

氏 名(本籍)	やま 山	ぐち 口	まさ 政	と 人
学位の種類	博 士 (農 学)			
学位記番号	農 博 第 594 号			
学位授与年月日	平 成 12 年 3 月 23 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科資源生物科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	Molecular Structures and Physiological Functions of Lectins Produced by Freshwater Cyano- bacteria (Blue-green Algae) (アオコ形成ラン藻レクチンの分子構造と生理機能に関 する研究)			
論文審査委員	(主 査)	教 授	村 本	光 二
		教 授	大 島	泰 克
		教 授	佐 藤	實

論文内容要旨

序論

糖鎖をもった生体分子や組織を特異的に認識して結合するレクチンは、ウイルスから高等動物まで広く生物界に分布している。糖鎖を情報媒体とするレクチンは、多様な構造と糖結合特異性および生体内での分布を持ち、糖代謝をはじめ、異物認識、細胞間相互作用、胚発生分化への関与など、多彩な生理機能をもつタンパク質であることが高等動物を中心に明らかにされてきている。しかしそれでも、レクチンの生理機能に関する研究は、生化学試薬への利用を目指したレクチンの探索や構造活性相関に関する研究と比べて、その分子多様性が障害となっているためか、系統的になされているものが少ない。レクチンは構造上の類似性と糖結合特異性を基に多くのファミリーに分類されている。それらのファミリーの中にはレクチンの活性発現領域が生物種を越えて保存されているものも少なくない。このように生物に普遍的に分布し、広範な生命現象に関わっているレクチンの生理機能の解明は、基礎と応用の両面から強く求められている。

本研究の対象生物であるラン藻 (シアノバクテリア) は、原核生物でありながら酸素発生型の光合成を行い、海洋から淡水域、乾燥した陸上にまでの広範囲な生息環境に分布している。また、「アオコ」の名称で知られるラン藻 *Microcystis* 属は、夏の時期に湖沼やダム湖で異常増殖し、発ガン性の肝臓毒を産生するので、公衆衛生上問題となっている環境汚染生物である。そのためラン藻の生理学的特性、特に有毒ラン藻の生育過程を細胞レベルで理解することが必要である。このような背景から本研究では、系統進化的にも、また、生態学的にも特異な生物であるラン藻の中で、特に *Microcystis* 属が産生するレクチンに着目し、レクチンがラン藻の生命過程でどのように機能しているのかを解明するために、その生化学的特性ならびにレクチン産生に及ぼす生育環境の影響を検討した。

【1】ラン藻 *Microcystis* 属におけるレクチンの分布

アオコ形成ラン藻におけるレクチンの分布に関する知見はほとんどない。そこで、アオコの出現で知られる霞ヶ浦 (茨城県) と津久井湖 (神奈川県) からアオコ・ラン藻 *Microcystis* 属を採取し、その抽出液の赤血球凝集活性をスクリーニングした (Table 1)。その結果、霞ヶ浦および津久井湖の藻体にはともにヒトおよび各種動物赤血球に対する凝集反応が認められ、レクチンの存在が示唆された。これらには赤血球に対する活性に相違がみられた。これは複数種の *Microcystis* 属が存在すること、または生育環境により異なるレクチンが産生されていることなど複数の因子によるものであると推測した。これらの点を明らかにするために、さらに、アオコから単離培養した *Microcystis* 属 3 種 16 株を用いて同様の試験を行った (Table 2)。その結果、*M. aeruginosa* M228 株および *M. viridis* NIES-102 株が顕著な活性を示したので、本研究では、これら 2 株を培養して産生させたレクチンについて調べた。

【2】*M. aeruginosa* M228 レクチン (MAL) の特性

2-1. MAL の単離

ラン藻 *M. aeruginosa* M228 株を温度 25°C、光強度 45 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 、通気 120 ml/min の条件下、MA 培地で培養した。細胞の抽出液を硫酸塩析し、活性画分を酸処理 Sepharose 4B カラムにかけレクチンを吸着させ、D-ガラクトースで溶出、続いて TSKgel G3000 SW で単離した。SDS-PAGE で 57 kDa に相当する位置に還元剤の存在に関わらず単一の成分を確認した (Fig. 1)。以上の結果から、MAL

は分子内に半シスチン残基をもたない単鎖ポリペプチドであることが分かった。

2-2. MAL の性状

MAL の糖との親和性を調べるため、19 種の糖および 8 種の糖タンパク質を用いて赤血球凝集阻害試験を行った。N-アセチル-D-ガラクトサミンが最も低い濃度で MAL の赤血球凝集を阻害した。O-結合型糖鎖をもつ糖タンパク質ムチン及びそのアシアロ体も阻害を示した (Table 3)。MAL の温度安定性を調べたところ、40°C、30 分間で活性が 50% 減少し、50°C では 30 分間で完全に失活した。また、活性の発現にはカルシウムイオンを要求した。

2-3. MAL 遺伝子 (*mal*) のクローニングおよび 1 次構造解析

レクチンの部分アミノ酸配列を気相プロテインシークエンサーで決定した。続いて M228 染色体 DNA を鋳型として、部分配列を基に作製したプライマーを用いて PCR によりクローニングし、MAL 遺伝子を含む 3468 bp の配列を決定した。MAL はアミノ酸 519 残基をコードする 1557 bp の翻訳領域から構成され、アミノ酸配列から計算した分子量は 55,159 であった (Fig. 2)。C 末端側にはアミノ酸約 60 残基からなる相同な配列 (MALrp-1, -2, -3) が 3 回繰り返して存在していた (Fig. 3A)。この繰り返し配列は嫌気性細菌 *Clostridium beijerinckii* の α -アミラーゼの繰り返し配列 (CB-1, -2, -3, -4, -5) と 30% の相同性を示した (Fig. 3B)。MAL の繰り返し配列のハイドロパシープロファイルでは、多くの動植物レクチンで知られているように、糖との相互作用に関与すると推定される芳香族アミノ酸チロシンが親水性領域に存在していた (Fig. 3C)。以上の結果から、MAL は単量体で存在するが、それぞれの繰り返し配列が糖結合領域となって赤血球凝集反応をもつと予測した。データベース検索では、他の微生物や動植物レクチンとの相同性は見つからなかった。

【3】 *M. viridis* NIES-102 レクチン (MVL) の特性

3-1. MVL の単離

ラン藻 *M. viridis* NIES-102 株を温度 25°C、光強度 45 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の条件下、MA 培地で培養した。細胞の抽出液を硫酸塩析し、活性画分を Phenyl Sepharose、Phenyl Superose を用いる疎水クロマトグラフィー、続いて Superose 12 HR10/30 のゲル濾過クロマトグラフィーにより単離した。SDS-PAGE で 13 kDa に相当する位置に還元剤の存在に関わらず単一の成分を確認した (Fig. 4)。以上の結果から、MAL と同じく MVL は分子内に半シスチン残基をもたない単鎖ポリペプチドであることが分かった。

3-2. MVL の性状

19 種の糖および 8 種の糖タンパク質を用いて赤血球凝集阻害試験を行い、MVL の糖との親和性を調べた。赤血球凝集活性は、単糖類および二糖類には阻害されず、酵母マンナンが最も低い濃度で MVL の赤血球凝集活性を阻害した (Table 4)。MVL を 50°C に加温しても活性を完全には失わず、MAL よりも高い熱安定性を持っていた。また、MVL は MAL とは異なり活性の発現に 2 価金属イオンを必要としなかった。

3-3. MVL 遺伝子 (*mvl*) のクローニングおよび 1 次構造解析

レクチンの部分アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサーで決定した。続いて NIES-102 染色体 DNA を鋳型として、部分配列を基に作製したプライマーを用いて PCR によりクローニングし、*mvl* を含む 578 bp の配列を決定した。MVL は、アミノ酸 114 残基をコードする 342 bp の翻訳領域から構成され、アミノ酸配列から計算した分子量は 12,367 であった (Fig. 5A)。分子内には N 末端側と C 末端側にそれぞれアミノ酸 54 残基からなる相同なドメインをもつ 2 回繰り返し配列構造が存在した (Fig. 5B)。MVL のヒドロパシープロファイルでは、1 つのドメイン内に 2 つの親水性領域が存在し、それぞれの領域には糖との相互作用に関与すると推定される芳香族アミノ酸のトリプトファンとフェニルアラニンが存在しており (Fig. 5C)、これら 2 つの繰り返し配列が糖鎖との結合に関与していることが示唆された。データベース検索では、他の微生物や動植物レクチンを含むタンパク質との相同性は見つからず、さらに MAL との間にも相同性はみられなかった。

3-4. 大腸菌を宿主とした発現系の構築および精製法の確立

NIES-102 株における MVL の産生量が微量であるため、発現タンパク質の調製を試みた。*mvl* を pTV118 N ベクターの *lac* プロモーター下流に導入し、*E. coli* JM109 を形質転換後、37°C で培養した。菌体内に発現したりコンビナント MVL (rMVL) を SDS-PAGE および赤血球凝集阻害試験により確認した。発現タンパク質の精製をアシアロフェチュインカラムによるアフィニティークロマトグラフィーで行った (Fig. 6A)。8 M 尿素溶出画分に含まれた rMVL は SDS-PAGE で単一のバンドを与えた (Fig. 6B)。本法では、藻体からの精製に比べ約 20 倍の収量を得ることができた。

【4】*Microcystis* 属レクチンの生理機能

4-1. MAL 産生に及ぼす光強度の影響

M228 株を異なる光強度下で培養した時の細胞当たりのレクチン量を抗 MAL ポリクローナル抗体を用いる ELISA 法によって定量した。光強度を 12、30、45、65、90 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ に設定し、定常期での MAL を定量した。その結果、12 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ で培養した時は 45~90 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の時に比べて、レクチン量が約 3 倍に増加した (Fig. 7A)。次に、成長過程の MAL の変動を調べたところ、MAL は対数期後期で最大量となった (Fig. 7B)。すなわち、細胞の増殖速度が遅くなるような低光強度の条件下でレクチン産生がより多く誘導された。

4-2. MAL 産生に及ぼす温度の影響

M228 株を 15、20、25、30、35°C で培養し、細胞当たりのレクチン産生量を ELISA 法で定量した。培養温度を 15°C にすると、30°C の時に比べて MAL が約 9 倍に増加した (Fig. 8A)。レクチン量は対数期の後期に最大となった (Fig. 8B)。この時の増殖速度は高い培養温度の細胞よりも遅く、細胞の増殖速度が低下するような低温でレクチン産生が誘導されることが分かった。

4-3. MAL の細胞内分布

M228 株のフィコビリゾームとそれ以外の可溶性画分にシヨ糖密度勾配遠心分離で分けた。フィコビリゾーム画分にはレクチン活性はみられず、MAL は細胞質または膜表在性のタンパク質であることが示

唆された (Fig. 9, Table 5)。

次に、M228 細胞の超薄切片を作製し、金コロイド抗体を用いた免疫染色を行い、電子顕微鏡で MAL の細胞内分布を観察したところ、核様体およびチラコイド付近に金コロイドの付着が観察された (Fig. 10)。チラコイド間隙に局在するタンパク質には、膜構造安定化に寄与すると考えられている緑藻類のレクチンや低温時に誘導される不飽和化酵素がある。また、ストレス応答に機能するシャペロン (DnaK、DnaJ) も細胞質またはチラコイド間隙に局在し、ラン藻毒マイクロシスチンも核様体やチラコイド間隙に局在することが知られている。MAL とこれらの成分との関連性は今のところ不明である。

4-4. ラン藻 *Microcystis* 属における MAL 類似遺伝子の分布

アオコ形成ラン藻 *M. aeruginosa* 5 株、*M. viridis* 2 株、*M. wesenbergii* 2 株について、MAL 遺伝子をプローブとしてゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行った。*M. aeruginosa* では M228 株以外には M204 株に、また *M. wesenbergii* の NIES-108 株にも陽性反応が検出された。さらに、M228 株と NIES-108 株では複数のシグナルが検出されたので、染色体 DNA に MAL 類似遺伝子のコピーが複数存在することが確認できた (Fig. 11)。

4-5. MVL 産生に及ぼす培養における通気の影響

M. viridis NIES-102 株を通気量 0、10、50、100 ml/min で培養し、成長過程における細胞当たりの赤血球凝集活性の変動を調べた。通気を行わなかった (0 ml/min) 細胞では、増殖速度が最も遅く、定常期に一過性のレクチン活性が認められた。通気を 10 ml/min に増加させた細胞では弱い活性がみられたのみであった。50 ml/min および 100 ml/min で培養した細胞では活性がみられなかった (Fig. 12)。この結果から、NIES-102 株では強制的な通気をしない条件下でレクチン産生が誘導されることが明らかになった。

4-6. MVL の細胞内分布

シヨ糖密度勾配遠心分離により、NIES-102 株の抽出液をフィコピリゾームとそれ以外の可溶性画分に分離し、赤血球凝集活性試験を行った。MVL も MAL と同様に、細胞質または膜表在性のタンパク質であることが示された。

総括

アオコを形成するラン藻 *Microcystis* 属のうち、*M. aeruginosa* M228 株と *M. viridis* NIES-102 株が産生するレクチン、MAL と MVL をラン藻レクチンとして初めて単離精製した。これらのレクチンは各々異なる糖結合特異性と分子量を持ち、レクチン遺伝子のクローニングによって解析した 1 次構造にも相同性はみられなかった。しかし、いずれも単量体で存在し、分子内には糖鎖認識部位と予測される繰り返し配列を保有していた。MAL と MVL の構造には、どちらにも既知のレクチンとの相同性が検出されず新規のレクチンファミリーに属すると考えられる。

レクチンの生理機能を知る手がかりを得るために、レクチン産生への培養条件の影響を調べた。M228

株では、増殖速度が低下する低照度または低温度で MAL の産生が促進され、NIES-102 株では培養時に通気しない時に MVL が産生されることが明らかになった。従って、M228 株と NIES-102 株では、レクチン産生の誘導条件が異なるものの、いずれでも細胞増殖が抑えられるようなストレス環境下でレクチンの発現が誘導された。これらのレクチンは、核様体およびチラコイド間隙に局在しており、環境因子に応答する既知タンパク質の局在性と類似していることから、ラン藻における環境応答機構の一端を担っていると考えられる。

発表論文

Sakamoto S, Yamaguchi M, Watanabe F M, Watanabe M and Kamiya H. Distribution and characterization of lectins from natural and cultured *Microcystis* sp. Harmful and Toxic Algal Blooms (ed by Yasumoto, T et al.) p.569-572, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 1996.

Yamaguchi M, Jimbo M, Sakai R, Muramoto K and Kamiya H. Purification and characterization of *Microcystis aeruginosa* (freshwater cyanobacterium) lectin. Comp. Biochem. Physiol., 119B, 593-597 (1998).

Yamaguchi M, Ogawa T, Muramoto K, Kamio Y, Jimbo M and Kamiya H. Isolation and Characterization of a Mannan-binding Lectin from the Freshwater Cyanobacterium (Blue-green Algae) *Microcystis viridis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 印刷中.

Yamaguchi M, Ogawa T, Muramoto K, Jimbo M and Kamiya H. Effects of Culture Conditions on the Expression Level of Lectin in *Microcystis aeruginosa* (Freshwater Cyanobacterium). Fish. Sci. 投稿中.

Jimbo M, Yamaguchi M, Muramoto, K and Kamiya H. Cloning of *Microcystis aeruginosa* M228 lectin (MAL) gene. 投稿準備中.

Table 1
Hemagglutinating activity and toxicity of *Microcystis* sp. from natural blue-green algae samples.

Sampling site (Prefecture)	Activity against erythrocytes			Ca ²⁺ dependency for hemagglutination	Toxicity ^{a)} LD ₁₀₀ (mg/kg)
	Rabbit	Horse	Ox		
Lake Kasumigaura (Ibaraki)	+	+	+	+	760
Lake Tsukui (Kanagawa)	+	-	+	+	620

a) LD₁₀₀ was calculated in terms of milligram of dry weight of algal cells per kilogram body weight of mouse.

Table 2
Hemagglutinating activity and toxicity of cultured *Microcystis* sp.

Strain	Activity ^{c)}	Activity against erythrocytes (Titer) ^{a)}				Toxicity ^{b)} (mg/kg)
		Rabbit	Horse	Ox	Human	
<i>M. aeruginosa</i>						
M228	A	128	64	-	16	32 16 64 260
M126	-	-	-	-	-	NT NT NT >960 ^{d)}
M204	-	-	-	-	-	NT NT NT NT ^{d)}
TAC51	H	8	-	-	-	NT NT NT >1080 ^{d)}
TAC63	H	8	-	-	2	NT NT NT 330
TAC81	-	-	-	-	-	NT NT NT >790 ^{d)}
NIES-98	H	4	-	-	-	NT NT NT >1180 ^{d)}
NIES-100	-	-	-	-	-	NT NT NT >810 ^{d)}
NIES-298	-	-	-	-	-	NT NT NT 190
<i>M. viridis</i>						
TAC44	H ^{e)}	4	2	-	2	NT NT NT 320
TAC64	-	-	-	-	-	NT NT NT 410
TAC78	H	4	2	2	-	NT NT NT 310
NIES102	A	256	256	-	-	NT ^{f)}
<i>M. wesenbergii</i>						
TAC40	-	-	-	-	-	NT NT NT >800 ^{d)}
NIES-106	-	-	-	-	-	NT NT NT NT
NIES-108	-	-	-	-	-	NT NT NT NT

a) - = No activity, NT = Not tested.

b) LD₁₀₀ was calculated in terms of milligram of dry weight of algal cells per kilogram body weight of mouse.

c) A = hemolysis. H = hemagglutination.

d) No mice died at this concentration.

e) Hemolytic activity was observed after hemagglutination.

f) This strain was toxic in the previous data.

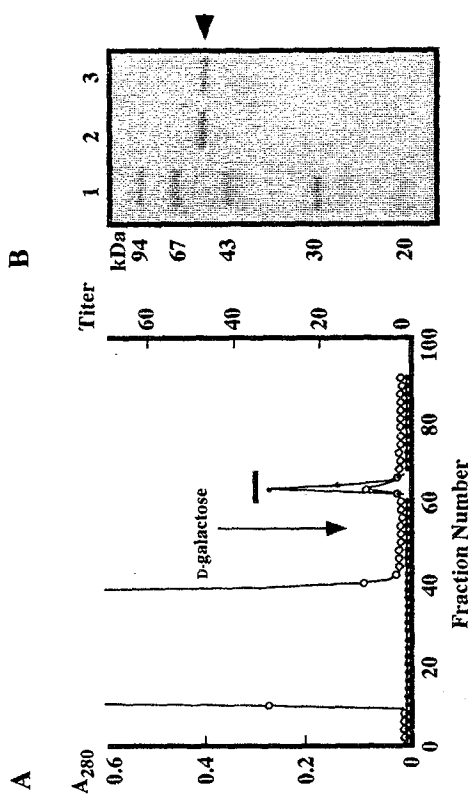


Fig. 1. Purification of MAL. (A) Affinity chromatography of MAL on acid-treated Sepharose 4B. Fractions were measured for the absorption at 280 nm (O-O) and the hemagglutinating activity against rabbit erythrocytes (●-●). (B) 12% SDS-PAGE of MAL. Lanes: 1, Standard protein; 2, MAL under reduced condition with 2-mercaptoethanol; 3, MAL under non reduced condition.

TABLE 3

Inhibition of hemagglutinating activity of MAL by saccharides and glycoproteins

Saccharides and glycoproteins	Minimum concentration ^{b)}
N-acetyl-D-galactosamine	0.8 (mM)
D-galactose	25.0
lactose	12.5
PSM ^{c)}	19.5 (μg/ml)
asialo PSM	19.5
asialo BSM ^{d)}	19.5
asialo fetuin	625.0

a) The purified lectin diluted to titer of 64 were used for tests.

b) Minimum concentration of saccharides and glycoproteins required for complete inhibition of agglutinating activity against rabbit erythrocytes.

c) mucine Type II from porcine stomach

d) mucine Type I from bovine submaxillary gland

412 L F S D G S A I T C N R G A E G C W
 TPA GCT TCT AGT TTT GCA AGT CCT AAA GTA GTA GGG GGC GAC GGT AAT TAC 1512
 430 L A S S G F A S P K V G D A N Y
 448 Y N R A L N K L I T N G F L I E
 AAC CTA GAA ACT ANG GGT TAT TTG TTC TCT GAT GGT AAT CCC ATC GGG GGC AAT 1620
 466 N L E I F R Y L F S D G L N P I G G N
 484 R G A C C G A G G G G T T A C C T C T A G T G E T T T T G C A A G T C C C A A C G T G 1674
 502 V G A D A N Y Y N R A I W K I Y L T A
 *
 TAG TCA TTA TCC TTA AGT TGG GSA CTT GCG CTT TGA TGA TGA ACC ATT TAG GGC 1782
 *
 TGG TCT GAT TCT TCT ACA GAG CGA GTT TCT GCG TGG GAT ATT CTT ACG CAA 1836
 *
 GTC CCT TGT TGA CCT AAA TCA ACA AAG ACG CGA TGG CTA TFC TGT TAT TTA TCA 1890
 *
 AAA TAG CGA TGG CTT TTT TTA AAT TGA CCT T 1921

Fig. 2. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the *mal* and its gene product, MAL. Solid and dashed lines indicate peptide sequences determined by Edman degradation of the peptides. Bold lines indicate putative promoter sequences. SD is Shine-Dalgarno sequence. The positions of two arrows indicate stem-loop sequences (inverted repeat). L, Lysylendopeptidase peptides; V, V8 protease peptides.

A
 MALrp-1 342 IENLETKRYLFDGNDPKDRGAEGLASGEPASPNNVVEADANNYRKYWKIPSGEYFL 402
 MALrp-2 403 IENLETKRYLFDGNDPKDRGAEGLASGEPASPNNVVEADANNYRKYWKIPSGEYFL 463
 MALrp-3 464 IENLETKRYLFDGNDPKDRGAEGLASGEPASPNNVVEADANNYRKYWKIPSGEYFL 519

B
 1 10 20 30 40 50 60
 MALrp-1 IENLETKRYLFDGNDPKDRGAEGLASGEPASPNNVVEADANNYRKYWKIPSGEYFL
 MALrp-2 IENLETKRYLFDGNDPKDRGAEGLASGEPASPNNVVEADANNYRKYWKIPSGEYFL
 MALrp-3 IENLETKRYLFDGNDPKDRGAEGLASGEPASPNNVVEADANNYRKYWKIPSGEYFL
 CB-2 YCGGASRIHVFSTGSSFDYS-SNCGWSTHSEVNTASRIAL-VVACDFNGDGKDIATMYD--
 CB-3 YCGGASRIHVFSTGSSFDYS-SNCGWSTHSEVNTASRIAL-VVACDFNGDGKDIATMYD--
 CB-4 YCGGASRIHVFSTGSSFDYS-SNCGWSTHSEVNTASRIAL-VVACDFNGDGKDIATMYD--
 CB-5 YCGGASRIHVFSTGSSFDYS-SNCGWSTHSEVNTASRIAL-VVACDFNGDGKDIATMYD--

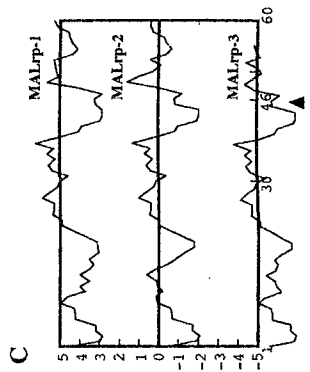


Fig. 3. Comparison of the amino acid sequences of three repeated domains (MALrp-1, 2, 3) of MAL. Different residues are enclosed in the boxes (A). (B) Comparison of MAL repeated sequences and putative α -amylase repeated sequences (CB-1, -2, -3, -4, -5) from *Clostridium beijerinckii*. Asterisks below sequences indicate similar residues. (C) Hydropathy profiles of the repeated sequences of MAL. Arrowhead indicates the position of the aromatic amino acid residue (Tyr).

AAC CCT TGC TAG AAA ACA ACT TTA GGA ATA AGT ATA ATT ACT CAC CTG CAT AAA 54
 TGA GAT CCC TCT ACA CTT GAC TAC TAT ATC AAT ATA ATA ATT TAT GAT CAG TCA 108
 ATC TGA AGC ATG GAA TTA CTT CTT TGG CTT TAT CCG TCA AAT GTA AAC GAG GTA 162
 TCT CTT TTT AGC GTT TGG CTT TCC CTT GTC TCA ACA TCT CAG CCT GGC TCT CTT 216
 1 (H) V L A S L V S T S Q A G S L
 GAA TTA CTG GCT ACC CAG CTT AAT AAT CCC GGT CTG GGT AAT AAT TCC GGT 270
 16 E L L A T Q L N N P P A L A N N S G
 AAG ACG GTG ACA GTC TCC CTG ACA ACA GGT CAA TGG GCT TTA ATT AAC TTT 324
 34 S T V T V L T A T A T A T A L I N F
 GGC ACA TCT GAT CTT ACG CTC GTC AAA TAC AAA ACC CCA GTS GAT GSC RAT GSF 378
 52 A T S D P S L V X Y K T P V D G N G
 CAT CTC CCG GAC AAA AAC GAT GAA AAA TTT GGG TTT BAG TAT CCC RAT TTG RAT 432
 70 E V R D K N D E K F G F K Y F N L N
 CCA GGG GGC CTA GTT GGC GAA ATT AAT GAT GGC AAG GGC AAC ACA AAA TCT ACG 486
 88 P A L V G E I K D A K G N T K S T
 GTG ACG GGC AAA CAA CAA AGC TTT GAA TTA CAA CCG GGA GAT ACA ATT TCT TTC 540
 106 V S G K Q Q S F E L Q P G D T I S F
 GTC ATT AAC GAT GAT CTT AAA TGG TAC GCA GAT AAC ACT GGC AAG TTG ACG ATT 594
 124 V I N D D P K W Y A D L N T G K L T I
 GCT TAT TCT GCT ACT GCT AAA ACA ACG CAA ATT GTC CCC ACT GCG CCA GGA GTG 648
 142 A Y S A T A K T T O I V P T A P C V
 ATC GCT AAC CTC TAC AAT ACG GGG GTT GAC GAT GGC CCG GGT CAG GAT TTA GGG GAT 702
 160 I A N L Y N T G V L D A R Q V L G D
 AAG APT CCC CAC CCC CAC TAT ACA ACC TAT CCG GCG GGG ACA GTA CTA 756
 178 S I P D P H Y R L L T T Y F A G T V T
 CCA GGT GCT ACC ACT CCC AAC AAG GAT TTA GCA CCA ATT ACC TGG GTT GCG RAT 810
 196 P G A T T P N K D L A P I S W V A N
 ACC AAT ACC GGC CGA TGG ATT GGT CTT AAC ACC CTT TCG GCT AAC GGT CCG GTT 864
 214 T N T A R H I G P N T P S A N G P V
 GGC AAC TAT GGC TAT ATA ACC TTT ACT TTA CCC AAT TCT TCT GAA GCT TCC 918
 232 G N Y G Y I T T T L E N S S E A S
 ATT GTC GGT GAA CTT TCC GTG GAT GAC AAT ACT GAT ATT GGT CTT AAC GGG 972
 250 I V G E L S V D N I T D I V L N G
 GTA TGG TTS GGT AAA CTT GGT TTA AGC TCT TGG TGG ACA AAG ATT AGT GGT 1026
 266 V S L G K P V A L S S W T K I S R
 TTT TCA ATT TCG ACG GGA TTT GTC GGA ACT AAC ACC CTG GAG TTT AAA CTG 1080
 286 F S I S T G F V G T N T L E F K L
 CAT AGT ATC GGT GGG CCC ACT GGT CTG CGA ATT GAT AGT ATT ACG GGA ACT TAT 1134
 304 H S I G G P T G L R I D S I S G T Y
 AAA CCC GTA GTC ACT CCG GCT AAT GCG GCA CTC AAA GAT CTG ACT AAT AAG ACA 1188
 322 K P V V T P A N A A L K D L T N K T
 GGT TTC AAT GAA AAC CTA AAC ACC CEF TAF CTG TTC TCT GAT GGT RAT CCC 1242
 340 Y F I E N L E T K R Y L F S D L A
 AYC AAG GGT GAT GGA GGC CCG GAA GGT TGG TTA GCT TCT AGT GGT TAT GCA 1296
 358 I X G D R G A E G G W L A S S G F T A
 AGT CCT AAC CTG GTT GGG GCT GAT GCT AAC TAC TAT AAT CCG GCT TAT TGG AAG 1350
 376 S P N V V G A D A N Y N R A Y W K
 ATT ATT CCC TCT GGT GAA TAT TTC CTG ATT AAT GAA AAC CTA GAA ACA AAT COT TAC 1404
 394 I I P S G E Y F L I E N L E T K R K
 1

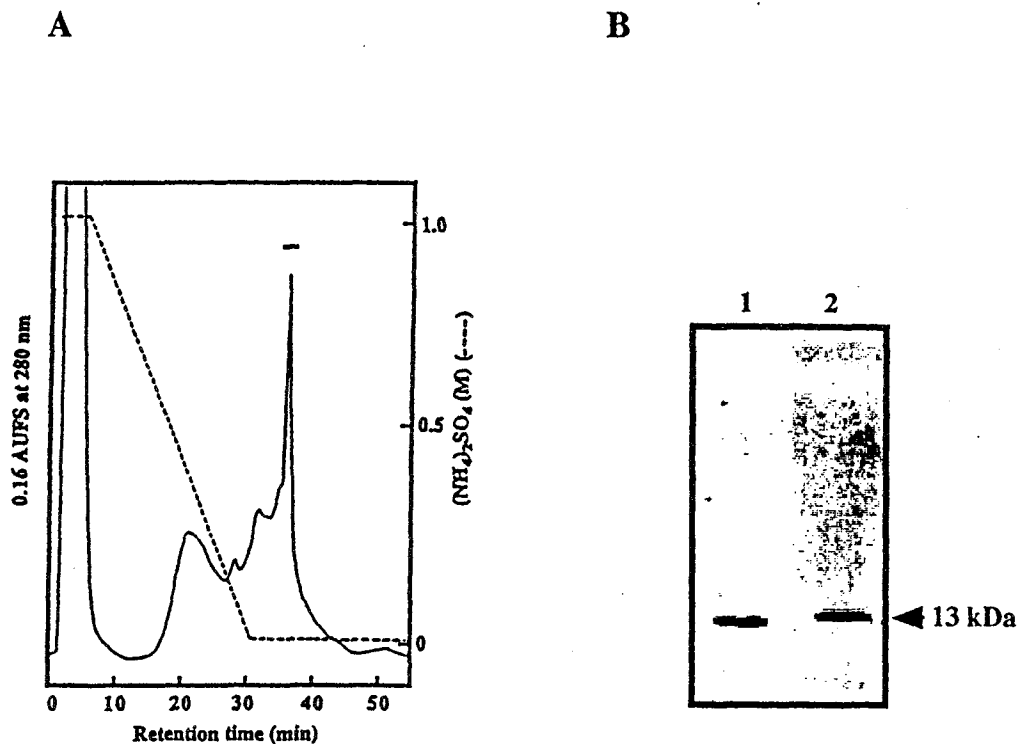


Fig. 4. Purification of MVL. (A) Hydrophobic HPLC on Phenyl Superose using a linear gradient of ammonium sulfate in 0.1 M phosphate buffer. Solid bar indicates the fractions having activity. (B) 15% SDS-PAGE of MVL. Lane 1, in the presence of 2-mercaptoethanol; lane 2, in the absence of 2-mercaptoethanol.

TABLE 4
a)
Inhibition of hemagglutinating activity of MVL by saccharides and glycoproteins

Saccharides and glycoproteins	Minimum concentration ^{b)} ($\mu\text{g/ml}$)
Yeast mannan	19.5
Asialofetuin	312.5
Ovalbumin	625.0
Monosaccharides	NI
Disaccharides	NI
Other glycoproteins	NI

a) The purified lectin diluted to titer of 8 were used for tests.

b) Minimum concentration of saccharides and glycoproteins required for complete inhibition of agglutinating activity against rabbit erythrocytes.

A

```

GGA TCC AAA CCA ATC ACT TTT AAC CAA AAG ACA AGA CAT TTT GCT TAA GGC ATT ATG GCT 60
AAC TCA AAA ATT CAG AAA AGG ATT TTT GAT ATC GTC TTG AGG ATA CAA AAT CAA CAA AAG 120
TCT CAA AGG ACA TTA TCT ATT ATG GCA AGT TAC AAA GTT AAT ATC CCT GCT GGG CCC CTC 180
1   SD (M) A S Y K V N I P A G P L 113
      |-----L1-----|-----V6-----|
      |-----L3-----|
      |-----V8-----|
TGG AGT AAC GCT GAA GCA CAA CAA GTA GGT CCG AAA ATT GCA GCT GCC CAT CAA GGA AAC 240
14  W S N A E A Q Q V G P K I A A A H Q G N 33
      |-----V8-----|-----L5-----|
      |-----V8-----|
TTC ACT GGT CAG TGG ACA ACC GTA GTT GAA AGT GCA ATG AGT GTA GTA GAA GTA GAA CTA 300
34  F T G Q W T T V V E S A M S V V E V E L 53
      |-----V2-----|-----V3-----|
      |-----V2-----|
CAG GTG GAA AAT ACT GGA ATT CAT GAA TTT AAA ACT GAT GTT TTA GCT GGA CCT CTC TGG 360
54  Q V E N T G I H E F K T D V L A G P L W 73
      |-----V1-----|-----V7-----|
      |-----L4-----|
AGC AAC GAT GAA GCA CAA AAA TTA GGT CCG CAA ATT GCA GCA TCT TAT GGT GCA GAA TTT 420
74  S N D E A Q K L G P Q I A A S Y G A E F 93
      |-----V4-----|-----L6-----|
      |-----V4-----|
ACT GGA CAG TGG CGA ACC ATT GTT GAA GGT GTC ATG AGT GTT ATT CAA ATC AAG TAC ACT 480
94  T G Q W R T I V E G V M S V I Q I K Y T 113
      |-----V5-----|-----V9-----|
      |-----L2-----|
TTC TAA GTG CGA TCG CCT CTC TTA TCG GTT AGA TTG AGG TAC GGA ACC CAA CAC TAT TTA 540
114 F *
      |-----|
      |-----|
AGG TGT GTT ACT TCG GTG ATG CAC CTT TTA CTG GAT CC 578
  
```

B

```

1 54
MVL-N ASHKVNIPAGPLWSNAEAOQVGPKIAAAHQGNFTGQWITIVVESAMSVVEVELQV
MVL-C HEFKTDVLAGPLWSNDEAOKLGFQIAASYGAEFTGQWRITIVEGVMSVIQIKYTF
60 * * * * * 113
  
```

C

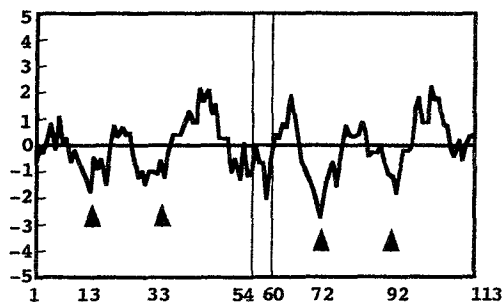


Fig. 5. Nucleotide sequence of the *mvl* and deduced amino acid sequence. Solid lines indicate the sequences determined by Edman degradation of the peptides. SD, Shine-Dalgarno sequence. L, Lysylendopeptidase peptides; V, V8 protease peptides (A). (B) Tandemly repeated homologous domains (MVL-N and MVL-C) found in the amino acid sequence of MVL. (C) Hydropathy profile of MVL. Arrowheads indicate positions of aromatic amino acid residues.

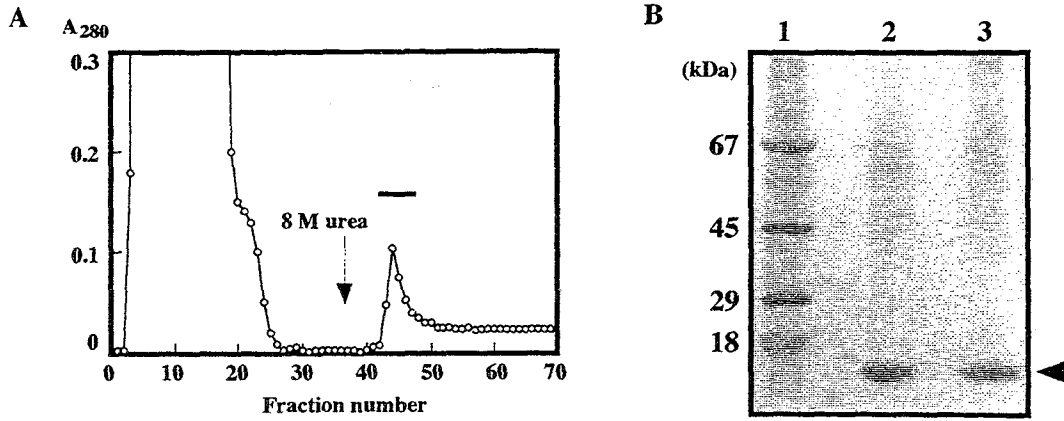


Fig. 6. Affinity chromatography of recombinant MVL on asialofetuin Sepharose 4B. The absorbed lectin was eluted with 8 M urea in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). The active fractions (indicated by a horizontal bar) were combined (A). (B) 15% SDS-PAGE profile of the purified recombinant MVL expressed in *E. coli*. Lanes: 1, Standard proteins; 2, rMVL under reduced condition with 2-mercaptoethanol; 3, rMVL under non reduced condition.

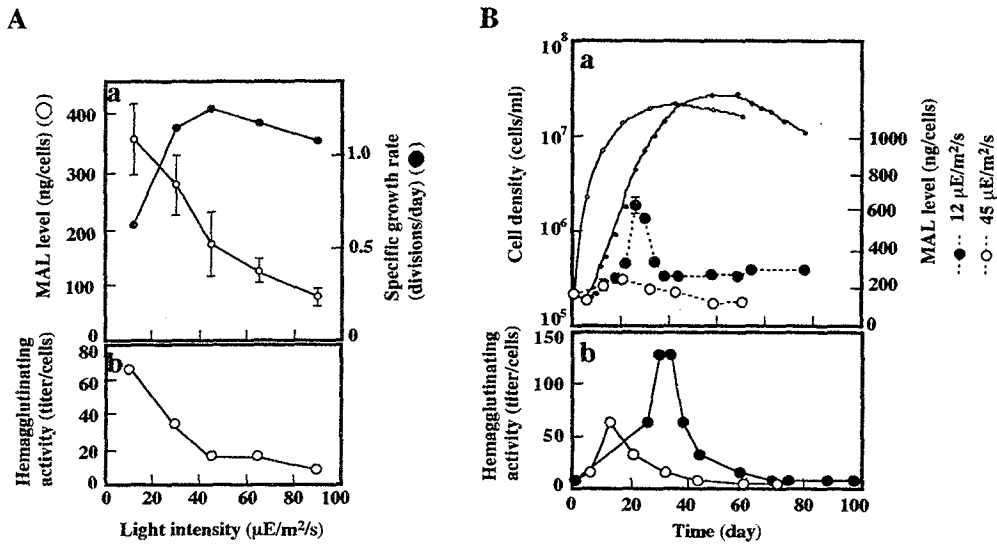


Fig. 7. Effect of light intensity on the specific growth rate, MAL level (a) and hemagglutinating activity (b) of *M. aeruginosa* M228 (A). (B) Changes of MAL level (a) and hemagglutinating activity (b) cultured with a light intensity of 45 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (○) or 12 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (●).

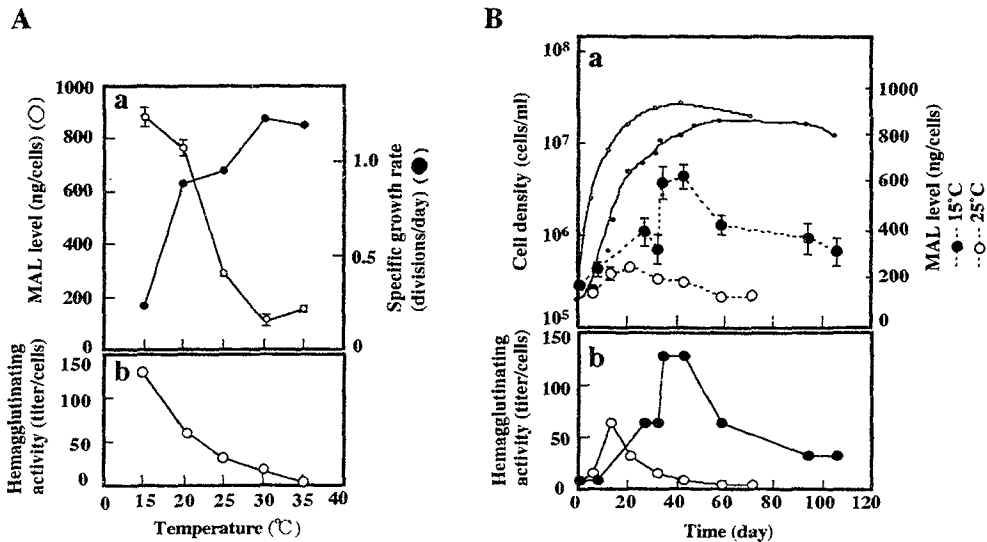


Fig. 8. Effect of cultivating temperature on the specific growth rate, MAL level (a) and hemagglutinating activity (b) of *M. aeruginosa* M228 (A). (B) Changes of MAL level (a) and hemagglutinating activity (b) cultured at 25 °C (○) or 15 °C (●).

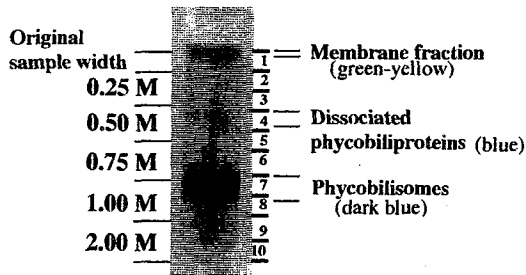


Fig. 9. Schematic presentation of the sucrose gradient centrifugation of the soluble fraction.

Table 5
Hemagglutination profiles of sucrose density gradient fractions of M228 cell extract

Fractions	Hemagglutinating activity	THU ^a
1	-	-
2	8	4
3	16	8
4	4	2
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-

^a Total hemagglutinating activity unit was calculated by multiplying the hemagglutination titer and the volume.



Fig. 10. Immuno-gold localization of MAL in *M. aeruginosa* M228 cells. Thylakoid area (T) and nucleoid (N) were labeled as indicated by arrowheads.

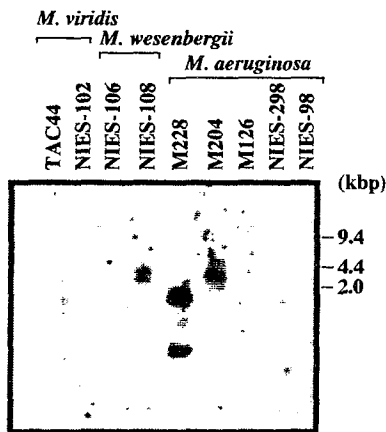


Fig. 11. Southern blot of genomic DNA from *Microcystis* sp. strains. DNA were digested with *Hinc* II.

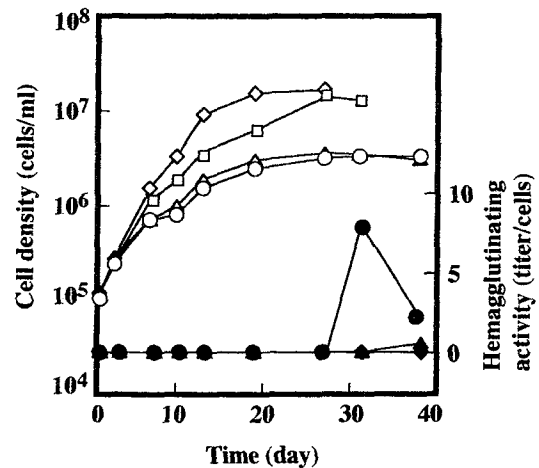


Fig. 12. Effect of aeration rates on the specific growth curves and hemagglutinating activity of *M. viridis* NIES-102. Aeration rates: ○, 0 ml/min; △, 10 ml/min; □, 50 ml/min; ◇, 100 ml/min. Hemagglutinating activity: ●, 0 ml/min; ▲, 10 ml/min; ■, 50 ml/min; ◆, 100 ml/min.

論文審査結果要旨

「アオコ」で知られるラン藻*Microcystis*属は、夏期に湖沼やダム湖で異常増殖し、発ガン性の肝臓毒を産生する環境汚染生物である。本論文の研究は、有毒ラン藻の細胞生理を理解してその防除に役立てることを目指し、ラン藻が産生するレクチンの生化学的特性と生理機能を明らかにすることを目的として行われた。

先ず著者は、霞ヶ浦と津久井湖から採集したラン藻*Microcystis*属 3 種16株におけるレクチンの存在を、赤血球凝集活性を指標にしてスクリーニングし、*M.aeruginosa* M228株及び*M.viridis* NIES-102株にレクチンを発見した。そして*M.aeruginosa* M228株から単量体のレクチン(MAL)を単離し、糖結合特異性を明らかにした。次に、染色体DNAをクローニングし、MAL遺伝子の構造を解析した。これによってMALはアミノ酸519残基をコードする1557bpの翻訳領域から構成され、C末端側にはアミノ酸約60残基からなる相同な配列が3回繰り返して存在すること、この繰り返し配列は他の微生物や動植物レクチンに相同性を持たないことを明らかにした。

続けて著者は、*M.viridis* NIES-102株からレクチン(MVL)を単離し、糖結合特異性などの性状を調べるとともに、染色体DNAのクローニングからレクチン遺伝子を含む578bpの配列を決定した。これによりMVLはアミノ酸114残基をコードする342bpの翻訳領域から構成され、分子内にはN末端側とC末端側にそれぞれアミノ酸54残基からなる相同なドメインをもつ2回繰り返し配列構造が存在すること、他の微生物や動植物レクチンを含むタンパク質との相同性はなく、MALとの間にも相同性がないことを示した。さらにMVL遺伝子を導入したベクターで大腸菌を形質転換して発現系を構築した。

またレクチン産生への培養条件の影響を調べ、M228株では低照度または低温度でMALの産生が促進されること、NIES-102株では低通気時にMVLが産生されることを明らかにした。すなわち、細胞増殖が抑制されるストレス環境下でレクチンの発現が誘導されることを示し、これらレクチンの核様体及びチラコイド間隙での局在性から、環境応答機構への関与を示唆した。

これらの研究成果は、糖鎖認識タンパク質であるレクチンの生命現象における機能性と、水圏環境に重大な影響を及ぼすラン藻の生育制御に関する重要な知見である。よって審査員一同は、本論文の著者が博士(農学)の学位を授与されるに値すると判定した。