

トゲクサビライシ *Ctenactis echinata* レクチンの精製と 褐虫藻 *Symbiodinium sp.* の関与

神保 充*

目 的

生物が特定の環境に適応する場合、他の生物と共生するのがしばしば観察される。熱帯の浅海域は貧栄養であるが、この地域に広く分布するサンゴは植物プランクトンの一種褐虫藻と共生している。これにより、サンゴは褐虫藻から光合成産物である有機物を得ることが可能となり、栄養の少ない環境でも繁栄することができるのである。褐虫藻から得られた有機物はサンゴに利用されるばかりでなく、その一部は体外に放出されて周りの魚類やエビにも利用される。すなわち、サンゴと褐虫藻の共生はサンゴ自体のためばかりでなく熱帯地域の生物を支えている点でも重要である。しかし、近年では海水温の上昇などのストレスにより褐虫藻が逃げ出す白化現象などによりサンゴが死んでしまい、熱帯の生態系にとって大きな問題となりつつある。従って、サンゴにおける共生関係がどのように確立され維持されているのか研究することは重要である。

サンゴが褐虫藻を獲得する方法は、親から受け取る垂直伝搬と環境から取込む水平伝搬が有るが、多くの場合、水平伝搬で褐虫藻を獲得する。褐虫藻は単独でも生活ができ、自由生活下では遊泳しているが、一旦サンゴに獲得されると不動の栄養細胞となる。サンゴは遊泳能を持つプラヌラ幼生および変態して着生した後に褐虫藻を獲得するが、この獲得過程の分子機構は少しずつ明らかにされている。ひとつは糖がサンゴへの褐虫藻の獲得に関与していることである。例えば、クサビライシの一種 *Fungia scutaria* および イソギンチャクの一種 *Aiptasia pulchella* では、褐虫藻を糖分解酵素で処理すると褐虫藻の獲得が阻害されることが報告されている (Wood-Charlson et al., 2006; Lin et al., 2000)。従って、褐虫藻の表

*北里大学海洋生命科学部

面糖鎖がサンゴによる褐虫藻の獲得に重要な役割を持つと考えられる。

一般に糖を認識する分子はレクチンと呼ばれており、赤血球の凝集を測定することにより容易に検出できる。その役割は、無脊椎動物では生体防御に関与していると報告されているが近年、共生においてレクチンが関与していることも様々な生物で報告されている。マメ科植物と根粒細菌では、根粒細菌の選択にレクチンが関与している可能性があり、根粒細菌の根毛への結合にレクチンが関与していることも報告されている (Laus et al., 2006; Hirsch, 1999)。一方、熱帯性の線虫 *Laxus oneistus* は体表に硫黄酸化細菌を共生させているが、この細菌の保持にレクチンが関与していると報告されている (Bulgheresi et al., 2006)。また海綿 *Didemnum molle* のレクチンは共生している藍藻の増殖を促進することが報告されている (Müller et al., 1981)。

我々は、サンゴと褐虫藻の共生においてもレクチンが関与していることを明らかにした (Jimbo et al., 2005; Koike et al., 2004; Jimbo et al., 2000)。八放サンゴの一種 シゲミカタトサカ *Sinularia lochmodes* のD-ガラクトース結合レクチン SLL-2 は、共生している褐虫藻の細胞壁の外側に分布していることを明らかにした。さらに、*Symbiodinium* CS-156 株にSLL-2 を与えると増殖に影響することなしに共生状態と類似した形態にさせること、刺胞内にこのレクチンが分布することから、褐虫藻の獲得または維持にレクチンが関与していることが示唆される。しかし、このサンゴは同定や飼育が困難であり、褐虫藻の獲得や維持に関する研究を行うには不向きであった。

そこで、より同定や採集が容易であり、褐虫藻を持たない幼生の採集が容易であるトゲクサビライシ *Ctenactis echinata* では粗抽出液がウサギ赤血球を凝集活性を示した。そこで、*C. echinata* を用いることで、上の考えをより詳細に検証できると考えた。本研究では、その第一段階としてレクチンを精製し、その性状を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

材 料

実験に用いた *Ctenactis echinata* は、沖縄県阿嘉島にて採集し、使用するまで -70°C で保存した。褐虫藻 FKM0207株は沖縄産クサビライシ *Fungia cf. Fungites* から単離されたも

のを、無菌的に実験室で維持した。

粗抽出液の作製

C. echinata を破砕機で破砕した後、3倍量の 600 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ で抽出した。その後、15,000 x g で 30 分間遠心して上清を得た。この作業を2回繰り返して、得られた上清を粗抽出液とした。

凝集活性試験

20 μ l の試料を希釈液(20 mM Tris-HCl, pH 8.5, 600 mM NaCl, 10 mM CaCl₂) で2倍系列希釈を行った後、20 μ l の4%動物赤血球を加えた。混合後、室温で30分間静置した後、凝集を確認した。凝集活性(HU)は、凝集活性を示す最大の希釈倍率で示した。

2価イオン要求性を検討する場合、まず、EDTA存在下で試料を透析した後、THB(50mM Tris-HCl, pH 8.5, 600 mM NaCl)で透析した。その後、2価イオンを含む 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 600 mM NaCl で試料を希釈して凝集活性を測定した。

熱安定性を検討する場合、各温度で 10分間処理した後、凝集活性の測定を行った。

糖阻害試験を行う場合は以下の様に行った。まず、10 μ l の各種糖を希釈液で2倍系列希釈した後、16HUの試料を10 μ l 加えて室温で30分間静置した。その後、20 μ l のウサギ赤血球を加え、室温で30分間静置した。糖として、L-アラビノース、L-フコース、デオキシ-D-リボース、D-キシロース、D-ガラクトース、D-ガラクトサミン、N-アセチル-D-ガラクトサミン、D-グルコース、D-グルコサミン、N-アセチル-D-グルコサミン、D-マンノース、D-マンノサミン、N-アセチルノイラミン酸、L-ラムノース、ソルボース、マルトース、ラクトース、メリビオースとシュクロースを用いた。

レクチンの精製

D-ガラクトース結合セファロース6Bは、エポキシ活性化セファロース6B (GEヘルスケアバイオサイエンス)を用いてメーカーのプロトコルに従って作製した。粗抽出液をD-ガラクトース結合セファロース6B に添加した後、THB で十分に洗浄した。その後、0.2 M D-ガラクトースを含むTHB で溶出した。凝集活性がある画分をまとめてTHB に対して透析して精製標品とした。

電気泳動

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)は、12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて、Laemmli の方法 (Laemmli, 1970)に従って行った。染色はイミダゾール染色を用いた (Fernández-Patrón et al., 1992)。

質量分析

質量分析は、マトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF-MS) Axima CFR plus (島津製作所)を用いて行った。1 μ g の試料を 10 μ l の 500 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)中で4°Cで一晩反応させた後、 α -シアノ-4-ヒドロキシケイヒ酸 (CHCA) を用いて分析した。

ゲルろ過による分子量の測定は、Superdex 200 10/30 GL (GEヘルスケアバイオサイエンス)を用いた。溶媒は、50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 500 mM NaCl, 10 mM CaCl₂を用い、Äkta FPLC システム(GEヘルスケアバイオサイエンス)を用いた。

N 末端アミノ酸配列分析

SDS-PAGE 後のゲルを、ポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜フルオロトランス W (ポール)にエレクトロブロットニングした。その後、ボンソーSでタンパク質を検出した後、必要な成分を気相アミノ酸シークエンサー PSQ-21A (島津製作所)を用いてアミノ酸配列を決定した。

結果と考察

C. echinata の凝集活性の性質

C. echinata の粗抽出液の各種動物赤血球に対する凝集活性は、ウサギで 32U と最も高く、次いでガチョウ、ヒツジと低くなった。また、その凝集活性はEDTA 存在下で失活し、10 mM CaCl₂ により完全に回復した(図 1)。従って、このレクチンは ウサギ赤血球に対し強い凝集活性を示し、Ca²⁺ イオン要求性であることがわかった。今後の凝集活性試験ではウサギ赤血球を用い、Ca²⁺ を含む溶液中で凝集活性を測定することとした。

次に、粗抽出液の凝集活性を阻害する糖を探索した(表1)。その結果、最も高い阻害が

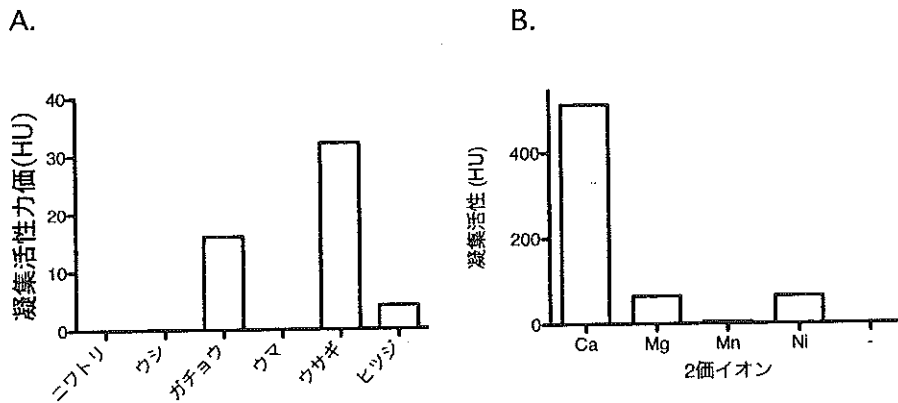


図1 *C. echinata* 粗抽出液の凝集活性

A. 各種動物赤血球に対する*C. echinata* 粗抽出液の凝集活性 B. *C. echinata* 粗抽出液の凝集活性への2価イオンの影響

表 I. CecLの糖阻害試験

糖	最小阻害濃度 (mM)	
	粗抽出液	CecL
L-arabinose	50	50
L-fucose	50	25
D-xylose	50	50
D-galactose	12.5	12.5
N-acetyl-D-galactosamine	50	50
D-galacturonic acid	50	100
D-glucose	100	100
D-glucuronic acid	100	100
D-mannose	100 <	100
L-rhamnose	100	100
maltose	25	25
lactose	6.25	6.25
melibiose	6.25	12.5

見られた糖は、ラクトースとメリビオース(6.25 mM)であり、D-ガラクトースとマルトースがそれに続いた。従って、この粗抽出液に含まれるレクチンはガラクトースおよびその誘導体に結合性を示すと考えられたので、レクチンの精製にはガラクトースを結合させた樹脂を用いることとした。

レクチンの精製

そこで、ガラクトース結合Sepharose 6Bを用いて精製を行った。溶出には、0.2M D-ガラクトースを用いた。図2に示す様に、凝集活性はこの樹脂に完全に吸着した後、D-ガラクトースにより溶出された。この溶出画分をSDS-PAGEに供したところ、31と36 kDa にバンドが検出された(図3)。この画分について糖阻害試験を行ったところ、粗抽出液と同様な糖阻害スペクトルを示した。従って、この画分が主要な *C. echinata* レクチンであることがわかった。そこで、この画分をCecLと名付けた。この精製により、65gのサンゴ試料から2.7mgの精製レクチンCecLが得られた。回収率は62.5%であり、比活性は107,000 HU/mgであった(表2)。

CecLをSDS-PAGEに供したところ、還元条件下では36kと31kDaにバンドが検出され、グリコペプチダーゼF処理により32kDaの成分のみが

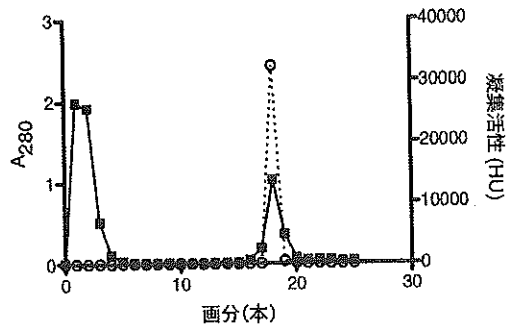


図2 アフィニティクロマトグラフィによるレクチンCecLの精製

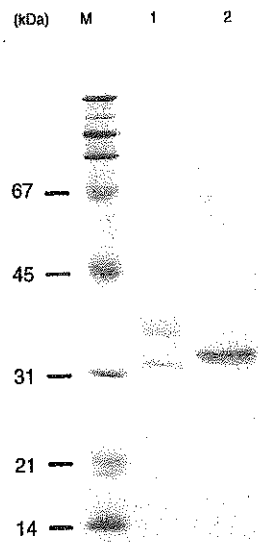


図3 CecLのグリコペプチダーゼF処理の移動度への影響
CecLをグリコペプチダーゼFと混合し、37°Cで16時間消化した後、SDS-PAGEを行った。lane 1: 未処理, lane 2: GPF処理, M: 分子量スタンダード。

表2 CecLの精製表

	タンパク質量	総活性	回収率	比活性	精製度
	(mg)	(THU)	(%)	(HU/mg protein)	(fold)
粗抽出液	57.2	64,000	-	1,120	1
CecL	0.375	40,000	62.5	107,000	95.5

観察された(図 3)。したがって、CecL は N結合型糖鎖を持つことがわかった。一方、ゲルろ過クロマトグラフィーにより相対質量数を測定したところ、67.4 kDa であった。CecL を還元条件下および非還元条件下で質量分析計に供した所、還元条件下では 28.3 および 24.8 k (m/z) に、非還元条件下では 56.6, 49.3 k (m/z) にピークが観測された(データ表示せず)。これらの結果から、CecL は分子間S-S結合を有する2量体として存在することがわかった。

CecLについてN末端アミノ酸配列分析を行った所、36kDaの成分では DGAEASSKE LXSE、31kDa の成分では DGNEAATXKELXSXGSESGA と決定された。これらの配列はお互いに非常に類似していることから、CecL はイソレクチンを含むことがわかった。

これまでに報告された刺胞動物のレクチンはわずかである。造礁サンゴでは、*Gerardia savaglia* (Kljajić et al, 1987)と今回の *C. echinata* のみであり、軟サンゴでは *Cerianthus membranaceus* (Koch et al, 1982), *Sinularia lochmodes* (Jimbo et al, 2000), *Lobophytum variatum* (Goto-Nance et al, 1996), *Sinularia sp.* (Goto et al, 1992) が報告されている。これらのうち、*Gerardia* レクチンはD-マンノース結合性であるが、その他はD-ガラクトース結合性である。一方、これらのレクチンのうち一次構造がわかっているもののアミノ酸配列はそれぞれ異なっており 分子量も様々である。すなわち、現在までに精製されたサンゴレクチンはサブユニットの分子量や糖結合性、アミノ酸配列が異なっていると考えられる。

サンゴの生活史における発現遺伝子の研究では、タキレクチン様遺伝子など様々なレクチン様遺伝子が見いだされている。*Acropora palmata* および *Montastrea faveolata* では、複数のレクチン様遺伝子が見いだされ、*S. lochmodes* レクチン SLL-2 と相同性を持つレクチン様遺伝子も見いだされている (Schwarz et al., 2008)。それにも関わらず1種のサンゴが

らは一つのレクチンしか精製されていないことから、サンゴは複数のレクチン遺伝子を持っているが主要なレクチンはひとつである可能性がある。同一の組織から種によって異なるグループに属すレクチンが見出されている例として、魚類の体表粘液レクチンがある (Suzuki et al., 2003)。魚類の体表粘液から精製されるレクチンはユリレクチンやCタイプレクチン、Rタイプレクチンなど様々なグループに属すレクチンが見いだされている。これらのレクチンの機能は生体防御と考えられていることから、その魚の生活環境に合わせて特定のレクチンを多く発現している可能性がある。サンゴの持つ主要なレクチンが共生に関与しているかは今後検討する必要がある。

S. lochmodes レクチン SLL-2 では、*Symbiodinium sp.* CS-156 株に対し、形態を球状のままに維持するが、増殖に影響を与えないことを明らかにした (Koike et al., 2004)。広島大学の小池らによると、近縁のサンゴである *Fungia cf. Fungites* から単離された株 FKM0207 株にレクチン CecL を添加して経時的に観察したところ、濃度依存的に遊泳細胞の割合が減少するとともに増殖も阻害された。この結果はSLL-2 の CS-156 株に対する影響とは異なっている。すなわち、CS-156 株では増殖に影響がなかったものの P082-3 株および JCUCS-1 株においては増殖が阻害された。従って、*Symbiodinium* の株の違いによりレクチンの作用が異なっていることが推定される。褐虫藻にはクレードと呼ばれる遺伝子を元にした分類が有り、種によって主に持っている *Symbiodinium* が異なることが報告されている。本研究で用いた *Symbiodinium* 株は、別の種から単離された株でクレードFに属すが、*C. echinata* が持つ *Symbiodinium* はクレード C である。したがって、FKM0207株は *C. echinata* と共生を維持できない可能性があるため、P082-3 や JCUCS-1 株の SLL-2 への反応と同様に、FKM0207株は CecL によって増殖が阻害されたのかもしれない。今後、*C. echinata* から単離された株を用いて CecL の増殖に対する影響を検討する必要がある。

謝 辞

本研究の一部は杉山化学研究所の研究助成の支援を得て行った。ここに記して御礼申し上げます。

参考文献

- 1 Bulgheresi, S., Schabussova, I., Chen, T., Mullin, N.P., Maizels, R.M., Ott, J.A., 2006. A new C-type lectin similar to the human immunoreceptor DC-SIGN mediates symbiont acquisition by a marine nematode. *APPL. ENVIRON. MICROB.* **72**, 2950-2956.
- 2 Fernández-Patrón, C., Castellanos-Serra, L., Rodríguez, P., 1992. Reverse-staining of sodium dodecylsulfate polyacrylamide gels by imidazole-zinc salts: Sensitive detection of unmodified proteins. *Biotechniques*. **12**, 564-573.
- 3 Goto, R., Muramoto, K., Yamazaki, M., Kamiya, H., 1992. Purification and Characterization of an Agglutinin of the Soft Coral *Sinularia* Species. *Dev.. Comp.. Immun.* **16**, 9-17.
- 4 Goto-Nance, R., Muramoto, K., Zempo, Y., Kamiya, H., 1996. Purification and Characterization of the Lectins of the Soft Coral *Lobophytum variatum*. *Fisher.. Sci.* **62**, 297-301.
- 5 Hirsch, A.M., 1999. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **2**, 320-326.
- 6 Jimbo, M., Koike, K., Sakai, R., Muramoto, K., Kamiya, H., 2005. Cloning and characterization of a lectin from the octocoral *Sinularia lochmodes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 157-162.
- 7 Jimbo, M., Yanohara, T., Koike, K., Sakai, R., Muramoto, K., Kamiya, H., 2000. The D-galactose-binding lectin of the octocoral *Sinularia lochmodes*: characterization and possible relationship to the symbiotic dinoflagellates. *COMP. BIOCHEM. PHYS. B.* **125**, 227-236.
- 8 Kljajić, Z., Schröder, H.C., Rottmann, M., Cuperlović, M., Movsesian, M., Uhlenbruck, G., Gasić, M., Zahn, R.K., Müller, W.E.G., 1987. D-mannose-specific lectin from *Gerardia savaglia* that inhibits nucleocytoplasmic transport of mRNA. *Eur.. J.. Biochem.* **169**, 97-104.
- 9 Koch, O.M., Lee, C.K., Uhlenbruck, G., 1982. Cerianthin lectins: a new group of agglutinins from *Cerianthus membranaceus* (Singapore). *Immunobiology.* **163**, 53-62.

- 10 Koike, K., Jimbo, M., Sakai, R., Kaeriyama, M., Muramoto, K., Ogata, T., Maruyama, T., Kamiya, H., 2004. Octocoral chemical signaling selects and controls dinoflagellate symbionts. *Biol. Bull.* **207**, 80-86.
- 11 Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
- 12 Laus, M.C., Logman, T.J., Lamers, G.E., Van Brussel, A.A.N., Carlson, R.W., Kijne, J.W., 2006. A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Mol. Microbiol.* **59**, 1704-1713.
- 13 Lin, K.L., Wang, J.T., Fang, L.S., 2000. Participation of glycoproteins on zooxanthellal cell walls in the establishment of a symbiotic relationship with the sea anemone, *Aiptasia pulchella*. *ZOOL. STUD.* **39**, 172-178.
- 14 Müller, W.E., Zahn, R.K., Kurelec, B., Lucu, C., Müller, I., Uhlenbruck, G., 1981. Lectin, a possible basis for symbiosis between bacteria and sponges. *J. Bacteriol.* **145**, 548-558.
- 15 Schwarz, J.A., Brokstein, P.B., Voolstra, C.R., Terry, A.Y., Miller, D.J., Szmant, A.M., Coffroth, M.A., Medina, M., 2008. Coral Life History and Symbiosis: functional genomic resources for two reef building Caribbean corals, *Acropora palmata* and *Montastraea faveolata*. *BMC. Genomics.* **9**, 97.
- 16 Suzuki, Y., Tasumi, S., Tsutsui, S., Okamoto, M., Suetake, H., 2003. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **136**, 723-730.
- 17 Wood-Charlson, E.M., Hollingsworth, L.L., Krupp, D.A., Weis, V.M., 2006. Lectin/glycan interactions play a role in recognition in a coral/dinoflagellate symbiosis. *Cell. Microbiol.* **8**, 1985-1993.