

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：41306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580296

研究課題名(和文)二枚貝における未受精卵成熟調整因子の探索とその応用

研究課題名(英文)Study on research of regulation factor of unfertilized eggs in bivalves.

研究代表者

永沼 孝子(Naganuma, Takako)

東北生活文化大学短期大学部・その他部局等・准教授

研究者番号：50250733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：マベガイから単離・精製した複数のレクチン画分について構造と生理機能を検討した。このうち5画分について得られたN末端配列はすべて相同性を有していた。生理機能を検討した結果、次の3つに大別された。グラム陰性菌を凝集・抗原提示を行い、生体防御の役割を担う。炭酸カルシウムの結晶化過程において、マトリックスタンパク質として働くものと、アラゴナイト結晶生成を促進するものがある。未受精卵の成熟制御に関する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The structures and physiological functions were studied on the several lectin fractions which purified from Pteria penguin pearl oyster. In these fractions, N-terminal sequences of five fractions were homologous reciprocally.

These physiological functions were roughly classified into three groups. Self-defence function by agglutinating of gram negative bacteria and antigen presenting. Role as a matrix protein of calcium carbonate crystallization and as facilitating the aragonite crystal formation. Involvement in the control of maturation in unfertilized eggs.

研究分野：水産化学

キーワード：レクチン マベガイ 生体防御 カルシウム結晶化 生殖腺

1. 研究開始当初の背景

報告書らは、以前に真珠貝の一種である二枚貝、マベガイの外殻膜から得られたレクチンが、雌性生殖腺にも局在していることを確認している。一方、魚卵に存在するレクチンに雌の未受精卵の成熟を制御する生理機能が見出されており、これらのレクチンとマベガイレクチンは約35%程度の相同性を有していた。その後、報告者らは前述のレクチンとは全く構造が異なる11種のレクチン画分を新たに単離・精製したが、これら11種の一次構造はすべて相同性を有しており、その中には相当量が含まれるものも見られた。そこで、これらのマベガイの生体における生理機能について検討することにした。

一般に知られているレクチンの生理機能は自然免疫系による生体防御能であるが、前述のように一部のレクチンは生殖腺に発現していることや11種ものレクチンが単離されたことから、生体防御以外の生理機能を有する可能性が考えられた。また、多細胞生物における生殖細胞の成熟過程に関するプロセスは大きく変わらないことから、二枚貝での研究結果は高等動物における未受精卵成熟過程解明の一助と成りうる可能性がある。さらに、多くのレクチンに共通する微生物凝集反応(生体防御能)についても解明することで、ヒトにおける病原菌感染防御のために資することができると思えた。

2. 研究の目的

マベガイ外殻膜より得られた新規レクチン9種について、生殖機能を軸とした生理機能の解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) レクチンの一次構造の検討

Resource Sを用いた陽イオン交換クロマトグラフィーこれまでの研究で、マベガイ外殻膜の抽出液は糖結合特異性を有し、特にマンノースとトレハロースに強い結合特異性を示すことが分かっている。この結果に基づき、マンノースをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーと陽イオン交換クロマトグラフィーによってレクチン画分を単離した。得られた複数の画分について、プロテインシクエンサーを用いてN末端配列を決定した。この配列について、既知レクチンの一次構造との相同性を調べた。このうち高いレクチン活性が見られ、N末端配列の決定ができた画分について検討を進めた。

(2) レクチンの生殖機能に対する影響

N末端配列が決定できたもののうち2画分について抗体作成を試み、各組織から抽出したタンパク質を用いてウェスタンブロットを行い、組織における局在を調べた。

(3) レクチンの各種細菌に対する影響

得られた画分のうちレクチン活性が高く、量的に試験に供するに十分なものを用いて変異種

を含むグラム陰性菌であるサルモネラ菌の5種および大腸菌2種について、凝集能を調べた。次に、レクチンを細菌とともにPBS中、37°Cでインキュベートし、マイクロプレートリーダーを用いてλ600nmにおける吸光度を経時的に測定し、各種細菌の増殖速度を測定して静菌能を調べた。また、各細菌を寒天培地中で培養し、抗菌能を調べた。

(4) レクチンのカルシウム結晶化に対する影響

得られたレクチン画分の一つが、別法で単離した相同性レクチン2画分に相当することが明らかになった。これらについてはカルシウムの結晶化制御能を有する可能性が報告者等の研究によって示唆されており、これを精査するために塩化カルシウムおよび炭酸水素ナトリウムを含む人工海水に6種類の濃度に調節した2つのレクチン画分をそれぞれ添加して炭酸カルシウムの結晶化を試み、結晶の形態を顕微鏡下で観察し、結晶の数を計測した。

4. 研究成果

(1) レクチンの一次構造

マンノースアフィニティークロマトグラフィー、および陽イオンクロマトグラフィーによって大小11画分(P-1~P11)のタンパク質が得られた(図1)。これらのN末端配列を検討したところ、P1~3のN末端25残基は同一であったので、3本についてはこのうち最も量の多かったP-1のみを使い、全部で9本のピークについて検討を進めた。またP-5,8,11は比較的少量に得られ、他の画分と異なる配列を示したので、(表1)以後はP-1,5,8,11について精査することとした。P-5は二量体であり、特にトレハロースと強い結合特性を示したので、すでにトレハロースアフィニティークロマトグラフィーによって精製している2画分(PPL-A=ヘテロ二量体、PPL-B=ホモ二量体)の配列と比較したところ、これらと同一のサブユニットから成るものであることがわかった。そこで、P-5はPPL-A、-Bと同一の物として、すでに得られているタンパ

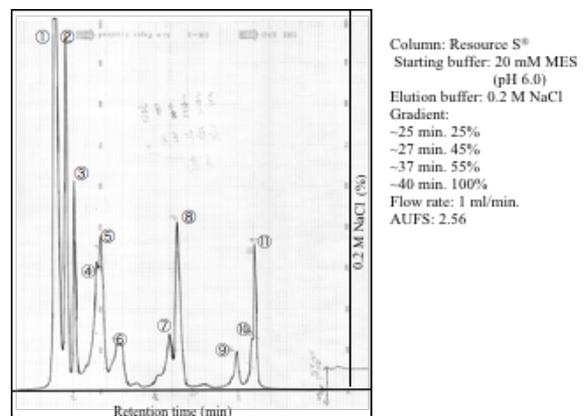


図1 Resource Sを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー

表1 マベガイ由来レクチン画分アミノ酸配列

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
P-1	T	I	A	R	K	Y	L	G	G	P	G	G	D	A	F	D	D	K	A	V	A	D	N	G	D	I	E	R	I	
P-2	T	I	A	R	K	Y	L	G	G	P	G	G	D	A	F	?	D	K	A	V	A	D	N	G	D	I	E	R	I	
P-5	A	K	L	P	Q	Y	L	G	I	V	G	G	N	G	G	G	A	K	D	E	?	?	L	N	D					
P-8	S	C	G	A	L	R	E	S	Y	G	G	P	G	L	N	R	F	D	E	K	A	L	V	K	N	G	D	I	K	
P-11	E	I	A	S	E	Y	E	G	G	P	G	G	D	A	K	D	D	I	A	P	A	D	N	G	D	I	?	R	E	

ク質を用いた。

(2) レクチンの生殖機能に対する影響

(1)で得られた P-5, P-8 について、ポリクローナル抗体を作製し、各組織から抽出したタンパク質とともにウェスタンブロットに供したが、幾度かにわたって試行し外套膜と生殖腺にわずかに反応が見られたものの、抗体の特異性が低く、明確な結果は得られなかった（現在検討中）。

そこで、これまでに多岐にわたって検討してきたレクチンの生理機能のうち、生体防御能（細菌に対する凝集能）についての精査を並行して進めることとした。

(3) レクチンの各種細菌に対する影響

P-1,5,8,11 の細菌に対する凝集能を検討した結果、P-11 に複数種に対する凝集が見られた（表 2）。そこで、P-11 を用いて細菌の増殖抑制効果を調べた。液体培養した細菌に各濃度になるように調製したレクチンを添加し、増殖速度を測定した結果、P-11 はグラム陰性菌の Rd 変異株に対して最も強い増殖阻害を示し、S 株（野生型）に対しても弱いながら効果を示すことが分かった。（図 2）

表2 レクチンの微生物凝集活性

Name of Bacteria	agglutination activity ($\mu\text{g/ml}$)*			
	P-1	P-5	P-8	P-11
LT-2 (S)	ND**	ND	ND	16
His-519 (Rc mutant)	ND	ND	250	ND
SL-1004 (Rd mutant)	ND	ND	125	8
SL-1002 (Re mutant)	ND	ND	ND	125
TA-2168 (Re mutant)	ND	ND	ND	250
E. coli B (S)	31	ND	63	31
E. coli K12 (S)	125	125	ND	4

*: Minimum concentration of lectins required to agglutinate bacteria.
 **: Not detected at the concentration of 500 $\mu\text{g/ml}$.

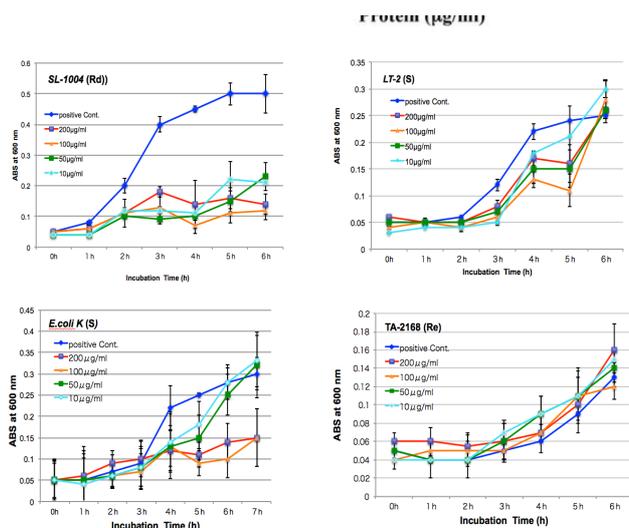


図2 P-11 の細菌増殖抑制作用

サルモネラ菌の Rd 変異株は細菌表面を覆うリポポリサッカライド (LPS) 構造の一番外側にヘプトースが存在しているが、この骨格はマンノースと同一であり、一方 S 株の先端にもマ

ンノースが結合しているものの、ここにアベクオースが結合しているため、抑制効果が弱まったと考えられた。さらに、P-11 の抗菌能について検討したが、いずれの菌に対しても殺菌作用は認められなかった。これらの事実より、P-11 は、グラム陰性菌 LPS のマンノースおよびその骨格を有する糖を認識し、結合・凝集することで抗原提示を行うと考えられた。また、P-8 にも弱い凝集活性が見られたが（図 2）、有意な静菌効果は認められなかった。

(4) レクチンのカルシウム結晶化に対する影響

P-5 に相当するレクチン画分は、トレハロースをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーによって得られた 2 つの相同性レクチン (PPL2-A, -2B) と同一であることがわかった。これらは、報告者らの研究によってカルシウムの結晶化に参与する可能性が示唆されていたので、このことについて検討した。人口海水中に PPL-2A を添加した群ではカルサイトの多結晶質形成が促進された（図 3）。蛍光色素を用いた顕微鏡観察では PPL-2A が多結晶の結晶境界面に局在しており、これらはカルサイト単結晶とは異なる形態であった。一方、PPL-2B 添加群ではアラゴナイトの結晶化が促進されていた。この結果より、PPL-2A は二枚貝における炭酸カルシウム結晶化の際に、マトリックスタンパク質として機能していることが示唆された。一方 PPL-2B はアラゴナイト様結晶の形成を促進するものと推測された。

このことから、カルシウム結晶化への関与が明らかになった 2 つのレクチンは、マベガイにおけるバイオミネラル化においてそれぞれ異なる役割を担っていることが示唆された。

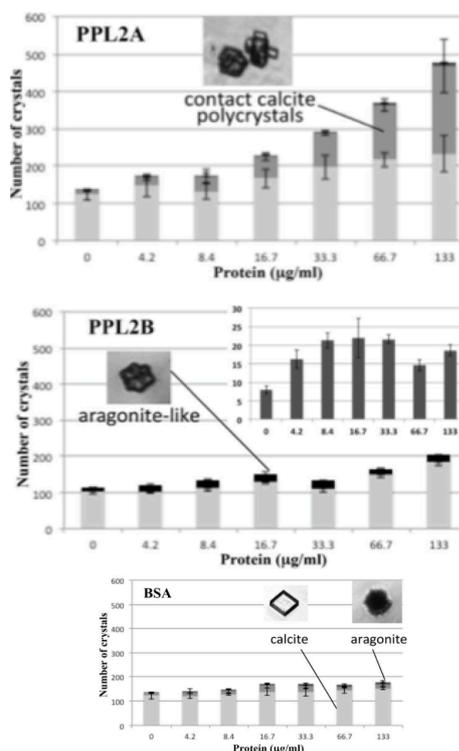


図3 P-5 のカルシウム結晶化におよぼす影響

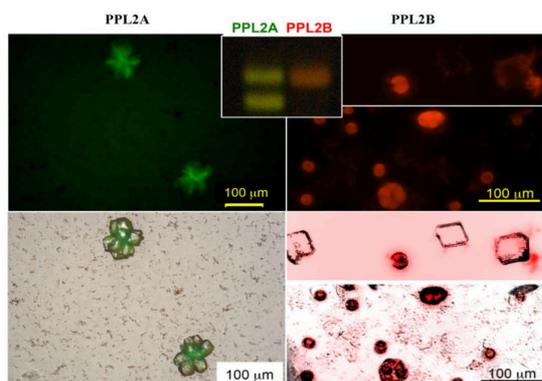


図4 P-5が炭酸カルシウム結晶の形態におよぼす影響(蛍光顕微鏡像)

(5) まとめと展望

マベガイ外套膜から抽出された複数レクチンは、グラム陰性菌におけるLPS糖鎖のマノースを認識して結合することが明らかになった。下等動物にとって、自然免疫系は生体を守るために非常に重要な役割を持つ。今回試験に供したレクチン群が細菌を凝集したのちにどのように抗原提示を行うのか、また増殖阻害のメカニズムがいかなるものかをこの後解明できれば、他の動物やヒトに対して病原性を示す細菌に対する阻害効果が期待できる。

トレハロース結合特異性を有するレクチン2種は、それぞれ真珠の形成においてマトリックスタンパク質として働く役割と、真珠層の形成を促進する役割を担っていることが示唆された。マベ真珠の品質は数年かけて養殖した後に初めて分かるものであるが、費やす時間の割に良質が得られる割合は少ない。今回、真珠層が形成されるメカニズムの一端を解明できたことで高品質真珠の生産量向上に向けての一助になるうかと思われる。

マベガイからはこの他にも複数のレクチンが単離されており、そのうちの一種で、魚卵と相同性を示すレクチンはノーザンブロットによって mRNA が生殖腺に局在することを明らかにしている。今回得られたレクチンについては、特異性の高い抗体が得られず、明確な結果を得ることができなかったが、生殖機能に関与する可能性は考えられる。

また、今回得られた複数のレクチン画分のうち、最も多量に得られたP-1、-2には、微生物凝集能もほとんどみられず、カルシウム結晶化制御能も確認できなかったことが謎として残っている。しかしながら他の画分と比較して非常に多量に存在する事実から、例えばmassとして存在することに意味があるのか、など生理機能の解明が待たれる。

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 4 件)

- ① T.Naganuma, W.Hoshino, Y.Shikanai, R.Sato, K.Liu, S.Sato, K.Muramoto,

M.Osada, K.Yoshimi, T.Ogawa: Novel Matrix Proteins of Pteria Penguin Pearl Oyster Shell Nacre Homologous to the Jacalin-Related β -Prism Fold Lectins. *PLOS ONE* 査読有 9, e112326 (2014)

- ② 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.*, 査読有 79, 513-519 (2013)

- ③ S.Yamamoto, M.Tomiyama, R.Nemoto, T.Naganuma, T.Ogawa, K.Muramoto: Effect of Food Lectins on the Transport System of Human Intestinal Caco-2 Cell Monolayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有 77, 1917-1924. (2013)

- ④ 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.*, 査読有 287 (37), 31061-31072. (2012)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 永沼孝子: マベガイに含まれる複数のレクチンの生体防御機能: 平成25年度日本水産学会秋季大会, 平成25年9月20日, 三重大学 (津市)
- ② 小川智久: マベ真珠由来ジャッカリン様レクチン群のバイオミネラルリゼーション調節機能: 第8回東北糖鎖研究会, 平成24年9月6日, 岩手大学 (盛岡市)
- ③ 小川智久: マベ真珠の足糸繊維構造を制御するTIMP様タンパク質の構造と機能, 日本化学会第94春季大会 平成24年3月28日, 名古屋大学 (名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(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

村本 光二 (MURAMOTO KOUJI)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号: 90157800

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし
