

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 筒井 繁行

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、トラフグ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。

まず第一章では、トラフグ体表粘液レクチンの単離精製とその性状解析について述べている。本レクチンの特異糖がマンノースであることから、マンノースをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーにより、精製し、約 13kDa のサブユニットが非共有結合により二量体を形成していること、これまで魚類体表で知られていたガレクチン、C 型レクチンのいずれでもないことが示している。

第二章では、本レクチンの一次構造の決定とその発現組織解析を記述している。精製レクチンの酵素消化断片について得た内部アミノ酸配列を基に縮重プライマーを設計し、RACE 法によりクローニングを行ない、このレクチン一次構造を決定している。ホモロジー検索の結果、本レクチンが、既知の動物レクチンとは一切相同性を示さず、マツユキソウ、ニンニクなどのユリ目植物のマンノース結合レクチンと類似する新規のレクチンであるという驚くべき結果を示している。その上、ユリ目植物レクチンにおける 3 箇所糖結合部位の内、2 箇所が完全に保存されていることも明らかにしている。そして、魚類がその体表粘液中に、赤血球凝集という共通の活性を持ちながらも、構造的には多様なレクチン分子を有しているという興味深い考察を加えている。

さらに、RT-PCR 法では本レクチンが鰓、口腔壁、食道、皮膚で発現しているのに対し、ノザンブロット法では、これらに加えて腸でもシグナルが認められたことから、腸でのみ発現する腸型アイソフォームの存在を明らかにしている。この結果は、遺伝子重複により分岐した遺伝子は発現部位を異にしなから分岐前の機能を持つ、とする DDC 理論に合致していると結論づけている。

第三章では、レクチンの産生細胞について述べている。皮膚型レクチンに対する抗体を用いた免疫染色の結果、皮膚型は皮膚、鰓、口腔壁、食道の上皮細胞に、腸型レクチンは腸の上皮細胞と粘液細胞に分布することが示す一方、*in situ* ハイブリダイゼーションでは、いずれの組織においても上皮細胞でのみ合成されることが明らかにしている。そして、皮膚型と腸型レクチンとは分泌様式が異なるのではないかと結論づけている。

第四章では、レクチンの糖鎖結合部位に言及している。本レクチンは糖鎖結合部位として、2 箇所の Q-X-D-X-N-X-V-X-Y 配列（N 末端側から site 1 および

site 2 とする) を有しているが、遺伝子組み替え技術によりアミノ酸置換を起こした 6 種類の変異型、および野生型の His-tag 標識リコンビナントタンパク質を作製し、マンノース結合性を比較している。その結果、site 1 変異型はいずれもマンノース結合能を失っているのに対し、野生型および site 2 変異型は結合性を有していることから、ユリ目植物レクチンと同じマンノース結合部位を持つものの、site 2 の機能については不明であるとしている。

最後に第五章では、レクチンの機能解析結果を記している。まず、本レクチンの、魚病細菌、検討しているが、5 種類のグラム陰性菌、1 種類のグラム陽性菌のいずれをも凝集しなかったという。蛍光標識した本レクチンをトラフグの寄生虫である *Heterobothrium okamotoi* に添加し、蛍光顕微鏡下で観察したところ、寄生虫の表面から明瞭な蛍光が検出され、本レクチンがこの寄生虫に結合することを明らかにしている。トラフグは *H. okamotoi* を排除できないものの、本レクチンが寄生虫に対して何らかの作用を持っているのではないかと結論している。

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、系統だった解析はまだ不十分である。本研究により新たな魚類レクチン分子の存在が明らかとなり、この分野の新たな、そして極めて大きな前進が見られた。特にユリとフグでの共通の分子という、分子進化上の大難問を残す重大な発見であり、学術上極めて意義深いものである。さらに、本研究がゲノム情報の充実したトラフグを材料としてなされていることから、生体防御上の機能解明のみならず、有用形質育種への展開も期待されるという意味においても極めて有意義なものといえる。よって、審査委員一同、博士（農学）の学位を授与するに値するものと認めた。