

氏名(本籍) 辰 巳 政 弘 (東京都)

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 博 甲 第 130 号

学位授与年月日 昭和57年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

審査研究科 農学研究科 応用生物化学専攻

学位論文題目 貝類及びホヤ類のレクチンに関する研究

主 査 筑波大学教授 農学博士 伊 藤 達 郎

副 査 筑波大学教授 農学博士 井 上 嘉 幸

副 査 筑波大学教授 農学博士 村 上 和 雄

副 査 筑波大学助教授 農学博士 今 川 弘

論 文 の 要 旨

レクチンは、多くの植物や無脊椎動物更に下等脊椎動物より発見されている。レクチンは、糖と特異的に結合し赤血球や細菌などを凝集するが、現在この結合性を利用し、糖タンパク質の精製におけるアフィニティークロマトグラフのリガンドや、糖タンパク質の糖鎖構造研究用試薬として広く使われている。さらに、レクチンはガン細胞を特異的に凝集し、その増殖を抑えることも知られている。

本論文は、植物に比べあまり研究されていない海洋生物、特に貝類及びホヤ類を試料とし、これら 20 種類からレクチンの検索を行ない、そのうちウチムラサキのレクチンについて単離精製し、その性質を調べたものである。さらに、レクチンの役割を調べる目的で、ウチムラサキの糖質分解酵素の性質を調べている。

第 1 編「貝類及びホヤ類におけるレクチンの検索」においては、16 種類の貝と 4 種類のホヤについて、人の赤血球 A B O 型を用い、レクチン活性の検索を行なっている。その結果、3 種類の貝(ハマグリ、ウバガイ、ウチムラサキ)と 1 種類のホヤ(リッテルボヤ)に、いずれも A 型特異的レクチンが見い出されている。そのうち、ハマグリ、ウバガイ、リッテルボヤのレクチンは、本研究によって初めて発見されたものである。次に、これら 4 種類のレクチンを、アフィニティークロマトグラフィーによって精製した。それらの精製レクチンは、電気泳動によって、いずれも数本のバンドを与えることが明らかになった。

第2編「ウチムラサキレクチンの精製」では、第1編で活性のあったもののうち、最も強い活性を示したウチムラサキのレクチンの単離精製を行ない、その諸性質について調べている。ウチムラサキレクチンについては、すでに報告されているが、単離精製は行なわれておらず、その性質もあまり調べられていない。

ウチムラサキレクチンの臓器別分布を調べたところ、消化管にはほとんど含まれず、外套筋及び斧足に多く含まれていることを明らかにしている。精製には、消化管を除いた部分を用い、硫酸分画と、第1回DEAE-cellulose、アフィニティーゲル、第2回DEAE-celluloseの各クロマトグラフィーによって行なっている。アフィニティークロマトグラフにより精製したレクチン (SPA) は、電気泳動的に7本のバンドを与えるが、上記精製法によってそのうちのメインバンド2本に相当する2つのレクチンの単離精製に成功している。2つのレクチン (SPA-I, SPA-III) の活性収量は各々、6.1, 18%であり、活性倍率は各々、74, 147倍であった。

第3編「ウチムラサキレクチンの性質」では、単離精製したレクチンの諸性質を調べている。ウチムラサキレクチンSPA-I及びSPA-IIIの分子量は、Sephadex G-150とBio-Gel P-200を用いたゲルろ過法によって、いずれも40,000の値を得ている。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、いずれのレクチンも分子量14,000に相当する単一バンドを与えることを確認し、分子量的に2つのレクチンを区別することができないことを明らかとした。一方、等電点電気泳動法によって、SPA-Iの等電点は4.5、SPA-IIIのそれは4.1であることを調べ、両レクチンは電氣的性質において異なることを明らかにした。両レクチンのアミノ酸組成は、非常によく似ているが、SPA-Iにはアスパラギン酸とリジンが多く含まれ、SPA-IIIではグルタミン酸とアラニンが多く含まれていることを明らかにした。また、糖組成をガスクロマトグラフによって調べ、両レクチンともN-アセチルグルコサミンのみを構成糖とする糖タンパク質であり、SPA-I, SPA-IIIのそれぞれの糖含量は、1.2%, 2.1%という値を得ている。

次にレクチンと糖の結合性を凝集阻害実験によって検討している。その結果、各糖に対する結合性は、両レクチンとも同じであり、メチル- α -N-アセチル-D-グルコサミンに対して最も強い結合性を示すことを明らかにしている。一般的に、A型特異的レクチンは、N-アセチルガラクトサミンに対して強い結合性を持つが、本レクチンはN-アセチルグルコサミンに対して、より強い結合性を示している。N-アセチルグルコサミンに対して結合性を示すレクチンとしては、小麦胚芽レクチンやカタツムリ (*Helix powatia*) のレクチンなどが知られているが、これらのレクチンは β 結合したN-アセチルグルコサミンに対してであり、 α 結合のN-アセチルグルコサミンに対して強い結合性を示すものは、バンデリア豆 (*Bandeiraea simplicifolia*) のレクチンII (BSII) しか知られていない。したがって、本レクチンはBSIIに次ぐ α 型結合したN-アセチルグルコサミンに特異的なレクチンである。

SPA-IとSPA-IIIのメチル- α -N-アセチル-D-グルコサミンに対する結合定数をUV吸収差法によって求め、SPA-Iでは $1.3 \times 10^3 \text{M}^{-1}$ 、SPA-IIIでは $4.2 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ の値を得ており、この結果より、両レクチンは結合する糖の種類は同じであるが、結合力に差があることを明らかにし

ている。

第4編「ウチムラサキにおける β -N-アセチルヘキソサミニダーゼの精製」においては、ウチムラサキレクチンと同じ糖に対して作用する糖質分解酵素の精製を行なっている。これは、リョクトウやサトウキビでは、それらの α -ガラクトシダーゼが、ウサギの赤血球を凝集すると報告されており、両作用は1つのタンパク質によるものとされている。そこで、ウチムラサキにおいても、レクチンと糖質分解酵素の関連を調べるため、 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼの精製を行なった。

精製には、ウチムラサキ消化管を用い、硫酸分画と、Toyopearl HW-50, CM-cellulose, Sepharose 4Bの各ゲルを用いたカラムクロマトグラフで行なった。その結果、電気泳動的に単一なバンドを与える酵素が得られ、活性収率は8.7%、活性倍率は98倍の値を得ている。本酵素は、各糖の p -ニトロフェニル化合物を基質とし、各糖に対する活性を検討している。その結果、本酵素は β -N-アセチルグルコサミンに対する活性を100%とした時、 β -N-アセチルガラクトサミンに対しては33%であり、他の α -N-アセチルグルコサミンや、 α 、 β -グルコース、 α 、 β -ガラクトースに対する活性はいずれも3.2%以下であることを調べ、本酵素は、 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼであることを明らかにしている。

本酵素は、Toyopearl HW-50 カラムクロマトグラフィーにより、レクチンと分離できることより、ウチムラサキの場合、両者は別の物質であることを確認している。

第5編「ウチムラサキの β -N-アセチルヘキソサミニダーゼの性質」では、単離精製された酵素の性質について検討を行なっている。第4編において、ウチムラサキのレクチンと β -N-アセチルヘキソサミニダーゼは、同一物質ではないことが明らかとなったが、本編では、レクチンと同じ糖に親和性を持つが、作用の異なる本酵素の性質を調べ、その違いを明らかにしている。分子量は、Bio-Gel P-200 によるゲルろ過法によって、66,000の値を得、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動では、33,000の値を得ている。これより、本酵素は2量体であると推定している。また、等電点は5.4であることを調べた。アミノ酸組成については、グリシン、バリン、セリン及びグルタミン酸を多く含むことを明らかにした。本酵素の最適pHは3.8であり、最適温度は55°C、熱安定性では50°C 1時間の加熱でもほぼ安定であることを明らかにした。また、本酵素の k_m 値は、 p -ニトロフェニル- β -D-N-アセチルグルコサミンに対しては $3.6 \times 10^{-3}M$ 、 p -ニトロフェニル- β -D-N-アセチルガラクトサミンに対しては $1.4 \times 10^{-3}M$ の値を得ている。

第6編「貝類及びホヤ類の抗ガン活性について」では、16種類の貝と、4種類のホヤについて、マウス白血病P-388を用いた*in vitro*, *in vivo*の抗ガン活性測定を行なっている。これは、小麦胚芽レクチンがガン細胞の増殖を抑えると報告されている一方、ハマグリやホヤが、抗ガン活性を持つという報告に基づくものである。その結果、*in vitro*ではサザエが最も高い抗ガン活性を示したが、いずれの試料もP-388細胞を凝集させず、小麦胚芽レクチンの様に凝集によって抗ガン性を示すものがないことを確認した。マウスを用いた*in vivo*の実験では、白ホヤが最も高い抗ガン活性を持つことを明らかにした。

審 査 の 要 旨

現在レクチンは、多くの植物より発見され、さらに無脊椎動物からも発見されている。しかし、植物のレクチンに比べ無脊椎動物、特に貝類やホヤ類のレクチンに関しては、ほとんど研究されていない。

著者は、研究の遅れているこの分野に注目し、新たなレクチンを発見した意義は大きい。さらに、今まで報告はされているが詳しい性質の調べられていない、ウチムラサキのレクチンに取り組み、その諸性質を明らかにしたことは十分に評価される。特に、ウチムラサキレクチンの特異糖が、 α 型結合したN-アセチルグルコサミンであることは、バンデリア豆のレクチンIIに次ぐ2番目の発見で、この意義は大きい。

また、実用面でも今まであまり知られていない糖認識をするレクチンは、アフィニティークロマトグラフィーや、糖タンパク質の糖鎖構造研究において、有効な手段となることが期待され、重要な発見と言える。

レクチンとの関連において、ウチムラサキの β -N-アセチルヘキソサミニダーゼの精製を行ない、レクチンと酵素は異なる物質であることを明らかにしているが、これは、今後レクチンの生体内での役割を研究する上で、重要な示唆を与えると思われる。さらに、酵素の性質を明らかにしているが、このことにより、糖質研究における利用面での道を開いたと言える。

よって、著者は農学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。