

学 位 論 文 要 旨

氏 名	リモ ビトリス
題 目	吹上海岸（南日本）松林に生育するキノコの2種のレクチンの特性 (CHARACTERIZATION OF TWO LECTINS FROM MUSHROOMS GROWING IN THE PINE FORESTS OF FUKIAGE SEA COAST-SOUTHERN JAPAN)

レクチンは免疫産物でないタンパク質あるいは糖タンパク質で、糖結合を介して細胞を凝集する、そして多糖類や複合糖質も凝集させる。レクチンは、血液型のタイピング、糖タンパク質の単離、炭水化物の構造研究、細胞、組織、生命体全体における糖構造に使用できることが分かっている。生物学的なレクチンの役割は細胞表面糖鎖に対するレクチンの結合の結果生じるものである。これまでいくつかの食用きのこからのレクチンが詳しく調べられているがそれらの役割についてははっきりしていない。そのため、生物学的な役割を知る上でまず物理化学的性質や分子構造を知ることが重要である。本研究では、キノコムラサキナギナタタケとウラムラサキのレクチンの精製と性質を明らかにした。二種のキノコは野生で食可能とされているが一般には食べられていない。それらは南日本、吹上浜の海岸松林に春と秋に生育する。

ウラムラサキレクチン (LAG) とムラサキナギナタタケレクチン (CpL) は asialofetuin 固定カラムと BSM 固定カラムを用い、1段階のアフィニティクロマトグラフィで均一に精製し、それぞれ115倍と160倍の精製度を示し、収量は54.82%であった。それぞれ、native, SDS-PAGE で単一バンドを示した。TOFMS では LAG は 17589, CpL は 15900 にピークを示した。ゲルろ過では 35K、32K にピークを示し、どちらも同じ分子量のサブユニットが共有結合しないで会合していると推定された。LAG は O-結合型の糖タンパク質とそれらのアシアロ体で強く阻害されたが、CpL は O-結合型、N-結合型のどちらでも阻害された。

LAG はガレクチンされるものであった、それはガレクチンの糖結合ドメインに共通の RVNWER 配列をもつためである。LAG の全アミノ酸配列はオオキツネタケのガレクチンとは 75.6%一致した、ヤナギマツタケ属、ヒトヨタケのものには、35-65%の一致が認められた。CpL は 2カ所の QXW 配列をもつことからリシンスーパーファミリーのドメインに相同性をもつことが分かった。SGNP の結果から CpL は α -galactosyl 結合糖鎖に親和性を示し、特に Gal α 1-3Gal とラフィノースを強く認識した。これらレクチンの利用が期待される。

学 位 論 文 要 旨

氏 名 Lyimo Beatrice

題 目 CHARACTERIZATION OF TWO LECTINS FROM MUSHROOMS GROWING
IN THE PINE FORESTS OF FUKIAGE SEA COAST-SOUTHERN JAPAN
(吹上海岸 (南日本) 松林に生育するキノコの2種のレクチンの特性)

Lectins are proteins or glycoprotein of non-immune origin, which are capable of agglutinating cells through sugar-specific binding sites and thus agglutinate polysaccharides and glycol-conjugate. Lectins are known to play roles in blood typing, isolation of glycoproteins, structural studies of carbohydrates, identification of glycosylated structures at the level of cells, tissues and the whole organisms. The biological role of lectins is a consequence of their carbohydrate-binding site which can bind to the cell surface glycans. Lectins from several edible mushrooms have been studied in detail but their biological and physiological roles remains uncertain. It is therefore important to know physicochemical properties, and molecular structure of the lectins to explore their physiological and biological roles. In this dissertation purification and characterization of lectin from mushroom *C. purpurea* and *L. amethystina* is described. *L. amethystina* and *C. purpurea* mushroom are wild but edible mushrooms though generally not considered a choice edible. They bloom during spring and autumn at the coastal pine forests of Fukiage beach, Southern Japan. *L. amethystina* Lectin (LAG) and *C. purpurea* lectin (CpL) were purified to homogeneity in a single step by affinity chromatography on asialofetuin immobilized column and BSM-formyl cellulose column respectively, with 115-160-fold with final recovery of 54-82%. The pure LAG and CpL migrated as a single band in native as well SDS-PAGE indicating homogeneity. The MW of LAG and CpL determined by MALDI TOFMs showed a main peak at m/z 17589.55 Da and 15900 Da respectively. The MM determined by gel filtration is 35KDa for LAG and 32KDa for CpL indicating that, they are made up of two identical subunits which are held noncovalently. While LAG was highly inhibited by O-linked glycoproteins and their asialo counterpart, CpL was inhibited by both N- and O-glycoproteins. LAG is classified as a galectins because its amino acid sequence contains RVNWER residues which are common for carbohydrate recognition domain (CRD) of galectins. The AA sequence of LAG shows high homology with those of the same genus, at 75.6 % identity to *L. bicolor*, and 35.5 - 65.0 % to galectins of *Agrocybe* spp and *Coprinopsis cinerea*. Partial sequences of CpL composed of two repeating sub-domains (QXW) suggested a similarity to the ricin super family domain that may have originated from an ancestry galactose binding motif. SGNPs results demonstrated the preference of CpL towards α -galactosyl sugar chains. CpL recognized Gal α 1-3Gal and raffinose. The use of these lectins are anticipated in future.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	Lyimo Beatrice
審査委員	主査 鹿児島大学農学部 教授 八木史郎
	副査 鹿児島大学農学部 准教授 南 雄二
	副査 佐賀大学農学部 教授 光富 勝
	副査 佐賀大学農学部 教授 渡邊啓一
	副査 鹿児島大学連合大学院 教授 杉元康志
審査協力者	
題 目	<p>Characterization of two lectins from mushrooms growing in the pine forests of Fukiage sea coast – southern Japan</p> <p>(吹上海岸 (南日本) 松林に生育するキノコの2種のレクチンの特性)</p>
<p>レクチンは自然界に広く分布する糖鎖を認識するタンパク質である。そして血液型のタイピング、糖タンパク質の単離、炭水化物の構造研究、細胞、組織、生命体全体における糖鎖構造解析に使用できることが分かっている。生物学的なレクチンの役割は細胞表面糖鎖に対するレクチンの結合の結果生じるものである。これまでいくつかの食用きのこからのレクチンが詳しく調べられているがそれらの生理的役割についてははっきりしていない。生物学的役割や利用を考える上で、まず物理化学的性質や分子構造ならびに糖結合特異性を知ることが必要である。本研究では、吹上浜の海岸松林に春と秋に生育する2種のキノコ、ムラサキナギナタタケとウラムラサキの子実体からレクチンを精製しそれらの性質を明らかにした。</p> <p>ウラムラサキレクチン (LAG) とムラサキナギナタタケレクチン (CpL) はBSM固定カラムと asialofetuin 固定カラムを用い、1段階のアフィニティクロマトグラフィで精製し、それぞれ115倍と160倍の精製度を示し、収率は</p>	

54 および 82%であった。それぞれ、native-PAGE, SDS-PAGE で単一バンドを示した。TOF-MS では LAG は 17,589, CpL は 15,900 にピークを示した。ゲルろ過では 35K、32K にピークを示し、どちらも同じ分子量のサブユニットが共有結合しないで会合していると推定された。LAG は *O*-結合型の糖タンパク質とそれらの asialo 体で強く阻害されたが、CpL は *O*-結合型、*N*-結合型糖鎖のどちらでも阻害された。

LAG はタンパク質の一次構造と cDNA 配列を決定した結果、糖結合ドメインに保存されているアミノ酸残基 Arg, Val, Asn, Trp, Glu, Arg をもつガレクチンに属するものである。ヒトでは 12 種のガレクチンが報告されていてその生理的機能も解明されてきた、しかし植物には報告されておらず、菌類では LAG 以外ではヤナギマツタケ、ヒトヨタケのガレクチンの性質が報告されているだけであった。LAG の糖結合特異性は他の菌類ガレクチンとは異なるものであり関心がもたれている。LAG の全配列はオオキツネタケのガレクチンとは 75.6%一致したがヤナギマツタケのガレクチンとは 35%の相同性しか示さなかった。CpL は部分配列を解析した結果 2 カ所に QXW 配列をもつことからリシンスーパーファミリーのドメインに相同性をもつことが分かった。CpL に対しコロイド金結合糖鎖をもちいたレクチンの糖結合特異性の解析を試み、他の方法と比較して感度も高く、少量の貴重な糖鎖で解析できることを示した。さらに α -galactosyl 結合糖鎖に親和性を示し、特に Gal α 1-3Gal と raffinose を強く認識し、 β 結合をもつ乳糖に比較した時、数 1,000 倍の差を示し、 α -galactosyl を含む糖鎖の認識に使用可能と考えられた。

以上のように、本研究においては 2 種のキノコレクチンを精製し、それらのタンパク質としての特性および糖結合特異性を明らかにした。LAG はガレクチンであり今後の菌類ガレクチンの研究応用への基礎的な知見を得るとともに *O*-結合型糖鎖に対しての利用が期待される。一方 CpL は RIP タイプのレクチンであり α -galactosyl 基を有する糖鎖に対し従来のレクチンとは異なった特異性を示し、今後の応用の可能性を明らかにした。これらの結果は、タンパク質化学的にも新規な知見を示し、本論文が博士（農学）として十分に価値あるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者氏名	Lyimo Beatrice
審査委員	主査 鹿児島大学農学部 教授 八木史郎
	副査 鹿児島大学農学部 准教授 南 雄二
	副査 佐賀大学 農学部 教授 光富 勝
	副査 佐賀大学 農学部 教授 渡邊啓一
	副査 鹿児島大学連合大学院 教授 杉元康志
審査協力者	
実施年月日	平成 24年 1月 19日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)	
<input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成24年1月19日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	Lyimo Beatrice
<p>[質問 1] LAG配列RVNWERが糖結合ドメインにあるとの説明であったが、それは誤りではないのですか？</p> <p>[回答 1] 配列ではなく糖結合ドメインに存在するアミノ酸残基がArg, Val, Asn, Trp, Glu, Argの順に認められるということであって、連続して配列として存在する訳ではない。</p> <p>[質問 2] LAGのcDNAの計算分子量とTOF-MSでの値は一致しますか？</p> <p>[回答 2] LAGのEdman 分解で得た配列からの計算値とTOF-MSの値が一致していてcDNAの値とは約10の差がある。</p> <p>[質問 3] LAGは分泌タンパク質ではないですか？シグナル配列は認められませんか？</p> <p>[回答 3] 分泌タンパク質ではなく、シグナル配列は存在しない。</p> <p>[質問 4] LAGの局在部位は、シグナル配列をもたないのならどこになりますか？</p> <p>[回答 4] 正確にはわかりませんが、cytosolの可能性が高いです。</p> <p>[質問 5] N末端残基のアミノ酸は何であったのですか？</p> <p>[回答 5] Valineから始まっています。</p> <p>[質問 6] 電気泳動の写真で1はsmearバンドを示しているがisolectinとの関係は？</p> <p>[回答 6] Native PAGEであるので、これを根拠にしている訳ではなく、配列上で2つのペプチドが得られたことを根拠にしています。</p> <p>[質問 7] isolectinの割合とそれらを分離する試みは行いましたか？</p> <p>[回答 7] minorなものはprotein sequencer では25%と算出されました。分離はイオン交換クロマトグラフも行ったことがあるがそれでは分けることが出来ませんでした。</p> <p>[質問 8] CpLとSGNPの相互作用の図がよく分かりません。最初から凝集しているように見えますが、分散しているのですか？</p> <p>[回答 8] 凝集している訳ではなく、解離分散しています。</p> <p>[質問 9] SGNPは自分で作成したのですか？</p> <p>[回答 9] Sudxという会社が販売しているものです。</p> <p>[質問 10] CpLはricin-typeということですが、毒性はありますか？</p> <p>[回答 10] ricin super familyですが毒性はないと思われます。</p> <p>[質問 11] CpLの結合部位について、いくつありますか？ MOAと比較すると分子量が半分ぐらいですが？</p> <p>[回答 11] 1 subunit に1つはありますが、繰り返し構造をもっている可能性がありますので複数あっても不思議ではありません。全配列が明らかではありませんので不明です。</p>	