



## 論 文 内 容 要 旨

熱帯及び亜熱帯の海には数多くの種類のウミヘビが棲息している。これらウミヘビの毒液は強い致死活性を示し、それは分子量7000程度の比較的小さな塩基性タンパクである神経毒成分による。類似の神経毒はコブラ毒液中からも単離されており、構造と作用の研究が盛んに行なわれている。近縁な一群の動物から得られた多くの類似タンパクの構造が明らかにされた点、極めて興味深い。

ウミヘビについては1971年、エラブウミヘビ(Laticauda semifasciata)毒液中の2種、エラプトキシンa, bのアミノ酸配列が報告されて以来、数種が知られるに至っている。本論文ではオーストラリア北岸で採集されたウミヘビ、Aipysurus laevis, Astrotia stokesii, Hydrophis ornatus, 及びフィリピン沖で採集されたHydrophis ornatus, Hydrophis inornatusの毒液から有毒成分をそれぞれ単離し、アミノ酸配列を決定した。また既に報告された蛇毒神経毒の一次構造と比較し、毒作用に必要な構造、更にウミヘビの分類について検討した。

各毒タンパクの単離、性質、及びアミノ酸配列の結果は次のように要約される。

1) ウミヘビAipysurus laevisの毒液から3種の有毒成分Aipysurus laevis a, b, cをCM-セルロース及びBio Rex 70カラムクロマトグラフィーを用いて単離した。これらの成分は平均すると毒液中のタンパク量のそれぞれ22%, 33%, 21%を占める。マウス筋肉内注射による50%致死量はどれもグラム体重あたり0.076 $\mu$ gと、極めて強い。作用様式は他の蛇毒神経毒と同様に、後シナプス膜におけるアセチルコリンレセプターに特異的に結合し、筋収縮を阻害する。

Aipysurus laevis a, b, cは、それぞれ60ケのアミノ酸残基から成る短鎖型毒(S-S結合4ケを有)である。エドマン分解法を用いてアミノ酸配列を決定したところ、3者は $\begin{matrix} a & b & c \\ \text{Lys} & \text{Met} & \text{Lys} \end{matrix}$ ,  $\begin{matrix} a & b & c \\ \text{Gln} & \text{Arg} & \text{Lys} \end{matrix}$ の置換がある他は、同じ構造を持っていた。

2) ウミヘビ、Astrotia stokesii毒液から有毒成分、Astrotia stokesii a, b, c, をCM-セルロースカラムクロマト、セファデックスG-50(fine)によるゲルろ過などで単離した。毒液中のタンパク量の約35%, 毒性の60%を占めるAstrotia stokesii a, は60ケのアミノ酸から成り、その配列はAipysurus laevis a, b, cの配列と類似していた。

タンパク量の14%及び5%を占めるAstrotia stokesii b, c, はそれぞれ70ケ及び71ケのアミノ酸から成る。部分的ではあるが、トリプシン消化ペプチドをエドマン分解すること

によって決定した *Astrotia stokesii* b のアミノ酸配列は、これまでコブラ毒液から単離された長鎖型神経毒 (S-S 結合 5 個を持つ) に類似していた。ウミヘビの毒液から毒性の強い長鎖型毒が単離されたのははじめてのことである。

3) 1973年にニューギニア近海で採集された *Hydrophis ornatus*, 1975年, フィリピン沖で採集された *Hydrophis ornatus* 及び *Hydrophis inornatus* の毒液から主な毒成分をそれぞれ単離した。これらはすべてアミノ酸 60 個から成る単鎖型毒で、トリプシン消化ペプチドのアミノ酸組成、及びペーパークロマト、高圧ろ紙電気泳動における挙動から、他のウミヘビ毒タンパクの構造との類似性に基づき、アミノ酸配列を決定した。その結果、*Hydrophis ornatus* '73 a と、*Hydrophis inornatus* '75 a とは、*Astrotia stokesii* a と同一のアミノ酸配列を持ち、一方、*Hydrophis ornatus* '75 a は異なった配列をしていた。ウミヘビ *Hydrophis ornatus* と、*Hydrophis inornatus* とは外見的に識別が困難であるといわれているが、これらの同定に毒成分の化学的分析が役立つことが示唆された。

4) *Laticauda semifasciata* 毒液中のエラプトキシン a, b, については、1971年に佐藤と田宮によって、又 エラプトキシン c については 1972年、田宮と阿部によってアミノ酸配列が決定され、報告されていたが、その一次構造を再検討し、21・22位の配列を、Glu-Ser (報告では Ser-Glu) と訂正した。

これら新たに分離し、アミノ酸配列を決定した 7 種、及び訂正した 3 種のウミヘビ神経毒の構造を、これまでに報告されているウミヘビ及びコブラからの神経毒 43 種、及びシトトキシン類 29 種の構造と比較した。タンパクが特異的な活性や毒性を示すのは空間配座に依るが、この空間配座はポリペプチド鎖におけるアミノ酸の特異的な配列によって既定されている。従って類似タンパクのアミノ酸配列で特定の位置に認められる共通残基や共通側鎖が作用の発現において重要な役割を荷っていることが考えられる。蛇毒神経毒についてその最小必須構造を考えてみた。81種の神経毒及びシトトキシン類を、一次構造上の共通性が出来るだけ大きくなるように適当な欠失をおきながら並べて比較すると、全部に共通しているのは 3. 17. 24. 45. 49. 60. 61. 66. 位の 8 個の半シスチン、44位-グリシン、50位-プロリンの 10 残基である。少しの例外はあるが極めて共通性の高いものは、25位-チロシン、27位-リジン、56位-アルキル基、63位-水酸基、64 (or 65) 位-カルボキシル基、67位-アスパラギンで、神経毒におけるこれらの残基や側鎖の他への置換がその毒の致死活性を弱めていないことから、これらが全体の構造を保つのに重要であると考えられる。一方、シトトキシン類を除き、神経毒 53 種だけに限り共通に存在する残基は 29位-トリプトファン、37位-アルギニン、39位-グリシンの 3 残基である。又、置換が毒作用を多少なりとも弱めている傾向にはあるが、神経毒において極めて共通性が高いものは、8位-水酸基、13位-トレオニン、31位-アスパラギン酸、42位-カルボキシル基、52位

ーバリン, 53位-⊕チャージ, 55位-グリシン, 58位-アルキル基, である。これら残基及び側鎖は, 毒作用発現の上で重要であろう。

ところで, 以上述べたような特定部位以外では, 蛇毒神経毒タンパクのアミノ酸配列は, その種によって様々に変化している。即ちアミノ酸配列はその種や生体が受けてきた遺伝的歴史を反映していると言え, 生物種が近縁であればある程, タンパクの構造は似ているであろうと思われる。こうした観点から, 本論文では短鎖型神経毒(ウミヘビ16種, 陸ヘビ15種)について, それぞれの配列におけるアミノ酸残基相違数を求め, 比較してウミヘビの分類を検討した。互いの相違数が30%以内のものをサブグループとすると, Hydrophids(Laticauda以外のウミヘビ), Laticauda, Cobra, Mamba の4つに分けられる。それぞれについて, 又短鎖型神経毒全体についての祖先型アミノ酸配列を, 各位に認められるアミノ酸置換を出来るだけ少ない対応遺伝子のコドンの塩基変化で説明しうるように推定し, 検討した。その結果, 各々のグループに対する祖先型配列間の遺伝距離はほぼ等しく, かつ全体に対する祖先型配列ともほぼ等しい距離にあることから, これらのグループが個々に進化したと考えられた。従って, Laticaudaをウミヘビ科に含めるのではなく, Hydrophids, Laticauda, Cobra, Mambaを並列させて分類するのが適切と思われた。

## 論文審査の結果の要旨

前田信代提出の論文はウミヘビ *Aipysurus laevis* より3種, *Astrotia stokesii* より1種, *Hydrophis ornatus* より1種, *Hydrophis inornatus* より1種合計6種の新しい神経毒タンパクを単離し, それらのアミノ酸配列の決定について記したものである。

蛇毒中の神経毒タンパクは1966年をはじめて単離されて以来約50種のアミノ酸配列が決定されている。前田はこれまでにそのうち7種の配列を明らかにし, 特にウミヘビ神経毒については, 17種のうち7種までを決定している。

以上の研究により神経毒タンパクの構造と作用の関係につき多くの知見を加えることができた。特に共通に存在する残基の一部を欠く毒タンパクが弱い毒性を示す事実の発見は重要である。

又アミノ酸配列の相同性を考慮してウミヘビ及びコブラの分類を再検討した。その結果これらの蛇がお互に同程度に相異なる *Laticauda*, *Hydrophis*, *Cobra*, *Dendroaspis* の4種に分けるのが妥当であることを示した。

以上前田信代提出の論文は, 前田が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。よって前田信代提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。