

学位論文要旨	
氏名	奥理尋
題目	<p>スナヤツメ及びニホンウナギ由来の イミダゾール関連ジペプチド分解酵素の同定 Identification of imidazole-related dipeptide-cleaving enzymes in the jawless vertebrate, Far Eastern brook lamprey (<i>Lethenteron reissneri</i>), and the ray-finned fish, Japanese eel (<i>Anguilla japonica</i>)</p>
<p>脊椎動物の骨格筋には、カルノシンやアンセリンなどの構造的にユニークなイミダゾール関連ジペプチドが高濃度で分布し、その生理的な役割に興味が持たれている。これらイミダゾール関連ジペプチドは、メタロペプチダーゼ M20A サブファミリーの 3 種類の酵素、血清カルノシナーゼ (EC 3.4.13.20, CNDP1)、サイトゾル非特異性ジペプチダーゼ (EC 3.4.13.18, CNDP2)、及びアンセリナーゼ (EC 3.4.13.5, ANSN) により加水分解されることが知られている。無頸類のヤツメウナギと条鰓類のウナギ類の一種の骨格筋には、イミダゾール関連ジペプチドを分解する酵素の存在が報告されているが、現在まで詳しい性状解析や同定はなされていない。本研究では、無頸類スナヤツメ (<i>Lethenteron reissneri</i>) とニホンウナギ (<i>Anguilla japonica</i>) 骨格筋由来のイミダゾール関連ジペプチド分解酵素の同定を行った。</p> <p>(1) スナヤツメ骨格筋からイミダゾール関連ジペプチド分解酵素の精製と同定を行った。60 kDa のサブユニットからなる酵素が単一に精製された。さらに、スナヤツメ骨格筋から 2 種類の M20A 遺伝子が単離され、1 つは 60 kDa の酵素サブユニットをコードする分泌型遺伝子、もう 1 つは、サイトゾル非特異性ジペプチダーゼをコードする非分泌型遺伝子であった。分子系統解析により、本研究で精製された酵素は、血清カルノシナーゼとアンセリナーゼの共通祖先に由来する、原始的な分泌型のジペプチダーゼ遺伝子であることが示唆され、血清カルノシナーゼにもアンセリナーゼにも分類されない、新規酵素と判断した。</p> <p>(2) ニホンウナギ骨格筋からイミダゾール関連ジペプチド分解酵素の精製と同定を行った。異なる 2 種類のイミダゾール関連ジペプチド分解酵素が骨格筋から均一的に精製され、一方は広い基質特異性、もう一方は狭い基質特異性を示した。N 末端アミノ酸配列解析、糖鎖切断解析、及び遺伝子解析により、前者は、ANSN 遺伝子によってコードされる、糖鎖が結合したサブユニットからなるホモダイマーのアンセリナーゼ、後者は、CNDP1 遺伝子によってコードされる、糖鎖が結合したサブユニットからなるホモダイマーの血清カルノシナーゼと同定された。これは、哺乳類以外の生物種からの血清カルノシナーゼの初めての報告となる。データベース検索では、CNDP1 遺伝子のオーソログはタイセイヨウサケに確認されたが、ゼブラフィッシュ、フグ、メダカなどゲノム解析が完了している他の条鰓類からは見出せなかつた。CNDP1 遺伝子と ANSN 遺伝子は肝臓で強く発現し、CNDP2 遺伝子は全組織で発現していた。</p>	

学位論文要旨

氏名	Takahiro Oku
題目	<p>Identification of imidazole-related dipeptide-cleaving enzymes in the jawless vertebrate, <i>Far Eastern brook lamprey (Lethenteron reissneri)</i>, and the ray-finned fish, Japanese eel (<i>Anguilla japonica</i>)</p> <p>スナヤツメ及びニホンウナギ由来の イミダゾール関連ジペプチド分解酵素の同定</p>

Imidazole-related dipeptides, such as carnosine and anserine, occur widely in skeletal muscles of jawed vertebrates. Three enzymes, serum carnosinase (EC 3.4.13.20, CNDP1), cytosolic nonspecific dipeptidase (EC 3.4.13.18, CNDP2), and anserinase (EC 3.4.13.5, ANSN), are known to be capable of catalyzing the hydrolysis of these dipeptides in vertebrates. Current research clarified as follows;

(I) The enzymatic characterization and molecular identification of an unidentified imidazole-related dipeptide-cleaving enzyme from the skeletal muscle of Far Eastern brook lamprey (*Lethenteron reissneri*). A 60-kDa subunit protein of the enzyme was purified to near homogeneity. Two M20A genes were cloned from the skeletal muscle of Far Eastern brook lamprey; one was a secretorytype gene encoding for the 60-kD protein, and another was a non-secretory-type gene presumably encoding for cytosolic nonspecific dipeptidase. The findings indicate that the purified enzyme is a *N*-glycosylated secretory M20A dipeptidase distributed specifically in the jawless vertebrate group, and may be derived from a common ancestor gene between serum carnosinase and anserinase. These results suggest that this dipeptidase is a novel secretory M20A enzyme and is classified as neither serum carnosinase nor anserinase.

(II) The purification and identification of two unidentified imidazole-related dipeptide-cleaving enzymes from Japanese eel (*Anguilla japonica*). Two different dipeptidases were successfully purified to homogeneity from the skeletal muscle; one exhibited a broad substrate specificity, while the other a narrow specificity. N-terminal amino-acid sequencing, deglycosylation analysis, and genetic analysis clearly revealed that the former is a homodimer of glycosylated subunits, encoded by ANSN, and the latter is another homodimer of glycosylated subunits, encoded by CNDP1; that is, anserinase, and serum carnosinase respectively. This is the first report on the identification of serum carnosinase from a non-mammal. Database search revealed presence of a CNDP1 ortholog only from Atlantic salmon, but not from other ray-finned fish species, such as zebrafish, fugu, and medaka whose genomes have been completely sequenced. The mRNAs of CNDP1 and ANSN are strongly expressed in the liver of Japanese eel, compared with other tissues, while that of CNDP2 is widely distributed in all tissues tested.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	奥 理尋
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 西 隆一郎 副査 鹿児島 大学 教授 板倉 隆夫 副査 琉球 大学 教授 屋 宏典 副査 鹿児島 大学 准教授 大塚 彰 副査 鹿児島 大学 准教授 小松正治
審査協力者	
題 目	スナヤツメ及びニホンウナギ由来のイミダゾール関連ジペプチド分解酵素の同定 Identification of imidazole-related dipeptide-cleaving enzymes in then jawless vertebrate, Far Eastern brook lamprey (<i>Lethenteron reissneri</i>), and the ray-finned fish, Japanese eel (<i>Anguilla japonica</i>)

奥 理尋氏が申請した学位論文「スナヤツメ及びニホンウナギ由来のイミダゾール関連ジペプチド分解酵素の同定 Identification of imidazole-related dipeptide-cleaving enzymes in then jawless vertebrate, Far Eastern brook lamprey (*Lethenteron reissneri*), and the ray-finned fish, Japanese eel (*Anguilla japonica*)」を審査した。

その結果、本学位論文では、

(1) スナヤツメ骨格筋からイミダゾール関連ジペプチド分解酵素の精製と同定を行った。60 kDa のサブユニットからなる酵素が単一に精製された。さらに、スナヤツメ骨格筋から 2 種類の M20A 遺伝子が単離され、1 つは 60 kDa の酵素サブユニットをコードする分泌型遺伝子、もう 1 つは、サイトゾル非特異性ジペプチダーゼをコードする非分泌型遺伝子であった。分子系統解析により、本研究で精製された酵素は、血清カルノシナーゼとアンセリナーゼの共通祖先に由来する、原始的な分泌型のジペプチダーゼ遺伝子であることが示唆され、血清カルノシナーゼにもアンセリナーゼにも分類されない新規酵素と判断し

そして、

(2) ニホンウナギ骨格筋からイミダゾール関連ジペプチド分解酵素の精製と同定を行い、異なる2種類のイミダゾール関連ジペプチド分解酵素が骨格筋から均一的に精製され、一方は広い基質特異性、もう一方は狭い基質特異性を示すことを明らかにした。また、N末端アミノ酸配列解析、糖鎖切断解析、及び遺伝子解析により、前者は、ANSN遺伝子によってコードされる糖鎖が結合したサブユニットからなるホモダイマーのアンセリナーゼ、後者はCNDP1遺伝子によってコードされる糖鎖が結合したサブユニットからなるホモダイマーの血清カルノシナーゼと同定した。これは、哺乳類以外の生物種からの血清カルノシナーゼの初めての報告となる。データベース検索では、CNDP1遺伝子のオーソログはタイセイヨウサケに確認されたが、ゼブラフィッシュ、フグ、メダカなどゲノム解析が完了している他の条鰓類からは見出せなかった。CNDP1遺伝子とANSN遺伝子は肝臓で強く発現し、CNDP2遺伝子は全組織で発現していることを明らかにした。

このように、本論文では、科学的な解析・分析手法を用いて、水産学的および生化学的に重要な発見および報告がなされており、貢献度の高い学位論文と考えられる。

(学位第9号様式)

No. 1

最終試験結果の要旨

学位申請者 氏 名	奥 理尋
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 西 隆一郎
	副査 鹿児島 大学 教授 板倉 隆夫
	副査 琉球 大学 教授 屋 宏典
	副査 鹿児島 大学 准教授 大塚 彰
	副査 鹿児島 大学 准教授 小松正治
審査協力者	
実施年月日	平成 25年 1月 22日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと.)	<input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答
<p>主査及び副査は、平成 25年1月22日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（水産学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	奥 理尋
質問1: Con Aで分画する際、非吸着画分には糖鎖を持たないCNDPが混入しているか。	
回答1: 非吸着画分にはCNDPが回収されていると考えられる。	
質問2: Con Aで分画する際、非吸着画分に糖鎖をもたない血清カルノシナーゼが混入しているとは考えられないか。	
回答2: 予備実験において、非吸着画分に存在する酵素は極めて不安定であり、その後の精製を進めることができない。従って、糖鎖を持たないタイプの血清カルノシナーゼの混入はわからない。	
質問3: mRNAの発現量と酵素活性の関係性はあるか。	
回答3: 検討していないのでわからない。	
質問4: 酵素は筋肉中に多く存在しているようだが、mRNAは肝臓で強く発現している。これは、酵素が肝臓中で何か働いていることをいみするのかか。	
回答4: 特に肝臓中で働いているのではないが、本酵素は糖鎖を持つ分泌型の酵素なので肝臓を通じて体内に送られる。	
質問5: 糖鎖が無いと活性も無くなるのか。	
回答5: 糖鎖を切断したものの酵素活性は調べていないので、わからない。	
質問6: この酵素はダイマーの形で体内に存在するのか。	
回答6: 本酵素は、ホモダイマーのタンパク質として体内に存在します。	
質問7: 酵素の生理学的意義は何か。	
回答7: 例えば、血清カルノシナーゼとヒトの糖尿病性腎障害との遺伝的関係が報告されている。	
質問8: 糖鎖の異なるタイプの酵素があるが、糖鎖の役割は何か。	
回答8: 糖鎖の役割については報告されていません。また、糖鎖が酵素活性に与える影響も調べていない。	
質問9: スナヤツメの60kDaのバンドの上に見えるスマアなバンドは、関係ないか。	
回答9: 論文で触れていないが、スマアなバンドについてもN末端アミノ酸配列を解析したが、全く関係なかった。	