

学位論文題名

硬骨魚類インスリンの一次構造, 遺伝子構造
および分泌動態に関する研究

学位論文内容の要旨

硬骨魚類において、インスリンは栄養素、特にタンパク質・アミノ酸の同化制御に key hormone として深く関わっている。したがって、硬骨魚類においてインスリンの分泌動態、作用機序を明らかにすることは、栄養素の効率的な同化、ひいては成長を促進する技術を開発する上で重要である。そして、硬骨魚類のインスリンの一次構造は変異性が高く、魚種ごとに生物活性が異なることが予想され、さらに複数の分子種を有する魚種が認められるため、各魚種において各分子種の生化学的同定および分泌動態を調査することが必要である。

以上のような背景を踏まえ、本研究はマツカワおよび数種の硬骨魚類においてインスリンの一次構造、遺伝子構造を解明し、複数のインスリン分子種の産生様式を明らかにした。さらに、マツカワインスリン酵素免疫測定法を新たに開発し、マツカワにおける2分子種のインスリンの分泌動態の一端を解明した。

第1章では、マツカワはB鎖のN末端の伸長 (Pyr-Ala) の有無のみが異なる2分子種のインスリンを有することを明らかにした。そして、5個体の臍抽出物を個体ごとに調製して、逆相HPLCに負荷したところ、インスリン-IおよびIIに対応するUV吸収ピークがすべての個体に認められ、両インスリンは非対立性遺伝子に支配されていることが示唆された。次に、PCRに

よりマツカワのゲノミック DNA からプレプロインスリン遺伝子を増幅し、塩基配列の解析を行った。その結果、単一の遺伝子が得られ、この遺伝子から演繹されたアミノ酸配列はインスリン-I および II に一致した。そして、この遺伝子の一部の塩基配列をプローブとしてゲノミックサザンブロットを行ったところ、3種の制限酵素のそれぞれにより消化されたゲノミック DNA において1本ずつのバンドが検出された。これらのことから、マツカワの2分子種のインスリンは単一のプレプロインスリンからシグナルペプチドのC末端の切断箇所が2箇所にわたるため生じると考えられた。

第2章では、マツカワにおける2分子種のインスリンの産生様式がマツカワに特異的なものか否かを、イシガレイ、カツオ、ホッケの3種からインスリンを精製するとともに、それらの一次構造を解析することにより検討した。

マツカワと系統的に遠縁であるイシガレイもB鎖のN末端の伸長 (Pyr-Ala) の有無のみが異なる2分子種のインスリンを有することが確認された。このことからカレイ類の多くの種がマツカワインスリン-I および II に対応する2分子種のインスリンを含むことが考えられた。

1個体のカツオからインスリンを精製したところ、インスリン-I および II が得られた。これらの間には50残基中11残基の配列置換が認められ、インスリン-IIのB鎖のN末端はインスリン-Iのそれに比較して1残基伸長していた。また、脊椎動物のインスリンのB鎖16残基目はレセプターと結合する領域を構成するため保存性が高く、ほとんどの種において Tyr であるが、カツオインスリン-Iのそれは Asn であった。さらに、3個体の臍抽出物を個体ごとに逆相 HPLC に負荷したところ、インスリン-I および II に対応する UV 吸収ピークがすべての個体において確認された。これらのことから、カツオのインスリン-I と II は異なる

る 2 遺伝子座に支配された分子種であり、生物活性が異なることが予想された。

ホッケにおいても 2 分子種のインスリン (I、II) の存在が確認された。そして、両分子種間に 5 1 残基中 1 1 残基の置換、およびインスリン-I の A 鎖の N 末端に 3 残基の伸長が認められた。また、ホッケ インスリン-II とカツオ インスリン-II 間のアミノ酸配列の置換残基数は 4 残基であったが、ホッケ インスリン-I とカツオ インスリン-I のそれは 1 7 残基であった。さらに、5 個体のホッケから得られた臍抽出物を逆相 H P L C に個体ごとに負荷したところ、すべての個体においてインスリン-I および II に対応する U V 吸収ピークが認められた。これらのことは、ホッケにおいてもインスリン-I および II は異なる 2 遺伝子座に支配されていること、およびカツオとホッケが分岐した後にそれぞれの種においてインスリン-I 遺伝子はインスリン-II 遺伝子の重複により生じたことを示唆している。また、ホッケのインスリン-I と II 間において、レセプターと結合する領域を構成する部分にアミノ酸配列の置換および伸長が認められたことから、ホッケにおいてもカツオと同様にインスリン-I と II 間の生物活性が異なることが予想された。

第 3 章においては、ビオチン標識 マツカワインスリン-II と抗マツカワインスリン-II 血清を使用した競合免疫測定法を開発した。そして、この測定法によりアミノ酸とグルコースのインスリン分泌誘導能を投与実験により比較したところ、アルギニンが強い誘導能を有することが示された。一方、哺乳類において強い誘導能を示すグルコースの効果は弱かった。次に、アルギニン投与あるいは餌料給餌によりインスリン分泌を誘導したマツカワから血漿を採取し、逆相 H P L C に負荷して得られた各フラクションのインスリン量を測定した。その結果、インスリン免疫反応はアルギニン投与および餌料給餌のいずれの実験区においても 2 つの

反応ピークとして認められ、それらの溶出時間はマツカワのインスリン-I と II のそれらにそれぞれが一致した。このことはマツカワにおいて 2 分子種のインスリンが成熟分子として血液中に分泌されること、およびアルギニンおよび摂餌後の栄養素の同化に両インスリンがともに作用することを示唆している。

本研究において、硬骨魚類のインスリンには (1) 単一のプレプロインスリンから成熟型へ変換される過程でシグナルペプチドの切断箇所が異なるために 2 分子が生じる様式と、(2) 2 遺伝子座の産物として 2 分子種が生じる様式の 2 つの分子多型の産生様式が存在することが明らかになった。そして、本研究において使用した 4 魚種すべてにおいて複数のインスリンの存在が明らかになったことから、さらに他の硬骨魚類においても未知のインスリン分子が存在する可能性が考えられる。そのため、栄養素代謝の研究対象種において複数のインスリンの存在可能性、分泌動態さらにそれらの間に機能分化があるか否かを検討することが必要であろう。そして、これらの知見およびインスリンの測定法は硬骨魚類、特に異体類においてインスリンを中心にした内分泌系制御による効率的なタンパク質・アミノ酸の同化制御技術開発の基礎として重要になると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 崎 文 雄
副 査 教 授 西 田 清 義
副 査 教 授 原 彰 彦
副 査 助 教 授 後 藤 晃

学 位 論 文 題 名

硬骨魚類インスリンの一次構造，遺伝子構造 および分泌動態に関する研究

一般に動物に摂食される栄養素の同化にはインスリンが重要な役割を担っている。特に哺乳類では糖代謝において血糖値降下作用を持つ唯一のホルモンとして、細胞内代謝から臨床応用の分野まで極めて多くの知見が蓄積されている。しかし魚類においてはこれまでインスリンについては、サケ、マス類、ウナギなどで生理学的研究が行われてきたが、インスリンの一次構造や機能分化等に関しては殆ど知られていないのが実状である。更に現在養殖対象種となっている海産魚種についての知見は皆無に近く、効率的な種苗養成技術を開発する上でも、インスリンの生化学的性質や分泌動態を明らかにすることは極めて重要である。特に魚類では肉食を主として多様な食性を有しており哺乳類とは異なる生活活性も予想される。

申請者はこの点に注目し、寒冷地で養殖対象種として期待されるマツカワを中心として水産上重要な種であるイシガレイ、カツオ、ホッケを研究材料として選び、インスリンの種による違いおよび同一種内にみられるインスリンの分子種についての生化学的同定を行い、分子構造と栄養素の投与実験から推定される機能分化および分泌動態を明らかにしようとしたもので、本研究の審査課程で評価した主な点を上げると次の通りである。

1. 調べた4魚種共海産魚であり、その内、特に異体類は養殖対象種として重要な魚種を含んでおり、栄養代謝に直接関与するインスリンの研究を推進した意義は大きい。
2. 調べた海産4魚種のいずれにおいてもインスリンには分子構造の異なる2分子種が存在することを明らかにした。この2分子種は調べた全ての個体に存在し、インスリンI、IIに相当することを明らかにした。
3. マツカワとイシガレイにみられたインスリンの2分子種はB鎖のN末端のPyr-Alaが存在するか否かの違いであり、その産生機構は1遺伝子座の支配を受けた単一のプレプロインスリンからインスリンIおよびIIに変換される過程で、シグナルペプチドのC末端の切断箇所が2箇所にあたることによると推定した。相違のみられたB鎖N末端はインスリンレセプターと結合する部位と離れていると考えられることから、異体類2魚種のインスリンI、IIには未だ生物活性の機能的分化は起こっていないと推論した。

4. カツオとホッケの2分子種（インスリンI、II）は異体類の場合と異なる事を示した。カツオではI、II間に50残基中11残基の配列置換があり、インスリンIIのB鎖のN末端はインスリンIと比較して1残基伸長しており、しかもB鎖16残基目はレセプターと結合する領域であり、この領域は殆どの種でTyrであるのに対して、カツオインスリンIではAsnであること、この2分子種は個体ごとに調べた結果、全ての個体に存在することから、カツオのインスリンI、IIは異なる2遺伝子座に支配された分子種で機能的に分化している可能性を示唆した。

5. ホッケではインスリンI、II間で51残基中11残基の置換、およびインスリンIのA鎖のN末端に3残基の伸長があること、ホッケにおいてもカツオと同様に2分子種が2遺伝子座に支配され、機能的に分化している可能性を示唆した。更にカツオとホッケとの比較ではインスリンIで17残基、インスリンIIでは4残基の置換があり、魚類のインスリンは魚種間で相当の変異があり、栄養素同化に多くの多様性を含んでいることを示す貴重な結果を提示した。

6. 本研究でビオチン標識マツカワ・インスリンIIと抗マツカワ・インスリンII血清を使用したインスリン酵素免疫測定法を新たに開発した点を評価した。この測定法により、アミノ酸とグルコースのインスリン分泌誘導能を調べるためマツカワを使用した投与実験によりマツカワのインスリンと哺乳類のインスリンの機能差を明らかにした。アミノ酸としてアルギニンとヒスチジンを使用し、グルコースと比較すると、哺乳類では強い誘導能を示すグルコースの効果はマツカワで弱く、逆にアルギニンの筋肉注射あるいは飼料給餌により血漿インスリン量が増加すること、この場合2分子種共に増加することから、アルギニンおよび摂餌後の栄養素の同化に両分子種が共に作用することを確認、2分子種の分子構造から推定した機能の同一性を実証した点を評価した。

7. 本研究は魚類のインスリンの産生過程において少なくとも2つの異なる様式のあることを示した。即ち、1つは単一のプレプロインスリンから成熟型へ変換される過程でシグナルペプチドの切断箇所が異なるために2分子種が生ずる様式、他の1つは2遺伝子座の産物として2分子種が生ずる様式で、少なくとも前者の様式は異体類で初めて見出された様式として注目される。4魚種の内カツオとホッケでは、インスリンII遺伝子座の重複により、インスリンI遺伝子座が形成されたと推定した。これは、現在両遺伝子座のいずれにおいても対立遺伝子が見出されておらず、魚類のインスリン分子の多様性を考える上で興味もたれる結果であると評価した。

以上により、本研究は魚類インスリンの分子種に関する先駆的研究であり、魚類特に海産魚類の栄養代謝を考える上で貴重な知見を与えるものとして高く評価され、審査員一同は本研究の申請者が博士（水産学）の学位を授与される十分な資格を有すると判定した。