

研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2006～2008  
課題番号：18580131  
研究課題名（和文） 腸管上皮の自然免疫機能に関与する分泌型レクチンの機能解析  
研究課題名（英文） Studies on a soluble lectin involved in intestinal mucosal innate immunity  
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：腸管上皮の自然免疫機能に関与する分子として見出した RegIV の機能を明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、RegIV がマンナンなどの糖鎖に結合すること、さらにグラム陽性菌・陰性菌および真菌に対し、その増殖を抑制する作用を有することを見いだした。これらのことから RegIV は腸管上皮より分泌されるレクチンであり、幅広い微生物に対して抗菌作用を示して、感染防御や腸内フローラ制御に重要な役割を担っていることが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,600,000	0	1,600,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	570,000	4,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：腸管上皮、感染防御、自然免疫、レクチン

## 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して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。このように腸管上皮は外部環境との接点として、体内最大とも言える免疫組織を形成している。食品の安全性への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、腸管免疫機構に対する関心は急速に高まっており、国内外で精力的に研究が行われるようになった。しかしながら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、盛んではなかった。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ところであった。

また、本研究課題で研究対象とした腸管上皮由来の分泌型レクチン様タンパク質については、ほとんど情報がなく、レクチン活性（糖結合性）の有無はもとより、その生理機能や免疫機能における役割についても全く知られていなかった。

「4. 研究成果」の項で後述するが、本研究の開始後、2006年に腸管上皮由来の抗菌性レクチンについての興味深い報告がなされ、その機能の重要性が大きく取り上げられるようになった。

## 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た。

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。しかしながら、RegIV の機能はまったく明らかとなっていなかった。

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、すなわち糖鎖への結合性の有無とその特異性、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。

これらに加え RegIV の機能を解明する上で重要となる、(3) 遺伝子発現様式の検討を行った。

## 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 ベクターに挿入するとともに、その N 末端側に GST (グルタ

チオン S-トランスフェラーゼ)、C 末端側に Flag タグ配列 (DYKDDDDK) 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 Rosetta-gami B (DE3) に導入し、IPTG (isopropyl- $\beta$ -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グルタチオン-Sepharose カラムに供し、目的の GST-RegIV-Flag 組み換えタンパク質を精製した。これにプロテアーゼによる限定分解を施して GST 部分を切断除去した後、さらにグルタチオン-Sepharose カラムに供することで、RegIV-Flag 組み換えタンパク質の精製を行った。

### (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-Flag 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 Flag 抗体によるウエスタン解析により、RegIV-Flag 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-Flag 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。

### (4) 糖の抗菌活性阻害作用の解析

上記 (3) で行った *Candida tropicalis* に対する抗菌活性の解析において、各種多糖類の阻害作用を解析した。具体的には菌と RegIV-Flag 組み換えタンパク質とをインキュベーションする際に、各種多糖類を共存させることによる、コロニー形成数への影響をしらべた。

### (5) 遺伝子発現様式の解析

RegIV mRNA の発現制御機構の一端を明らかにするため、菌体成分による RegIV mRNA 発現誘導機構について検討した。具体的には、ヒト腸管上皮モデルである Caco-2 細胞を単層培養し、腸管上皮様に分化させた。これに菌体成分としてリポ多糖 (LPS) を作用させ、

細胞より RNA を回収して RT-PCR 法により RegIV mRNA 発現量の変化を半定量的に検討した。

さらに RegIV mRNA の発現部位を明らかにするため、*in situ* hybridization による検討を行った。マウスの小腸の切片を作製し、マウス RegIV cRNA をプローブとして発現細胞を検出した。腸管上皮細胞群に特異的に発現するマーカー（パネト細胞：デフェンシン-6、ゴブレット細胞：ムチン-2、腸管内分泌細胞：コレシストキニン）についても連続切片による染色を行うことにより、発現細胞を特定した。

#### 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

N 末端側に GST および C 末端側に Flag タグ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、37°C で培養して IPTG による発現誘導を行ったところ、目的の組み換えタンパク質 (GST-RegIV-Flag 組み換えタンパク質) のほとんどは不溶性となってしまうため、各種実験に用いることはできなかった。

そこで、さまざまな培養条件、発現誘導条件により、発現方法の改良を試みた。その結果、培養温度を 15°C、IPTG 濃度を 0.1mM とすることで、目的タンパク質の 50%程度が菌破砕物の可溶性画分に回収されることが確認され、効率的な組み換えタンパク質発現系が構築できた。

可溶性の GST-RegIV-Flag 組み換えタンパク質をグルタチオン-Sepharose カラムにより精製した。GST と RegIV-Flag の間に設計した認識配列を利用し、PreScission protease によるプロセッシングを行った。さらにグルタチオン-Sepharose カラムに供することにより、精製 RegIV-Flag 組み換えタンパク質を得ることができた。

##### (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-Flag 組み換えタンパク質との結合を検討した。その結果、RegIV-Flag 組み換えタンパク質は、グルコース樹脂、マンノース樹脂、ガラクトース樹脂には結合せず、マンノース樹脂に弱い結合性を示した。

また、多糖をカップリングした樹脂との結合性の検討を行ったところ、RegIV-Flag 組み換えタンパク質は、マンノースのポリマーであるマンナンに強く結合することが明らかとなった。

##### (3) 抗菌活性の解析

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) の増殖に対する RegIV-Flag 組み換えタンパク質の作用を検討した。その結果、RegIV-Flag 組み換えタンパク質を作用させた場合、検討した全ての菌において、コロニー形成数の減少が認められた。また、RegIV-Flag 組み換えタンパク質の濃度に依存してコロニー数が減少した。

##### (4) 糖の抗菌活性阻害作用の解析

上記 (2) の結果から、RegIV-Flag 組み換えタンパク質はマンナンに強く結合することが示された。そこで、マンナンを共存させた場合の抗菌活性の変化を検討した。その結果、*Candida tropicalis* に対する RegIV-Flag 組み換えタンパク質の抗菌活性は、マンナンにより抑制されることが明らかとなった。一方、デキストランやアラビノガラクトランを共存させても、抗菌活性に影響は見られなかった。

##### (5) 遺伝子発現制御機構の解析

腸管上皮様に分化させた Caco-2 細胞層に菌体成分として LPS を作用させ、RegIV mRNA 発現量の変化を検討した。その結果、LPS の処理による RegIV mRNA 発現量の変化は観察されなかった。

一方、*in situ* hybridization により検討を行ったところ、腸管上皮細胞群のうち、パネト細胞、ゴブレット細胞に加えて、腸管内分泌細胞にも RegIV mRNA の発現が確認された。

##### (6) まとめ

以上の研究成果から、RegIV がマンノースや、そのポリマーであるマンナンを認識してこれらに結合するレクチンであることが始めて明らかとなった。今後、さらにさまざまな糖カップリング樹脂を用いることにより、RegIV の糖結合特異性が明らかとなると期待される。

さらに、RegIV がグラム陰性菌、グラム陽性菌、および真菌といった幅広い菌に対して抗菌活性 (増殖抑制活性) を示すことが明らかとなった。また、マンナンの共存により、*Candida tropicalis* に対する抗菌活性が抑制されたことから、RegIV の抗菌活性は、糖 (この場合はマンナン) への結合が重要であることが明らかとなった。*Candida tropicalis* の細胞表面にはマンナンが存在することから、RegIV はこれに結合して抗菌活性を発揮していると考えられる。グラム陰性菌やグラム陽性菌に対する抗菌活性においても、細胞表面の糖鎖への結合が重要であると考えられる。

が、その詳細は今後明らかにすべき課題である。

Caco-2 細胞層における RegIV mRNA 発現量に対し、LPS 添加の効果は見られなかったが、作用させる時間などの条件を今後さらに検討する必要があると考えられる。また、結腸癌由来細胞株である Caco-2 は、後述するような RegIV mRNA 発現細胞とは異なる性質をもつことも考えられるため、マウスを用いた *in vivo* での解析も行う必要があると考えられる。

一方、RegIV mRNA の発現がパネト細胞やゴブレット細胞といった外分泌細胞だけでなく、腸管内分泌細胞にも認められたことは、非常に興味深い知見である。すなわち、本研究の成果は、RegIV が腸管腔へ外分泌されて抗菌因子として機能するだけでなく、内分泌されて何らかの機能を有することを示唆したものであり、腸管上皮の分泌型レクチンの機能研究に新たな展開をもたらさうものと考えられる。

本研究の開始当初、RegIV やそれに類似したレクチン様タンパク質の機能には不明の点が多かったが、本研究期間内に興味深い報告がなされた。すなわち、RegIV と類似の RegIII  $\gamma$  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ものである (Cash *et al.*, *Science* 313, 1052-1054 2006)。これは、腸管の自然免疫機能に、分泌型のレクチンが機能しうることを明確に示した知見であり、その重要性は高く評価されている。

一方、本研究では、RegIV がマンナンに結合性を有し、グラム陰性菌、グラム陽性菌、および真菌といった幅広い抗菌スペクトルをもつことを初めて明らかにした。このような特性は上記 RegIII  $\gamma$  とは明らかに異なるものである点で重要な知見であると考えられる。

腸内フローラの異常は、炎症性腸疾患やアレルギーなどさまざまな疾病の原因となることから、腸内フローラ制御機構の解明は重要な研究課題となっている。RegIV は幅広い抗菌性を示すことから、感染防御のみならず、腸内フローラの制御に関与する可能性も推定される。今後、このような観点から RegIV の機能を解析することも重要な課題であると考えられる。

RegIV あるいはこれに類似した分泌型レクチン群の解析は緒についたばかりであり、その糖鎖結合特異性、抗菌機構、さらには発現制御機構など基礎的な特性については解明すべき点が多いのが現状である。しかしながら、本研究や上述した関連分野の研究により、これらタンパク質の独特な機能と、その重要性が明らかになりつつある。今後さらに詳細に研究を行い、これら特性を明らかにするこ

とは、腸管上皮の自然免疫機能の解明に大きく貢献しうると考えられる。また、これらタンパク質の解析は、食中毒などの感染症や、腸内フローラ異常に付随した炎症性疾患などの発症機構の解明にも寄与しうると期待される。

## 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 1 件)

- ① Akiko Shimizu-Ibuka, Yuji Nakai, Keisuke Nakamori, Yuji Morita, Ken-ichiro Nakajima, Koji Kadota, Hirohito Watanabe, Satoshi Okubo, Tohru Terada, Tomiko Asakura, Takumi Misaka, and Keiko Abe, "Biochemical and genomic analysis of neoculin compared to monocot mannose-binding lectins." *J. Agric. Food Chem.* 56, 5338-5344 (2008)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 高橋玄、岡絵美子、浜本牧子、渡辺寛人  
「腸管上皮細胞から分泌される C-type レクチン RegIV の機能解析」  
日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 28 日、福岡市

## 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

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし