

マガキ血リンパレクチンの分子機構と生体防御機能の解明

東北大学大学院農学研究科 圓谷佑介

研究の目的

レクチンは、糖鎖の構造を認識して結合する糖タンパク質である。現在では、植物をはじめとして動物、真菌、細菌やウイルスなど幅広い生物種に存在することが知られている。海産無脊椎動物においてもレクチンの存在が確認され、形態形成や生体防御機構へ関与しているといわれているが、機能の全容は明らかになっていない。マガキにおいては、血リンパ中に性質の異なる 2 種類のレクチン(gigalin-H、gigalin-E)が存在していることが、活性の点などから明らかになっている (Hardy et al. 1977)。しかし、それらの遺伝子配列などの分子的性状や産生部位等は全くわかっていない。本研究では、生体防御機構への関与が示唆されるこれらの gigalin について、分子の特定や特異抗体の作製を行い、生体防御因子としての知見を蓄積するとともに、例えばマガキの健康状態を測る生物指標に用いるなど、カキ養殖への応用も視野に入れたレクチン研究の実行を目的とする。

材料と方法

マガキは宮城県石巻市桃浦湾、北海道厚岸湾で垂下養殖されたものを用いた。閉殻筋より血リンパを採取し、赤血球凝集活性を測定した。赤血球にはウマ赤血球と、ガチョウ赤血球を用いた。さらに gigalin-H と gigalin-E の交差性の有無も確認した。次いで、交差吸着により得たレクチン画分に数種の糖鎖を反応させ結合糖を検討した。次いで、ウシ顎下腺ムチン (BSM) を使用したアフィニティークロマトグラフィーにより、血リンパ中から gigalin-E を分離し、nano LC-MS/MS により gigalin-E の同定を行った。また、ペプチド抗体カラムによっても gigalin-E の精製を試みた。さらに、nano LC-MS/MS の結果から得られたアミノ酸配列のモチーフ解析を行うことで、gigalin-E の機能の推定を行った。最後に gigalin-E が生体防御因子としての役割を持つかどうか、細菌 (*S. aureus*, *E. coli*, *V. tapetis*) に対する凝集活性で評価した。

結果および考察

マガキ血リンパの赤血球凝集活性を検討したところ、カルシウム依存的にウマ赤血球を凝集する成分と、カルシウムに依存せずにガチョウ赤血球を凝集する成分が確認された。さらに、交差性もみられなかったことより、2種類の赤血球を凝集するレクチン成分 (Gigalin-E、Gigalin-H) が異なる分子であることが示された。糖鎖との反応試験より、Gigalin-E 画分が 3SialylGalactosyl および 6 SialylGalactosyl 糖鎖を強く凝集することが確認できた。gigalin-E 画分は、他のシアル酸を含まない糖鎖では凝集塊を生成しなかったことから、gigalin-E 画分はシアル酸を含む糖鎖を認識している可能性が示唆された。BSM アフィニティカラムで得られた画分は、ガチョウ赤血球に対しては凝集活性が見られず、ウマ赤血球にのみ活性が見られたため (Table. 1)、gigalin-E が BSM アフィニティカラムで回収できたと考えられた。また、電気泳動像は Fig. 1 に示した。Fig. 1 のバンド B は cavortin であり凝集因子ではないので、nano LC-MS/MS の結果よりウマ赤血球を凝集するレクチン gigalin-E は Clq-like protein 4 であることが示された (Fig. 2)。ドメイン検索、モチーフ解析により gigalin-E が生体防御因子として働いている可能性が示唆されたので細菌反応試験を実施したところ、gigalin-E が *E. coli* を凝集することが確認できた。これより、gigalin-E は、細菌を凝集するレクチンとしての働きを通して生体防御に貢献している可能性が考えられた。



Fig. 1 SDS-PAGE of gigalin-E fraction.

Table.1 Agglutinating titers (\log_2 values) of *C. gigas* hemolymph and giganin-E fraction after BSM affinity column

	ERBC		GRBC	
	+Ca ⁺⁺	-Ca ⁺⁺	+Ca ⁺⁺	-Ca ⁺⁺
hemolymph	14	1	8	8
giganin-E fraction	9	0	-	-

-:not detected.

B

1 MHRICVFVAL CLYAAYGYES CDQK**IMEDTI CSLCGQRKGS** EQQEAGQQVA
51 FVVYMSQNVL INTISKYKTF VYDRVETNVG NGYNVQTGNF TAPESGVYVF
101 HTTTAAFDKS HSTIEIVANG QVK**DITWADA MDHNDRAVAS SMTVLSLTGG**
151 **DVVYVRVGLT FAGNYLESNQ YTRMSFSGFK** LA

C

1 MHRICVFVAL CLYAAYGYES CDQK**IMEDTI CSLCGQRKGS** EQQEAGQQVA
51 FVVYMSQNVL INTISKYKTF VYDRVETNVG NGYNVQTGNF TAPESGVYVF
101 HTTTAAFDKS HSTIEIVANG QVK**DITWADA MDHNDRAVAS SMTVLSLTGG**
151 **DVVYVRVGLT FAGNYLESNQ YTRMSFSGFK** LA

Fig.2 (B) Tryptic peptides of band B(Fig.1) in SDS-PAGE identified by MS are written in the red. The MS analysis revealed 34% sequence coverage of complement Clq-like protein 4 isoform X1.

(C) Tryptic peptides of band C(Fig.1) in SDS-PAGE identified by MS are written in the red. The MS analysis revealed 35% sequence coverage of complement Clq-like protein 4 isoform X1.

Table.2 Agglutination activity of hemolymph and giganin-E to bacteria.
 Titters of giganin-E fraction and hemolymph are 9 and 12, respectively.

bacteria	hemolymph	giganin-E
<i>Escherichia coli</i>	++	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>Vibrio tapetis</i>	-	-

+: agglutination
 -: no agglutination

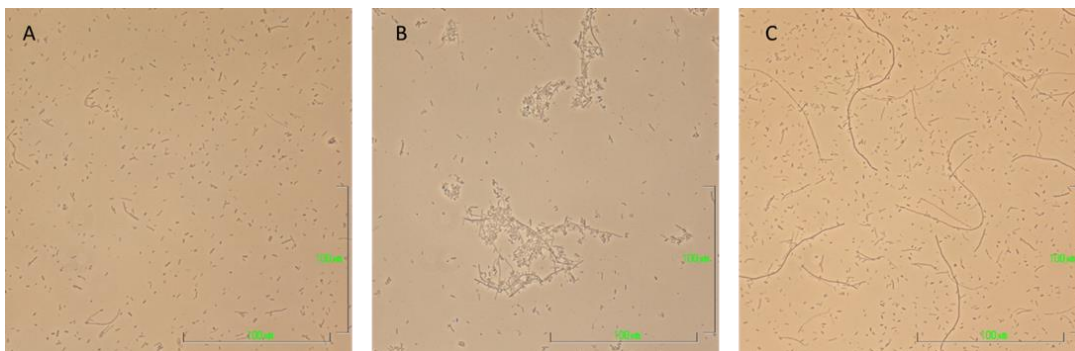


Fig.3 *E. coli* agglutination induced by giganin-E in different conditions.
 A, TBS was used instead of giganin-E as control. B, the agglutination induced by hemolymph. C, the agglutination induced by giganin-E.