

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 田 角 聡 志

水中生活者である魚類では、皮膚は多くの病原生物と接する場である。その皮膚の表面を覆っている体表粘液中には生体防御に関与するさまざまな因子が存在する。本論文は、この内、ウナギの体表粘液中に存在するレクチン（特異的な糖に結合するタンパク質）について解析を進めた結果を記したものである。

まず、第 1 章ではレクチン活性の性状を解析した結果をまとめている。粘液粗抽出液に存在するレクチンの活性は、40°C で 20 分間の加熱でも低下せず、pH 5 から 12 の範囲で安定であった。また、Ca<sup>2+</sup>非依存性であり、Ca<sup>2+</sup>依存性の活性を示す C 型レクチンではないと、この時点では推定している。さらにラクトースの添加により活性が阻害されることから、このレクチンはラクトースに特異的な結合をすることを明らかにしている。

第 2 章では、レクチン精製の結果と、得られた精製レクチンの性状解析について記している。ラクトースをリガンドとしたアフィニティーカラムに粘液抽出液を通し、結合した成分をラクトースを含むバッファーで溶出すると活性を示す単一のピークが得られるが、ゲル濾過に付すと 2 つのピークからなり、ウナギが少なくとも 2 つのレクチン (AJL-1, AJL-2) をもつことを明らかにしている。AJL-1 は非共有結合で、AJL-2 はジスルフィド結合でいずれも 2 量体を形成していた。熱や pH 安定性、Ca<sup>2+</sup>要求性、特異糖は粗抽出液とほぼ同様である。また、N 末端アミノ酸配列解析により AJL-2 については 40 残基まで決定している。さらに、マアナゴの体表粘液中レクチンの congerin に対する抗体は AJL-1 のみと結合し、類似性が示されている。

第 3 章では AJL-1 の 1 次構造を解析している。N 末端がブロックされていることから、ペプチダーゼにより断片化して内部配列が得て、それに基づきプライマーを作製し、RACE 法により塩基配列を決定している。ホモロジー検索の結果、congerin など、動物のガレクチンと比較的高い相同性があり、その糖認識部位 (carbohydrate recognition domain, CRD) を保存していることが明らかにしている。

第 4 章では、AJL-2 の 1 次構造を解析している。N 末端アミノ酸配列に基づいて作製したプライマーを用いた RACE 法により塩基配列を決定し、その CRD が多くの C 型レクチンと比較的高い相同性が見られることを示している。C 型レクチンは Ca<sup>2+</sup>要求性をその特徴としているが、この AJL-2 は要求せず、ウナギが Ca<sup>2+</sup>に乏しい淡水中にも生息することと考え合わせて興味深い結果である。ノーザンハイブリダイゼーションの結果、皮膚でのみ特異的に発現していること、精製 AJL-2 に対する抗血清を用いた免疫組織化学により、表皮の棍棒状細胞に存在することから、皮膚特有のレクチンであるとしている。

第 5 章では、精製した AJL-1, 2 の機能解析の端緒として大腸菌 *E. coli* に対する作用を見た結果を記している。まずホルマリン死菌に対しては、AJL-2 が強く凝集するのに対し、AJL-1 は凝集しないことを示している。その一方で大腸菌株の成長については、両者とも

その速度を遅らせることから、これらのレクチンがいずれも生体防御に関与しているものと推定している。大腸菌を凝集しない AJL-1 にも成長阻害が見られるという結果については更なる検討が必要としている。

体表粘液レクチンに関しては多くの魚類でその存在が知られており、重要な役割があるものと信じられているが、系統だった解析が行なわれておらず、今後の研究の進展が望まれているところである。本研究はウナギ体表粘液中の2種類のレクチンについて、その構造を決定し、予備的ではあるが、機能についての検討も加えたものである。魚類粘液レクチンとしてはアナゴに次ぐ構造決定であり、菌に対する作用にまで言及したのは初めてのケースである。特に AJL-2 は C タイプレクチンの定義を変えなければならないような発見であり、分子進化の面からも興味深く、学術上の貢献が大きい。また、病原性細菌に対する作用や耐病性との関係をさらに解析していくことにより、育種や養殖技法の改善につながる新しい分野が開ける可能性を秘めた有意義な研究ということもできる。よって、審査委員一同、博士（農学）の学位授与として価値あるものと認めた。