

貝類インスリン関連ペプチドの生理機能

淡路 雅彦^{*1}・森山 俊介^{*2}

Physiological function of the insulin-related peptides in molluscs.

Masahiko AWAJI^{*1} and Shunsuke MORIYAMA^{*2}

Abstract Peptides structurally related to vertebrate insulin have been identified in invertebrates including mollusks. In the pond snail, *Lymnaea stagnalis*, clusters of neurons called light green cells in the cerebral ganglia produce and release molluscan insulin-related peptides (MIPs) which are suggested to stimulate the use of hemolymph glucose as an energy source by growing tissues. In the sea hare, *Aplysia californica*, *Aplysia* insulin (AI) is produced in the central region of the cerebral ganglia. The expression of AI mRNA decreases when the animal is deprived of food, and injections of AI reduce hemolymph glucose levels. These results suggest that the gastropod insulin-related peptides play important roles in growth control and carbohydrate homeostasis. In bivalves, the structure and gene expression of the insulin-related peptide are detailed only in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. The expression of the oyster insulin-related peptide (oIRP) mRNA increases in March prior to growth and germ cell development, and decreases in July after active spawning. To gain insight into the physiological function of oIRP, changes in the oIRP mRNA levels under food deprivation or glucose administration were examined, but significant changes in the gene expression were not detected.

Key words : insulin, *Lymnaea*, *Aplysia*, *Crassostrea*, Mollusca

無脊椎動物を含む様々な動物でインスリンと類似した構造を持つペプチド（インスリンファミリーペプチド）が存在することが知られている。貝類にもインスリンファミリーペプチド（インスリン関連ペプチド）があり、その生理作用の一部として軟体部や殻の成長を維持する機能を持つと考えられている (Smit *et al.*, 1988)。貝類の成長は水温などの物理的環境要因や餌料条件によって変化し、成長が変化する機構を理解することは効率的な養殖を進める上の基礎となる。ここではインスリン関連ペプチドにより貝類の軟体部や殻の成長が維持される機構を中心に、腹足類（巻貝類）、斧足類（二枚貝類）での知見の現状を我々の研究成果も含めて紹介する。

モノアラガイ科 *Lymnaea stagnalis* の MIP

腹足綱有肺亜綱の *L. stagnalis* は中枢神経系を構成する神経細胞が実体顕微鏡下で個別に確認できるほど大きく、神経生物学のモデル動物として利用されている。中枢神経系の神経細胞はいくつかの神経細胞群に類別でき、同じ種類の細胞が集団を作っている。Geraerts(1976) は特定の神経細胞群の除去が貝の生理状態にどのような影響を及ぼすかを検討し、脳神経節の Light Green Cells (LGC、淡緑細胞群) という神経細胞群を除去すると貝の殻と軟体部全体の成長が著しく遅くなり、LGC を含む脳神経節を他個体から移植すると、LGC 除去した個体の成長が正常個体と同じレベルに回復することを明らかにした。この結果から LGC は殻と軟体部の成長を維持する機能を持つホルモンを分泌すると考えられる。

2008年4月23日受理 (Received on April 23, 2008)

^{*1} 養殖研究所 〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦 422-1 (National Research Institute of Aquaculture, Nakatsuhamaura, Minami-Ise, Mie 516-0193, Japan)

^{*2} 北里大学水産学部 〒022-0101 岩手県大船渡市三陸町越喜来字鳥頭 160-4 (Laboratory of Molecular Endocrinology, School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Sanriku, Iwate 022-0101, Japan)

Geraerts(1992)はLGC除去に伴う体液成分等の変化も調べ、成長の停滞に伴い血リンパ液グルコース濃度が上昇し、軟体部各部のグリコーゲン含量が増加することを示した。一方、殻の形成に関しては、LGC除去により外套膜縁(殻形成部位)のカルシウム結合タンパク質の減少(Dogterom and Doderer, 1981)、殻皮形成の抑制(Dogterom and Jentjens, 1980a)、殻縁へのカルシウムの移行の抑制(Dogterom *et al.*, 1979)が起こることと、LGC産生物がオルニチンデカルボキシラーゼ活性を高めることが示された(Dogterom and Robles, 1980b)。そして単離されたLGCは培養条件下で培地のグルコース濃度が生理的範囲内で上昇するのに応じて脱極して活性化することが報告されている(Kits *et al.*, 1991)。これらの結果からLGCから分泌されるホルモンは、餌から血リンパ液に吸収されたグルコースを細胞に取り込ませ、エネルギー源として利用することを促進して軟体部や殻の成長を維持すると考えられ、血リンパ液グルコース濃度の上昇によりホルモンの分泌が促進されると予想される。

LGCから分泌されるホルモンの精製は困難な状態が続いたが、Smit *et al.*(1988)によりLGCではインスリン関連ペプチド(Molluscan Insulin-related peptide, MIP)遺伝子が特異的に発現していることが明らかに

され、遺伝子の情報に基づきペプチド本体も程なく精製され一次構造が確認された(Li *et al.*, 1992)。現在のところ5種類のMIP(MIP I、II、III、V、VII)がLGCで産生されることが知られており、互いに類似したアミノ酸配列を持っている(Fig. 1)。ゲノムにはこれらに加えてMIP IV、VIという遺伝子も存在するが、これらは偽遺伝子で機能的なmRNAには転写されない(Smit *et al.*, 1998)。MIPレセプターは1種類が報告されており、中枢神経系と胚での遺伝子発現が確認されている(Roovers *et al.*, 1995)。LGCで特異的に産生されるホルモンがMIPのみであるかは不明であり、精製したMIPをLGC除去した貝に投与する実験もまだ成功していないが、MIPはLGCで産生される成長の維持に必須のホルモンである可能性が高い。ただし、MIP遺伝子はLGCの他に脳神経節近傍のLateral lobe(LL)という部分のCanopy cellでも発現している(Smit *et al.*, 1988)。LLを除去すると成長が大幅に促進されることが知られており(Geraerts, 1976)、Canopy cellのMIPが果たす機能についてはよく理解されていない。またMIP VIIは摂餌行動をコントロールする口球神経節でも発現しており、摂餌と何らかのかかわりを持つ可能性も指摘されている(Smit *et al.*, 1996)。

A chain

```

oIRP      -- YGDINIVCECCYHSCSVAEFEDYCAE-----
MIP I     -- QGTTNIVCECCMKPCTLSELRQYCP-----
MIP II    -- QRTTNLVCECCFNQCTPDVVRKYCY-----
MIP III   -- ESRPSIVCECCFNQCTVQELLAYC-----
MIP V     -- QRTTNLVCECCYNVCTVDVVFYEYCY-----
MIP VII   EVMAEPSLVCDCCYNECSVRKLATYC-----
AI        -- EASGSITCECCFNQCRIFELAQYCRLPDHFPSRIS
Human     -----GIVEQCCTSI CSLYQLENYCN-----

```

B chain

```

oIRP      -FEKVC TFETYRRGVHQQGACGDNLADMLRLVCRKYKRSGGTRPDKTYDVL
MIP I     -QFSACNINDRP---HRRGVC GSALADLVDFACSSSNQPAMV-----
MIP II    --QSSCSLSSRP---HPRGICGSNLAGFRAFICSNQNSPSMV-----
MIP III   TTQHTCSILSRP---HPRGLCGSTLANMVQWLCSTYTTSSKV-----
MIP V     -QFSACSFSSRP---HPRGICGSDLADLRAFICSRRNQPAMV-----
MIP VII   QQVNTCTMFSRQ---HPRGLCGNRLARAHANL C FLLRNTYDPDIFPR----
AI        NFEHSCNGYMRP---HPRGLCGEDLHVIIISNLCSSSLGGNRRRFLAKYMV---
Human     -----F---VNQHLCSH LVEALYLVCGERGFYTPKT-----

```

Fig. 1. Amino acid sequence comparison of the insulin-related peptides of mollusks with human insulin. The positions that have an identical residue or similar amino acids are shaded with dark or light grey respectively. Arrows indicate the extra cystein residues of the molluscan insulin. oIRP, Pacific oyster insulin-related peptide; MIP, molluscan insulin-related peptide of *Lymnaea stagnalis*; AI, *Aplysia* insulin; Human, human insulin.

アメフラシ科 *Aplysia californica* の AI

腹足綱後鰓亜綱の *A. californica* ではインスリン関連ペプチド (*Aplysia insulin*, AI) が脳神経節の F クラスター、C クラスターと呼ばれる神経細胞群で産生され、その cDNA とペプチドの構造 (Fig. 1) が明らかにされている (Floyd *et al.*, 1999)。AI の遺伝子発現は絶食により低下し、精製した AI の投与により血リンパ液グルコース量が低下する (Horn *et al.*, 1998; Floyd *et al.*, 1999)。この結果は MIP と同様に AI が細胞へのグルコースの取り込みとエネルギー源としての利用を促進していることを示唆し、遺伝子発現が餌条件に依存することを示している。一方、*A. californica* のインスリンレセプターは神経系、特に産卵ホルモン (Egg laying hormone, ELH) を産生、分泌する囊細胞 (Bag cell neuron) に多く存在することが報告されている (Jonas *et al.*, 1996)。囊細胞は培養条件下でヒト・インスリンの作用により ELH を放出することが知られており (Jonas *et al.*, 1997)、AI が産卵にかかわる神経伝達物質としても機能する可能性を示している。最近報告された *A. californica* 神経系の EST 解析においてインスリン関連ペプチドが AI 以外に 2 種類存在することが明らかになり、cDNA が登録されている (Accession number: DQ479392, DQ479393)。摂餌、糖代謝、産卵に異なるインスリン関連ペプチドが関与している可能性がある。

二枚貝のインスリン関連ペプチド

二枚貝に哺乳類のインスリンを投与する実験や二枚貝の組織抽出物中のインスリン様活性を見る実験は 1960、70 年代から行われ、血リンパ液グルコース量の低下やグリコーゲン合成の促進活性が報告されている (Kasinathan, 1963; Davidson *et al.*, 1971)。抗脊椎動物インスリン抗体を用いた免疫組織化学によるインスリン産生細胞の検討も 1970 年代から行われ、消化管や神経節に抗体と反応する細胞が検出されている (Fritsch *et al.*, 1976; Kellner-Cousin *et al.*, 1994)。またヒト・組換え IGF がマガキ *Crassostrea gigas* の生殖細胞の増殖や外套膜縁でのタンパク合成を促進すると報告されている (Gricourt *et al.*, 2003; Gricourt *et al.*, 2006)。しかし二枚貝にもインスリン関連ペプチドが存在することはホタテガイ *Patinopecten yessoensis* のインスリン関連ペプチド cDNA が Naraoka により GenBank に登録され (Accession number: AB125891)、マガキにおける Hamano *et al.* (2005) の詳細な検討が報告されて初めて明らかになった。Hamano *et al.* (2005) はマガキインスリン関連

ペプチド (oIRP) の cDNA をクローニングし、推定アミノ酸配列の A,B 両鎖にシステイン残基が脊椎動物より一つずつ多くあり、腹足類と同様の特徴を持つことを示した (Fig. 1, 矢印)。oIRP の mRNA は 3 種類存在し、内臓神経節で発現している。そして遺伝子発現の季節変化を検討した結果、生殖巣の発達や軟体部、殻の成長が進む春に遺伝子発現が高まることを明らかにした。生殖巣の発達や軟体部、殻の成長には複数のホルモンが関与すると予想されるが、その中で oIRP が一定の機能を果たしている可能性がある。

腹足類での研究成果から、インスリン関連ペプチドは二枚貝においても細胞内へのグルコースの取り込みとエネルギー源としての利用を促進し、その遺伝子発現とホルモンの分泌が餌条件や血リンパ液グルコース量により変化する可能性が考えられる。そこで餌条件や血リンパ液グルコース量に応じた遺伝子発現変化がマガキでも観察されるかを検討した。給餌飼育したマガキを 2 群に分けて 1 群は給餌を続け、他の 1 群は絶食させて、内臓神経節での oIRP 遺伝子発現と血リンパ液グルコース量、軟体部グリコーゲン量の変化を比較した。その結果、絶食区は血リンパ液グルコース量が実験開始時よりも減少するが、oIRP 遺伝子発現量には有意な差があるとは言えなかった (Fig. 2)。また 20mM グルコース含有海水にマガキを浸漬すると血リンパ液グルコース量が対照区の 10 倍ほどに有意に上昇するが、oIRP 遺伝子発現には対照区と有意な差があるとは言えない事も示された (Fig. 3)。これらの結果はマガキ oIRP の遺伝子発現が餌料条件や血リンパ液グルコース量で単純に調節されるものではないことを示唆している。

おわりに

二枚貝におけるインスリン関連ペプチドの生理機能は未だ解明できていないが、マガキ oIRP 遺伝子発現の季節変化のパターンから、腹足類と同様に細胞内へのグルコースの取り込みとエネルギー源としての利用を促進している可能性が考えられる。今後マガキ oIRP など二枚貝インスリン関連ペプチドの精製、そして組換えペプチドの産生を進め、培養条件下での生理機能の検討や体内でのペプチド分泌の動態を解明することが生理機能解明に不可欠である。またインスリン関連ペプチドが細胞内へのグルコースの取り込みとエネルギー源としての利用を促進する機能を有するならば、組換えペプチドを貝類の細胞培養に利用することで、現在のところ困難である培養細胞系の樹立などに結びつく可能性がある。

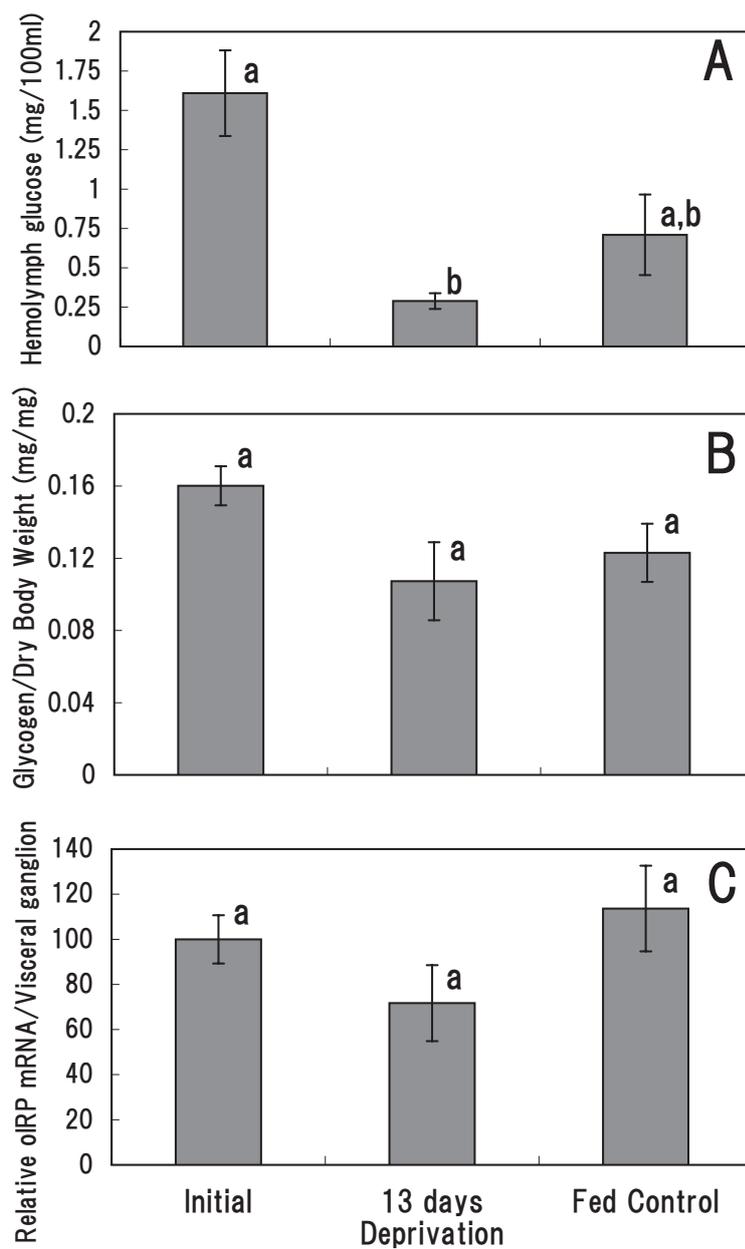


Fig. 2. Effects of food deprivation on the hemolymph glucose concentration (A), glycogen content of the dry meat (B), and the oIRP mRNA level in the visceral ganglion (C) of the Pacific oyster. Each column with a vertical bar represents the mean \pm SEM. Groups sharing a common letter do not differ significantly ($p > 0.05$).

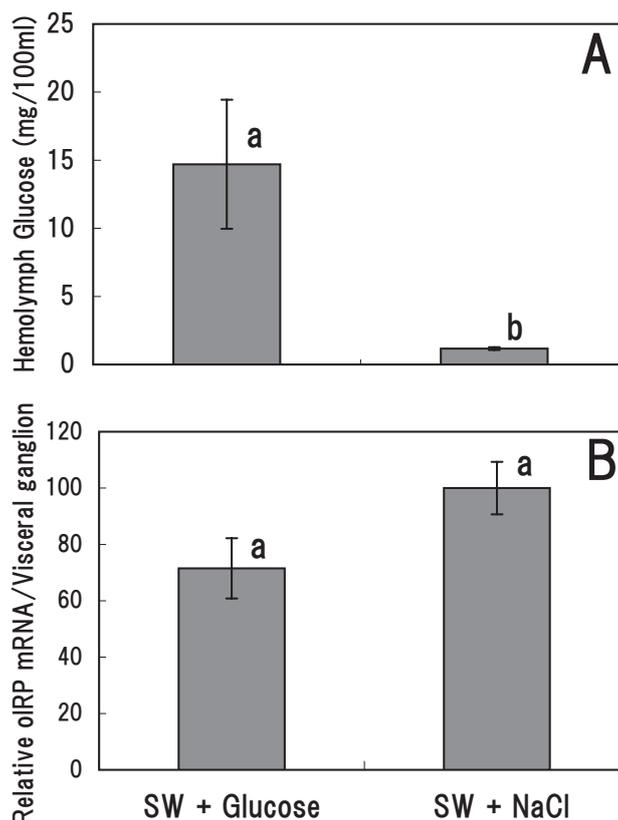


Fig. 3. Effects of glucose administration on the hemolymph glucose concentration (A) and the oIRP mRNA level in the visceral ganglion (B) of the Pacific oyster. Oysters were immersed in the seawater containing 20 mM glucose or 10 mM NaCl for 90 min at 14 °C. Each column with a vertical bar represents the mean \pm SEM. Groups sharing a common letter do not differ significantly ($p > 0.05$).

文 献

- Davidson J.K., Falkmer S., Mehrotra B.K., and Wilson S., 1971: Insulin assays and light microscopical studies of digestive organs in Protostomian and Deuterostomian species and in Coelenterates. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **17**, 388-401.
- Dogterom A.A., Loenhout H. van, Schors R. C. van der., 1979: The effect of the growth hormone of *Lymnaea stagnalis* on shell calcification. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **39**, 63-68.
- Dogterom A.A. and Jentjens T., 1980a: The effect of the growth hormone of the pond snail *Lymnaea stagnalis* on periostracum formation. *Comp. Biochem. Physiol.*, **66A**, 687-690.
- Dogterom A.A. and Robles B.R., 1980b: Stimulation of ornithine decarboxylase activity in *Lymnaea stagnalis* after a single injection with molluscan growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **40**, 238-240.
- Dogterom A.A. and Doderer A., 1981: A hormone dependent calcium-binding protein in the mantle edge of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Calcif. Tissue Int.*, **33**, 505-508.
- Floyd P.D., Lingjun L., Rubakhin S.S., Sweedler J.V., Horn C.C., Kupfermann I., Alexeeva V.Y., Ellis T.A., Dembrow N.C., Weiss K.R., and Vilim F.S., 1999: Insulin prohormone processing, distribution, and relation to metabolism in *Aplysia californica*. *J. Neuroscience*, **19**, 7732-7741.
- Fritsch H.A.R., Noorden S. van, and Pearse A.G.E., 1976: Cytochemical and immunofluorescence investigations on insulin-like producing cells in the intestine of *Mytilus edulis* L. (Bivalvia). *Cell Tissue Res.*, **165**, 365-369.
- Geraerts W.P.M., 1976: Control of growth by the neurosecretory hormone of the light green cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **29**, 61-71.
- Geraerts W.P.M., 1992: Neurohormonal control of growth and carbohydrate metabolism by the light green cells

- in *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **86**, 433–444.
- Gricourt L., Bonnet G., Boujard D., Mathieu M., and Kellner K., 2003: Insulin-like system and growth regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: hrIGF-1 effect on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **134**, 44–56.
- Gricourt L., Mathieu M., and Kellner K., 2006: An insulin-like system involved in the control of Pacific oyster *Crassostrea gigas* reproduction: hrIGF-1 effect on germinal cell proliferation and maturation associated with expression of homologous insulin receptor-related receptor. *Aquaculture*, **251**, 85–98.
- Hamano K., Awaji M., and Usuki, H., 2005: cDNA structure of an insulin-related peptide in the Pacific oyster and seasonal changes in the gene expression. *J. Endocrinol.*, **187**, 55–67.
- Horn C.C., Koester J., and Kupfermann I., 1998: Evidence that hemolymph glucose in *Aplysia californica* is regulated but does not affect feeding behavior. *Behavioral Neuroscience*, **112**, 1258–1265.
- Jonas E.A., Knox R.J., Kaczmarek L.K., Schwartz J.H., and Solomon D.H., 1996: Insulin receptor in *Aplysia neurons*: Characterization, molecular cloning, and modulation of ion currents. *J. Neuroscience*, **16**, 1645–1658.
- Jonas E.A., Knox R.J., Smith T.C.M., Wayne N.L., Connor J.A., and Kaczmarek L.K., 1997: Regulation by insulin of a unique neuronal Ca²⁺ pool and of neuropeptides secretion. *Nature*, **385**, 343–346.
- Kasinathan S., 1963: Effect of insulin on carbohydrate metabolism of the bivalve mollusk *Meretrix casta* (Chemnitz). *Proc. Indian Acad. Sci.*, **B58**, 367–374.
- Kellner-Cousin K., Mialhe E., and Mathieu M., 1994: Identification of insulin-like peptides in cerebral ganglia neurosecretory cells of the mussel *Mytilus edulis*. *Tissue and Cell*, **26**, 891–899.
- Kits K.S., Bobeldijk R.C., Crest M., and Lodder, J.C., 1991: Glucose-induced excitation in molluscan central neurons producing insulin-related peptides. *Pflugers Arch.*, **417**, 597–604.
- Li K.W., Geraerts W.P.M., and Joosse J., 1992: Purification and sequencing of molluscan insulin-related peptide II from the neuroendocrine light green cells in *Lymnaea stagnalis*. *Endocrinology*, **130**, 3427–3432.
- Roovers E., Vincent M.E., Kesteren E. van, Geraerts W.P.M., Planta R.J., Vreugdenhil E., and Heerikhuizen H. van, 1995: Characterization of a putative molluscan insulin-related peptide receptor. *Gene*, **162**, 181–188.
- Smit A.B., Vreugdenhil E., Ebberink R.H.M., Geraerts W.P.M., Klootwijk J., and Joosse J., 1988: Growth-controlling molluscan neurons produce the precursor of an insulin-related peptide. *Nature*, **331**, 535–538.
- Smit A.B., Spijker S., Minnen J. van, Burke J.F., Winter F. de, Elk R. van, and Geraerts W.P.M., 1996: Expression and characterization of molluscan insulin-related peptide VII from the mollusk *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience*, **70**, 589–596.
- Smit A.B., Kesteren R.E. van, Li K.W., Minnen J. van, Spijker S., Heerikhuizen H. van, and Geraerts W.P.M., 1998: Towards understanding the role of insulin in the brain: Lessons from insulin-related signaling systems in the invertebrate brain. *Progress in Neurobiology*, **54**, 35–54.