

| | |
|----------|--|
| 氏名 | 佐竹 炎 |
| 学位(専攻分野) | 博士 (薬学) |
| 学位記番号 | 論薬博第620号 |
| 学位授与の日付 | 平成11年11月24日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第2項該当 |
| 学位論文題目 | 軟体動物および環形動物由来の生理活性ペプチドの遺伝子配列と遺伝子発現に関する研究 |

論文調査委員 (主査) 教授 杉浦幸雄 教授 伊藤信行 教授 川寄敏祐

論文内容の要旨

無脊椎動物から単離された生理活性ペプチドは、アミノ酸配列や生理機能がユニークなものから高等動物の類縁体と考えられるものまで多種・多様である。著者は、(1) アフリカマイマイの神経節と心房から単離されたD-アミノ酸含有ペプチドである achatin-I と fulicin, (2) 同心房から単離された RFamide の一種である ACEP-1 およびフナの脳から単離された ACEP-1 類似ペプチドである C-RFa, (3) シマミズから発見された oxytocin 類縁ペプチドである annetocin の各 cDNA 配列およびこれらの遺伝子発現分布について研究し、以下の新知見を得た。

1. achatin-I の cDNA は典型的なプロセッシング配列である Lys-Arg が前後に付加した achatin 配列を7個含む前駆体をコードしていること、また、achatin-I 中の D-Phe は全て通常の L-Phe のコドンで指定されていることが判明した。この結果、achatin-I の生合成は他の神経ペプチドと同様にリボゾーム経路で行われ、D-Phe はプロセッシングの過程で achatin 配列中の L-Phe が D-Phe に異性化されて出現することがわかった。さらに、発現分布を調べたところ、achatin-I 遺伝子は pedal ganglion のみで発現していたことから achatin-I は pedal ganglion で生成し心房まで輸送され心室の活動を活性化させる心臓興奮性の神経ペプチドであることが示唆された。一方、fulicin 遺伝子は achatin-I 遺伝子とは異なり parietal ganglion で発現しており、また心房でも転写物の存在が認められたことから、fulicin は achatin-I とは別の機能に関わる神経ペプチドであるとともに心房性ホルモン様の生理的役割を有する可能性が考えられた。

2. ACEP-1 の cDNA は ACEP-1 を1コピー含む ACEP-1 前駆体をコードしており、モノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) の類縁ペプチド、LyCEP の前駆体と 49.4% の相同性を示した。ACEP-1 遺伝子の発現分布を検討したところ、脳神経節と食道下神経節内の pedal ganglion の小型の神経細胞、および right parietal ganglion と visceral ganglion の大型の神経細胞に発現が認められた。さらに心房にも発現が確認されたため、ACEP-1 は神経ペプチドであると同時に心房性ホルモン様の機能を有すると推定された。また、ACEP-1 と類似配列を有する C-RFa の cDNA は C-RFa を1コピー含む前駆体をコードしていた。さらに、C-RFa は哺乳類由来の prolactin-releasing peptide (PrRP) とも高い一次配列相同性を有し、PrRP 前駆体に特徴的な配列が C-RFa 前駆体にもいくつか存在していたことから、C-RFa と PrRP はファミリーを形成しているのではないかと推察された。フナの脳における C-RFa 遺伝子の発現分布を検討した結果、C-RFa 遺伝子は延髄、大脳、中脳、および眼球において多量に発現していたことから、C-RFa は視覚伝達を含め様々な生理的機能に関与していることが示唆された。また、発現様式が PrRP 遺伝子と類似していたことから、C-RFa は魚類における PrRP に相当するのではないかと推定された。

3. annetocin の cDNA は oxytocin ファミリーペプチドの前プロホルモンと同様にシグナルペプチド、ホルモンペプチド、および neurophysin の3個のドメインで構成される annetocin プレプロホルモンをコードしていた。また neurophysin 領域に特徴的な14個の Cys 残基も他種の vasopressin/oxytocin (VP/OT) superfamily プレプロホルモンの neurophysin 領域と同様に保存されていた。これらの結果から、annetocin は VP/OT superfamily に属することが実証された。annetocin プレプロホルモンは他の VP/OT superfamily プロホルモンと 37.4 ~ 45.8% の相同性を示したが、この相同性

と分類系統樹には相関関係は見出されなかった。また、14個の高保存性 Cys 以外に neurophysin が VP/OT superfamily ペプチドと相互作用するのに必須と考えられているアミノ酸残基が annetocin プレプロホルモンにも保存されていることから、無脊椎動物の neurophysin は哺乳類の neurophysin と本質的に同様の高次構造を形成でき、VP/OT superfamily ペプチドと結合する可能性が示唆された。さらに、annetocin 遺伝子は産卵行動を支配していると考えられている食道下神経節の神経細胞に特異的に発現していたことから、annetocin が産卵行動に関与している神経ペプチドであることが裏付けられた。

以上、軟体動物や環形動物由来の生理活性ペプチドの遺伝子レベルでの研究により、そのアミノ酸配列から得られる情報のみでは解決し難いペプチドの生理的機能や相同性あるいは多様性について明らかにすることが可能となり、今後の生合成機構や発現制御の研究を行う上でも有益な知見を提供するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

アフリカマイマイの神経節と心房から単離された D-アミノ酸含有ペプチドである achatin-I、および同心房から単離された RFamide 配列を有する ACEP-1 は特徴的なペプチドであり、一方、シマミズから得られた annetocin は高等動物の下垂体ホルモンの一種 oxytocin と高い相同性を示す。これらの生理機能や分子の普遍性あるいは多様性を解明する上で、cDNA をクローニングし、RT-PCR 法や in situ hybridization 法を駆使して遺伝子発現の局在を明らかにすることが大変重要である。本研究により、以下のような新規、かつ興味深い知見が得られた。

achatin-I の前駆体はプロセッシング配列の Lys-Arg を付加した achatin 配列をコードしており、achatin-I 中の D-Phe は L-Phe のコドンで指定されていた。achatin 遺伝子は pedal ganglion のみで発現していた。これらの結果から、achatin 配列中の L-Phe が D-Phe に変換され achatin-I が成熟すること、およびこのアイソマー化を含む achatin-I の生成は pedal ganglion で特異的に起こることが示唆された。

ACEP-1 前駆体は、ACEP-1 を 1 コピー含有していた。ACEP-1 mRNA は、脳神経節と食道下神経節の pedal ganglion, right parietal ganglion、および visceral ganglion で検出されたばかりでなく心房でもその存在が確認された。従って、ACEP-1 は神経ペプチドと心房性ホルモン様の因子の二つの機能を有すると推定された。

C-RFa 前駆体は 1 コピーの C-RFa をコードしており、C-RFa 前駆体には哺乳類の prolactin-releasing peptide (PrRP) 前駆体に特徴的な配列がいくつか存在していた。さらに、主に延髄、大脳、中脳、および眼球に C-RFa 遺伝子の発現が認められたが、この発現様式は PrRP 遺伝子の発現とよく似ていた。これらの結果から、C-RFa と PrRP は同様の機能に関わるファミリーペプチドと考えられた。

oxytocin 前駆体と同様に、annetocin の前駆体はシグナルペプチド、ホルモンペプチド、および neurophysin 領域で形成されている等の結果から、annetocin が vasopressin/oxytocin (VP/OT) superfamily の一員であることが確立された。また、全種の neurophysin 領域に保存されている 14 個の Cys に加えて、neurophysin の機能に不可欠なアミノ酸が annetocin 前駆体にも存在していることが見出された。さらに、annetocin mRNA は産卵行動に関与すると考えられている神経細胞のみに検出できた。これらの結果は、VP/OT superfamily ペプチド一次配列だけでなく、ペプチド分子と neurophysin の機能も哺乳類から環形動物まで保存されていることを強く示している。

以上、本研究の成果は、生理活性ペプチドの生理的機能や分子の相同性あるいは多様性を理解する上で極めて有用と考えられる。よって、審査に当たった伊藤教授、川崎教授そして私は、本論文が博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。更に、平成 11 年 10 月 25 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。