

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380118

研究課題名（和文） 魚類卵レクチン機能の分子機構解析と応用への展開

研究課題名（英文） Molecular mechanism of the function of fish egg lectins and its application

研究代表者

村本 光二（MURAMOTO KOJI）

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：90157800

研究成果の概要（和文）：魚類卵から単離したラムノース結合特異性レクチン(RBL)の機能性に係る分子機構を解析した。RBLは、糖脂質やリポ多糖を介して細菌や微孢子虫に結合し、生体防御に働くことを示した。シロサケ RBL である CSL1~3 の精密構造を新規クロマト技術と X 線結晶解析により明らかにした。CSL は、魚類マクロファージにおける貪食作用や、炎症性サイトカインと活性酸素の産生を促進するとともに、緑膿菌の感染阻止やヒト結腸ガン細胞のアポトーシスを誘導した。これらの機能性を応用するために CSL 組換え体の発現系を構築した。

研究成果の概要（英文）：The molecular mechanism of the functions of rhamnose-binding lectins (RBLs) from fish eggs was revealed. RBL played a role in biodefense by binding to a microsporidian as well as bacteria via glycolipids and lipopolysaccharides. The precise structures of three RBLs, CSL1, CSL2 and CSL3, from chum salmon were analyzed by using a novel chromatographic technique and X-ray crystallography. CSLs had the opsonic effect on the macrophage cell line from rainbow trout and induced the production of proinflammatory cytokines and reactive oxygen species. They were applied to reduce the infiltration of an opportunistic bacterium and induce the apoptotic death of human colon adenocarcinoma cell lines. Furthermore, the expression system for recombinant RBLs was constructed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：レクチン，魚類卵，糖鎖，生体防御，ラムノース

1. 研究開始当初の背景

レクチンは代表的な糖鎖認識機能分子であり、ヒトなどの哺乳動物における発生・分化、生体防御、アポトーシス等における働きが次々に明らかにされている。われわれは、サケ科魚類未受精卵での L-ラムノース結合特異性レクチン(RBL)の発見を端緒に、この新規ファミリーに属するレクチンを 10 種類

以上単離して生化学的性状を明らかにした。RBL は主に肝臓と卵巣で合成され、血流を介して多くの組織に分布している。これらはいずれも、4 本のドメイン内 SS 結合で安定化された約 95 アミノ酸残基からなる糖鎖認識ドメイン(CRD)が 2~3 回タンデムに繰り返された構造からできており、微生物・植物には存在するが動物には存在しない L-ラムノース

を特異的に認識して結合した。これらの特性をもつ RBL とその CRD は、病原微生物制御を目指した薬剤やチップ・センサーのプロブ、さらにはキメラ・ハイブリッド分子の構成ユニットとしての糖鎖パターン認識モジュールとしての応用が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、魚類卵から単離したラムノース結合特異性レクチン(RBL)の構造と機能性を精査することによって、魚類免疫細胞活性化の分子機構を解明すること、RBL の糖鎖認識ドメイン(CRD)の組換え体を作成すること、さらに、それらを糖鎖パターン認識モジュールとして、病原微生物制御や抗腫瘍タンパク質としての応用に資することを目的にした。

3. 研究の方法

(1)免疫細胞活性化の分子機構：ニジマス腹腔内マクロファージの培養細胞(RTM5)にシロサケ卵由来の RBL (CSL1, CSL2, CSL3) を投与し、細胞内活性酸素の生成とサイトカイン発現を誘導した。炎症性サイトカインの遺伝子発現は、リアルタイム PCR、活性酸素は DCFDA を用いた蛍光法で分析した。食食作用は蛍光標識ラテックスビーズの細胞内への取込みを蛍光顕微鏡で計測して調べた。RTM5 を糖脂質合成酵素阻害剤で処理し、RBL による活性化への影響を検討した。

(2)RBL の精密構造解析：CSLs のサブユニット構造を動的光散乱法、およびホスホリルコリン固定化カラムによるゲル濾過クロマトにより分析した。また、CSL の結晶化を行い、X 線構造解析でレクチンと糖鎖の相互作用様式を調べた。糖鎖認識部位の 3 次元構造座標データを、統合計算化学システム MOE を用いて解析し、その構造原理を明らかにした。

(3)CSL・CRD 組換え体発現系の構築：シロサケの未受精卵および肝臓から抽出した RNA を用いて CSL1~3, および CSL1 の 3 つの CRD の発現プラスミドを作成した。これらの発現プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) に形質転換してリコンビナント CRD の発現系を構築した。

(4)RBL 機能性の応用：ヒト結腸ガン由来細胞株に対する細胞毒性、培養細胞で作成した腸管上皮モデルの輸送機構に対する調節作用、および緑膿菌に対する感染阻害活性を調べた。

4. 研究成果

(1)免疫細胞活性化の分子機構：いずれの CSL も RTM-5 細胞における IL-1 β 1, IL-1 β 2, TNF- α 1, TNF- α 2, IL-8, IL-11, IL-10, IFN- γ , γ IP-10 遺伝子を誘導した。しかし、IL-18A と IL-18B 遺伝子の発現量には影響しなかった。CSL2 は、5~10 μ g/mL 付近で最も強く発現を誘導し、それ以上の濃度では発現量の低下が

みられた。一方、CSL1, 3 は 50~100 μ g/mL 付近で発現量が最も増加した。CSL 間の相同性は約 50% であるが、レクチン活性やサイトカイン誘導活性の差は、サブユニット構造の違いにも起因すると考えられる。

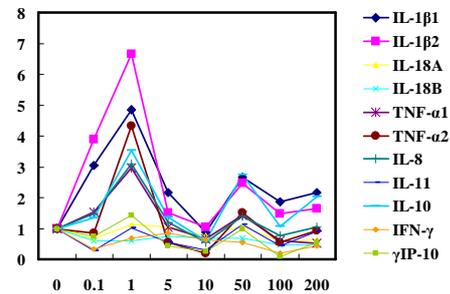


図1 RTM-5 細胞における CSL2 (μ g) によるサイトカイン誘導活性

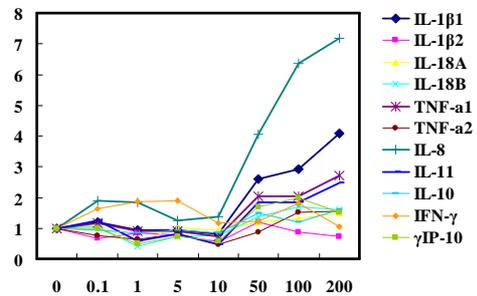


図2 RTM-5 細胞における CSL3 (μ g) によるサイトカイン誘導活性

蛍光標識 CSL の RTM-5 細胞への結合はラムノースで阻害された。CSL は細胞表面に点在する糖脂質 Gb3 に特異的な結合性し、Gb3 の合成阻害剤や抗 Gb3 抗体の添加により CSL 活性は抑制された。RBL は、魚類の肝臓や卵巣で発現し、肝臓、腎臓、血清、腸、エラ、脾臓など各種臓器に存在していた。また、血中の白血球、鰓の粘液細胞、腸の杯細胞など免疫系細胞に存在して、グラム陰性菌や陽性菌とリポ多糖やリポテイコ酸を介して相互作用し、微生物の凝集を引き起こした。活性酸素の産生能の強さは、CSL2 で最も強く、次に CSL1, CSL3 の順であった。これは赤血球凝集活性およびサイトカイン誘導活性の強さと一致したが、ラムノースでは阻害されず、糖認識部位以外が作用に関与している可能性が示唆された。

(2)RBL の精密構造解析：疎水性が強く特異な構造を有する魚類卵由来のラムノース結合特異性レクチンは、通常のゲル濾過カラムに吸着するため分子量が測定できず、従来、サブユニット構造を解析することができなかった。そこでホスホリルコリンを固定化したゲル濾過クロマトグラフィー担体として用

い、シロサケ卵由来のレクチンのサブユニット構造の解析に成功した。CSL1~3, それぞれの分子量を 119k, 379k, 42k と見積られ、動的光散乱法および電気泳動の結果を総合して、各レクチンのサブユニットはそれぞれ 4 量体, 18 量体, 2 量体であると決定した。これらのレクチンの構成サブユニット数と各レクチンの生理活性の強さには高い相関がみられた。

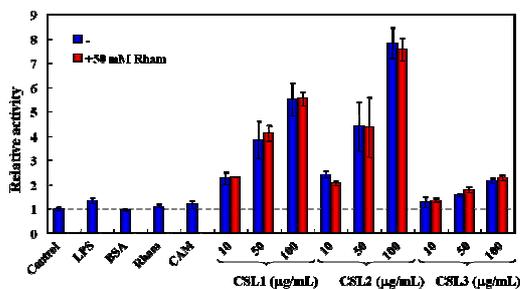


図3 RTM-5細胞におけるCSL3による活性酸素産生刺激活性

Spring-8のビームラインBL38B1とCCD検出器を用いて異常分散法によりCSL3およびCSL3とラムノース、メリビオース、およびGb3との複合体結晶のX線回折像を得た。CSL3は、サブユニット内の2つのCRDがリンカー(-Gln-Gln-Gln-Glu-Thr-)で繋がった亜鈴構造をとり、そのサブユニットが2つ交差したユニークな擬似4量体構造を示した。各CRDは、5つのβ構造からなる2つの逆平行βシートと3つのヘリックス構造から構成されていた。糖との結合には、Glu7, Tyr27, Arg39, Gln43, Asn74, Asp79, Gly83, Lys86が主に関わっており、これらのアミノ酸残基にはRBL内で高い保存性がみられた。特異的で強い結合($K_d=2.6 \times 10^{-5} M$)がみられるGb3との間には10本の水素結合が存在した。

(3) CSL・CRD組換え体発現系の構築: PCRを用いてCSL1の3つのCRDをコードする断片を増幅させ、N末端側にHisタグを有するpET-15bベクターにサブクローニングし、それぞれのCRDの発現プラスミドを作成した。これらが大腸菌に形質転換して組み換え体CRDを発現させた。これらを可溶化後、ニッケルキレートカラムで単離した。これをリフォールディングしたのち、ラムノースカラム精製して各組み換え体CRDを得た。

(4) RBL機能性の応用: ヒト結腸ガン由来の培養細胞Caco-2, Lovo, DLD-1, HCT-15にCSLを添加したところ、Caco-2とLovoにはアポトーシスがみられ、ほかの細胞には影響が認められなかった。リガンド糖やリン脂質合成酵素阻害剤の添加試験により、活性の違いは

細胞表面のGb3の有無によることが分かった。また、Caco-2細胞の単層膜を腸管モデルとして用いた透過輸送試験においてCSLはタイトジャンクションやP糖タンパク質の輸送経路を増加させた。さらに、CSLは緑膿菌のバイオフィーム生成の阻害活性を示した。これらの結果は、RBLファミリーのレクチン活性を生体防御や生体機能の調節などの多様な目的に応用が可能であることを示している。

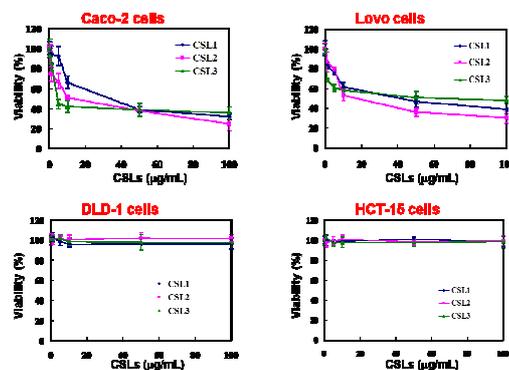


図4 ヒト結腸ガン由来培養細胞に対するCSLのアポトーシス誘導活性

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計13件)

1. A. Konno, S. Yonemaru, A. Kitagawa, K. Muramoto, T. Shirai and T. Ogawa: Protein engineering of conger eel galectins by tracing of molecular evolution using probable ancestral mutants. 査読有 *BMC Evolutionary Biology* 2010, 10:43doi:10.1186/1471-2148-10-43.
2. Y. Watanabe, M. Abolhassani, Y. Tojo, Y. Suda, K. Miyazawa, Y. Igarashi, K. Sakuma, T. Ogawa, and K. Muramoto: Evaluation of silica gel-immobilized phosphorylcholine columns for size exclusion chromatography and their application in the analysis of the subunit structures of fish-egg lectins. 査読有 *J. Chromatogr. A*, 1216, 8563-8566 (2009).
3. T. Shirai, Y. Watanabe, M. Lee, T. Ogawa and K. Muramoto: Structure of rhamnose-binding lectin CSL3: unique pseudo-tetrameric architecture of a pattern recognition protein. 査読有 *J. Mol. Biol.*, 391, 390-403 (2009).
4. Y. Ohizumi, M. Gaidamashvili, S. Ohwada, K. Matsuda, J. Kominami, S. Nakamura-Tsuruta, J. Hirabayashi, T. Naganuma, T. Ogawa, K. Muramoto: Mannose-binding lectin from yam (*Dioscorea batatas*) tubers with insecticidal properties against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). 査読有 *J. Agric. Food Chem.*, 57, 2896-2902 (2009).
5. Y. Watanabe, H. Tateno, S. Nakamura-Tsuruta,

J. Kominami, J. Hirabayashi, O. Nakamura, T. Watanabe, H. Kamiya, T. Naganuma, T. Ogawa, R. J. Naudé, K. Muramoto: The function of rhamnose-binding lectin in innate immunity by restricted binding to Gb3. 査読有 *Dev. Comp. Immunol.*, **33**, 187-197 (2009).

6. Y. Watanabe, Y.-H. Chang, T. Naganuma, T. Ogawa, and K. Muramoto: Structure and activities of rhamnose-binding lectins from fish eggs. 査読無 Proceeding of the 5th World Fisheries Congress. October 20-24, 2008, Yokohama, Japan. 3g-0676-067.

7. S. Yamamoto, T. Naganuma, T. Ogawa, and K. Muramoto: Proteomic analysis of Caco-2 cells treated with food lectins. 査読有 *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **43** Suppl. 1, 70-73 (2008).

8. Y. Watanabe, N. Shiina, F. Shinozaki, H. Yokoyama, J. Kominami, S. Nakamura-Tsuruta, J. Hirabayashi, K. Sugahara, H. Kamiya, H. Matsubara, T. Ogawa, K. Muramoto: Isolation and characterization of L-rhamnose-binding lectin, which binds to microsporidian, *Glugea plecoglossi*, from ayu (*Plecoglossus altivelis*) eggs. 査読有 *Dev. Comp. Immunol.* **32**, 487-499 (2008).

〔学会発表〕(計 17 件)

1. K. Muramoto, S. Yamamoto, A. Mori, N. Iwaki, T. Naganuma, T. Ogawa: Modulating effects of food lectins on the intestinal function. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies. 2010 年 12 月 17 日ハワイ・アメリカ

2. 野地紀人, 成田紘瀬, 永沼孝子, 小川智久, 村本光二: ヒト腸管上皮細胞 Caco-2 におけるグルタチオン産生に対するレクチンの影響. 日本農芸化学会東北支部・北海道支部合同大会・2010 年 9 月 28 日東北大学

3. 渡辺瑞樹, 中村修, 村本光二, 小川智久: マアナゴ腹腔由来ガレクチン・コンジェリン P はマンノースを認識する. 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 22 日神戸

4. 渡邊康春, M. Abolhassani, 小川智久, 村本光二, 東條洋介: 新規ゲル濾過クロマトグラフィーによる魚類卵レクチンのサブユニット構造解析. 2009 年日本水産学会秋季大会 2009 年 10 月 1 日盛岡

5. 白井剛, 渡邊康春, 李敏燮, 小川智久, 村本光二: 魚類卵由来ラムノース結合特異性レクチンの立体構造. 2009 年日本水産学会秋季大会 2009 年 10 月 1 日盛岡

6. 村本光二: 糖鎖認識結合タンパク質の構造・機能と応用性. 化学系学協会東北大会 2009 年 9 月 19 日日本大学工学部

7. 張晏瑄, 渡邊康春, 小川智久, 村本光二, 中村修, 渡辺翼, 神谷久男: Effect of

L-rhamnose-binding lectins on respiratory burst activity of a macrophage cell line from rainbow trout. 日本水産学会春季大会 2009 年 3 月 30 日東京海洋大学

8. Y. Watanabe, Y. H. Chang, T. Naganuma, T. Ogawa, K. Muramoto: Structure and activity of rhamnose-binding lectins from fish eggs. 5th World Fisheries Congress, 2008 年 10 月 22 日横浜

〔図書〕(計 1 件)

村本光二, 陳華敏: 抗酸化ペプチド, “機能性ペプチドの最新応用技術-食品・化粧品・ペットフードへの展開”, 有原圭三, シーエムシー出版, 69-77, 2009.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/hozo/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村本 光二 (MURAMOTO KOJI)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号: 90157800

(2) 研究分担者

小川 智久 (OGAWA TOMOHISA)
東北大学・大学院生命科学研究科・准教授
研究者番号: 80240901

永沼 孝子 (NAGANUMA TAKAKO)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号: 50250733