

## 論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 13 年度博士課程 進学

氏名 筒井繁行

指導教官名 鈴木譲

論文題目 Skin Mucus Lectin of Pufferfish, *Takifugu rubripes*

(トラフグ *Takifugu rubripes* の体表粘液レクチン)

水産増養殖にとって最大の課題は病気の克服である。魚類においても、感染成立後の免疫応答に関しては多くの理解が得られるようになってきたが、病原体の体内への侵入を未然に防ぐ、外壁での防御機構についての知見は乏しい。細菌や寄生虫の生存や伝播に好都合な水中環境で生活する魚類にとって、皮膚は重大な感染経路であり、防御の場でもある。魚類の表皮は粘液で覆われているが、この粘液中には免疫グロブリンなどの様々な生体防御因子が含まれていることが知られている。レクチンもその一つである。

糖鎖と結合するタンパクであるレクチンは、細菌から植物、動物までのあらゆる生物界に分布している。これまでに体内に分布する一部の動物レクチンで防御因子としての機能が解明されている。一方、体表に分泌されるレクチンについては、今日までにいくつかの魚種の体表粘液から単離精製されているものの、その詳細な構造や機能は必ずしも明らかとなっていない。近年、マアナゴの体表粘液から 2 種類のガレクチンについてその構造が解明されたのに続き、ウナギがガレクチンに加えて構造の全く異なる C 型レクチンを粘液中に併せ持つことが示された。レクチンが示す赤血球凝集活性は、トラフグの体表粘液にも見られる。トラフグはゲノム DNA データベースが充実しているため、体表での防御機構を総合的に理解する上で格好の研究材料であるが、本研究はその一環として、トラフグ体表粘液レクチンに関する基礎的知見の蓄積、およびその機能の解明を目指したものである。

## 第一章 トラフグ体表粘液レクチンの単離精製とその性状解析

トラフグの体表粘液抽出物をイオン交換クロマトグラフィーに供し、ウサギ赤血球を凝集するレクチンの部分精製品を得た。次に 10 種類の糖を用いて、トラフグレクチンの特異糖を検索したところ、これまでに単離されている魚類体表粘液レクチンの多くがラクトース特異的であるのに対し、本レクチンの特異糖がマンノースであることが示された。そこで、マンノースをリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーを用いることにより、体表粘液抽出物からレクチンを精製した。還元、非還元 SDS-PAGE、MALDI-TOF mass、およびゲル濾過クロマトグラフィーの結果から、本レクチンは、約 13kDa のサブユニットが非共有結合により二量体を形成しているものと推定された。また、本レクチンのウサギ赤血球凝集活性は、 $\text{Ca}^{2+}$ イオン、および EDTA の添加による影響を受けなかったことから、本レクチンが  $\text{Ca}^{2+}$ イオン非依存性であることが示された。本レクチンの特異糖がマンノースであり、 $\text{Ca}^{2+}$ イオン非依存性および SDS-PAGE の泳動パターンから、本レクチンがガレクチン、C 型レクチンのいずれでもないことが示唆された。

## 第二章 トラフグ体表粘液レクチンの一次構造の決定とその発現組織解析

アフィニティークロマトグラフィーで精製したレクチンをリジルエンドペプチダーゼにより断片化し、逆相 HPLC で分離後、プロテインシーケンサーに供し、2 箇所内部アミノ酸配列を得た。この配列を基に縮重プライマーを設計し、皮膚由来の cDNA を用いた RACE 法によるクローニングを行い、116 残基のアミノ酸をコードする、527bp からなるレクチン cDNA の塩基配列を決定した。ホモロジー検索の結果、本レクチンは、既知の動物レクチンとは一切相同性を示さず、マツユキソウ、ニンニクなどのユリ目植物のマンノース結合レクチンと類似する新規のレクチンであることが明らかとなった。ユリ目植物レクチンのマンノース結合部位は、3 箇所の Q-X-D-X-N-X-V-X-Y 配列であることが知られているが、トラフグ体表粘液レクチンのアミノ酸配列の中にも、このうちの 2 箇所が完全に保存されていた。これまでに構造決定されているウナギ目魚類体表粘液レクチン 4 種は、ガレクチンまたは C-タイプレクチンファミリーに属している。本研究の結果は、魚類がその体表粘液中に、赤血球凝集という共通の活性を持ちながらも、構造的には多様なレクチン分子を有している事を示唆している。

RT-PCR 法およびノザンブロット法を用いて、筋肉、肝臓、心臓、腎臓、頭腎、脾臓、脳、生殖腺、鰓、口腔壁、食道、腸、および皮膚での本レクチン遺伝子の発現を調べたところ、RT-PCR 法では鰓、口腔壁、食道、および皮膚でバンドが検出されたのに対し、ノザンブロット解析では、これらに加えて腸でもシグナルが認められた。そこで腸由来の cDNA および新たに作製したプライマーを用いてクローニングを行ったところ、アミノ酸レベルで

91.4%の同一性を示す腸型アイソフォームの cDNA が得られた。さらに RT-PCR 法の結果から、このアイソフォーム遺伝子が腸でのみ発現していることが明らかとなった。この腸型アイソフォームも皮膚型レクチンと同様にユリ目植物レクチンのマンノース結合部位の配列を 2 箇所保存していた。実際、腸抽出液をマンノースアフィニティーカラムに供したところ、ウサギ赤血球に対する凝集活性を持つレクチンが単離されたが、このレクチンは、後述の抗皮膚型レクチン抗体と反応したことから、腸型レクチンであると考えられた。これら一連の結果は、遺伝子重複により分岐した遺伝子は発現部位を異にしながら分岐前の機能を持つ、とする DDC 理論に合致している。

### 第三章 トラフグ体表粘液レクチン産生細胞の同定

これまでウナギ目の 2 種において、表皮の棍棒状細胞でのレクチンの存在が報告されているが、トラフグは同細胞を持たない。そこでトラフグでのレクチンの分布、およびその産生細胞を明らかにするため、免疫染色および *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。ウサギにトラフグ体表粘液中から精製した皮膚型レクチンを注射し、皮膚型、腸型両レクチンに反応する抗体を得た。次に発現組織解析で陽性を示した皮膚、鰓、口腔壁、食道、および腸の組織切片を作製し、この抗体を用いて免疫染色を行ったところ、皮膚型レクチンは皮膚、鰓、口腔壁、および食道の上皮細胞に、腸型レクチンは腸の上皮細胞と粘液細胞に分布することが示された。一方、皮膚型、腸型両レクチンの mRNA を認識するプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションの結果、皮膚型、腸型両レクチンの mRNA はいずれの組織においても上皮細胞でのみ合成されることが明らかになった。以上のことから、皮膚型と腸型レクチンとは分泌様式が異なる可能性が示された。

### 第四章 トラフグ体表粘液レクチンの糖鎖結合部位

遺伝子組み替え技術を用いて、2 箇所の Q-X-D-X-N-X-V-X-Y 配列 (N 末端側から site 1 および site 2 とする) にアミノ酸置換を起こした 6 種類の変異型、および野生型の His-tag 標識リコンビナントタンパク質を作製し、マンノース結合性を比較した。各リコンビナントタンパク質を大腸菌に発現させ、メタルアフィニティーカラムおよびイオン交換カラムを用いて精製した後、濃度を 500 µg/ml に調整し、マンノースアフィニティークロマトグラフィーに供した結果、野生型および site 2 変異型のリコンビナントタンパク質が同様にマンノースカラムに結合したのに対し、site 1 変異型はいずれもマンノースカラムに結合しなかった。このことから、トラフグ体表粘液レクチンの site 1 がマンノースとの結合に必須であることが明らかとなり、site 2 の機能については不明であるものの、本レクチンがユリ目植物レクチンと同じマンノース結合部位を持つことが示された。

## 第五章 トラフグ体表粘液レクチンの機能解析

本レクチンの生体防御因子としての機能を解明するため、本レクチンの、魚病細菌、寄生虫に対する結合性について検討した。5種類のグラム陰性菌、*Aeromonas hydrophila* FPC 866、*Edwardsiella tarda* FPC 499、*Pseudomonas plecoglossicida* FPC 337、*Vibrio anguillarum* FPC 675、およびグラム陽性菌 *Streptococcus difficile* FPC 576 のホルマリン死菌に対する本レクチンの凝集活性を調べたが、本レクチンはこれらの菌のいずれをも凝集しなかった。次に蛍光標識した本レクチンをトラフグの寄生虫である *Heterobothrium okamotoi* に添加し、蛍光顕微鏡下で観察したところ、寄生虫の表面から明瞭な蛍光が検出され、本レクチンがこの寄生虫に結合することが示された。トラフグは *H. okamotoi* を排除できないものの、この結果は、本レクチンの寄生虫に対する作用を示唆した。

以上、本研究により、トラフグ体表粘液レクチンの性状が明らかとなり、構造が決定され、発現組織、分布細胞が同定された。さらに生化学的、生物学的な機能についても検討を行った。本レクチンは寄生虫に結合するばかりでなく、飼育環境水から単離されたある種の細菌に対して凝集活性を持つ（間野ら私信）。近年、哺乳類において、腸管や肺等の粘膜組織の表面で機能する、体内の免疫とは独立した粘膜免疫系に注目が集まっているが、トラフグで、外部環境との接点であり、且つ生体防御の場として重要である皮膚、消化管といった体の外側にレクチンの分布が確認されたことは、本レクチンが粘膜免疫系において何らかの役割を演じている可能性を示している。今後、本レクチンの詳細な機能解析を行い、増養殖の分野に応用されることが期待される。