

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15321

研究課題名(和文)ゲノム情報を基盤とした褐藻レクチンの網羅的探索

研究課題名(英文)Comprehensive investigation for the lectins from brown algae, based on their genome information

研究代表者

平山 真(Hirayama, Makoto)

広島大学・統合生命科学研究科(生)・講師

研究者番号：40535465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖結合性タンパク質「レクチン」は、様々な生命現象に関与する重要なタンパク質であり、ウイルスからヒトに至る全ての生物が持つと予想されるが、潜在的なバイオマス資源であり、私たちの食卓にも馴染みのある褐藻類においてはレクチンの単離報告は皆無である。本研究では、全ゲノム情報が公開されている褐藻種を対象にレクチン探索を試み、オキナワモズク由来レクチン様遺伝子の発見ならびにその活性組換え体の調製に成功した。さらに、褐藻藻体からのレクチン単離を目指してアフィニティークロマトグラフィーを用いた新規レクチン精製法の開発を試み、非単糖結合性かつ高親和性レクチンの溶出に加温が効果的であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

褐藻レクチンの単離例はこれまでになく、本研究により褐藻もレクチンを含有することが明らかとなり、その学術的意義は大きい。我が国の食文化の大きな特徴の一つである海藻食に関連して、今後、食用褐藻レクチンの機能性の一端が明らかになれば、国内外にインパクトを与えることは必至である。日本沿岸に大量に存在し、潜在的なバイオマスとして注目される褐藻からの機能性成分探索という側面から、本成果により褐藻の利用拡大にも寄与できると考えられ、水産学に資するものである。

研究成果の概要(英文)：Lectins, sugar-binding proteins, are important proteins that are involved in a variety of biological processes. While all organisms from viruses to humans are expected to have it, there are no reports of lectin isolation in brown algae, it is a potential biomass resource and there are no reports of lectin isolation in brown algae, which are familiar to us as food and are potential bioresources. In this study, we examined the in silico search for lectins in brown algae species whose whole genome information is available. We succeeded in the discovery of a lectin-like gene and the preparation of an active recombinant of the lectin from the Okinawa mozuku (*Cladosiphon okamuranus*). Furthermore, to aim the isolation of brown algal lectin, the development of a new lectin purification method using affinity chromatography was attempted. It was found that heating during elution was effective in eluting non-monosaccharide binding and high affinity lectins.

研究分野：海洋生物資源化学

キーワード：褐藻 レクチン ゲノム アフィニティークロマトグラフィー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2013年、ユネスコ無形文化遺産に登録された我が国の食文化「和食」は健康食としても注目されているが、その特徴の1つとして海藻食が挙げられる。四方を海に囲まれた我が国では、古くから海藻を食材として利用し、コンブやヒジキなどの褐藻類や海苔などの紅藻類、アオサなどの緑藻類が日常的に食材・食品として食されてきた。これまでにフコイダンやフコキサンチンなどの海藻に含まれる多糖類・脂質成分の生理作用が解析され、我々の健康に寄与することが明らかになりつつあるもの、タンパク質機能性成分についてはほとんど着目されていない。和食ならびに海藻食が注目されるなか、本成分の機能性の解明が求められる。

糖結合性タンパク質「レクチン」は、細胞内外に存在する複合糖質と協働して、免疫、感染、受精など、種々の生命現象に関与する。その重要性から、レクチンはウイルスからヒトに至るまで全ての生物が持つと考えられ、これまでに一次構造・認識糖鎖構造が異なる種々レクチンファミリーが様々な生物から見出されている。複合糖質糖鎖は生物グループや細胞腫、病態によって特徴的な構造を示すことが知られ、これら糖鎖構造に特異的なレクチンは、それらをターゲットとした試薬・医薬素材として有望である。また最近、我々は食用紅藻由来レクチンの栄養機能性に着目した研究を行い、同レクチンが強い抗腫瘍活性を示すことを見出した。しかしながら、コンブやワカメ、モズク、ヒジキなど、食卓に並ぶことの多い褐藻はレクチン様活性を示す夾雑物(ポリフェノール類と推定)を含むため、古典的単離法の適用が難しく、褐藻由来レクチンの単離報告は皆無で、世界的にも例がない。ここで近年、シオミドロやマコンブ、オキナワモズクなどの褐藻類で全ゲノム配列が報告された。これら褐藻のゲノムデータは、同藻由来レクチンを同定するための強力なツールとなると期待される。

2. 研究の目的

海藻類において、緑藻類および紅藻類から種々のレクチンが単離され、その機能性ならびに有用性が解析されているが、私たちの食卓に最も馴染み深く、また水産バイオマスとして有望である褐藻類においてはレクチンの単離報告は皆無で、その機能性は未だ不明である。本研究では、全ゲノム情報が公開されている褐藻種を中心に、ゲノム情報を基盤とした多角的なレクチン探索法を開発・駆使することで、褐藻レクチンの単離・同定を試み、その性状を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、全ゲノム情報が公開されているシオミドロ *Ectocarpus siliculosus*、マコンブ *Saccharina japonica*、およびオキナワモズク *Cladosiphon okamuranus* の褐藻3種を対象に *in silico* スクリーニングを行い、褐藻レクチンの単離・同定を試みた。まず、上記褐藻3種のゲノムデータベースを対象に、動物、植物、藻類、真菌および原核生物由来レクチン100種以上のアミノ酸配列を問い合わせ配列(query配列)として、各種BLAST検索(E値カットオフ:0.001)に供し、これら褐藻ゲノム配列中にコードされるレクチン様タンパク質遺伝子を探索した。これにより見出された既知レクチンと高い相同性を示すタンパク質遺伝子に注目し、特にオキナワモズクゲノム配列に見出された藍藻由来レクチン類似のレクチン様タンパク質遺伝子につき、常法に従い、大腸菌発現系を用いて組換え体調製を行った。同組換え体につき、赤血球凝集活性試験、ならびに種々糖化合物を用いた赤血球凝集阻止試験に供し、さらに、蛍光標識(ピリジルアミノ化)糖鎖を用いた遠心限外ろ過-HPLC法により同組換えレクチンの糖鎖結合特異性を解析した。加えて、トリプトファン(Trp)由来蛍光スペクトルを測定し、無標識糖鎖と組換えレクチン混合後の同蛍光強度の減退を指標にレクチン-糖鎖間の結合を調べた。また、実際にオキナワモズク藻体内での同レクチンの発現の有無を調べるため、別途調製した同藍藻由来レクチンの組換え体を用いてウサギを免疫して同レクチンに対する抗体を調製し、オキナワモズクタンパク質抽出画分を対象にウエスタンブロットに供した。

次に、褐藻藻体からのレクチン獲得手法を検討した。一般にレクチンは、結合糖化合物をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィー(AC)により精製されるが、単糖結合性を示さず、糖鎖に対して高い親和性を示す藻類レクチンは、リガンド結合後の溶出が極めて困難で、ACによる精製は不適である。褐藻レクチンも高親和性である可能性を考え、高マンノース型糖鎖に対して高い親和性を示し、非単糖結合性である藍藻 *Oscillatoria agardhii* 由来レクチン OAA をモデルに、ACにおける溶出条件、特に加温の影響について検討した。まず、大腸菌発現系を用いて調製した組換え OAA (rOAA) を pH3、7 または 11 の緩衝液中で 30-100 で 30 分間インキュベートした後の赤血球凝集活性を指標に、活性を維持できる pH および温度条件を検討した。次に、遠心限外ろ過-HPLC 法によるレクチン-糖鎖間の溶離試験を行った。すなわち、rOAA と蛍光標識高マンノース型糖鎖 M5 (Man 1-6(Man 1-3)Man 1-6(Man 1-3)Man 1-4GlcNAc 1-4GlcNAc-PA) を混和後、室温で 60 分間静置し、この反応液につき微量遠心限外ろ過器(分画分子量: 10 kDa)を用いて未反応の糖鎖をろ過した。このろ過器に溶離溶媒を加え、30-100 で 30 分インキュベート後、遠心ろ過した。溶離溶媒としてリン酸緩衝液(pH7.0)(PB) および各種単糖(マンノース(Man)、ガラクトース(Gal) またはグルコース(Glc)) を 1 M 含む同緩衝液を使用した。各ろ液を HPLC に供して溶出した遊離糖鎖量を求め、溶離率を算出した。さらに、rOAA のリガンドである高マンノース型糖鎖を有する糖タンパク質、イーストマンナン(YM) を固定化したカラムに rOAA を添加し、室温で 1 時間インキュベート後、PB で十分洗浄し、上記と

同様の溶離溶媒に置換して 30-80 で 30 分間インキュベート後に溶出した。加えて、それぞれ異なる高マンノース型糖鎖特異的レクチンを含む緑藻ヒメサボテングサ *Halimeda renschii*、紅藻トサカノリ *Meristotheca papulosa* および同トゲキリンサイ *Eucheuma serra* の 3 種海藻由来 70%飽和硫酸沈殿画分につき、上記と同様の手法により YM カラムを用いた AC に供し、上記試験により有効性が示唆された溶出法の汎用性を評価した。ただし、カラム溶出温度は、3 種藻類レクチンの活性が維持される最高温度とした。

4. 研究成果

BLAST 検索による *in silico* スクリーニングの結果、オキナワモズク、シオミドロおよびマコンブのゲノムデータベースから複数種のレクチン様タンパク質遺伝子が検出された。特に、糖タンパク質の品質管理に関与するレクチン、calnexin、calreticulin および M-type lectin と高い相同性を示す遺伝子が 3 種に共通して見出され、同様の機構が褐藻類にも備わっていることが示唆された。さらに、B-type lectin または C-type lectin ドメインを含む遺伝子も 3 種のゲノムから検出され、他方、高マンノース型糖鎖結合性を示す藍藻 *Microcystis viridis* 由来レクチン MVL と相同性を示すレクチン様タンパク質遺伝子がオキナワモズクゲノムのみでみられた。興味深いことに、本オキナワモズク由来 MVL 様遺伝子 (CoMVL) はイントロン構造を有さず、また藍藻由来のものと同じ配列類似性 (92%) を示すことから、遺伝子の水平伝播により獲得されたものと推察された。同遺伝子につき、大腸菌発現系を用いた組換え体調製を行ったところ、収量は培養液 100 mL あたり 17.5 mg と比較的高収量で得られた。SDS-PAGE の結果、同組換え体 rCoMVL の精製標品は 14 kDa 付近に単一バンドを与え、質量分析により分子量は 14,515.26 Da と測定され、アミノ酸配列からの算出分子量と一致した。赤血球凝集活性試験の結果、rCoMVL は強い凝集活性 (レクチン活性) を示し、すなわち、褐藻から初めてレクチンが単離・同定されたことを確認した。さらにその糖阻止プロファイルは MVL のものと同様の傾向を示した。蛍光標識糖鎖 (高マンノース型) を用い、遠心限外ろ過-HPLC 法により rCoMVL と同糖鎖との結合を調べたところ、rCoMVL-糖鎖間の結合を認めなかった。その要因として、糖鎖の還元末端 N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) の環状構造 (ピラノース環) が蛍光標識 (ピリジルアミノ化) により開環していることが考えられた。そこで、rCoMVL が有する Trp 由来蛍光スペクトルを測定し、無標識の高マンノース型糖鎖と rCoMVL 混合後の同蛍光強度の減退を指標にレクチン-糖鎖間の結合を調べた。その結果、添加糖鎖濃度依存的に蛍光強度が減少したことから、rCoMVL は藍藻由来 MVL と同様、還元末端 GlcNAc の環状構造が保持された高マンノース型糖鎖と結合することが示唆された。実際に同レクチンがオキナワモズク藻体内で発現しているか調べるため、抗 MVL ウサギ抗体を調製し、オキナワモズク藻体のタンパク質抽出画分を対象にウエスタンブロットを行ったところ、コントロールとして用いた rCoMVL が強く検出されたものの、藻体由来タンパク質画分における明瞭な反応は見られなかった。試験に用いた藻体が本レクチンを発現していないか、もしくは極めて微量である可能性が考えられた。

褐藻藻体からのレクチン獲得を目指した AC によるレクチン精製法の検討について、まず、rOAA を対象とした安定性試験の結果、pH3 および 7 の条件で 80 まで元の活性を維持し、90 および 100 で活性が減少した。遠心限外ろ過-HPLC 法による溶離試験の結果、処理温度依存的に糖鎖の溶離率も増加した。また、高マンノース型糖鎖の構成単糖である Man を加えることにより溶離率の増加を期待したが、Man 添加による有意な効果は得られなかった。一方、リガンド固定化カラムに結合した OAA の溶出量が溶出温度依存的に増加することを見出し、さらに本試験では Man 含有溶媒において溶出量が有意に増加した。

高親和性レクチンを含む緑藻 1 種および紅藻 2 種由来硫酸沈殿画分を対象に、AC における加温によるレクチン溶出を試みるため、まず安定性試験を行ったところ、ヒメサボテングサおよびトサカノリ由来画分は 60 まで、またトゲキリンサイ由来画分は 80 まで赤血球凝集活性を維持した。YM カラムを用いた AC において、ヒメサボテングサおよびトサカノリ由来画分は、Man 含有溶媒および 60 の条件における溶出画分において、これらが含有する既知高マンノース型糖鎖結合レクチンに特有のバンドが主要なタンパク質として検出された。一方、トゲキリンサイ由来画分においては、同様の溶出 (ただし 80 加温) により、既知レクチンとともに比較的低分子量の未知の主要成分が検出された。ここで加温した超純水による溶出を試みたところ、意外なことに既知レクチンのみが有意に溶出された。これらの結果から、非単糖結合性/高親和性レクチンを対象とした AC において、少なくとも溶出剤の加温が効果的であることを見出し、対象レクチンにより、さらにリガンド構成糖の添加が有効であることが示唆された。しかしながら、結合した全てのレクチンを溶出するには至っていない。YM には様々な構造の糖鎖が存在するため、これらの糖鎖に対して様々な強度でレクチンが結合していることが考えられ、加温による溶出では比較的弱く結合したレクチンが優先的に溶出し、強く結合したレクチンは溶出できなかった可能性がある。今後、レクチンとの親和性が低い糖鎖やそれを含有する糖タンパク質をリガンドとして用いることにより、溶出率の向上が可能と考えられ、本手法の褐藻レクチン単離への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 稲田 翔太・堀 貫治・平山 真
2. 発表標題 アフィニティークロマトグラフィーによる高親和性藻類レクチンの精製
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 純平・堀 貫治・平山 真
2. 発表標題 In silicoスクリーニングによる褐藻レクチンの探索
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考