摂食と細胞増殖因子 — ヒドラのグルタチオン応答と細胞増殖因子の関係から

九州大学理学部生物学教室 花井 一 光

In a lower invertebrate hydra, growth factors appear to be released after food intake. We found that the growth factors depressed the feeding response. We also found a phasic increase of acidic FGF activity after food intake in cerebrospinal fluid from cannulated rats. These observations suggest a close relationship between food intake and growth factors from hydra to mammals.

Hydra / feeding / growth factors / acidic fibroblast growth factor / CNS regulation of food intake

細胞増殖因子は当初培養細胞の増殖に必須の微量因子として見出され、精製された。しかし最近では多彩な生物学的活性を示す情報伝達物質であると認識されつつある¹⁾。筆者はヒドラの摂食応答であるグルタチオン化学受容の分子機構を明らかにすべく研究している。この過程で偶然に、非常に低濃度の細胞増殖因子が特異的に応答を抑制することを見出した²⁾。一方ヒト・ラットの高等動物でも体液中に細胞増殖因子活性が食後一過的に増加することを見出した³⁾。これらの観察を通じて、動物界全体で、細胞増殖因子は *in vivo* で摂食調節にも関与しているのではないかと仮説に至った。

もともと摂食と細胞増殖は深くカップルしている。動物がエサを食べて成長することはあまりに日常的で、特別な注意すら払っていないのではなかろうか。成熟した高等動物では、摂食と細胞増殖との関係は不明な点が多いが、下等動物ヒドラでは明快である。ヒドラではエサを食べた後分裂指数が一過的に増加し、細胞増殖が起る^{4),5)}。細胞数が増加すると新しい個体が横腹から出芽し、3日位で別の個体になる(図1)。出

芽の頻度はエサの量に依存し、細胞数と個体数は比例している⁶⁾。ヒドラは摂食と細胞増殖の関係を調べるのに適している。

細胞増殖因子によるグルタチオン応答の抑制

淡水産腔腸動物ヒドラは神経系を備えた最下等の動物である。これの摂食行動は還元型グルタチオンによって特異的に誘発される⁷⁾。ヒドラは生きている動物性プランクトンを食べるが、刺胞でエサを捕獲してエサの傷口から還元型グルタチオンが漏出してくれば、これを捕食する。ヤマトヒドラ (*Hydra japonica*) ではグルタチオンによって誘発される反応のうち、触手球形成応答(触手が頭のところで糸まりのようになる応答)の持続時間は再現性にすぐれ反応を定量的に調べるのに適している⁸⁾。

この応答を解析中に、我々は偶然高等動物由来の細胞増殖因子—血小板由来細胞増殖因子(PDGF)、酸性型、塩基性型繊維芽細胞増殖因子(aFGF, bFGF)、インターロイキン(IL)などが摂食応答を特異的に抑制することを見出した。おもしろいことにそれぞれの因子はグルタチオン濃度に応じて複雑な抑制を示した(図2)。これらの複雑な抑制は、グルタチオンの濃度域に応じて、少なくともR1—R5の5つの応答成分があり(図2D)、それぞれの因子は特異的な様式でR1—R5を抑制すると考えればうまく整理できる(表1)²⁾。R1—R5のおおのは狭い濃度域(高々10倍)でのみ大きな応答を示し、全体では 10^4 の濃度域をカバーしている。このような受容システムは環境中のグルタチオン濃度のわずかな差を検出できると考えられる。視覚を持たないヒドラが動き回るエサを捕獲するためには必要なかもしれない。狭い範囲の刺

図1. ヒドラの摂食と無性生殖

Growth factors and the feeding response of Hydra

Kazumitsu HANAI

Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University

図2 A) 精製 PDGF (3.3pM) 存在下でのヒドラのグルタチオン応答。B) 精製 bFGF (○; 2.6pM, ●: 0.26fM) 存在下での応答。C) 精製の aFGF (3aM) 存在下での応答。…○…はコントロールの応答を示す。縦軸は触手球形成応答の持続時間 (分), 横軸は S-メチルグルタチオンの濃度。D) 仮想的な応答の 5 成分 (R1-R5)。実際に観察されるのはこれらの総和。

表1 ヒドラのグルタチオン応答に対する細胞増殖因子および関連物質の効果

	応答	ED ₅₀
EGF	R2, R3, R4	1.5×10^{-8} M
aFGF	R4	$< 10^{-20}$
bFGF	R2	5.0×10^{-13}
	R3, R5	5.5×10^{-19}
NGF	R1, R3	7.0×10^{-11}
PDGF	R2	1.7×10^{-13}
TGF α	R2	$< 10^{-20}$
TGF β	no effect	$(10^{-10}$ M)
insulin	no effect	$(10^{-7}$ M)
IL-1 β	R2, R4	$< 10^{-20}$
TNF α	R5	$< 10^{-20}$

激 (音のレベル, 周波数, 光の波長など) にのみ応答する複数のユニットが集まってダイナミックレンジを広くしている例は多い。これは感覚器の受容域分割 (range fractionation) と呼ばれている⁹⁾。ヒドラのグルタチオン受容は化学物質の濃度に対する受容域分割の例のように思える。

グルタチオン受容体のモノクローナル抗体による分別

R1—R5は細胞増殖因子の抑制から推察された見掛け上のものであるが, R1—R5のいくつかのみを特異的に抑制するモノクローナル抗体を多数得ている¹⁰⁾。これらの抗体を利用した免疫組織化学では, それぞれの抗原は異なる分布をしている。抗原の生化学的解析では R5は特に多量にあるようである。R5に対する特異的光親和標識剤 S-(p-アームドフェナシル)-グルタチオンで抗原を標識して, アコニストやアンタゴニストと R5抗原 (R5を抑制する抗体の抗原) との相互作用を調べてみると, R5抗原は R5受容体そのものと考えてよいという結果を得つつある。R1—R5はそれぞれ異なる受容体に媒介される応答であると考えられる。

ヒドラは細胞増殖因子に対する特異的で高度な増巾機構を備えている

表1からわかるように, 細胞増殖因子によるグルタチオン応答の抑制はしばしば非常に低濃度で観察される。これはヒドラが 10^{10} 以上にも達する特異的な増巾機構を備えているためであることがわかった。シャー

レのなかに一匹のヒドラを入れておき、閾値濃度の aFGF を加え 5 分間置く。するとこの保温溶液中の aFGF 活性は 10^{13} 倍希釈しても検出された。これはヒドラが aFGF の刺激を受けて、内因性の aFGF 様活性物質を飼育液中に放出するためと考えられる。一方 1 度 aFGF と保温して洗ったヒドラ (aFGF 順化ヒドラ) ではもはやどのような高濃度でも aFGF による抑制は見られない (脱感作) が、内因性 aFGF 様物質による抑制は見られる。従って、ヒドラは aFGF 刺激を受けるとまず内因性物質を放出しその内因性物質がグルタチオン受容体 (R4) と直接相互作用して応答を抑制すると考えられる。一方 1 度 aFGF と保温すると、放出すべき内因性物質をすべて放出してしまうので、aFGF 順化ヒドラではもはや aFGF による抑制は受けないものと思われる。内因性 aFGF 様物質については今後の研究に待つところが多いが、aFGF と同じくヘパリンに親和性を示し、aFGF に類似したものと思われる。

aFGF 以外の多くの細胞増殖因子でも脱感作と活性の増中は観察されるので、類似の機構が働いている可能性が高い。前述したように細胞増殖因子の作用は R1—R5 にそれぞれ特異的であるので、内因性因子もそれぞれに対応して特異的なものがあると考えられる。このヒドラの細胞増殖因子増中機構はレーザーやメーザーの発振機構に類似しており、生物レーザーとも呼べるものである。

摂食と高等動物中枢における aFGF 活性

ヒドラの摂食応答系は細胞増殖因子を非常に敏感に検出できるので、これを利用して様々の微量の生物学的試料中の細胞増殖因子活性を調べることができる。食前・食後で血清・脳脊髄液 (CSF) 中の R4 抑制活性 (aFGF 活性) が大きく変化することを見出した (図 3)³⁾。食前に採取したヒトの血清や、ラットの第Ⅲ脳室より採取した CSF 中には R4 抑制活性はほとんど見出されない。一方食後に採取した試料では 10^7 倍以上強力な活性が見出される。この活性が aFGF 由来のものであることは次のようにして確かめられた。1) ヘパリンは FGF と特異的に相互作用し、ヘパリンセファロースの親和クロマトグラフィーで特異的に精製されるが、CSF 中の活性もヘパリンカラムで aFGF と同じ振舞いを示す。2) BALB/c3T3 細胞を利用して増殖因子活性を調べても食後の試料では実際に 10 倍高い活性が見出された。3) 食後の CSF 中の活性は抗 aFGF 抗体で特異的に中和された。一方熱安定性では

図 3 A) 食前・食後の人の血清 (0.1%, ○●), ラット脳脊髄液 (10^{-6} , □■) 存在下でのヒドラの応答。食前 (白) の試料存在下では R4 応答は抑制されていないが、食後 (黒) の試料存在下では抑制される。B) ラット脳脊髄液中の R4 抑制活性の経時変化。第 1 日目は絶食、2 日目の 17:20 にエサを与え以後自由に食べられるようにする (□) か、同時刻にグルコース (300mg/kg 体重) を腹腔内注射 (●)。縦軸は R4 抑制の観察できる最大希釈度の対数。

CSF 中の R4 抑制活性は aFGF と異なっており、aFGF そのものではなく、一部が切断されたフラグメントである可能性が高い。このことは食前・食後でヒドラの系では 10^7 もの活性の差が見出されるが、BALB/c3T3 細胞の系では 10 倍の活性の差しか見出されないことから示唆される。両システムでの aFGF ペプチドに対する特異性が異なることが考えられる。

さて食後の脳室内には強い aFGF 活性が見出されるので、高度に精製された aFGF を脳室内に注入して摂食量に対する効果を調べてみた。その結果 10 匹のラットの平均で 24 時間摂食量は 13% 減少し、これは有意な減少であった³⁾。

次に視床下部外側野 (LHA) のグルコース感受性ニューロンの神経活動に対する効果を調べてみた。このニューロンは絶食時 (摂食前) には高頻度の自発放電を示し、摂食後の活動は低下する。このニューロン

は摂食中枢で摂食調節に関与していると考えられている¹⁰⁾。このニューロンの活動を記録しながら、多連微小電極を介してaFGFを投与してみた。すると大部分のLHAのグルコース感受性ニューロンで、aFGFを投与すると自発放電頻度は大巾に減少し、その状態がおよそ20分持続した後また自発放電の頻度はaFGF投与前のレベルまで自発的に回復してくるのが観察された³⁾。従ってaFGFは摂食中枢のニューロンに対して神経活動修飾因子として機能することが確かめられた。

抗aFGF抗体を利用した脳の免疫組織化学の結果によると、絶食時にはaFGFは主に脳室壁の上皮細胞にあり、腹腔内グルコース投与(摂食と同等、図3参照)によって、脳実質の方に放出されるものと考えられる(滋賀医大・木村宏博士私信)。精製aFGFを脳室内に投与した場合、摂食量に対する効果は小さいが、これは脳室から脳実質の方に移行するaFGFが非常に少ないためと考えられる。またaFGFが失活し易いことを考えると、移行したaFGFも大部分が失活している可能性も高い。

以上の結果は、aFGF関連物質が高等動物中枢で内因性の摂食調節物質として働いていることを示唆している。FGFは神経細胞に対して直接あるいは間接(グリア細胞を介して)に栄養性因子として働くことが示されている¹²⁾。FGF活性が摂食後に大きく変化することは、学習・記憶といった中枢神経系の高度な機能にも深く関与している可能性がある。

今後の展望

ヒドラの摂食応答と細胞増殖因子の関係から、図4のような図式が考えられる。すなわち、摂食により細胞増殖因子が放出されるが、この放出された因子は細胞の増殖・分化に働く(forward action)だけでなく、摂食機構に対して抑制因子(negative feedback)として働くと考えられるものである。この図式は下等動物から高等動物まで広くあてはめることができるように思われる。この図式に示されたループについて更に理解するためには、生理学、細胞生物学、分子生物学など多方面からのアプローチが必要だろう。高等動物においてはこのループにもいくつかのレベルがあってもかなり複雑なものである可能性は高いが、このループでの異常が様々な病態に関係していることは容易に想像される。ヒドラでの知見が将来病態の理解の一助になるかも知れない。

ヒドラは、摂食後様々の活性を飼育液中に放出する。

図4 摂食と細胞増殖因子の関係を示す仮説。

これらの因子はグルタチオン受容体と直接相互作用する可能性があり、多くの相互作用が体表面と飼育液との間で行なわれる。外から加えた細胞増殖因子が内因性因子を放出させるのも、この摂食後に見られる体表面と飼育液との間の相互作用を反映しているものと思われる。またヒドラの細胞を*in vitro*で研究できれば、増殖・分化についてもより詳細に解析できる。我々は現在この方面にも努力している。

謝辞: ヒドラのグルタチオン応答がPDGFによって抑制されることを、最初に示唆されました加藤久雄博士(現循環器病センター)に感謝します。ラットについての実験は九州大学医学部第一生理学教室大村裕教授および同教室の協力によるもので、同教授、教室員の皆様に感謝します。今榮康雄博士には本稿を用意するに当たって有益な助言をいただきました。同氏に感謝します。

文 献

- 1) Sporn, M. B. and A. B. Roberts, (1988) *Nature*, 332, 227-219.
- 2) Hanai, K., H. Kato, S. Matsushashi, H. Morita, E. W. Raines, and R. Ross (1987) *J. Cell Biol.*, 104, 1675-1681.
- 3) Hanai, K., Y. Oomura, Y. Kai, K. Nishikawa, N. Shimizu, H. Morita, and C. R. Plata-Salaman (1988) *Amer. J. Physiol.*, in press.
- 4) Campbell, R. D. (1967) *Dev. Biol.*, 15, 487-502.
- 5) David, C. N., and R. D. Campbell (1972) *J. Cell Sci.*, 11, 557-568.
- 6) Otto, J. J. and R. D. Campbell (1977) *J. Cell Sci.*, 28, 117-132.
- 7) Loomis, W. F. (1955) *Ann. NY Acad. Sci.*, 62, 211-227.
- 8) Hanai, K. (1981) *J. Comp. Physiol.*, 144, 503-508.
- 9) Cohen, M. J. (1964) *Neural Theory and Modelling*. (ed. R. F. Reiss), Stanford University Press, Stanford, CA, 273-292.
- 10) Hanai, K., M. Sakaguchi, S. Matsushashi, K. Hori, and H. Morita (1987) *Ann. NY Acad. Sci.*, 510, 335-337.

- 11) Oomura Y. (1983) *Adv. Metab. Disord.*, 10, 31-65.
 12) Hatten, M. E., M. Lynch, R. E. Rydle, J. Sanchez,

J. Joseph-Silverstein, D. Moscatelli, and D. B. Rifkin (1988) *Dev. Biol.*, 125, 280-289.

はない かずみつ

昭和46年京都大学理学部卒業。昭和51年同大学院理学研究科博士課程単位修得退学。同年九州大学理学部生物学教室助手現在に至る。生物物理学会は感覚受容の重要なスポンサーですが、光受容だけでなく化学受容の方にももう少し配慮してほしい。小生はこれまで12年間化学感覚のテーマで科研費をもらったことは1度もありません。石の上にも3年と言いますが学問の世界はもっときびしいのでしょうか。

☎092-641-1101 内線4424

RNSAKU
いんさく

Isolation of a putative phospholipase C gene of *Drosophila*. *norpA*, and its role in phototransduction

Bloomquist, B. T., Shortridge, R. D., Schneuwly, S., Perdew, M., Montell, C., Steller, H., Rubin, G., and Pak, L. W. (1988) *Cell*, 54, 723-733.

ショウジョウバエのX染色体から *norpA* 遺伝子が単離された。 *norpA* 突然変異体では光受容に伴う視細胞の受容器電位が発生しなくなる。得られたDNAは網膜特異的に発現しているようであり、また1095アミノ酸残基よりなる蛋白をコードしていた。このアミノ酸配列は牛の脳から得られたホスホリパーゼC (PLC) の配列と類似性が高く、また、以前から *norpA* 突然変異体では眼のPLC活性が著しく低下していることが報告されていたので、PLCをコードしているものと結論された。もし、これが正しければ、機能の分かっているホスファチジル酸特異性PLCとしてはアミノ酸配列の分かった最初の物となる。

この結果は、ショウジョウバエの視興奮過程にPLCが、つまり、イノシトール三リン酸を介してのカルシウムイオン濃度変化が関与していることを強く示唆しており、最近明らかにされた脊椎動物の視興奮経路；ロドプシン→G蛋白→ホスホジェステラーゼ→cGMP→チャンネルと比較して大変興味深い。

(T. I.)