

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380121

研究課題名(和文) 魚類腸管機能に対する内因性・外因性レクチンの調節作用とその応用

研究課題名(英文) Modulatory effects of endogeneous and exogeneous lectins on fish intestinal function and its application

研究代表者

村本 光二 (Muramoto, Koji)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：90157800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：魚類体内の内因性レクチンと外因性レクチンが魚類腸管機能に及ぼす作用をゼブラフィッシュおよび腸管上皮モデルを使って明らかにした。内因性と外因性のレクチンは、各々の特異的な構造と糖結合活性により、抗酸化剤や免疫賦活剤の腸管吸収に対する多様な調節作用を示した。ゼブラフィッシュから単離した複数の内因性レクチン(RBL)には、糖鎖認識ドメイン構造が異なるシロサケRBLとウニ卵RBLの2種類のタイプが存在し、これらのレクチンは微生物からの生体防御機能を担うことが示唆された。外因性レクチンのゼブラフィッシュにおける動態と機能性は、蛍光顕微鏡による直接的な観察と、血液・臓器の生化学分析によって評価した。

研究成果の概要(英文)：The modulatory effects of endogeneous and exogeneous lectins on fish intestinal function were investigated by using an experimental animal, zebrafish, and an in vitro model of the intestinal epithelial system. These lectins modulated the transepithelial transport of antioxidants and immunomodulating agents in different ways, probably because of their specific structures and sugar binding activities. Multiple rhamnose-binding lectins (RBL) from zebrafish were composed of two types of carbohydrate-recognition-domain structures, chum salmon RBL type and sea urchin egg SUEL type, and were shown to play some role in biodefense against pathogenic microorganisms. The dynamic state and function of exogeneous lectins were successfully evaluated by direct observation using fluorescence microscopy and biochemical analysis of blood and organs.

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 腸管機能 生体防御 ゼブラフィッシュ 抗酸化剤 免疫賦活剤 腸管上皮 糖鎖認識

1. 研究開始当初の背景

養殖対象魚種が増えて疾病も多様化している今日、薬剤やワクチンだけでなく、抗酸化剤や免疫賦活剤で非特異的生体防御能を高めることは魚病を予防する有効な手段である。多くの場合、これらは餌料に添加して投与することになるが、魚類腸管からの吸収性に関する研究は非常に少ない。本研究で用いるゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) はモデル実験動物として遺伝、発生・分化、形態形成、免疫などの広範な研究分野で用いられている。しかし、消化管の機能や透過・輸送機構に関する報告はみられない。

我われはこれまで、海洋生物を中心としてレクチンの探索を進め、原核生物から魚類までの多様な生物種から特異な機能性を有するレクチンの性状を明らかにした。とくに魚類では、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、この新規レクチン・ファミリーに属するレクチンを魚類だけでなく、無脊椎動物からも単離し、それらの生化学的性状とともに自然免疫系における働きを明らかにした。RBL は、卵巣や肝臓、血液細胞だけでなく、エラや皮膚、腸管等の外部環境との境界域にも分布する。また、動物レクチンの主要ファミリーであるガレクチンをマアナゴ体表から複数単離したが、これらも上部消化管粘膜にも分布していることを観察した。しかもレクチンは消化酵素群に耐性を持ち、腸管内微生物叢と相互作用することで生体防御機能を発揮した。一方、レクチンは、養殖魚用植物性飼料原料としても用いられるマメ科やイネ科の植物に特に多く含まれ、これらのレクチンは熱処理や消化酵素に対して高い安定性をもつ。我われは、大豆レクチンがホ乳類の腸管でのポリフェノールの吸収性を高めることを初めて明らかにした。

2. 研究の目的

腸管は内因性と外因性のレクチンと様々な様式で相互作用する事実に基づき、これらレクチンの腸管機能調節作用をモデル実験動物であるゼブラフィッシュで詳細に検討し、得られた成果を養殖対象魚類の抗酸化ストレス・抗病性の向上に活用することを目指している。本研究では、我われがこれまで研究を進めてきた魚類に内在する RBL 等のレクチンの腸管機能における役割を明らかにするとともに、主要な植物性飼料原料である大豆、小麦、米等に含まれる外因性レクチンを用いて、次の諸点を明らかにすることを目的にした。・ゼブラフィッシュ腸管における透過・輸送機能に対する外因性レクチンの調節作用とその機構解明、・ゼブラフィッシュの内因性レクチンの生化学的解析、および生物機能の解析、・外因性レクチン投与による抗酸化剤・免疫賦活剤の吸収率向上と、抗酸化ストレス・抗病性の評価。

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュ腸管における外因性レ

クチンの安定性を、蛍光標識大豆レクチン (SBA)、ナタマメレクチン (CGA)、小麦胚芽レクチン (WGA) を用いて調べた。また、これらのレクチンと腸管上皮粘膜との結合性をドットプロット法で分析した。ゼブラフィッシュにレクチンを1週間投与したのち、腸管細胞タンパク質を2次元電気泳動で分離し、発現量に変化したタンパク質スポットを同定した。蛍光標識 ODS 樹脂法による摂餌量測定法を設定後、輸送経路が異なる蛍光マーカーをゼブラフィッシュに与え、これらの腸管輸送に対するレクチンの影響を蛍光 HPLC で測定した。抗酸化ジペプチドをゼブラフィッシュに与え、血液と肝臓における酸化ストレスマーカーを分析した。食品機能因子イソフラボン配糖体をアグリコンに変換後、ゼブラフィッシュに投与、血液分析により、吸収されたイソフラボン抱合体を同定した。ゼブラフィッシュに酸化ストレスを与え、血液と臓器の酸化ストレスマーカーを評価した。さらにオリゴ糖鎖の腸管吸収と免疫賦活活性を蛍光顕微鏡観察と体内活性酸素量と一酸化窒素量の変動によって調べた。

ゼブラフィッシュ未受精卵からアフィニティークロマトグラフィーによりラムノース結合特異性レクチンを単離した。さらに陽イオン交換クロマトグラフィーでアイソレクチンに分離した。これらは、それぞれ DRL1, 2, 3 と命名し、糖鎖認識能、構造、生化学的性状を解析した。シロサケ卵 RBL である CSL3 に対するウサギ抗体を使用して免疫染色でレクチンの局在を観察した。さらに *in situ* ハイブリダイゼーションでレクチン遺伝子の局在を調べた。

腸管上皮の輸送系へのレクチンの作用機構をさらに詳しく解析するために、CSL3 の腸管モデル Caco-2 細胞単層膜のタイトジャンクション機能に対する作用とその機構を調べた。経上皮電気抵抗 (Trans Epithelial Resistance: TER) 値を経時毎に測定してレクチンおよび特異糖の影響を調べた。また、細胞内カルシウムイオン濃度の変化とそれに伴う細胞骨格系の変化を、それぞれカルシウム蛍光プローブと抗 β -アクチン抗体による蛍光染色で解析した。

4. 研究成果

ゼブラフィッシュ腸管における外因性レクチンの安定性を蛍光標識 SBA, CGA, WGA を使い調べた。標準タンパク質 (ウシ血清アルブミン、卵白アルブミン) は、腸管消化酵素により完全に消化され、低分子化した。一方、レクチンには高い消化耐性がみられた。また、これらのレクチンは腸管上皮粘膜抽出物に結合活性を示した。ゼブラフィッシュにレクチンを 1% 含む餌料を 1 週間与えた後、腸管タンパク質を 2 次元電気泳動で分析し、各レクチン処理群とコントロールの比較により、レクチン処理で発現したタンパク質を同定した。

外因性レクチンが腸管上皮における透

過・輸送に与える影響とその機構を、輸送経路が既知の蛍光マーカを使い蛍光 HPLC と蛍光顕微鏡により解析した。ゼブラフィッシュ稚魚ではいずれの蛍光マーカでも投与後 3 時間から腸管から体内への移行が観察され、24 時間後には肝臓への集積が認められた。成魚では、尾部静脈から採取した血液中の蛍光マーカの動態を HPLC で分析し、レクチンの投与によって、カルボン酸輸送経路と P 糖タンパク質介在経路に関係する輸送量が増加することを明らかにした。吸収量の定量においては、蛍光マーカを含む餌料の摂食量を知る必要があるため、摂食量の測定を、蛍光マーカをコーティングしたマイクロビーズを用いて行った。すなわち腸管輸送の追跡に用いた蛍光マーカとは異なる蛍光特性と HPLC 挙動を示す蛍光マーカをマイクロビーズに導入し、これを添加した餌料を試験魚に投与後、一定時間後に腸管からマイクロビーズを回収、回収蛍光マーカ量から摂食量を求めた。

抗酸化性ジペプチドであるカルノシン含有量が 5%、レクチンが 1% になるように調整した餌料をゼブラフィッシュに 1 週間与え、血液と肝臓における酸化ストレスマーカであるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性、および還元型/酸化型グルタチオン比を測定した。カルノシンの投与により血液中の SOD 活性は上昇したが、レクチンの同時投与による SOD 活性への影響はみられなかった (図 1)。還元型/酸化型グルタチオン比においても、カルノシン投与により還元型グルタチオン値が上昇した (図 2)。しかし、WGA の同時投与により SOD 活性は低下し、コントロールと同レベルになった。WGA によりカルノシンの吸収が阻害された結果、SOD 活性と還元型/酸化型グルタチオン比が低下したと考えられる。

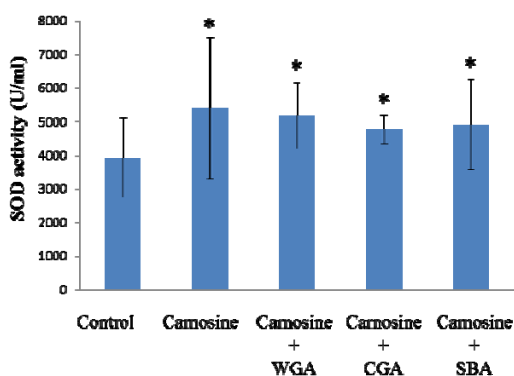


図 1. SOD 活性へのカルノシン投与の影響

食品機能因子イソフラボン配糖体 (ダイジン、ゲニスチン) をグリコシダーゼ処理によってアグリコン (ダイゼイン、ゲニスチン) に変換後、ゼブラフィッシュに投与し、尾静脈から採取した血液を逆相分配系 HPLC で分析して腸管から吸収されたイソフラボンは体内で抱合体化されることを明らかにした。ゼブラフィッシュをパラコート (PQ) 存在下で

飼育し、各臓器 (血液、肝臓、エラ、腸管) を採取、DPPP 法により過酸化脂質量を蛍光定量した。PQ による酸化ストレスによって、ゼブラフィッシュのすべての臓器で過酸化脂質量が増加しており、抗酸化ストレスの評価系としての応用性が示された。

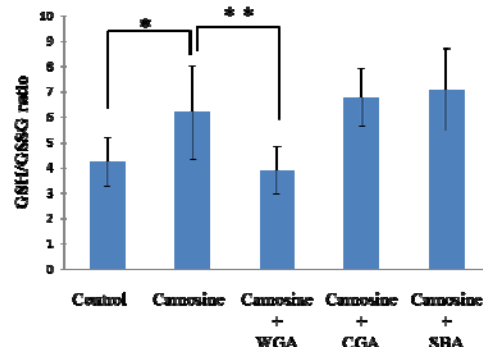


図 2. 還元型グルタチオン比に対するカルノシン投与の影響

ゼブラフィッシュ稚魚に対する糖鎖の免疫賦活活性を調べた。蛍光標識糖鎖を稚魚に経口投与後、5~12 時間で最も多く体内に蓄積された。24 時間暴露条件下における 2 dpf 稚魚のリポ多糖 (LPS) 最低致死濃度は 175

μg/mL であり、オリゴ糖鎖含有餌料を与えた群は死亡率が低下した。また、これらの糖鎖は稚魚体内の一酸化窒素量を低下させる保護作用を示した

ゼブラフィッシュ未受精卵から単離した複数のラムノース結合特異性レクチン (RBL) の構造解析を行い、主要な DRL1 と DRL2 が 23.2kDa の 3 量体、DRL3 は 14kDa の 2 量体であること、そしてこれらの 1 次構造を BLAST 検索で明らかにした。DRL1 と DRL2 は、215 アミノ酸残基からなるシロサケ RBL である CSL3 様構造をもち、DRL3 はウニ卵レクチン SUEL に高い相同性を示した。抗 CSL3 ウサギ抗体と in situ ハイブリダイゼーションでレクチンの局在を調べたところ、未成熟卵細胞においてのみレクチンが局在していた。この結果から、ゼブラフィッシュに発現する主要な内因性レクチン DRL は、主に産卵時、細菌や微生物から卵を守るための生体防御機能を担うことが示唆された。

また、内因性レクチンの分子機構を調べるために、RBL (CSL1) の直鎖状に繋がった 3 つの糖鎖認識ドメイン (CRD)、CSL1-N、CSL1-M、CSL1-C のリコンビナント発現系を大腸菌 BL21 に発現ベクターを形質転換して構築した。

腸管上皮の輸送系へのレクチンの作用機構をさらに詳しく解析するために、Caco-2 細胞単層膜のタイトジャンクション機能に対する CSL3 の作用とその機構を調べた。CSL3 は 2 時間で濃度依存的に TER 値を減少させ、その TER 値は 6 時間後までは維持された。CSL3 の特異糖である L-ラムノースを管腔側に投与したところ、投与 1 時間後に TER 値は

コントロールの TER 値と同レベルまで回復した (図 3)。CSL3 が結合活性を示す D-ガラクトースにも同様の作用が見られたが、特異糖でない他の糖では TER 値の回復はみられなかった。また、CSL3 とは分子量と構造の異なる CSL1 には TER 値減少作用はみられなかった。このことから CSL3 のタイトジャンクションへの作用は糖鎖認識結合ドメインの構造が関与していると考えられる。

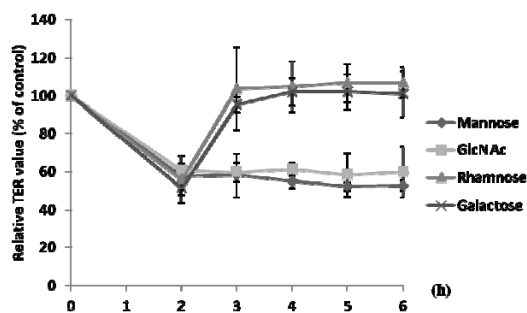


図 3. CSL3 は糖結合活性によってタイトジャンクションを開放

CSL3 は濃度依存的に細胞内カルシウムイオン濃度を増加させた。一方、CSL3 で 2 時間処理後にラムノースを加えたところ、1 時間後には細胞内カルシウムイオン濃度の増加はみられなかった (図 4)。

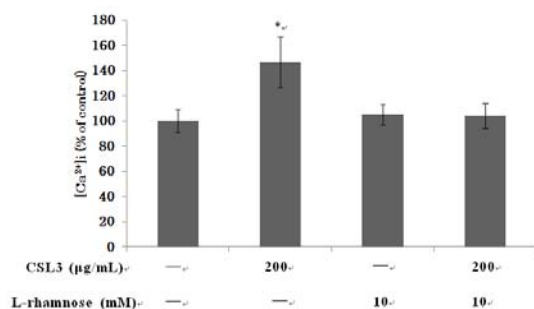


図 4. CSL3 による細胞内カルシウムイオン濃度増加と特異糖による阻害

このとき、アクチンの蛍光染色が CSL3 処理によって不鮮明となり、細胞骨格が変化したことが分かった。また、CSL3 処理後にラムノースを加えたところ、β-アクチンが再度鮮明に染色された。この結果から、CSL3 のタイトジャンクションを開放作用は特異糖によって阻害され、CSL3 のタイトジャンクションへの作用は制御可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 9 件)

- ① F. Odei-Addo, C. Frost, N. Smith, T. Ogawa, K. Muramoto, M. L. V. Oliva, L. Gráf, R. Naude: Biochemical characterization of *Acacia schweinfurthii* serine proteinase

inhibitor. J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 29, 印刷中 査読有 2014 DOI:

10.3109/14756366.2013.836642

- ② S. Yamamoto, M. Tomiyama, R. Nemoto, T. Naganuma, T. Ogawa, and K. Muramoto: Effects of food lectins on the transport system of human intestinal Caco-2 cell monolayers. Biosci. Biotech. Biochem. 77, 1917-1924 (2013). 査読有 Doi:10.1271/bbb.130367
- ③ Y. Watanabe, Y.-H. Chang, O. Nakamura, T. Naganuma, T. Ogawa, K. Muramoto: Rhamnose-binding lectins induce respiratory burst activity in macrophage cells from rainbow trout. Fish. Sci. 79, 513-519 (2013). 査読有 DOI 10.1007/s12562-013-0624-7
- ④ 村本光二: 抗酸化活性の測定法. 細胞, 45, 642-645 (2013). 査読無 http://hokuryukan-ns.co.jp/magazines/archives/2013/11/201312_1.html
- ⑤ M. Watanabe, O. Nakamura, K. Muramoto, T. Ogawa: Allosteric regulation of the carbohydrate-binding ability of a novel conger eel galectin by D-mannoside: J. Biol. Chem., 287, 31061-31072 (2012). 査読有 Doi:10.1074/jbc.M112.346213
- ⑥ O. Nakamura, M. Watanabe, T. Ogawa, K. Muramoto, K. Ogawa, S. Tsutsuia, H. Kamiya: Galectins in the abdominal cavity of the conger eel *Conger myriaster* participate in the cellular encapsulation of parasitic nematodes by host cells. Fish Shellfish Immunol., 33, 780-787 (2012). 査読有 Doi:10.1016/j.fsi.2012.07.003
- ⑦ T. Ogawa, M. Watanabe, T. Naganuma, K. Muramoto: Diversified carbohydrate-binding lectins from marine resources. J. Amino Acids, 2011 (2011), Article ID 838914, 20 pages. 査読有 Doi:10.4061/2011/838914

〔学会発表〕 (計 23 件)

- ① K. Muramoto: Lectins as carbohydrate Recognition Molecules. 2013 年 9 月 28 日-30 日 International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan. Tohoku University (Miyagi)
- ② 宇部仁美, 永沼孝子, 小川智久, 村本光二, 鈴木徹: ゼブラフィッシュ卵に存在するラムノース結合特異性レクチンの生化学的性状. 2013 年 9 月 19 日-22 日 (三重大大学) 平成 25 年度日本水産学会秋季大会
- ③ 齋藤信裕, 菅原沙恵子, 菊地あかね, 永沼孝子, 小川智久, 村本光二: ゼブラフィッシュを用いた腸管吸収調節因子の評

- 働法. 2013年9月19日-22日(三重大学)平成25年度日本水産学会秋季大会
- ④ 石上博久, 石井孝典, 永沼孝子, 小川智久, 村本光二: ラムノース結合特異性レクチンの糖鎖認識ドメインの発現と機能特性. 2013年9月19日-22日(三重大学)平成25年度日本水産学会秋季大会
- ⑤ 野地紀人, 富山舞, 永沼孝子, 小川智久, 村本光二: ヒト腸管上皮モデル Caco-2 細胞のグルタチオンレベルに対する食品レクチンの影響. 2013年8月29日-31日(実践女子大学)日本食品科学工学会第60回記念大会

[図書] (計 4件)

- ① Y. Watanabe, T. Naganuma, T. Ogawa, and K. Muramoto, 33-54, 2013. 'Antitumor potential and other emerging medicinal properties of natural compounds' Ed. By E.F. Fang and T.B. Ng, Springer, ISBN 978-94-007-6213-8.
- ② 村本光二: 三次機能, “大豆の機能と科学”, 小野伴忠, 下山田真, 村本光二(編), 朝倉書店, 55-57, 72-99, 2012.
- ③ 村本光二: 抗酸化ペプチド, “機能性アミノ酸・ペプチドの技術と市場”, シーエムシー出版, 90-101, 2012.

[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

研究分担者

永沼 孝子 (NAGANUMA, Takako)
東北生活文化大学・短期大学部・講師
研究者番号: 50250733

(3) 連携研究者

鈴木 徹 (SUZUKI, Tohru)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 70344330