

動物学雑誌 ZOOLOGICAL MAGAZINE 83: 1-9 (1974)

〔総 説〕

ヒトデの卵成熟と配偶子放出機構 I. 生殖巣刺激物質

Mechanism of oocyte maturation and gamete release in starfishes
I. Gonad-stimulating substance

金 谷 晴 夫

HARUO KANATANI

164 中野区 東京大学海洋研究所海洋生物生理部門

1973年9月28日 受領

多細胞動物にみられる生殖現象（有性）は一般的に言ってホルモン作用の支配下にあると考えるのが常識的な線であろう。脊椎動物では古くからいろいろと生殖に関する内分泌学的研究が多いが、無脊椎動物では節足動物昆虫類、甲殻類、環形動物多毛類、軟体動物腹足類、頭足類などにかぎられており、他の動物では本稿で述べるヒトデ類を除いて明らかでない（福田、1966；金谷、1973 参照）。しかし筆者の希望的観測が許されるなら多細胞動物一般について生殖現象はホルモンによって支配されていると考えてとりくむのが有利な研究法と思われる。

ヒトデの配偶子放出が放射神経の水抽出物の注射によって誘起されることが1959年米国の Chaet and McConaughy によってたまたま発見され、これが棘皮動物の生殖生理学における内分泌的研究の糸口となった。またこの発見によりはじめて確実なヒトデの採卵法が確立され（Chaet and Musick, 1960; Chaet, 1964a），多量の材料を発生生物学者に提供できることになった。Chaet らは神経内に含まれるこの活性物質を配偶子放出物質（gamete-shedding substance）と名付けた（Chaet and Rose, 1961）。Chaet たちの発見以来、1962年から日本では筆者らのグループ；また少しおくれて米国では Johns Hopkins 大学の Schuetz らのグループがヒトデの放卵および卵成熟の機構に関して研究を続けている。1967年、この物質は生殖巣に作用して、第二次物質を生成し、これが配偶子放出および卵成熟を誘起する直接的な引き金物質であることが

明らかになり（Schuetz and Biggers, 1967；Kanatani and Shirai, 1967），こうした問題の解析は新たな局面を迎えることとなった（Kanatani, 1969）。そこで神経由来の活性物質は生殖巣刺激物質（gonad-stimulating substance, GSS），二次物質は成熟分裂誘起物質*（meiosis-inducing substance, MIS）と呼ばれることになった（Kanatani and Shirai, 1967；金谷, 1967）。

この総説ではこのGSSとMISの研究を通じてなされたヒトデの配偶子放出および卵成熟機構の解析について述べることとする。便宜上2部にわけ第一部では主としてGSSの問題について、第二部ではMISならびに総括的な問題を取扱うこととするが、両者の関係は密接しており、それぞれ独立な総説ではない。

* 成熟分裂誘起物質という名前は本当は正しくない。はじめ成熟誘起物質と名付けることも考えたが、成熟という場合、卵巣の成熟とか個体の成熟というようにも使用され、言葉の意味が曖昧であるためあえて成熟分裂誘起物質と呼んだのである。しかし、実際には成熟分裂の前期はすでにはじまっているので、正しくは、一時休止の成熟分裂を再開させる物質というべきであるが名前として煩雑すぎる。その後、後述〔II部〕するように、成熟分裂の逐行とは別にこの物質が卵を受精可能な状態に成熟させる作用をもつことも明らかになり、結局、やはり卵成熟誘起物質（Maturation-inducing substance, MIS）と呼ぶことにした（Kanatani and Shirai, 1972）。

1. 配偶子放出および卵成熟を支配する神経物質

放射神経にGSSが存在し、神経の水抽出物の注射によって配偶子の放出を誘起できたヒトデは現在までのところ約30種に達している(表1)。筆者らの試みたかぎり例外はなかったので、GSSはひろくヒトデ綱に存在するものと考えてよい。

ヒトデのGSSを異種間で作用させてみると大体において種特異性は認められないが例外もある(Hartman and Chaet, 1962; Noumura and

表 1. GSSの存在が判明しているヒトデ
(Kanatani, 1973)

Family	Species
Astropectinidae	<i>Astropecten armatus</i> <i>Astropecten scoparius</i> <i>Astropecten aurantiacus</i> <i>Luidia quinaria</i>
Luidiidae	<i>Mediaster aequalis</i>
Goniasteridae	<i>Ceramaster placenta</i>
Ophidiasteridae	<i>Certonardoa semiregularis</i>
Asterinidae	<i>Asterina pectinifera</i> <i>Patiria miniata</i>
Echinasteridae	<i>Echinaster echinophorus</i> <i>Henricia leviuscula</i> <i>Henricia nipponica</i> <i>Henricia sanguinolenta</i> <i>Poraniopsis inflata</i> <i>Heliaster kubinjii</i>
Poraniopiidae	
Heliasteridae	
Asteriidae	
Coscinasteriinae	<i>Coscinasterias acutispina</i> <i>Marthasterias glacialis</i> <i>Orthasterias koehleri</i>
Pycnopodiinae	<i>Pycnopodia helianthoides</i>
Asteriinae	<i>Aphelasterias japonica</i> <i>Asterias amurensis</i> <i>Asterias forbesi</i> <i>Asterias vulgaris</i> <i>Evasterias troschelii</i> <i>Leptasterias hexactis</i> <i>Pisaster brevispinus</i> <i>Pisaster giganteus</i> <i>Pisaster ochraceus</i>

Kanatani, 1962; Chaet, 1966a,b; 金谷, 1967)。例えばイトマキヒトデ (*Asterina pectinifera*) のGSSはモミジガイ (*Astropecten scoparius*), スナヒトデ (*Luidia quinaria*), ヤツデヒトデ (*Coscinasterias acutispina*), *Marthasterias glacialis*, ヒトデ (*Asterias amurensis*) に有効であるが、ヒトデ, エゾヒトデ (*Aphelasterias japonica*), モミジガイのGSSはイトマキヒトデには無効である。

Strathmann and Sato (1969)によればヒトデの1種 *Pycnopodia helianthoides* の神経抽出液がナマコ (*Parastichopus californicus*) の卵核胞崩壊をおこさせる。最近ウニ (*Strongylocentrotus purpuratus*) でも放射神経抽出液がウニやヒトデの配偶子放出を誘起したという報告がある(Cochran and Engelmann, 1972)。筆者らの研究ではウニの放射神経試料には後述の1-メチルアデニンが含まれており、ウニの配偶子放出はさておくとしても、ウニ神経抽出物によるヒトデの放卵はこの物質によるものと考えている(未発表)。

放射神経抽出液をえるには、摘出した神経を蒸溜水に浸しておくだけでも抽出されてくるが、適切な方法としては、まづ凍結乾燥し、これを小量の蒸溜水でホモジナイズし、遠心した上清を海水または0.5M NaClで希釈して用いるとよい(大体乾燥神経30μg/mlで確実に有効)(Kanatani and Ohguri, 1966)。また乾燥神経を一旦アセトン粉末にしたり、ホモジェネートを100°Cで15分から30分加熱するのもよい。もう少し厳密には以上の処理をしてからセファデックスG-25のカラムでゲル濾過すれば高分子部分と共に溶出されてくる。まづセファデックスG-50カラムにかけてGSSを低分子分画に溶出させ、さらにG-25カラムにかけるとより精製されたものがえられる(Kanatani and Noumura, 1962; Chaet, 1964a; 金谷・能村, 1964; Kanatani et al., 1971)。

1-1. GSSの生理作用

ヒトデの放射神経の水抽出液を産卵期にある個体の体腔に注射すると雄では約30分以内、雌で1時間以内に精子または卵を放出する(Chaet and McConaughy, 1959; Noumura and Kanatani, 1962)が、多くの実験は *in vitro* で遊離卵巢片を用いて行われた(Chaet et al., 1964; Kanatani, 1964; Kanatani and Ohguri, 1966)。その理由は海水中に切りだした長さ5~10mmの卵巢片で

充分放卵の誘起が観察できるし、またこの大きさに切った場合、一匹の雌から数百の卵巣片をえることができて活性物質に対する感受性の個体差にもとづくばらつきがなくなることによる。普通GSSの有効最低濃度は乾燥神経 3~12 µg (時に 25 µg)/ml である (以後神経抽出物を含む海水をGSS海水と呼ぶ)。

切口を糸でしばって放卵がおこらないようにした卵巣片をGSS海水で処理するとなかの卵は成熟分裂を行い極体を放出して成熟卵になる。一方海水中に放置した対照では卵成熟がおこらない (Kanatani, 1964; Chaet, 1966 a, b)。このことはGSSが配偶子放出をおこさせるだけでなく卵成熟も誘起することを示している。GSSによって成熟した卵は媒精すると高い受精率を示し (Chaet and Musick, 1960; Kanatani and Noumura, 1962), その後正常に発生する (Schuetz, 1969)。卵巣1箇をとりだし、先の部分をGSS海水に、根元の方 (この部分に生殖管があり生殖孔に開口している) を海水にひたしておき、40分後、卵巣の各部分から卵をとりだして検鏡するとGSS処理した部分にかぎって卵成熟がおこっており、またピンセットで卵巣の所々に小さな傷をつけておくと、GSS処理した部分にかぎって著しい卵の放出がみられる (Kanatani, 1964; Kanatani and Shirai, 1969)。したがってGSSは局部的に直接卵巣に作用すると考えられる。恐らく正常の場合、体腔液中に放出されたGSSがそこにぶらさがっている卵巣の表面から内部に入つて働くと考えられる。

GSSによって誘起される放卵の機構について Chaet (1966 a) は神経抽出液に収縮因子が存在し、その作用で卵巣の筋肉が収縮して卵がおしだされると考えた。さらに Mecklenberg and Chaet (1964) は Ca 欠除海水中ではGSSがあっても遊離卵巣片の放卵がおこらないことをみた。これらの卵巣片を正常海水にもどすとほげしい放卵がおこる。GSSが収縮因子であるとする Chaet の説は極めて常識的であるが、筆者には次の理由で納得がいかない。(1) ウニと違って、ヒトデでは KCl やアセチルコリン、または電気刺激などの収縮要因は有効な採卵方法でない (Kanatani, 1967; 金谷, 1967; Kanatani and Shirai, 1969)。(2) ヒトデの卵巣壁のプレパレーションをつくり、キモグラフに収縮を書かせると、上記の処理で卵巣壁は収縮する。また GSS海水によっても収縮するが、これは低分子性の夾雑物 (例えばアセチルコリンなど (Unger,

1962)) が神経抽出液に共存しているからであって、セファデックスG-25カラムでゲル濾過したGSS試料には卵巣壁を収縮させる効力はない (この試料は勿論強い放卵活性をもっている) (Kanatani, 1967; Kanatani and Shirai, 1969)。筆者らの説 (Kanatani, 1964; Kanatani and Shirai, 1969)によればGSSによる放卵は、卵を囲む濾胞層が崩壊することによっておこる。これは卵と卵、卵と卵巣壁を濾胞層を介してくっついている結合物質がGSSの作用によって溶解することが原因と考えられる。この考え方の根拠となった観察として (1) 上述の如く、収縮因子処理が放卵のための確実な方法たりえないこと。(2) GSS処理した卵巣では濾胞層が崩壊すること (Kanatani, 1967; Schuetz and Biggers, 1968)。(3) 卵巣のごく小さな房をピンセットでつつくと壁が破れて、卵巣壁が途端に収縮し、内の卵塊が外にでて所謂裏返し卵巣房となるが、卵塊は海水中で個々の卵が濾胞層を介してくっつきあっていること (金谷, 1967)。(4) GSS海水中ではこうした卵巣房はつかれなくとも切口から卵が一定時間後に放出され、それらの卵はもはやくっつきあうことなく、さらさらしており、勿論濾胞層をもたないこと (Kanatani and Shirai, 1969)。などがあげられる。もし上述の考え方が正しければGSSを用いなくとも濾胞層を崩壊させる手段を用いればヒトデの放卵を誘起できる筈であるが、実際、Mg欠除海水中に卵巣片を放置するとやがて放卵がおこるし、Ca欠除海水で40分位処理し、濾胞層を崩壊させてから正常海水にもどすと、直ちにはげしい放卵がおこる (Kanatani, 1964; Kanatani and Shirai, 1969; Shuetz and Biggers, 1968)。このことは濾胞細胞—卵—卵巣壁を結合している物質が通例の細胞間結合物質と同じカテゴリーに属するもの (多分ムコ多糖) であって、これが2価陽イオンの欠除によって溶解したと考えられる。Ca欠除海水で放卵がおこらないのは、放卵が實際におこるためには卵巣壁の収縮が必要であることを示しているが、この卵巣壁の収縮 (多分卵が一杯つまつて張りきっている卵巣壁自身の張力による) の前提条件となるのは結合物質の溶解にともなう濾胞層の崩壊なのである。要するにヒトデでは卵巣内の卵がくっつきあっているため卵巣壁が収縮できない状態にあり、もしこれをばらばらにすれば、放卵が可能となり、そうなった時には KCl などの添加はよりほげしい卵巣壁の収縮をうながし、放卵の程度もほげしくなる。

ヒトデ濾胞の結合物質はヒアルuronsulfatase, 脱リブン酸, エラスターーゼ, ニューラミダーゼなどの酵素処理に対して抵抗性がある (Kanatani and Shirai, 1969 および未発表)。ここで特にことわっておきたいのは、さきにも少し述べたが、GSSによる放卵や卵成熟は実はGSSの間接作用であり、実際にはGSSによって卵巢で生成された卵成熟誘起物質 (MIS) の作用によっておこるということである。

1-2. GSSの分布

GSSは雌雄を問わず放射神経に存在しており (Chaet and McConaughy, 1959; Kanatani and Noumura, 1962; Kanatani and Ohguri, 1966), 乾燥神経重量あたりのGSS含有量を卵巢片を用いて生物検定すると雌雄において差が認められない (Chaet, 1966a; Kanatani and Ohguri, 1966)。したがって雄で放精をおこさせる因子と、雌で放卵をおこさせる因子は同一のGSSであると考えてよい。このことは単離精製したGSSが雌雄に同じように有効であることから確かめられた。Noumura and Kanatani (1962) はアカヒトデやヤツデヒトデの放射神経を生殖期でない時期にとりだし、これがGSSを含むことを明らかにした。Moore and Biggers (1964) も成熟した雌と雄、およびすでに配偶子を放出した個体との間でGSS活性にはさしたる変化がないと報告している。Chaetらは *Asterias forbesi* から放射神経を毎月、2年にわたって摘出し、凍結乾燥試料とし、これを同時に検定したところ、年間を通じてGSSの含有量には変化がみられなかつたと報告している (Chaet and Smith, 1962; Chaet, 1966a)。もっともこの場合、神経抽出液を倍々希釈したものについて生物検定をしたのであるから、年間を通じてGSSが存在することは間違いないが、その量には少し差があつても彼等の方法では検出不可能である。

放射神経以外の体部にGSSが存在するかどうかについて Chaet (1966a) は消化管、管足、体表、体腔液、生殖巣、幽門盲嚢の温海水抽出液にはGSS活性が認められないと報告した。しかし Kanatani and Ohguri (1966) はヒトデの体表および管足には放射神経ほどではないが担当量のGSSが含まれていることを明らかにした。その他噴門胃にもGSS活性が認められた。しかし幽門盲嚢の抽出液には配偶子放出能力はなかつた。Atwood and Simon (1971) は最近、*Asterias forbesi* を用いて

Kanatani らの結果を追試し、確認した。GSSの体内における分布をみると神経がよく発達している組織なり器官にGSS含量が多い。周口神経環—放射神経の系ではどの部分をとってみても乾燥重量あたりのGSS含有量は同じであった (Kanatani and Ohguri, 1966)。

体腔液についてみると自然放卵を行っているヒトデの体腔液にかぎってGSSが含まれている (Kanatani and Ohguri, 1966; Kanatani and Shirai, 1969)。しかしその時放卵していないヒトデではその生殖巣の状態がどうであろうと体腔液中にGSSは検出されない。放卵中のヒトデに限って体腔液中にGSSが放出されていることは、今までのところGSSがホルモンであると考えられる唯一の根拠となっている。

Marthasterias glacialis の周口神経環および放射神経について Unger (1962) は Gomori のクロムアラムヘマトキシリン・フロキシン法や Gabe のパラアルデヒド・フクシン法などの神経分泌染色をほどこした。その結果、これらの神経には上記の方法でよく染まる顆粒を含む両極性および多極性の神経細胞が多数存在することを見出した。さらに放射神経の外側にあるクチクラ層のすぐ内側にある支持細胞層もこれらの色素に強く染まる顆粒にみたされている。Bargmann et al. (1962) は支持細胞内のこの分泌顆粒は、ムコ多糖、グリコリビド、グリコゲンを含んでいるからクチクラ形成における材料物質であるとしたが、何ら実験をともなわないこうした決論は大して意味をもたない。Imlay and Chaet (1967) は神経分泌染色で染まる物質が顆粒の形で *A. forbesi* の3つの異なる部分に存在していると報告した。彼等は神経分泌らしい顆粒 (直径 1~2 μ) を放射神経の腹側層 (支持細胞層に相当すると考えられる) に検出し、これらの顆粒がGSSを含む可能性を示唆した。Atwood and Simon (1971) は好フクシン性顆粒 (1~2 μm) が *Echinaster echinophorus* や *Patiria miniata* の放射神経の表皮下神経叢に存在し、また同様な顆粒が管足、体表、噴門胃の表皮下神経叢にみられるが、幽門盲嚢の口側および反口側の壁にある顕著な神経叢にみられないことを明らかにし、この顆粒の存在とGSSの存在との関連性を示唆している。

de Angelis et al. (1972) はイトマキヒトデの放射神経からGSSを含む顆粒を取りだし、この顆粒の電顕像と放射神経の電顕像との比較からGSS顆粒の放射神経内における存在部位を明らかにしよ

うと試みた。差次遠心法および蔗糖密度勾配超遠心法によって放射神経のホモジエネートから高いGSS活性を示す顆粒分画を取りだしたが、これらは支持細胞層に存在する顆粒とよく似ており、GSS顆粒は支持細胞に存在していると結論された。また顕微手術法によって支持細胞層を摘出して調べたところ高いGSS活性がみられたことはこの結論を支持する(Uter, 1967; de Angelis et al., 1972)。Uter(1967)はさらに放射神経のクチクラ層、Langeの神経、血洞、体腔上皮層にはGSS活性がないと報告している。

GSSが放射神経から生殖巣に達する道筋についてのChaet(1966b, 1967)の考えは次のようなものである。この物質が放射神経の表面(海水に面している)から海水中に放出され、もし域値より低濃度にうすめられなければ、そばにいるヒトデの配偶子放出を誘起する。域値レベル以上のGSSはこれを放出したヒトデの体腔に運ばれその生殖巣を刺激する。放卵しているヒトデから放出されたGSSはそばにいるヒトデの体腔に吸収され、その生殖巣を刺激する。このようにして近所にいるヒトデは多少とも同時的に放卵をおこす。また管足はアミノ酸を海水中からとり込むので、おそらくGSSも海水中から管足によってとり込まれると言う。彼の考えはGSSがホルモンではなくフェロモンとして働くことを示しているので非常に興味深いが、実際に種々の濃度のGSS(25~200 μg乾燥神経/ml)を含む海水にヒトデを入れてみても放卵はおこらない。しかしこれらのヒトデにGSSを注射すると例外なく放卵をおこす。一方、腕に少し傷をつけておくとその隙間からGSSが入り込み放卵がおこる(金谷・白井, 1968; Kanatani and Shirai, 1969)。

Chaetの考えとは別にUnger(1962)は支持細胞内にある好フクシン性顆粒が支持纖維に沿って背方に移行しつつあると思われる光顯像から分泌物質はこうした径路をとおって放射血洞など血洞系を通り(水管系にも入り)生殖巣のある体腔に達すると考えている。筆者はUngerの考えの方が妥当であると思う。

1-3. GSSの化学的性質

(A) 熱安定性 GSSは比較的熱に安定で *Asterias forbesi*では100°Cで20分処理しても僅かに失活するのみである(Chaet and Rose, 1961)。日本産のヒトデ(*A. amurensis*)でも100°C1時間の熱処理でさしたる失活はみられないが120°C

で1時間オートクレーブにかけると大部分の活性がなくなる(Kanatani and Noumura, 1962)。熱安定性の問題はその後再び Chaet(1966a, b, 1967)によって取りあげられ、今度はむしろ熱に弱いとされた。その根拠として神経抽出液を室温で18時間、5~7°Cで7日間放置すると失活がみられることをあげている。白井・金谷(1968)は、この原因がGSSの熱に対する不安定性にあるのではなく多分細菌によるGSSの分解またはホモジエネート中の蛋白分解酵素による自己分解(autolysis)の結果と考え、あらかじめ熱処理して滅菌し、さらに滅菌した状態でGSSを放置したところ室温で23日間(実験はそこで中止した)活性のおとろえが認められなかつた。対照として滅菌しない場合、23°Cで24時間以内に失活した。また、n-ブタノール(1-2%)を殺菌剤として用いると失活を防ぐことができる。そのもの自身は熱に安定なものであってもペプチド性のホルモン物質をとりあつかう場合、こうした点での注意を充分払う必要のあることをこの実験は教えている。GSSは-20°Cに凍結しておくかぎり非常に安定で何年でも失活しない。

(B) 可溶性。GSSは水にはよく溶けるがクロロホルム、エーテル、アセトン、エタノールなどの有機溶媒には不溶である。80%エタノールには相当溶ける(Chaet and Rose, 1961; Kanatani and Noumura, 1962)。したがって粗試料としては凍結乾燥した神経をアセトン粉末やエーテル粉末などにしておくことができる。

(C) 透析・ゲル濾過 *Asterias*のGSSはセロファン膜を通過する(Chaet and Rose, 1961; Kanatani and Noumura, 1962)。セファデックスのカラムによるゲル濾過によるとG-25では高分子分画に溶出されるが、G-50では低分子無機塩類の手前で溶出される(金谷・能村, 1964)。したがって、神経抽出液をG-50とG-25のカラムに一回づつ通すことによって比較的純度のよい試料を簡単にえることができる(但し、蒸溜水で溶出するとセファデックスに吸着する傾向があるから適当な緩衝液または塩類溶液(例えは食塩水)を用いる必要がある)。

(D) 蛋白分解酵素の影響。GSSはトリプシン、キモトリプシン、ペプシン、プロナーゼなどの蛋白分解酵素処理によって失活する(Kanatani and Noumura, 1962; Chaet, 1964b; Kanatani and Shirai, 1967; Schuetz, 1969)。Chaet(1966a)によれば0.2%ニンヒドリンを加えることによって

GSSの失活がみられる。これらのこととはGSSがペプチド性ホルモンであることを示している。既知のペプチドホルモンや神経ホルモンでヒトデの放卵が誘起されるかどうかが調べられたが、オキシトシン、バソプレッシン、LH, FSH、アセチルコリン、4-アミノ酪酸、dl-2-アミノ酪酸などすべて無効であった (Chaet and Rose, 1961; Moore and Biggers, 1964; Kanatani, 1967)。

(E) GSSの精製。金谷・能村 (1964) は *Asterias amurensis* のGSSの精製を試み、486匹のヒトデから放射神経をとりだし、セファデックスG-50 およびG-25カラムによるゲル濾過とディスク電気泳動法によって乾燥神経試料と較べて100倍の比活性をもつGSS試料を得た ($0.2 \mu\text{g}$ で1匹のヒトデの放卵を誘起)。その後 Kanatani (1967) は2000匹のヒトデを用いてセファデックスカラムによるゲル濾過、DEAEセファデックスによるイオン交換クロマトグラフィーによって $0.03 \mu\text{g}/\text{ml}$ で遊離卵巣片の放卵を誘起する試料を得た。一方 Chaet (1967) は *Patiria miniata* の放射神経を材料とし、50%アセトン抽出、セファデックスG-50 およびG-25カラムによるゲル濾過、フリークロマト電気泳動などによって 3.4 g の乾燥神経から 1.3 mg のGSS試料を得た。比活性は383倍に高まつたといふ。この試料をアミノ酸分析にかけて次のようなアミノ酸残基比を得た: グルタミン酸(7), アスパラギン酸(6), アラニン(4), グリシン(3),

アルギニン(3), セリン(3), ロイシン(3), シスチン(2), プロリン(2), バリン(2), スレオニン(2), チロシン(1), リジン(1), イソロイシン(1), フェニールアラニン(1), ヒスチジン(1)。このデータに基づいて彼はGSSが約42のアミノ酸残基からなり、その結果これを基にして分子量を4800と計算した。この分子量は、以前に彼がニンヒドリン反応から得た値 (Chaet, 1966a) の2倍近いといふ。この点に関して筆者は以下に述べる精製実験の結果とにらみあわせて、Chaetがニンヒドリン反応からえた分子量の推定の方が、アミノ酸分析から割りだしたものより正しいと考えている。Kanatani et al. (1971) は約7400匹の *A. amurensis* からえた放射神経の凍結乾燥試料をアセトン粉末とし、0.01 M NaCl (80°C ~ 90°C) でGSSを抽出し、種々のサイズのセファデックスカラム (G-50 およびG-25) によるゲル濾過とDEAE-セファデックスカラムによるイオン交換クロマトグラフィーによって 70 g の乾燥神経から 1.3 mg の精製GSSを得た (図1)。これは $0.0096 \mu\text{g}/\text{ml}$ で遊離卵巣の放卵を誘起した。出発材料としての乾燥神経は $6.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ で有効であったから比活性は約700倍高まつたことになる。この試料について超遠心による沈降平衡法を用いて分子量を測定すると偏比容 (V) を仮に 0.70 ml/g としたとき 2200 という値をえた。また回転半径に沿った分子量分布をみるとよく一致しており、得られた精製試料は沈降平衡的に均一であ

図1. *Asterias amurensis* のGSS精製過程

ることを示した。一方、この試料を加水分解してアミノ酸分析を行うとGSSは約22のアミノ酸残基よりなり、その組成は次の通りとなる：アスパラギン酸(2), スレオニン(1), セリン(6), グルタミン酸(1), プロリン(1), グリシン(4), アラニン(2), バリン(1), イソロイシン(1), ロイシン(1), ヒスチジン(1), オルニチン(1)。このアミノ酸残基構成からGSSの偏比容を計算すると 0.693 ml/g となり、これを用いて分子量を計算しなおすと2100となる。一方アミノ酸分析から得られたGSSの分子量は2066となり両者はよく一致する。精製の段階でGSS分子が分解していないかどうかを検討するために粗GSS(神経抽出液の遠心上清)をセファデックスG-50カラムにかけ、GSSの溶出位置を生物検定によって決定し、ゲル濾過によって分子量を推定すると2000と2300の間であるという結果が得られたので、精製過程でGSS分子の分解はおこっていないと考えられる。以上のアミノ酸組成から見て、ペプチドホルモンとしてのGSSの特徴はシスチン、システイン、メチオニンを含まないことであり、また別の測定からトリプトファンも含まないことが判明した。別に7100匹のヒトデから得た放射神経を材料として上述の精製における幾度ものゲル濾過の代りにn-ブタノール-ピリジン-0.1%醋酸(3:1:3)を用いた2段階の分配クロマトグラフィーを行って 0.1 mg の精製試料を得たがそのアミノ酸組成も上述の結果とよく一致した。この試料を用いて測定したヒトデGSSの等電点は約4.5であった。ここに得られた精製GSSはごくわずかであるが、チロシン、フェニールアラニン、リジン、アルギニンを含むペプチドが混在していた。GSSのアミノ酸配列を求めるためにはさらに多量の材料を用いた精製が必要と考えられる。

1-4. GSS作用を阻害する因子

Chaet(1966a,b)によれば、GSSの放卵活性に拮抗する物質が放射神経内にあると考え、これをShedhibinと呼んだ。その根拠となった観察は次のようなものである：(1) *Patiria miniata*の神経抽出液は高濃度になると放卵活性が低下するが、このことは生殖期にあるヒトデから神経をとりだした場合にかぎられ、放卵後または未熟の個体から得た神経抽出液は濃度に関係なく有効である；(2) 成熟した個体の神経抽出液をセファデックスG-25カラムにかけて分画するとGSSの存在下でも放卵を抑制する分画(ペプチドと想定される)が得られる

(この実験は一定量のGSSを含む海水に各分画を加え、ある分画を加えたとき放卵がおこらないというものであり、後に述べる筆者たちの追試実験と関係がある)；(3) 非常に成熟したヒトデから取りだした卵巣片は単に海水中でも時々、GSSなしに放卵するが、こうした卵巣片を抑制物質を含む海水におくと放卵がおこらない。これらの観察および実験から彼はGSSは年間を通じて神経内に同じ量だけ存在しているが(Chaet and Smith, 1962), Shedhibinは生殖期に増加し、これが放卵の時期を支配すると考えた。

金谷・白井(未発表)はこの問題に興味を持ち、彼の用いた*Patiria miniata*と近縁のイトマキヒトデを材料として追試実験を行った結果、そのような物質の存在を想定する必要はないことを明らかにした。たしかにイトマキヒトデの神経抽出液の濃度を高めると卵巣片の放卵は抑制される。しかしこのことは放卵後の個体や生殖期以前の未熟の個体から得たGSSでも同じであった。さらに比較的高濃度の放射神経抽出液を人工海水で平衡化したセファデックスG-25カラムにかけて、その各分画を希釈することなく卵巣片で生物検定すると、GSS活性は隣接した2つのピークとなって得られる。この2つのピークの間の分画では放卵はおこらない。これがChaetの言うShedhibinの分画に相当するが、この分画を希釈すると著しい放卵活性を示す。したがって、各分画を適当に希釈して生物検定すると逆に彼の言うShedhibinの分画をピークとするGSS活性の单一の大きなピークが得られる。また希釈しない分画に卵巣片を放置して放卵がおこらない場合、1時間後に卵巣内の卵を検鏡すると、すべて卵核胞を消失していた。普通、卵巣内の卵の卵核胞の消失はまれで、消失率もきわめて低いものである。また精製したGSS試料についてその濃度を高めて行くと高濃度では放卵活性がみられない。したがってChaetの考えたShedhibinの分画は、実は最もGSSの濃度の高い分画であり、これを一定量のGSSを含む試験液に加えれば当然GSSの濃度が高まり、放卵が抑制されると考えられる。現在のところ高濃度によるGSSの放卵抑制作用の機構は不明であるが、筆者らは高濃度のGSSが恐らく卵巣壁の収縮を阻害して放卵を抑制していると考えている。もしShedhibinなるものが存在せず、これが筆者らの主張するように高濃度のGSSによる放卵阻害であれば、皮肉なことであるが、彼の主張したGSSの放射神経内での含有量が年間を通じて

一定であるということの土台がゆらいでくる。前述のようにGSSが年間を通じて存在していることは事実であるが(金谷・白井の未発表の追試による),含有量が一定であるという彼の根拠は倍々希釈による生物検定であるから、生殖期に増加しても2倍以下であれば検出は不可能で一定ということになるのである。

しかし一方、所謂 Sheddibin とは別に卵巣や精巣にGSS作用を阻害する物質が含まれていることは確かである。Ikegami *et al.* (1967) はヒトデ生殖巣の水抽出液中にGSSの放卵作用を抑制する物質を見出した。卵巣や精巣を水でホモジナイズした上清にふくまれているこの抑制物質は最初イトマキヒトデの精巣を材料として精製された。方法としては凍結乾燥した精巣のアセトン粉末を出発材料として種々のサイズのセファデックスG-25, G-15, G-10によるゲル濾過およびDEAE・セファデックスカラムによるイオン交換クロマトグラフィーを用い、最後にエタノールを加えて結晶を得た。精製物質は20 µg/ml のGSS(乾燥神経重量/ml)の作用を4.4~44 µg/ml(生物検定する個体によって異なる)の濃度で阻害した。この物質はまづ薄層クロマトグラフィーにおいてニンヒドリン陽性のスポットとして捕えられ、L-グルタミン酸であると同定され、さらにアミノ酸自動分析、赤外吸収スペクトル、核磁気共鳴、旋光度測定などで確められた。種々の市販アミノ酸について放卵抑制活性をしらべるとL-グルタミン酸(5~50 µg/ml で有効)の他にL-アスパラギン酸に前者の1/10に相当する活性が見られた。また上記の濃度のグルタミン酸は、正常な精巣および卵巣に存在している遊離のL-グルタミン酸量で充分まかなえるものであった(Ikegami, *et al.*, 1967; Ikegami and Tamura, 1972)。

さらに卵巣または精巣の抽出液をL-グルタミン酸脱水素酵素で処理すると放卵抑制活性は失われるからイトマキヒトデ生殖巣における主たる放卵抑制物質はL-グルタミン酸であると結論される(Ikegami and Tamura, 1972)。

しかしグルタミン酸はヒトデ *A. amurensis* の放卵については抑制作用を示さない。そこで Ikegami *et al.* (1972) はヒトデの卵巣を材料としてそのなかに含まれている別種の放卵抑制因子の精製を行った。80% アセトン抽出、酸性ブタノールへの分配、セファデックスG-50, G-25カラムによるゲル濾過、DEAEセファデックスカラムによるイオン交換クロマトグラフィー、クロロホルム・メタノー

ル・醋酸による分配カラムクロマトグラフィーによって2種の放卵抑制因子が得られている。この2つの物質はともに溶血作用をもち、また水と混ぜるとよく泡立つところからサボニン様の物質と考えられた。紫外吸収特性、赤外吸収スペクトル、薄層クロマトグラフィー等により、この2つの抑制因子はそれぞれ、Yasumoto and Hashimoto (1965, 1967) がヒトデに含まれる有毒物質として単離したアステロサボニンAおよびBにあたると同定された(Ikegami *et al.*, 1972)。アステロサボニンAは12.5~125 µg/mlで、アステロサボニンBは63~125 µg/mlで乾燥神経 10 µg/ml の濃度の神経抽出液の放卵活性を阻止する。しかし、これらの物質はイトマキヒトデの放卵を抑制しない。また各種の表面活性剤；ナマコからとりだしたサボニンであるホロスリソニンA, B; 植物性サボニン、ウワバインなどにはヒトデにおける放卵抑制活性を示さないのでアステロサボニンA, Bの放卵抑制作用はかなり特異的なものと考えられている(池上, 1972)。こうした放卵抑制物質が実際にヒトデ類の放卵をどのように支配しているかどうかは興味のあるところであるが適切な解決は将来の問題である。

文 献

- ATWOOD, D. G. AND J. L. SIMON (1971) *Amer. Zool.* 11: 701.
 BARGMANN, W., M. VON HARNACK AND K. JACOB (1962) *Z. Zelforsch. Mikrosk. Anat.* 56: 573-594.
 CHAET, A. B. (1964a) *Biol. Bull.* 126: 8-13.
 CHAET, A. B. (1964b) *Tex. Rep. Biol. Med.* 22: 204-000.
 ——— (1966a) *Biol. Bull.* 130: 43-58.
 ——— (1966b) *Amer. Zool.* 6: 263-271.
 ——— (1967) *Echinoderm Biology*, Symp. Zool. Soc. London, Vol. 20, Academic Press, New York, p. 13-24.
 ——— AND R. A. McCONNAUGHEY (1959) *Biol. Bull.* 117: 407.
 ——— AND R. S. MUSICK, JR. (1960) *Biol. Bull.* 119: 292.
 ——— AND R. A. ROSE (1961) *Biol. Bull.* 121: 385-386.
 ——— AND R. H. SMITH (1962) *Amer. Zool.* 2: 511.
 ———, P. M. ANDREWS AND R. H. SMITH (1964) *Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp.*

- Biol. 23: 204.
- COCHRAN, R. C. AND F. ENGELMANN (1972) Science 178: 423-424.
- DE ANGELIS, E., A. VIGLIA, T. WATANABE, H. SHIRAI, J. KUBOTA AND H. KANATANI (1972) Annot. Zool. Japon. 45: 16-21.
- 福田宗一 (1966) “現代の生物学” 7卷 岩波書店、東京, pp. 123-165.
- HARTMAN, H. B. AND A. B. CHAET (1962) Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., 21: 363.
- 池上 普 (1972) 化学と生物 11: 336-343.
- IKEGAMI, S., S. TAMURA AND H. KANATANI (1967) Science 158: 1052.
- AND S. TAMURA (1972) Agr. Biol. Chem. 36: 1899-1902.
- , Y. KAMIYA AND S. TAMURA (1972) Agr. Biol. Chem. 36: 2005-2011.
- IMLAY, M. J. AND A. B. CHEAT (1967) Trans. Amer. Microsc. Soc. 86: 120-126.
- KANATANI, H. (1964) Science 146: 1177-1179.
- (1967) Gunma Symp. Endocrinol. 4: 65-78.
- 金谷晴夫 (1967) 実験形態学誌 21: 61-78.
- (1969) Gen. Comp. Enocrinol. Suppl. 2: 582-589.
- 金谷晴夫 (1973) 海洋学講座 8卷 東京大学出版会、東京, pp. 171-187.
- (1973) Intern. Rev. Cytol. 35: 253-298.
- AND T. NOUMURA (1962) J. Fac. Sci. Univ. Tokyo, Sec. 4, 9: 403-416.
- 金谷晴夫・能村哲郎 (1964) 動物学雑誌 73: 65-69.
- KANATANI, H. AND M. OHGRI (1966) Biol. Bull. 131: 104-114.
- AND H. SHIRAI (1967) Nature 216: 284-286.
- 金谷晴夫・白井浩子 (1968) 動物学雑誌 77: 207-212.
- KAANATANI, H. AND H. SHIRAI (1969) Biol. Bull. 137: 297-311.
- AND —— (1970) Develop., Growth and Different. 12: 119-140.
- AND —— (1972) Gen. Comp. Endocrinol. Suppl. 3: 571-579.
- , S. IKEGAMI, H. SHIRAI, H. OIDE AND S. TAMURA (1971) Develop., Growth and Different. 13: 151-164.
- MECKLENBERG, T. A. AND A. B. CHAET (1964) Amer. Zool. 4: 414.
- MOORE, D. AND J. D. BIGGERS (1964) Biol. Bull. 127: 381-382.
- NOUMURA, T. AND H. KANATANI (1962) J. Fac. Sci. Univ. Tokyo, Sec. 4, 9: 397-402.
- SCHUETZ, A. W. (1969) Gen. Comp. Endocrinol. 12: 209-221.
- AND J. D. BIGGERS (1967) Exptl Cell Res. 46: 624-628.
- AND —— (1968) J. Exp. Zool. 168: 1-10.
- 白井浩子・金谷晴夫 (1968) 動物学雑誌 77: 128-130.
- STRATHMANN, R. R. AND H. SATO (1969) Exptl. Cell Res. 54: 127-129.
- UNGER, H. (1962) Zool. Jahrb., Abt. Allg. Zool. Physiol. Tiere 69: 481-536.
- UTER, A. O. (1967) M. A. Thesis, American University, Washington D. C.
- YASUMOTO, T. AND Y. HASHIMOTO (1965) Agr. Biol. Chem. 29: 804-808.
- AND —— (1967) Agr. Biol. Chem. 31: 368-372.