- 氏 名(本籍) 舘 野 浩 章
- 学位の種類 博 士 (農 学)
- 学位記番号 農 博 第 694 号
- 学位授与年月日 平成 14 年 3 月 25 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 Structure and Biological Function of a Novel Rhamnose-binding Lectin Family in Fish Eggs (魚類卵に存在する新規ラムノース結合特異性レクチン ファミリーの分子構造と生物学的機能に関する研究)

論文審査委員	(主	査)	教	授	村	本	光	
			教	授	齋	藤	忠	夫
			教	授	佐	藤		實

## 緒言

生物を構成する細胞は糖鎖で覆われているが、糖鎖のもつ情報と機能性は多様な細胞間相互作 用の場において利用されているだけでなく、タンパク質の機能を多次元化し、本体には備わって いない性能を付け加えている。糖鎖はタンパク質、核酸につづく生命における第3の情報分子、 暗号を担う分子であると考えられているが、あまりに多様かつ不均一であり、遺伝子にもコード されていないなどの理由から、その意義は DNA の遺伝暗号のように普遍的には理解されていな い。その複雑な糖鎖暗号を見分けて、受信している分子が動物レクチンであり、近年では炎症や 免疫といった病理的・生理的現象の中で重要な役割をもつことが明らかになっている。糖鎖情報 受信メカニズムを明らかにすることができれば、生命における糖鎖の生物学的な役割を明らかに することができる。

魚類卵の中にも、L-ラムノースという動物界では極めて希少な糖に結合特異性を示すレクチン が共通して存在しており、古くから発生分化、受精、生体防御などとの関連が指摘されてきたが、 その構造や機能については全く不明であった。その実体を明らかにすべく、本研究ではサケ科魚 類スチールヘッドトラウト(Oncorhynchus mykiss)の未受精卵から単離した 3 種類のラムノ ース結合特異性レクチン(STL1、STL2、STL3)を中心対象としながら、タンパク質化学、分 子生物学、免疫組織化学的な手法により、分子構造と機能の解明を行った。また、他の魚種由来 のレクチンについても比較生化学的な研究を行なった。第1章では、STLsを中心として、様々 な魚種の卵から単離したラムノース結合特異性レクチンファミリー(RBL family)の性質と分子 構造について解析し、このファミリーの分子進化を考察した。第2章では STLs の組織分布と卵 成熟、受精に伴う動態変化を調べ、STLs の多様な局在と動態を明らかにした。第3章では細菌 表層に存在するリポ多糖、リポテイコ酸に対する STLs の結合特性を調べ、STLs の生物学的機 能と魚類の自然免疫との関係について考察した。

第1章 ラムノース結合特異性レクチンファミリーの生化学的特性と分子構造

#### 1、スチールヘッドトラウト第レクチン(STLs)の単離、性状、1次構造

スチールヘッドトラウト(Oncorhynchus mykiss)の未受精卵から L-ラムノースをリガンド としたアフィニティークロマトグラフィー、続いて Hi-Trap Q を用いた陰イオン交換クロマト グラフィー、TSKgel ODS 120T を用いた逆相 HPLC により 3 種類のラムノース結合特異性レ クチン (STL1、STL2、STL3)を単離した(Fig. 1)。架橋法により、STLs はそれぞれ 28 kDa、 21 kDa、22 kDa のサブユニットが非共有結合によりホモ 2 量体を形成していることが分かっ た(Fig. 2)。

STLs の糖結合特異性を赤血球凝集阻害試験により測定した(Table 1)。いずれのレクチンも L-ラムノースに最も強い親和性を示し、メリビオース、L-アラビノース、D-ガラクトース、D-フコース、ラクトース、ラフィノースにも親和性を示した。STLs は D-アラビノースや L-フコ ースには親和性を示さなかったことからも分かるように、STLs の糖への結合には糖の2位と4 位の水酸基の立体配置が特に重要であることが分かった(Fig. 3)。

STLs の 1 次構造を気相プロテインシークエンサー、アミノ酸組成分析、MALDI 飛行時間型 質量分析計で分析し、STL2 と STL3 については全アミノ酸配列を決定した。STL1 については 258 アミノ酸残基を決定したが、N 末端側の約 31 アミノ酸残基を決定できなかった。そこで、 STL1 は肝臓、STL2 と STL3 では卵巣の cDNA ライブラリーを鋳型とし、内部配列を基に作製 したプライマーを用いて cDNA クローニングを行い、RACE 法により STLs のそれぞれ、1,251 bp、990 bp、916 bp の配列を決定した。STLs はそれぞれ 69 bp (23 aa)、69 bp (23 aa)、 66 bp (22 aa)のシグナルペプチドを含む、936 bp (312 aa)、654 bp(218 aa)、651 bp(217 aa)の翻訳領域から構成されていた(Fig. 4)。STLs 間の相同性は 40~52%であり、半シスチン 残基は高度に保存されていた。STLs のシグナルペプチドは疎水性アミノ酸残基に富んでいたも のの、STL1 のシグナルペプチドは STL2 と STL3 のそれとは低い相同性しか示さず (STL1-STL2:30%、STL1-STL3:18%、STL2-STL3:50%)、細胞内での異なる局在性が示唆 された。

何れのレクチンも約95 アミノ酸残基からなるドメインが、STL1 では3回、STL2とSTL3 では2回、タンデムに繰り返された構造を持っていた。ウニ(Anthocidaris crassispina)卵レ クチン(SUEL)では、このドメイン1つからなるサブユニットがジスルフィド結合により2量体 を形成することで赤血球凝集活性を発現しており、このドメインはそれ自体が糖鎖を認識しうる 糖鎖認識ドメイン(RBL CRD)であると考えられた(Fig. 5)[1]。このCRD モチーフは、高度に 保存された8 個の半シスチン残基、N 末端側のG、L、A-N(L)-Y-G-R とC 末端側の D-P-C-X-G-T-Y-K-Y-L-E(D)により特徴づけることができ、ラムノース認識能に深く関与して いると考えられる(Fig. 6)。相同性検索から、RBL CRD 様ドメイン (RCLD)はヒトやモデル生 物 (Drisophila、C. elegans、Arabidopsis)に遺伝子配列に広く存在していた。RBL CRD モ チーフはほとんどのタンパク質でN 末端部に配置されており、内在性リガンドとの結合に直接 関与していると推測されるが、これらのタンパク質が実際にL-ラムノースを認識するかどうか は明らかにされていない。以上の結果から、STLsを構成する RBL CRD モチーフ構造は魚類に 限定されず、ヒトから線虫まで広く動物界に存在していることが明らかになった。

2、STLsの動物細胞による発現系の構築

活性型 STLs の発現を、動物細胞を用いて試みた。STL1、STL2、STL3、STL3 の N 末端ド メイン(STL3-N)のシグナルペプチドを含む翻訳領域を pcDL-SRalpha296 ベクターのプロモ ーター下流のマルチクローニングサイトに導入し、サル腎臓細胞 COS7 にリポソーム法により 形質転換し、一過性発現させ、ウエスタンブロッティングにより発現を確認した(Fig. 7)。発 現させた rSTL1、rSTL2、rSTL3、rSTL3-N はいずれもラムノースゲルへの結合能を保持して いた。よって、クローニングした STLs の cDNA は STLs をコードする遺伝子であることがわか った。また STL3-N もラムノースへの結合能を示したことから、STLs を構成する相同ドメイン が活性発現の最小単位である糖鎖認識ドメイン(CRD)であることを確認した。

3、他魚種由来のラムノース結合特異性レクチンの単離、性状、1 次構造解析

サケ目サケ科シロサケ(Oncorhynchus keta)、アメマス(Salvelinus leucomaenis)、サケ 目アユ科アユ(Plecoglossus altivelis)の未受精卵からラムノース結合特異性レクチンを単離し、 STLs との生化学的な比較を行なった。

A、シロサケ卵レクチン

シロサケの未受精卵から、L-ラムノースを担体としたアフィニティークロマトグラフィー、イ オン交換クロマトグラフィー、逆相 HPLC により3 種類のラムノース結合特異性レクチン(CSL1、 CSL2、CSL3)を単離した。CSLs はそれぞれ非遠元 SDS-PAGE で 28、21、22 kDa を示した。 CSLs は L-ラムノースに最も強い親和性を示し、2 位と 4 位の水酸基の立体配置がラムノース と同じ、メリビオース、L-アラビノース、D-ガラクトース、D-フコースにも親和性を示した。 CSLs の 1 次構造を気相プロテインシークエンサー、アミノ酸組成分析、MALDI 飛行時間型質 量分析計により分析し、全アミノ酸配列を決定した。CSLs は、対応する STLs にそれぞれ約 95% の高い相同性を示した。CSLs も STLs と同様に RBL CRD モチーフがタンデムに繰り返された 構造を有していた(Figs. 5、6)。

B、アメマス卵レクチン(WCLs)

アメマスの未受精卵から L-ラムノースを担体としたアフィニティークロマトグラフィーと、 陰イオン交換クロマトグラフィーにより 2 種類のラムノース結合特異性レクチン(WCL1、 WCL3)を単離した。WCLs はそれぞれ非還元 SDS-PAGE で 28 と 22 kDa を示した。WCLs は L-ラムノースに最も強い親和性を示し、2 位と 4 位の水酸基の立体配置がラムノースと同じ、 メリビオース、L-アラビノース、D-ガラクトース、D-フコースにも親和性を示した。WCLs の 1 次構造を気相プロテインシークエンサーと RACE 法を用いた cDNA クローニングで決定した。 WCL1 と WCL3 は対応する STL1 と STL3 に、それぞれ 91、93%の高い相同性を示した。WCLs も STLs と同様に RBL CRD モチーフがタンデムに繰り返された構造を有していた(Fig. 5)。ノ ーザンブロッティングとウエスタンブロッティングから、アメマス卵中には STL2 様のタンパク 質、mRNA が存在していなかった。これは、スチールヘッドトラウトとシロサケがアメマスと 1000 万年前に生物進化において分岐した後に、遺伝子重複によって STL2 と CSL2 が生じたこ とを示している。以上の結果から、STL 様の分子は高度に保存されてサケ科魚類に共通して存 在していることが分かった。

C、アユ卵レクチン(SFL)

アユの未受精卵から L-ラムノースを担体としたアフィニティークロマトグラフィーにより、 SDS-PAGE で 28 kDa を示すラムノース結合特異性レクチン(SFL)を単離した。SFL は L-ラム ノースに最も強い親和性を示し、2 位と 4 位の水酸基のラムノースと立体配置が同じ、メリビ オース、L-アラビノース、D-フコース、ラフィノースにも親和性を示した。SFL の 1 次構造は 現在分析中であるが、内部配列は STL3 に高い相同性を示しており、半シスチン残基やいくつか のセグメントも保存されていた。

また、これまでに他のグループによってもラムノース結合特異性レクチンの構造についての報告がなされている。共同研究者である Kamiya らによりコイ目コイ科マルタ(*Tribolodon taczanowski*)の未受精卵から 3 種類のラムノース結合特異性レクチン(TBL1、TBL2、TBL3) が単離され、その1次構造が決定された。TBLs は非遠元 SDS-PAGE で 29、22、34kDa を示した。TBLs はそれぞれ、207、189、308 アミノ酸残基からそれぞれ構成されており、STLs に 38-45%の相同性を示した。TBL も STL 同様、RBL CRD が 2 回(TBL1、TBL2)もしくは 3 回 (TBL3)繰り返された構造から構成されていた。

Hosono らはナマズ目ナマズ科マナマズ(Silurus asotus)の未受精卵からラムノース結合特 異性レクチン(SAL)を単離し、その1次構造を報告した[2]。非還元 SDS-PAGE で 28kDa を示 す 285 アミノ酸残基から構成されていた。STLs に 30%の相同性を示し、RBL CRD モチーフ が3回繰り返された構造から構成されていた。

以上の結果から、魚類卵から単離されたラムノース結合特異性レクチンは、いずれも STLs を 構成していた RBL CRD がタンデムに 2 回、もしくは 3 回繰り返された構造を有していること が分かった(Table 2)。これまでに得られた知見を基に、RBLs を構成する CRD モチーフ の系 統樹を作成した。RBL CRD の祖先遺伝子は大きく 2 つのドメイン(N-terminal domain、 C-terminal domain)に早い段階で分岐した後、遺伝子の重複がおこり、タンデム構造を構成し たと考えられる(Fig. 9)。

ラムノースに結合特異性を示すレクチンは、サケ科を中心として原始的な真骨魚類から多く見 出されている(サケ目、ニシン目、コイ目、ナマズ目)が、進化上、上位に位置するスズキ目から もラムノースに結合特異性をもつレクチンが単離されている[3]。よって、ラムノース結合特異 性レクチンは広く魚類に分布していることは間違いない。先に述べたように、ウニ卵にもラムノ ース結合特異性レクチンは存在しており、動物界における分布に興味がもたれる。

動物レクチンは、糖結合特異性と構造上の類似性から C-type lectin、galectin、I-type lectin、 P-type lectin などに分類、呼称されているが[4]、魚類卵から見出したラムノース結合特異性 レクチンファミリーは既存のレクチンファミリーとは全く異なる性質と構造をもつことから、新 規の動物レクチンファミリーを構成しているものと結論づけられる。

#### 第2章 STLsの組織分布及び卵成熟と受精に伴う動態変化

スチールヘッドトラウト各組織における STLs の分布を、抗 STLs 抗体を用いたサンドイッチ ELISA により調べた。STL1 は雌の卵巣と、雌雄の肝臓や脾臓など、いくつかの組織と血清に多 く存在していた (Fig. 10)。一方、STL2 と STL3 は卵巣にのみ多く存在していた。

スチールヘッドトラウト各組織における STLs の発現部位を、ノーザンブロッティングにより 調べた(Fig. 11)。STL1 は卵巣では発現しておらず、肝臓でのみ発現していた。一方、STL2 と STL3 は卵巣でのみ発現していた。 次に、STLsの分布を免疫組織化学的手法により、共焦点レーザー顕微鏡で調べた。卵母細胞 が前卵黄形成期(previtellogenic stage)に入ると、卵黄胞が細胞質周辺部に微小胞として生じ、 次第に大きさを増しながら求心的に蓄積された。さらに卵黄形成期に入ると、卵黄球が卵黄胞の 間に出現し始めた。STLsは、前卵黄形成期の卵母細胞で、卵黄胞の出現とともに検出された(Fig. 12)。卵黄形成期の卵母細胞においても、成長した卵黄胞に蓄積されていることが分かった(Fig. 13)。STL1は、前卵黄形成期の卵巣の卵核胞と卵黄膜にも局在していた。受精前後の卵巣にお ける STLs の局在変化を調べたところ、受精直前に細胞質表層の卵黄胞(表層胞)に局在してい た STLs は、受精の際、卵黄胞の崩壊とともに囲卵腔に放出された(Fig. 14)。受精卵では囲卵 腔に位置していることが分かった。

STLs の卵巣における発現部位を、STLs の mRNA に対するアンチセンス RNA プローブを用 いた in situ ハイブリダイゼーションにより調べた。STL2 と STL3 の RNA は前卵黄形成期の卵 母細胞の細胞質周辺に検出されたが、さらに成熟した卵黄形成期の卵母細胞では検出されなかっ た(Fig. 15)。これは、卵黄形成期の卵母細胞の体積が卵黄の蓄積により増加し、STLs mRNA 濃度が減少してしまったためと考えられる。ノーザンブロッティングの結果と同様に、STL1 の mRNA は卵巣では検出されなかった。

STLsの受精から孵化にかけての動態変化をサンドイッチ ELISA、赤血球凝集活性、ノーザン ブロッティングで調べた(Fig. 16)。赤血球凝集活性、STL2 タンパク質量、STL3 タンパク質量 は受精前から受精後にかけて大きな変動は見られなかったものの、孵化の際、大きく減少した。 ー方、STL1 タンパク質量は孵化の際、逆に増加し、卵黄嚢の吸収とともに減少した。STL2 mRNA と STL3 mRNA は前卵黄形成期から卵黄形成期にかけて検出されたが、受精卵、孵化した稚魚 では検出されなかった (Fig. 11B)。一方、STL1 mRNA 量は受精前、受精後いずれの卵でも検 出されなかったが、孵化した稚魚で検出された。卵での局在部位を考えると、孵化の際、STL2 タンパク質量、STL3 タンパク質量が急激に減少したのは、囲卵腔に存在していたものが、孵化 と同時に外に放出されたためであると考えられる。また、STL1 タンパク質量が減少しなかった のは、STL1 が稚魚の中で合成、蓄積され始めているためであることがわかった。

STL1 はサンドイッチ ELISA により雌雄の各組織で検出されたことから、各組織における STL1 の分布を調べた(Figs. 17)。STL1 は脾臓や血中に存在する白血球、鰓の粘液細胞、腸の 杯細胞など、免疫系細胞に存在していることが分かった。以上の結果をまとめると、STL1 は肝 臓で発現した後、血中を介して卵巣、白血球や粘液細胞に移行することが分かった。一方、STL2 と STL3 は卵母細胞の細胞質で発現して、そのまま卵黄胞に蓄積されることがわかった。STL1 のシグナルペプチドの構造が STL2、STL3 と異なることからも予想されたように、STL1 は STL2、 STL3 とは明らかに異なる局在を示した。

## 第3章 STLsの生物学的機能

STL1 が脾臓や白血球、血清などの免疫系細胞に局在していたこと、受精卵では STLs が囲卵

腔に局在していたことを考えあわせると、STLs が魚類の自然免疫系に関係していることが予想 された。自然免疫系が認識する物質としてよく知られているのが、細胞壁構成成分であるグラム 陰性菌のリポ多糖(LPS)やグラム陽性菌のリポテイコ酸(LTA)、酵母のマンナンなどである。LPS は lipid A、R コア、O 抗原多糖の 3 つの部分から構成されており、O 抗原をもっている LPS は スムース型 LPS(S-LPS)、O 抗原を欠いているものはラフ型 LPS(R-LPS)と呼称されている (Fig. 18)。

まず、STLs の様々な抗原型 LPS と LTA への結合をサンドイッチ ELISA で調べた(Fig. 19)。 STLs は異なる構造をもつ LPS に濃度依存的に結合し、これらの相互作用はラムノース濃度、温 度依存的に特異的に阻害された(Fig. 20)。特に *E. coli* K-12 と *S. flexneri* 1A 由来の S-LPS に強く結合したが、それらの LPS のラフ型に対する結合はスムース型に比べると弱かった(Fig. 21)。STLs と *S. flexneri* 1A S-LPS の相互作用は *E. coli* K-12 や *S. flexneri* の S-LPS によ り完全に阻害されたが、これらの R-LPS には全く阻害されなかった(Fig. 22, Table 3)。以上 の結果から、STLsの LPS への結合には LPS の O 抗原多糖の構造が重要であることが分かった。 *E. coli* K-12 と *S. flexneri* 1A S-LPS の O 抗原多糖は L-ラムノースをその繰り返し単位とし て含む。予想されたように、L-ラムノースが天然のリガンドである可能性は高い。また STLs は *B. subtilis* 由来の LTA にも濃度依存的に結合し、ラムノースの添加により特異的に阻害された (Fig. 23)。

次に STLs の細菌に対する結合能について調べた(Fig. 24)。STLs は実験で用いた細菌のほと んどに結合性を示したが、中でもグラム陰性菌の E. coli K-12 とグラム陽性菌の B. subtilis に 強く結合した。また STLs はこの 2 種類の細菌を強く凝集した(Fig. 25)。この凝集塊は 0.1 M のL-ラムノースもしくは E. coli K-12 S-LPS と B. subtilis LTA の添加により、それぞれ阻害 された。STLs はこれらの細菌に対して増殖阻害活性を示した。これらのことから、STLs はグ ラム陰性菌の LPS、グラム陽性菌の LTA の構造を認識して微生物を結合、凝集する活性をもつ ことが分かった。以上の結果から、STLs は、微生物がもつ特徴的な糖鎖パターンを認識するパ ターン認識リセプターであることが明らかとなった[5]。

魚類の自然免疫系、特に卵での防御機構については、ほとんど分かっていない。卵や孵化した ばかりの稚魚は微生物の感染を受け難いことが知られており、母体由来の何らかの因子が防御に 働いていると考えられている[6]。STLs が細菌表層の LPS や LTA を認識して細菌を凝集したこ とから、ラムノース結合特異性レクチンが魚類の自然免疫系において重要な役割を担っている可 能性が考えられる。現在、食細胞、補体系、ナチュラルキラー細胞に対する活性化能について検 討中である。

#### 総括

魚類卵の中に赤血球を強く凝集する物質があることは以前から知れており、魚類卵レクチンの 単離と性状に関する論文はいくつか報告されていた。これらのレクチンは多精拒否や外界からの 胚の防御、胚発生に重要な役割をもつのではないかと推測されていたが、その構造や機能に関し ての知見は全くなかった。本研究は、ラムノース結合特異性レクチンの構造、詳細な組織分布、 細菌との相互作用を明らかにしただけでなく、動物レクチンファミリーに新たな一員を加える証 拠を提示した。このファミリーを構成する RBL CRD モチーフは線虫からヒトまで広く動物界に 存在しており、動物にとって重要な分子であると考えられる。今後、この新規レクチンファミリ ーが様々な動物種から見出されると予測され、動物界におけるこのファミリーの生物機能の重要 性が益々高まるものと考えられる。

#### 引用文献

[1] Ozeki, Y., Matsui, T., Suzuki, M., and Titani, K. Amino acid sequence and molecular characterization of a D-galactose-specific lectin purified from sea urchin (*Anthocidaris crassispina*) eggs. *Biochemistry* 1991; **30**: 2391-2394.

[2] Hosono, M., Ishikawa, K., Mineki, R., Murayama, K., Numata, C., Ogawa, Y., Takayanagi, Y., and Nitta, K. Tandem repeat structure of rhamnose-binding lectin from catfish (*Silurus asotus*) eggs. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1472**: 668-675.

[3] Hosono, M. and Nitta, K. Fish roe rhamnose-binding lectins. Possibilities for a new sugar-binding domain structure. *Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo* 1993; **40**: 21-43.

[4] Gabius, H.-J. Animal lectins. Eur. J. Biochem. 1997; 243: 543-576.

[5] Medzhitov, R. and Janeway, C. A., Jr. Innate immunity. The virtues of a nonclonal system of a recognition. *Cell* 1997; **91**: 295-298.

[6] Ellis, A. E. Innate immunity defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol*. 2001; **25**: 827-839.

## 論文目録

[1] <u>Tateno, H</u>., Saneyoshi, A., Ogawa, T., Muramoto, K., Kamiya, H., and Saneyoshi, M. Isolation and characterization of rhamnose-binding lectins from eggs of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) homologous to low density lipoprotein receptor super family. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 19190-19197.

[2] <u>Tateno, H</u>., Ogawa, T., Muramoto, K., Kamiya, H., Hirai, T., and Saneyoshi M. A novel rhamnose-binding lectin family from eggs of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) with different structures and tissue distribution. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2001; **65**: 1328-1338.

[3] <u>Tateno, H</u>., Ogawa, T., Muramoto, K., Kamiya, H., and Saneyoshi, M. Rhamnose-binding Lectins from steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs recognize specific O-antigens of bacterial lipopolysaccharides and lipoteichoic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 印刷中.

[4] <u>Tateno, H</u>., Muramoto, K., and Kamiya, H. Structure and function of marine animal lectins. *Proceedings of Fish. Sci.* 印刷中.

[5] <u>Tateno, H</u>., Yamaguchi, T., Ogawa, T., Muramoto, K., T, Watanabe, Kamiya, H., and Saneyoshi, M. Immunohistochemical localization of rhamnose-binding lectins in the steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev. Comp. Immunol*. 投稿中.

[6] <u>Tateno, H.</u>, Ogawa, T., Muramoto, K., Kamiya, H., and Saneyoshi, M. Isolation and characterization of rhamnose-binding lectins from eggs of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*). 投稿準備中.

[7] <u>Tateno, H.</u>, Shibata, Y., Nagahama, Y., Ogawa, T., Muramoto, K., Kamiya, H., and Saneyoshi, M. Tissue-specific expression of rhamnose-binding lectins in the steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). 投稿準備中

[8] Shiina, N., <u>Tateno, H</u>., Ogawa, T., Muramoto, K., Kamiya, H., and Saneyoshi, M. Isolation and characterization of rhamnose-binding lectins from eggs of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). 投稿準備中.



Fig. 1. Purification of STLs. (A) Affinity chromatography of STLs on L-rhamnose-Sepharose 6B. (B) Reversed-phase HPLC of STLs on TSKgel ODS 120 T. (C) SDS-PAGE of STLs.



(DTBP).



-174 -

Δ			
11	1	ATGCTCCTTGGRCAATCAATTTTGTTCGCCGCGCGCGCAGCCAGCCTCTTTCTGGTTCCA	61
	-23	H L L G Q S I L F A A L Q A S L F L V P	-4
	61	GETTATEGAATGTCAGAGATTCAGCGCAGGTTCCTGACGTGTGGTGATCCCAGCCTCCAG	121
	-3	GYGHSEIORRFLTCGDPSLO	17
	-	I	
	121	TOTOATCACCOUNT GATCATGGTOTATGGGTCCAATTCAGCACTATTGAGAAGTTGTCA	197
	78		37
	10		3,
	1		
	101		241
	30		51
	291	TOTUATOGRAATGABAAGIGTGATGTGGCGACCTCCGGCABTGTGTGGCCTCTGTAGC	301
	28	CDGNBKCDVKISGSVCDDCS	~
		•	
	301	ACTIGCATACCTGACTAATATCTTCCTGGACGTTACCTATOGCTGCCTGGAGAGAGAAGAAG	361
	78	TAYLTNIFLDVTYGCLESKK	97
	361	GTGACTACCTGTCATGGTGTGGTGCATTTGGAATGTGGAGATGGGGTGGTCTTTCTCCAG	421
	98	V T T C H G V V R L E C G D G V V F L Q	117
	421	AAASCACTCTACGGACGCATAGACAGCCAGACCTGTAGTCAGGGACGACCTCAGAGTGAG	481
	119	<u>ALYGRIDSQTCSQGRPQSE</u>	137
		******	
	481	CTGACGAACALAAAGTGTTCCCAGGAAGGAACTCTGGCACTCTGGTCACAGAGGTGTGAC	541
	139	LTNTRCSQEGTLALWSQRCD	157
		***************************************	
	541	GGGAAGCACACATGAGGTGAACATGAGAGTGAATCAAATCTCGGACCCTTGTGTCGGA	601
	159	<u>G K O T C E V N M R V N O I S D P C V G</u>	177
		***************************************	
	601	ACCTACAAATATCTGGACGTCACCTACATCTGCCTCCCTGCTAAGACAAGTATCACCTGC	661
	178	TYKYLDVTYICLPAK, TSITC	197
		*****************************	
	661	GAGGGCTCANCCAGCTCCCTGGACTGTGGTAAGGGTGTGATAAAGGTGTTTCATGCTAAC	721
	198	EGSTSSLDCGKGVIKVFHAN	217
		····· •	
	721	TADSGGCGTMGAGACGGGTCTACCTGTTCTGCTGGACGACAACGAGGCTCAGCAACCAAAAC	781
	218	YGRRDGSTCSAGRHELSNON	237
	781	TGTCTGCAACCCRAAACCCTGGACGTTGTCAAACAATGGTGTGAGGGAAAGAGTCAGTGT	841
	238	C L Q P K T L D V V K Q V C E G K S Q C	257
		······································	
	841	ACTGTGGGGCTTGATCCGGTCTTCGGGGATCCCTGCTATGGAACCTACAAGTACCTGGAG	901
	258	TVGLDPVFGDPCYGTYRYLE	277
	901	OTTICCTACACCTGTCTGGGAGGCTCCCCTACAGTGTAATGATGGCCTGGCTGG	961
	278	V S Y T C L G G S P T V	
		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
	961	SCENETTCETSTCCSCCTCCACCGAAGAACTTCTTCSACTGGATGCCCTTTTTACTCTGS	1021
	1021	ATTTACTCCATAATCMAACACGATGAACCCCTGATAAATCAACTAATAAGAAACCAATCC	1081
:	1081	ATAMATCAACGTGCAAACTAGTGACTGAATGTTAATGTGTAGCCGGCTCATTTTCAGACC	114
:	1141	AGTGTTTTTTTTAGAGAACGCAACCCTACCTATGTTATTGATTTGGATGTCAAGAGATAC	1201
:	1201	оттасалтталалтсалатсялтстсалалалалалалалалалалалалалала 1254	

D			£1
	1	ATTETETISTCACACIONETIGOTTERECTOCTOCTOCTOCIONETITISTICACIACIA	
	-23	H L L V I L I G F I L L X X V C L I L P	
		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
	61	GCTSCAGCGACAGAGAGTGGTCACCTGTGACAATGGAGAAAACGTCCAGTTCCTGATCTGT	123
	-3	AAATRVVTCDNGENVQFLIC	17
		·	
	121	GATTCTGGAGTGATCTTCATTGAGAGAGCTCTGTATGGAAGGACTGACGGAACCACCTGC	181
	18	DSGVIFIERALYGRTDGTTC	37
	181	AGAGAAGGACGACCTGCCAACCAGCGACCAACACACAGTGTCACAGACGGGCACCCTG	241
	38	REGRPANQLTHTQCSQTGTL	57
		***************************************	
	241	GAGGTCCTCTCACAGAGGTGCAATGGGAAACAGGTGTGTGAAGTGAACACTGAAGTCTTC	301
	58	EVLSQRCNGEQVCEVNTEVE	77
		and farmer farmer	
	301	CGTACTTCTGACCCCTGTGTTGGAATCTACAAATACCTGGAAACCACCTATACCTGCATC	361
	78	R T S D P C V G I Y K Y L E T T Y T C I	97
	361	CONSCRICT, CACCAGORTONOGTOTORAGOCTOTORIGOCTORACTAGARTORATORAGO	421
	98	PATRSITCEGSDAQLECDEG ;	117
	421	ACENTCOMENTCTACHETOCOMACTATEGCOSCOGTERCOMECTAGTETETTTAAN	(81
	118	TIQIYSANYGRRDQLVCSFR	137
		************	
	481	CECCCECTANCENCERACIACEANCECCECEACEACEACEACEACEACEACEACEACEACEACE	541
	138	R P A N Q L A N T N C L S Q S I T T S K I	157
		<pre></pre>	
	541	GTGGCAGAGAGGTGTAATGGTAAGATCCAGTGTGACGTCCCGGCGTCCAACTCTCTGTAT	601
	158	VAERCNGRIQCDVPASNSLY :	177
	601	GENERTCORTGTTTGGRACCTRORAGTACCTGGRAGTGGCGTRCRCCTGTGGCTRARTG	661
	178	G D P C V G T Y K Y L E V A Y T C G *	
	661	TINGGACGCATGCATACGGAGATCTTCTCTGAGGAACAAAGACCAGAGAGACTACTTGG	721
	721	ATAICITCETCTTCATIGGATGGATTGTATTTCTTTCCCGTCTTCTCTCTCTCGAAGTC	781
	781	TCAATTGATTGTAAAATCTATGTAAATTCAAAATTGGTAAATCCCATTGATTG	B41
	843	CATGAGGCATAACTTGTGTAATAAAATCATGGGGCCCCTCTTGTGCTGCAGCAATGCACS	901
	901	GTCRGGRGGRRCCATGGRGRAATTAARCATTAACCCCCARAAATAAACTATTCTTCAARTA	961
	961	аладаалалалалалалалалалала 990	
0			
し			
	1	atetecattiteggacteaceetescattecteetescattectectectecactaaca	ଗ
	-22	M C I L R L T V V T L L A T A C C T L T	~3
	61	GATGGAGCAATCAGCATCACATGTGAAGGCTCTGATGCTTTACTGCAATGTGATGGAGGT 1	21
	-2	DGAISITCEGSDALLQCDGG	18
	121	ANGATCCATATCAAGCGTGCGAACTACGGTCGTCGTCGTCAACACGATGTGTGTTCTATTGGG 1	81
	19	KIHIKRANYGRRQHDVCSIG	36
		***************************************	
	181	CECCUTGATCACCAACTCACAGACAACTGCUTCAGCCAATCCTCCACAGCAAGATG 2	41
	39	R P D H Q L T D T N C L S Q S S T S K H	58
		******	
	241	GCMEAAAGATGCGGTGGGAAGAGCGAGTGTATTGTCCCTGCATCCAATTTCGTTTTTGGA 3	101
	59	A E R C G G R S E C I V P A S N F V F S	78

361

98

421 118

481

138

541 CAABATG

158

601

661

721

901

GTAGATIGITTA 781

Ħ

scvo

V C S I G

TOTONTOTONOTACTATOTONTOLOGI

LSQSTTSKM

STATCCAACTCIGTG11CGGT

v G 178

НD

В



79

367

99

421 119

491

139

541

601 179

661

721

781

841 GGJ 901 **жалалалалалал**а 916

E

GC 159

٨

-1+

V G τ <u>, x</u>, <u>x</u> в

DPCVGTYKYLDTK

IRIRLANYGRRÖ

X ... R

TTTTCCTCCAACCTCCAARTCAACTTCAATGACCATTGTAAACC

HKQLKNT

ETISSIICEGSDSQLLCDRG

NC

TETTETGGGGAGCCTGAAGATGTACAAGGCTTCAGGGATATCITCATCAGGTTGTGCTG

AGAAATGCTTCAACACCATTTCTGAACTGTGGTGGTCTGAATTAAATGAAGCGGCA 841

GALACAATAAGCAGCATCATATGTGA

	STL1, CSL1, WCL1, SAL	interespisation and a sub-definition is part of the sub-definition	Three tandem repeats
	STL2, STL3, CSL2, CSL3, WCL3, TBL2, TBL3		Two tandem repeats
	Sea urchin egg lectin (SUEL)		Homodimer
	Latrophilin	and an and a second second Second second	n a native free and the fragman and the free and the free and the
	C.elegans cosmid B0457 and F32A7.3	มาให้เราะที่สามารถหมาย สามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามา สามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสามารถสา	na the International Actives and the constants of
		RBL CRD	
		Fig. 5. Domain structure	s of RBL family
-N(1-94)	MSEIORRFLIGGDPSLOCDHG-V	IMVYGVOFSTIEKLSSNERPKA	SDT-EAFNGVSNHODGNENDVATSGSVCDIDSTAYLTNIFLDVTYCOLE
M(95-19	1)SKKVTIG-HGVVHLECEDG-V	VFLQKALYGRIDSQTOSQGRPQSELTNTK	SQE-GTLALWSQFCDGKQTCEVNMRV-NQISDFCVGTYKYLDVTYICLPA
-C(192-2)	89)KTSIIC-E <b>G-</b> STSSLCCKG-V	IKVFHANYGRRDGSTCSAGRHELSNON	QLQP-KTLDVVKQWQEGKSQQTVGLDPVFGDEQYGTYKYLEVSYTCLGGSPTV
N(1-99)	TRVVICDNGENVQFLICDAG-V	IFIERALYGRTDGTTCREGRPANQLTNTC	CSQT-GTLEVLSQFCNGKQVGEVNTEV-FRTSDFCGGIYKYLETTYTCIPA
C{100-1	95)TRSI 10-EG-SDAQLECDEG-1	IQIYSANYGRRDQLVOSFKRPANQLANIN	ULSQS1TTSKVAEHONGKIOGDVPASN-SLYGDEOVOTYKYLEVAY1UG
C(101-1)	,TSSTIC-PG-SDALLODGG-K	TOTOLSNYCODO	TISO-STREAMARDOCKPOOTVKUSN-SVFCDDOVGTIKYLDUNISUVQVOL
N(1-91)		TMVYGVOFSTTEI.SSNFRPKA	SDT-EAKNGPSNEGDGNEHODVATSGSVCDTONSAYLTNI FLDVTYGCLE
M(92-18	B)SKKVTIG-EGVVHLEGGDG-V	VFLOKALYGRIDSOTOSOGRPOSOLTNIK	SOE-GTLALWSORDGKOTCEVNMRV-NOISDECVGTYKYLDVTYICLPA
C(189-28	B6)KTSIIC-EG-STSSLOGKG-V	IKVFHANYGRRDGSTCSAGRHELSNON	LOP-KTLDVVKONCEGKSCOTLGLDPVFGDECFGTYKYLEVSYTCLGGSPV
N(1-99)	TRVV10DNGENVQFLICDSG-V	IFIERALYGRTDGTTCKEGRPANOLTNTC	SQT-GTLEVLSHRCNGKQVCEVNTEV-FRTSDRCVGIYKYLETTYTCLPA

STL1-

STL1-

I E

N	С	G	ΓC	ANYGI	а <b>с</b>	2	L	С	С	С	DPC	XGYKYLD	YC		С
22A1.2(22-161)	-MKVQAQ-	DG-ERI		FRM TOT 2 AOLGE TOK	VVPENQU	JPPQAGERHSE	MINEDELS	DEL HESSTCORI:		nnig:		F11981		L PMDI -	
0431.1(40-139)	NBVOID-	DOL-FDI		PAGAVISIVLGN <b>XGR</b>	2 DT-VAV	TELEDND-1V	ANT DDI	WINN-KIKSIL	THUNG	DSMU	TTVDKKTITEDE	DTTCKY		VVPA	
PNZ (9/=133)	Teumad	DG-ENI		PGSDVIMIESANIGE		T DAD 2- FO	DON-T	CONN-KEKIM			LAATCO-DALADE	PGTIKY	PER A CAR	VPIIFV	
PH(36-132)	-RRELAU-	EG-YP		PGSDVIMVENANYGR		-DADP-FQ	MENV	ULLE-DAFKIM	SUHONN	NTOQ1	VVVAGS-DAPPDR	PGTYKY.	PEAGAIC	VPIKV-	
DEL(1-105) ELVSEFCL	NKERYO-	ED-SSI		PEGEGIVIILAIYGR	NR-GEVL	FGTLG	APTINRO MEM M	UKSS-NSUQVV	G	~ II	TVLASN-SVEGDE	POTAKY	LAVIXIC	DLP	
WP-D3 (181-582)	KEMV VQ-	EG-GSA	151NC	AQ~TIKTIWANYGR	TDSTVL	DIGRPG	2 DELNT	TS-DTLNKV	AUCOR		TIPANN-NFFGDE	PNTIKY	BRIVYAC	v	
AL-D2(96-190)	NYAVIG	EH-GYS	STLUC	SND-ALLIVNANYGR	ASSQI	SNGLPN	GLTQNT	HYAA-NTLTTV	AGLONG	KKSKI	IVEALN-TIFSDE	SGTVKY	TVTYIC	Ľ	
AL-D1(1-95)	ANMITO	YG-DVC	Сктно	TG-LIIVKSSLYGR	TDSTIC	STNRPP	AQVAVT.	LISLPITTI	SDHONG.	LPDC	LKTDL-LGNTDE	QGTYRY	INTSFIC	ING	
BL3-C(196-293)	RSSVICE	NANN	TLIC	EQGTVINIHTANYGR	TDRST	FIRRPA	SQTAKT	HISS-NSQPIV	DECEG	TNIC/	LVASN-AVFSDE	VGTAKF	LYVSYSC	VAI	
BL3-M(97-195)	EKSLIGH	G <b>G</b> YA	AXTRC	esg-tiqint <b>a</b> hy <b>gr</b>	INKFI	SEGRPS	SELQNSI	TYSP-NALSPV	SKSONG	LESC	ELFATQ-TVFT <b>DE</b>	VGTYKY	LTVSYFC	LPTAL	
BL3-N(1-96)A	EIVVId-	DG-FVQ	DETAC	DSG-VIHVNSATFGR	TNSNI	SVGRPQ	GQTVNT	CSMVVPEV	зкяфра	LSVQ	ELNTOG-LAAR <b>DE</b>	DGTYKY	YTTNYIC	ITA	
BL2-C(99-189)	-RSV10-	EN-SQS	SVINC	CKG-VIHIHHANYGR	RDLVI	PHVFA	TSPI	TISSQTSSL	SECTO	ккаф	LNASN-SVFFDE	VGIYKY	LEVTYC	ESY	
BL2-N(1-98)	-KKMI VQ-	EG-ESA	THE	DVN-FIKVNKANYGR	TNCKI	115 <b>G</b> KPA	NOISNT	ONTA-ESLSIM	SSRCOG	skada	IVPAVN-SVFS <b>DE</b>	VGTYKY	LDLSYIC	lpak	
BL1-C(100-192)	-RSV10-	EN-SQS	SVINC	GKG-VIHVHHANYGR	RDLVT	PHKLGR	TTI	YSPQTSSL	SECTO	колфі	(LCASN-SVFS <b>DE</b>	VSVNKY	LEVTYRC	KKYRL	
BL1-N(1-99)A	KKAVVC-	EG-ESI	ARINC	DLG-FIKVIK <b>ANYGR</b>	TDCKI	as <b>G</b> kpa	TRISNK	STE-ASLSIM	SSROPG	skadi	IVPAVN-SVFA <b>DE</b>	VGTYKY	LAVSYND	EPAK	
CL3-C(101-195)	ISSI10-	EG-SDI	DOMC	DRG-EIHIQR <b>ANYGR</b>	RQHDV	SIGRPQ	NQLKNTI	LSD-STTSTV	LEFCOG	erddi	IVKVSN-SVFG <b>DE</b>	VGTYKY	DVAYIC	¥	
CL3-N(1-100)	AISI10-	EG-SD/	vrrdc	DGG-KIQIKR <b>ANYGR</b>	RQHDV	SIGRPD	NQLSNT	CLSQ-STTSKM	AEROGG	KSE(d)	/VPASN-FVFG <b>DE</b>	VGTYRY	LDTKYSC	VQQQET	
CL1-C (193-290)	KTSIDE	GSTS	ssid	GKGVINVFHANYGRR	DGS1	\$AGR	HELSNO	CLQP-KTLDVV	(QNCEG	KRQC	IVGLDPVFGDF	YGTYKY	LEVSY 1C	LGGSPTV	
CL1-M(94-192)S	KKVT1d-	EGAGV	VHLEC	GDG-VVFLQKALYGR	TDSRT	SQGRPQ	SQLINT	CSQE-GTLALW	SQFCCCG	комфа	EVNMRV-NQISDE	FGTYKY	LDVTYIC	LPA	
CL1-N(1-93)MSEIR	HREL d-	-GDP	-side	DDG~VIIVYGVKFST	IEKS	NE	SPK	SDT-EAFNGV	SKRODG	NGH	DVATSGSVCDI	NSAYQNNI FI	LDVTYC	LV	
SL3-C(101-195)	ISSI10-	EG-SDS	soud	DRG-EIRIQR <b>ANYGR</b>	RQHDV	SIGRPH	QQLKNT	CLSQ-STTSKM	AERCOG	крф	IVSVSN-SVFG <b>DE</b>	VGTYKY	LDVAXIC	Þ	
SL3-N(1-100)	AISI	EG-SD/	ALIC	DGA-KIHIKRANYGR	RQHDV	SIGRPD	NOLTDT	LSQ-SSTSKM	AERCGG	KSEC	IVPASN-FVFG <b>DE</b>	VGTYKY	LDTKYSC	VQQQET	
SL2-C(100-195)	TRSIT	EG-SDA	APLEC	DEG-TIQIHSANYGR	RDQLV	SFNRPA	NQLANT	LSQSITTSKS.	AERONR	кsddi	DVPASN-SLYGDE	VOTYRY	LOVAYIC	G	
SL2-N(1-99)	TRVVID	NGENV	OFIC	DSG-VIFIERALYGR	TDGTT	KEGRPA	NQLINT	GSQT-GTLEVL	SHRONG	кovd	EVNTEV-FRTSDE	VGIYKY	LETTY	LPA	
SL1-C(189-286)	KTSI10-	EG-STS	sid	GKG-VIKVFHANYGR	RDGST	5AGR	HELSNON	CLQP-KTLDVV	KOWCEG.	кsdd:	ILGLDPVFG <b>DE</b>	FGTYKY	LEVSYIC	LGGSPV	
SL1-M(92-188)S	KKVTIG-	EGVI	лыс	GDG-VVFLQKALYGR	IDSQT	SQGRPQ	SQLINT	CSQE-GTLALW	SOFCOG	кord	EVNMRV-NQISDE	VGTYKY	LOVINIC	LPA	
SL1-N(1-91)EIQ	RRFLIC		PSIC	DYG-VIMVYGVQFST	IELS	SSNERP	K	SDT-EAKNGP	SNFCOG	NER	VATSGSVCDI	NSAYLTNIF	LDVTYCC	LE	
TL3-C (101-195)	ISSI1d-	EG-SDS	sould	DRG-EIRIRLANYGR	ROHDV	SIGRPH	KOLKNT	CLSO-STTSKM	AERCOG	KRdd	VKVSN-SVFGDE	VGTYKY	LOVAYIC	b	
TI.3-N(1-100)	AISITC-	EG-SD/	ALLOC	DGG-KIHIKRANYGR	ROHDV	SIGRPD	HOLTDT	LSO-SSTSKM	AEROGG	KSEC	IVPASN-FVFGDE	VGTYRY	LDTKYSC	VOOHET-	
TL2-C(100-195)	TRST	EG-SDZ	AOLEC	DEG-TTOTYSANYGR	BDOLV	SFKRPA	NOLANTI	CLSOSTTTSKV.	ERONG	ĸīdd	OVPASN-SLYGDE	VGTYKY	LEVAYTC	G	

RBL CRD motif

Fig. 6. Comparison of the RBL CRDs. Tandemly repeated domains of RBLs are separately aligned for comparison. Boxes indicate conserved Cys-residues. Bold indicates amino acid residues identical to STL-N, -M and -C except for STL1-N. STL: steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) egg lectin; CSL: chum salmon (*Oncorhynchus keta*) egg lectin; SAL: catfish (*Silurus asotus*) egg lectin; WCL: White-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) egg lectin; TBL: far eastern dace (*Tribolodon taczanowskii*) egg lectin; SUEL: sea urchin (*Anthocidaris crassispina*) egg lectin; LPH:  $\alpha$ -latrotoxin receptor from rat (*Rattus norvegicus*); LPH2:  $\alpha$ -latrotoxin receptor from humar; B0457: a putative protein encoded by *Caenorhabditis elegans* cosmid B0457; F32A7.3:

Fish species	Lectin	Sugar specificity	Molcular weight	Amino acid residues	Number of the R-type CRD	Sequence homology to STLs
[Salmoniformes, Salmonidae]						
Oncorhynchus mykiss	STL1	L-rhamnose	28	289	3	-
(Steelhead trout)	STL2	L-rhamnose	21	195	2	•
	STL3	L-rhamnose	22	195	2	-
Oncorhynchus keta	CSL1	L-rhamnose	28	286	3	95% to STL1
(Chum salmon)	CSL2	L-rhamnose	21	195	2	94% to STL2
	CSL3	L-rhamnose	22	195	2	96% to STL3
Salvelinus leucomaenis	WCL1	L-rhamnose	28	290	3	91% to STL1
(White-spotted charr)	WCL3	L-rhamnose	22	195	2	93% to STL3
[Cypriniformes, Cyprinidae]						
Tribolodon taczanowski	TBL1	L-rhamnose	29	207	2	45% to STLs
(Far eastern dace)	TBL2	L-rhamnose	22	189	2	45% to STLs
	TBL3	L-rhamnose	34	308	3	48% to STL2
[Siluriiformes, Siluridae]						
Silurus asotus (Catfish)	SAL	L-rhamnose	28	285	3	30 % to STLs

Table 2. Rhamnose-binding lectins from fish eggs





Fig. 7. Functional expression of STL1, STL2, STL3, and STL3-N in COS7.





Fig. 8. Phylogenetic tree of the RBL CRD. Tandemly repeated RBL CRDs were separately aligned for comparison.







Scale bar is 50 µm

Fig. 13. Immunohistochemical localization of STLs in vitellogenic oocytes.



Fig. 14. Immunohistochemical localization of STL1 in mature steelhead trout egg before (A) and after (B) fertilization.



Fig. 15. In situ hybridization of the steelhead trout ovary probed with digoxigenin dUTP labeled STLs antisense RNAs.



Fig. 16. Changes in STLs levels and hemagglutinating activity of steelhead trout eggs during embryonic development.



# Chapter 3. Biological functions of RBLs







Fig. 19. Binding of STLs to various types of LPSs analyzed by ELISA.



Fig. 20. Effects of L-Rhamnose (A) and the heat treatment (B) on the binding of STLs to *S. flexneri* S-LPS .



Fig. 21. Binding of STLs to S- and R-LPSs.



Fig. 22. Effects of S- and R-LPSs on the sensorgrams of STL3 to L-rhamnose immobilized onto the sensor Chip. STL3 (100  $\mu$ g/ml) was co-injected with 500 (I), 125 (II), 31.3 (III), 15.6 (IV), 7.8 (V), 3.9 (VI)  $\mu$ g/ml of *E. coli* K-12 S-LPS (A) and *E. coli* K-12 R-LPS (B), *S. flexneri* S-LPS (C), and *S. flexneri* R-LPS (D) to the sensor chip.

	STL1	STL2 IC <sub>50</sub> (μM)	STL3
E. coli K-12 S-LPS	39.4	6.3	8.7
E. coli K-12 R-LPS	>167	>167	>167
S. flexneri 1A S-LPS	11,2	16.9	36.0
S. flexneri R-LPS	>167	>167	>167

Table 3. The 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of LPSs on the binding of STLs to L-rhamnose by surface plasmon resonance.



Fig. 23. Binding of STLs to LTA (A) and the effect of L-rhamnose on the binding of STLs (B).



Fig. 24. Binding of STLs to Gram-negative and Gram-positive bacteria.



Fig. 25. Agglutination of bacteria by STL3.

## 論文審查結果要旨

レクチンは、細胞表面などの糖鎖の構造を認識して結合するタンパク質であり、情報伝達などの多様 な生体機構に関与していると考えられている。魚類卵にもラムノースに結合特異性を示すレクチンが存 在しており、古くから発生分化、受精、生体防御などとの関連が指摘されてきたが、その構造や機能に ついては全く不明であった。本研究は、その実体を明らかにするべく、サケ科魚類スチールヘッドマス の未成熟卵から単離した3種類のレクチン(STL1, STL2, STL3)を中心として、タンパク質化学、分 子生物学、免疫組織化学的な手法を使って魚類卵レクチンの分子構造と生物機能の解明を目指したもの である。

最初に、3種類のSTLの糖結合特異性やサブユニット構造を調べた後、1次構造をタンパク質レベル とcDNAの両面から決定し、これらのレクチンが相同性を持った繰り返しドメイン構造からなることを 明らかにした。また、STLは従来知られている動物レクチンファミリーのいずれにも属さず、データベー スの相同性の検索によってそのモチーフ構造がヒトから線虫まで広く動物界に存在していることを発見 した。動物細胞を用いた発現系の構築によって1つの分子内ドメインが糖鎖認識の最小構成単位である ことを証明した。

次に、シロサケ、アメマス、アユなどの異なる魚種の卵からレクチンを単離して生化学的な性状を明 らかにすることによって、分子進化過程を考察するとともに、ラムノース結合特異性レクチンが新規の 動物レクチンファミリーを構成することを結論付けた。

魚体におけるSTLの組織分布を免疫組織化学的手法とノーザンブロッティングで調べ,STL1は雌雄の 肝臓でのみ発現して血流を介して卵巣に運ばれること,STL2とSTL3は卵巣のみで発現していることを 明らかにした。さらに卵成熟過程,及び受精から孵化におけるSTLの動態を精査した。そしてSTL1が脾 臓や白血球,血清などの免疫系細胞に局在し,受精卵ではSTLsは囲卵腔に局在していることからSTLs が魚類の自然免疫系に関与していることを指摘した。これを証明するために,魚病細菌を含むグラム陰 性菌及びグラム陽性菌に対するSTLsの擬集活性,また,それらの細胞壁構成成分であるリポ多糖(LPS) やリポテイコ酸(LTA)に対するSTLsの相互作用を結合試験を用いて明らかにした。これらの結果に よってSTLsがLPSやLTAの構造を識別して微生物と相互作用することを実験的に証明した。

以上のように本論文は、魚類卵で発見したラムノース結合特異性レクチン群の化学構造を初めて解明 しただけでなく、詳細な組織分布や動態、細菌との相互作用を解析して、これらのレクチンが生体内で 糖鎖を介した重要な機能を担う新規の動物レクチンファミリーを構成する実験証拠を提示した学術的に 優れたものである。よって、博士(農学)の学位を授与するに値すると判定した。