

論文審査及び最終試験結果報告書

論文提出者氏名：松井 信太郎

論文題目：ネコザメ皮膚レクチン HjCL により開始される

新奇血液凝固系の全貌解明

審査の概要：

循環系を有する生物において、受傷時の迅速な止血は生命の維持に不可欠なものである。哺乳類の止血機構には二つの局面が存在する。一つは血小板が創傷部位に付着して血栓を形成する一次止血であり、もう一つは血液凝固カスケードの展開により最終的に産生されるフィブリンが血栓をより強固に固定する二次止血である。その血液凝固カスケードには 12 もの因子が関与しており、その多くは C 末端領域にセリンプロテアーゼドメインを持ったトリプシン様酵素である。これらは循環血液内では活性を持たない前駆体として存在するが、カスケードの上流に存在する活性型プロテアーゼによって特定の部位が分解されることで活性化される。

Heterodontus japonicus C-type レクチン (HjCL) は軟骨魚類ネコザメ *Heterodontus japonicus* の皮膚から見出された約 14 kDa サブユニットからなるレクチンである。本レクチンの最大の特徴として、ネコザメ自身の血液凝固を促進させることが挙げられる。HjCL の組織分布は表皮の大型細胞内に限られることから、本分子は通常、血液と接触することなく存在するが、受傷により大型細胞と真皮の血管が破壊され、HjCL と血液が接触することでその凝固が誘導されているものと推測される。すなわち、HjCL は血液凝固カスケードの起点因子としての役割を果たすものと考えられる。しかしながら、HjCL がどの血液凝固因子に作用するかは特定されていない。また、HjCL はプロテアーゼドメインをもたず、どのように本レクチンが血液凝固因子前駆体を活性化しているのかも未解明である。

本論文は HjCL が作用する血漿タンパク質を探索し、本レクチンによって開始される新奇血液凝固系の全容を明らかにするとともに、HjCL がどのようにして標的とする血液凝固因子前駆体を活性化するのか、そのメカニズムを検証したものである。

第一章では、ネコザメの血漿をゲル濾過クロマトグラフィーで分離し、それぞれの画分に HjCL を添加して分解されるタンパク質を探索している。その結果、約 110 kDa 付近のバンドが分解され、新たに約 37 kDa のバンドが出現することを見出している。LC-QTOF-MS システムを用いた *de novo* sequencing 解析により、これらのバンドはネコザメプロトロンビン (ProT) およびその分解産物であることが示された。さらに HjCL が ProT に直接作用するかを調べるために、ネコザメ血漿から 3 種類のクロマトグラフィーを用いて ProT を精製し、それに HjCL を添加した。その結果 ProT の分解が認められたことから、HjCL が ProT に直

接的に作用していることが明らかとなった。

続いて、HjCL の添加によって ProT がどのように分解されるかを調べた。ProT は N 末端側から順に Gla ドメイン、2 つの Kringle ドメイン、プロテアーゼドメインから構成される。ヒト ProT は活性型血液凝固第 X 因子、活性型血液凝固第 V 因子、 Ca^{2+} およびリン脂質から構成されるプロトロンビナーゼ複合体によって 2 ヶ所で切断され、プロテアーゼドメインのみからなる活性型のトロンビンに変換される。クローニングによって得られたネコザメ ProT の塩基配列から演繹したアミノ酸配列には、これらに相当する被切断部位が存在していた。また、哺乳類の ProT は切断される部位の優先度により、異なる 2 つの中間体、すなわち prethrombin-2 と meizothrombin を経てトロンビンに変換される。そこで、HjCL 添加に伴う ProT の分解産物パターンを決定すべく、得られた分解産物を *de novo sequencing* 解析に供した。その結果、ネコザメ ProT は prethrombin-2 を経て、トロンビンに変換されることが明らかとなった。また、ここで産生されたトロンビンがプロテアーゼ活性を持つかを検証するために、ヒトトロンビンの触媒領域に不可逆的に結合する合成阻害剤 D-phenylalanyl-prolyl-arginyl chloromethyl keton (PPACK) と反応させた。その結果、ネコザメトロンビンの B 鎖と PPACK の結合が認められた。さらに、ヒトフィブリノゲン、ヒト ProT および HjCL を混合したところ、フィブリン塊が形成された。以上のことから、HjCL がヒト ProT にも作用すること、および HjCL によって誘導されたトロンビンがフィブリノゲン分解活性を有することが明らかとなった。

第二章ではプロテアーゼドメインを持たない HjCL がどのようにしてフィブリノゲンを分解するのかを検証している。すなわち、一部のプロテアーゼ前駆体は微弱な酵素活性を有し、これにより前駆体同士での分解を伴う活性化、すなわち自己活性化が起こることが知られている。また、補酵素はそのようなプロテアーゼ前駆体の自己活性化能を増強させる。本章では、HjCL が ProT の補酵素として機能する、すなわち ProT の自己活性化を促進するとの仮説を立て、それを検証している。

補酵素がプロテアーゼ前駆体の自己活性化を促進するためには、両者の結合が不可欠である。そこでまず、HjCL と ProT が結合性を示すかをバイオレイヤー干渉法により検証した。ヒト ProT をセンサーに固相化し、アナライトとして HjCL を用いたところ、アナライト添加直後からシグナルの上昇が認められた。よって HjCL は ProT と結合することが示された。

続いて、HjCL が ProT の糖鎖に結合するかを調べた。すなわち、HjCL を 6 種類の単糖と反応させた後、これを ProT に加えたところ、糖による分解の阻害は見られなかった。このことから、HjCL が ProT の糖鎖ではなくペプチド鎖を認識し、分解を誘導していることが示唆された。そこで HjCL が ProT のどのドメインに作用しているかを調べるために、ヒト ProT から各ドメインが除去された 2 つの変異体を調製し、それらが HjCL によって活性化されるかを試験した。その結果、どちらの変異体においてもその活性化は見られなかった。これらの変異体は共通して Gla ドメインを持たないことから、HjCL は ProT の Gla ドメインに作用しているものと考えられている。





最後に ProT が自己活性化するために必要なプロテアーゼ活性を持つかを検証した。まず、ProT が時間経過とともに分解されるかを調べるために、ProT を 24 時間インキュベートしたが、その分解は認められなかった。続いて、PPACK をネコザメ ProT およびその中間体 prethrombin-2 に反応させたところ、後者でのみ PPACK の結合が認められた。prethrombin-2 は ProT の非触媒領域 Fragment-1+2 を欠いていることから、この非触媒領域が触媒部位を立体的に塞ぐことで、ネコザメ ProT の自己活性化能が抑制されている可能性が示された。以上のことから、HjCL が ProT の Gla ドメインに結合し、Fragment-1+2 の立体的な配置を変化させることで、ProT の自己活性化能を向上させているものと考察している。

レクチンは糖鎖結合タンパク質であり、微生物に対する凝集活性や貪食細胞の食作用を高めるオプソニン活性などが知られているが、本論文はレクチンがプロトロンビンを活性型に転換し血液凝固を誘導するという、極めてユニークな機能を発見している。容易に血液が流失しうる水中環境に住む魚類にとって、止血は重要な生体防御である。本論文はレクチンの新たな存在意義を明らかにした画期的な研究であり、博士論文にふさわしい内容であると判断できる。

2023 (令和 5) 年 1 月 25 日に実施した最終試験においては、論文の内容ならびに関連分野について、本人が学位を受けるために必要十分な学識並びに学力を持つことを認め、合格と判定した。以上の結果から、審査員一同はこれを北里大学・博士(水産学)の学位を授与するに値すると判定した。

なお、審査委員会は、当初論文題目「ネコザメ皮膚レクチン HjCL により開始される新奇血液凝固系の全貌解明」の「ネコザメ皮膚レクチン HjCL により開始される新奇血液凝固系」への変更を要請することとした。

論文審査担当者：

主査	北 里 大 学	教 授	高 橋 明 義	
副査	北 里 大 学	教 授	天 野 勝 文	
副査	北 里 大 学	教 授	神 保 充	
副査	九 州 大 学	教 授	中 尾 実 樹	
副査	北 里 大 学	准教授	高 田 健 太 郎	