ヒトデの生殖腺刺激ホルモンは インスリンファミリーだった！

吉国通庸

イトマキヒトデの生殖腺刺激ホルモンと考えられてきた放射神経由来のペプチドの構造を決定した。その分子構造と遺伝子構造の解析から、インスリンファミリーに属することがわかった。これまでにウニやナマコで報告されてきた知見と合わせると、棘皮動物の生殖腺刺激ホルモンは、どれもがインスリンファミリーに属しているかも知れない。

ヒトデ生殖腺刺激ホルモンの歴史

1959年に Chaet と McConnaughey が、アメリカのヒトデ *Asterias forbesi* (日本のヒトデ *Asterias amurensis* と同じ属に分類される。 *A. amurensis* の和名はヒトデだが、一般的な呼称のヒトデと区別するために、本稿ではあえて俗称のキヒトデと表記する) の放射神経から得た熱海水抽出物を個体に注射すると配偶子の放出が起こることを偶然発見した⁽¹⁾。翌年には、ヒトデから効果的に卵や精子を得る方法であると紹介し、放卵された卵のほとんどは卵核胞(卵母細胞に特徴的な肥大化した核)を消失しており、そうした卵の受精率は非常に高いことも観察している⁽²⁾。Chaet らのこの発見は、その後

の棘皮動物の生殖現象における内分泌学的研究の発端となり、また大量の卵と精子を確実に得る方法が確立されたことで、発生学的研究にも大きく貢献することとなった。

金谷らはこの発見を受けて、ただちにヒトデの配偶子放出の研究を開始している。1962年には、キヒトデやイトマキヒトデ (*Asterina pectinifera*, 図1) など5種類のヒトデ類を用いてそれぞれの神経抽出物中の配偶子放出活性を観察し、さらに、種を変えて交互に注射を行ない、神経抽出物が種を越えて作用する場合があることも示した。また、この頃すでに、神経抽出物中の有効な成分はポリペプチドであろうと予想している^(3,4)。ヒトデの5本の腕の中には、それぞれ一対の生殖巣が含まれていて、精巣・卵巣を問わず、小さな房が集まってシダ植物の2回羽状複葉のような格好をしている。ヒトデの腕に付けた小さな切り口から卵巣の一部をシャーレに取り出し、数mm程度の小さな断片に切り分けて、海水中で培養実験を行なうことができる。ヒトデ自身は水槽に戻して生かしておけば繰り返し実験に供することが可能なので、感受性を揃えた実験を何度も行なうことができる。このようにして、卵巣片からの卵の放出を指標にして神経抽出物中の放卵誘導活性を検出する生物検定法が確立された(放卵アッセイ法、図2)⁽⁵⁾。一般に動物の卵

Gonad-stimulating Substance of Starfish is an Insulin Family Peptide
Michiyasu YOSHIKUNI, 九州大学大学院農学研究院

図1 ■ イトマキヒトデと放射神経

産卵を始めたイトマキヒトデの雌（左写真）。背側の各腕と腕の間に一対の生殖孔がある。（写真の左端にこぼれ落ちているオレンジ色の卵が見える）。右上の写真は腹面を示してある。右下は、管足の走る部分を拡大してある。溝の底部を写真では左右に走る放射神経組織が見える（矢印で示した。見やすいように管足は切除してある）。写真の個体は最大幅で8 cm 程度

図2 ■ 卵巣片を用いた放卵アッセイ

産卵期のイトマキヒトデから卵巣片を海水に取り出したところ。左写真は神経抽出物を加える前の卵巣片、長さは5 mm 程度。右写真は、神経抽出物を加え室温で1時間培養した後の同じ卵巣片。ほとんどの卵を放出して、卵巣片自体は小さく縮んでいる。放出された卵は、卵核胞を消失している。卵の直径は150 μm 以下

母細胞は、卵巣内にあるときは、卵黄形成を十分に遂げて最大級に大きくなったものであっても、減数分裂を途中で停止したいわば休止期の状態にあってそのままでは受精できないものが多い。しかし、放卵に先立って減数分裂が再開・進行し、受精可能な卵細胞へと変化することが知られており、その一連の反応を卵成熟 (oocyte maturation) と呼んでいる。放卵アッセイにおいて卵巣片から放出された卵は卵成熟を起こしていることから、神経抽出物は放卵を誘導するとき、同時に卵成熟を誘起していることがわかる。

1967年に、神経抽出物は生殖巣に作用して新たに2次物質を産生させ、その2次物質が卵成熟と配偶子放出をひき起こしていることが明らかにされた^(6,7)。それに伴い、神経抽出物中の活性成分は生殖巣刺激物質 (gonad-stimulating substance, GSS)、生殖巣で新たに産生さ

れる2次物質は卵成熟誘起物質 (maturation-inducing substance, MIS) と命名された。1969年には、キヒトデの20 gの乾燥神経と20 kgの卵巣をインキュベートした100 lの海水中からこの2次物質 MIS が単離精製され、1-メチルアデニン (1-methyladenine, 1-MA) であると同定された。動物で構造が解明された初めての MIS であった⁽⁸⁾。続く1971年には、MIS の産生を指標にして、GSS の標的組織が卵巣では濾胞細胞であることが明らかとなり⁽⁹⁾、1977年には精巣中の体細胞 (A 細胞) が GSS の作用点として見いだされた⁽¹⁰⁾。精巣片を用いた GSS や 1-MA による放精アッセイ法も不可能ではないが、精子が自然に漏れ出てしまうので、はっきりした結果を得るには細めの精巣片を用いるなどの工夫が必要である。卵巣に比べると解析は遅れている。

ヒトデの卵成熟におけるホルモン制御の流れを、脊椎動物のものと対比してみよう。図3の左側にヒトデ、右側にサケ科魚類の例を示してある。一般に動物の卵母細胞の発達は、卵黄物質を蓄積して卵自体が大きく成長するために比較的長い期間となる卵黄形成期と、産卵に先立ち卵成熟を完了する短い卵成熟期とに区別できる。この図では、卵成熟期に限って示してある。ヒトデでは (図左)、放射神経から分泌された GSS が卵巣中の濾胞細胞を刺激し、MIS である 1-MA の産生を誘導する⁽¹¹⁾。分泌された 1-MA は卵母細胞表層にある受容体に結合して卵成熟を開始させる⁽¹²⁾。サケ科魚類では (図右)、脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン (ゴナドトロピン) が血流を経て卵巣に至り卵巣中の濾胞細胞層を刺激して、魚類の MIS であるステロイドの $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17\alpha, 20\beta$ -DP) の産生を誘導する⁽¹³⁾。分泌された $17\alpha, 20\beta$ -DP は、ステロイドでありながら卵表にある受容体に結合して卵成熟を開始させる⁽¹⁴⁾。このようにその作用を対比してみると、ヒトデ GSS はまさに棘皮動物のゴナドトロピンに相当するものであることがよくわかる。余談だが、このような卵成熟の研究の中から新しい重要な研究領域が生まれてきている。細胞周期制御の研究^(15,16)や、細胞膜受容体を介する遺伝子発現を伴わないステロイドホルモンの新しい作用機構の研究^(17,18)などはその代表例であろう。

脊椎動物のゴナドトロピンは糖タンパク質ホルモンであるが、その構造と機能が哺乳類から魚類に至るまでよく保存されていることもあって、詳しい解析が行われてきた。しかし、無脊椎動物ではそれに相当する分子の報告はない。ヒトデ GSS が、機能的にはゴナドトロピン以外の何ものでもないとすれば、ヒトデの研究のためにも、また無脊椎動物の生殖研究の代表選手としても、ヒ

図3 ■ ホルモンによる卵成熟の制御

脳または放射神経から生殖腺刺激ホルモンが分泌され、卵巣中の濾胞細胞(層)が刺激され、新たに卵成熟誘起ホルモンを合成して分泌する。卵成熟誘起ホルモンは卵に直接、結合して卵成熟を起こさせる。左半分はヒトデ、右半分はサケ科魚の例を示してある。ホルモンとしての物質は異なるが、同じ制御システムをもっていることがわかる。

ヒトデ GSS の構造解明がなされねばならなかった。GSS の単離・精製は早くから試みられた。1967 年, Chaet は、1,600 匹以上のヒトデ *Patiria miniata* から採取した 3.4 g の乾燥神経試料から GSS 標品として 1.3 mg のペプチドを精製し、アミノ酸分析を行なった。44 アミノ酸からなる分子量約 4,800 のペプチドであった⁽¹⁹⁾。1971 年、金谷らは 7,360 匹のキヒトデから 70.3 g (乾燥重量) の神経を採取し、最終的に 1.3 mg の GSS 標品を得た。アミノ酸分析を行ない、キヒトデ GSS は 21 アミノ酸からなる分子量約 2,100、等電点 4.5 (等電点電気泳動法での測定値) のペプチドであろうと推定している⁽²⁰⁾。その後、白井らはキヒトデ GSS のアミノ酸配列の解析を試みているが、残念ながら全配列の解明には至っていない⁽²¹⁾。

彼らが生理活性を追いながら精製して得たものは、糖タンパク質ではなく、分子量数千以下のペプチドとしての GSS であった。この後、他のグループによりウニ⁽²²⁾やナマコ類⁽²³⁾の GSS も研究され、やはり分子量数千程度のペプチドが GSS として推定されており、棘皮動物の GSS はペプチド性のものであると考えられるようになった。脊椎動物の糖タンパク質ホルモンとはまったく異なるゴナドトロピンがあるのか？ 違うとなれば、なおのことその正体を明らかにする必要がある。Chaet や金谷らの試みは 20 年以上も前のことである。当時の分析機器の感度ははたして如何ほどのものであったろうか。彼らの試みを今日繰り返せば、必ず分析できるのではないだろうか？ 三度目の正直を期待してヒトデ GSS 解明に挑戦することとなった。

イトマキヒトデ GSS の精製

GSS の精製には大量のヒトデ放射神経が必要となる。材料にはキヒトデを使うことも考えたが、手間のかかる神経採取の間、たくさんのヒトデを限られた水槽で体調良く維持しておくためにはイトマキヒトデのほうが丈夫でよい。また、ヒトデを利用する国内の研究グループが年に何度か集まって共同で行なうイトマキヒトデ採集が、20 年以上も続いていて、近年では、ゴールデンウィークの頃に東京湾横須賀付近、6 月に英虞湾、9 月に東北大浅虫臨海実験所、11 月に鹿児島大の水産実験所で採集している。潜水採集で揚がったヒトデに鋏で小さな切傷をつけて、そこから内部の生殖巣の膨らみ具合と透明感を観察して、良いメス、良いオスを選別するのである。ヒトデ GSS は、主に放射神経組織に含まれるが、その量に雌雄差はなく、また放卵の前後でも差は認められないことが知られていた⁽²⁴⁾。Chaet はさらに、*A. forbesi* からの神経採取を 1 ヶ月毎 2 年間行ない、その間の GSS 含量には変動がなかったと報告している⁽²⁵⁾。

神経はいつでも GSS を含んでいるという事実は、GSS の精製にとって好都合であった。共同採集で選別から漏れたヒトデを大量に使うことができたのである。小～中スケールでの何度かのトライアルの後、本精製用に大量に追加採集したのは、産卵期を過ぎた 1 月の鹿児島であった。そのときは、3,000 匹近いヒトデを採集して持ち帰ったのだが、そのためか、翌年からの取れ高が激減し現在に至るまで採集を休止することとなり、関係者に大変な迷惑をかけている(精製・構造決定の仕事にはいつも付いてまわる問題をここでも起こしてしまった。今

年あたりから少しずつ回復の兆しが見えるとの連絡をいただいていたけど、ヒトデといえば海底での捕食者であり、またスカベンジャーでもあろうから、この間の当の海域に及ぼした影響がとても気になる。

本番の精製では約 5,500 匹のイトマキヒトデの放射神経（湿重量 126.3 g）を材料とした。ヒトデ GSS は分子量数千のペプチドであると予想されていたので、白井の方法⁽²⁶⁾を参考にしながら、凍結神経をヒスコトロンでホモナイズ後、Sephadex-G25 と G50 を使って脱塩・除タンパク質し、そのまま、強引に逆相 HPLC で分離した。分取用カラムから内径 1.5 mm のカラムまで、溶離液の pH と有機溶媒濃度を調節しながら 4 段階の逆相 HPLC を経て、単一の活性成分を得ることができた（論文投稿中）。活性画分の検定には、イトマキヒトデの卵巣断片による *in vitro* 放卵アッセイ法を用いた。のちに合成 GSS で検定してわかったことだが、この放卵アッセイ法は nM レベルの GSS を検出することができていた。ヒトデ卵巣片の放卵アッセイ法は、このように鋭敏であるだけではなく、迅速（1 時間以内に結果が出る）・簡便（ろ過海水と卵巣の小片を用意するだけ）で再現性も高く（同じ個体を繰り返し使える）、こうしたアッセイ法の優れた点が GSS の精製を成功に導いた大きな要因であった。

4 段目のクロマト後の最終活性画分を MALDI-TOF 型質量分析計で分析すると、ほぼ単一の成分に精製できていた。分子量は、4,737 と測定された（小数点以下を省いている）。神経抽出物をジチオスレイトール (DTT) などの還元剤で処理すると GSS 活性がなくなることから、ジスルフィド結合が関与すると予想していたが、はたして DTT 処理をしてみると、4,737 のシグナルが消え、代わりに 2,236 と 2,507 の 2 つの成分が現われた。これをさらに、SH 試薬であるヨードアセトアミド (IAA) を用いてカルバミドメチル化を試みると、特徴的な 57 mass の増加が、それぞれの成分に少なくとも 2 つずつ起きていることが確認された（図 4）。この実験から、GSS には少なくとも 2 つのジスルフィド結合が含まれると推定できた。一方、精製した GSS の分子量 4,737 に対し、還元により生じた 2 成分の分子量の合計は 4,743 となり、6 mass 異なっていた。2 個の -SH 基がジスルフィド結合 -SS- を 1 個形成すると、水素原子 2 個が遊離して 2 mass の損失が起こる。そこで、GSS には 3 対のジスルフィド結合が含まれているのではないかと、そしてそのうちの 1 つは何らかの理由（たとえばシステインの分子内の位置的な問題？）で、還元され難いかまたは IAA が付加し難いのではないかと予想した。

図 4 ■ 精製イトマキヒトデ GSS の TOF-MS 解析

上図は、精製されたイトマキヒトデ GSS の MALDI-TOF MS による質量スペクトルを示している。GSS の分子量が 4737.86 $[M+H]^+$ と測定されている。プロトン 1 分子付加の値なので、実際の GSS の分子量は 4736.85 程度となる。（遺伝子クローニング後の計算値は、4736.987）下図は、精製画分の DTT による還元処理で 4737.86 のシグナルが消えて、2237 $[M+H]^+$ と 2508 $[M+H]^+$ の 2 つのシグナルが現われた試料に、さらに IAA を反応させてカルバミドメチル化したものである。同反応に特徴的な 57 mass ずつの増加が観測できる。A 鎖、B 鎖それぞれに、2 または 3 個所のカルバミドメチル化が生じたことによるシグナルと判断した。

いずれにしても、GSS は分子量の異なる 2 つのペプチドからなるヘテロ二量体であることがわかり、個々のアミノ酸配列を決定するためにはそれぞれを分ける必要が生じた。しかし、精製したものはすでに微量であったので、それ以上の分離作業を諦めた。操作の過程で失ってしまったのは元も子もない。そこで、混合物のままプロテインシーケンサーで解析し、N 末端からの配列情報を（2 鎖混合のまま）読み取り、同時に、LC-Q-TOF 型質量分析計を用いて MS/MS 解析を行ない、双方の結果をつき合わせることで配列の完全解析を行なうこととした。

図 5 上段にプロテインシーケンサーで読み取った情報を示した。確実に読みきれない個所が複数あった。これに MS/MS による *de novo* 配列解析の結果を加味して、最

プロテインシーケンサによる結果
 EKYSDDDFHMAVFRITTAVSL?VV...
 SE?CGIASY?CLHGCCPSE

質量分析による結果

GSS-A (2507.04)
 SEYSGIASY**C**CLHGCTPSELSVVC

GSS-B (2235.93)
 EKY**C**DDDFHMAVFRITCAVS

図5 ■ イトマキヒトデ GSS のアミノ酸配列

上段は、プロテインシーケンサにより得られた N 末端からのアミノ酸配列情報。A 鎖、B 鎖から 1 つずつ外れたアミノ酸が同時に検出されるので、一度に 2 つのアミノ酸シグナルが得られる。それらのつながりは読み取れない。? は読み取れなかったアミノ酸を示す。下段は MS/MS 解析の結果を合わせて最終的に決定した配列を示す。A 鎖、B 鎖の () 内の計算値は、平均分子量ではなく、monoisotopic mass 値を示した。MALDI-TOF MS 解析で得た値と一致している。システインを緑字で示した。

最終的に決定した配列を図 5 下段に示した。配列から計算したサブユニットの分子量は還元処理後の各サブユニットの測定値と一致した。ペプチド鎖自体への修飾は何もない単純ペプチドであった。システインも計 6 残基含まれ、予想通り 3 対のジスルフィド結合が形成されているとすると、2 対はサブユニット分子間架橋で、1 対は片方のサブユニットの分子内架橋であると考えられた。

20 年ほど前に白井⁽²¹⁾が報告したキヒトデ GSS の部分配列 (16 アミノ酸) には、イトマキヒトデ GSS に部分的に似ているところがあるようにも思われるが、システインは含まれていない。残念ながら、イトマキヒトデ GSS の配列をもとに、キヒトデ GSS の配列を推定する

ことは難しそうである。

GSS 遺伝子のクローニング

イトマキヒトデ GSS は、単純ペプチドからなるヘテロ二量体で、分子内にジスルフィド結合を 3 つ含むものであった。そのアミノ酸配列をシステインに着目してみると、A 鎖に CCxxxCxxxxxxxxxC, B 鎖に Cxxxxxx-xxxxxC のシステイン配置が認められるが、実はこれはインスリンファミリーの定義そのものである。

「ヒトデ GSS はインスリンファミリーのペプチドか?」。これは、ヘテロ二量体であるヒトデ GSS の遺伝子のクローニング作戦に決定的に重要である。読者もご存知のように、インスリンファミリーのペプチドは 1 つの遺伝子から翻訳されているのである。図 6 に、ヒトインスリンの例 (プレプロインスリン) を模式的に示した。アミノ酸は、その N 末端側から、シグナル配列、B 鎖、C ペプチド、A 鎖の順に並んでいる。C ペプチドの両側には切断のための認識配列である塩基性ジペプチドが存在する。筆者らは、イトマキヒトデ GSS の 2 つのサブユニットがインスリンと同様な配置をとっていることを想定して、cDNA クローニングを試みた。はたして、得られたクローンから演繹されたアミノ酸配列の構造は図 6 に示すようにインスリンと同様のドメイン構造をもっていた。A 鎖、B 鎖それぞれのアミノ酸配列は、精製 GSS の MS/MS 解析で決定した配列とピッタリと一致した。精製したイトマキヒトデ GSS は特徴的なシステインモチーフと遺伝子構造から、インスリンファミリーに属するペプチドであることが確実となった。

図6 ■ インスリンファミリーとイトマキヒトデ GSS の cDNA 構造
 ヒトインスリン、ヒトリラキシシ 3、イトマキヒトデ GSS のアミノ酸配列を模式的に示す。左上 N 末端より、シグナル配列 (桃色)、B 鎖 (空色)、C ペプチド (黄色)、A 鎖 (黄緑色) と連続している。イトマキヒトデ GSS の cDNA がインスリン・リラキシシと同様の構造をもつことがわかる。

人工 GSS の化学合成

次に筆者らは、イトマキヒトデ GSS の化学合成を試みた。最も簡単な方法は、A 鎖、B 鎖のペプチドを別々に合成し、それらを単に混ぜ合わせて、自然に二量体が形成されるのを待つのである。数日間反応させて、ジスルフィド形成は空気酸化に任せる。初期のインスリン研究者が行なった方法である。その後、目的の分子量 4,737 を示すピークを HPLC で分取すれば終わりである。反応の効率は低く、各ペプチドのホモ二量体なども生成するので、目的物の最終収量は泣きたいほどであったが、取りあえずの実験に用いることはできた。実はこれまでも、部分ペプチドを抗原としたポリクローナル抗体の作製を何度か試みているが芳しくない。完全な二量体ペプチドを抗原として用いた抗体作製を試してみたいと思っているのだが、そのためには収量を上げる合成法を何とか工夫しないといけない。

さて、精製した合成 GSS のホルモン活性を検定してみた。放卵アッセイ法で GSS の比活性 (ED_{50}) を検定した結果を表 1 に示した。バイオアッセイなので、選んだヒトデの感受性に依存するのは止むを得ないが、これまでのところ、大体 $10^{-8} \sim 10^{-9}$ M で効いている。精製した天然 GSS との比較の実験では、どちらもほぼ同じ効果をもっていた。A 鎖、B 鎖単独では活性はない。また、サブユニットの架橋反応前の、A 鎖と B 鎖ペプチドを単に混合した直後のものも活性は示さなかった。

次に、GSS の標的細胞である濾胞細胞を実験に用いた。GSS は G タンパク質結合型受容体を介して、濾胞細胞内の cAMP 量の上昇をもたらす⁽²⁷⁾。刺激された濾胞細胞はただちに卵成熟誘起ホルモンである 1-MA の合成を開始し、速やかに分泌することがわかっている。イトマキヒトデ卵巣から単離した濾胞細胞を海水に懸濁

表 1 ■ 合成 GSS の放卵活性

	GSS 濃度 (EC_{50})	
	イトマキヒトデ	キヒトデ
A 鎖ペプチド	活性なし	活性なし
B 鎖ペプチド	活性なし	活性なし
A+B 混合物	活性なし	活性なし
合成 GSS	0.6~3.6	2~10
天然 GSS	0.7~4.0	N. D.

イトマキヒトデとキヒトデの卵巣を用いて、精製（天然）GSS と合成 GSS による放卵の強さを比較した。精製 GSS 濃度は紫外吸収から推定した。どちらも nM 程度の濃度で 50% 放卵活性を示した。サブユニット単体と二量体形成前の混合物は、濃度を $1 \mu\text{M}$ まで上げて活性を示さない。天然 GSS のキヒトデにおける作用濃度は測定していない。

表 2 ■ 合成 GSS による濾胞細胞内 cAMP 量の増加

GSS 濃度 (nM)	cAMP 量 (pmole/ 10^7 濾胞細胞)
0	0.2
10	4.3

イトマキヒトデ卵巣から濾胞細胞を調製し、10 nM の合成 GSS とともに培養し、濾胞細胞内の cAMP 量の増加を測定した。

表 3 ■ 合成 GSS による 1-MA の産生

GSS 濃度 (nM)	1-MA 量 (nmole/ml)
0	0.0
10	0.43

イトマキヒトデ卵巣から濾胞細胞を調製し、10 nM の合成 GSS とともに海水中で培養した。海水のみを回収し、濾胞細胞を除いて裸にした卵母細胞を培養して成熟率を求めた。別に求めた標準 1-MA による卵成熟の誘導曲線を検量線として、培養海水中の 1-MA 濃度を求めた。

し、合成 GSS を加えて培養した。10 nM の合成 GSS の投与により濾胞細胞内の cAMP 量は約 20 倍に増加した（表 2）。また、海水中へ分泌される 1-MA 量は、濾胞細胞を除いて GSS に反応しないようにした裸の卵母細胞を用いて、1-MA により誘導される卵成熟率から検量した。合成 GSS 投与により 1-MA 産生が刺激され、10 nM の合成 GSS で分泌は最大となった（表 3）。

次いで、産卵期に採集した雌雄の個体の腹腔内に合成 GSS を注射してみた。GSS を注射された個体と、コントロールとして海水だけを注射された個体を同じ 60 cm 水槽に放してその後の行動を観察した。注射後しばらくすると、GSS を投与された個体の水槽底面での歩行が活発となり、1 時間ほどで水槽の壁面を登り始め、水面に到達すると活発に放卵・放精を開始した。同じ水槽内の GSS を打たない個体は、水槽の底面をゆっくり徘徊しているままであった。

以上の *in vitro* 放卵アッセイ、*in vivo* での放卵・放精行動の誘起、濾胞細胞による 1-MA 産生の誘導実験の結果から、化学合成したペプチドが、従来、神経抽出物で行なわれてきた実験と同じ作用をもつことが確認され、精製したペプチドがイトマキヒトデの GSS であると決定した。

種特異性の低い棘皮動物の GSS

ここまでイトマキヒトデ GSS を中心に紹介してきたが、はじめにも少し触れたように、さまざまなヒトデ、ウニ、ナマコなどで神経抽出物の実験が行なわれている。ヒトデ類での実験例が最も多く、30 種近いヒトデで GSS 活性の存在が確認されている⁽²⁸⁾。ウニ類では 3

表 4 ■ 棘皮動物の GSS 活性

綱	種	donor	rec.	出典
Asteroidea ヒトデ綱	<i>Astrpeccaten armatus</i>	+	+	Chaet, 1966
	<i>Astropecten soparius</i>	+	+	Noumura & Kanatani, 1962
	<i>Astropecten aurantiaus</i>			Kanatani, 1969
	<i>Astropecten polyacanthus</i>	+	+	Maruyama, 1986
	<i>Luidia quinaria</i>			Kanatani, 1969
	<i>Mediaster aequalis</i>	+		Chaet, 1966
	<i>Ceramaster placenta</i>			Kanatani, 1969
	<i>Certnardoia semiregularis</i>	+		Noumura & Kanatani, 1962
	<i>Asterina pectinifera</i>	+		Noumura & Kanatani, 1962
	<i>Patiria miniata</i>	+	+	Chaet, 1966
	<i>Acanthaster planci</i>			Vine (Kanatani, 1974)
	<i>Echinaster echinophorus</i>			Atwood & Simon, 1971
	<i>Henricia leviusula</i>	+		Chaet, 1966
	<i>Henricia nipponia</i>			Kanatani, 1974
	<i>Henricia sanguinolenta</i>	+		Hartman & Chaet, 1962
	<i>Poraniopsis inflata</i>			Chaet, 1966
	<i>Heliaster kubiniji</i>	+		Chaet, 1966
	<i>Coscinasteras acutispina</i>	+	+	Noumura & Kanatani, 1962
	<i>Marthasterias glacialis</i>			Unger, 1962
	<i>Orthasterias koehleri</i>	+		Chaet, 1966
	<i>Pycnopodia helianthoides</i>	+		Chaet, 1966
	<i>Aphelasterias japonica</i>			Kanatani, 1969
	<i>Asterias amurensis</i>	+	+	Noumura & Kanatani, 1962
	<i>Asterias forbesi</i>	+	+	Chaet & McConnaughey, 1959
	<i>Asterias vulgaris</i>	+		Hartman & Chaet, 1959
	<i>Evasterias troschelii</i>			Strathmann, 1971
	<i>Leptasterias bexactis</i>			Kanatani, 1974
	<i>Pisaster brevispinus</i>	+		Chaet, 1966
	<i>Pisaster giganteus</i>	+	+	Chaet, 1964
	<i>Pisaster ochraceus</i>	+	+	Chaet, 1966
Echinoidea ウニ綱	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	+	+	Cochran & Englemann, 1972
	<i>Strongylocentrotus franciscanus</i>			Cochran & Englemann, 1972
	<i>Lytechinus pictus</i>			Cochran & Englemann, 1972
Holothuroidea ナマコ綱	<i>Holothuria leucospilota</i>	+	+	Maruyama, 1985
	<i>Holothuria pervicax</i>	+	+	Maruyama, 1985
	<i>Holothuria moebi</i>	+	+	Maruyama, 1985
	<i>Holothuria pardalis</i>	+	+	Maruyama, 1985
	<i>Stichopus japonicus</i>	+		Maruyama, 1985

ヒトデ、ウニ、ナマコで神経抽出物中の配偶子放出活性が報告されている種を示した。表中、donor+は、その神経抽出物が他の種に対しても活性を示したことを示し、rec.+は、他の種の神経抽出物に反応して配偶子放出をしたことを示している。

種⁽²²⁾、ナマコ類でも 6 種類^(23, 29)ほどで確認されている(表 4)。ここで興味深いのは、ヒトデ類・ナマコ類それぞれにおいて、神経抽出物を異種間で作用させると、大体において種特異性が見られないことである^(3, 23, 30, 31)。神経抽出物が種を越えて作用するという事は、抽出物中の有効成分が仮に GSS 1 種類であるとすれば、種毎の GSS が構造上よく似ているということを意味している。ただし、まったく同一のものというわけではないようで、イトマキヒトデの神経抽出物は多くの別種のヒトデに効果を示すが、キヒトデやモミジガイ（ヒトデの 1 種）の抽出物はイトマキヒトデには効かないらしい⁽³⁾。Chaet の報告によると、アメリカのヒトデにも、日本のイトマキヒトデのように頑固な種類がいるらしい⁽²⁹⁾。ウ

ニ類では報告がないのでわからない。

さらに興味深いのは、ヒトデ、ウニ、ナマコなど綱レベルの分類群を越えて、神経抽出物が作用しているという報告が出ていることである。Cochran と Englemann は、アメリカムラサキウニ(*Strongylocentrotus purpuratus*)の神経抽出物がアメリカ産ヒトデ 3 種(*Patiria miniata*, *Pisaster ochraceus*, *Pisaster giganteus*)に配偶子放出を起こさせ、逆にこれらのヒトデの神経抽出物がアメリカムラサキウニに効くと述べている⁽²²⁾。また、カリフォルニアナマコ(*Parastichopus californicus*)に対してヒトデ(*Pycnopodia helianthoides* や *Patiria miniata*)の神経抽出物が効くという報告もある^(29, 32)。金谷らもクモヒトデ(*Ophioplocus japonicus*)やテツイ

ロナマコ (*Holothuria moebi*) の神経抽出物をキヒトデに打っているが、この場合は効果はなかったとしている⁽³⁾。報告されている例数は少ないけれども、このように綱を越えて効く場合があるというのはどういうことであろう。ヒトデ・ウニ・ナマコは、それぞれのグループ毎に構造の類似した GSS をもつだけではなく、実は綱レベルの分類群を越えて、それらの構造が互いによく似ている可能性が考えられるのではないだろうか？

イトマキヒトデ GSS の分子量は 4,737 であった。ウニ・ナマコ類の GSS は未だ単離されていないのでその構造は不明だが、分子量の推定は行なわれている。Cochran と Engelmann は SDS 電気泳動法を用いて、アメリカムラサキウニの神経抽出物中の GSS 活性成分はペプチドで、その分子量は $5,600 \pm 800$ と測定している⁽²²⁾。また、Maruyama はゲルろ過での溶出位置から、ニセクロナマコ (*Holothuria leucospilota*) の GSS は分子量数千程度のペプチドであろうと議論した⁽²³⁾。これら

3 種の GSS は、分子量については似ているといえよう。

棘皮動物の GSS とインスリンファミリー

イトマキヒトデ GSS はインスリンファミリーペプチドであることが明らかとなったわけだが、このインスリンファミリーは、大きくインスリン・IGF (インスリン様成長因子) グループとリラキシンググループに分けることができる。イトマキヒトデ GSS を系統解析してみると、リラキシンググループに含まれることがわかった (図 7) (ファミリーで忘れてはならないものとしてボンビキシンがあるが、昆虫の世界で爆発的に広がっていて、カイコでは 30 コピー以上の遺伝子からなる多重遺伝子ファミリーを形成しているなど、説明が複雑になるし、また系統解析にも難しい問題があるので図 7 には含めていない。ボンビキシンについては岩見の総説をご覧ください⁽³³⁾)。

図 7 ■ インスリンファミリーと GSS の系統解析

脊椎動物のインスリンファミリーペプチドと GSS の系統解析を ClustalW で行なった。解析には C ペプチドを除いた B 鎖と A 鎖部分を用いた。インスリンと IGF は右半分にグループ (濃灰色の部分) をつくり、リラキシン類とイトマキヒトデ GSS は、左にグループ (薄灰色の部分) を形成した。イトマキヒトデ GSS はコバルト色字で示してある。アメリカムラサキウニの GSS 候補 (薄コバルト色字) も、ヒトデ GSS の近くに位置しているのがわかる。

リラキシン (relaxin, RLN) は、もともと、黄体や胎盤・子宮などでつくられるインスリンファミリーペプチドで、恥骨結合の弛緩や子宮頸部の拡張など、分娩を容易にする作用をもつものとして知られていたが、現在では、雌では排卵から分娩・授乳まで、雄でも生殖器官の発達・精子形成などと、生殖の全般のみならず、非生殖器官・組織での作用も調べられている⁽³⁴⁾。また、その種類も、最も多いヒトでは7種類のリラキシンペプチドが明らかにされている。リラキシン類の解明は比較的新しく、1976~7年に初めてブタリラキシンの構造が決められて以来、1999年までにRLN1, RLN2, INSL3, INSL4, INSL5, INSL6 (INSLはinsulin-likeの略である)が発見され、2002年に7番目のRLN3が発見された⁽³⁵⁾。特にRLN3は主に脳で発現していることから、神経ペプチドとしての機能が探索されている。

リラキシン類の系統学的解析では、7種類の中でRLN3とINSL5が最も祖先形に近いものと考えられている⁽³⁶⁾。それらの中で、イトマキヒトデGSSはどこに位置するのであろうか？今のところ筆者らは、GSSはRLN3に近いのではないかと考えている(図7参照)。GSSのクローニング中には、GSS遺伝子1つだけしか見つからなかった。現時点で、ヒトデにGSSとは別のリラキシンやインスリン様の遺伝子があるのかどうかは不明だが、とりあえず、すでに明らかにしたヒトデGSSがリラキシンの中で最も古いと思われるRLN3と似ているというのは大変興味深い。産生場所も脳・放射神経と、どちらも神経系である。リラキシンが古い時代にはもっていたのかも知れない生殖腺刺激ホルモンの機能が、今もヒトデGSSとして残されている、と考えるのは想像力を働かせ過ぎているだろうか？

いずれにせよ、無脊椎動物でのインスリンファミリーの仲間を増やして、広く解析のテーブルに載せていかないと細かなことがわかってこない。岩見がボンビキシン研究の総説の中で、無脊椎動物におけるインスリン様ペプチドの研究について要領よくまとめている⁽³³⁾。近年では、特に、線虫やショウジョウバエなどでのインスリンシグナルと個体の寿命の研究が目覚ましい^(34, 35)し、軟体動物でもMIPs (molluscan insulin-related peptides) などが研究されている。全体としてインスリンファミリーは無脊椎動物においても広く分布しているように思われるし、それならば、何らかの共通した重要な機能をもっているのではないだろうか。しかし、詳細な解析の対象になっている種はまだ限られていて、生理機能の解明が進んでいるとはいえない。

現在、棘皮動物では、唯一アメリカムラサキウニのゲ

ノムデータベースがNCBIで公開されている。筆者も、イトマキヒトデGSSがRLN3に似ていたことから、このウニゲノムデータを入手してインスリン様配列を検索してみた。複数の候補が見つかったが、そのうちの1つはヒトデGSSに似ていると思われた(図7参照)。すでに述べたように、ウニ・ナマコのGSSも、ヒトデGSS同様に分子量数千のペプチドであると思われるが、アメリカムラサキウニのデータベースから見つけた候補分子の推定分子量も5,800ほどで辻褄は合っている。棘皮動物のウニやナマコのGSSも、ヒトデ同様にインスリンファミリーであつたらさぞかし面白い話になるだろう。そう思ってウニやナマコも調べ始めている。

謝辞：本稿で紹介したGSSの研究は、三田雅敏(東京学芸大学)・吉国通庸(基礎生物学研究所：現、九州大学)がGSSの精製を行ない、磯部稔(名古屋大学・農)・吉国によりMS/MS解析、大野薫(基礎生物学研究所)により遺伝子クローニング・系統解析を実施しました。研究の立ち上げから今日まで、終始サポートしていただいた長濱嘉孝教授(基礎生物学研究所)に紙面を借りてお礼を述べさせていただきます。プロテインシーケンサー解析、GSSペプチドの合成では、基礎生物学研究所分析室の森友子、牧野由美子両氏にお世話になりました。また、多年にわたるヒトデの大量採集にご協力いただいた多くの大学の教員・学生の方々に感謝いたします。

本研究の一部は、生研センターの「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」の支援の下に実施されています(吉国通庸・山野恵祐(養殖研究所), H18~)。

文献

- 1) A. B. Chaet & R. A. McConnaughy: *Biol. Bull.*, **117**, 407 (1959).
- 2) A. B. Chaet & R. S. Musick, Jr.: *Biol. Bull.*, **119**, 292 (1960).
- 3) T. Noumura & H. Kanatani: *J. Fac. Sci. Univ. Tokyo*, **IV**, **9**, 397 (1962).
- 4) H. Kanatani & T. Noumura: *J. Fac. Sci. Univ. Tokyo*, **IV**, **9**, 403 (1962).
- 5) H. Kanatani: *Science*, **146**, 1177 (1964).
- 6) A. W. Schuetz & J. D. Biggers: *Exptl. Cell Res.*, **46**, 624 (1967).
- 7) H. Kanatani & H. Shirai: *Nature*, **216**, 284 (1967).
- 8) H. Kanatani *et al.*: *Nature*, **221**, 273 (1969).
- 9) S. Hirai & H. Kanatani: *Exp. Cell Res.*, **67**, 224 (1971).
- 10) J. Kubota *et al.*: *Exp. Cell Res.*, **106**, 63 (1977).
- 11) 金谷晴夫: “卵と精子”, 現代動物学の課題シリーズ, 東京大学出版会/学会出版センター, 1975, p. 21.
- 12) M. Yoshikuni *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1874 (1988).
- 13) Nagahama *et al.*: “Current Topics in Developmental Biology”, Academic Press, 1995, p. 103.
- 14) M. Yoshikuni, N. Shibata & Y. Nagahama: *Fish Physiol. Biochem.*, **11**, 15 (1993).
- 15) Y. Masui: *Differentiation*, **69**, 1 (2001).
- 16) T. Kishimoto: *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 654 (2003).
- 17) Y. Zhu *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2231 (2003).
- 18) Y. Zhu, J. Bond & P. Thomas: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2237 (2003).
- 19) A. B. Chaet: *Symp. Zool. Soc. Lond.*, **20**, 13 (1967).
- 20) H. Kanatani *et al.*: *Develop. Growth. Differ.*, **13**, 151 (1971).

- 21) H. Shirai *et al.* : *Gen. Comp. Endocrinol.*, **66**, 50 (1987).
- 22) R. C. Cochran & F. Engelmann : *Science*, **178**, 423 (1972).
- 23) Y. K. Maruyama : *Biol. Bull.*, **168**, 249 (1985).
- 24) 金谷晴夫 : *Zool. Mag.*, **83**, 1 (1974).
- 25) A. B. Chaet : *Biol. Bull.*, **130**, 43 (1966).
- 26) H. Shirai : *Methods Cell Biol.*, **27**, 73 (1986).
- 27) M. Mita & Y. Nagahama : *Dev. Biol.*, **144**, 262 (1991).
- 28) H. Kanatani : *Int. Rev. Cytol.*, **35**, 253 (1973).
- 29) R. R. Strathmann & H. Sato : *Exp. Cell Res.*, **54**, 127 (1968).
- 30) A. B. Chaet : *Biol. Bull.*, **130**, 43 (1966).
- 31) A. B. Chaet : *Am. Zoologist*, **6**, 263 (1966).
- 32) H. M. Hufty & P. C. Schroeder : *Gen. Comp. Endocrinol.*, **23**, 348 (1974).
- 33) 岩見雅史 : “無脊椎動物のホルモン”, ホルモンの分子生物学 No. 8, 学会出版センター, 1998, p. 37.
- 34) O. D. Sherwood : *Endocr. Rev.*, **25**, 205 (2004).
- 35) R. A. D. Bathgate *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **277**, 1148 (2002).
- 36) S. Y. Hsu *et al.* : *Ann. NY. Acad. Sci.*, **1041**, 520 (2005).

プロフィール

浦川 到 (Itaru Urakawa) <略歴> 1996年東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻修士課程修了/同年キリンビール(株)医薬探索研究所/1997年同社基盤技術研究所/2001年同社医薬探索研究所, 現在にいたる<研究テーマと抱負>腎臓およびミネラル代謝に関する創薬研究<趣味>旅行, 食べ歩き

梶原 康宏 (Yasuhiro Kajihara) <略歴>平成5年東京工業大学大学院総合理工学研究科生命化学専攻博士後期課程修了(理博)/同年日本たばこ産業(株)生命科学研究科/7年横浜市立大学理学部助手/13年同大学大学院総合理工学研究科助教授/19年同大学大学院国際総合科学研究科教授, 現在にいたる<研究テーマと抱負>糖鎖, 糖タンパク質の化学合成<趣味>釣り, テニス

木村 賢一 (Ken-ichi Kimura) <略歴>1982年東北大学農学部農芸化学科卒業/1984年同大学大学院農学研究科博士課程前期修了/同年雪印乳業(株)生物科学研究科/2000年同社岩手医薬品工場・品質管理室長/2001年岩手大学農学部助教

授, 現在にいたる. この間, 1984年理化学研究所委託研究生, 1998年英国サザンプトン大学訪問研究員. 1990年農博(東北大学)<研究テーマと抱負>食材, 植物, 微生物などの天然資源からユニークなバイオブローブを見だし, それを用いて生命現象の解析を行ない(ケミカルバイオロジー), できれば医薬品や機能性食品などとして実用化を目指すこと<趣味>お笑い鑑賞

窪川かおる (Kaoru Kubokawa) <略歴>1984年早稲田大学大学院理工学研究科博士後期課程修了(理博)後, 同大学教育学部常勤嘱託, 東京大学海洋研究所助手を経て, 同研究所先端海洋システム研究センター教授, 現在にいたる<研究テーマと抱負>ナメクジウオの生物学, 生態からゲノムまで脊椎動物への進化をナメクジウオから研究する. 現在は, 神経・内分泌系の進化と適応の問題に取り組んでいる<趣味>読書, 散策

熊谷日登美 (Hitomi Kumagai) <略歴>お茶の水女子大学家政学部食物学科卒業後, 同大学大学院家政学研究科食物学専

攻修士課程修了, 東京大学大学院農学系研究科農芸化学専攻博士課程修了(農博), 日本大学生物資源科学部(旧農獣医学部)助手, 講師を経て, 現在, 同准教授. この間, 2000年英国 The University of Nottingham 海外派遣研究員(1年間)<研究テーマと抱負>食品タンパク質の脱アミド化による機能改善, 食品フレーバー成分の機能解析<趣味>通勤電車内で新聞を読むこと(行きは朝日, 帰りは日経)と年1回のスキーが現在の楽しみ. 子供達に手がかからなくなったら自分のための時間を作りたい

佐々木克友 (Katsutomo Sasaki) <略歴>1999年北海道大学農学部生物機能化学科卒業/2001年同大学大学院農学研究科博士前期(修士)課程修了/2004年同博士後期課程修了(農博)/同年(独)農業生物資源研究所 PROBRAIN 特別研究員, 現在にいたる<研究テーマと抱負>植物における病傷害応答シグナル伝達機構の解明を行っています. 植物に特異的な転写因子のシグナル伝達, そして機能の解明全般に興味があります<趣味>我が子の写真撮影