

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580159

研究課題名（和文）腸管上皮より分泌される抗菌性レクチン RegIV の機能解析

研究課題名（英文）Physiological function of RegIV, an antimicrobial lectin secreted from intestinal epithelia

研究代表者

渡辺 寛人（WATANABE HIROHITO）

明治大学・農学部・准教授

研究者番号：20270895

研究成果の概要（和文）：

腸管上皮の自然免疫機能に關与する抗菌性レクチン RegIV の機能解析を行った。組み換えヒト RegIV タンパク質の発現系を構築し、これを用いて糖結合特性を解析した結果、RegIV がペプチドグリカンへの結合性を有することを明らかにした。さらに抗菌メカニズムを解析した結果、RegIV が大腸菌の膜構造を変化させ、膜透過性を増大させることによって抗菌活性を発揮することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Function of RegIV, an antimicrobial lectin secreted from intestinal epithelia, was analyzed using recombinant human RegIV protein. Analysis of ligand binding property using sugar-coupled beads revealed that recombinant RegIV binds peptidoglycan from gram-positive bacteria. It was also shown that RegIV elicits bactericidal activity on *E. coli* through membrane permeabilization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品化学

キーワード：食品安全性、感染防御

1. 研究開始当初の背景

われわれが摂取する食品には、無数の抗原が含まれており、また病原性微生物が存在することもある。ここで自己と非自己の識別を行い、病原体の侵入を阻止する最前線のバリアとして機能しているのが腸管免疫システムである。このように外部環境との接点に位置する腸管上皮は、体内最大とも言える免疫組織を形成している。

食品安全性に対する関心が高まっている現在、腸管上皮細胞のバリア機能の解明はきわめて重要な課題である。

本研究の開始当初、腸管免疫機構に関して国内外で精力的に研究が行われるようになっていた。その重点は腸管上皮間リンパ球 (IEL) など、獲得免疫におかれており、第一線の障壁である自然免疫に関する分子の研究は、依然として盛んではなかった。しかしながら細菌やウイルスなどに特徴的な分子を認識し、これらの除去反応を誘導する機能をもつ受容体 TLR (Toll-like receptor) に関する研究が進み、腸管上皮における TLR の役割が理解されたことなどから、新しい自然免疫機能における腸管上皮の役割が認識されるようになった。

本研究代表者は腸管上皮の自然免疫に関与しうる分子としてヒト腸管上皮モデルである Caco-2 細胞より新奇な分泌型レクチン様タンパク質を見いだした。その後このタンパク質のアミノ酸配列は、機能未知の分子として報告された RegIV と同一であることが判明した。RegIV は、甲殻類の体表粘液中で自然免疫に関わっている抗菌性 C 型レクチンと比較的高い相同性を有していることから、ヒトの腸管腔において抗菌性を発揮している可能性が考えら

れた。レクチンが病原菌細胞表面糖鎖に結合し、増殖や上皮細胞への感染を抑制するというのが抗菌性の推定機序である。

実際に本研究代表者は、RegIV がマンナンなどの糖鎖を認識して結合し、さまざまな菌に対して抗菌活性を有することを見出した。さらに RegIV と類似の RegIII γ が、ペプチドグリカンに結合し、グラム陽性菌に対し抗菌活性を示すという報告 (Cash *et al*, Science 313, 1052-1054 2006) がなされ、腸管の自然免疫機能に、分泌型のレクチンが大きな役割をもつことが示された。

2. 研究の目的

以上に述べた背景から、ヒトを含めた高等動物の、とりわけ腸管上皮細胞のもつ自然免疫機能研究の重要性はますます大きなものになると予想された。その上で、このような機能に関与する分子を明らかにすることが重要であると考えられる。

本研究は、RegIV の機能、とくに自然免疫における機能を解明することを目的として計画されたものである。具体的には、RegIV の (1) レクチンとしての機能特性、すなわち糖結合特異性、および (2) 抗菌因子としての機能、すなわち各種微生物に対する増殖抑制作用、を明らかにすることを目指して行われた。

3. 研究の方法

(1) 組み換え RegIV タンパク質発現系の構築とタンパク質の精製

ヒト RegIV cDNA を pET21b ベクターに挿入し、C 末端側に (His×6) タグ配列が付加するよう設計した発現ベクターを構築した。これを大腸菌 BL21 に導入し、IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) 添加を添加することによりタンパク質の発現を誘導した。

大腸菌破砕液の上清を陽イオン交換クロマトグラフィー (CM-Sehadex C50) および Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーに供し、目的の RegIV 組み換えタンパク質を精製した。

(2) 糖結合性の解析

Epoxy-activated Sepharose 6B と各種の糖をアルカリ条件下で反応させた後、エタノールアミンで未反応基をブロッキングすることにより、糖をカップリングさせた樹脂を作製した。

この樹脂と RegIV 組み換えタンパク質をインキュベートした後、樹脂を遠心分離し、沈殿させた。樹脂に結合して沈殿したタンパク質を SDS-PAGE により分離した。その後、抗 (His×6) タグ抗体によるウエスタン解析により、RegIV 組み換えタンパク質を検出した。

(3) 抗菌活性の解析

グラム陰性菌として *Escherichia coli* K12、グラム陽性菌として *Bacillus subtilis* JCM 1465T、真菌 (酵母) として *Candida tropicalis* NBRC 1400 を用い、それぞれを培養した。培養液に RegIV 組み換えタンパク質を加えて 2 時間培養した後、適宜段階希釈して寒天培地に塗布した。一定時間、一定温度で培養した後、寒天培地上に出現したコロニーを計数した。

抗菌メカニズムを明らかにするため、膜

透過性の変化を解析した。具体的には蛍光色素を取り込ませた菌に RegIV 組み換えタンパク質を加えて 2 時間培養した後、溶液中への蛍光色素の放出を解析した。

さらに菌の形態変化を観察した。具体的には菌に RegIV 組み換えタンパク質を加えて 2 時間培養した後、走査型電子顕微鏡による観察を行った。

4. 研究成果

(1) 組み換え RegIV タンパク質発現系の構築とタンパク質の精製

C 末端側に (His×6) タグ配列が付加した融合タンパク質としてヒト RegIV を発現させるベクターを構築した。大腸菌にこのベクターを導入し、IPTG による発現誘導を行った。菌破砕物をクロマトグラフィーに供することにより目的のヒト RegIV 組み換えタンパク質を精製した。

(2) 糖結合性の解析

各種の糖をカップリングさせた樹脂を作製し、これと RegIV 組み換えタンパク質との結合を検討した。その結果 RegIV 組み換えタンパク質は、これまでに確認されたマンナン、リボ多糖に加えて、ペプチドグリカンに結合することがはじめて明らかとなった。そのほか、アミロース、キチン、セルロースなどの糖鎖に結合しうることなどから、RegIV の糖鎖結合には糖の 3 位のヒドロキシル基が重要であると推定された。

(3) 抗菌活性の解析

(1) で精製した RegIV 組み換えタンパク質はグラム陰性菌 (*Escherichia coli*

K12)、グラム陽性菌 (*Bacillus subtilis* JCM 1465T)、真菌 (*Candida tropicalis* NBRC 1400) のコロニー形成数を減少させた。

あらかじめ蛍光色素を取り込ませた大腸菌に対して RegIV 組み換えタンパク質を作用させたところ、培養溶液中への蛍光色素の放出が認められた。その放出量は RegIV 組み換えタンパク質濃度依存的に増大した。さらに、マンナンの共存下では、蛍光色素の放出は抑制されることが明らかとなった。これらのことから RegIV は大腸菌表面の糖鎖に結合して膜透過性を変化させ、抗菌作用を発揮することが示唆された。

RegIV による膜構造の変化を明らかにするため走査型電子顕微鏡観察を行ったところ、RegIV 組み換えタンパク質を作用させた大腸菌においては顕著な膜構造の崩壊が観察された。

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)

[学会発表] (計 1 件)

高橋玄、渡辺寛人「腸管上皮細胞から分泌される抗菌性レクチン RegIV の作用機構の解析」2010 年度日本農芸化学会大会、2010 年 3 月 25 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 寛人 (WATANABE HIROHITO)

明治大学・農学部・准教授

研究者番号：20270895