

論文の内容の要旨

論文題目 無脊椎動物タキキニン関連ペプチド Uru-TK に関する研究

氏名 川田 剛士

タキキニンは生体内で多様な作用を引き起こす脳腸ペプチドである。このペプチドは哺乳類に対して血圧降下作用や唾液分泌効果、腸管収縮作用などの末梢作用を示す。また神経内では痛覚などの侵害情報を伝達する神経ペプチドとして機能している。さらに脊椎動物から単離されたタキキニンペプチドはC末端に $[-\text{Phe-X-Gly-Leu-Met-NH}_2]$ という共通配列を有していることが特徴である。一方、無脊椎動物の神経組織からもタキキニンと同様に腸管収縮作用を誘起し、かつタキキニンの共通配列と相同性のある $[-\text{Phe-X-Gly-Y-Arg-NH}_2]$ という配列がC末端に保存されているペプチドが確認されていた。これらのペプチドはその生物活性の特徴とアミノ酸配列の類似性から、タキキニン関連ペプチドと総称されていた。しかし、このタキキニン関連ペプチドは無脊椎動物の腸管に対しては収縮を促すが、脊椎動物の腸組織に対する収縮活性はほとんどない。またタキキニンの共通アミノ酸配列においても、類似性は認められるが同一ではない。加えて、既存のタキキニン関連ペプチドに関する研究はペプチドの一次配列決定、生物活性検定や免疫学的組織染色がほとんどであるため、タキキニン関連ペプチドとタキキニンとの分子進化学的関連や機能レベルでの進化や多様性を解明する上で不可欠な分子生物学的知見が全く存在しない状況であった。そこで筆者は、まず、

- (1) これまで明らかにされていなかった無脊椎動物のタキキニン関連ペプチドの前駆体構造を明らかにすること

(2) 哺乳類タキキニン前駆体との共通点または相違点を調べること

(3) タキキニン関連ペプチドの受容体を同定して、アミノ酸配列、ゲノム構造、ペプチドリガンドとの反応性を決定し、脊椎動物のタキキニンおよびその受容体と構造や機能を比較することにより、タキキニン関連ペプチドの構造と機能の進化、多様性を解明することを

目的とし、以下の研究を行った。

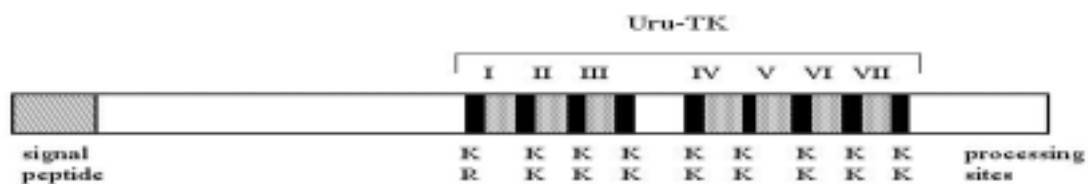


図1 Uru-TK 前駆体模式図。タキキニン関連ペプチド共通配列を含むペプチドを点画で、プロセシングサイトを黒地で、シグナルペプチドを斜線でそれぞれ表している。

ユムシはユムシ動物門に属する無脊椎動物であり、環形動物門の近縁である。このユムシの神経索から2種類のタキキニン関連ペプチド、Uru-TK I と Uru-TK II が以前に同定されていた。そこで、ユムシ神経索から Uru-TK I および Uru-TK II をコードする cDNA のクローニングを試みた結果、Uru-TK I と Uru-TK II は同一の前駆体にコードされていることが明らかになった。さらにこの前駆体には Uru-TK I と Uru-TK II 以外にも、タキキニン関連ペプチド特有の配列 (-Phe-X-Gly-Y-Arg-Gly- : Gly はプロセシングによりアミド化) を含むペプチドが5つ(Uru-TK III-VII)コードされていた(図1)。これら5つの新規仮想ペプチドの存在を、質量分析測定によって検出したところ、Uru-TK III-V, VIIが実際に神経索内に存在することが判明した。またゴキブリ後腸収縮活性の測定を行った結果、これら4つのペプチドは Uru-TK I と Uru-TK II とほぼ同等の生物活性を示すことが明らかになった。以上の実験結果から、Uru-TK 前駆体は少なくとも6つのタキキニン関連ペプチド(表1)をコードおよび産生することが証明された。哺乳類タキキニンの前駆体にはタキキニンが1つまたは2つしかコードされておらず、前駆体構造におい

てタキキニンと Uru-TK の間には明らかな差異が認められた。またタキキニン遺伝子では選択的スプライシングが起こる例が確認されるが、Uru-TK 遺伝子ではこの選択的スプライシングは確認されなかった。この結果から転写様式においても Uru-TK 遺伝子はタキキニン遺伝子とは異なることが判明した。これらの知見から、タキキニン関連ペプチド遺伝子は、タキキニン遺伝子とは先祖遺伝子が異なるか、もしくはそれぞれが別々の経路で進化してきたことが示唆され、従来のアミノ酸配列比較や生理学実験から示唆されていたタキキニンとタキキニン関連ペプチドを同族とする見解を覆すものである。

表 1 Uru-TK ペプチドのアミノ酸配列

Peptide	Sequence
Uru-TK I	LRQSQFVGAR-NH ₂
Uru-TK II	AAGMGFFGAR-NH ₂
Uru-TK III	AAPSGFFGAR-NH ₂
Uru-TK IV	AAYSGFFGAR-NH ₂
Uru-TK V	APSMGFFGAR-NH ₂
Uru-TK VII	APKMGFFGAR-NH ₂

太字はタキキニン関連ペプチドの共通アミノ酸残基

生理活性ペプチドの機能や特徴を解析するに際し、その生物活性を媒介する分子である受容体を同定し活性化機構を明らかにすることは重要である。そこで筆者は Uru-TK の受容体をコードする cDNA をクローニングし、タキキニン受容体と比較することを試みた。タキキニン受容体は多くの脊椎動物から同定されているが、それらのアミノ酸配列には相同性の高い領域が存在する。この相同性の高いアミノ酸配列に対応する degenerate primer を作成し、ユムシ神経索 cDNA を鋳型に PCR を行うことにより、タキキニン受容体と相同性をもつ 1 つの受容体候補遺伝子を取得した。この受容体候補蛋白質をアフリカツメガエル卵に発現させ、Uru-TK I と反応させたところ、生物活性を促したことから、この候補蛋白質が Uru-TK の受容体であることが示された（以後、この受容体を UTKR と呼ぶ）。タキキニン受容体は G 蛋白質結合型受容体であり、タキキニンとの結合により PLC の活性化、IP₃ の生成、細胞質 Ca²⁺ イオン濃度の増加等を誘起する。ツメガエル卵における生物活性はこの PLC 活性化由来のものであり、UTKR はタキキニン受容体と同じ

シグナル伝達を引き起こすことが示された。またタキキニン受容体は3種類（NK1受容体、NK2受容体、NK3受容体）存在するが、それぞれの受容体に対応するリガンドがある。哺乳類には3種類のタキキニン（substance P, NKA, NKB）が存在するが、NK1受容体はsubstance Pと、NK2受容体はNKA、NK3受容体はNKBとそれぞれ選択的に相互作用する。しかしながら、UTKRと6種類のUru-TK（表1）の反応性を確認したところ、全ペプチドともほぼ同等の活性を示すことが判明した。したがってUTKRにはリガンド選択性がないか非常に弱いことが示唆され、タキキニンとタキキニン受容体に特徴的な強いリガンド選択性はないことが証明された。

タキキニンとタキキニン関連ペプチドではC末端アミノ酸残基が前者ではMet残基、後者ではArg残基である。そこで、Uru-TK IのC末端アミノ酸残基をArg残基からMet残基に置換したアナログペプチドを、UTKRを発現させたアフリカツメガエル卵に反応させて活性が促されるかを確認したところ、このUru-TK IアナログはUTKRを活性化させないことが示された。さらにタキキニンであるsubstance PのC末端アミノ酸残基をMet残基からArg残基置換したアナログペプチドを用いて同様の実験を行った結果、substance PアナログはUTKRを活性化することが示された。これらの結果からUTKRを活性化させるにおいてペプチドC末端アミノ酸残基が重要な影響を及ぼしていることが確認された。

タキキニン受容体とタキキニン関連ペプチド受容体の分子進化レベルでの関連性を考察する上で、タキキニン関連ペプチド受容体のエクソン-イントロン構造を決定することは必須である。そこで筆者はUTKR受容体をコードする染色体領域の配列決定を行い、イントロン領域の配列および挿入部位を決定した。その結果、UTKR受容体コード領域には4つのイントロン領域が含まれており、そのイントロンの挿入位置はタキキニン受容体遺伝子における挿入位置と一致していた。この事実からタキキニン受容体遺伝子とタキキニン関連ペプチド受容体遺伝子は同一の祖先遺伝子を起源にすることが示唆され、タキキニン受容体とタキキニン関連ペプチド受容体は同族の受容体であることが立証された。一方、この受容体の保存性とは対照的に、ペプチドではタキキニンとタキキニン関連ペプチドの間に前駆体構造や転写様式に明確な差異が認められた。特にペプチドの前駆体構造の相違は、タキキニン遺伝子とタキキニン関連ペプチド遺伝子が異なる祖先遺伝子から派生してきた可能性を示唆している。それぞれ別々の進化過程を経てきたタキキニンおよびタキキニン関連ペプチドと、共通の祖先から派生したそれぞれの受容体が、1つのリガンド-受容体システムを構築して生体反応制御に関与することとなり、非常に興味深い知見である。

以上、本研究によって従来のアミノ酸配列や生理活性測定では明らかにされなかったタキキニン関連ペプチドおよびその受容体の一次構造、活性化機構、ならびにタキキニンとその受容体の分子進化的関連において新規かつ重要な知見が明らかになった。