

ウスエダミドリイシ幼生の着生・変態にはチロシン残基のリン酸化を必要とする

谷口 洋基
阿嘉島臨海研究所

Settlement and metamorphosis of *Acropora tenuis* larvae need phosphorylation of the protein on tyrosine residues

H. Taniguchi

●はじめに

近年、サンゴの有性生殖を利用したサンゴの増養殖に関する研究が盛んになっているが、これを成功させるためには幼生期の着生・変態のメカニズムの解明が一つの重要なカギとなる。しかし、この点に関してはいまだ不明点が多い。そこで、すでに構造や作用のわかっている20種類の生理活性物質*を用いて、これらの中にプラヌラ幼生の着生・変態を誘引するものがあるのかどうかスクリーニングをおこなったが、今回用いた物質の中には着生・変態誘引作用はみられなかった。ところが、逆に幼生の着生・変態が期待できる条件の下でこれらの物質を添加したところ、チロシンキナーゼ阻害活性をもつ4種類の物質(herbimycin、erbstatin、2,5-MeC (methyl-2,5-dihydroxycinnamate)、lavendustin)に幼生の着生・変態を妨げる作用がみられた。チロシンキナーゼは細胞外から細胞内へのシグナルの伝達に関与し、細胞の増殖や分化など多くの生理機能を制御している重要な酵素である。そのため、サンゴのプラヌラ幼生が外部からの刺激によって着生・変態する過程にもチロシンキナーゼが関与している可能性がある。そこで今回これら4種類のチロシンキナーゼ阻害物質を用いて、チロシンキナーゼがサンゴ幼生の着生・変態に関与しているかどうかを確かめるとともに、それらによって幼生の着生・変態を制御することが可能かどうかを実験によって検討した。

●方法

あらかじめ野外より成熟した卵をもつウスエダミドリイシ*Acropora tenuis*の一部(10cm×10cm程度)を数群体から採集し、産卵日まで阿嘉港近くの海底に置

いておいた。産卵当日、海水を入れた水槽中にサンゴを入れて産卵を待ち、産卵終了後に水面に浮いたバンドルを駒込ピペットで別の容器に回収した。そしてピPETTINGによってバンドルを壊し、受精させた。受精卵は卵割を経て受精から40時間ほどでプラヌラ幼生となり、繊毛を使って泳ぎ始める。そしてそれからさらに40時間ほどで着生能力を有するようになる。実験に用いたプラヌラ幼生は水槽の水を毎日交換することで、実験終了まで良い状態で維持した。

実験はすべて24穴のマルチウェルプレートでおこない、使用した海水は0.22 μ mのろ紙でろ過したものを用いた。今回の実験には9-17日齢の*Acropora tenuis*の幼生を用いたが、この間の幼生の行動および着生能力には違いはなかった。

得られた結果はスチューデントのt検定($P<0.05$)によって有意性を検定した。

1. サンゴモによって誘導される*Acropora tenuis* 幼生の着生・変態に対する各チロシンキナーゼ阻害物質の影響
ろ過海水2mlに*A. tenuis*のプラヌラ幼生(17日齢)を10個体と幼生の着生促進効果の知られているサンゴモ類の一種*Hydrolithon reinboldii* (Morse and Morse 1991)のチップを適量入れたマルチウェルプレートに、チロシンキナーゼ阻害物質の herbimycin (Uehara et al. 1988)、erbstatin (Imoto et al. 1987)、2,5-MeC (Kawada et al. 1993)、lavendustin (Onoda et al. 1990)をそれぞれ最終濃度 $1\times 10^2\mu\text{g/ml}$ 、 $1\times 10^1\mu\text{g/ml}$ 、 $3\times 10^1\mu\text{g/ml}$ 、 $1\mu\text{g/ml}$ 、 $3\mu\text{g/ml}$ 、そしてネガティブコントロールとして用いたerbstatin不活性誘導体である4'-O-methylerbstatinについては $1\times 10^1\mu\text{g/ml}$ 、 $3\times 10^1\mu\text{g/ml}$ 、 $1\mu\text{g/ml}$ 、 $3\mu\text{g/ml}$ 加えた。また、サンゴモチップのみを適量加えたものをコントロールとした。室温で24時間静置した後、各ウェルの幼生の着生・変態率を顕微鏡で観察した。

2. 神経ペプチドHym-248によって誘導される*Acropora*

* leupeptin, pepstatin, chymostatin, erbstatin, herbimycin, oudenone, methyl-2,5-dihydroxycinnamate, formycin B, fusaric acid, teleocidin, 2,3-dihydroxybenzaldehyde, rotenon, inostamycin, sangivamycin, forphenicin, forphenicinol, cinnamic amide, phenethylamine, dephostatin, lavendustin

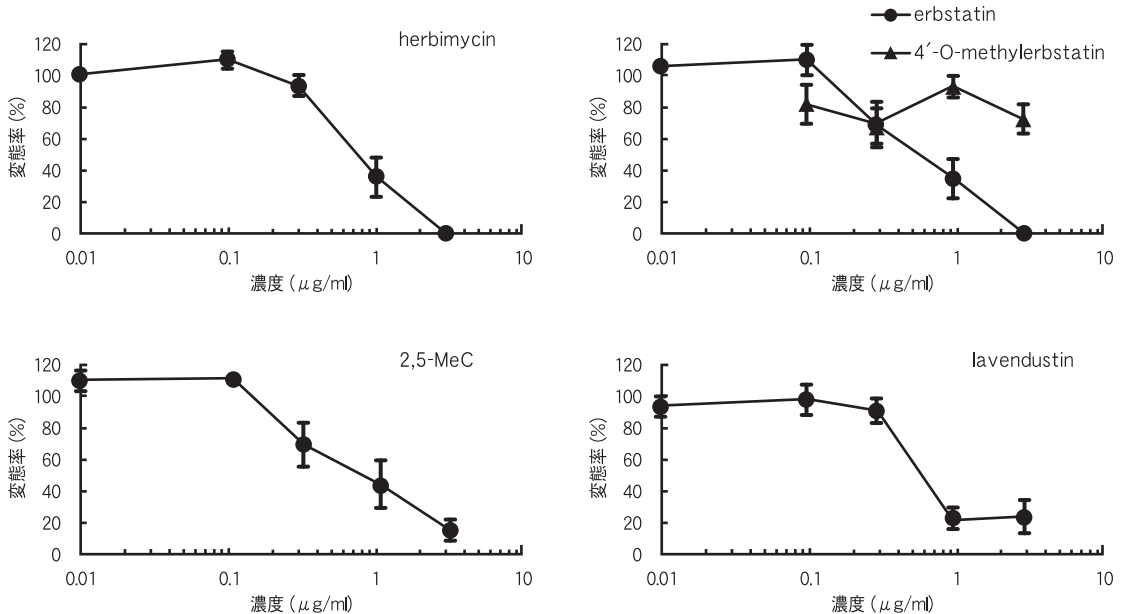


図1. サンゴモによって誘導される*Acropora tenuis* 幼生の着生・変態に対する各チロシンキナーゼ阻害物質の影響
縦軸はControlを100としたときの平均変態率を示し、棒線は標準誤差を示す。(n=4)

tenuis 幼生の着生・変態に対する各阻害物質の影響

ろ過海水1mlに*A. tenuis* のプラナラ幼生（9日齢）を10個体と幼生の着生促進効果の知られているヒドラ由来の神経ペプチドHym-248（以下、Hym-248とする：Iwao et al. 2002）を最終濃度 1×10^{-6} Mで加えたマルチウェルプレートに、各阻害物質を最終濃度 1×10^{-1} μg/ml、 3×10^{-1} μg/ml、 1 μg/ml、 3 μg/ml、そして4'-O-methylerbstatin は 1×10^{-1} 、 3×10^{-1} 、 1 、 3 、 10 μg/ml 加え、室温で静置した。コントロールにはHym-248のみを加えた。24時間後、各ウェルの幼生の着生・変態率を顕微鏡で観察した。

3. ペプチドHym-248の濃度を変えたときの各チロシンキナーゼ阻害物質の効果

2の実験で 1×10^{-6} M のHym-248で刺激した場合、どの阻害物質においても 3 μg/mlで十分に幼生の着生・変態を妨げた。そこで、Hym-248の濃度を高くすれば各阻害物質の存在下でもプラナラ幼生を着生・変態させることができるかどうかを調べた。

ろ過海水1mlに*A. tenuis* のプラナラ幼生（16日齢）を10個体と最終濃度 1×10^{-6} M、 2×10^{-6} M、 4×10^{-6} Mに調整したHym-248を加えた24穴のマルチウェルプレートに各阻害物質を 3 μg/mlの濃度で添加し、24時間後のプラ

ナラ幼生の着生・変態率をみた。コントロールにはHym-248のみを加えた。

4. 各阻害物質の可逆性

それぞれの阻害物質を添加することによってみられたプラナラ幼生の着生・変態能力の低下または消失が、阻害物質を除去することで再び回復するかどうかを検討した。

ろ過海水1mlに*A. tenuis* のプラナラ幼生（13日齢）を各10個体入れ、各阻害物質を最終濃度 3 μg/mlになるように加えた。室温で24時間静置したのち、幼生をろ過海水で十分に洗浄し、再び1mlのろ過海水に入れた。そこに適量のサンゴモチップまたはHym-248（最終濃度 1×10^{-6} M）を加え、24時間後の幼生の変態率をみた。

●結果

サンゴモによって誘引されるプラナラ幼生の着生・変態は、herbimycin、erbstatin、2,5-MeC、lavendustinの4種類のチロシンキナーゼ阻害物質によって濃度依存的に妨げられた。そしてチロシンキナーゼ阻害活性のない4'-O-methylerbstatin ではコントロールとの間に有意な差はみられなかった（図1）。

サンゴモ刺激に対するそれぞれの阻害物質の IC_{50} 値（着

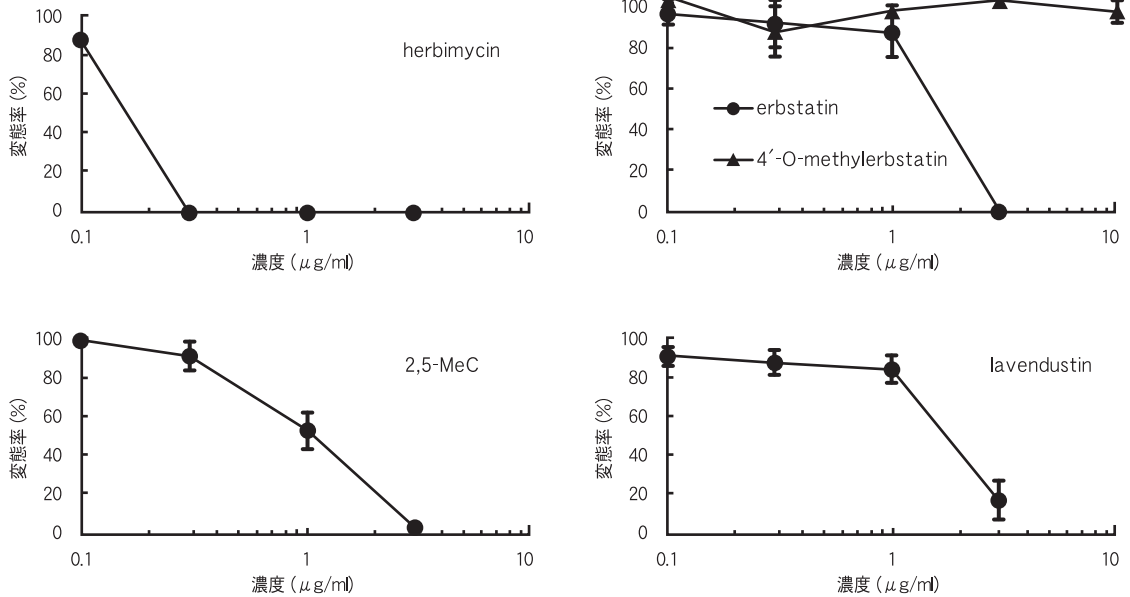


図2. ペプチドHym-248によって誘導される*Acropora tenuis* 幼生の着生・変態に対する各チロシンキナーゼ阻害物質の影響
縦軸はControlを100としたときの平均変態率を示し、棒線は標準誤差を示す。(n=4)

生・変態を50%抑制する濃度)はherbimycin: 0.50 μg/ml, erbstatin: 0.30 μg/ml, 2,5-MeC: 0.42 μg/ml, lavendustin: 0.48 μg/mlであった。

次に、Hym-248による着生・変態誘引については、herbimycin においては0.30 μg/ml以上の濃度で幼生の着生・変態はともに完全に妨げられた(図2)。erbstatinでは濃度依存的に着生・変態を妨げる効果がみられ、3 μg/mlでは完全に妨げた。また、2,5-MeCおよびlavendustinについても着生・変態は濃度依存的に妨げられた。さらに、2,5-MeCでは1 μg/ml以上、lavendustinでは3 μg/mlの濃度では、変態した幼生において、変態の進行速度がコントロールに比べて非常に遅いかまたは途中で停止するような現象がみられた。この現象は幼生の着生後、隔膜が観察され始める段階でみられた。4'-O-methylerbstatinにおいては10 μg/mlの濃度でも有意な効果はみられなかった(図2)。また、Hym-248で着生・変態を誘引した場合、サンゴモの場合と異なりプレートに着生せずに水中で変態する個体もみられた。

Hym-248刺激に対するそれぞれの阻害物質のIC₅₀値は、herbimycin: 0.16 μg/ml, erbstatin: 1.80 μg/ml, 2,5-MeC: 1.05 μg/ml, lavendustin: 1.75 μg/mlであった。

高濃度のHym-248を用いて各阻害物質の効果をみた

実験では、herbimycin ではHym-248の濃度に関わらず完全に幼生の着生・変態を妨げることがわかった。そしてerbstatin、2,5-MeCおよびlavendustinでは、妨げる作用はみられるものの、Hym-248の濃度が高くなるにしたがってその効果は小さくなった(図3)。

各阻害物質の可逆性を調べた実験では、herbimycinで前処理した幼生はサンゴモとHym-248の刺激に対しては反応せず、阻害物質除去後も幼生の着生・変態はみられなかった。それに対し、erbstatin、2,5-MeCおよびlavendustinで前処理した幼生では除去後にサンゴモとHym-248による刺激によって再び幼生の着生・変態がみられた(図4)。

なお、今回の実験で用いた試薬の濃度ではプラヌラ幼生の死亡や不自然な形態の変化などはおこらなかった。

●考察

チロシンキナーゼとは、タンパク質のチロシン残基を特異的にリン酸化する酵素で、外部からの刺激によってこのチロシンキナーゼが活性化されることにより細胞内へシグナルが伝達される。しかし、これまでサンゴ幼生の着生・変態とチロシンキナーゼとの関わりを調べた報告はない。今回用いたherbimycin、erbstatin、2,5-MeCおよびlavendustinの4種類のチロシンキナーゼ

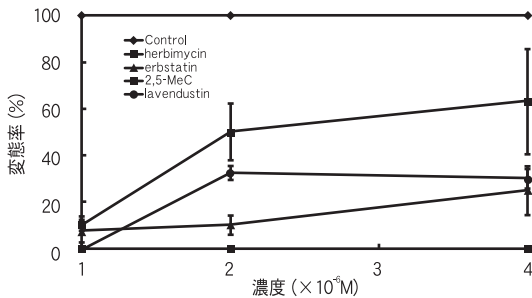


図3. ペプチドHym-248の濃度を変えたときの各チロシンキナーゼ阻害物質の効果
Control はHym-248刺激のみの場合の変態率を示す。縦軸は平均変態率を示し、棒線は標準誤差を示す。(n=4)

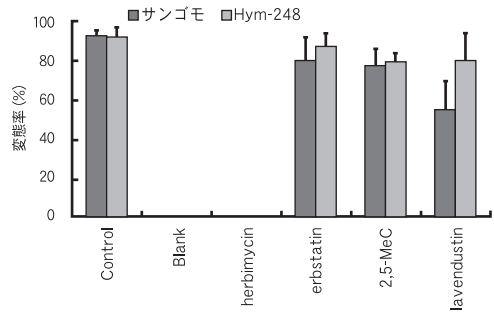


図4. 各チロシンキナーゼ阻害物質の可逆性
ControlはサンゴモまたはHym-248のみを加えたもの、Blankはなんの刺激も与えていないものを示す。縦軸は平均変態率を示し、棒線は標準誤差を示す。(n=4)

阻害物質はどれもサンゴモチップとHym-248によって誘導されるプラナラ幼生の着生・変態を妨げることが明らかになった。そして、erbstatinの不活性誘導体である4'-O-methylerbstatinでは有意な効果がみられなかったことから、*Acropora tenuis*のプラナラ幼生が外部からの刺激によって着生し、ポリプへと変態する過程にはチロシンキナーゼによるチロシン残基のリン酸化が必要であることが示唆された。

herbimycinはHym-248刺激に対しては特に強力に幼生の着生・変態を妨げ、Hym-248の濃度を高くしてもその効果はまったく低下しなかった。また、可逆性をみた実験でも、herbimycinの場合は試薬の除去後も幼生の着生・変態能力は失われたままであった。このことから、herbimycinは酵素またはタンパク質と強く結合し、永続的に反応を阻害することがわかった。他の3種類は阻害物質除去によって再び着生・変態能力を取り戻した。このことは、例えば飼育中のプラナラ幼生が水槽内で早期に着生・変態し始めた場合に、erbstatin、2,5-MeC、lavendustinなどのチロシンキナーゼ阻害物質を適量加えることでプラナラ幼生の期間をより長く維持できる可能性を示唆する。

Hym-248でプラナラ幼生の着生・変態を誘引した際、幼生が着生することなく浮いた状態で変態する現象がみられた。これは、プラナラ幼生が外部からの刺激によって着生し、その後ポリプへの変態過程へと進むと考えれば、Hym-248は幼生の着生を促すと同時に変態のシグナル伝達経路も活性化するのではないかと考えられる。また、2,5-MeC、lavendustinを加えた幼生では着生はするが変態が初期段階で停止してしまう（または変態速度が非常に遅くなる）現象がみられたことは、

これらの物質が幼生の着生を妨げる作用のほかにその後の変態に関わるチロシンキナーゼをより強く阻害する作用をもつことを示しているようである。

●謝辞

本研究に使用した生理活性物質は慶応義塾大学理工学部の梅沢一夫教授に供与していただいた。深く感謝の意を表したい。

●引用文献

- Imoto M., K. Umezawa, K. Komuro, T. Sawa, T. Takeuchi and H. Umezawa 1987. Antitumor activity of erbstatin, a tyrosine protein kinase inhibitor. *Jpn J. Cancer Res.*, 78: 329-332.
- Iwao K., T. Fujisawa and M. Hatta 2002. A cnidarian neuropeptide of the GLW amide family induces metamorphosis of reef-building corals in the genus *Acropora*. *Coral Reefs*, 21: 127-129.
- Uehara Y., Y. Murakami, S. Mizuno and S. Kawai 1988. Inhibition of transforming activity of tyrosine kinase oncogenes by herbimycin A. *Virology*, 164: 294-298.
- Onoda T., K. Isshiki, T. Takeuchi, K. Katsuta and K. Umezawa 1990. Inhibition of tyrosine kinase and epidermal growth factor receptor internalization by lavendustin A methyl ester in cultured A431 cells. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 16: 249-253.
- Kawada M., J. Tawara, T. Tsuji, Y. Honma, M. Hozumi, J. Y. Wang and K. Umezawa 1993. Inhibition of Abelson oncogene function by erbstatin analogues. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 19: 235-241.
- Morse D. E. and A. N. C. Morse 1991. Enzymatic characterization of the morphogen recognized by *Agaricia humilis* (scleractinian coral) larvae. *Biol. Bull.*, 181: 104-122.