

平成 22 年 12 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19580232

研究課題名（和文）マベガイに含まれる多様なレクチンは生体維持機能にどうかかわるのか。

研究課題名（英文）Involvement of multiple lectins from *pteria penguin* in life support system.

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：4 種のマベガイ外套膜レクチン(PPL-1～4)のうち、PPL-1 は生体防御に関わること、PPL-2 はカルシウム結晶化制御能、即ち貝殻および真珠層の形成に関与する他、生体防御能も有することを明らかにした。PPL-4 もカルシウム結晶化に関与することが分かった。このように、PPL 群はマベガイ生体において、それぞれ異なる役割を果たし、健康な生体の維持に貢献していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Four novel lectins (PPL-1～4) has purified from mantle of *pteria penguin*. PPL-1 was involved in self-defense system and PPL-2 had capacity of Calcium crystallization that is formation of shells and alagonite layers and involved in self-defense system. PPL-4 also had a role in Calcium crystallization. In conclusion, PPLs have the important role in respectively and concertedly contribute life-sustaining capacity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、マベガイ、生体防御、アラゴナイト、バイオミネラリゼーション

## 1. 研究開始当初の背景

レクチンの大きな生理機能として生体防御能が知られている。しかし動植物の種によってはほとんど解明されていないものもあり、二枚貝における研究の進捗状況も同様であった。一方、真珠貝であるマベガイは、養殖開始から真珠を得るまでに長い年月を要するにも関わらず、良質の真珠が得られる確

率即ち歩留まりは 1 割程度である。このような背景から、優れた品質の真珠を効率的に生産する方法の開発が望まれていた。

申請者らはマベガイから 3 種のレクチン (PPL-1～3) を単離し、PPL-1 が生体防御に関する機能を有することを確認した。また PPL-2 は真珠の形成に関与することが分かった。これらの事実から、マベガイが外敵か

ら生体を防御機能して健康な母貝を維持し、さらに良質の真珠を形成する過程にレクチン群が関与している可能性を考えた。

## 2. 研究の目的

マベガイ外套膜レクチン(PPL)群がそれぞれ生体内で発揮する生理機能を解明し、それらが総合的に生体維持のために果たす役割を明らかにすることを目的とした。具体的にはこれまで得られた知見に基づいて、以下のことを目指した。

1. PPL 群の生体防御能について精査する。
2. PPL 群のカルシウム結晶化制御能(真珠形成、貝殻形成)への関与とその機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1)すでに一次構造が明らかになっているレクチンの他に、イオン交換クロマトグラフィー画分のうち赤血球凝集活性を示したタンパク画分について、cDNA ライブラリーを用いて一次構造を決定し、これらの相同性を調べた。また、赤血球凝集阻害試験により糖結合特性を調べた。さらに温度耐性、Ca<sup>++</sup>依存性を調べた。

(2)マベガイにおけるレクチン(PPL-1, -2)の発現部位を確認するために、マベガイ各部位の mRNA を調整し、ノーザンブロッティングをおこなった。

(3)PPL 群の微生物との相互作用(生体防御能)を調べる目的で以下の事項について検討した。

①微生物を FITC でラベルし、PPL 群を加えて凝集の有無を顕微鏡で観察した。

②リポポリサッカライド(LPS)・リポテイコ酸(LTA)との相互作用調べるために、各種 LPS および LTA と①で凝集活性を示した PPL(PPL-1, -2)を種々の濃度に調整して添加し、インキュベートした後、マウスを用いて作製した PPL 抗体を反応させて ELISA を行った。

③液体培養中の微生物に PPL1-, -2 を加えて経時的に濁度を測定し、増殖抑制効果を調べた。

(4)PPL 群のカルシウム結晶化に対する影響について調べるため、以下の項目について検討した。

①各 PPL のノックダウン個体を作製し、貝殻が形成される最初の段階である D 型幼生期の貝殻の状態を走査型電子顕微鏡で観察し、その形態が正常な個体・不完全な個体・形成されていない個体数の割合を比較した。

②人工海水と PPL の混合液をインキュベートした後、形成される結晶の形態を走査型電子顕微鏡で観察し、PPL がカルシウム結晶化に及ぼす影響を調べた。

③カルシウムの結晶中に存在するマトリックスタンパク質と PPL の関係を明らかにする

ために、真珠層を脱灰して残ったマトリックスタンパク質成分をイオン交換クロマトグラフィーで分画し、PPL-2 抗体を用いたウェスタンブロットに供し、マトリックスタンパク質における存在を検討した。

また、真珠層の表面を脱灰して残ったマトリックスタンパク質のシートに PPL-2 抗体を反応させ、DAB 染色を行なって PPL-2 の分布を形態学的に観察した。

## 4. 研究成果

(1)PPL-1~4 の一次構造を決定した。このうち、PPL-2 は  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  の 3 つのサブユニットからなる 2 量体で、組み合わせの違いから PPL-2A, PPL-2B に分けられた。

各 PPL の構造と性状についてのまとめを表 1、各レクチンの糖結合特異性を表 2 に示す。PPL-1 と PPL-2~4 は全く異なる構造を有しており、PPL-1 は魚類卵レクチンと相同性、PPL-2~4 は植物レクチンであるジャッカリンと相同性を示した。特異的結合糖もそれぞれ異なっており、それぞれが独自の生理機能を有する可能性が示唆された。

表 1. PPL 群の構造と性状

外套膜レクチン	サブユニットの分子量	サブユニット構成	糖結合特性(最強の結合)	金属イオン要求性	相同性	温度耐性(完全失活条件)
PPL-1	18.4kDa	単量体	ガラクトース	—	サケ科魚卵レクチン ウニ卵レクチン	90°C 40分
PPL-2 A } B }	$\alpha$ 16.9kDa	$\alpha, \gamma$ の二量体	トレハロース	—	ジャッカリン	70°C 10分
	$\beta$ 15.8kDa	$\beta, \gamma$ の二量体	単糖と結合せず	—		
PPL-3	15.7kDa	二量体	イソマルトース	—	ジャッカリン	90°C 60分
PPL-4	$\alpha$ 16.5kDa	$\alpha, \beta$ の二量体	GlcNAc	—	ジャッカリン	90°C 100分
	$\beta$ 16.5kDa					

表 2. PPL 群の糖結合特異性

Saccharides/glycoproteins	component	PPL1	PPL2A	PPL2B	PPL3	PPL4
D-Glucose		250	>200	>200	200	25
D-Galactose		7.8	>200	>200	>200	>200
D-Fructose		ND	200	>200	50	50
D-Mannose		>250	100	>200	100	25
L-Rhamnose		125	>200	>200	>200	>200
D-Glucosamine		>250	>200	>200	>200	200
D-Galactosamine		125	>200	>200	>200	>200
N-Acetyl-D-glucosamine		>250	>200	>200	>200	6.25
N-Acetyl-D-galactosamine		125	>200	>200	>200	>200
N-Acetyl-D-lactosamine		7.8	ND	ND	ND	ND
Trehalose	Gluc(a1-1a)Glc	125	12.5	>200	25	100
Kojibiose	Gluc(a1-2a)Glc	125	>200	>200	>200	100
Maltose	Gluc(a1-4a)Glc	>250	>200	>200	>200	200
Isomaltose	Gluc(a1-6a)Glc	>250	25	>200	12.5	>200
Lactose	Gal(b1-4b)Glc	63	>200	>200	>200	>200
Others*		>250	>200	>200	>200	>200
				%		
Chitin oligomers	(GlcNAc(b1-4b)GlcNAc) <sub>n</sub>	ND	>0.25	>0.25	>0.25	0.125
Chitosan oligomers	(GlcNH2(b1-4b)GlcNH2) <sub>n</sub>	ND	>0.25	>0.25	>0.25	>0.25
Fetuin		0.031	>0.25	0.025	0.025	0.025
Asialo fetuin		0.016	0.0125	0.0031	0.0031	0.025
Mucin type I		0.016	>0.25	0.0125	0.125	ND
Asialo mucin		0.13	ND	ND	ND	ND

Others\*: D-Xylose, L-Fucose, L-Arabinose, Cellobiose, Nigerose, ND: not determined.

(2)PPL-1, PPL-2 について行なったノーザンブロッティングの結果、PPL-1 は外套膜と生殖腺に特異的に発現していたが、PPL-2 は外套膜、鰓、筋組織、消化網嚢、生殖腺に発現しており、生体全域にわたって発現している

と考えられた。

(3)PPL 群と微生物の相互作用について検討した。

①PPL 群による微生物の凝集反応を観察した。PPL-1 と PPL-2 はグラム陰性菌を主とする細菌群を凝集した(表3)が、PPL-3 および PPL-4 には凝集活性は見られなかった。また、PPL-1 と PPL-2 では凝集する微生物の種類が異なる

表3 PPLsの微生物凝集活性

Bacteria	Minimum agglutinating activity (µg/ml)	
	PPL-1	PPL-2
<i>LT-2</i> (S)	>500	>500
<i>His-519</i> (Rc mutant)	3.9	16
<i>SL-1004</i> (Rd mutant)	500	8
<i>SL-1002</i> (Re mutant)	31.5	8
<i>TA-2168</i> (Re mutant)	1.9	4
<i>JM109</i>	62.5	125
<i>Aeromonas hydrophila</i>	>500	16
-----		
<i>Lactococcus garvieae</i>	>500	>500

Rc,Rd,ReはそれぞれLPSの変異した株。Sは変異していない株。

ことが分かった。

②PPL が認識する微生物表面の糖鎖について精査するため、LPS と LTA との相互作用をELISA 法で検討した。その結果、PPL-1 は Ra 型と、PPL-2 は Rd, Re 型と強く結合することが明らかになった。

この事実から PPL 群は細菌に対してそれぞれ異なる結合スペクトルを有し、共同で生体防御の役割を果たしている可能性が示唆された。

③PPL-1, -2 の細菌増殖阻害能を調べた。

LPS 構造が明らかになっている前出の *Salmonella* 5 株 (*LT-2*, *His 519*, *SL-1004*, *SL-1002*, *TA-2168*) に対する増殖阻活性を測定した。その結果、PPL-1 は *His -519* (Rc 型)、PPL-2 は *TA-2168*(Re 型) に対して阻害活性が観された。その他魚病細菌や大腸菌に対しても試験を行ったが、総じて PPL-1, -2 が活性を示す対象となる細菌種は少なく、PPL の細菌増殖阻害活性を示すスペクトルは狭いと考えられた。さらに、殺菌 (抗菌) 活性についても穿孔-寒天平板培地法によって検討したが、試験したいずれの株でも抗菌活性は観察されなかった。

以上の事実より、PPL-1, -2 は種々の細菌を凝集し、弱い増殖阻害能も有するが、殺菌活性は持たないことが分かった。凝集によって引き起こされるオプソニン化効果等の可能性については、なお詳細な検討が必要である。

(4)PPL 群がカルシウム結晶化 (貝殻形成・真珠層形成) に及ぼす影響について検討した。

①各 PPL のノックダウン個体にける D 型幼生の貝殻形成の比較を図 1, 2 に示した。

PPL-1 は貝殻の形成に影響をあたえず、

PPL-2, -4 は大きく影響した。

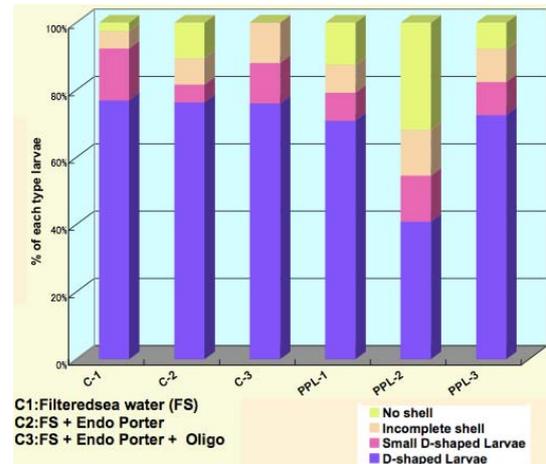


図 1. D 型幼生の貝殻形成に及ぼす PPL の影響 (1)

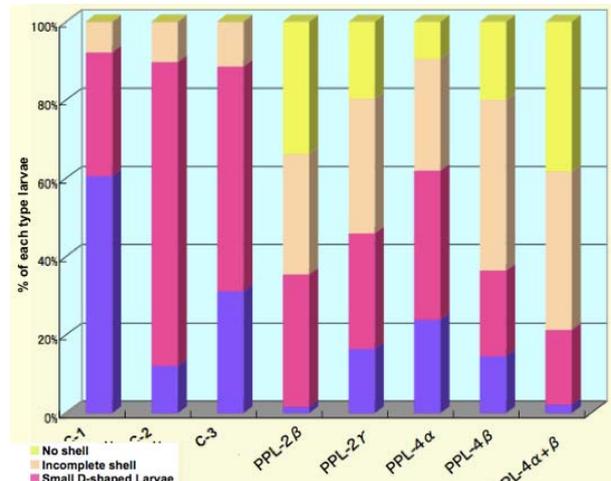


図 2. D 型幼生の貝殻形成に及ぼす PPL の影響 (2)

②PPL-2 が貝殻の形成に関与する可能性が示唆されたので、PPL-2 の人工海水中のカルシウム結晶化に与える影響を観察した。その結果、PPL-2A を比較的高濃度で添加すると、アラゴナイト (真珠層を構成する結晶構造) の形成が著しく減少することが明らかになった(図 3)。この現象は PPL-3 を添加したときには観察されなかった。この事実から、PPL-2A はマベガイにおいて真珠層の形成を制御している可能性が示唆された。

③PPL2 の真珠層 (アラゴナイト層) 形成への関与についてさらに検討した。真珠層のマトリックスタンパク質の各画分について PPL-2 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行なった。その結果、PPL-2 に相当するタンパク質が存在することが確認された。また、アラゴナイト層のマトリックスシートに直接 PPL-2 抗体を反応させても PPL-2 の局在が

形態学的に確認された(図4)。

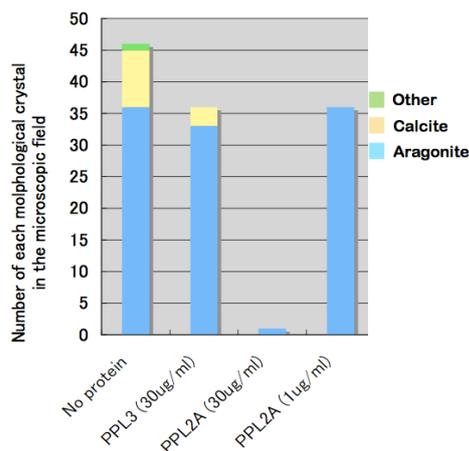


図3 カルシウムの結晶化に対するPPL-2の影響

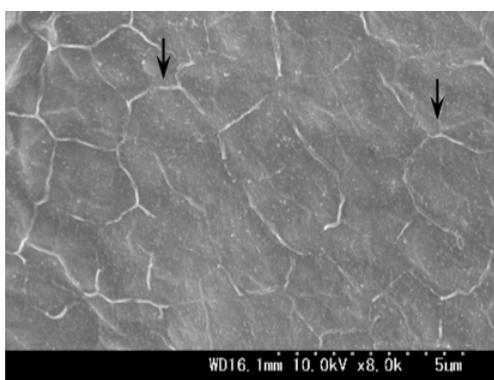


図4. マトリックスタンパク質中のPPL-2の局在  
↓:PPL-2抗体の結合部位(DAB染色)

以上の結果をまとめると、これまでに単離されたPPL群のうちPPL-1と-2は微生物との相互作用を通して生体防御に関与すること、さらにPPL-2はアラゴナイト層におけるマトリックスタンパク質の構成成分であること、さらに貝殻および真珠層のアラゴナイト結晶の形成においてカルシウムの結晶化を制御すること、またPPL-4も貝殻の形成に関与することが明らかになった。PPL-3については未解明であるが、上記の機能は有していないことから、更に別の生理機能を発揮している可能性が考えられる。このように、マベガイにおいてPPL群はそれぞれの機能を発揮しながら、強調して生体維持・調節に重要な役割を果たしていると考えられた。これらの発見は、良質の真珠を効率よく産生する方法について大きなヒントを与えるものであり、国内外における貴重な発見と言える。さらに生体を守るという観点からは、多くの動物における自然免疫のしくみを解明する上で重要な役割を果たすと考えられる。

## 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5件)

- ① Y. Watanabe, H. Tateno, S. Nakamura-Tsuruta, J. Kominami, J. Hirabayashi, O. Nakamura, T. Watanabe, H. Kamiya, T. Naganuma, T. Ogawa, R. J. Naude, K. Muramoto: The function of rhamnose-binding lectin in innate immunity by restricted binding to Gb3. *Dev. Comp. Immunol.*, 査読有 33, 187-197. (2009).
- ② 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*). *Dev. Comp. Immunol.* 査読有 32, 487-499. (2008)
- ③ H. Matsubara, T. Hayashi, T. Ogawa, K. Muramoto, M. Jimbo, and H. Kamiya: Modulating effect of acorn barnacle C-type lectins on the crystallization of calcium carbonate. *Fish. Sci.*, 査読有 74, 418-424. (2008)
- ④ H. Matsubara, S. Nakamura-Tsuruta, J. Hirabayashi, M. Jimbo, H. Kamiya, T. Ogawa, and K. Muramoto: Biosci. Biotech. Biochem. Diverse sugar-binding specificities of marine invertebrate C-type lectins., 査読有 71, 513-519 (2007)
- ⑤ T. Terada, Y. Watanabe, H. Tateno, T. Naganuma, T. Ogawa, K. Muramoto: Structural characterization of rhamnose-binding glycoprotein (lectin) from Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) eggs. *Biochem. Biophys. Acta*, 査読有 1770, 617-629. (2007)

[学会発表] (計6件)

- ① 小川智久: マベガイ真珠バイオミネラリゼーションに関わるADPリボシルトランスフェラーゼの構造と機能、第82回日本生化学会年会、2009年10月24日、神戸ポートアイランド(神戸市)。
- ② 永沼孝子: マベガイ外套膜に含まれる

Jacalin 様レクチンの構造的特徴とバイオミネラリゼーションへの関与、2009 年度日本水産学会秋期大会、2009 年 10 月 1 日、いわて県民情報交流センター・アイーナ（盛岡市）。

③小川智久：タンパク質に依る結晶形成制御と新マテリアル創製への挑戦、メタマテリアル創製シンポジウム、2009 年 7 月 18 日、秋田大学手形キャンパス工学資源学部（秋田市）。

④小川智久：マベ真珠アラゴナイト結晶配向性に関わる新規 26kDa タンパク質の構造と機能、日本農芸化学会平成 21 年度大会、2009 年 3 月 27 日、福岡国際会議場（福岡市）。

⑤永沼孝子：マベガイ外套膜レクチン PPL-1 の微生物に対する相互作用、2008 年度日本水産学会春季大会、2008 年 3 月 30 日、東海大学海洋学部（静岡市）。

⑥永沼孝子：マベガイに含まれるレクチン群の多様な構造と機能、2007 年度日本水産学会秋季大会、2007 年 9 月 27 日、北海道大学水産学部（函館市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (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  
尾定 誠 (OSADA MAKOTO)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：30177208  
[H20→H21:連携研究者]

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：