

# マベ貝外套膜からの 植物レクチン様レクチンの単離と性状

○ 星野亘・永沼孝子・小川智久・村本光二（東北大院生命）

キーワード：レクチン・二枚貝・トレハロース・糖鎖

〔目的〕 多くの海洋生物において、多様な糖結合特異性をもったレクチンの存在が確認され、生体防御作用を中心に、それらの機能も解明されつつあるが、二枚貝のレクチンについての知見は少ない。演者らはこれまで、ウグイスガイ科に属するマベ貝の外套膜からトレハロースに対して結合特異性を示し、魚卵由来ラムノース結合特異性レクチンに相同性を持ったレクチン (PPL-1) をムチンアフィニティークラムで単離し、その性状を明らかにしてきた。この過程において、PPL-1 とは異なるレクチン (PPL-2) の存在を確認した。本研究では、PPL-2 の生理機能の解明のために、その性状を明らかにした。

〔方法・結果〕 マベ貝外套膜より、トレハロースセファロース 4B カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーでレクチン (PPL2s) を単離した。さらに、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて 2 種類のレクチン (PPL-2 I、PPL-2 II) を得た。SDS-PAGE と MALDI-TOF-MS から、PPL-2 I は  $\alpha$  サブユニットと  $\gamma$  サブユニットが分子間 S-S 結合でつながったヘテロダイマーであり、PPL-2 II は  $\beta$  サブユニットが分子間 S-S 結合でつながったホモダイマーであることが示された。赤血球凝集阻害試験により、PPL-2 I はイソマルトースやトレハロースに、そして PPL-2 II はコウジビオースに糖結合特異性を持つことが明らかになった。気相プロテインシークエンサーと MALDI-TOF-MS により PPL-2 I と PPL-2 II のアミノ酸配列を決定した。また、マベ貝外套膜由来 cDNA ライブラリーから PPL-2s 遺伝子をクローニングし、塩基配列を調べた。それらの結果、3 つのサブユニットは互いに約 50% の類似性を有していた。 $\alpha$  サブユニットには Asn-Gln-Thr の糖鎖修飾モチーフがあり、糖鎖の修飾を受けていた。糖鎖の分子量は約 1 kDa であり、マンノース、N-アセチルグルコサミン、フコースから構成されていた。次に、マベ貝の外套膜、えら、生殖腺、貝柱の 4 つの組織から RNA を抽出し、各サブユニットに特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行い、発現を調べた。その結果、いずれのサブユニットとも、4 つの組織で発現がみられた。また、ウエスタンブロットの結果より、外套膜、えら、貝柱、体液で PPL-2 の存在が確認され、mRNA の発現と一致した。PPL-2 の生理機能を調べるために、リガンドの存在を調べた。体液にはスクロースのみが検出され、貝柱では、グリコーゲン、マルトース、グルコースが検出された。しかしながら、トレハロースは検出されなかった。

〔考察〕 マベ貝外套膜から、約 50% の相同性を有するが、異なる糖結合特異性を持った 2 種類のレクチンを単離した。PPL-2s は、同じくトレハロース結合特異性を持つレクチン PPL-1 に対して全く相同性を有していなかった。また、PPL-2s はこれまで報告されている動物レクチンファミリーのいずれとも相同性を示さなかったが、植物レクチンファミリーである jacalin-related lectins (JRLs) に相同性を示した。フグ体表粘液中でユリ目植物レクチンと相同性を持つレクチンの存在が報告されているが、レクチンの分子進化上、非常に興味深い。すでに立体構造が判明している菊芋塊茎レクチン (Heltuba) を鋳型とし、MOE (molecular operating environment) を用いて PPL-2 の立体構造を予測した結果、糖認識部位に関わっているアミノ酸 (36、153 位のグリシン、154 位のシステイン、155 位イソロイシン、156 位のアスパラギン酸) が推定された。すなわち、JRL ファミリーの糖認識部位で保存されている 3 つのアミノ酸残基は、PPL-2 でも保存されていた。PPL-2 は外套膜の他に、貝柱、えら、体液、生殖腺にも存在していることが明らかになり、マベ貝で幅広く生理機能に関与していると考えられる。さらにマベ貝には PPL-2 と相同性を有しているが、糖結合特異性が異なるレクチンが他にも存在しており、これらのマルチプルレクチンは、特異な進化によって多様な機能を獲得してきたと考えられる。