

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 11 年度博士課程 進学

氏名 田角 聡志

指導教官名 鈴木 譲

論文題目 ウナギ体表粘液レクチンに関する研究

魚類は水中生活者であることから陸上生物とは異なり、皮膚において常に異物が侵入するおそれがある。その皮膚の表面を覆っている体表粘液中には免疫グロブリン、補体、溶血素、C 反応性タンパク質、レクチンなどといった、生体防御に関与する因子が多く存在することが知られている。このうち、レクチンは糖に結合するタンパク質として知られており、菌類から動物まで、様々な生物にみられる。動物ではこれまで体内のレクチンを中心に研究が進められており、それらの多くについて構造が解析されている。また、体内レクチンの役割には様々なものが報告されているが、補体経路の活性化など、生体防御に関与する機能も知られている。一方、体外のレクチンに関しては、多くの魚種の体表粘液中にその存在が報告され、単離精製されたものも少なくないものの構造に関する報告は 1 例しかなく、機能の解析はほとんど行われてこなかった。本研究では、粘液中に強いレクチン活性がみられ、また粘液量も豊富なウナギ *Anguilla japonica* を材料として、まずレクチンの単離精製を行い、活性の生化学的特性を調べた。ついでこのレクチンをコードする遺伝子の構造、およびアミノ酸配列の解析を行うとともに、発現組織の同定とその組織における分布について調べた。さらに、グラム陰性菌の 1 つである大腸菌 *Escherichia coli* に対するこのレクチンの活性について調べることで、機能解明の手がかりを得ることを目指した。

第 1 章 ウナギ体表粘液抽出液のレクチン活性の性状解析

ウナギを 2-フェノキシエタノールで麻酔し、体表から出血しないように注意しながら粘液をかき取り、5 倍重量のバッファーを加えホモジェナイズした。

これを 10,000 rpm で 30 分間遠心分離し、上清を粘液抽出液とした。ついで、粘液抽出液の赤血球凝集活性に対する熱、pH、塩濃度の影響について調べた。活性は 40℃で 20 分間加熱しても低下せず、常温では比較的安定であることが示された。また、pH 5 から 12 の広い範囲で安定であることが示された。さらに、1 M NaCl 存在下でも活性は変化しなかった。つぎに、レクチンの性状解析において重要である、活性の Ca^{2+} イオン要求性および特異糖の検索を行った。活性は EDTA または EGTA 添加により低下せず、また Ca^{2+} イオンの添加により上昇しなかったことから、 Ca^{2+} イオン非依存性であることが明らかとなった。一般に Ca^{2+} イオン依存性活性を示すレクチンは C 型レクチンに分類されることから、この結果はこのレクチンが C 型ではないことを示唆している。また、今回調べた糖類の中ではラクトースのみが活性阻害を示し、最小阻害濃度が 3.125 mM と低かったことから、このレクチンはラクトースに特異的結合をすることが推定された。以上の性質を総合すると、このレクチンを精製するには pH 7.0 前後のバッファーを用いて体表粘液を抽出し、ついで同じバッファーを用いたラクトース-アフィニティークロマトグラフィーに供した後、必要に応じてゲル濾過やイオン交換クロマトグラフィーを適用すればよいと考えられた。

第 2 章 ウナギ体表粘液レクチンの精製と性状解析

ラクトースをリガンドとして Sepharose に導入したゲル担体をつめたカラムに体表粘液抽出液を通し、十分量の PBS で洗浄した。その後、50 mM ラクトースを含む PBS で溶出したところ鋭い単一のピークがみられ、この画分に活性が認められた。ついでこのピーク画分を濃縮し、さらに Superose 6 によるゲル濾過に付したところ 2 つのピークがみられ、これらのピーク画分は単独で活性を示した。はじめに溶出したレクチン(以下、AJL-1 とする)は Native PAGE で移動度が小さいスミアなバンドとなり、SDS-PAGE では非還元、還元両条件で約 15kDa を示した。また、MALDI-TOF-MS により分子量は 16091 Da と決定された。さらに、ゲル濾過により推定されたこのレクチンの分子量は約 30 kDa であった。これらより、AJL-1 は非共有結合により 2 量体を形成して活性を示していると考えられた。一方、後から溶出されたレクチン(以下、AJL-2 とする)は Native PAGE で移動度の大きいシャープなバンドとなり、非還元 SDS-PAGE で約 32kDa、還元 SDS-PAGE では約 16kDa を示した。また、MALDI-TOF-MS により分子量は 31743 Da と決定された。これらの結果、AJL-2 は約 16 kDa のサブユニットがジスルフィド結合により 2 量体を形成して活性を示しているものと推定された。これらのレクチンは両者とも、温度、pH、塩の添加に対して安定であった。さらに、両者とも Ca^{2+} イオン非依存的活性を示

すことが明らかとなった。また、活性阻害は AJL-1 では D-ガラクトース、N-アセチル-D-ガラクトサミン、ラクトース、メリピオースでみられ、特にラクトースに対する特異性が高いことが示された。AJL-2 は調べた糖類ではラクトースのみに特異性を示した。つぎに、AJL-1 および 2 の N 末端アミノ酸配列の解析を行ったところ、AJL-1 はブロックされていて決定できなかったが、AJL-2 については 40 残基まで決定できた。最後に、マアナゴの体表粘液中に存在するレクチンである congerin I および II に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、AJL-2 にはいずれの抗体も反応しなかったが AJL-1 には 2 つの抗体とも交差反応を示し、AJL-1 が congerin と同じレクチンファミリーに属していることが推定された。

第 3 章 AJL-1 の 1 次構造および分布の解析

AJL-1 は N 末端がブロックされていたため、ペプチダーゼにより断片化しこれらの配列を解析したところ 5 つの内部配列が得られた。このうち 1 つに基づきプライマーを作製し、皮膚 cDNA を鋳型として 3'-および 5'-RACE によりこのレクチンをコードする塩基配列を決定した。ホモロジー検索の結果、AJL-1 は多くの動物のガレクチン (Ca^{2+} 非依存的に β -ガラクトシドに対して特異的活性を示すレクチンファミリー) と比較的高い相同性を示すことが明らかとなった。これらのうち congerin II がもっともスコアが高く、congerin と同様にシステイン残基をもたない、特殊なガレクチンであることも明らかとなった。AJL-1 は、ヒト galectin-2 においてラクトースと直接結合することが明らかにされている 7 つのアミノ酸残基をほぼ完全に保存しており、ガレクチンの糖認識部位 (carbohydrate recognition domain, CRD) を保存していることが明らかとなった。また、分子量を計算したところ 16.07 kDa となり、第 2 章で測定された分子量とほぼ一致した。このことから、この配列の 130-132 残基目の部分に、N 結合型糖鎖が結合しうる配列 (NIS) が認められたが、AJL-1 は糖鎖をもたないと考えられた。ノーザンハイブリダイゼーションの結果、皮膚で特異的に発現していることが明らかとなった。発現量には個体差がみられたが、病気に対して特に高い抵抗性を示した 1 個体で発現量が多く、このレクチンと耐病性との関係が示唆された。

第 4 章 AJL-2 の 1 次構造および分布の解析

N 末端アミノ酸配列に基づき作製したプライマーを用いて、皮膚 cDNA を鋳型とした縮重 PCR、3'-および 5'-RACE により AJL-2 をコードする塩基配列を決定した。ホモロジー検索の結果、多くの C 型レクチンの CRD と比較的高い相同性を示すことが明らかとなった。これまでに C 型 CRD 内には 2 分子の Ca^{2+}

イオンの存在が報告されている。AJL-2 は糖との結合にも関与する 2 つめの Ca^{2+} イオンと結合するアミノ酸残基を完全に保存していたが、1 つめについては 4 つの残基のうち 1 つが欠失していた。第 2 章で AJL-2 は活性の面からは C 型でないことが示されたが、本章の結果から、構造上は C 型であることが示された。このように AJL-2 が相反する性質を持っているのは上述した 1 つめの Ca^{2+} イオンと結合するアミノ酸残基の欠失による可能性がある。さらに、AJL-2 の糖結合特異性モチーフの配列がこれまでにマンノース特異的であるとされた EPN であった。しかし、AJL-2 はマンノース特異的ではなくラクトース特異的であることから、既知のものとは異なるモチーフをもつ可能性が示された。つぎに AJL-2 の配列の分子量を計算したところ、第 2 章で測定された分子量の 1/2 であることが明らかとなった。これらから、AJL-2 は分子量 15.87 kDa のサブユニット 2 個からなる 2 量体を形成していることが明らかとなった。さらに、このレクチンが糖鎖をもっていないことが考えられる。ノーザンハイブリダイゼーションの結果、皮膚で特異的に発現していることが示された。また、精製 AJL-2 に対する抗血清を用いた免疫組織化学により、皮膚における分布を調べたところ、棍棒状細胞に存在することが明らかとなった。

第 5 章 AJL-1, 2 の機能解析

AJL-1, 2 の大腸菌 *E. coli* K 12 株に対する凝集能をホルマリン死菌を用いて検討したところ、AJL-1 は凝集しなかったのに対して AJL-2 は強く凝集した。つぎに、この大腸菌株の成長に対する AJL-1, 2 の影響を調べたところ、両者ともコントロールの菌に比べて成長速度を遅らせることが明らかとなった。これらから、AJL-2 では菌を凝集させることで凝集塊内部の菌に酸素不足を引き起こして菌の増殖を遅らせるものと考えられるのに対し、AJL-1 の阻害機構は全く不明である。

以上、本研究によりウナギ体表粘液中に存在するラクトース特異的レクチンの生化学的性質が明らかとなり、構造が決定され、発現組織が同定された。さらに機能について若干の検討を行った。これらの成果は、まだ基礎的知見の乏しい体表粘液レクチンについて多くの情報を提供するものである。今後、本研究で得られた成果を手がかりにして、病原性細菌に対する作用やこれらのレクチンと耐病性との関係を明らかにし、育種や養殖技法の改善につなげていくことが期待される。