

ふりがな いたう なおこ  
氏名 伊藤 尚子  
学位 博士 ( 理学 )  
学位記番号 新大院博 ( 理 ) 第287号  
学位授与の日付 平成 20年 3月 24日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
博士論文名 **Studies on the biologically active molecules in the buccal gland secretion of a parasitic lamprey, *Lethenteron japonicum***  
(寄生性無顎類 *Lethenteron japonicum* 口腔腺分泌液の生理活性分子の研究)

論文審査委員  
主査 教授 小谷 昌司  
副査 教授 渡辺 勇一  
副査 教授 内海 利男  
副査 教授 細野 正道  
副査 教授 大西 耕二

#### 博士論文の要旨

脊椎動物や無脊椎動物の唾液腺、毒腺、皮膚腺などの分泌液には血液凝固阻止や神経毒、細胞毒その他の顕著な生物活性を示すタンパクやペプチドから低分子化合物にいたる多彩な分子が含まれている。吸血性の寄生種であるヤツメウナギ類は口腔腺をもち血液凝固阻止活性のある口腔腺液を分泌することが知られている。本論文では、カワヤツメの口腔腺分泌液の生理活性分子の探究をおこなった。分泌液はSephacryl S-200をもちいたゲル濾過により粗分画をおこない、さらに逆相クロマトグラフィーや調製用電気泳動などで精製した。そのタンパク組成は160 kDaおよび26 kDaのタンパクを主要な成分とし、その他に10種前後のタンパクが少量成分として認められた。また360 nmに強い紫外吸収を示す低分子を見いだした。160 kDaタンパクについては、アミノ酸組成とペプチドの部分アミノ酸配列からこれがカワヤツメの血漿アルブミンであることを明らかにした。分泌液のフィブリノーゲン分解活性を検討したところ、この活性が分子量約70,000の画分に認められることを見いだした。キレート剤による阻害実験によりカワヤツメ口腔腺液中のフィブリノーゲン分解活性はCa<sup>2+</sup>あるいはMg<sup>2+</sup>依存性であること、Zn<sup>2+</sup>は無効であることから、本活性は触媒部位そのものに通常のZn<sup>2+</sup>ではなく、Ca<sup>2+</sup>あるいはMg<sup>2+</sup>をもつ全く新しい金属プロテアーゼと考えられる。

もう一つの主要成分である 26 kDa タンパクについては、アミノ酸配列分析と cDNA クローニングをおこなって全一次構造を決定し、このタンパクが cysteine-rich secretory protein (CRISP) のファミリーに属するタンパク質であることを示した。CRISP は蛇毒に多く含まれるタンパク質であるが、系統樹からはカワヤツメ CRISP は特にメキシコ毒トカゲの毒液中のリアノジン受容体のブロッカーである CRISP と相溶性が高い。ラットの尾動脈平滑筋の筋収縮阻害実験を行ったところ、カワヤツメ CRISP は高カリウム濃度で誘導される収縮を阻害し、カフェインで誘導される収縮は阻害しないことがわかった。したがってカワヤツメ CRISP の平滑筋収縮阻害はリアノジン受容体の阻害ではなく、電位作動性のカルシウムチャネルのブロックによる結果であることが明らかになった。この結果は寄生性ヤツメの CRISP が宿主の血管の収縮による止血を妨げ吸血を容易にする一種の血管弛緩剤として機能していることを示唆する。更に低分子化合物に関して <sup>1</sup>H-NMR を始め、各種の分析により脊椎動物における新物質であることを明らかにした。

#### 審査結果の要旨

脊椎動物や無脊椎動物の分泌液に含まれる各種の生理活性分子の研究は、その生物学的活性と薬理作用など応用面から古くから注目されており、現在までに主要な生物種のほぼすべてについて、その生理活性分子の探求がなされてきた。特に吸血性動物のだ液や蛇毒には血液凝固因子を阻害する活性が認められるため、血液凝固機構の研究と、血栓症や出血傾向の治療への応用の点から、考えられる吸血性動物に関しては徹底的に研究されているといえる。ところが、現生のヤツメウナギ類はその多くが吸血性の寄生種であり 1 対の口腔腺(buccal glands)から lamphredin と呼ばれる抗血液凝固活性をもつ液を分泌するが、これは 80 年前の 1927 年に *Science* 誌にその溶血作用とともに報告されて以来、魚類学のテキストに記載され一般にも広く知られているにもかかわらず、その後それらの活性の本体に関する生化学的研究は全くなされていない。本研究はその点に着目したところが高く評価された。特にヤツメウナギ類はメクラウナギとともに古生代オルドビス紀に分化した無顎類に属し、現存する最も原始的な脊椎動物であり 5 億年をかけて独自の進化をとげているため、新しい生理活性分子が見いだされる可能性を考えている。本研究は新潟県の河川に遡上する寄生性のカワヤツメ(*Lethenteron japonicum*)を材料とし、これまで全く研究されていない上、生物進化上重要な位置にある無顎類の口腔腺分泌液に含まれるタンパク質から低分子までの網羅的な解析を試みたものである。

タンパク質に関しては、機能不明ではあるが通常の 2.5 倍の分子量をもつ特異な血漿アルブミンが高濃度に存在することをタンパク質化学的に証明した。また、フィブリノーゲン分解により血液凝固を阻害する新しい金属プロテアーゼを発見した。カルシウムイオンで活性化されるプロテアーゼには、カルシウムを介したリン脂質との相互作用によって酵素前駆体から活性化されるセリンプロテアーゼである血液凝固因子群、分子内にカルモジュリン様の調節配列をもつシステインプロテアーゼであるカルパインなどが知られているが、本活性は触媒部位そのものに通常の亜鉛イオンやコバルトイオンではなく、カルシウムあるいはマグネシウムイオンをもつ全く新しい金属プロテアーゼであると考えられ、酵素学的にもその意義は大きい。

更に、宿主の血管の収縮を阻害し出血を維持する機能をもつと考えられる、新規の電位作動性のカルシウムチャンネルブロッカー蛋白を見だし、cDNA クローニングにより全構造を決定している。高度な実験技術を要求される微小筋収縮実験により阻害の作用点を明らかにした点も評価できる。その他にも新規の低分子を始めとしてタンパク質、ペプチド、低分子化合物などが多彩な分子が含まれていることを明らかにした点も優れている。同様な吸血性の無顎類は高名な北米五大湖のウミヤツメをはじめとして多種類が知られているため、今後の研究に道を開いたと言える。これらの結果の主要部分は伝統ある国際誌 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 誌に投稿され、その内容の新規性と論文としての完成度の高さを評価されて、改訂無しで即日掲載決定された。以上の結果をもとにして適切な英文で書かれた学位申請論文は内容も充実しており、博士(理学)の学位論文として十分に価値あるものと判定された。