

# *Illex argentinus* 墨汁チロシナーゼの酵素学的性質 及び構造に関する研究

## 学位論文内容の要旨

イカ墨汁は古くから民間伝承薬や漢方薬として用いられている。イカ (*Illex argentinus*) 墨汁の有効活用を目的としたこれまでの研究の結果、新規の糖鎖構造を有する複合糖質イレキシシペプチドグリカン (IPG と略す) が発見された。さらに、IPG を主成分とする画分に抗腫瘍活性が見出され、その効果は免疫賦活作用を介して発現すると推定された。しかしながら、活性の本体は明らかではなく、他の蛋白成分の関与が示唆された。本研究は、抗腫瘍活性の本体およびその性状を明らかにすることを目標に行われたものである。始めに、蛋白質成分の関与という推論から、墨汁に報告されているチロシナーゼ (monophenol, L-dopa:oxygen oxidoreductase; EC 1.14.18.1) の挙動に注目して同抗腫瘍活性画分の分画を行い、分画物の抗腫瘍活性を調べた。その結果、抗腫瘍活性へのチロシナーゼの関与を示唆する結果が得られた。続いて、これまで性状が解明されていなかった墨汁チロシナーゼの単離に成功し、諸性質を解析し、その全一次構造を含む構造情報を初めて明らかにした。軟体動物チロシナーゼの詳細な解析研究は他に例がない。

### (1) *I. argentinus* 墨汁の抗腫瘍活性とチロシナーゼ

既報の墨汁抗腫瘍活性画分の調製方法に従い、*I. argentinus* 墨汁のアセトン粉末を調製し、抽出後、陰イオン交換およびゲルクロマトグラフィーにより分画した。その結果、従来の抗腫瘍活性画分には、墨汁中の大部分のチロシナーゼ活性成分が含まれることがわかった。さらに、Phenyl-Sepharose CL-4B 疎水クロマトグラフィーによって、抗腫瘍活性画分は、チロシナーゼ活性が除かれた IPG 画分、チロシナーゼ活性のみが含まれる画分、およびチロシナーゼ活性と IPG の一部が共存する画分の 3 つに分離された。マウスによる抗腫瘍活性テストでは、チロシナーゼ活性のみを含む画分でも、従来の抗腫瘍活性画分よりも高い活性が見られ、チロシナーゼと IPG の共存画分に最も高い活性が認められた。一方、チロシナーゼが除かれた IPG 画分の抗腫瘍活性は逆に低下した。これらの結果から、抗腫瘍活性に対するチロシナーゼの関与が強く示唆された。

### (2) *I. argentinus* 墨汁チロシナーゼの酵素学的性質

チロシナーゼは、自然界に広範に分布する type 3 銅含有酵素である。本酵素は、チロシンなど

のモノフェノールから *o*-ジフェノールへの1原子酸素添加 (モノフェノラーゼ活性)、さらに *o*-ジフェノールから対応する *o*-キノンへの酸化 (*o*-ジフェノラーゼ活性) を触媒する。チロシナーゼの役割として、メラニン合成による紫外線防御が知られているが、節足動物においては、外骨格形成の他、宿主防御系の最終的な活性分子として重要な役割を果たしている。また、頭足類での墨汁合成、海洋生物の接着反応など、様々な生物学上の現象に関わっている。しかしながら軟体動物のチロシナーゼの性質は明確にされておらず、構造は明らかにされていない。

上述の研究において、*I. argentinus* 墨汁のチロシナーゼ活性成分は、未変性電気泳動で、多様な分子形態を示すスミアな活性染色像を与えたが、その中に、分子量約 94 kDa の位置に明瞭な活性バンドを示す蛋白質 (ST94 とする) が見出された。本研究では、このチロシナーゼ分子 ST94 を単離し、性質を調べた。

ST94 は、墨汁アセトン粉末から、硫酸沈殿分画、疎水および陰イオン交換クロマトグラフィーにより、粉末 100 g 当たり 0.73 mg の収率で得られた。さらに、ST94 は、トリプシン限定分解によって分子量が低下した蛋白質 (ST94t とする) を与え、大幅に活性が上昇することがわかった。このことから、軟体動物チロシナーゼについても、節足動物の酵素と同様な活性化機構が推測された。ST94、ST94t および墨汁チロシナーゼ活性の大部分を含む粗酵素画分について性質を調べた結果、互いに非常に類似していることがわかった。このことから、他の墨汁チロシナーゼ成分も ST94 と同様の性質を有すると考えられた。得られた *I. argentinus* 墨汁チロシナーゼの性質は次のとおりであった。モノフェノラーゼ活性および *o*-ジフェノラーゼ活性を有する。中性からアルカリ領域で安定であり、*o*-ジフェノラーゼ活性で求めた最適 pH は 8 付近である。30 °C 以下で安定である。*o*-ジフェノラーゼ活性は、反応温度が低下しても活性の低下が少ない低温活性酵素の性質を示す。*o*-ジフェノラーゼ活性は、チロシナーゼ阻害剤 (フェニルチオウレア、トロポロン、コウジ酸、アルブチン) によって阻害される。ST94 から ST94t への変化によりモノフェノラーゼ活性が約 40 倍以上に上昇する。

### (3) *I. argentinus* 墨汁チロシナーゼの構造

SDS 電気泳動および質量分析の結果、ST94 は、ジスルフィド架橋された分子量 70.1 kDa ポリペプチド 2 分子からなる 140.2 kDa の蛋白質であること、ST94t は、同じく架橋された 63.8 kDa のポリペプチド 2 分子からなるホモ 2 量体 (127.6 kDa) であることがわかった。N-末端配列解析で、両者は異なるアミノ酸配列を与え、トリプシンにより ST94 の N-末端領域が消化されていることがわかった。これらの N-末端配列を基に、墨汁囊 poly(A)<sup>+</sup> RNA を用いて RT-PCR および RACE により酵素遺伝子の単離を行い、625 アミノ酸残基の蛋白質をコードする 2 種類の cDNA (cDNA-1 および cDNA-2) が得られた。cDNA-1 にコードされた蛋白質のアミノ酸配列は、ST94 および ST94t の N-末端配列 (各々 19 残基および 14 残基) を含んでいたが、cDNA-2 では、コードされた蛋白質の 4 個所にアミノ酸置換が見られ、内 1 個所で決定された N-末端配列と異なっていた。両 cDNA 配列の高い相同性 (99.3 %) から、ST94 のアイソザイム遺伝子と考えられた。cDNA-1 にコードされたアミノ酸配列から、ST94 のサブユニットは、625 アミノ酸残基 (70975 Da) の前駆体

として発現した後、18 アミノ酸残基のシグナル領域が切断されて 607 アミノ酸残基 (68993 Da) の ST94 になると推測された。アミノ酸配列には type 3 銅蛋白質に共通する 2 個所の銅イオン結合部位が存在した。

チロシナーゼを含む Type 3 銅蛋白質は、一方で、分子進化学的な興味の対象となっている。本研究で明らかにされた軟体動物チロシナーゼ ST94 の銅イオン結合部位には、微生物、線虫、脊椎動物のチロシナーゼおよび軟体動物ヘモシアニンとの相同性が認められた。また、軟体動物のチロシナーゼとヘモシアニンは、おそらく後生動物発生前に分岐したと推測された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 村 淳 夫

副 査 助 教 授 森 春 英

副 査 教 授 芦 田 正 明 (北海道大学低温科学研究所)

学 位 論 文 題 名

## *Illex argentinus* 墨汁チロシナーゼの酵素学的性質 及び構造に関する研究

本論文は、和文 115 頁、図 29、表 7、6 章からなり、参考論文 12 編が添えられている。

イカ (*Illex argentinus*) 墨汁の有効活用を目的とした一連の研究で、新規の構造を有する複合糖鎖イレキシシペプチドグリカン (IPG と略す) が発見され、IPG を主成分とする画分に抗腫瘍活性が見出された。しかし、活性の本体は明確ではなく、墨汁中にある他の蛋白因子の関与が示唆された。本研究は、抗腫瘍活性の本体と性状の解明を行い、チロシナーゼ (EC 1.14.18.1) が関与することを示した。次に墨汁チロシナーゼに関し、酵素単離を行い、諸性質および構造情報を明らかにした。軟体動物チロシナーゼに関する詳細な解析研究は他に例がない。

### (1) *I. argentinus* 墨汁の抗腫瘍活性とチロシナーゼ

従来の手法でイカ墨汁から抗腫瘍活性画分を得た。本活性画分には、墨汁中にあるチロシナーゼ活性の大部分が含まれていた。疎水クロマトグラフィーにより抗腫瘍活性は、チロシナーゼが除かれた IPG 画分、チロシナーゼのみの画分およびチロシナーゼと IPG の一部が共存する画分の 3 つに分離された。分画前の抗腫瘍活性よりも高い活性値が、チロシナーゼのみの画分に認められた。チロシナーゼと IPG 共存画分の活性が最も高く、IPG のみの画分の活性は逆に低下した。これらの結果は、抗腫瘍活性におけるチロシナーゼの関与を強く示唆した。

### (2) *I. argentinus* 墨汁チロシナーゼの酵素学的性質

前述の精製過程における未変性電気泳動で、イカ墨汁チロシナーゼは多様な分子形態を示すスミアな活性染色像を与えた。その中で分子量約 94 kDa の位置に明瞭な活性バンドを示す蛋白質 (ST94 と仮称) が見出されたので、ST94 の単離を試み、アセトン粉末から硫酸分画・疎水およ

び陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。トリプシン限定分解した ST94 (ST94t と仮称) の活性は、大幅に上昇した。ST94、ST94t および墨汁チロシナーゼ活性の大部分を含む粗酵素の性質は非常に類似しており、他の墨汁チロシナーゼ成分も ST94 と同様の性質を有すると考えられた。以下に緒性質を示す。モノフェノラーゼ活性および *o*-ジフェノラーゼ活性を有した。pH 安定域 (中性からアルカリ領域) と温度安定域 (30 °C 以下) を調べ、*o*-ジフェノラーゼ活性で求めた最適 pH は 8 付近であった。*o*-ジフェノラーゼ活性は、反応温度が低下しても活性低下が少ない低温活性酵素の性質を示した。*o*-ジフェノラーゼ活性は、チロシナーゼ阻害剤 (フェニルチオウレア、トロポロン、コウジ酸、アルブチン) によって阻害された。ST94 から ST94t への変化によりモノフェノラーゼ活性が約 40 倍以上に上昇した。

### (3) *I. argentinus* 墨汁チロシナーゼの構造

ST94 は、分子量 70.1 kDa ポリペプチド 2 分子からなる 140.2 kDa の蛋白質であり、両サブユニットはジスルフィド架橋で結合していた。ST94t は、同じくジスルフィド架橋を介した 63.8 kDa のポリペプチド 2 分子からなるホモ 2 量体 (127.6 kDa) であった。トリプシンにより ST94 の N-末端領域が消化され、ST94t が生成した。両者の N-末端配列情報をもとに、墨汁囊 poly(A)<sup>+</sup> RNA を用いて RT-PCR および RACE により酵素遺伝子の単離を行った。625 アミノ酸残基の蛋白質をコードする 2 つの cDNA (cDNA-1 および cDNA-2) が得られ、塩基配列に高い同一性 (99.3 %) が認められた。cDNA-1 からのアミノ酸配列には ST94 と ST94t の N-末端配列が含まれていた。cDNA-2 の N-末端領域に相当する配列は ST94 のものと異なっており、cDNA-2 は ST94 のアイソザイム遺伝子と考えられた。ST94 のサブユニットは、625 アミノ酸残基の前駆体として発現し 18 残基のシグナル領域が切断された後、607 アミノ酸残基の成熟蛋白質になると推測された。アミノ酸配列には type 3 銅蛋白質に共通する 2 個所の銅イオン結合部位が存在し、ST94 の 1 サブユニット当たり 2 分子の銅が存在していた。

以上のように本研究は、これまで解明例がないイカ墨汁チロシナーゼの機能究明、単離、性質および構造の解析を行ったものである。本酵素が墨汁の抗腫瘍活性に関与することを示し、多様な分子形態を示す活性画分から酵素精製に成功したこと、限定消化による活性化を含む一般的な諸性質ならびに全一次構造やサブユニット形成を含む構造情報を初めて明らかにしたことなど、軟体動物チロシナーゼに関する用途開発や学術的に重要な基礎的知見を提供している。

よって審査員一同は、奈良岡 哲志が博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。