

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19510214

研究課題名 (和文) 無顎類口腔腺分泌液における新規の生理活性物質の探索

研究課題名 (英文) Bioactive Substances in the Buccal Gland Secretion of an Agnatha

研究代表者

氏 名：小谷 昌司 (ODANI SHOJI)

所 属：新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：60018702

研究成果の概要：もっとも原始的な脊椎動物である寄生性の無顎類口腔腺分泌液について、初めてタンパク質から低分子までを網羅的に分析し新規の生理活性物質を探索した。その結果、血管収縮にかかわる新規カルシウムチャネル阻害タンパク、血液凝固を阻止する線溶酵素、および機能未知の低分子を見だし、それぞれクローン化、構造解析を実施するとともに、進化的考察をおこなった。これらの物質が血圧調節や血栓治療などに応用される可能性も示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：複合新領域・生物分子科学

キーワード：無顎類, 生理活性物質, タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

我々は従来よりプロテアーゼインヒビター、血液凝固阻害蛋白、神経毒、レクチンその他の生物活性をもつタンパクの探索、精製、構造決定、構造・活性相関の研究を行ってきた。とくに蛇毒を始めとする動物の毒腺、唾液腺や皮膚腺からの分泌液は各種の生理活性物質が豊富に含まれていることから、これまでに調べ尽くされていると言って過言ではない。しかし我々は現存するもっとも原始的な脊椎動物である無顎類 (円口類) のヤツメウナギは一对の発達した口腔腺 (*buccal glands*) から血液凝固阻因子を分泌、吸血することが古くから知られているにもかか

わらず (1927 年 *Science* 誌)、その本体はまったく研究されていないことに注目した。

## 2. 研究の目的

我々は予備実験として、日本産のカワヤツメ (*Lethenteron japonicum*) の口腔腺分泌液を調べ、やはりヒトの血液凝固時間を延ばす作用があることを見いだした。また、タンパク成分を予備的に分離、部分アミノ酸配列の分析をしたところ、分子量 16 万の血清アルブミンと相同なタンパクと分子量 2 万 5 千でメキシコ毒トカゲの毒成分であるカルシウムチャネルブロッカーと相同性なタンパクが主成分であることを見いだした。その他のタンパク質やペプチド成分も多く存在することが口腔

腺液の SDS 電気泳動のパターンから示唆された。さらに 360 nm で励起すると、強い青色の蛍光を示す酸性の低分子が含まれることを見いだした。また分泌液そのものは濃赤色~濃紫色を呈しており、色素成分の存在が認められる。以上、口腔腺分泌液にはタンパク質から低分子有機物まで多彩な物質が含まれているため、それらの本体と生理活性や凝固阻止活性などを明らかにすることを目的としている。本研究ではこれまで全く手がつけられていない無顎類の口腔腺を材料に選択した点、また無顎類が非常に古い時代に分岐し 5 億年をかけて独自の進化をとげて来ていることから、これまでに類のない生理活性物質が見いだされる可能性がある点にまず特色があると考えられる。なかでも血液凝固阻害物質は血栓症などに対する臨床的応用の面から製薬企業を中心として、動植物、微生物に幅広く精力的に探求されてきている。その古典的な成功例は、医用ヒルから分離されたヒルジンである。我々も担子菌に凝固第 X I 因子を阻害する新規のタンパクを見いだし構造決定をおこなった [Odani S, et al. (1999) *Eur. J. Biochem.* **262**(3):915-923]。現在までにヒルとダニ類を中心に、回虫類、蚊、吸血性カメムシ、ウシアブ、吸血性の蛾、吸血コウモリなど、およそ考えられるすべての吸血性の動物から様々な凝固阻止タンパクの精製、cDNA クローニング、結晶構造の解析がおこなわれている。したがって、無顎類口腔腺液に新しい凝固阻止成分や凝固塊を溶解する線溶酵素などを探索することは基礎・応用両面から意義があると思われる。

### 3. 研究の方法

ゲルろ過による口腔腺分泌液のタンパク質、低分子画分の分離と各成分の精製。口腔腺液はセファクリル S-100 カラムのゲルろ過により、150 kDa 程度、50-100 kDa、30 kDa、~5 kDa、~500 Da の 5 画分に分離する。タンパク成分はさらにイオン交換樹脂をもちいた高速液体クロマトグラフィーにより精製する。分子量数千のペプチド画分については、逆相 HPLC による精製をおこなう。また有機低分子は親水性相互作用を利用した HILIC の手法あるいは誘導体化により逆相 HPLC を応用して精製をおこなう。タンパク質、ペプチド画分について、構造解析は常法により行うとともにそのデータをもとにクローニングをおこなう。低分子の構造解析は、スペクトル解析、化学修飾や酵素処理による官能基の同定を行うとともに、本学および他大学の研究者の協力をえて、質量分析、核磁気共鳴により実施する。機能解析では、明治薬科大学薬効学教室三田充男博士の協力によりラット尾動脈平滑筋収縮に及ぼす効果を評価する。プロテアーゼ活性、プロテアーゼインヒビター活性は常法により、合成蛍光基質を用いた測定を实

施する。血液凝固阻止活性はヒトの APTT (activated partial thromboplastin time) の測定および活性化凝固因子特異的な蛍光基質を使用して測定する。

### 4. 研究成果

まずカワヤツメ口腔腺分泌液の血液凝固阻止活性を APTT の測定により確認した。口腔腺分泌液は Sephacryl S-200 をもちいたゲルろ過により粗分画をおこない、それぞれの分画は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。口腔腺分泌液のタンパク組成は 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。口腔腺分泌液に血漿アルブミンが存在する理由は明らかでないが、ごく最近になり Xiao らは口腔腺液の分子量 159,909 のタンパクにフィブリノーゲン分解活性があることを報告した (R. Xiao, et al. (2007) *Biochimie*, **89**, 383-392)。このことは低分子のキャリアと考えられる血漿アルブミンがフィブリノーゲン分解活性、すなわちプロテアーゼ活性をもつことを意味しており、またフィブリノーゲンとアルブミンは血中で共存していることから、にわかには首肯しがたい。そこで、Sephacryl S-100, Superdex 75-HR 等による精密なゲルろ過で得られた画分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 から 50,000 の画分に強く認められることを見いだした。すなわち分子量 16 万のカワヤツメアルブミンそのものがフィブリノーゲン分解活性の本体ではないことを示している。

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  $\text{Ca}^{2+}$  あるいは  $\text{Mg}^{2+}$  依存性の全く新しいメタロプロテアーゼであることが示唆された。フィブリノーゲン分解活性を持つゲルろ過フラクション画分にはまだ複数のタンパク質が含まれており、その中にアルブミンの断片の配列を見いだした。以上の結果より、アルブミンにプロテアーゼ活性があるとしてもアルブミンそのものではなく、断片化によって初めて活性を示す可能性が考えられる。

口腔腺分泌液の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 22 残基のシグナル配列を含む 237 アミノ酸からなる全一次構造を決定した (次ページ図)。

このタンパク質の BLAST search を行ったところ cysteine-rich secretory protein (CRISP) のファミリーに属するタンパク質で

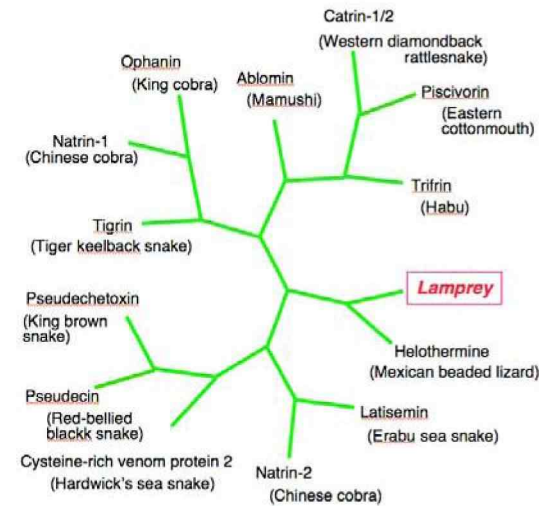
あることがわかった。

```

-109 GGATCAGAGAGGCACTGCCACCCGTTCCGTCGCCAGCAGAGAG -67
-66 ATGTTCACTAACCTCGTGACCCCGCGGCTTGGCGTGGTGTTCATGGCAGCGTCGTG -6
-22 M F T N L V T P A A L A L V F M A S V V -3
-5 GCGGCGACATCCGTCACGACTGGAAGCTCTGGACACGAAGCTGTCGGCGAACCGGAAG 54
-2 A A T S V N D W K L L D T K L S A N R K 18
55 GTCATCGTGGACGTTTCAACGAGCTGCGGCGCGGCGTGGTCCACCGCCAGCAACATG 114
19 V I V D V H N E L R R G V V P T A S N M 38
115 CTCAGATGGCGTCAACGAACGAGCAGCAGAGCCAGCCGCTTGTGGGCGCCGCGCTGC 175
39 L K M A Y N E Q A A E T S R L N A A A C 58
176 AGCTTCTCGCACAGCCCGCAGCAACACGCGCACCTGGAAGACCGCGAAGCAGAGTGGGAC 234
59 S F S H S P S N T R T W K T P Q A E W D 78
235 TCGGGAGAGAACCTCTCATGTCCAGCAACCCAGGTCGTGGACGAGGCAAGTGGCGACG 294
79 C G E N L F M S S N P R S W D E A V R S 98
295 TGGTACGAGAGGTCACCTCCCGCGCTTCCAGTACGGCAGGGGGCTGTGGGCGCGGG 354
99 W Y D E V T S P F G Q Y G T G A V G P G 118
355 GCCGTGGGACACTACTCAGGTGGTGGTACAAGTCCACAGGTGGGCTGCGCCGTC 414
119 A V G H Y T Q V V W Y K S H Q V G C A V 138
415 AACTACTGCCCAACCCCGCGCCCTCAAGTTCCTCATGTGTGCCACTACTGCCCC 474
139 N Y C F N H P G A L K F L Y V K H Y C P 158
475 GCAGGGAACCTGGTCACCGAGTCAACAAACCTACGACCTGGGGACTCCGTGGCAGGG 534
159 A G N L V T R I N K F Y D L G T P C Q A 178
535 TGCCCCATAGCTGCGACAACAACCTGTGCAACCCGTCGCCCTACGTGGACAGTTC 594
179 C P H S C D N N L C T F N P C P Y V D Q F 198
595 AGCAACTGCCCGCAGCTGTCAGCGCCACCGCTGCGGGAACGACGCGGGGGGAACC 654
199 S N C P C Q L F S A H G C A N D G A G G T 218
655 TTCGTGAGCAAACTGCCCTGCCAGCTGCAGCTGCAGCAGGATGTGCAGTGTGGGAC 714
219 F V Q T N C P A T C S C T T D V Q * 235
715 CTCGTACGACTGCTACACCCCGCTGCT 746

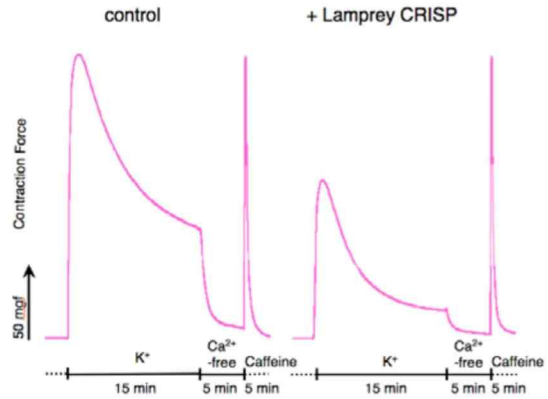
```

CRISP は蛇毒に多く含まれるタンパク質であるが、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 と相同性が高い。

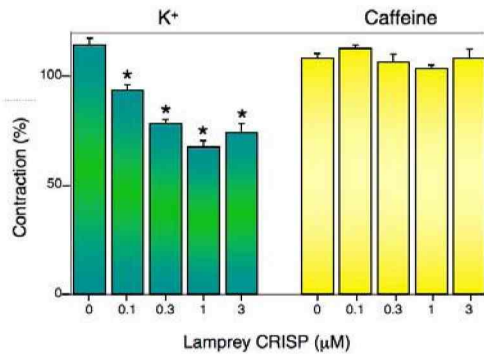


カワヤツメ CRISP と蛇毒・トカゲ毒 CRISP の系統関係

この結果より、ラットの尾動脈平滑筋のヘリカルストリップを用いて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 (次図)。



カリウムおよびカフェインで誘導される平滑筋収縮におよぼすカワヤツメ CRISP の効果

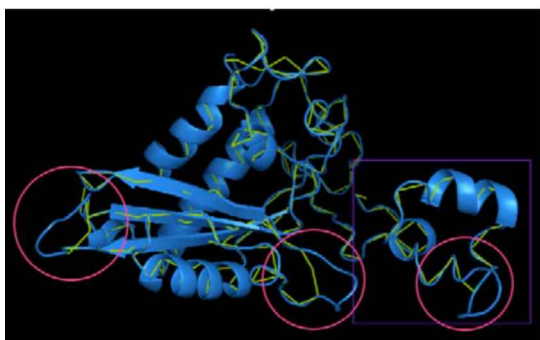


電位作動性カルシウムチャネルのカルシウムチャネル阻害の濃度依存性

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をブロックす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している。カワヤツメ CRISP の一次構造は蛇毒やトカゲ毒のものと並列すると、分子全体に挿入配列が散在し、無顎類とハ虫類との間の大きな進化的距離を反映している。そこで既知の CRISP の座標をもちいて、ホモロジーモデリングによりカワヤツメ CRISP の立体構造モデルを構築した。モデルを下に示す。ブルーのリボンモデルで示しているのが、ヤツメ CRISP であり、緑色のラインモデルで台湾コブラ毒の CRISP である natrin を示している。Natrin は筋小胞体のカルシウム依存性カルシウムチャネルである、リアノジン受容体のブロッカーとして知られている。一方、前述のように、ヤツメ CRISP にはリアノジン受容体の阻害は見られなかった。ヤツメ CRISP に存在する複数の挿入配列部分は、次



ページの図において赤い円で囲った部分に分布しており、分子表面にループアウトしていることがわかる。これらのループ部分がイオンチャンネルとの相互作用の特異性を決定していることが示唆された。



ヤツメ CRISP の立体構造モデルおよびタイワンコブラ CRISP の結晶構造のオーバーレイ

一方、タンパク質以外の物質として 360 nm に吸収極大を持つ低分子があり、イオン交換クロマトグラフィー等で精製し、機能を推定するためにまず構造決定を試みた。種々の解析により、この物質は高度に親水性で硫酸基を持つ酸性のキノンであること、600 MHz の  $^3\text{H-NMR}$  測定では溶媒と交換しない隣あった芳香族水素が 3 個、脂肪族水素が 3 個あること、精密質量分析で質量数は 304.0726 という結果を得た。このような構造上の特性を持つ物質は知られていないため、脊椎動物における新物質であることが予想され引き続き構造決定をおこなっている。

以上、無顎類の口腔腺分泌液にはフィブリノーゲン分解により血液凝固を阻害する金属プロテアーゼ、宿主の血管の収縮を阻害すると思われるカルシウムチャンネルブロッカー、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。これらをさらに解析することは特異な生物学的機能や分子進化の他、抗血液凝固作用による血栓症の治療、血管弛緩をもたらすカルシウムチャンネルブロッカーとしての臨床的応用の可能性からも興味ある課題である。また、外来種の害魚として著名なヤツメであるアメリカ五大湖のウミヤツメは、はるかに大型であり材料としても好適である。その他北半球に主に分布している多様な寄生性のヤツメ類についても口腔腺液の分析をおこなうことにより、更に興味ある生理活性成分の発見に至ることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① 伊藤尚子、三田充男、高橋由明、松島綾乃、渡辺勇一、平野茂樹、小谷昌司、Novel Cysteine-rich Secretory Protein in the Buccal Gland Secretion of the Parasitic Lamprey, *Lethenteron japonicum*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 358, 35-40, 2007 査読有

[学会発表] (計 2 件)

①伊藤尚子 (代表)、カワヤツメ口腔腺液に見いだされた新規イオンチャンネルブロッカーの構造と機能、第7回日本蛋白質科学会年会、2007. 5. 26 (仙台市)

②伊藤尚子 (代表)、寄生生無顎類口腔腺分泌液における生理活性分子の探索、第 80 回日本生化学会大会、2007. 12. 14 (横浜市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小谷 昌司 (ODANI SHOJI)  
新潟大学・自然科学系・教授  
研究者番号：60018702

### (2) 研究分担者

内海 利男 (UCHIUMI TOSHIO)  
新潟大学・自然科学系・教授  
研究者番号：50143764