

## 論文内容要旨

### 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

### 指導教員

筒井 繁行

### 要 旨

循環系を持つ生物において、出血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 2 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。さらに、このカスケードにはトリガーが異なる 2 つの経路があることが知られている。すなわち、組織因子によって開始される経路の外因系と、ガラスやプラスチックなどの陰性電荷を帯びた物質によって誘発される内因系である。血液が容易に流出する水という環境に生息する魚類においても、フィブリンによる血液凝固が起こることが古くから知られている。また、近年では多くの魚種において、哺乳類の血液凝固因子ホモログも確認されている。しかしながら、ほとんどの軟骨魚類と真骨魚類は内因系に関与する血液凝固第 XII 因子および血液凝固第 XI 因子を持たず、円口類はさらに血液凝固第 IX 因子および血液凝固第 VIII 因子を欠いている。これらのことから、魚類の血液凝固は主に外因系により誘起されると考えられている。

レクチンは糖に結合するタンパク質であり、様々な生物種の多様な組織に存在する。*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。

本研究では、第 1 章で 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した。第 2 章では、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。

## 第 1 章 HjCL が作用する血液凝固因子の同定

ネコザメの血漿をゲル濾過クロマトグラフィで分離し、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た。その結果、約 110 kDa 付近のバンドが分解され、新たに約 37 kDa のバンドが認められた。これらのバンドを LC-QTOF-MS システムを用いた *de novo sequencing* 解析に供したところ、両者からジンベエザメの ProT と高い同一性を示す複数のペプチド配列が得られた。このことから、これらのタンパク質はネコザメ 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示された。

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<sup>2+</sup>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、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になった。

## 第 2 章 HjCL がプロテアーゼ前駆体を活性化する分子メカニズム

第 1 章で HjCL が ProT の分解を誘導し、トロンビンに変換することを示した。しかし、HjCL はプロテアーゼドメインを持たない。一方、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、それを検証した。

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、アナライトの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 つの変異体を調整し、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た。

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可能性が示唆された。

以上、本研究により HjCL が ProT に作用してトロンビンを生産し、これがフィブリノゲンをフィブリンに変換する新奇血液凝固系の全容が明らかとなった。この系は構成する因子が既報の血液凝固系よりもはるかに少ないことから、より迅速な止血が可能であると思われる、水中生活者である軟骨魚類の恒常性の維持に極めて重要な役割を演じているものと考えられる。