

臨研 258


(別紙様式第3号)

## 論 文 要 旨

### 論文題目

Molecular cloning and functional expression of hemolysin from the sea anemone *ActinERIA villosa*

(フサウンパチイソギンチャク溶血毒遺伝子クローニング及び機能的発現)

氏 名 上 地 玄 一 郎 

研	究	目	的	:																
	沖	縄	の	サ	ン	ゴ	礁	域	に	棲	息	す	る	海	洋	性	危	険	生	
物	に	よ	る	健	康	被	害	の	ひ	と	つ	に	フ	サ	ウ	ン	パ	チ	イ	
	ソ	ギ	ン	チャ	ク	( <i>Actineria villosa</i> )	に	よ	る	刺	傷	が	あ	る						
	本	種	は	、	最	近	に	な	っ	て	沖	縄	近	海	に	生	息	す	る	
	と	が	確	認	さ	れ	た	未	知	の	種	類	で	あ	る					
	は	、	本	種	に	よ	る	刺	傷	被	害	の	予	防	と	治	療	に	資	す
	る	た	め	に	、	そ	の	毒	成	分	の	解	析	を	目	的	に	実	施	さ
	れ	た																		
	結	果	と	考	察	:														
	沖	縄	近	海	で	採	集	さ	れ	た	本	種	の	刺	胞	球	か	ら	粗	
	毒	を	抽	出	し	、	ヒ	ツ	ジ	赤	血	球	に	対	す	る	溶	血	活	性
	を	指	標	と	し	て	、	溶	血	毒	の	単	離	・	精	製	を	行	っ	
	た																			
	の	塩	基	性	タ	ン	パ	ク	で	あ	り	、	リ	ン	脂	質	の	一	種	で
	あ	る	ス	フ	ィ	ン	ゴ	ミ	エ	リ	ン	に	よ	っ	て	相	対	的	に	溶
	血	活	性	が	阻	害	さ	れ	、	10	%	酢	酸	に	よ	っ	て	失	活	す
	る	こ	と	が	分	っ	た													
	球	に	対	す	る	溶	血	活	性	は	そ	れ	ら	の	赤	血	球	膜	の	ス
	フ	ィ	ン	ゴ	ミ	エ	リ	ン	含	量	と	相	関	し	て	い	る	と	考	え




\*要旨は3枚(1200字以内)にまとめること。

られた。精製された Avt-I の N 末端塩基配列を  
もとに、Degenerate PCR 法によりクローニングさ  
れた完全長の Avt-I 遺伝子は 1046 塩基長で、226  
残基のアミノ酸をコードしており、cDNA の 5'  
側および 3' 側に非翻訳領域の存在が確認され  
た。N 末端の 47 残基のプレ配列が除去される  
ことにより 179 残基からなる成熟型溶血毒にな  
ることも明らかになった。遺伝子配列から予  
想される Avt-I の分子量は 19,600、等電点 9.3 の塩  
基性タンパクであり、天然型 Avt-I には糖が検  
出されなかったことから糖タンパクではない  
と考えられた。このアミノ酸配列中にはシス  
테인残基が存在しないため Avt-I はジスルフ  
イド結合に由来する高次構造は取らないもの  
と予想された。また、そのアミノ酸配列にト  
リプトファンリッチな領域が存在し、この部  
分が赤血球膜のスフィンゴミエリンとの結合  
に関与し、4 分子程度の N 末端側  $\alpha$  ヘリックス  
構造が膜内に侵入することによって溶血が  
引き起こされると推定された。さらに他のイ

ソ	ギ	ン	チ	ャ	ク	溶	血	毒	に	特	徴	的	な	R	G	D	モ	チ	ー	フ								
配	列	が	存	在	せ	ず	、	類	縁	の	ウ	ン	バ	チ	イ	ソ	ギ	ン	チ									
ャ	ク	(	<i>Phyllo</i>	<i>discus</i>	<i>semoni</i>	)	に	も	同	様	に	み	ら	れ	な	い												
こ	と	か	ら	進	化	上	、	毒	素	の	タ	ー	ゲ	ッ	ト	分	子	が	変									
わ	っ	た	こ	と	を	示	唆	し	た	。	A	v	t	-	I	遺	伝	子	を	大	腸	菌						
B	L	2	1	(	D	E	3	)	株	に	組	み	換	え	て	作	成	し	た	組	換	え	A	v	t	-	I	
(	r	A	v	t	-	I	)	は	、	天	然	型	A	v	t	-	I	と	ほ	ぼ	同	様	の	溶	血	活	性	を
示	し	た	。	ま	た	、	培	地	の	組	成	を	最	適	化	す	る	こ	と									
に	よ	り	約	2	倍	の	発	現	量	増	加	を	認	め	た	。												
こ	れ	ら	の	結	果	か	ら	、	本	種	の	溶	血	毒	の	作	用	機										
序	が	明	ら	か	に	な	り	、	リ	ン	脂	質	の	一	種	で	あ	る	ス									
フ	ィ	ン	ゴ	ミ	エ	リ	ン	特	異	的	な	検	出	プ	ロ	ー	ブ	、	神									
経	の	生	理	学	的	研	究	、	傷	害	発	生	の	予	防	や	治	療	に									
役	立	っ	た	も	の	と	期	待	さ	れ	る	。																

(別紙様式第7号)

## 論文審査結果の要旨

報告番号	課程博 * 第 号 論文博	氏名	上地 玄一郎
論文審査委員	審査日	平成	17年 1月 27日
	主査教授	成島 研二	
	副査教授	久木田 一朗	
	副査教授	小杉 忠誠	
(論文題目)			
Molecular cloning and functional expression of hemolysin from the sea anemone <i>Actinaria villosa</i>			
(論文審査結果の要旨)			
上記の論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義、学術的水準等につき慎重かつ公正に検討し、以下のような審査結果を得た。			
1. 研究の背景と目的			
沖縄のサンゴ礁域に棲息する海洋性危険生物による健康被害のひとつにフサウンパチイソギンチャク ( <i>Actinaria villosa</i> ) による刺傷がある。本種は、最近になって沖縄近海に生息することが確認された未知の種類である。本研究は、本種による刺傷被害の予防と治療に資するために、その毒成分の解析を目的に実施された。			
2. 研究内容			
沖縄近海で採集された本種の刺胞球から粗毒を抽出し、ヒツジ赤血球に対する溶血活性を指標として、溶血毒の単離・精製を行った。その結果、溶血毒 (Avt-I) は分子量が約 20kDa の塩基性タンパクであり、リン脂質の一種であるスフィンゴミエリンによって相対的に溶血活性が阻害され、10% 酢酸によって失活することが分った。また、Avt-I の各種動物赤血球に対する溶血活性はそれらの赤血球膜のスフィンゴミエリン含量と相関していると考えられた。精製された Avt-I の N 末端塩基配列をもとに、Degenerate PCR 法によりクローニングされた完全長の Avt-I 遺伝子は 1046 塩基長で、226 残基のアミノ酸をコードしており、cDNA の 5' 側および 3' 側に非翻訳領域の存在が確認された。N 末端の 47 残基のプレ配列が除去されることにより 179 残基からなる成熟型溶血毒になることも明らかになった。遺伝子配列から予想される Avt-I の分子量は 19,600、等電点 9.3 の塩基性タンパクであり、天然型 Avt-I には糖が検出されなかったことから糖タンパクではないと考えられた。このアミノ酸配列中にはシステイン残基が存在しないため Avt-I はジスルフィド結合に由来する高次構造は取らないものと予想された。また、そのアミノ酸配列にトリプトファンリッチな領域が存在し、この部分が赤血球膜のスフィンゴミエリン			

との結合に関与し、4分子程度のN末端側 $\alpha$ ヘリックス構造が膜内に侵入することによって溶血が引き起こされると推定された。さらに他のイソギンチャク溶血毒に特徴的なRGDモチーフ配列が存在せず、類縁のウンバチイソギンチャク (*Phyllodiscus semoni*) にも同様にみられないことから進化上、毒素のターゲット分子が変わったことを示唆した。Avt-I遺伝子は大腸菌 BL21(DE3)株に組み換えて作成した組換え Avt-I (rAvt-I) は、天然型 Avt-I とほぼ同様の溶血活性を示した。また、培地の組成を最適化することにより約2倍の発現量増加を認めた。

これらの結果から、本種の溶血毒の作用機序が明らかになり、リン脂質の一種であるスフィンゴミエリン特異的な検出プローブ、神経の生理学的研究、傷害発生の予防や治療に役立つものと期待される。

### 3. 研究成果の意義と学術的水準

フサウンバチイソギンチャクは2001年に国内で初めて確認された種であり、その毒素の保有及び毒の性状を明らかにした研究は他に類がなく、微量で強い毒性を示す毒素に明らかにした点は治療法の開発などに重要な知見を与えるものと思われる。本研究は国際的にも高く評価されるものであると判断される。

以上により本論文は学位授与に十分に値するものであると判断した。

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
  - 2 要旨は800字~1200字以内にまとめること。
  - 3 \*印は記入しないこと。