本

材料は淡水産有肺類インドヒラマキガイ *Indoplanorbis exustus* で、広島大学理学部生物科学教室で以前より継代飼育しているものを用いた。水槽の水はフィルターにより常時濾過し、餌として30分間煮詰めたレタスと市販の熱帯魚用ペレットを与え、水温23°Cで飼育した。実験には殻長10-15mmのものを用いた。

まず、カイの殻を半分程度除去し、外套膜の直下で体を切断し、頭部を含む部分をリンガー液を満した電位測定用トラフ (15×20×20mmのアクリル製容器の底に東芝シリコンTSE387を半分程度敷いたもの) にタングステン針で固定した。食道神経環は食道を抜いて露出させ、15分間のコラゲナーゼ処理によりその結合組織を除去した。トラフは拍動ポンプ (アトー, SJ-1211) を用い、毎分0.6mlの割合で正常リンガー液の灌流を行い、薬物や試料は所定の濃度になるようリンガー液に溶解し、灌流液の切り替えにより投与した。正常リンガー液は、NaCl 51.3; KCl 1.7; CaCl₂ 4.1; MgCl₂ 1.5; HEPES 5.0 (単位mM), pH 7.4の組成のものを使用した。

2. 神経細胞内電位記録

細胞内電位記録用の微小電極は、4 M CH₃COOHを満した電極抵抗50-100MΩのもので、径0.1mmのAg/AgCl線を介して前置増幅器へ導いた。また、径0.5mmのAg/AgCl電極をリンガー液に漬かる部分に固定し、不関電極とした。細胞内電位変化はオシロスコープ (菊水電子DSS-5020A) で観察すると同時に、データレコーダーに記録保存し、後にペンレコーダー (グラフテック WR-3310) で書き取った。実験は全て室温下で行った。

3. ペプチドの抽出と精製

インドヒラマキガイ (780匹, 総重量666g) を-80°Cのアセトン中で砕いた後ホモジェナイズし、8,000rpm・4°C・30分間の遠心を行った。できた沈殿を70%アセトン中でもう一度ホモジェナイズ・遠心し、その上清と前回の上清とを合わせてアセトン上清とした。一方、沈殿は更に、80%メタノールでホモジェナイズ、遠心2回を行い、できた上清をメタノール上清とした。二つの上清は各々2リッ

トルあったので、これをロータリーエバポレーターを用いて減圧下40°Cで約100mlにまで濃縮し、各濃縮液に0.1%になるようにトリフルオロ酢酸 (TFA) を加えた後、約10,000×g・4°Cで30分間遠心した。次に各遠沈上清を3本の使い捨てのC18カートリッジカラム (Sep-Pak Vac, Waters) に直列に通し、それぞれのカラムについて0.1% TFAで洗った後、50%メタノール・0.1%TFAおよび100%メタノール・0.1%TFAで保持物質を溶出させた。この4つの溶出液を粗抽出液として以後の精製に用いた。

各粗抽出液を遠心エバポレーター (SAKUMA) を用いて約0.5mlまで濃縮し、フィルター (ULTRAFREE C3, Millipore 0.22μm) で遠心濾過して固形物を取り除いた。これを高速液体クロマトグラフィー装置 (HPLC, SHIMADZU) を用い、C18逆相カラム (Inertsil ODS 10×250mm) に通し、流速1ml/min, 0.1%TFAを含むアセトニトリル (ACN) 0-60%/120minの直線的濃度勾配で溶出し、溶出液を2ml毎にサンプルチューブに分取した。各画分からは後に述べる消化管によるバイオアッセイ用に2μl (1/1000) を分注した。バイオアッセイでは、これら分注した試料中に含まれる溶媒を遠心エバポレーターによって完全に蒸発させた後、リンガー液に溶解し使用した。バイオアッセイで活性のあった画分は、次に陽イオン交換カラム (SP-5PW, Tosoh 7.5×7.5mm), またはC18逆相カラム (ODS-80TM, Tosoh 4.6×150mm) に通し、1mlずつの画分に分けさらなるバイオアッセイを行った。以下同様にバイオアッセイと逆相・陽イオン交換HPLCによる分離を繰り返した。精製の程度は、HPLCのクロマトグラム (波長 220nmでの吸光度: OD at 220nm) により判断し、単一のピークを描くものを最終精製物とみなした。

以後、アミノ酸残基は一文字表記法により示す。なお、すべての試料は-80°Cで保存した。

4. バイオアッセイ

(1) マイマイの消化管の自動収縮を指標としたアッセイ
殻径約2.5cmの陸産有肺類セトウチマイマイ (*Euhadra congenita hickonis*) を野外より採集し、餌として薄くスライスしたサツマイモを与え室温下で飼育したものを用いた。マイマイの殻を取り除き、リンガー液 (NaCl 80; KCl 4; CaCl₂ 7; MgCl₂ 5; HEPES 5, 単位 mM, pH 7.0-7.1) を満した解剖皿中で摘出した消化管の素嚢・砂嚢の前後をそれぞれ木綿糸で縛り、一方を張力測定用トラフ (容量 2mlのシリンジ) の銀線に固定し、他方をストレインゲージを用いた張力トランスデューサーのフックに連結した。このトラフに別のシリンジを用いてリン

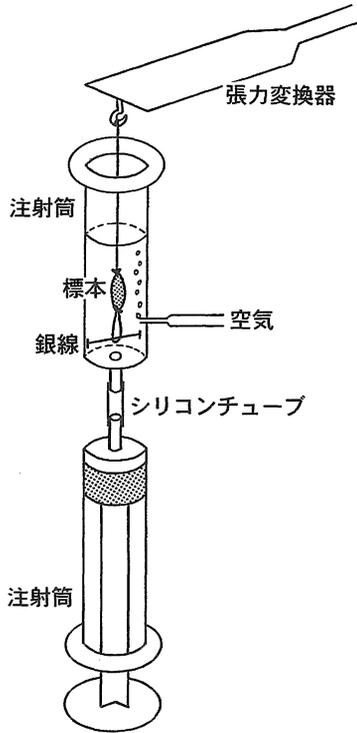


図1 マイマイの消化管の自動収縮記録装置の模式図

ガー液を満たし、攪拌のためエアーポンプで絶えずエアレーションを行った(図1)。トランスデューサーで電気信号に変換した張力は、アンプで増幅して平衡型レコーダーで記録した。試料は0.1mlのリンガー液に溶かしたものを、マイクロピペットを用いてトラフ上部から液中加入した。一つの試料をテストした後は、トラフ内部をリ

ンガー液で5回洗浄し、自動収縮の回復を待って、次の試料をテストした。

(2)インドヒラマキガイの神経系を用いた電気生理学的アッセイ

電位測定用トラフにセットしたインドヒラマキガイ神経環標本・内臓神経節中の同定V5細胞より自発放電を細胞内記録し、灌流液に試料を添加した際の放電パターンの変化を指標としてアッセイを行った。

5. ペプチドのアミノ酸配列の決定

これらの最終精製物につき、エドマン分解法によるアミノ酸配列分析を行った。

結 果

1. マイマイの消化管収縮を指標としたバイオアッセイ

マイマイの消化管は、不規則ながらも、随時自動収縮を行っている。本研究では、収縮のベースライン (tone) が上昇し収縮高 (peak to peak) の減少がみられる、あるいは収縮頻度が増加する場合、また、自動収縮が行われていない標本で自動収縮が惹起される場合、興奮性反応とみなした。一方、収縮のベースラインが下降し自動収縮が停止する、あるいは自動収縮高が減少する場合、また、自動収縮が行われていない標本で、収縮のベースラインが下降する場合抑制性反応とみなした(図3)。

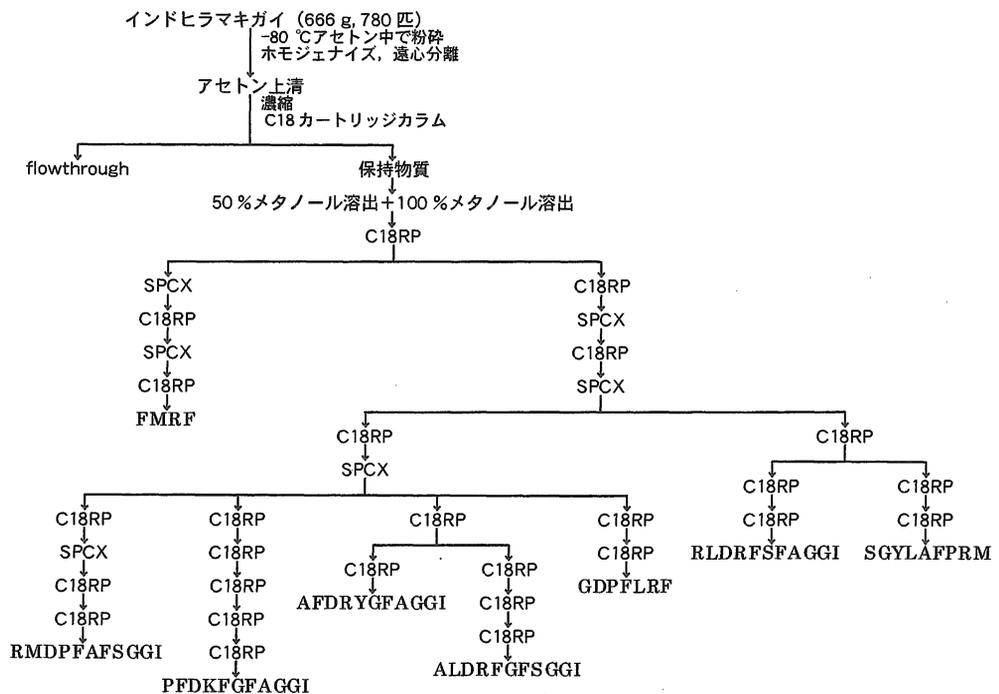


図2 8種のペプチドの精製手順。C18RP：C18逆相カラム，SPCX：陽イオン交換カラム。ペプチドのアミノ酸配列はN末端からの一文字表記。

2. 生理活性ペプチドの単離

アセトン上清50%メタノール抽出液 (A50), アセトン上清100%メタノール抽出液 (A100), メタノール上清50%メタノール抽出液 (M50) と, メタノール上清100%メタノール抽出液 (M100) という4つの粗抽出液をマイマイの消化管収縮を指標としたバイオアッセイにかけると, A50, A100, M50は生理活性を示したが, M100は活性を示さなかったため, A50とA100を混合したものと, M50の2種をHPLCにかけた. M50では, 第一段階の逆相HPLCの後のアッセイにより3カ所の活性部位が認められ, 最終的にシングルピークを描く2つの最終精製物が得られた. しかし, 配列決定をしてみると, 両者ともGDPFLRFというFMRFamideファミリーの amino acid 配列であり, 既知のペプチドと同じ配列であった. A50+A100では, 第一段階の逆相HPLCの後のアッセイにより4カ所の活性部位が認められ, 最終的にはシングルピークを描く10個の最終精製物が得られた. 全体としては, 配列決定によりFMRFamideファミリーから2種, buccalinファミリーから5種とSCPファミリーから1種のペプチドが確認され

た (図2). 単離したペプチドの配列および消化管の自動収縮に対する効果を表1 (Contraction) に, また典型例を図3に示す. 消化管に対しては全てのペプチドが抑制性の反応を引き起こした.

3. インドヒラマキガイのV5神経細胞を用いた電気生理学的アッセイ

このカイの内臓神経節には大型の細胞体をもつニューロンが多く, 特にその後方の神経束の出口あたりには直径40μmに達する細胞が10個あまり見られる. これらの細胞にガラス微小電極を任意刺入すると, 多くのものが自発的なバースト発射を起こしていることがわかる. その中から, 相対的位置とその色から同定しV5細胞と命名した細胞に着目し, その自発的なバースト発射の変化を指標として最終精製物あるいはそれと同じ配列を持つ合成物質の効果を調べた. アッセイでは, 試料の濃度が分かっている場合には濃度を10⁻⁵Mとし, 分かっている場合には, 試料を30倍希釈して用いた. FMRFamide, GDPFLRF(a)とRMDPFAFSGGI(a)では抑制反応が (図4), RLDRFSFAGGI(a)とPFDKFGFAGGI(a)では興奮性反応が起こった. SCP (SGYLAFPRM(a)), AFDRYGFAGGI(a)とALDRFGFSGGI(a)については顕著な変化がみられなかった (表1 V5-Burst). なお, V5細胞への他のニューロンからの入力を絶つコバルトリンガー液で

Contraction of digestive tract in *Euhadra*

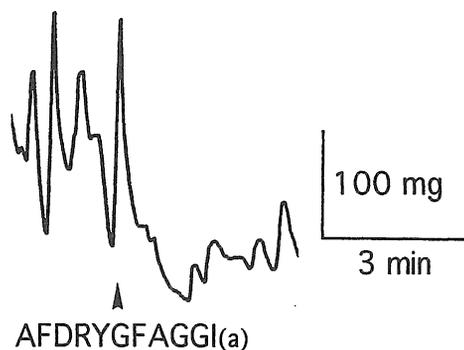


図3 マイマイ消化管の収縮活動に対するペプチドの効果の一例 (AFDRYGFAGGI (a)). ペプチドの投与によりベースが下がり, 収縮高が減少している.

Distribution of neurons in VG

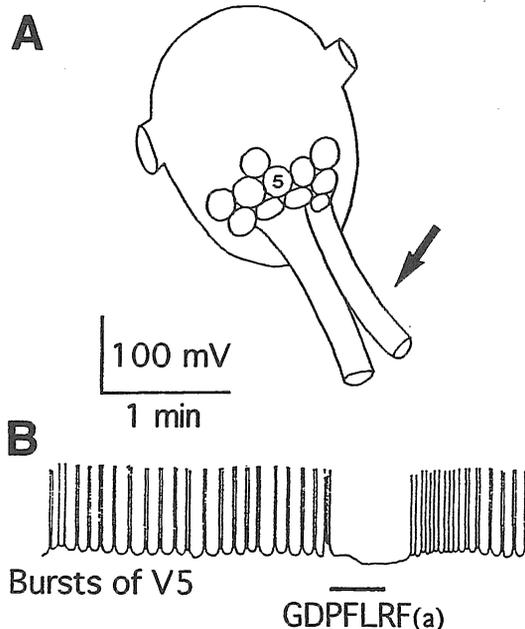


図4 A: 内臓神経節中のV5細胞の位置. 矢印は内臓に向かう神経束. B: V5細胞のバースト発射に及ぼす単離ペプチドの効果の例 (GDPFLRF (a)).

Contraction V5-Burst

| | | | |
|-----------------|----------------|---|---|
| FMRF family | FMRFamide* | - | - |
| | GDPFLRF(a) | - | - |
| SCP family | SGYLAFPRM(a) | - | • |
| buccalin family | RLDRFSFAGGI(a) | - | + |
| | RMDPFAFSGGI(a) | - | - |
| | PFDKFGFAGGI(a) | - | + |
| | AFDRYGFAGGI(a) | - | • |
| | ALDRFGFSGGI(a) | - | • |

表1 +は興奮性の応答を, -は抑制性の応答を, •は変化のないことを示す. (*市販品)

は、FMRFamideの効果のみが観察された。

考 察

通常、神経系に対する活性物質を検索するには、当該動物の神経応答を指標とするアッセイに基づき精製する事が望ましいが、本研究では、ヒラマキガイの類縁種であるマイマイの消化管を用いた。その利点として、一般に消化管は種々の活性物質に対してよく反応するので、幅広く生理活性物質を単離できることがあげられる (Muneoka and Kobayashi, 1992)。

FMRFamideファミリー、SCPファミリー、buccalinファミリー共に既知のペプチドで軟体動物ではよく見られるものである (Bulloch *et al.*, 1988; Lloyd *et al.*, 1985; Candelario-Martinez *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 1992; Ikeda *et al.*, 1992)。今回単離されたペプチドは、質量分析にかけていないため、C末端の残基がアミド化されているかどうかは不明である。しかし、他の軟体動物より単離された関連ペプチドはアミド化されており、インドヒラマキのペプチドもおそらくアミド化されているものと考えられる。SCPは*Helix* (Ikeda *et al.*, 1991; 1992) と*Achatina* (Hori *et al.*, 1990) から同じものが単離されている。5種のbuccalinファミリーのうちRLDRFSFAGGI(a)は、*Helix* (Ikeda *et al.*, 1992) と*Achatina* (Minakata, personal communication) から単離されたものとアミノ酸が1残基異なっているものであった (*Helix* - 6残基目のSがG, *Achatina* - 2残基目のLがV)。

V5細胞の自発的バースト発射に対して抑制性の効果を持つペプチドの内、コバルトリンガー液を用いてこの細胞へのシナプス入力を絶ってもその効果が消えなかったものはFMRFamideであった。しかし、今回単離されたペプチドの内一番多く含まれていたのはGDPFLRFであり、これはFMRFamideファミリーに属することから、本種の中心的FMRFamideファミリーペプチドはGDPFLRFである可能性もある。

マイマイの消化管活動に対して、これらのペプチドは全て抑制性の作用を呈した。一方、V5細胞のバースト発射に対しては促進性、抑制性あるいは効果なしと、種々の結果が得られたが、これはシナプス前細胞に対する濃度による効果とも考えられる。そのため、効果が顕著でなかったペプチドについても濃度を変えることによって効果が現れる可能性もあり、今後さらに検討する必要がある。

この様に、今回単離されたペプチドは、マイマイの消化管をアッセイ系として用いたものであったが、V5細胞に対してだけでもペプチドの種によって様々な活性がみられるなど興味ある特性を示しており、今後、これらの作用機序について調べる事が重要であると考えられる。

引用文献

- Bulloch, A. G. M., Price, D. A., Murphy, A. D., Lee, T.D. and Bowes, H.N. FMRFamide peptides in *Helisoma*: identification and physiological actions at a peripheral synapse. *J. Neurosci.*, **9**: 3459-3469, 1988.
- Candelario-Martinez, A., Reed, D. M., Prichard, S. J., Doble, K. E., Lee, T. D., Lesser, W., Price, D. and Greenberg, M. J. SCP-related peptides from bivalve mollusks: identification, tissue distribution, and actions reference. *Biol. Bull.*, **185**: 428-439, 1993.
- Cropper, E. C., Miller, M. W., Tenenbaum, R., Kolks, M. A. G., Kupfermann, I. and Weiss, K. R. Structure and action of buccalin: a modulatory neuropeptide localized to an identified small cardioactive peptide-containing cholinergic motor neuron of *Aplysia californica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 6177-6181, 1988.
- Hirata, T., Kubota, I., Iwasawa, N., Fujisawa, Y., Muneoka, Y. and Kobayashi, M. Effects of *Mytilus* inhibitory peptides on mechanical responses of various molluscan muscles. *Comp. Biochem. Physiol.*, **93C**: 381-388, 1989.
- Hirata, T., Kubota, I., Takabatake, I., Kawahara, A., Shimamoto, N. and Muneoka, Y. Catch-relaxing peptide isolated from *Mytilus* pedal ganglia. *Brain Res.*, **422**: 374-376, 1987.
- Hori, K., Furukawa, Y. and Kobayashi, M. Regulatory actions of 5-hydroxytryptamine and some neuropeptides on the heart of the African giant snail, *Achatina fulica* Ferussac. *Zool. Sci.*, **7**: 377-384, 1990.
- Ikeda, T., Kiss, T., Hiripi, L., Fujisawa, Y., Kubota, I. and Muneoka, Y. MIP (*Mytilus* inhibitory peptide) analogues isolated from the ganglia of the pulmonate mollusc *Helix pomatia*.

- In Shimonishi, Y. (ed), *Peptide Chemistry 1990*. Protein Research Foundation, Osaka, pp.357-362, 1991.
- Ikeda, T., Minakata, H., Fujita, T., Muneoka, Y., Kiss, T., Hiripi, L. and Nomoto, K. Neuropeptides isolated from *Helix pomatia*. Part 1. Peptides related to MIP, buccalin, myomodulin-CARP and SCP. In Yanaihara, N. (ed), *Peptide Chemistry 1992*. ESCOM Science Publishers B. V., Leiden, The Netherlands, pp. 576-578, 1992.
- Kobayashi, M. and Muneoka, Y. Structure and action of molluscan neuropeptides. *Zool. Sci.*, 7: 801-814, 1990.
- Lloyd, P. E., Kupfermann, I. and Weiss, K. R. Two endogenous neuropeptides (SCP_A and SCP_B) produce a cAMP-mediated stimulation of cardiac activity in *Aplysia*. *J. Comp. Physiol. A*, 156: 659-667, 1985.
- Morris, H. R., Panico, M., Karplus, A., Lloyd, P. E. and Riniker, B. Elucidation by FAB-MS of the structure of a new cardioactive peptide from *Aplysia*. *Nature*, 300: 643-645, 1982.
- Muneoka, Y. and Kobayashi, M. Comparative aspects of structure and action of molluscan neuropeptides. *Experientia*, 48: 448-456, 1992.
- Price, D. A. and Greenberg, M. J. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science*, 197: 670-671, 1977.
- Weiss, K. R., Brezina, V., Cropper, E. C., Hooper, S. L., Miller, M. W., Probst, W. C., Vilim, F. S. and Kupfermann, I. Peptidergic cotransmission in *Aplysia*: Functional implications for rhythmic behaviors. *Experientia*, 48: 456-463, 1992.