

氏名(本籍)	たて 館	の 野	ひろ 浩	あき 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
		教授	齋	藤
		教授	佐	藤
				實

論文内容要旨

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卵レクチン(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、メリピオース、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ケンサー、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(*Drosophila*、*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 はそれぞれ非還元 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)。ノーザンブロットィングとウエスタンブロットィングから、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 は非還元 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、ノーザンブロット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部に検出されたが、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。ノーザンブロット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、ノーザンブロットィングで調べた(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。一方、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はスムーズ型LPS(S-LPS)、O抗原を欠いているものはラフ型LPS(R-LPS)と呼ばれている(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ズ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、その構造や機能につい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] Tateno, H., 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] Tateno, H., 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] Tateno, H., 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] Tateno, H., Muramoto, K., and Kamiya, H. Structure and function of marine animal lectins. *Proceedings of Fish. Sci.* 印刷中.
- [5] Tateno, H., 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] Tateno, H., 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] Tateno, H., 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., Tateno, H., 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.

Chapter 1. Molecular structures of rhamnose-binding lectins (RBLs)

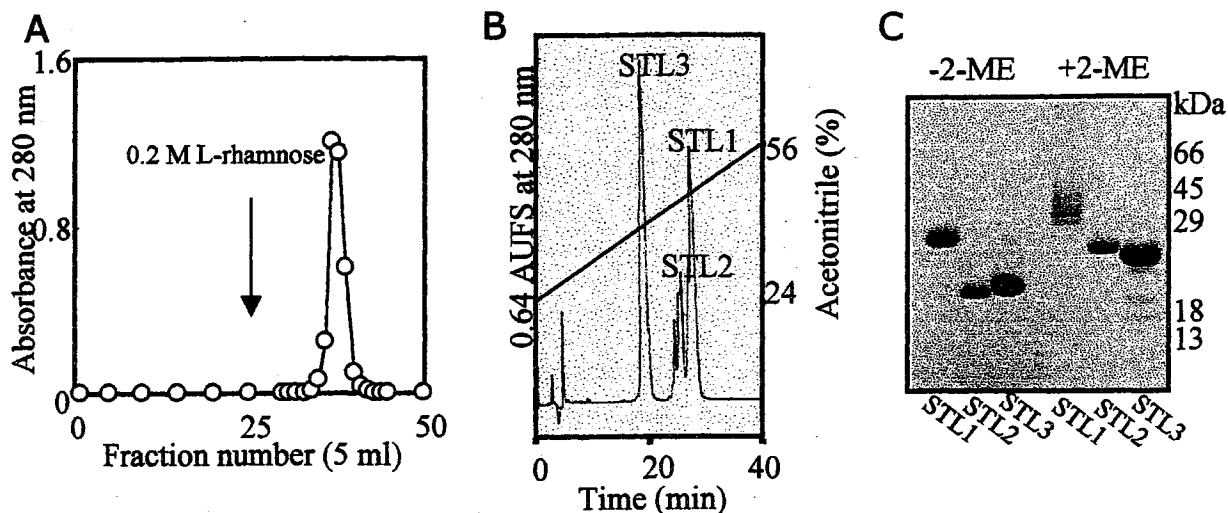


Fig. 1. Purification of STLs. (A) Affinity chromatography of STLs on L-rhamnose-Sepharose 6B. (B) Reversed-phase HPLC of STLs on TSKgel ODS 120 T. (C) SDS-PAGE of STLs.

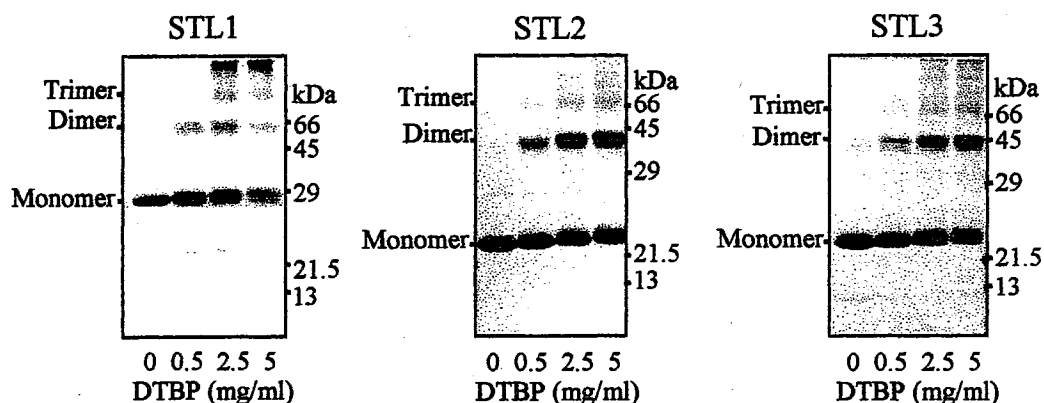


Fig. 2. SDS-PAGE of STLs cross-linked with dimethyl-3,3'-di-thio-bis propionimide (DTBP).

Table 1. Inhibition of hemagglutinating activity of STLs by saccharides

Saccharide ^a	STL1	STL2	STL3
L-Rhamnose	0.3 mM	0.3 mM	0.2 mM
Melibiose	12.5	3.1	3.2
L-Arabinose	25	100	50
D-Fucose	50	100	50
D-Galactose	50	50	25
Raffinose	100	50	50
D-Arabinose	>100	>100	>100
L-Fucose	>100	>100	>100
Others ^b	>100(0.1%) ^c	>100 (0.1%)	>100 (0.1%)

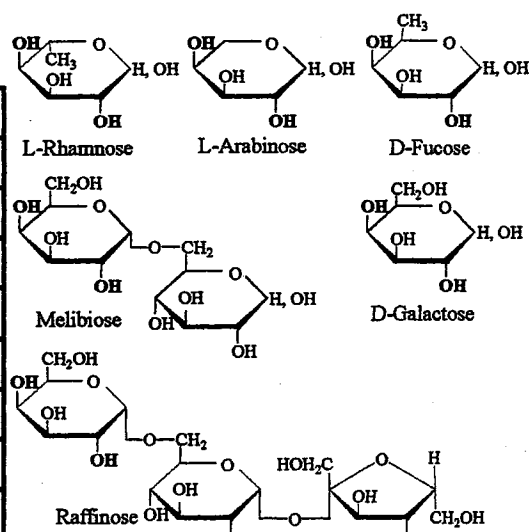


Fig. 3. Chemical structures of saccharides.

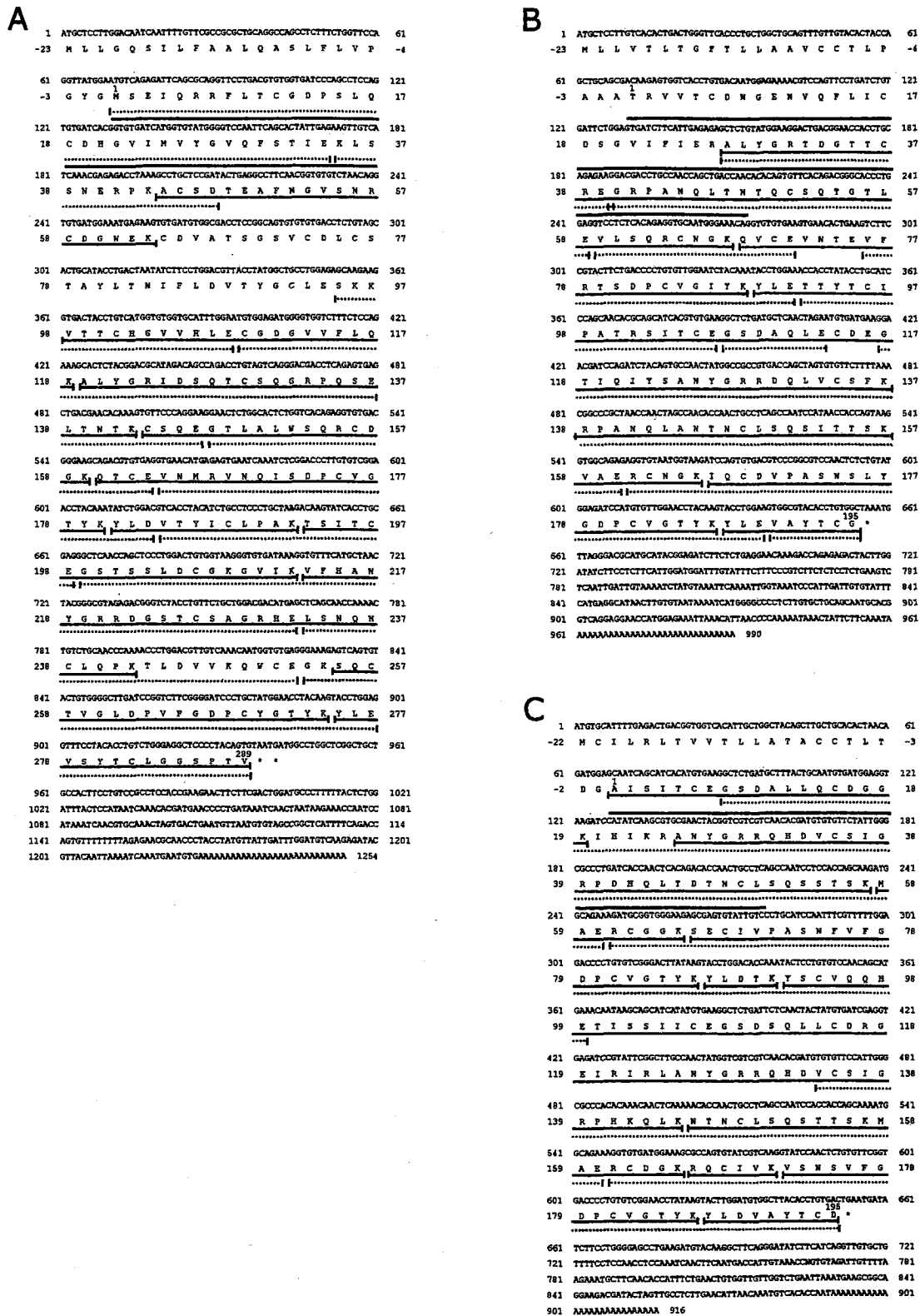


Fig. 4. Nucleotide sequences and amino acid sequences of STL1 (A), STL2 (B) and STL3 (C). Nucleotides and amino acid residues are numbered on the sides. Solid and dotted underlines represent sequences known by amino acid sequence analysis of the isolated peptides generated by cleavage of the CAM-proteins with *Achromobacter* protease I and *S. aureus* V8 protease, respectively.

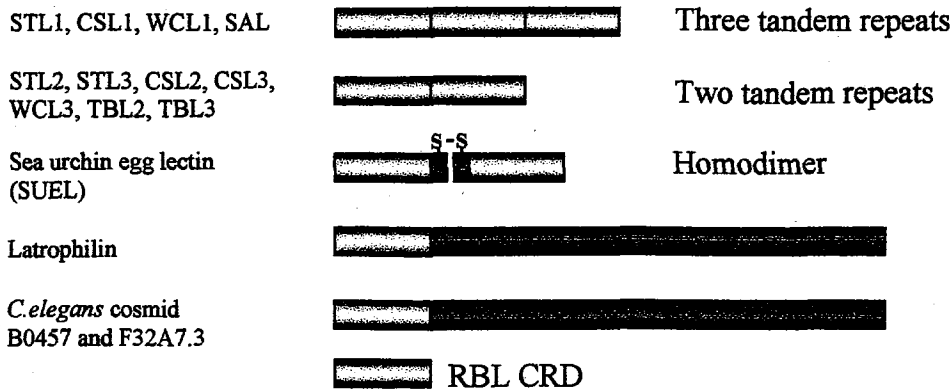


Fig. 5. Domain structures of RBL family

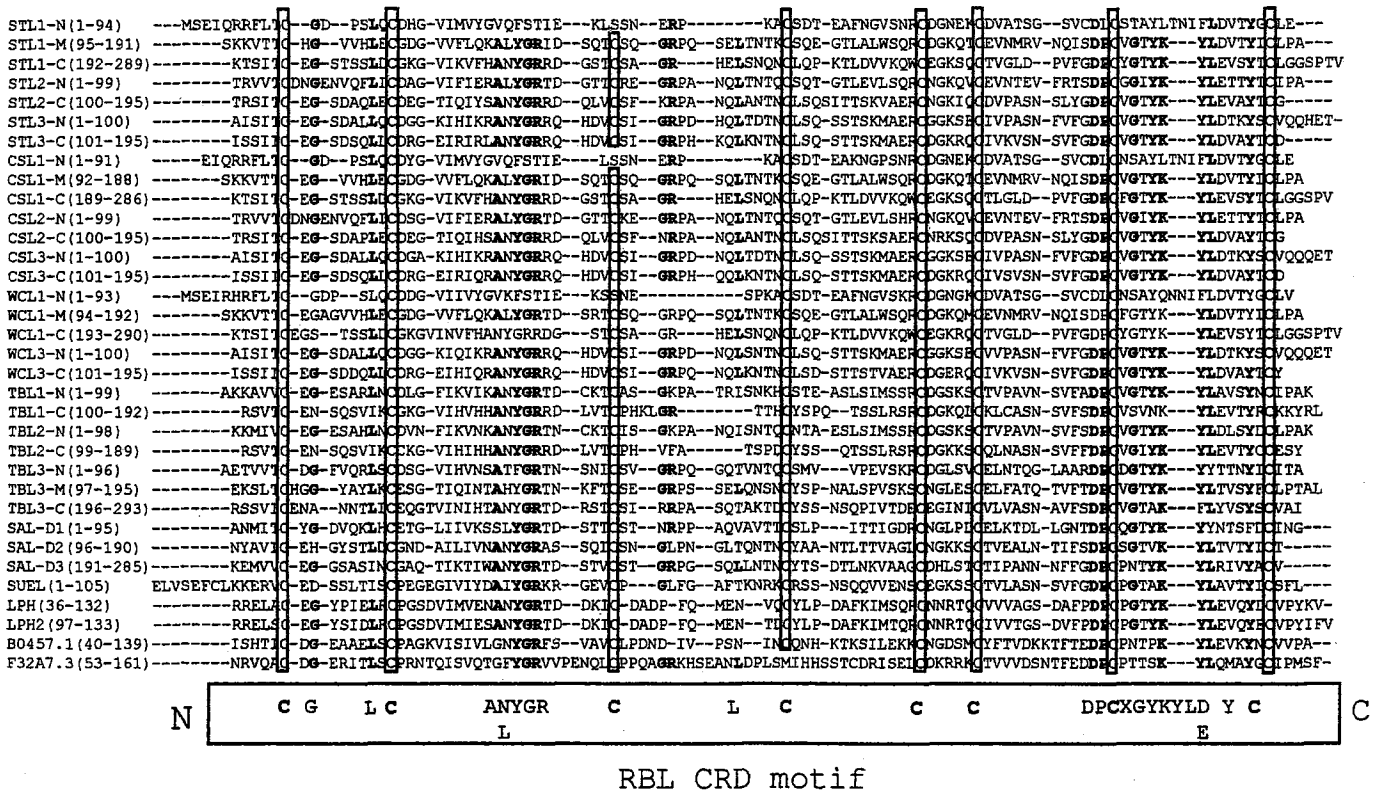


Fig. 6. Comparison of the RBL CRDs. Tandemly repeated domains of RBLs are separately aligned for comparison. Boxes indicate conserved Cys-residues. Bold indicates amino acid residues identical to STL-N, -M and -C except for STL1-N. STL: steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) egg lectin; CSL: chum salmon (*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: α -latrotoxin receptor from rat (*Rattus norvegicus*); LPH2: α -latrotoxin receptor from human; B0457: a putative protein encoded by *Caenorhabditis elegans* cosmid B0457; F32A7.3: a putative protein encoded by *Caenorhabditis elegans* cosmid F32A7.3

Table 2. Rhamnose-binding lectins from fish eggs

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

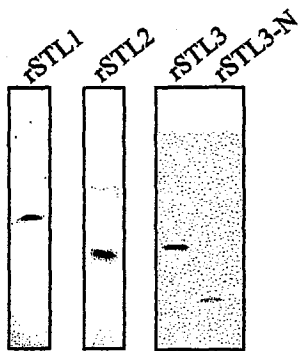


Fig. 7. Functional expression of STL1, STL2, STL3, and STL3-N in COS7.

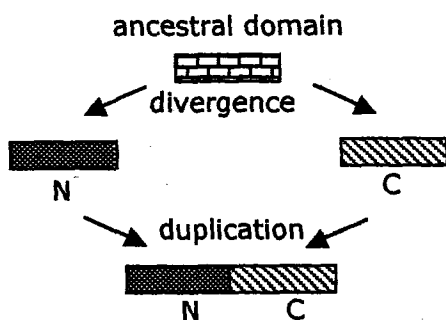


Fig. 9. Putative evolution of the RBL CRD.

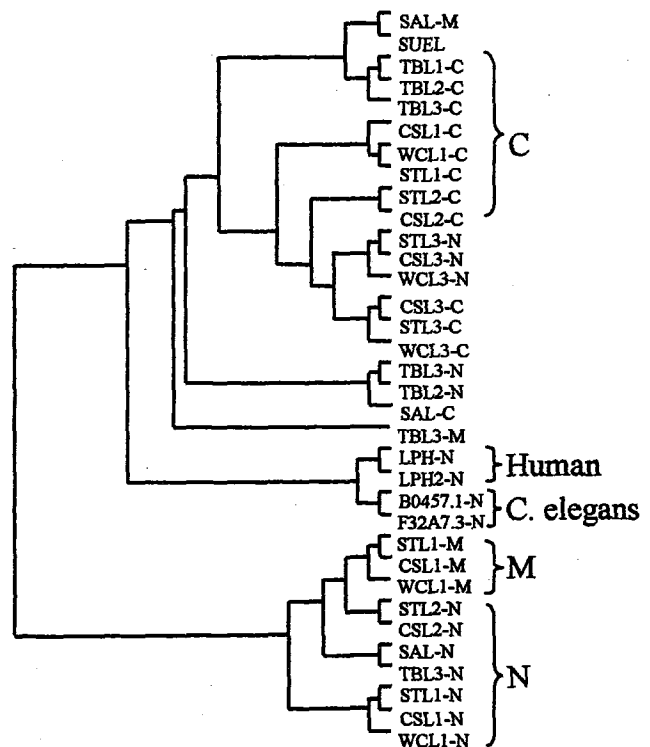


Fig. 8. Phylogenetic tree of the RBL CRD. Tandemly repeated RBL CRDs were separately aligned for comparison.

Chapter 2. Distribution of RBLs

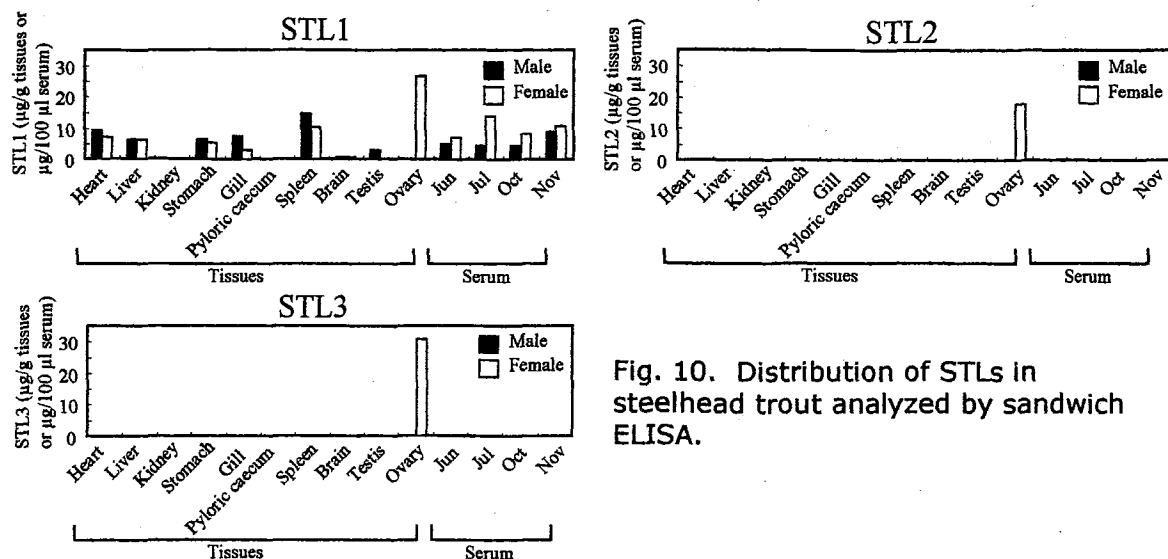


Fig. 10. Distribution of STLs in steelhead trout analyzed by sandwich ELISA.

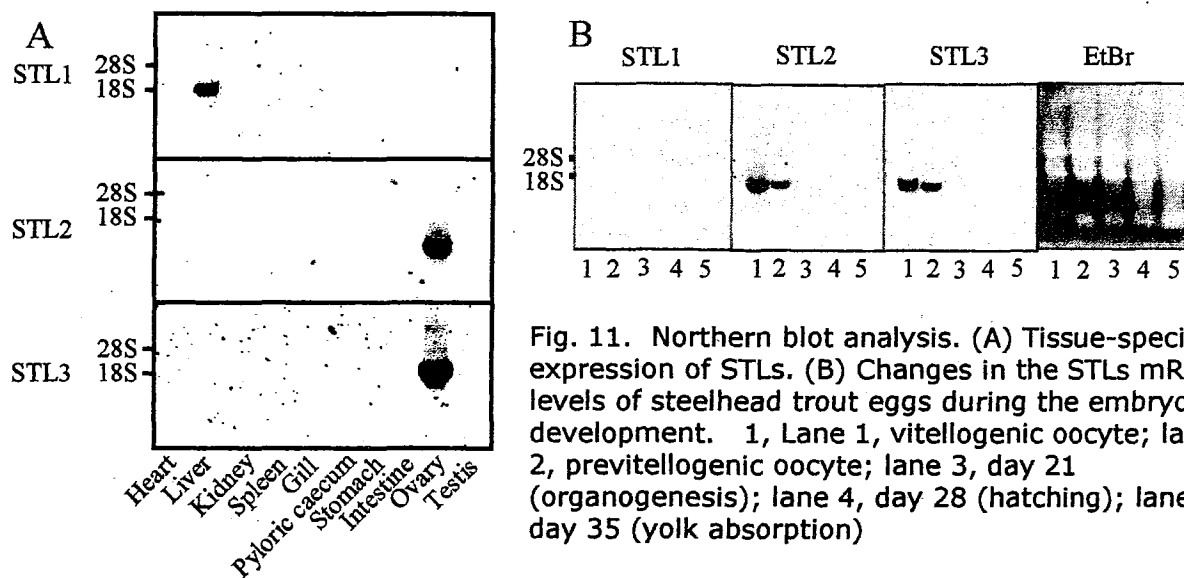


Fig. 11. Northern blot analysis. (A) Tissue-specific expression of STLs. (B) Changes in the STLs mRNA levels of steelhead trout eggs during the embryonic development. 1, Lane 1, vitellogenic oocyte; lane 2, previtellogenic oocyte; lane 3, day 21 (organogenesis); lane 4, day 28 (hatching); lane 5, day 35 (yolk absorption)

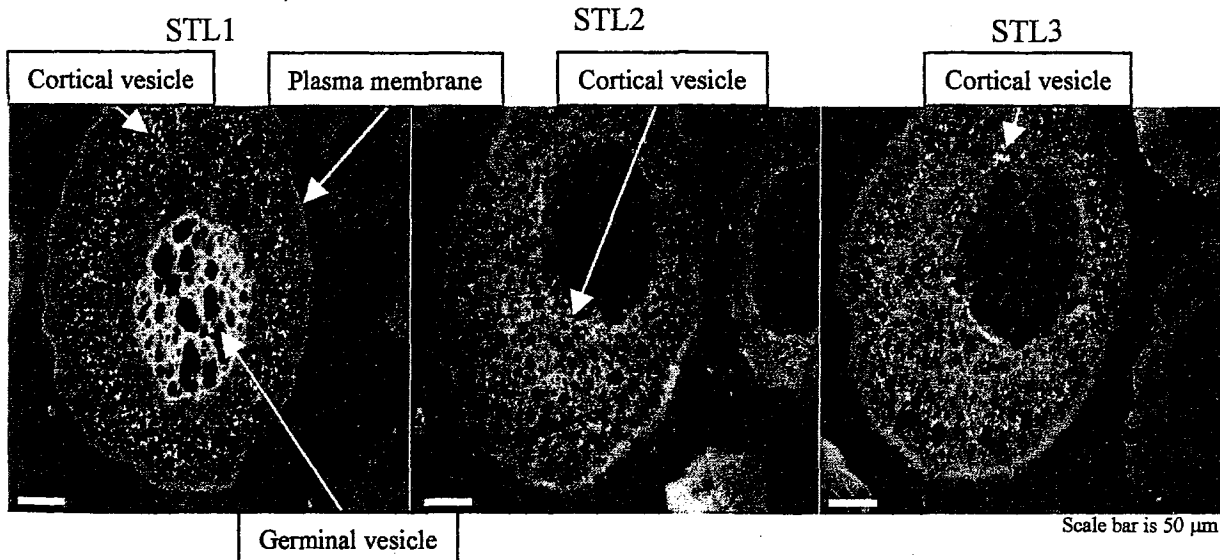


Fig. 12. Immunohistochemical localization of STLs in early previtellogenic oocytes.

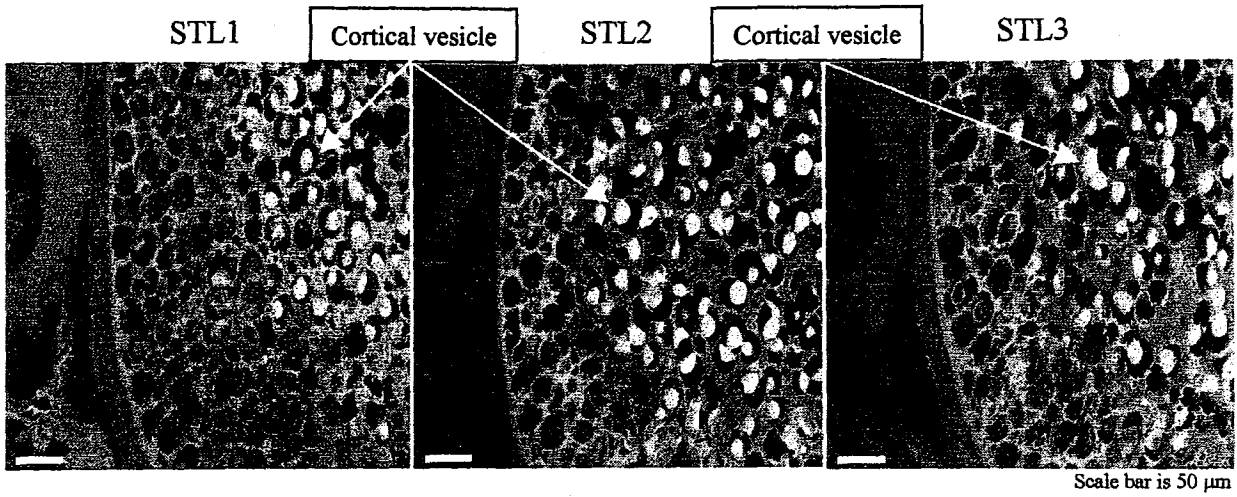


Fig. 13. Immunohistochemical localization of STLs in vitellogenic oocytes.

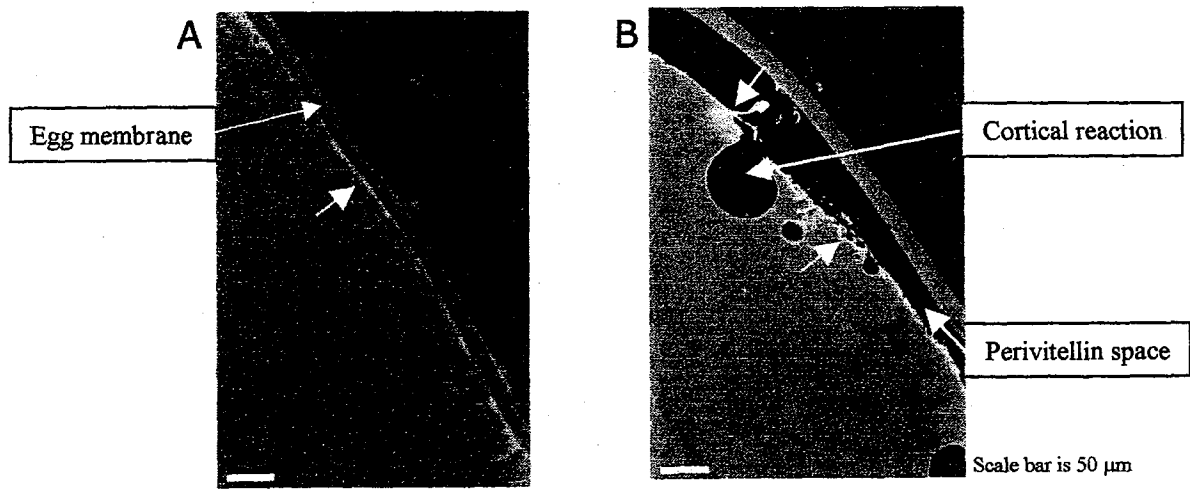


Fig. 14. Immunohistochemical localization of STL1 in mature steelhead trout egg before (A) and after (B) fertilization.

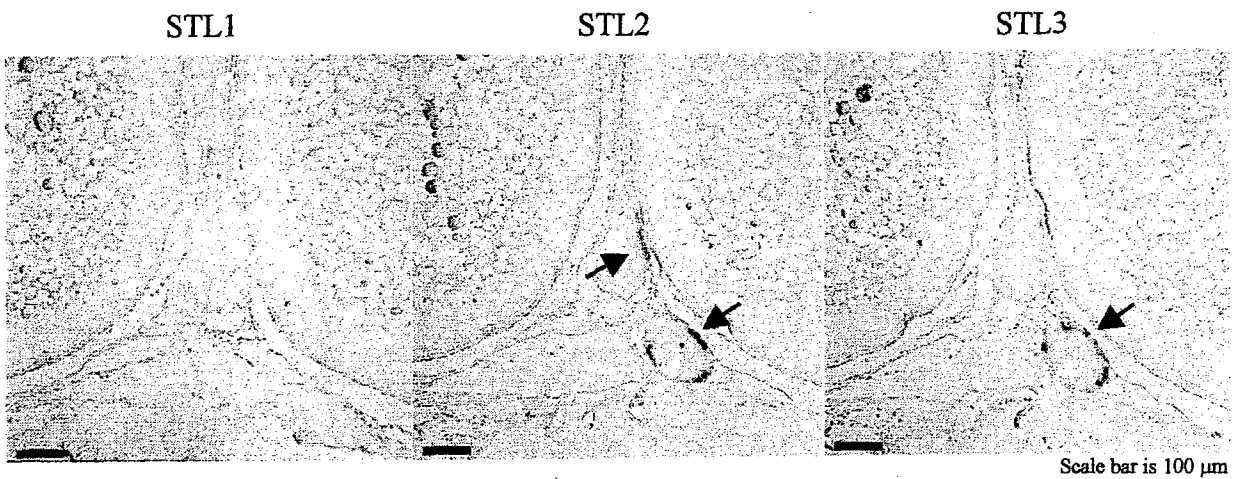


Fig. 15. In situ hybridization of the steelhead trout ovary probed with digoxigenin dUTP labeled STLs antisense RNAs.

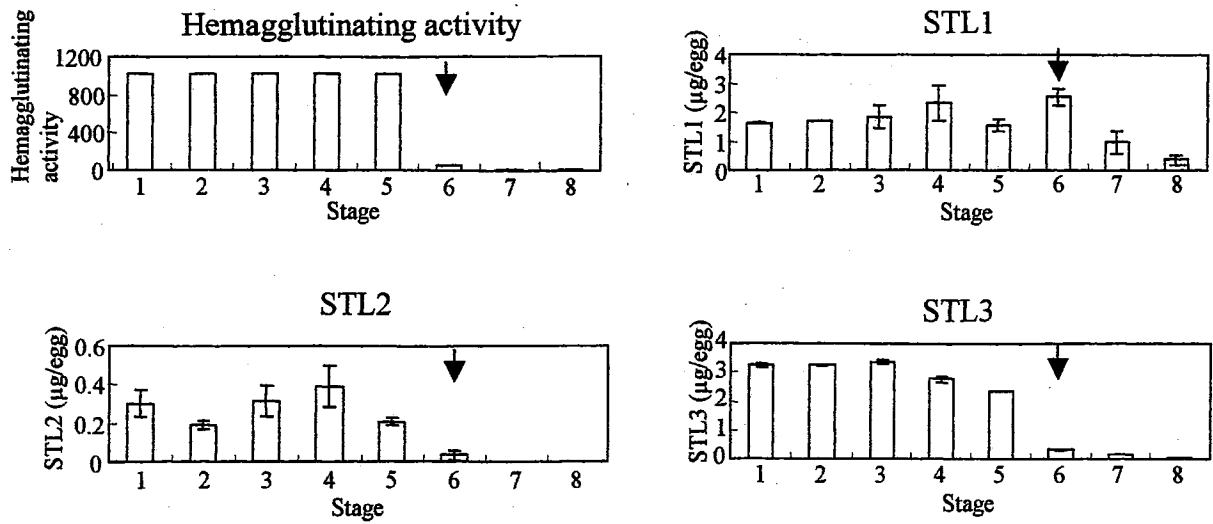


Fig. 16. Changes in STLs levels and hemagglutinating activity of steelhead trout eggs during embryonic development.

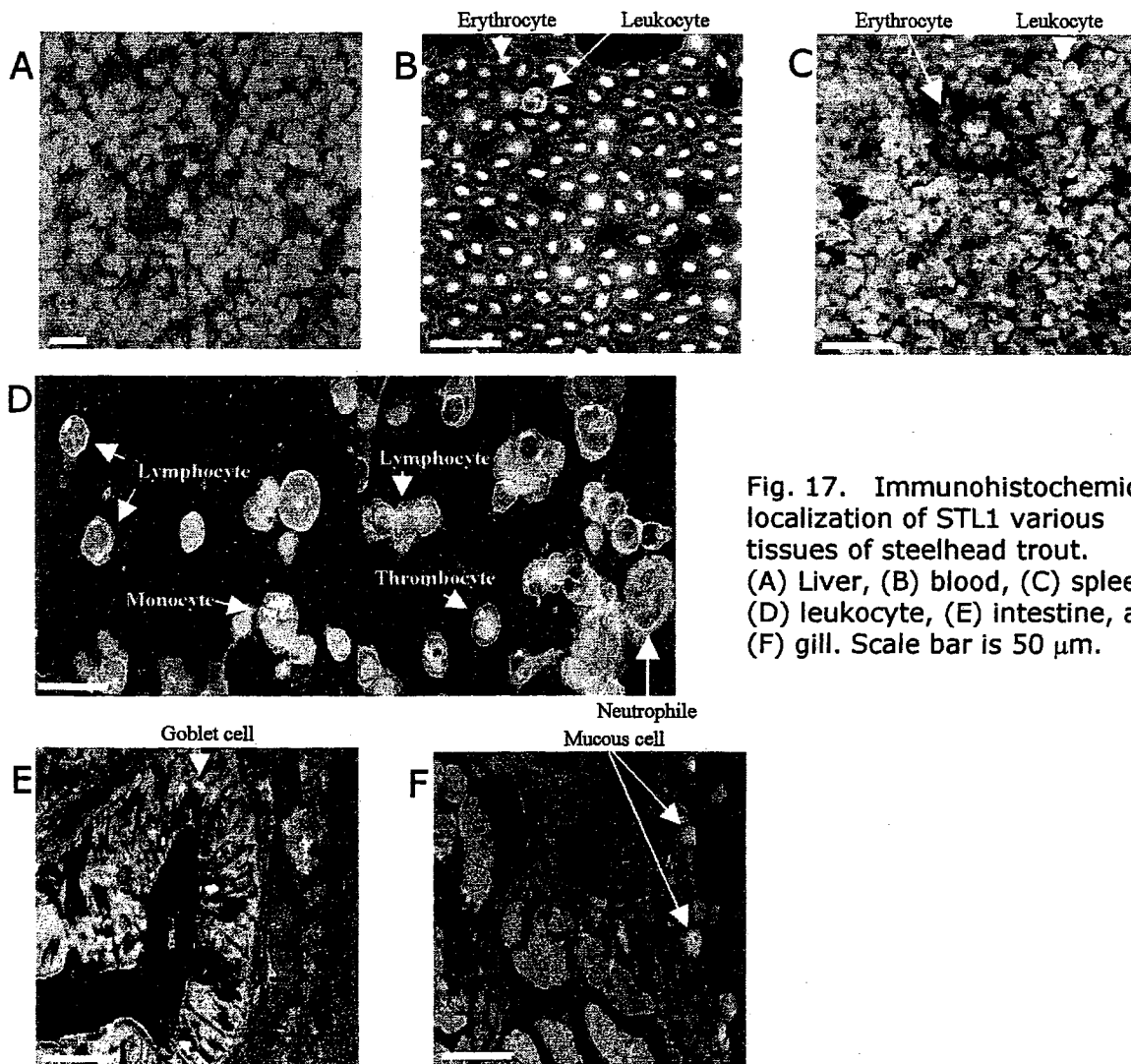


Fig. 17. Immunohistochemical localization of STL1 various tissues of steelhead trout. (A) Liver, (B) blood, (C) spleen, (D) leukocyte, (E) intestine, and (F) gill. Scale bar is 50 µm.

Chapter 3. Biological functions of RBLs

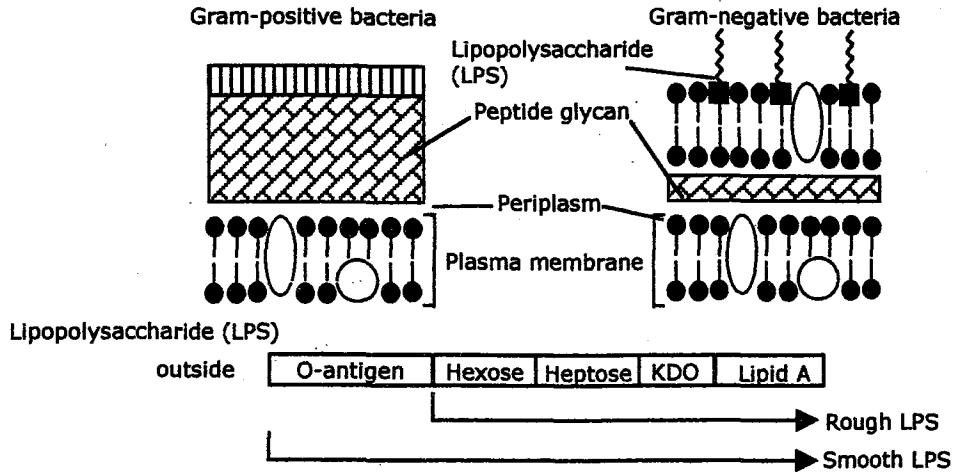


Fig. 18. Schematic representation of bacterial cell wall.

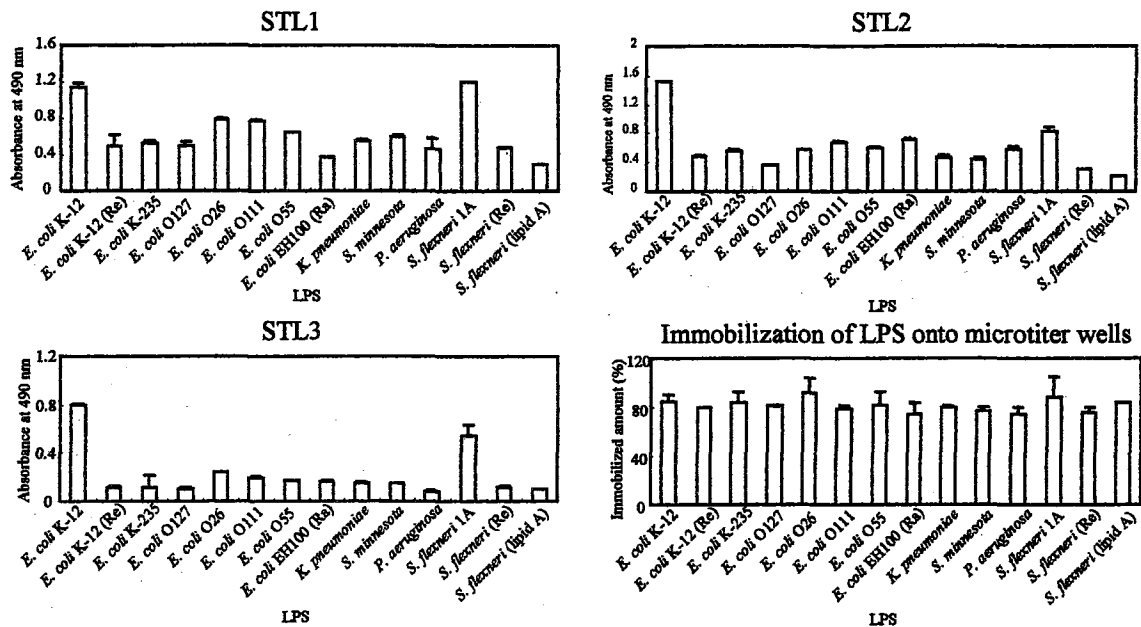


Fig. 19. Binding of STLs to various types of LPSs analyzed by ELISA.

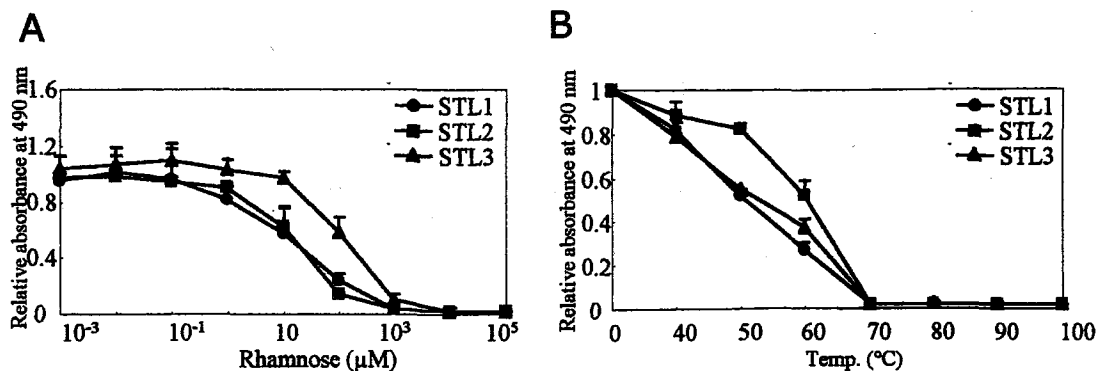


Fig. 20. Effects of L-Rhamnose (A) and the heat treatment (B) on the binding of STLs to *S. flexneri* S-LPS .

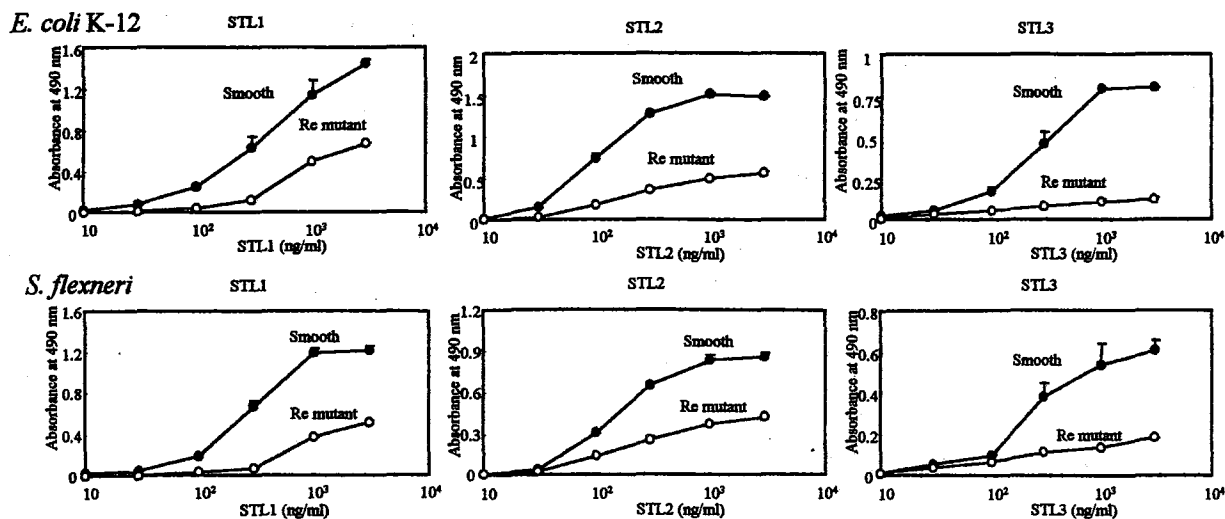


Fig. 21. Binding of STLs to S- and R-LPSs.

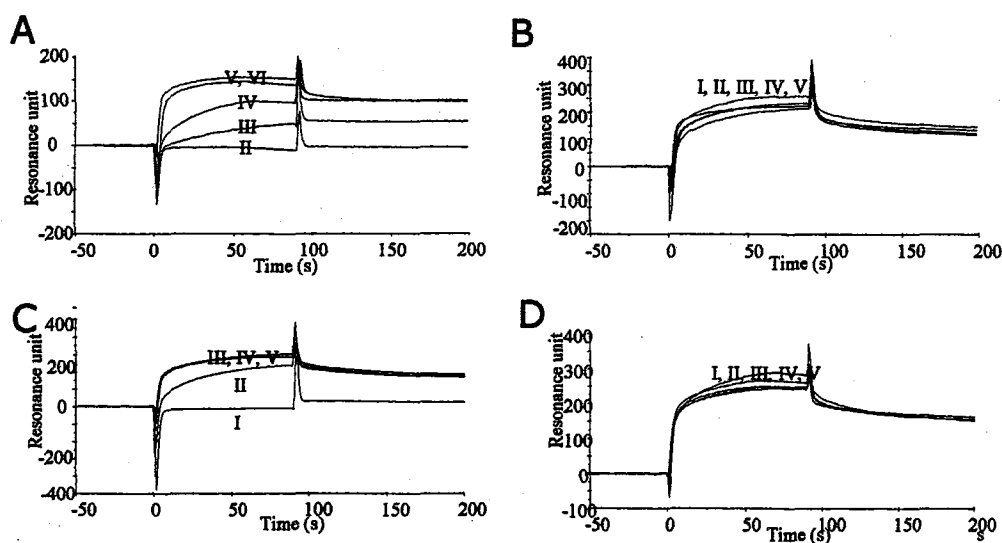


Fig. 22. Effects of S- and R-LPSs on the sensorgrams of STL3 to L-rhamnose immobilized onto the sensor Chip. STL3 (100 $\mu\text{g/ml}$) was co-injected with 500 (I), 125 (II), 31.3 (III), 15.6 (IV), 7.8 (V), 3.9 (VI) $\mu\text{g/ml}$ of *E. coli* K-12 S-LPS (A) and *E. coli* K-12 R-LPS (B), *S. flexneri*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

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

	STL1	STL2	STL3
	IC_{50} (μM)		
<i>E. coli</i> K-12 S-LPS	39.4	6.3	8.7
<i>E. coli</i> K-12 R-LPS	>167	>167	>167
<i>S. flexneri</i> 1A S-LPS	11.2	16.9	36.0
<i>S. flexneri</i> R-LPS	>167	>167	>167

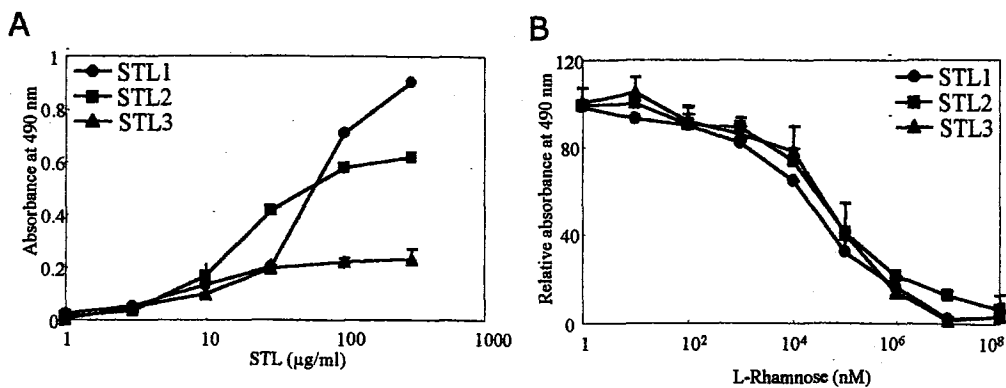


Fig. 23. Binding of STLs to LTA (A) and the effect of L-rhamnose on the binding of STLs (B).

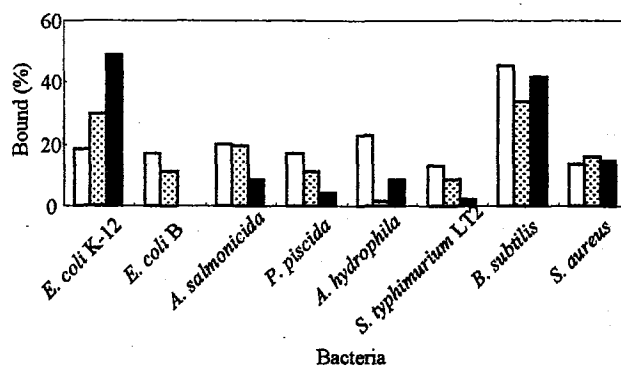


Fig. 24. Binding of STLs to Gram-negative and Gram-positive bacteria.

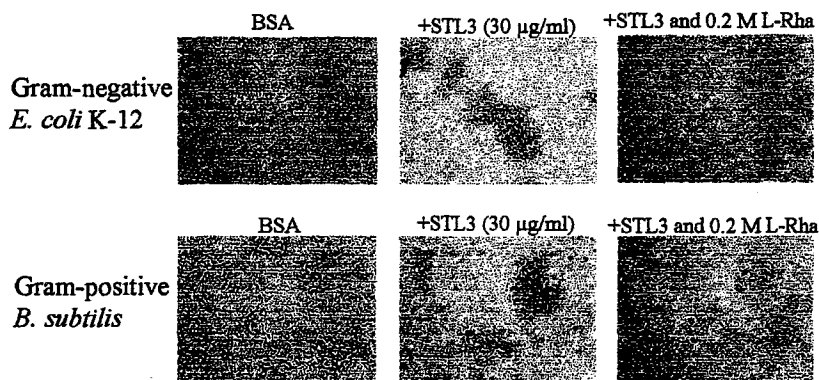


Fig. 25. Agglutination of bacteria by STL3.

論文審査結果要旨

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トイングで調べ、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の凝集活性、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。