受容体は尾部細胞に広く発現していることが分かっている¹¹⁾、このストーリーは無理がないものと考えている。今後はこの受容体の必要性などを追求していく必要がある。また、お気づきかと思われるが、GABAはGnRH放出を促進することになる。GABAの興奮性の作用については、イオンチャネル型ではよく知られているものの¹³⁾、代謝型受容体がそのような機能を有するののかについて、その機構の詳細も明らかにする必要がある。さらに、体幹部の成長や成体組織形成も、上流がGABAであることは分かるが、その下流の機構が分かっていない。さらに、固着によって最初に興奮する神経細胞はGABA神経であろうか？確かに付着突起ではGABA関連遺伝子の発現が認められており¹⁴⁾、その可能性はあるが、付着突起には他のニューロンも分布しており^{11,15)}、その同定は注意深く進める必要がある。ホヤの変態について、大きく貢献するGABA-GnRH経路を同定したが、まだまだ課題は尽きないようである。

本論文は、GABA-induced GnRH release triggers chordate metamorphosis. (Hozumi A, Matsunobu S, Mita K, Treen N, Sugihara T, Horie T, Sakuma T, Yamamoto T,

Shiraishi A, Hamada M, Satoh N, Sakurai K, Satake H, Sasakura Y) と題し、Curr Biol, (2020) 30, 1-7 に発表した。数多くの著者やその他の研究者に支えられた実験であり、この場を借りて深くお礼申し上げる。

文献

- 1) Dehal P, et al. Science **298**, 2157-2167 (2002).
- 2) Delsuc F, et al. 2006. Nature **439**, 965-968 (2006).
- 3) Zeng F, et al. Dev Biol **448**, 183-198 (2019).
- 4) Takamura K, Dev Genes Evol **208**, 1-8 (1998).
- 5) Coniglio L, et al. J Exp Zool **280**, 314-320 (1998).
- 6) Kimura Y, Yoshida M, Morisawa M, Dev Biol **258**, 129-140 (2003).
- 7) Zega G, et al. J Comp Neurol **506**, 489-505 (2008).
- 8) Okamura Y, et al. Physiol Genomics **22**, 269-282 (2005).
- 9) Treen N, et al. Development **141**, 481-487 (2014).
- 10) Kamiya C, et al. Dev Dyn **243**, 1524-1535 (2014).
- 11) Kusakabe TG, et al. PLoS One **7**, e41955 (2012).
- 12) Nakayama-Ishimura A, et al. Dev Biol **326**, 357-367 (2009).
- 13) Ben-Ari Y, Nat Rev Neurosci **3**, 728-739 (2002).
- 14) Horie T, et al. Zoolog Sci **27**, 181-190 (2010).
- 15) Horie T, et al. J Comp Neurol **508**, 249-263 (2008).

神経ペプチド GLWamide はイシサンゴのポリプ収縮に関与する

識名 信也¹、邱 顥陵²、張 燕²、姚 毅前²、柳 泰宇²、
蔡 品萱¹、Céline Zatylny-Gaudin³、張 清風²

(¹ 台湾海洋大・海洋環境與生態研究所、² 台湾海洋大・水産養殖系、³ フランス国立科学研究センター・BOREA)

E-mail: shikina@mail.ntou.edu.tw

1. はじめに

イシサンゴ類(以下「サンゴ」)は、多種多様な海洋生物の命を育む「サンゴ礁生態系」を構築する主要な生物である。近年、世界的なサンゴ礁の衰退により、サンゴの基礎生物学的な研究が加速している。とりわけ、サンゴと褐虫藻の共生関係や骨格形成機構に関する研究が精力的に進められ、地球温暖化などの気候変動がサンゴに与える影響を理解するうえで必要な情報が集積されつつある¹⁻³⁾。しかし、社会的注目度が低い、サンゴのその他の基本的な生物学的特徴(例えば、神経、免疫、消化器系)に関しては不明な点が多く残されている。

サンゴはイソギンチャク、ヒドラ、クラゲなどの仲間であり、刺胞動物門に属する。サンゴの多くは固着性生活をおくことから、外界の生物・非生物要因を感受し、生体防御や捕食等の生理的反応へと変換するための敏感な「神経系」を有していると予想される。一般的に刺胞動物は、中枢神経系(脳)を持たず、シンプルな散在神経系を有するとされているが⁴⁾、サンゴ体内における神経細胞の分布およびその機能の詳細を示した研究ほとんどない。そこで筆者らは、サンゴの神経系を理解する第一歩として、神経ペプチドに着目した研究を開始した。神経ペプチドは、神経細胞により生産されるアミノ

酸 3-70 残基から成る生理活性分子の総称である^{5,6)}。通常、細胞内において分子量の大きな前駆体として生合成され、限定切断やC末端アミド化などの翻訳後修飾を受けてはじめて機能的な活性型ペプチドとなる。神経ペプチドは、様々な脊椎動物および無脊椎動物において、成長、生殖、代謝のみならず、行動の制御においても重要な役割を果たすことが示されている^{5,7-9)}。刺胞動物でも、ヒドラをモデルとした研究により、多様な神経ペプチドの存在およびその生理機能が証明されている^{6,10,11)}。

C末端配列が Glycine-Leucine-Tryptophan-amide で構成される GLWamide ペプチドファミリーは、刺胞動物において、幼生の変態やポリプの収縮および卵成熟の誘導など幅広い生理機能を有することが示されている重要な神経ペプチドである¹²⁾。サンゴでは、ヒドラで同定された GLWamide ペプチドの一種(Hym-248)を用いて、ミドリイシ属サンゴの幼生の変態が誘導可能であることが示されていた¹³⁾。また近年、幼生内における GLWamide neurons の存在も明らかにされた¹⁴⁾。しかし、成体サンゴにおいては、GLWamide 前駆体の発現が transcriptome 解析で確認されているのみであり、それ以上の詳細は不明であった。そこで筆者らは、成体サンゴにおける GLWamide neurons の空間分布、および

図 1. ナガレハナサンゴのポリプ構造および GLWamide 前駆体 mRNA の発現様式

(A) ポリプ外観図。(B) ポリプ解剖図。触手 (tentacles)、食道を含む口部の一部分 (parts of mouth with pharynx)、および隔膜系 (mesenterial filaments) が観察される。(C & D) 雄または雌ポリプの異なる部位における GLWamide 前駆体 mRNA の相対発現量。棒グラフ上の異なるアルファベットは群間で有意差があることを示す (One-way ANOVA; $P < 0.05$)。

GLWamide ペプチドの機能を明らかにすることを目的とした一連の実験を行なった。実験材料としては、太平洋に広く分布するナガレハナサンゴ (*Euphyllia ancora*) を用いた (図 1A,B)。本種のポリプは直径約 3~5 cm と、他のサンゴ (例、ミドリイシサンゴ, 直径約 2 mm) と比べて大きい。そのためポリプを構成する種々の組織を実体顕微鏡下で単離し、目的の mRNA やタンパク質の組織分布を調べることができる。また、単離した一部の組織を合成ペプチド等で処理し、その変化を観ることで、目的のペプチドの機能を調べることも可能である。

2. 成体サンゴにおける GLWamide 前駆体 mRNA および GLWamide neurons の分布

まず、ナガレハナサンゴの transcriptome データベース (未発表) から GLWamide 前駆体をコードすると予想される部分配列を同定した。完全長 cDNA 配列を決定し、推定アミノ酸配列の解析を行なった結果、刺胞動物の GLWamide 前駆体に共通して見られる分泌シグナルペプチド、および複数の GLW motifs の存在が確認された。Peptraq ソフトウェア¹⁵⁾を用いた詳細な配列解析の結果、同前駆体から 6 つの推定 GLWamide ペプチドが作られることが予想された。次に、ポリプ内における GLWamide 前駆体 mRNA および GLWamide neurons の分布を調査した。雌雄のコロニーから触手、口部 (食道部位を含む)、隔膜系、および生殖巣をそれ

ぞれ単離し、real-time PCR 法を用いて GLWamide 前駆体 mRNA の相対発現量を調べた結果、雌雄ともに口部、および触手において比較的高い発現が見られた (図 1 C,D)。ポリプ内における GLWamide neurons の分布を、抗 GLWamide モノクローナル抗体を用いた免疫染色法で調べた結果、GLWamide 前駆体 mRNA の発現パターンとほぼ一致して、口部と触手において GLWamide neurons が確認された (図 2 A,B)。

3. 成体サンゴにおいて GLWamide ペプチドはポリプの収縮に関与する

成体サンゴにおける GLWamide ペプチドの機能を調べるために、まず、ポリプから単離した組織を合成 GLWamide ペプチドで処理する実験を行なった。GLWamide 前駆体配列から推定された 6 つ全ての GLWamide ペプチドにおいて C 末端配列が PPGLW であったこと、さらにサンゴ種間で同配列が高く保存されていたことから、PPGLWamide ペプチドを合成し実験に用いた。また特異性を確認するために、PPGLW-OH (非アミド型) と PPGLLamide ペプチドを合成し、同様に処理実験に用いた。まず単離した口部、触手、隔膜系を 10 μ M PPGLWamide ペプチドで処理した結果、口部と触手において明瞭な収縮反応が確認された。PPGLW-OH および PPGLLamide ペプチド処理区では、同様の収縮反応はほとんど見られなかったことから、

図2. ナガレハナサンゴの GLWamide neurons

(A) 口部で観察された GLWamide neurons。 (B) 触手内の GLWamide neurons。 抗 GLWamide モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色法により検出。主に皮層 (epidermis, epi) に GLWamide neurons の存在を示す陽性シグナル (茶色) が観察される。胃層 (gastrodermis, gas) ではほとんど見られない。矢印は、GLWamide neurons の細胞体または神経突起を示す。

図3. PPGLWamide ペプチドによる処理がナガレハナサンゴのポリプに与える影響

(A) 飼育海水中に溶媒 (蒸留水, Control)、PPGLWamide、PPGLW-OH、または PPGLamide ペプチドを添加したときのポリプの様子 (真上から撮影)。上段は添加前、下段は添加 40 分後の様子を示す。PPGLWamide ペプチド処理群でのみ明瞭な収縮反応が見られる。(B) 各処理群におけるポリプ収縮度の定量結果。処理前 (0 min) および処理後 (30 秒、20 分、40 分) に各処理群のポリプを撮影し、画像上で触手が占める面積を画像解析ソフトで算出した。ポリプの収縮度 (polyp contraction) は、処理前の触手が占める面積を 100 としたとき、処理後のそれがどれくらい小さくなったかを示す相対値 (%) で表した。折れ線グラフ上の異なるアルファベットは群間で有意差があることを示す (One-way ANOVA; $P < 0.05$)。

PPGLWamide に特異的な反応であることが示された。同時に、口部および触手に GLWamide ペプチドの受容体が存在していることが示唆された。

続いて、ナガレハナサンゴのポリプを 10 μ M PPGLWamide、10 μ M PPGLW-OH、10 μ M PPGLamide ペプチドまたは溶媒 (蒸留水) で処理した結果、10 μ M PPGLWamide ペプチドで処理した場合においての

み、処理後 30 秒後から明瞭な収縮反応が確認された (図 3A,B)。最後に、PPGLWamide ペプチド内における機能的な配列を特定するために、ポリプを 5 種類のペプチド (PPGLWamide、PGLWamide、GLWamide、LWamide、Wamide、各 10 μ M) または溶媒 (蒸留水、対象区) でそれぞれ処理する実験を行なった。その結果、PPGLWamide、PGLWamide、GLWamide、または

LWamide でペプチド処理した区 においてのみ明瞭な収縮反応が見られた。Wamide 区と対象区では収縮反応が見られなかったことから、PPGLWamide ペプチドの作用において LWamide という配列が不可欠であることが示唆された。

4. おわりに

本論文により、成体サンゴにおける GLWamide neurons の分布および GLWamide ペプチドのポリプ収縮への関与がサンゴで初めて示された。GLWamide ペプチドの筋収縮への関与は、ヒドラやイソギンチャクでも示されていることから¹²⁾、刺胞動物の多くの種において共通する機能であることが示唆された。今後はサンゴの体内で実際に機能している GLWamide ペプチドおよび受容体の同定を行うことで、サンゴの GLWamide ペプチドの作用機序の詳細が明らかになるであろう。本論文は Involvement of GLWamide neuropeptide in poly contraction of the adult stony coral *Euphyllia ancora*

(Shikina S, Chiu YL, Zhang Y et al.) と題して、Scientific Reports (2020) 10:9427 に発表した。

文献

- 1) Weis VM. *Integ Comp Biol*, **59**, 845-855 (2019).
- 2) Fine M, Tchernov D. *Science*, **315**, 1181 (2007).
- 3) Tambutte E, et al. *Nat Commun*, **6**, 7368 (2015).
- 4) 小泉 修. 比較生理生化学, **16**, pp278-287 (1999).
- 5) Holmgren S, Jensen J. *Brain Res Bull*, **55**, 723-735 (2011).
- 6) Takahashi T, Takeda N. *Int J Mol Sci*, **16**, 2610-2625 (2015).
- 7) Klavdieva MM. *Front Neuroendocrinol*, **16**, 293-321 (1995).
- 8) Jékely G. *Proc Natl Acad Sci USA*, **110**, 8702-8707 (2013).
- 9) Elphick MR, et al. *J Exp Biol*, **221**, jeb151092 (2018).
- 10) Grimmelikhuijzen CJP, et al. *Can J Zool*, **80**, 1690-1702 (2002).
- 11) Fujisawa T, et al. *Int J Dev Biol*, **56**, 543-550 (2012).
- 12) Takahashi T, Hatta M. *J Amino Acids*, **2011**, 424501 (2011).
- 13) Iwao K, et al. *Coral Reefs*, **21**, 127-129 (2002).
- 14) Attenborough RME, et al. *Dev Biol*, **446**, 56-57 (2019).
- 15) Zatylny-Gaudin C, et al. *J Proteome Res*, **15**, 48-67 (2016).

複写を希望の方へ

本誌に記載された著作物の複写をご希望の方は、(社) 学術著作権協会より許諾を受けて下さい。日本比較内分泌学会は本誌掲載著作物の複写に関する権利を(社) 学術著作権協会に委託しております。但し、企業等法人による社内利用目的の複写については、当該企業等法人が(社) 日本複写権センターと包括複写許諾契約を締結している場合には、その必要はありません(社外頒布目的の複写については許諾が必要となります)。

権利委託先：〒107-0052 東京都港区赤坂9-6-41 乃木坂ビル3F

一般社団法人 学術著作権協会

FAX : 03-3475-5619 E-mail : info@jaacc.jp

なお、複写以外の著作物の引用・転載・翻訳等の許諾に関しては、直接、日本比較内分泌学会事務局にお問い合わせ下さい。

〒252-0373 神奈川県相模原市南区北里1-15-1 北里大学 海洋生命科学部 魚類分子内分科学研究室

日本比較内分泌学会事務局 水澤 寛太

TEL : 042-778-9144 FAX : 042-778-5010 (代表) E-mail : mizusawa@kitasato-u.ac.jp

Notice about photocopying for overseas user

In order to make a copy of any work from this publication, users must obtain permission from the Japan Academic Association for Copyright Clearance (JAACC) or the local Reproduction Rights Organizations (RROs) under bilateral contract with JAACC (see "List of foreign bilateral agreements" on the following website).

Japan Academic Association for Copyright Clearance (JAACC)

Akasaka 9-6-41, Minato-ku, Tokyo 107-0052, Japan

Website: <http://www.jaacc.jp>

E-mail: info@jaacc.jp Fax: +81-3-3475-5619

In case of quotation, reproduction and translation, please contact the copyright holder (JSCE) directly.

Japan Society for Comparative Endocrinology (JSCE)

Kanta Mizusawa, Ph.D

Laboratory of Fish Endocrinology, School of Marine Biosciences, Kitasato University

1-15-1 Kitasato, Minami-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-0373, Japan

E-mail: mizusawa@kitasato-u.ac.jp Fax: +81-42-778-5010