

シバフタケとアフリカパンノキの新規レクチンに関する研究

- 一次構造と糖結合特異性 -

下川 倫子

2015

目次

第一章	序論	1
第二章	本産シバフタケ (<i>Marasmius oreades</i>)	
	GNA 様レクチンの精製と諸性質	
第一節	緒言	7
第二節	実験材料および実験方法	9
2-1	実験材料	9
2-2	使用試薬	9
2-3	使用菌株およびプラスミド	9
2-4	培地	10
2-5	糖タンパク質の調製	10
2-6	粗レクチンの調製	11
2-7	アフィニティーカラムを用いたレクチンの精製	11
2-8	プロテアーゼを用いた酵素消化	11
2-9	逆相液体クロマトグラフィー (RP-HPLC)	12
2-10	アミノ酸配列解析	13
2-11	ゲノム DNA の抽出	13
2-12	ゲノム DNA 断片の増幅	13
2-13	トータル RNA の抽出	14
2-14	cDNA の合成	14
2-15	3'-RACE	14
2-16	5'-RACE	15
2-17	TA クローニング	16
2-18	塩基配列解析	16
2-19	組み換え体の発現	17
2-20	分子量	17
2-21	タンパク質の定量	18
2-22	赤血球浮遊液の調製	19

2-2 3	血球凝集活性	20
2-2 4	血球凝集活性阻害 (糖阻害)	20
2-2 5	グリカンアレイ	21
2-2 6	温度安定性	21
第三節	実験結果	24
3-1	シバフタケレクチン(MOL)の精製	24
3-2	MOL のアミノ酸配列解析	25
3-3	塩基配列の決定	25
3-4	組み換えシバフタケレクチン (rMOL) の精製	30
3-5	rMOL のアミノ酸配列	30
3-6	分子量	30
3-7	血球凝集活性	31
3-8	糖結合特異性	31
3-9	温度安定性	32
第四節	考察	38
第五節	結論	43
第六節	小活	43

第三章 アフリカパンノキ(*Treculia africana*)種子由来

2種類のジャカリン近縁レクチンの精製と諸性質

第一節	緒言	45
第二節	実験材料および実験方法	47
2-1	実験材料	47
2-2	使用試薬	47
2-3	糖タンパク質の調製	48
2-4	粗レクチンの調製	48
2-5	アフィニティーカラムを用いたレクチンの精製	49

2-6	Native PAGE	50
2-7	分子量	50
2-8	タンパク質の定量	50
2-9	中性糖の定量	51
2-10	赤血球浮遊液の調製	51
2-11	血球凝集活性	51
2-12	血球凝集活性阻害 (糖阻害)	51
2-13	プロテアーゼを用いた酵素消化	52
2-14	RP-HPLC	52
2-15	アミノ酸配列解析	53
2-16	酵素結合免疫吸着検査法 (ELISA)	53
2-17	グリカンアレイ	54
2-18	モデリング	54
第三節	実験結果	56
3-1	アフリカパンノキレクチンの精製	56
3-2	Native PAGE	58
3-3	分子量	59
3-4	アミノ酸配列解析	62
3-5	中性糖の定量	66
3-6	ELISA	66
3-7	糖結合特異性	67
第四節	考察	71
第五節	小活	75
第四章	総括	76
	参考文献	81
	謝辞	96

第一章 序論

レクチンの研究は Stillmark [1]が 1888 年に、ヒマ(*Ricinus communis*)種子の抽出液中に毒性が高く、血球凝集活性を持つタンパク質・リシン [2]を発見したことにより始まった。Landsteiner と Raubitschek [3]は 1908 年に、植物種子の抽出液に含まれる血球凝集活性は、動物種によって異なった反応を示し、血液凝集素による血球凝集活性には特異性があることを明らかにした。Sumner [4]は 1919 年に、タチナタマメ(*Canavalia ensiformis*)由来の血球凝集活性を持つタンパク質・コンカナバリン A(ConA)を結晶化し、Howell [5]との共同研究により 1936 年に、ConA が赤血球だけでなく酵母やグリコーゲンまでも沈殿させること、また血球凝集活性がスクロースによって阻害されることを明らかにし、血球凝集活性は赤血球表面の糖鎖と植物抽出液に含まれる凝集素間の特異的な反応によって起こると示唆した。Renkonen [6]と Boyd [7]は 1948 年と 1949 年に、各種植物抽出液の血液型特異的凝集活性を検索し、それらの相違を相次いで報告した。Boyd と Schpleigh [8]は 1954 年に、植物抽出液に含まれる血球凝集素がヒト血液型を識別することを見出し、血球表面の糖鎖構造を見分けることから、ラテン語の“選び出す(*legere*)”になぞらえてこれらを、レクチン(*lectin*)と呼ぶことを提唱した。1970 年代以降、レクチンの細胞生物学的応用についての関心が高まり、研究対象を植物だけでなく、細菌、カビ、無脊椎動物の体液、哺乳動物の組織など、あらゆる生物種からレクチン様物質が見出されるようになった。

レクチンの定義は、Goldstein ら[9]が最初に 1985 年に発表した「レクチンと

は糖と相互作用するタンパク質あるいは糖タンパク質のことで、細胞や複合体を凝集させるが免疫学的産物（免疫により産生させた糖結合抗体）ではないものを言う。そこでレクチンは少なくとも2個以上の糖結合サイトを持ち、動物あるいは植物細胞を凝集させたり、多糖、糖タンパク質、糖脂質を沈降させる性質があり、それらの活性は単糖あるいはオリゴ糖などにより阻害されなければならない」提唱に基づいていた。しかし、Barondes [10]は1988年に、レクチンが糖結合サイト以外に機能性ドメインを持つこともあり、また糖結合サイトがひとつでもレクチンと称して良いのではないかと再定義している。その代表例はリシンである。リシンはレクチンでありながら *N*-グリコシダーゼ活性 [11]を持つために、その毒性が発現するという作用機構が報告された。酵素活性部位を保有するレクチンとしては、その後シバフタケレクチン(MOA)もプロテアーゼ活性を持つことが明らかにされた [12]。また、多糖分解酵素では基質以外の糖鎖が阻害剤となれば、レクチン活性を有する可能性もあり、現在ではこのような酵素活性を有するタンパク質もレクチンと分類されている [13]。

レクチンの機能については、Ashwell ら[14]が肝細胞のガラクトース識別タンパク質による、タンパク質の品質管理について最初に発表し、その後豆科レクチンと類似構造を持つL-タイプレクチン[15]やマンノース-6-リン酸結合性を持ち、細胞内での輸送機構に関わるP-タイプレクチン[16]などが明らかにされた。しかし、糖鎖は生物界に普遍的に分布するものであり、レクチンの機能はそれ以外にも多くの役割が明らかにされつつある[17]。

糖鎖はDNAやタンパク質に続く第三の生命鎖として、現在注目を集める物質である。糖鎖の機能解析や構造解析は、DNAやタンパク質に比べて複雑か

つ多様な糖鎖構造をとるために困難をきわめている。この難題に向けて、レクチンは多様な糖鎖構造に結合できるタンパク質であることを利用し、複合糖質の単離や構造研究、細胞膜やオルガネラ膜の糖鎖研究、糖結合特異性を利用した診断や治療への応用など、生物学、医学の分野における応用が行われている。そのため現在もなお、新しい糖結合特異性をもつもの、特異性の高いものなどが求められている。それに伴い、レクチンの研究は近年のグリカンアレイ[18, 19]を用いる方法や、応用ではレクチンアレイ[20, 21]などの新しい方法も開発され、ますます糖鎖研究への熱は加速している。そして、次々と見出される新しい糖結合特異性を持つレクチンに対して Goldstein は「物語はまだ終わりではない」と述べている[22]。

植物のレクチンは、レクチン研究の中でも最も研究の歴史が古く、豆科植物からの ConA をはじめとして現在多くのものが市販されている。現在もなお新しいレクチンが植物から単離され、その数は増え続けている。植物レクチンファミリー[23]の分類において、1998 年までは、豆科植物レクチン、アマランサスファミリー(Amarantin)、リシンタイプレクチン(Ricin)、ジャカリン近縁レクチン(Jacalin)、単子葉植物マンノース結合レクチン(GNA)、ウリ科植物レクチン(Nictaba)、ヘベインタイプレクチン(Hevein)の7種類のファミリーに分類していた。その後の研究により Van Damme ら [13]は、2008 年に DNA データベースから高等植物ではこれに Class V chitinase homologs with lectin activity (CRA)、セイヨウマユミレクチン (EUL)が加わり計9種類のファミリーとなっている。さらに、苔類ではマッシュルーム凝集素 (ABA)タイプのレクチンファミリーが、また苔類、ヒカゲノカズラ植物門やシダ植物門ではシアノピリン

(Cyanovirin)のファミリー が加わり、リジンモチーフをもつ LysM 配列は多くの植物群に認められ、現在では、合計 12 種類のレクチンファミリーが提唱されている (Table 1-1)。植物レクチンとは対照的に、菌類のレクチンの全体像はそれほど明確ではない。なぜならば、菌類は 10 万種近く同定されているが、実数は 50 万以上あると推定されており [24]、未同定のキノコが多く存在すること、また菌類の DNA のバーコーディングでは、2012 年に各リボソームをコードする遺伝子の間に存在する ITS 領域をバーコード領域として正式に採用したため、キノコの分類が現在大きく変わろうとしていることも全体像がはっきりしない一因である。キノコは、国内には 1 万 2 千種が分布すると見積もられていて、キノコ子実体の少なくとも半数近くがレクチンを含むと考えられている [25-28]。しかし、現在までに一次構造が決定されたキノコレクチンの数は、植物レクチンの 10 分の 1 以下と推定されている。キノコレクチンの歴史としては、Ford [29]の研究が 1910 年に報告され、その後、1970 年代にマッシュルームレクチンなどがタンパク質としての性質や糖結合特異性が明確に報告された。さらに、植物レクチンとは全く異なる L-フコース特異的な β -プロペラ構造を持つヒイロチャワンタケレクチン(AAL)[30]や免疫調節タンパク質であるマンネンタケレクチン(LZ-8)の一次構造が報告されている[31]。現在では構造上、少なくとも 6 種類のファミリー[32]が分かっている。Table 1-1 に示す植物の遺伝子からは、キノコレクチンの候補として LysM などが含まれる可能性はあるが、今後の研究が待たれる。

このような背景の中、本研究は「レクチンの糖鎖認識能に注目し、新たなる糖鎖研究ツールの発見」を目的とし、様々な植物、動物、キノコから新規レク

チンの探索を行った。探索の結果、新規な日本産シバフタケ子実体由来 GNA 様レクチンとアフリカパンノキ種子由来ジャカリン近縁レクチンを見出した。

本研究は、これらのレクチンの単離および糖結合特異性や一次構造などの諸性質について記したものである。特に、日本産シバフタケレクチン MOL の発見により植物のマンノース認識レクチンのファミリー (GNA 様レクチン) をキノコレクチンのグループに新たに加え、7 グループとなることを示した (Table 1-2)。

本研究で得られた知見が糖鎖研究への応用を始め、人類の健康のための生命科学に貢献することを期待する。

Table 1-1. Taxonomic distribution of lectin domains in Viridiplantae

Taxonomic Family	被子植物	裸子植物	シダ植物		コケ類		緑藻
	Angiosperms	Gymnosperms	Fern	Lycophytes	Mosses	Liveworts	Chlorophyta
ABA					(○)	○	
Amarantin	○	○		○			
CRA	○						
Cyanovirin			○	○			
EUL	○	○	○	○	○	○	
GNA	○	○	○	○	○	○	
Hevein	○	○	○	○	○	○	○
Jacalin	○	○	○	○	○		
Legume	○	○	○	○	○	○	○
LysM	○	○	○	○	○	○	○
Nictaba	○	○	○	○	○		
Ricin-B	○					○	

○ : Present, (○) : Possibly present

Table 1-2. Families of lectins from fungi

Type	Fungi	Animal	Plant
Jacalin-related	<i>Grifola</i>	○	○
RIP	<i>Marasmius</i>		○
Immunomodulatory	<i>Ganoderma</i>	○	
Galectin	<i>Coprinus , Agrocybe</i>	○	
ABA	<i>Agaricus</i>		○
β -propeller	<i>Aleuria, Aspergillus</i>		
GNA-like	<i>Marasmius</i>		○

Others (*Lyophyllum* [33], *Pholiota* [34])

第二章 日本産シバフタケ(*Marasmius oreades*) GNA 様レクチンの精製と諸性質

第一節 緒言

レクチンとは非免疫起源の糖鎖結合タンパク質であり、糖鎖と相互作用して細胞凝集、多糖や複合多糖の沈降などの生理活性を示す[35]。レクチンはウィルスや微生物、植物や動物に至るまで幅広い生物種に存在しており、生理学的に重要な役割を持っていることが示唆される。レクチンについては多くの生物学的機能が詳細に解明され、様々な生物学または生物医学への応用に使用されている。これまでに分離されたキノコ由来の多くのレクチンには、細胞分裂促進作用や抗増殖作用、抗がん作用、抗ウィルス作用、免疫刺激機能などを含む多くの機能性が発見されている[28]。

Goldstein と Winter [32]はキノコレクチンには配列相同性と特異性をもとに、少なくとも6種類のファミリー(真菌類免疫調節タンパク、ガレクチンファミリー、マッシュルームレクチン(CXL)ファミリー、リシンファミリー、 β -プロペラ構造ファミリー、ジャカリン近縁レクチンファミリー)があると報告している。さらに、これまで解析されてきたアミノ酸配列をもとに、2つのレクチンファミリーが存在すると推測されている。一つは、単子葉植物マンノース結合レクチンファミリー、もう一つはハタケシメジレクチン(LDL) [33] タイプのレクチンである。単子葉植物マンノース結合型レクチンファミリーのモチーフ配列はニホンコウジカビ [36]を含むいくつかの真菌類より報告されており、ペプチド断片の配列から子囊菌門からのキシロース結合型レクチン[37]もこのタイプと推測された。一方、LDL は今までに報告されているレクチンとの配列相同性は示

さなかつた。

Kruger ら[38]は 2002 年に食用可能で、ヨーロッパやアメリカで一般的によく見かけられるキノコであるアメリカ産シバフタケから *M. oreades agglutinin* (MOA)を分離し、性質決定を行った。MOAは強いヒト B 型血球凝集活性を持ち、Gal α 1-3Gal に対して強い相互作用を示した。Yagi ら[26]はある種のキノコレクチンの多様性は地理的な位置に相関性があると報告している。これより、日本産シバフタケにアメリカ産シバフタケと同様のレクチンが存在するか、予備調査を行った。その結果、日本産シバフタケ抽出液には MOA とは異なるレクチンが含まれていることを確認した。

本章では、日本産シバフタケに含まれる血球凝集素の単離、性質決定、全塩基配列の決定、大腸菌で発現させた組み換え体についての結果について述べる。

第二節 実験材料および実験方法

2-1 実験材料

シバフタケ子実体は 2011 年 6 月、慈眼寺公園（鹿児島）で自生しているシバフタケを採取した。シバフタケは使用するまで -80°C で保存した。

2-2 使用試薬

CNBr-activated Sepharose 4B は Amersham Biosciences 社より購入した。アシアロフェチュイン-セファロース 4B カラムは製品マニュアルに従い、CNBr-activated Sepharose 4B にアシアロフェチュインをカップリングして調製した。糖や糖タンパク質は Sigma-Aldrich 社製のものを使用した。ウサギ保存血液は日本バイオテスト研究所より購入した。その他の試薬は明示しない限り、和光純薬工業社製およびナカライテスク社製の特級試薬を使用した。

2-3 使用菌株およびプラスミド

クローニングで用いる宿主に大腸菌 JM109 株および大腸菌 BL21(DE3)株を使用した。またサブクローニングおよびシークエンスの際のプラスミドベクターとして pGEMT (Promega 社製) を使用し、発現ベクターとして pET-3a (Novagen 社製) を使用した。

2-4 培地

大腸菌の培養には LB 培地を用い、平面培地には LB 培地に 1.5%の寒天を加えたものを使用した。また組換え体には、必要に応じてアンピシリンを終濃度が 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。形質転換には液体培地として SOC 培地を使用した。また、培地および機器等の滅菌が必要なものにはオートクレーブ (121 $^{\circ}\text{C}$ 、20 分)を行った。

2-5 糖タンパク質の調製

(1) アシアロ化糖タンパク質

糖鎖末端にシアル酸が付加している糖タンパク質 (0.2 g)を 0.1 M 硫酸に溶解し、80 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間加熱した。加熱後、水酸化ナトリウムで中和し、蒸留水で透析後、凍結乾燥した。

(2) ウズラ由来の糖タンパク質

Koga らが示す方法に従い、ウズラオボアルブミンとウズラオボムコイドを精製した[39, 40]。

(3) ニワトリ由来の糖タンパク質

Koga らが示す方法に従い、ニワトリオボアルブミンとニワトリオボムコイドを精製した[39, 40]。

2-6 粗レクチンの調製

シバフタケ子実体 (100 g)を氷冷した 10 倍量のリン酸緩衝食塩水 (PBS)、pH 7.5 中で摩砕した。その後、低温室にて一晩抽出し、抽出液をガーゼで濾過し、濾液を遠心分離 (10,000g、20 分、4°C) した。遠心上清に硫酸アンモニウムを加えて飽和塩析し、さらに遠心分離 (15,000g、20 分、4°C) して沈殿を回収し、0.5 M NaCl を含む PBS に溶解して粗レクチン溶液とした。

2-7 アフィニティーカラムを用いたレクチンの精製

0.5 M NaCl を含む PBS で平衡化したアフィニティーカラム・アシアロフェチュイン-セファロース 4B (ϕ 1.5 × 12 cm)に同緩衝液に溶解した粗レクチン溶液を供した。0.5 M NaCl を含む PBS で非吸着画分を洗浄し、カラムに吸着したタンパク質を 0.5 M NaCl を含む 0.2 M グリシン塩酸塩 (pH 2.5) で溶出した。溶出画分は 2 M のトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)で直ちに中和した。

2-8 プロテアーゼを用いた酵素消化

(1) トリプシンによる酵素消化

レクチン(4.0 nmol)を 100 μ L の 50 mM 炭酸水素ナトリウム(pH 8.0)に溶解し、Sigma-Aldrich 社の TPCK 処理トリプシンと 1:50 (酵素 :基質、mol/mol) の割合で混合し、24 時間 37°Cで酵素消化を行った。

(2) キモトリプシンによる酵素消化

レクチン(4.0 nmol)を 100 μ L の 50 mM 炭酸水素ナトリウム(pH 8.0)に溶解し、Sigma-Aldrich 社の TLCK 処理キモトリプシンと 1:50 (酵素 :基質、mol/mol)の割合で混合し、24 時間 37°Cで酵素消化を行った。

(3) *Staphylococcus aureus* V8 プロテアーゼによる酵素消化

レクチン(4.0 nmol) を 100 μ L の 50 mM リン酸緩衝液(pH 7.8)に溶解し、和光純薬工業社の *S. aureus* V8 プロテアーゼと 1:50 (酵素 :基質、mol/mol)の割合で混合し、24 時間 37°Cで酵素消化を行った。

2-9 逆相液体クロマトグラフィー (RP-HPLC)

COSMOSIL 5 C18 MS-II カラム (ϕ 4.6 \times 250 mm、ナカライテスク社) を用い、RP-HPLC によって分離した。HPLC は日本分光社 PU-2080 型ポンプに日本分光社 UV-2070 型紫外可視検出器を接続したものをを用い、吸光度 220 nm により検出した。酵素消化断片の分離には Table2-1 に示す溶媒を使用した。

Table 2-1. HPLC system of COSMOSIL 5 C18 MS-II

Column	COSMOSIL 5 C18 MS-II
Column size	Φ4.6 \times 250 mm
Flow rate	1.0 ml/min
Solvent system	Solvent A: 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) Solvent B: 80% acetonitrile in 0.1% TFA
Elution gradient	Sol A: Sol B = (100: 0) \rightarrow (52: 48) in 60 min, linear gradient

2-1 0 アミノ酸配列解析

レクチンの N 末端側からのアミノ酸配列、および酵素消化後のアミノ酸配列決定には Procise 492 protein sequencer (Applied Biosystems 社製) を用いて行った [41]。

2-1 1 ゲノムDNAの抽出

子実体 (100 mg) から、DNeasy plant mini kit (Qiagen社製)を用いて製品マニュアルに従い、ゲノムDNAの抽出を行った。

2-1 2 ゲノムDNA断片の増幅

ゲノムDNA (70 ng/μL) を鋳型とし、DNA断片の増幅を行った。PCR法によるDNA断片の増幅にはTAKARA LA Taq Polymerase (タカラバイオ社製) を使用した。反応には、サーマルサークルーGeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems社製) を使用した。用いたプライマーは、日本産シバフタケレクチンのアミノ酸配列をもとにデザインした。96°C: 30秒、 52°C: 30秒、伸長72°C: 1分で25サイクル繰り返し行い、ゲノムDNAからMOLをコードする遺伝子特異的なMOL-F配列を手に入れた(Table 2-2)。

2-1 3 トータル RNA の抽出

子実体 (100 mg) から、RNeasy plant mini kit (Qiagen社製)を用いて製品マニュアルに従い、トータルRNAの抽出を行った。

2-1 4 cDNA の合成

トータルRNA (2 µg) を鋳型とし、逆転写酵素によるcDNAの合成を行った。逆転写反応にはReverTra Ace® qPCR RT kit (東洋紡社製)を用いた。反応には、サーマルサークラーGeneAmp PCR System 9700を使用した。プライマーは付属のoligo (dT)₂₀プライマーを使用した。反応条件は42°C: 20分で行った。

2-1 5 3'-RACE

Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 法は 3'-full RACE Core set (タカラバイオ社) を使用して行った。トータル RNA (1 µg) を鋳型として、付属の逆転写酵素 AMV Reverse Transcriptase XL と Oligo dT-3sites Adaptor プライマーを用いて 1st ストランド cDNA の合成を行った。合成した 1st ストランド cDNA を鋳型として、付属の 3sites Adaptor プライマーと日本産シバフタケ遺伝子特異的配列 MOL-F プライマー (Table. 2-2)を用いて PCR を行った。PCR 反応には、TAKARA LA Taq Polymerase (タカラバイオ社製) を用いた。反応には、サーマルサークラーGeneAmp PCR System 9700 を使用した。反応条件は 94°C: 30 秒、55°C: 30 秒、72°C: 2 分を 25 サイクル行った。

2-16 5'-RACE

RACE 法は 5'-full RACE Core set (タカラバイオ社) を使用して行った。トータル RNA (1 μ g) を鋳型とし、付属の逆転写酵素 AMV Reverse Transcriptase XL と 5'末端をリン酸化した MOL-RP プライマー (Table. 2-2) を用いて 1st ストランド cDNA の合成を行った。付属の RNase H を用いてハイブリッド RNA を分解し、T4 RNA Ligase を用いて一本鎖 cDNA を環化した。環化した一本鎖 cDNA を鋳型に、TAKARA LA Taq Polymerase とプライマー MOL-S1、MOL-A1 (Table. 2-2) を用いて 1st PCR 反応を行った。反応条件は 94°C: 3 分の変性後、94°C: 30 秒、60°C: 30 秒、72°C: 1 分で 25 サイクル行った。1st PCR 反応液を用いて、TAKARA LA Taq Polymerase とプライマー MOL-S2、MOL-A2 (Table. 2-2) を使用し 2nd PCR を行った。反応条件は 1st PCR と同様に行った。

Table 2-2. Primer design for cloning of *mol* gene

MOL-F	ATGCAGACAGATGGTAATTGCGTCGGTTAC
MOL-RP	5'-(P) CATTCAACGTTTGGCAG -3'
MOL-S1	GGACTGGGATTTGAACGGAGCGAATTCGAC
MOL-A1	CAACGGTCTCAGCAATTTAGTGGACCACGG
MOL-S2	GGAACGTTTCGTTATGACCAGTTGTGTAC
MOL-A2	CCGCCTTTGGCATAGACAACCAAGTTTCCG

2-17 TA クローニング

目的遺伝子の PCR 産物をアガロース電気泳動し、アガロースゲルからの DNA 断片の回収法により、PCR 産物を回収した。回収した PCR 産物と pGEMT ベクターをライゲーション溶液 Ligation Mighty Mix (タカラバイオ社製)を使用してライゲーション反応を行った。T ベクター内の遺伝子配列解析には、T7 プロモータープライマーまたは SP6 プロモータープライマーを用いた。

2-18 塩基配列解析

塩基配列を決定するため、Sanger らのジデオキシシークエンス法 [42]に基づいて、ABI PRISM 3130 ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems 社製) を用いて行った。ジデオキシサイクルシークエンシング反応は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社製) を用い、反応条件は添付のプロトコールに従った。シークエンス反応後、エタノール沈殿により試料を調製し、シークエンサーでの塩基配列解析を行った。解析後、塩基配列、アミノ酸配列の分析およびホモロジー検索に、遺伝子情報処理ソフト GENETIX-Mac Ver. 15 (GENETIX 社製)および、NCBI (National Center for Biotechnology Information)、DDBJ (DNA Date Bank of Japan)のデータベースを用いた。配列比較には ClustalW [43]を使用した。

2-19 組み換え体の発現

ゲノムDNAを鋳型とし、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (タカラバイオ社製) を用いて、PCR法によりレクチン遺伝子を増幅した。PCR産物と発現用ベクターpET-3aを制限酵素 *Nde* I (東洋紡社製) と *Bam*H I (東洋紡社製) で酵素消化した。制限酵素消化したPCR産物と発現用ベクターpET-3a (Novagen社製) をLigation Mighty Mixを使用してライゲーション反応を行った。目的遺伝子を含むpET-3aベクターを用いて、大腸菌BL21 (DE3) 株を形質転換し、アンピシリンを含むLB培地 (3 mL) で37°C、12時間培養した。生育した菌体を、アンピシリンを含むLB培地 (1 L) で培養後、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)により、12時間、25°Cで誘導し、10,000 g、20分、4°Cで集菌した。沈殿物をPBSに再懸濁し、細胞懸濁液を超音波破碎後、不溶性画分を遠心分離 (10,000 g、20 分、4°C) によって取り除いた。

2-20 分子量

(1)マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析 (MALDI-TOF MS)

Autoflex speed TOF/TOF-KG (Bruker Daltonics 社製) を用いて MALDI-TOF MS による質量分析を行った。マトリックスには 50% (v/v) アセトニトリル、0.1% (v/v) TFA を含む 10 mg/mL シナピン酸 (Sigma-Aldrich 社製) を用いた。レクチン 10 pmol/ μ L に希釈し、試料:マトリックス= 4:1 の割合で混合した。キャリブレーションには Protein calibration standard I (Bruker Daltonics 社製)

を使用した。

(2) SDS-PAGE

Tricine SDS-PAGE は Schagger と von Jagow [44] によって示された方法に従い、4%濃縮ゲルと 16.5%分離ゲルを用い、ゲル染色にはクマシーブリリアントブルー-R-250 を用いた。タンパク質マーカにはナカライテスク社の Broad range マーカーを使用した。

(3) ゲル濾過

HPLC を用いたゲル濾過分析には、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を使用し、TSKgel G2000SW (φ 7.5 × 300 mm)カラム (東ソー社) を用いて分子量を測定した (Table 2-3)。分子量マーカにはゲル濾過マーカキット・タンパク質・分子量 12,000-200,000 Da 用 (Sigma-Aldrich 社製) を使用した。HPLC は島津製作所 LC-10AS 型ポンプに昭和電工社 Shodex-UV41 型紫外分光検出器を接続したものをを用い、吸光度 280 nm により検出した。

Table 2-3. HPLC system of gel filtration

Column	TSKgel G2000SW
Column size	Φ7.5 × 300 mm
Flow rate	0.5 ml/min
Solvent system	Solvent : 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.0)

2-2 1 タンパク質の定量

タンパク質量は牛血清アルブミン(BSA)をスタンダードに用いた Lowry 法によって定量した[45]。

2-2 2 赤血球浮遊液の調製

(1) ウサギ赤血球の調製

ウサギ保存血液を遠心分離 (1,300 rpm、10 分、室温) し、上清に含まれる抗凝固剤 (アルセバー液) をピペッティングにより除去した。残った赤血球に 5 倍量の PBS を加えて懸濁した後、再度遠心分離 (1,300 rpm、10 分、室温) し、上清をピペッティングにより除去した。この操作を 4 回繰り返した後、得られた赤血球に PBS を加えて、4% (v/v) 赤血球浮遊液とした。

(2) トリプシン処理ウサギ赤血球の調製

ウサギ保存血液を遠心分離 (1,300 rpm、10 分、室温) し、上清に含まれる抗凝固剤 (アルセバー液) をピペッティングにより除去した。PBS に 4% になるようにウサギ赤血球を浮遊し、0.1% になるようにトリプシンを加え混合した後、37°C で 30 分間酵素消化した。酵素消化したウサギ赤血球を遠心分離 (1,300 rpm、10 分、室温) し、上清をピペッティングにより除去した。残った赤血球に 5 倍量の PBS を加えて懸濁した後、再度遠心分離 (1,300 rpm、10 分、室温) した。この操作を 4 回繰り返した後、得られた赤血球に PBS を加えて、4% (v/v) 赤血球浮遊液とした。

(3) トリプシン処理ヒト赤血球 (A 型、B 型、O 型) の調製

ヒト保存血液を遠心分離 (1,300 rpm、10 分、室温) し、上清に含まれる抗凝固剤 (アルセバー液またはヘパリン) をピペッティングにより除去し

た。PBS に 4% になるようにヒト赤血球を浮遊し、0.1% になるようにトリプシンを加え混合した後、37°C で 60 分間酵素消化した。酵素消化したヒト赤血球を遠心分離 (1,300 rpm、10 分、室温) し、上清をピペッティングにより除去した。残った赤血球に 5 倍量の PBS を加えて懸濁した後、再度遠心分離 (1,300 rpm、10 分、室温) した。この操作を 4 回繰り返した後、得られた赤血球に PBS を加えて、4% (v/v) 赤血球浮遊液とした。

2-2 3 血球凝集活性

血球凝集活性は PBS で連続 2 倍希釈したレクチン溶液 50 μ L にトリプシン処理した赤血球浮遊液 20 μ L を加えて総量 70 μ L で測定した。1 時間の室温インキュベート後、肉眼にて凝集を判断した。

2-2 4 血球凝集活性阻害 (糖阻害)

PBS で連続 2 倍希釈した単糖、オリゴ糖および糖タンパク質溶液 (25 μ L) に、PBS で titer 4 に調整したレクチン溶液 (25 μ L) を混合した。さらにトリプシン処理したウサギ赤血球浮遊液 20 μ L を加えて総量 70 μ L で測定した。1 時間の室温インキュベート後、肉眼にて凝集を判断した。血球凝集活性を完全に阻害する単糖、オリゴ糖および糖タンパク質溶液の最小濃度を血球凝集活性阻害として示した。単糖は L-アラビノース、L-フコース、D-ガラクトース、D-マンノース、L-ラムノース、D-キシロース、二糖はラクトースとラミナリビオースを使用した。糖タンパク質はウシ顎下腺ムチン (BSM)、ブタ胃ムチン (PSM)、フェチュイン、ウシ由来サイログロブリン、ブタ

由来サイログロブリン、アシアロ BSM、アシアロ PSM、アシアロフェチュ
イン、ウシ膵臓由来 RNase B、酵母マンナン、ニワトリアルブミン、ウズラ
アルブミン、ウズラオボムコイドを使用した。

2-25 グリカンアレイ

糖結合特異性分析は Tateno らの方法により行った[18]。Table 2-4 には、
グリカンアレイに使用した糖鎖を示した。

2-26 温度安定性

レクチン溶液を 30°C から 100°C まで 10°C 毎に、30 分間インキュベートし、
熱処理したレクチン溶液を氷冷後、残存活性を測定した。4°C で処理した血
球凝集活性を 100% として、各温度での活性を相対値で示した。

Table 2-4. Glycans used for glycan array

Number	Trivial name	Presentation	Glycans
1	aFuc	PAA	Fuc α 1-PAA
2	Fuc α 2Gal	PAA	Fuc α 1-2Gal β 1-PAA
3	Fuc α 3GlcNAc	PAA	Fuc α 1-3GlcNAc β 1-PAA
4	Fuc α 4GlcNAc	PAA	Fuc α 1-4GlcNAc β 1-PAA
5	H type1	PAA	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-PAA
6	H type2	PAA	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-PAA
7	H type3	PAA	Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA
8	A	PAA	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β 1-PAA
9	B	PAA	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β 1-PAA
10	Le ^a	PAA	Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-PAA
11	[3S]Le ^a	PAA	(3OSO ₃)Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-PAA
12	Le ^b	PAA	Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-PAA
13	Le ^x	PAA	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-PAA
14	Le ^y	PAA	Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-PAA
15	aNeu5Ac	PAA	Neu5Ac α 2-PAA
16	aNeu5Gc	PAA	Neu5Gc α 2-PAA
17	Sia2	PAA	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-PAA
18	Sia3	PAA	Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-PAA
19	3'SiaLe ^c	PAA	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-PAA
20	3'SL	PAA	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-PAA
21	3'SLN	PAA	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-PAA
22	sLe ^a	PAA	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-PAA
23	sLe ^x	PAA	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-PAA
24	6'SL	PAA	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc β 1-PAA
25	FET	Glycoprotein	Fetuin (Complex-type N-glycans and O-glycans)
26	AGP	Glycoprotein	α 1-acid glycoprotein (Complex-type N-glycans)
27	TF	Glycoprotein	Transferrin (Complex-type N-glycans)
28	TG	Glycoprotein	Porcine thyroglobulin (Complex and high-mannose-type N-glycans)
29	bGal	PAA	Gal β 1-PAA
30	[3S]bGal	PAA	(3OSO ₃)Gal β 1-PAA
31	A-di	PAA	GalNAc α 1-3Gal β 1-PAA
32	Lac	PAA	Gal β 1-4Glc β 1-PAA
33	Le ^c	PAA	Gal β 1-3GlcNAc β 1-PAA
34	[3'S]Le ^c	PAA	(3OSO ₃)Gal β 1-3GlcNAc β 1-PAA
35	LN	PAA	Gal β 1-4GlcNAc β 1-PAA
36	[3'S]LN	PAA	(3OSO ₃)Gal β 1-4GlcNAc β 1-PAA
37	[6S]LN	PAA	Gal β 1-4(6OSO ₃)GlcNAc β 1-PAA
38	[6'S]LN	PAA	(6OSO ₃)Gal β 1-4GlcNAc β 1-PAA
39	bGalNAc	PAA	GalNAc β 1-PAA
40	di-GalNAc β	PAA	GalNAc β 1-3GalNAc β 1-PAA
41	LDN	PAA	GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-PAA
42	GA2	PAA	GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-PAA
43	Asialo-FET	Glycoprotein	Asialo fetuin (Desialylated complex-type N- and O-glycans)
44	Asialo-AGP	Glycoprotein	Asialo α 1-acid glycoprotein (Desialylated complex-type N-glycans)
45	Asialo-TF	Glycoprotein	Asialo transferrin (Desialylated complex-type N-glycans)
46	Asialo-TG	Glycoprotein	Asialo porcine thyroglobulin (Desialylated complex-type N-glycans, high-mannose-type N-glycans)
47	β GlcNAc	PAA	GlcNAc β 1-PAA
48	[6 S]bGlcNAc	PAA	(6OSO ₃)GlcNAc β 1-PAA
49	Agalacto-Fet	Glycoprotein	Agalacto fetuin (Agalactosylated complex-type N- and O-glycans)
50	Agalacto-AGP	Glycoprotein	Agalacto α 1-acid glycoprotein (Agalactosylated complex-type N-glycans)

Table 2-4. Glycans used for glycan array (continued)

Number	Trivial name	Presentation	Glycans
51	Agalacto-TF	Glycoprotein	Agalacto transferrin (Agalactosylated complex-type N-glycans, high-mannose-type N-glycans)
52	OVM	Glycoprotein	Ovomucoid (Complex-type N-glycans)
53	OVA	Glycoprotein	Ovoalbumin (Hybrid-type N-glycans)
54	aMan	PAA	Man α 1-PAA
55	bMan	PAA	Man β 1-PAA
56	[6P]Man	PAA	(6OPO ₄)Man α 1-PAA
57	INV	Glycoprotein	Yeast invertase (High mannose-type N-glycans)
58	Tn	PAA	GalNAc α 1-PAA
59	Core1	PAA	Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA
60	Core2	PAA	Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α 1-PAA
61	Core3	PAA	GlcNAc β 1-3GalNAc α 1-PAA
62	Core4	PAA	GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α 1-PAA
63	Forssman	PAA	GalNAc α 1-3GalNAc β 1-PAA
64	Core6	PAA	GlcNAc β 1-6GalNAc α 1-PAA
65	Core8	PAA	Gal α 1-3GalNAc α 1-PAA
66	[3'S]Core1	PAA	(3OSO ₃)Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA
67	Galb-Core3	PAA	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3GalNAc α 1-PAA
68	Asialo-BSM	Glycoprotein	Asialo bovine submaxillary mucin (Tn)
69	Asialo-GP	Glycoprotein	Asialo human glycoporphin MN (T)
70	STn	PAA	Neu5Ac α 2-6GalNAc α 1-PAA
71	STn (Gc)	PAA	Neu5Gc α 2-6GalNAc α 1-PAA
72	ST	PAA	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA
73	Sia α 2-6Core 1	PAA	Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α 1-PAA
74	BSM	Glycoprotein	Bovine submaxillary mucin (Sialyl Tn)
75	GP	Glycoprotein	Human glycoporphin (Disialyl T and sialyl Tn)
76	aGal	PAA	Gal α 1-PAA
77	Gal α 1-2Gal	PAA	Gal α 1-2Gal β 1-PAA
78	Gal α 1-3Gal	PAA	Gal α 1-3Gal β 1-PAA
79	Gal α 1-3Lac	PAA	Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β 1-PAA
80	Gal α 1-3LN	PAA	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-PAA
81	Gal α 1-4LN	PAA	Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β 1-PAA
82	Melibiose	PAA	Gal α 1-6Glc β 1-PAA
83	aGlc	PAA	Glc α 1-PAA
84	bGlc	PAA	Glc β 1-PAA
85	Maltose	PAA	Glc α 1-4Glc β 1-PAA
86	HA	BSA	Hyaluronic acid-BSA
87	CSA	BSA	Chondroitin Sulfate A-BSA
88	CSB	BSA	Chondroitin Sulfate B-BSA
89	HS	BSA	Heparan Sulfate-BSA
90	HP	BSA	Heparin-BSA
91	KS	BSA	Keratan Sulfate-BSA
92	aRha	PAA	Rhamnose α 1-PAA
93	Mannan (SC)	Glycoprotein	<i>S. cerevisiae</i> mannan
94	Mannan (CA)	Glycoprotein	<i>C. albicans</i> mannan
95	Zymosan	Glycoprotein	Zymosan
96	Chitobiose	PAA	GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-PAA
97	BSA	BSA	-
98	Negative PAA	PAA	-
99	Marker		
100	BG		

第三節 実験結果

3-1 シバフタケレクチン (MOL) の精製

シバフタケレクチン (MOL) はシバフタケ子実体 (100 g) からアシアロフチュイン-セファローズ4Bカラムを用いて16.2 mg得られ、最終精製標品の比活性は1,480 titer/mg タンパク質であり、収率は75%であった (Fig. 2-1、Table 2-5)。

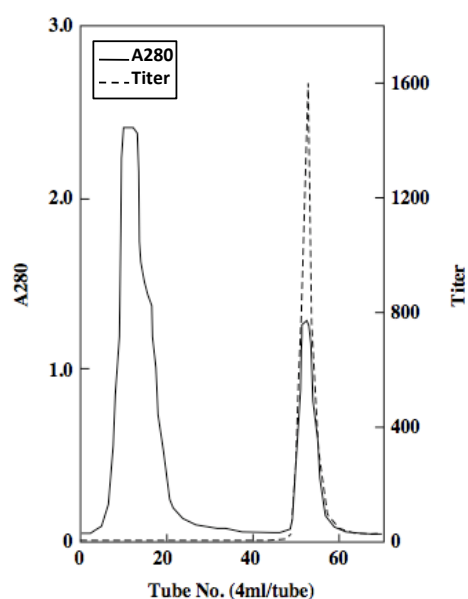


Fig. 2-1. Affinity chromatographic purification of MOL on asialofetuin-Sepharose 4B column.

The arrow indicated the starting position of elution with 0.2 M glycine-HCl containing 0.5 M NaCl, pH 2.5. Solid line, absorbance at 280 nm and broken line, hemagglutination activity.

Table 2-5. Purification of MOL

Purification step	Total activity (titer)	Total protein (mg)	Specific activity (titer/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	32,000	2,500	12.8	1	100
Asialofetuin sepharose 4B	24,000	16.2	1,480	115	75

3-2 MOLのアミノ酸配列解析

(1) N末端配列

MOLのN末端配列解析を行ったところ、N末端はブロックされていたため解析出来なかった。

(2) MOLの酵素消化断片配列

MOLを3種類のプロテアーゼ(トリプシン、キモトリプシン、*S. aureus* V8プロテアーゼ)を用いて酵素消化を行い、酵素消化断片のアミノ酸配列解析を行った。(Fig. 2-2、Fig. 2-4) MOLのキモトリプシン酵素消化断片の一つのペプチド配列はSYVHPYGSTLPENGであった。

3-3 塩基配列の決定

3'-RACE、5'-RACEを用いて塩基配列の決定を行った(Fig. 2-3、Fig.2-4)。この結果、日本産シバフタケレクチン遺伝子(*mol*)はORF 360 bpからなり120残基のアミノ酸をコードし、計算分子量13,103 Daであることが示唆された(GenBank™ accession number AB 649027)。また、DNAデータベースから決定された塩基配列をもとに既知のアミノ酸配列と相同性検索を行ったところ、ゼニゴケ由来スノードロップ凝集素(GNA)様タンパク質[46]、トウモロコシ由来マンノース結合型レクチン[47]、西洋ネギ由来マンノース結合型レクチン[48]、オニノヤガラ由来抗真菌性タンパク(NCBI accession number AAG53445)、オウシュウトウヒ由来マンノース結合型レク

チン (NCBI accession number AAZ30388)、放線菌 *Segniliparus rugosus* 由来マ
 シノース結合型レクチン (NCBI accession number ZP_07963966) と高い相同
 性を示した (Fig. 2-5)。

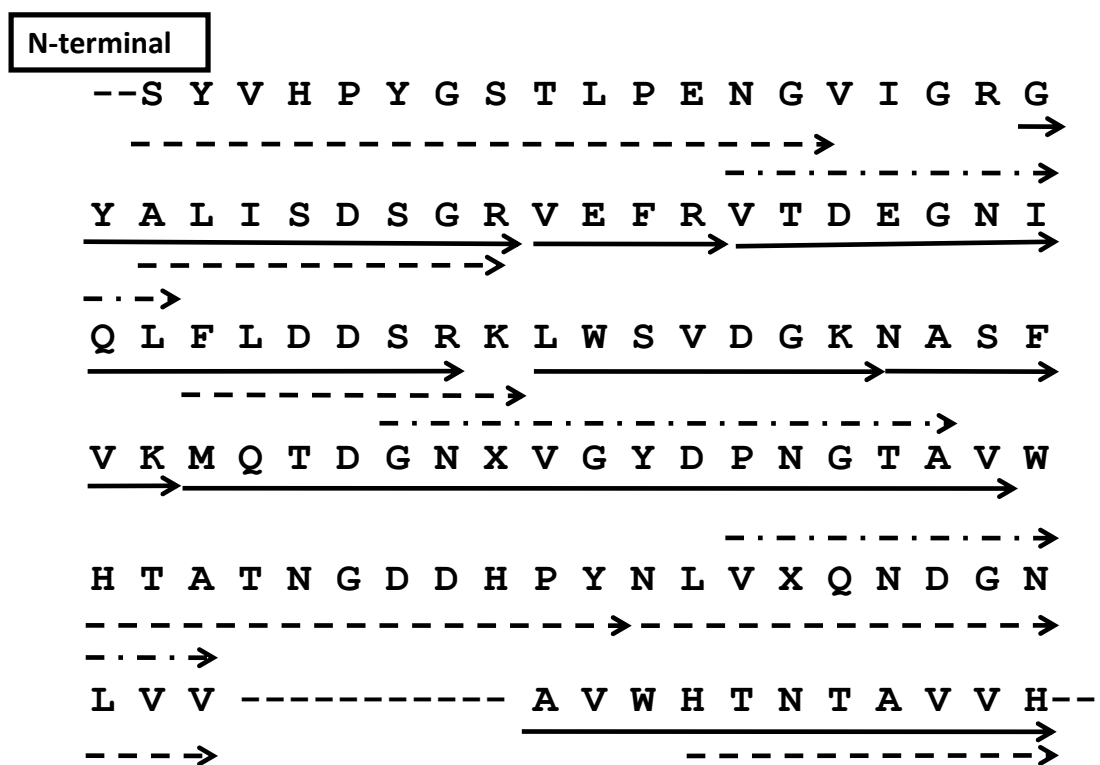


Fig. 2-2. Deduced amino acid sequence of MOL.
 The arrows represent amino acid residues determined by Edman degradation.
 Dashed line is chymotryptic peptides, continuous line is tryptic peptides, long
 dashed dotted line is *S. aureus* V8- digested peptides.

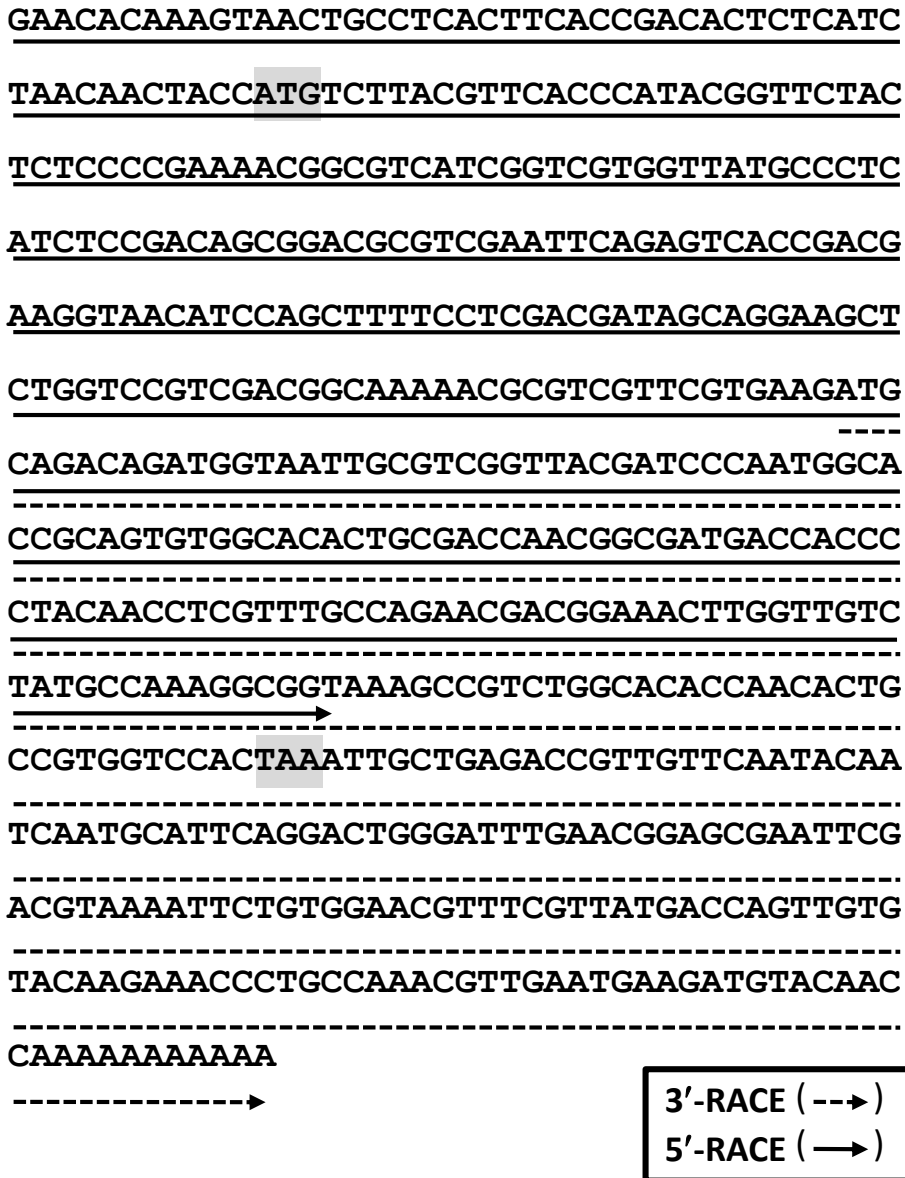


Fig. 2-3. Nucleotide sequence of *mol*.

The arrows represent nucleotide sequence. Dashed line is 3'-RACE, continuous line is 5'-RACE. Initiation and stop codons are shaded in gray.


```

P. abies -----MGYGTLDNGDWLMVGMSIFS---KDRSVELRMQDDGK 34
Z. mays -----MGYGTLDNGDWLMVGMSIFS---KDRSVELRMQDDGK 34
M. polymorpha -----MGYGTLDNGDWLMVGMSIFS---KDRSVELRMQDDGK 34
S. rugosus -----MATLQAGQSLAKGQSLSS---DNGVFTLTLQDDGN 32
MOL -----MSYVHPYGSTLPENGVIGRGYALIS---DSGRVEFRVTDEGN 39
A. ampeloprasum MGRTPSPKLIMSIITVAAILTILASTCMARNLLTNGEGLYAGQSLDVEQYKFIMQDDCN 60
G. elata --MAASASTAVILFFAVTTMMSLSAIPAFASDRLNSDHQLDTGGSLAQGGYLFIIQNDCN 58
R. vivipara -----LGTNYLLSQQLDTEGHLKNGDFDLVMQDDCN 32
: . : : : : : : : :

P. abies LAIYYNNRCAWQSTD-QQISNAKGAI TQGDGNFCIYDKNGKATWHTNTAAPKGDNRTFVA 93
Z. mays LAIYYNNRCAWQSTD-QQISNAKGAIMQGDGNFCIYDKNGKATWHTNTAAPKGDNRKTFVA 93
M. polymorpha LAIYYNDRCAWQSTD-QQISNAKGAIMQGDGNLCIYDKNGKATWHTNTAAPSGDNKTLLS 93
S. rugosus LVLAEG-STPVWSTQ-TNGTGASRLEVQTDGNVVLVYTDSNESKWATGTSG----QVRLE 85
MOL IQLFLLDSSRKLWS---VDGKNASFVKMOTDGNCVGYDPNGTAVWHTATNGD--DHPYNLV 94
A. ampeloprasum LVLYEYSTPIWASNTGVTGKNGCRAVMQKDGNFVVYDVNGRPVWATNSVRG--NGNYILV 118
G. elata LVLYDNNRAVWASGTNGKASN-CFLKMQNDGNLVIYSGS-RAIWASNTNRQ--KGNYYLI 114
R. vivipara LVLYNGN---WQSN TANNGRD-CKLTLTDYGE LVIKNGDGSTVWKSGA QSV--KGN YAAV 86
: : * . * : . * : :

P. abies VQDDGNLVLYRDGGATPIWSSKSNK----- 118
Z. mays VQDDGNLVLYRDGGATPIWSSKSNK----- 118
M. polymorpha VQDDGNLVLYKNGGATPIWSSKSNK----- 118
S. rugosus LQNDRNLVVYGADGS-ALWNSGTVTDKPIVPTAAAEEVVEEPAPEPQTYVVESGDTLS 144
MOL CQNDGNLVYAKGGK-AVWHTNTAVVH----- 120
A. ampeloprasum LQQDRNVVIY---GSDIWSGTGYRRS-----AGGPVVM 148
G. elata LQDRNRVVIYDNSNN-AIWATHTNVGN-----AEI 143
R. vivipara VHPDGRVLVVLGPS-----VF 101
: * . : * :

```

Fig. 2-5. Comparison of sequences of MOL with some bulb-type mannose-specific lectins. Sequence alignment of bulb-type mannosespecific lectins from *P. abies*, *Z. may*, *M. polymorpha*, *A. ampeloprasum*, *G. elata*, *S. rugosus*, *R. vivipara*, and MOL, performed using Clustal W. Identical residues are indicated by asterisks, and similar residues are indicated by dashes or colons. The amino acids that constitute the mannose-binding motifs are shaded in gray

3-4 組み換えシバフタケレクチン (rMOL) の精製

組み換えシバフタケレクチン (rMOL) はLB培地 (1 L) からアシアロフチュイン-セファローズ4Bカラムを用いて23.4 mg得られ、最終精製標品の比活性は1,770 titer/mg タンパク質であり、収率は32.5%であった (Table 2-6)。

Table 2-6. Purification of rMOL

Purification step	Total activity (Titer)	Total protein (mg)	Specific activity (titer/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	128,000	720	178	1	100
Asialofetuin sepharose 4B	41,600	23.4	1,770	10	32.5

3-5 rMOLのアミノ酸配列

rMOLのN末端はブロックされておらず、アミノ酸配はSYVHPYGSTLPEN Gであった。

3-6 分子量

(1) MALDI-TOF MS

MOLとrMOLをMALDI-TOF MSを用いて質量分析を行ったところ、MOLはm/z 13,012.8±3.0、rMOLはわずかに小さいm/z 12,968.5±3.0であった (Fig. 2-6)。

(2) SDS-PAGE

Tricine SDS-PAGEの結果、MOLとrMOLの電気泳動における移動度は、共に13 kDaであると推定できた (Fig. 2-7)。

(3) ゲル濾過

HPLCを用いたゲル濾過の結果、MOLは30,000、rMOLは28,500であった (Fig. 2-8)。

3-7 血球凝集活性

MOL と rMOL は、ウサギ赤血球浮遊液およびトリプシン処理ウサギ赤血球浮遊液を使用した血球凝集活性では、最小濃度 0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で凝集した。

しかし、MOL と rMOL は共にヒト赤血球浮遊液 A 型、B 型、O 型では、トリプシン処理の有無に関わらず血球凝集活性を示さなかった (Table 2-7)。

3-8 糖結合特異性

(1) 血球凝集活性阻害 (糖阻害)

MOLとrMOLに対する血球凝集活性阻害を調べた結果、単糖では200 mMマンノースでのみ弱い血球凝集活性阻害を示した。糖タンパク質では、トリマンノシルコアを持つウズラオボムコイドや高マンノースN-結合型糖鎖を持つウシ由来サイログロブリンで弱い血球凝集阻害を示した。しかし、高マンノースN-結合型糖鎖だけを持つウズラアルブミンや牛膵臓由来

RNase Bでは、血球凝集阻害活性は示さなかった。最も強い血球凝集活性阻害を示した糖タンパク質はアシアロフェチュインであった (Table 2-8)。

(2) グリカンアレイ

MOLは高マンノース*N*-結合型糖鎖を持つインベルターゼとオボアルブミン、酵母マンナンに対しては反応を示さなかった。アシアロサイログロブリンに対しても弱い反応しか示さなかった。対照的に、MOLは α_1 -酸性糖タンパク質、フェチュイン、トランスフェリンのアシアロ型やアガラクト型に対しては強い反応を示した (Fig. 2-9)。

3-9 温度安定性

MOLとrMOLは60°Cで30分間の熱処理を行っても血球凝集活性を100%維持していたが、70°Cで30分間の熱処理を行うと血球凝集活性を完全に失活した。

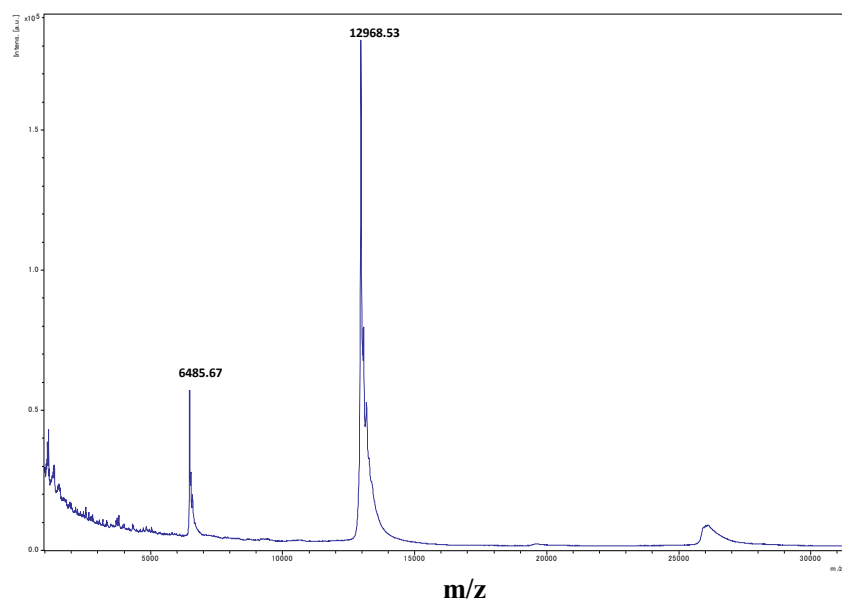
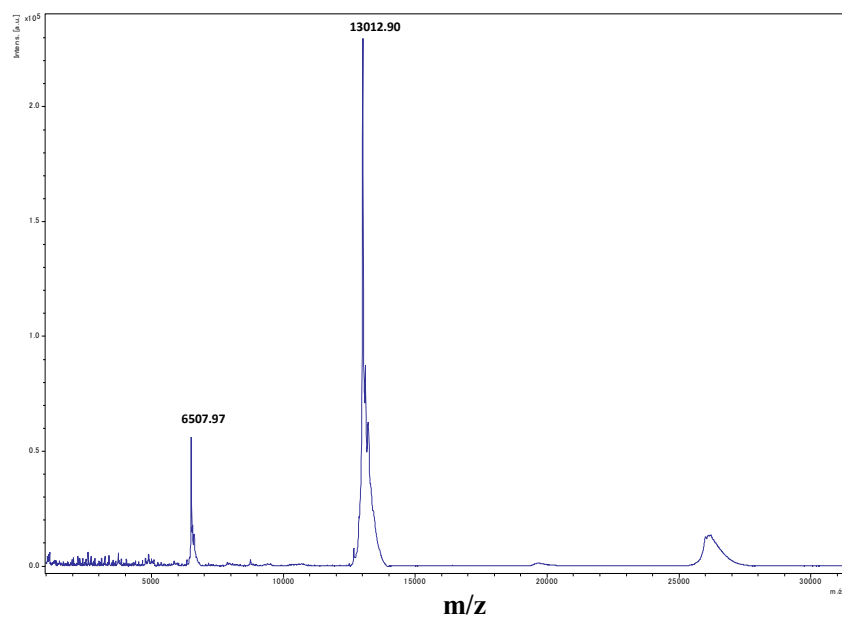


Fig. 2-6. MALDI-TOF MS spectra of MOL(A), rMOL(B). MALDI-TOF MS indicated that MOL and rMOL have monoisotopic molecular masses of 13,012.90 and 12,968.53. The corresponding double charged protonated molecules at m/z 6507.97 and 6485.67.

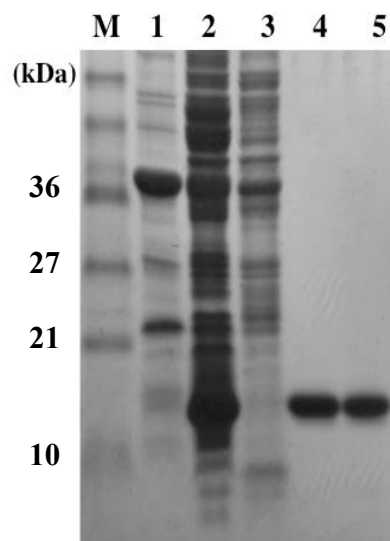


Fig. 2-7. Tricine SDS-PAGE analysis of MOL and recombinant MOL.
 Lane M, protein molecular weight marker; Lane 1, precipitation of bacterial lysate;
 Lane 2, supernatant of bacterial lysate; Lane 3, flowthrough fraction; Lane 4, purified
 recombinant MOL by affinity chromatography on asialofetuin-Sepharose 4B column;
 Lane 5, purified MOL by affinity chromatography on asialofetuin-Sepharose 4B column.

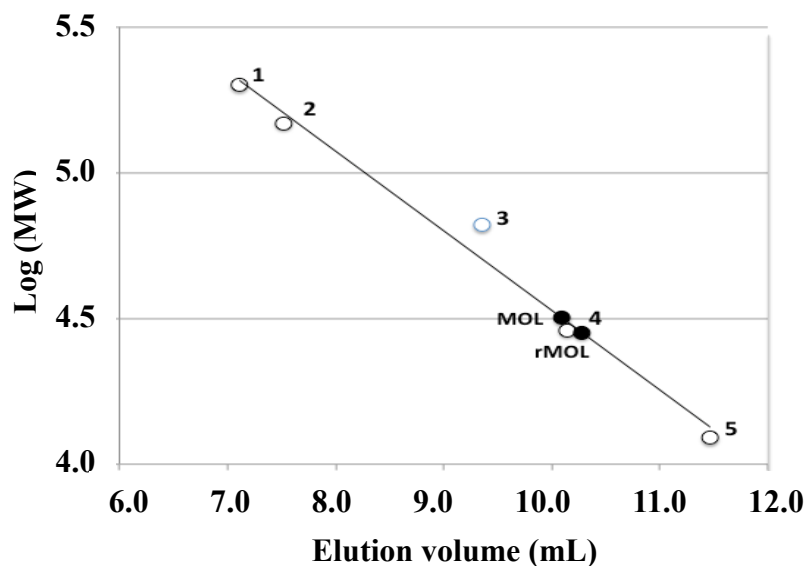


Fig. 2-8. Molecular mass estimation by HPLC.
 Five proteins were applied as molecular size markers. Open circle
 1, β -amylase; 2, alcohol dehydrogenase; 3, bovine serum albumin;
 4, carbonic anhydrase; 5, cytochrome c. Closed circle, MOL and rMOL.

Table 2-7. Hemagglutination activity of MOL and rMOL

Blood type	MOL	rMOL
Rabbit	+	+
Human A	-	-
Human B	-	-
Human O	-	-

Table 2-8. Inhibition of sugar and glycoproteins of hemagglutinating activity of MOL and rMOL. Minimum concentration required for the complete inhibition of titer 4 hemagglutinating activity.

Inhibitor	Minimum inhibitory Concentration	
	MOL	rMOL
	(mM)	(mM)
Mannose	200	200
	(mg/mL)	(mg/mL)
BSM	0.25	0.25
AsialoBSM	0.125	0.125
Asialofetuin	0.008	0.004
Ovomucoid (Quail)	0.25	0.125
Thyroglobulin(Bovine)	0.125	0.125

Arabinose, L-fucose, galactose, glucose, rhamnose and xylose were not inhibitory at 200 mM, and lactose and laminaribiose were not at 100 mM. AsialoPSM, bovine pancreatic RNase B, fetuin, ovalbumin, quail ovalbumin, PSM, yeast mannan were 1.0 mg/mL, and porcine thyroglobulin was not at 0.5 mg/mL

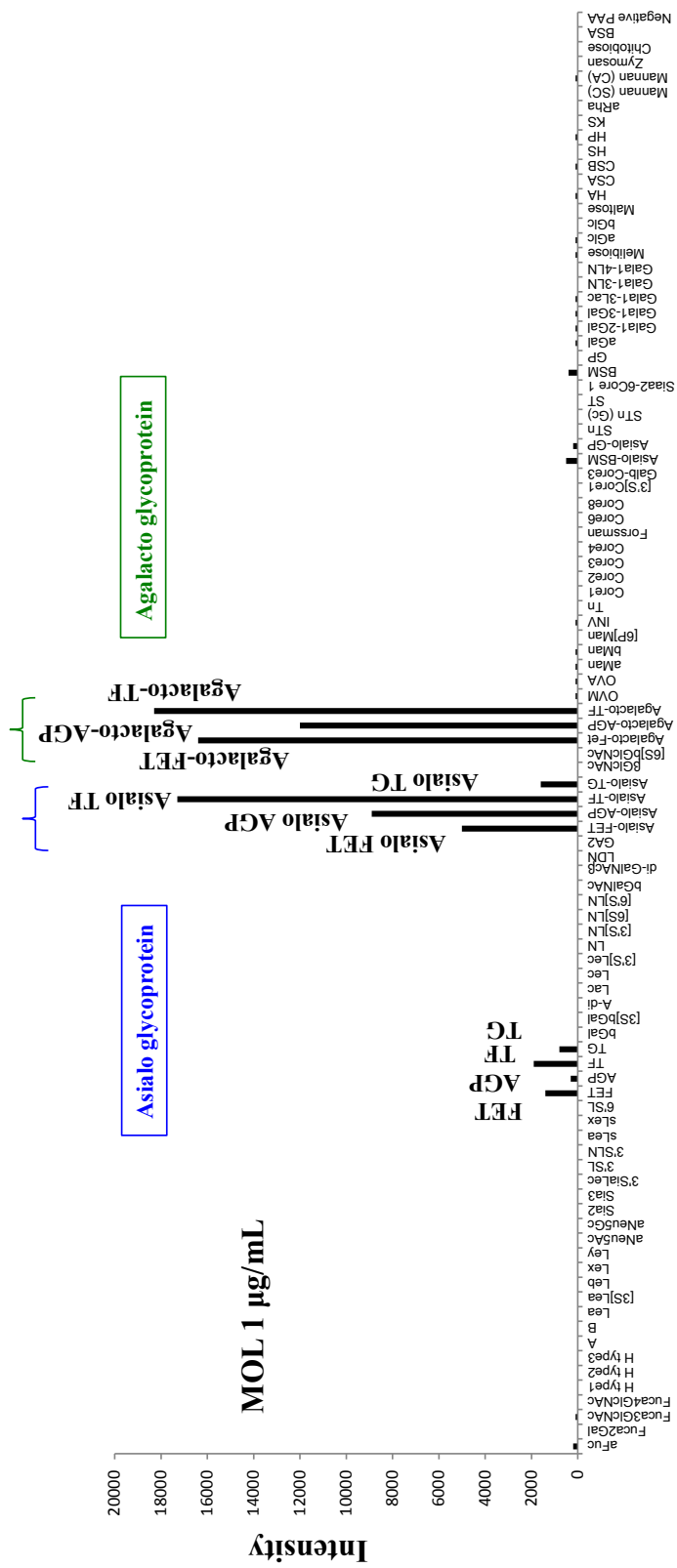


Fig. 2-9. Glycan-array of MOL. Cy3-labeled MOL was applied on the array and binding was detected by the scanner. Scan image of MOL were analyzed with the Array Pro analyzer ver. 4.5.

第四節 考察

日本産シバフタケ子実体から、アジアロフチュイン-セファロース4Bカラムを用いて、新規レクチンMOLを単離し、アミノ酸配列解析を行った。MOLの部分配列をもとに*mol*遺伝子のクローニングを行った結果、MOLは120アミノ酸からなり、計算分子量13,103であった (Fig. 2-4)。また、大腸菌を用いた組み換えタンパク質の発現を行い、MOLと同様の精製方法でrMOLの精製を行った。MOLとrMOLの性質決定を行った結果、SDS-PAGEの結果より共に13 kDaであり、ゲル濾過分析の結果より二量体を形成していることが明らかになった (Fig. 2-7、Fig. 2-8)。さらに、MOLとrMOLをMALDI-TOF MSを用いて質量分析を行ったところ、MOLはm/z 13,012.8±3.0、rMOLはわずかに小さいm/z 12,968.5±3.0であった (Fig. 2-6)。この分析結果は、計算分子量とは異なる結果であった。しかし、MOLとrMOLのアミノ酸配列分析の結果より、MOLのN末端はブロックされていたため解析は出来なかったが、MOLのキモトリプシンで酵素消化を行ったペプチド配列はSYVHPYGSTLPENGを示した。また、rMOLのN末端配列もSYVHPYGSTLとMOLの酵素消化断片と同様の配列であった。これより、計算分子量と測定分子量の結果の違いは、アミノ酸配列先頭のメチオニンが除去されたことによるものであると示唆された。

MOLとrMOLの糖結合特異性は、高マンノースN-結合型糖鎖だけを持つ糖タンパク質には血球凝集活性阻害を示さず、アジアロ型のN-結合型複合糖鎖であるアジアロフェチュインに対しては、強い血球凝集活性阻害を示した。グリカンレイの結果からも同様に、高マンノースN-結合型糖鎖を持つ糖タンパク質には糖結合特異性を示さず、N-結合型複合糖鎖を持つ α_1 -酸性糖タンパク質や、

フェチュイン、トランスフェリンに対して弱い糖結合特異性を示し、アジアロ型またはアガラクト型のN-結合型複合糖鎖に対しては強い糖結合特異性を示した。以前、Tatenoらは、典型的なマンノース結合型レクチンの糖鎖結合パターンをコンカナバリンA (Con A) [18]を用いて示した。その結果、Con Aは高マンノースN-結合型糖鎖に強く反応したが、アジアロ型またはアガラクト型の糖タンパク質に対してはトランスフェリンに対してのみ強く反応した(Fig. 2-10)。これより、MOLの糖結合特異性はCon Aのような典型的なマンノース結合型レクチンとは異なり、アジアロ型またはアガラクト型のN-結合型複合糖鎖に対して糖結合特異性を示すチューリップレクチン(TxLC- I) [49]に近いと考えられた(Fig. 2-11)。

また、DNAデータベースから決定された塩基配列をもとに既知のアミノ酸配列と相同性検索を行ったところ、マンノース結合モチーフQXDXNXVXYを持つバルブタイプマンノース結合型レクチン[13]と高い相同性を示した(Fig. 2-5)。バルブタイプマンノース結合型レクチンの配列はスノードロップ [50]から初めて報告され、その後、単子葉植物や苔類から多くのレクチンが単離された。さらに、放線菌*Segniliparus*属、針葉樹、糸状菌[13, 36]からも遺伝子が見つかり、また、1種類の子囊菌由来レクチンのN末端から10残基の部分アミノ酸配列が、糸状菌由来のバルブタイプマンノース結合型レクチンの遺伝子配列をもとに決定されたアミノ酸配列と一致したことから、このファミリーであると推定されている[37]。しかし、この子囊菌レクチンはキシロースやイヌリンを認識したため、従来のバルブタイプマンノース結合型レクチンとは糖結合特異性が全く異なるものであった。MOLもマンノース結合モチーフを持っていたが、MOL

は高マンノースN-結合型糖鎖よりもN-結合型複合糖鎖を強く認識した。また、MOLの糖結合特異性は高マンノースN-結合型糖鎖だけでなくN-結合型複合糖鎖にも結合する点においてGNAMAIZE [47] や*Remusatia vivipara*レクチン (RVL) [51] に近いものであり、MOLのアミノ酸配列はトウモロコシやゼニゴケ由来のマンノース結合型レクチンと38%の配列相同性があった。さらに、MOLのアミノ酸配列には相同ドメインを2カ所(残基 64–84 と 残基96–116)含み、分子内相同性が62%あった。これより、日本産シバフタケMOLはマンノース結合モチーフ (QXDXNXVXY) を持つバルブタイプマンノース結合型レクチンであったが、その糖結合特異性は従来の同ファミリーのものとは異なっていた。

日本産シバフタケと欧米産シバフタケには、発現しているレクチンが異なるという点で差異がある。しかし、別種であるかは不明である。なぜなら、遺伝子が95%一致している場合でも、別種のキノコもあり、遺伝子のみからの判定は困難であるという理由による。

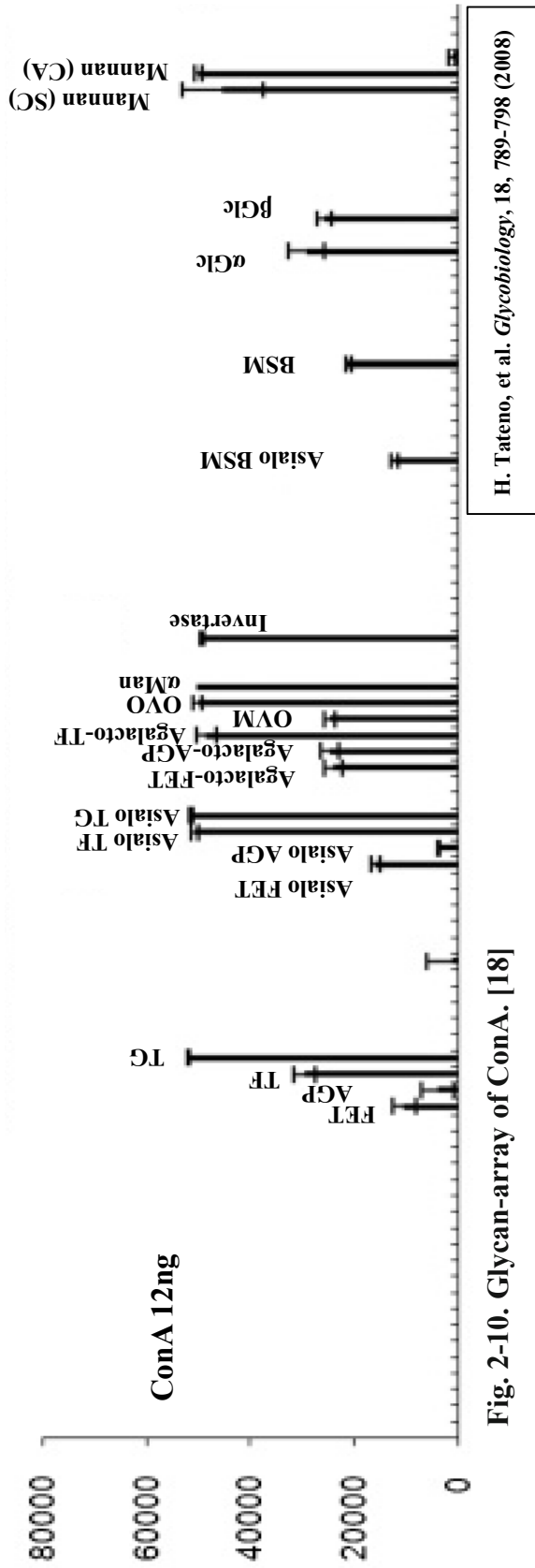


Fig. 2-10. Glycan-array of ConA. [18]

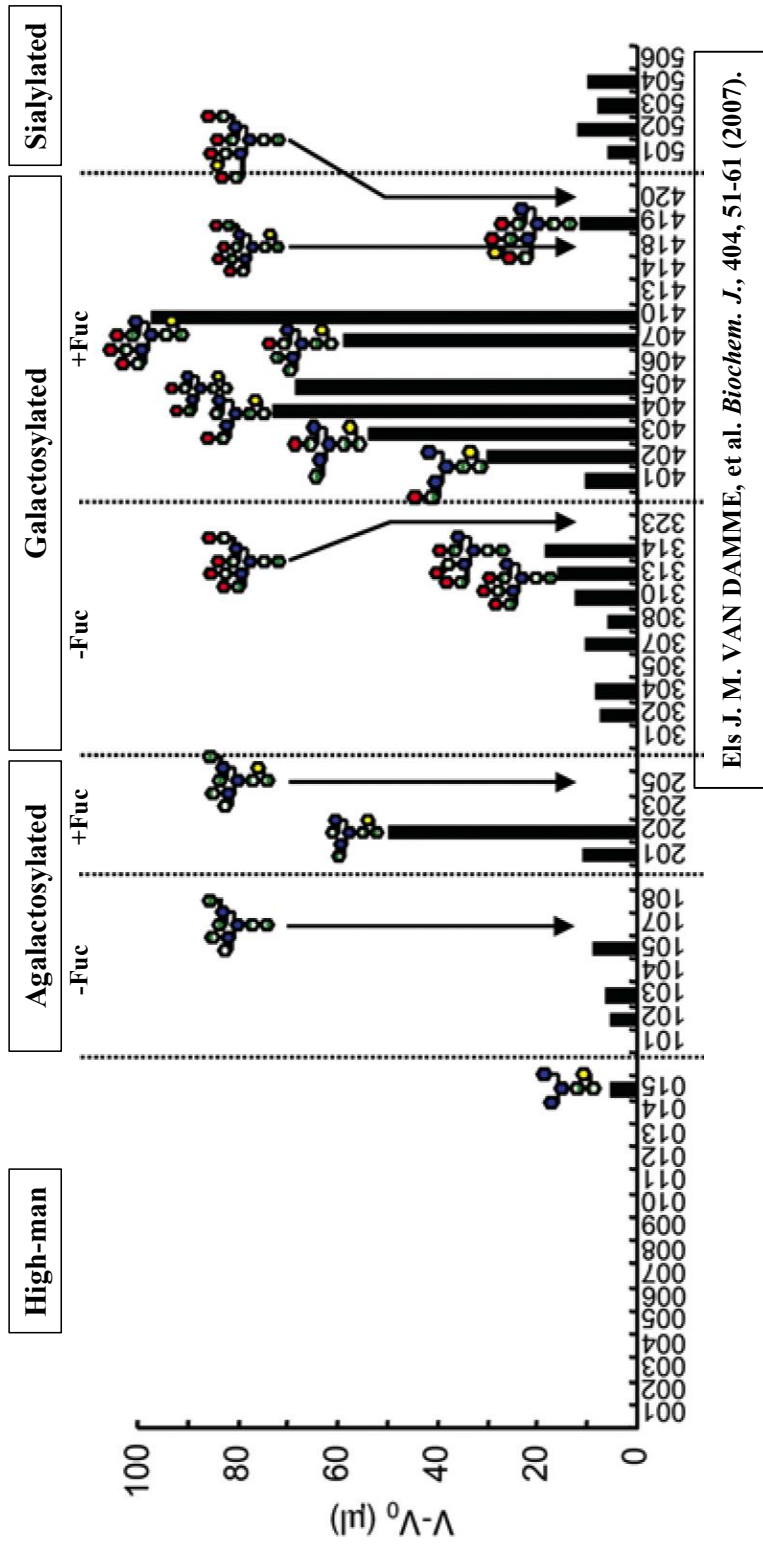


Fig. 2-11. Frontal affinity chromatography analysis of the carbohydrate-binding specificity of TxLC-I-I. [49]

第五節 結論

バルブタイプレクチンはリシントタイプレクチンやジャカリン近縁レクチンと同様に、植物や真菌類に含まれるレクチンとしてよく知られている。本研究では、単子葉植物から多く見つかったマンノース結合モチーフ

(QXDXNXVXY) を持つマンノース結合型GNA様レクチンを担子菌類から初めて発見した。GNA様レクチンは単糖のマンノースや高マンノースN-結合型糖鎖に対して強い糖結合特異性を示すが、MOLの糖結合特異性は単糖のマンノースや高マンノースN-結合型糖鎖だけでなくN-結合型複合糖鎖に対しても結合特異性を示すことからGNAMAIZEやRVLに近いものであり、子囊菌由来のGNA様レクチンとは異なるものであった。また、日本産シバフタケは欧米産シバフタケとは異なる菌種である可能性が示唆された[52, 53]。

第六節 小活

新規のマンノース認識レクチン(MOL)を日本産シバフタケ*Marasmius oreades* よりアジアロフェチュイン-セファロース4Bカラムを用いて精製した。米国产シバフタケ子実体より分離されたMOAはリボソーム不活化タンパク質型レクチンであり、B型血球を認識することが知られている。しかし、予備調査の結果、日本産シバフタケ*M. oreades*にはMOAは含まれておらずMOLが含まれていた。ゲル濾過分析よりMOLは13 kDaのサブユニットがホモダイマー構造を形成していることを明らかにした (Fig. 2-8)。また、MOLのN末端はブロックされていたため、全アミノ酸配列の決定はMOLの酵素消化断片のアミノ酸配列解析と*mol*遺伝子のクローニングにより決定した。

MOLの一次構造には、植物由来バルブタイプマンノース結合型レクチンに特徴的なマンノース結合モチーフ（QXDXNXVXY）が2カ所保存されていた。ウサギ赤血球を用いた血球凝集活性阻害によって糖結合特異性を分析したところ、MOLは単糖のマンノースと糖タンパク質の牛由来サイログロブリンに対して弱い阻害を示し、糖タンパク質のアシアロフェツインに対しては非常に強い阻害を示した。さらに、グリカンアレイ分析によりMOLの糖結合特異性を解析した結果、MOLは高マンノース*N*-結合型糖鎖よりも*N*-結合型複合糖鎖を強く認識する傾向にあり、典型的なマンノース結合型レクチンとは異なる結果を示した。

第三章 アフリカパンノキ (*Treculia africana* L.) 種子由来 2 種類の

ジャカリン近縁レクチンの精製と諸性質

第一節 緒言

ジャカリン近縁レクチン(JRLs)は被子植物、裸子植物、真性シダ植物を含む幅広い植物界で見つかっており、ガラクトース認識ジャカリン近縁レクチン(gJRLs)とマンノース認識ジャカリン近縁レクチン(mJRLs)がこれまでに報告されている [23, 54, 55]。gJRLs はクワ科植物のみから見つかっているが、mJRLs は生物界に幅広く分布し [23]、これら 2 種類のレクチンは糖結合特異性や構造、細胞内局在性の点で異なっている [56]。gJRLs はプレプロタンパク質として合成され、同時または翻訳後にプロセッシングを受け、プロトマーの開裂によって短鎖の β 鎖と長鎖の α 鎖が作られる [57-59]。これとは対照的に mJRLs は一本のポリペプチド鎖である。gJRLs は mJRLs の相同体のループ開裂によって作り出され、結果としてガラクトースや *N*-アセチルガラクトサミンに対して認識を示すようになる。Pratap ら [60] は gJRL であるジャカリンと mJRL であるアルトカルピンの糖鎖認識部位には、2 点の違いがあると報告している。一点目はジャカリンが翻訳後プロセッシングを受けることで α 鎖と β 鎖を間に存在するリンカー領域が分解され、ループが開裂することで α 鎖と β 鎖が出来ることである。二点目は、ジャカリンにはガラクトース認識に必要不可欠な 4 残基の芳香族アミノ酸が糖鎖認識部位に存在しているということである。一方、アルトカルピンの糖鎖認識部位には芳香族アミノ酸は存在せず、マンノースを認識するという性質を示す。Van Damme ら [61] はブラックマルベリー (*Morus nigra*) の樹皮

には、gJRL であるモルニガ G と mJRL であるモルニガ M という 2 種類の JRLs が大量に含まれていると報告した。さらに、ジャックフルーツ (*Artocarpus integrifolia*) の種子中にもジャカリンとアルトカルピン [62]の 2 種類の JRLs が含まれていることが既に知られていた。

アメリカハリグワ凝集素 (MPA) [57, 63]やモルニガ G [61]、ジャカリンを含むパンノキ属由来 gJRLs [64-68] はこれまでにいくつか報告されており、*N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) や T 抗原 (Gal β 1-3GalNAc)、*O*-結合型糖鎖を認識することが知られている [63, 67, 69-74]。gJRLs はフロンタルアフィニティークロマトグラフィーやグリカンアレイによって、コア 3 *O*-結合型糖鎖 (GlcNAc β 1-3GalNAc) やその他の糖鎖を認識出来ることも明らかにされている [75-77]。特に、コア 3 *O*-結合型糖鎖の合成には、腫瘍形成と転移の制御が関係しているため [78, 79]、腫瘍の生物化学・生物医学に非常に重要な糖鎖である。Kabir は IgA 腎症と *O*-結合型糖鎖を含む多くの免疫学的研究におけるジャカリンの応用について報告し [80]、Bies は、ドラッグデリバリーシステムにおける MPA の使用について書き記している [81]。近年、gJRLs はレクチンマイクロアレイ [20, 21] に使用されており、gJRLs は *O*-結合型糖鎖を認識する便利なツールとして知られている。

先行研究より、アフリカパンノキにはマンノース認識レクチンが含まれていることが報告されていたが、詳細な機能や構造などは今まで報告されていなかった [82]。そこで本章では、アフリカパンノキに含まれるレクチンの詳細な糖結合特異性や一次構造の解析を目的とし、レクチンの精製、性質決定を行った。また、アフリカパンノキがクワ科植物であり、パンノキ属に属することから鑑

みて、ガラクトース認識レクチンが存在すると推測し、新規レクチンの探索も行った。

第二節 実験材料および実験方法

2-1 実験材料

アフリカパンノキ種子はコンゴ民主共和国で採取し、ミキサーで粉砕して4°Cで保存した。

2-2 使用試薬

マンノースアガロースカラムとメリビオースアガロースカラムは Sigma-Aldrich 社製のものを使用した。GlcNAc β 1-3GalNAc- α -PNP (コア 3 糖鎖- α -PNP)と Gal β 1-3 [GlcNAc β 1-6]GalNAc- α -PNP (コア 2 糖鎖- α -PNP)は Toronto Research Chemicals 社より購入した。その他の単糖、オリゴ糖、糖タンパクは Sigma-Aldrich 社より購入した。ヒト IgA はオリエンタル酵母社製のものを使用した。日本クリレクチン (CCA) に対する IgGs は以前の論文に記した[83]。ウサギ保存血液は日本バイオテスト研究所より購入した。 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼは Sigma-Aldrich 社製のものを使用した。その他の試薬は明示しない限り、和光純薬工業社製およびナカライテスク社製の特級試薬を使用した。

2-3 糖タンパク質の調製

(1) アシアロ化糖タンパク質の調製

第二章、第二節、2-5 (1) に示した方法と同様に行った。

(2) アガラクト化した糖タンパク質の調製

β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼを用いて、アシアロ BSM の酵素消化を行った。終濃度 0.5 unit/mL の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼを 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0)、37 °C で 18 時間反応させて、アガラクト BSM を調製した。

(3) ウズラ由来の糖タンパク質

第二章、第二節、2-5 (2) に示した方法と同様に行った。

(4) ニワトリ由来の糖タンパク質

第二章、第二節、2-5 (3) に示した方法と同様に行った。

2-4 粗レクチンの調製

アフリカパンノキ (2 g) を氷冷した 100 mL のリン酸緩衝食塩水 (PBS)、pH 7.5 中で摩砕した。その後の操作は、第二章、第二節、2-6 に示した方法と同様に行った。

2-5 アフィニティーカラムを用いたレクチンの精製

(1) マンノースアガロースカラム

PBS で平衡化したアフィニティーカラム・マンノースアガロースカラム ($\phi 9.0 \times 32$ mm) に同緩衝液に溶解した粗レクチン溶液を供した。PBS で非吸着画分を洗浄し、マンノースアガロースカラムの素通り画分として回収した。カラムに吸着したタンパク質は、150 mM メチル- α -マンノシドを用いて溶出し、マンノースアガロースカラムの吸着画分とした。

(2) メリビオースアガロースカラム

PBS で平衡化したアフィニティーカラム・メリビオースアガロースカラムにマンノースアガロースカラムの素通り画分を供した。PBS で非吸着画分を洗浄し、カラムに吸着したタンパク質を 60 mM メリビオースを含む同緩衝液で溶出した。

次に、PBS で平衡化したメリビオースアガロースカラムにマンノースアガロースカラムの吸着画分を供した。PBS で非吸着画分を洗浄し、カラムに吸着したタンパク質を 60 mM メリビオースを含む同緩衝液で溶出した。アフィニティーカラムで精製した標品はアミノ酸配列分析を除く全ての解析に使用した。

2-6 Native PAGE

ポリアクリルアミド電気泳動(PAGE)はDavisの方法に従いpH 8.9で行った [84]。

2-7 分子量

(1) MALDI-TOF MS

第二章、第二節、2-20 (1) に示した方法と同様に行った。

(2) SDS-PAGE

第二章、第二節、2-20 (2) に示した方法と同様に行った。タンパク質マーカーにはテフコ社製のタンパク質分子量マーカーIIを用いた。

(3) ゲル濾過

第二章、第二節、2-20 (3) に示した方法と同様に行った。

HPLC を用いたゲル濾過分析には、東ソー社の TSKgel SWXL カラム($\phi 7.5 \times 300$ mm)を用いて分子量を測定した (Table 3-1)。

Table 3-1. HPLC system of gel filtration

Column	TSKgel SWXL
Column size	$\Phi 7.5 \times 300$ mm
Flow rate	0.4 ml/min
Solvent system	Solvent : 0.1M Phosphate buffer (pH 7.0)

2-8 タンパク質の定量

第二章、第二節、2-21 に示した方法と同様に行った。

2-9 中性糖の定量

中性糖は、レクチン (2 mg) を用いて、Dubois らのマンノースを標準物質として用いたフェノール硫酸法により定量した[85]。

2-10 赤血球浮遊液の調製

(1) ウサギ赤血球の調製

第二章、第二節、2-2 2 (1) に示した方法と同様に行った。

(2) トリプシン処理ウサギ赤血球の調製

第二章、第二節、2-2 2 (2) に示した方法と同様に行った。

2-11 血球凝集活性

第二章、第二節、2-2 3 に示した方法と同様に行った。

2-12 血球凝集活性阻害 (糖阻害)

第二章、第二節、2-2 4 に示した方法と同様に行った。

単糖は D-ガラクトース (Gal)、D-グルコース (Glc)、D-マンノース (Man)、メチル- α -ガラクトシド (Gal- α -Me)、メチル- α -グルコシド (Glc- α -Me)、メチル- α -マンノシド (Man- α -Me)、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、グルコサミン、Gal- β -PNP、GalNAc- α -PNP、GalNAc- β -PNP、二糖はラクトース、メリビオース、コア 1 糖鎖

(Gal β 1-3GalNAc)、Gal β 1-3GalNAc- α -PNP、GlcNAc β 1-3GalNAc- α -PNP、三

糖としては Gal β 1-3[GlcNAc β 1-6]GalNAc- α -PNP (コア 2 糖鎖- α -PNP) 、
Man α 1-6[Man α 1-3]Man- α -Me を、さらにマンノペンタオースを使用した。糖
タンパク質は BSM、アシアロ BSM、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ処理
したアシアロ BSM、フェチュイン、アシアロフェチュイン、ウシ由来サイ
ログロブリン、アシアロサイログロブリン、IgA、ウズラオボムコイドを使
用した。

2-1 3 プロテアーゼを用いた酵素消化

(1) リシルエンドペプチダーゼによる酵素消化

レクチン (10.0 nmol) を 100 μ L の 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) に
溶解し、和光純薬工業社のリシルエンドペプチダーゼと 1:20 (酵素:基質、
mol/mol)の割合で混合し、4 時間 37°C で酵素消化を行った。

(2) キモトリプシンによる酵素消化

レクチン (10.0 nmol) を使用して 1 : 100 (酵素:基質、mol/mol) の割合で
混合し、第二章、第二節、2-8 (2) に示した方法と同様に行った。

2-1 4 RP-HPLC

(1) 酵素消化断片の分離

第二章、第二節、2-9 に示した方法と同様に行った。

(2) レクチンの短鎖と長鎖の分離

COSMOSIL Protein-R カラム ($\phi 4.6 \times 250$ mm、ナカライテスク社) を用い、RP-HPLC によって分離した。HPLC は日本分光社 PU-2080 型ポンプに日本分光社 UV-2070 型紫外可視検出器を接続したものをを用い、吸光度 280 nm により検出した。レクチンの短鎖と長鎖の分離には Table 3-2 に示す溶媒を使用した。

Table 3-2. HPLC system of COSMOSIL 5 C18 MS-II

Column	COSMOSIL Protein-R
Column size	$\Phi 4.6 \times 250$ mm
Flow rate	1.0 ml/min
Solvent system	Solvent A: 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) Solvent B: 80% acetonitrile in 0.1% TFA
Elution gradient	Sol. A: Sol. B = (100: 0) \rightarrow (0: 100) in 80 min, linear gradient

2-15 アミノ酸配列解析

第二章、第二節、2-10 に示した方法と同様に行った。

2-16 酵素結合免疫吸着検査法 (ELISA)

PBS に溶解したレクチン溶液を平底のタイタープレート上に 4°C で一晩吸着させた。次に、ウェルを 0.05% Tween 20 を含む PBS (PBS-T) で 2 回洗浄後、PBS で 4000 倍に希釈した抗 CCA の IgG と室温で 2 時間インキュベートした。再びプレート内を PBS-T で 2 回洗浄した。さらに 2 次抗体のペルオキシダーゼ複合体ヒツジ由来抗ウサギ IgG (Fab')₂ を PBS で 2000 倍に希釈してウェルに

加え、室温で1.5時間反応後、再度ウェルをPBS-Tで2回洗浄した。ペルオキシダーゼ反応にはELISA POD substrate TMB kit (ナカライテスク社製)を使用し、マイクロプレートリーダーを用いて、吸光度620 nmで測定した。ポジティブコントロールとしてmJRLである日本産ソテツの葉由来レクチン (CRL) を使用した [54]。各レクチンの反応性は、CRLの反応値 ($A_{620} = 0.125$)を100としたときの相対値を%によって表した。ブランクの値は1次抗体抜きで測定した。

2-17 グリカンアレイ

第二章、第二節、2-25に示した方法と同様に行った。Table 3-3には、グリカンアレイに使用した糖鎖を示した。

2-18 モデリング

タンパク質構造解析ソフト MOE (菱化システム社製)を用いて、ジャカリンの結晶構造解析データ (PDB code: 1UGX)を使用して、ホモロジーモデリングおよびドッキングシュミレーションを行った。

Table 3-3. Glycans used for glycan array

Trivial name	Glycans
Melibiose	Gal α 1-6Glc β 1-PAA
Gal α 1-4LN	Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β 1-PAA
Gal α 1-3LN	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-PAA
Gal α 1-3Lac	Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β 1-PAA
Gal α 1-3Gal	Gal α 1-3Gal β 1-PAA
Gal α 1-2Gal	Gal α 1-2Gal β 1-PAA
aGal	Gal α 1-PAA
GP	Human glycophorin (Disialyl T and sialyl Tn)
BSM	Bovine submaxillary mucin (Sialyl Tn)
Sia α 2-6Core 1	Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α 1-PAA
ST	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA
STn (Gc)	Neu5Gc α 2-6GalNAc α 1-PAA
STn	Neu5Ac α 2-6GalNAc α 1-PAA
aGP	Asialo human glycophorin MN (T)
aBSM	Asialo bovine submaxillary mucin (Tn)
Gal β -Core3	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3GalNAc α 1-PAA
[3'S]Core1	(3OSO ₃)Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA
Core8	Gal α 1-3GalNAc α 1-PAA
Core6	GlcNAc β 1-6GalNAc α 1-PAA
Forssman	GalNAc α 1-3GalNAc β 1-PAA
Core4	GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α 1-PAA
Core3	GlcNAc β 1-3GalNAc α 1-PAA
Core2	Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α 1-PAA
Core1	Gal β 1-3GalNAc α 1-PAA
Tn	GalNAc α 1-PAA

第三節 実験結果

3-1 アフリカパンノキレクチンの精製

先行研究より、アフリカパンノキレクチンにはマンノース認識レクチンが含まれていることが報告されていた。また、これまでの研究より、クワ科植物にはgJRLsが含まれていること、さらに、パンノキ属の植物からはgJRLとmJRLを同時に含む植物の報告例もあったため、アフリカパンノキにも2種類のJRLsが含まれている可能性を考えて、2種類のアフィニティーカラムを用いて、アフリカパンノキレクチンの精製を行った。mJRLを精製するためにマンノースアガロースカラムを使用し、gJRLを精製するためにメリビオースアガロースカラムを使用した。gJRLは、わずかにマンノースを認識する場合もあるため、メリビオースアガロースカラムにはマンノースアガロースカラムの素通り画分と吸着画分の両方を供した (Fig. 3-1)。アフリカパンノキ種子より、2種類のアフィニティーカラムを使用して2種類のレクチンを精製した。精製したレクチンは、マンノースアガロースカラムにのみ吸着を示したマンノース認識型アフリカパンノキレクチン (TAA-M) とメリビオースアガロースカラムに吸着を示したガラクトース認識型アフリカパンノキレクチン (TAA-G)とした。Table 3-4には精製のまとめを示した。アフリカパンノキ種子には、種子1gあたりTAA-Gが7.0 mg、TAA-Mが7.2 mg含まれていて、レクチンの比活性は TAA-Gが64,000 titer/mg、TAA-Mが3,200 titer/mgと大きく異なった。

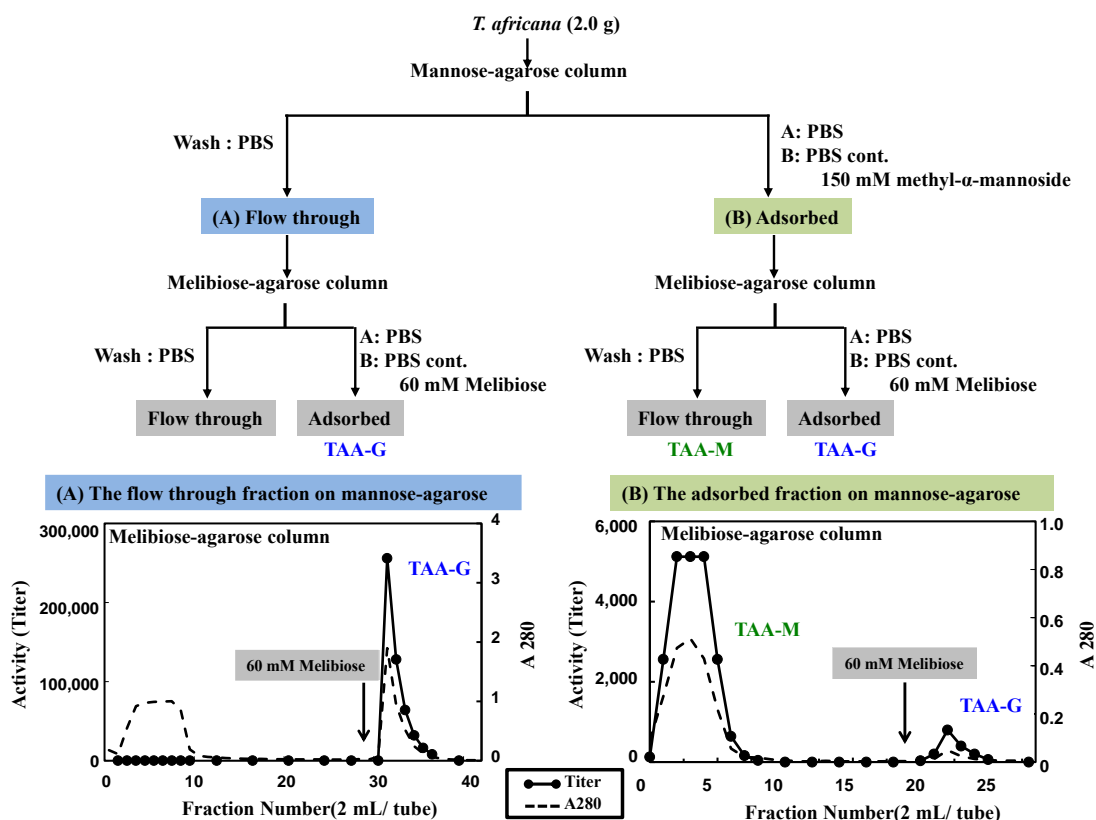


Fig. 3-1. Scheme for purification of TAA-G and TAA-M

Table. 3-4. Purification of two Jacalin-related lectins from *T. africana* seeds. Hemagglutination activity was measured with native rabbit erythrocytes. Yield was calculated on the basis of protein amount. Details, see Materials and methods.

Purification step	Protein (mg)	Total activity (titer)	Specific activity (Titer/mg)	Yield (%)
Crude extract	58.0	960,000	16,550	100
Mannose-agarose				
A: Flow-through	41.7	800,000	19,180	71.9
B: 150 mM Me- α -Man	16.0	130,000	8,125	27.6
Melibiose-agarose				
A: 60 mM melibiose (TAA-G)	12.7	814,000	64,000	21.9
B: Flow-through (TAA-M)	14.4	46,000	3,200	24.8
B: 60 mM melibiose (TAA-G)	1.3	83,200	64,000	2.2

3-2 Native PAGE

TAA-GとTAA-MのNative PAGEを行ったところ、単一のバンドではなく、スメアなバンドであった (Fig. 3-2)。これより、精製標品であるTAA-GとTAA-Mは、タンパク質の不均一性を示すことが明らかになった。

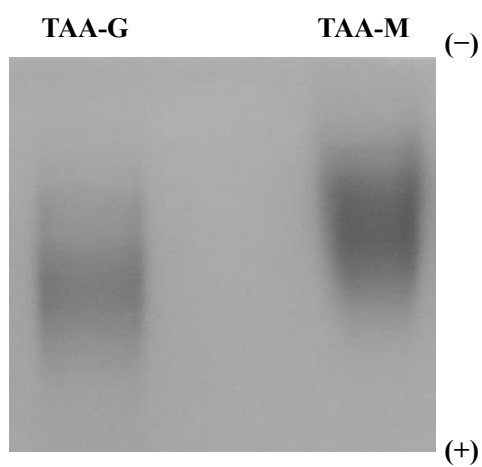


Fig. 3-2. Native PAGE of TAAs.

Notes: Native PAGE at 12.5% gel and pH 8.9.

3-3 分子量

(1) MALDI-TOF MS

TAA-GとTAA-MはMALDI-TOF MS分析において、メインピークの近くにいくつかの小さなピークと幅広いピークが確認された。TAA-Gの β 鎖のメインピークは m/z 2,100、TAA-Gの α 鎖のメインピークは m/z 14,830、TAA-Mのメインピークは m/z 16,120であった (Fig.3-3)。

(2) SDS-PAGE

Tricine SDS-PAGEの結果、TAA-GとTAA-Mの電気泳動における移動度から、それぞれ15kDaと17kDaの分子量を持つと推定できた。TAA-Gの分子量は α 鎖に対応するものであった(Fig.3-4)。

(3) ゲル濾過

HPLCを用いたゲル濾過の結果、TAA-GとTAA-Mは共に64 kDaを示した。これより、TAA-Gは4個の大サブユニット α 鎖と4個の小サブユニット β 鎖から構成されることが明らかになった。また、TAA-Mも4個のサブユニットから構成されることが明らかになった。

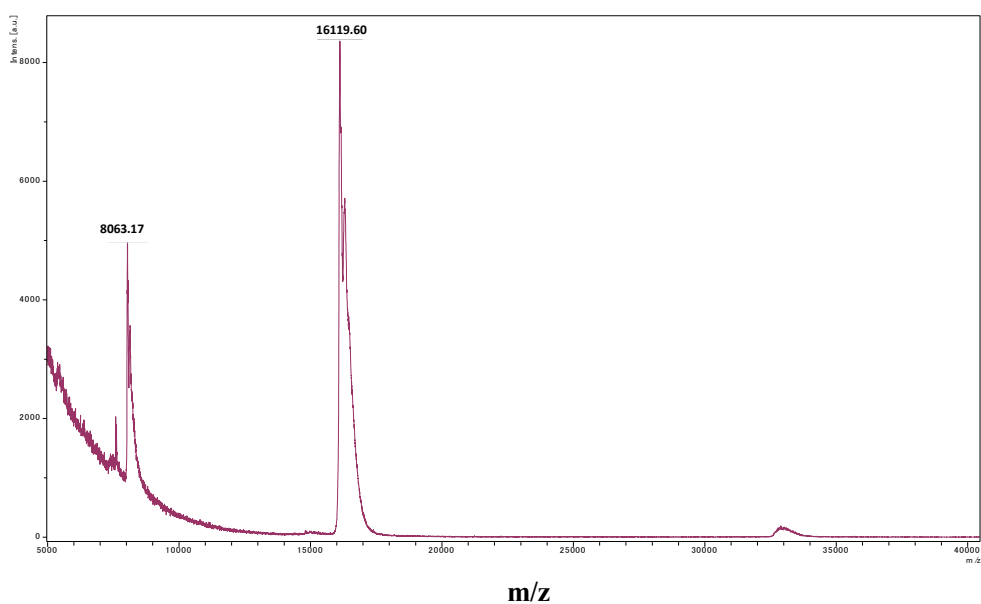
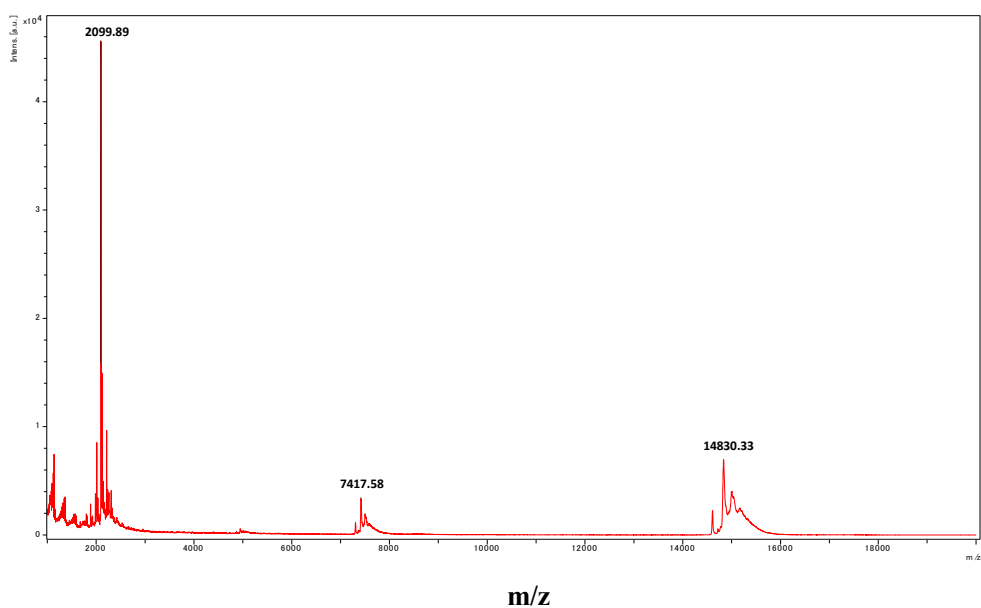


Fig. 3-3. MALDI-TOF MS spectra of TAA-G (A), TAA-M (B). MALDI-TOF MS indicated that β -chain of TAA-G , α -chain of TAA-G and TAA-M have monoisotopic molecular masses of 2099.89, 14,830.33 and 16,119.60, respectively. The corresponding double charged protonated molecules of α -chain of TAA-G and TAA-M at m/z 6507.97 and 8,063.17.

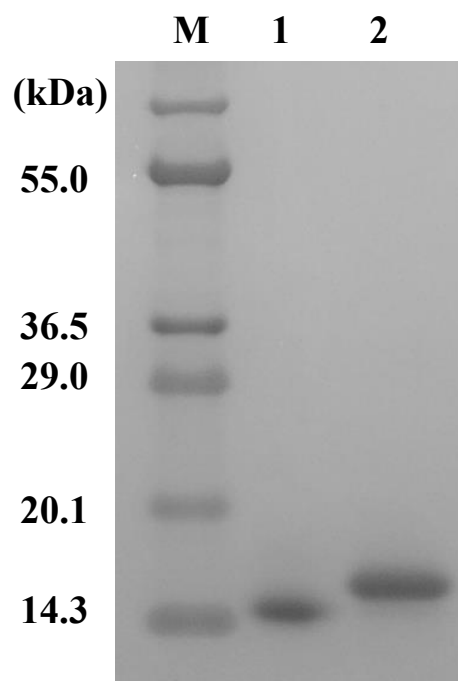


Fig. 3-4. Tricine-SDS-PAGE of TAA-G and TAA-M.

Notes: Lanes M, 1, and 2, molecular mass markers, TAA-G and TAA-M, respectively. Molecular mass markers for SDS-PAGE: lysozyme 14.3 kDa, trypsin inhibitor 20.1 kDa, carbonic anhydrase 29 kDa, lactate dehydrogenase 36.5 kDa, glutamate dehydrogenase 55 kDa, (wide range; Technical Frontier, Tokyo).

3-4 アミノ酸配列解析

Fig. 3-5 には TAA-G のアミノ酸配列を示した。長鎖が gJRL の α 鎖に対応し、短鎖が β 鎖に対応した。 β 鎖のアミノ酸配列解析を行った結果、22 残基のアミノ酸によって構成されていることが明らかになった。また、決定されたアミノ酸配列の計算値が MALDI-TOF MS の測定値 m/z 2,100 と一致した (Fig. 3-3)。一方、 α 鎖は N 末端配列解析の結果 64 番目のチロシンまでの配列を決定した。次に、キモトリプシンにより得られた 13 個の酵素消化断片とリジルエンドペプチダーゼにより得られた 4 個の酵素消化断片のアミノ酸配列解析を行った。決定された α 鎖の N 末端配列(Gly1- Tyr64)と酵素消化断片のアミノ酸配列の重複によって α 鎖の全長を決定した。この結果、 α 鎖は 134 残基のアミノ酸により構成されていることが明らかになった。また、決定した α 鎖のアミノ酸配列の計算値が MALDI-TOF MS の測定値と一致した (Fig. 3-3)。TAA-G と 5 種類の gJRL のアミノ酸配列相同性の比較を行った (Fig. 3-6)。ジャカリン、AHL (*Artocarpus hirsuta* lectin) 、フルタリン (*Artocarpus incisa* lectin) はクワ科パンノキ属に属している植物由来のレクチンである。TAA-G の相同性は ジャカリン 69%、MPA 71%、モルニガ G 75%であった。TAA-G は他の gJRLs とは異なり、79 番目と 80 番目のアミノ酸残基の位置に 2 残基のアミノ酸の挿入があり、C 末端残基の欠損があった。Fig. 3-7 は一次構造をもとにした gJRL の系統樹を示している。TAA-G はクワ科クワ属植物由来のモルニガ G と近いが、クワ科パンノキ属に属する植物由来の gJRLs からは系統的に遠かった。

β-Chain			
Jacalin	NEQSGKSQTIVVGSWGAK--VS	20	
AHL	---SGKSQTIVVGPWGAK----	15	
Frutalin	NEQSGKSQTIVVGPWGAK--VS	20	
MPA	-GPNGKSQSTTVGPWGDR-VTN	20	
Morniga-G	NQQSGKSQTIVVGTWGAQ-VTS	21	
TAA-G	NLGVGESQTIVVGPWGAKGSS	22	
	*:***: **.*:		
α-Chain			
Jacalin	GKAFDDGAF T GIREINLSYNKETAIGDFQVVYDLNGSPYVGNHKS F ITGFT P VKISLDF	60	
AHL	GKAFDDGAF T GIREINLSYNKETAIGDFQVVYDLNGSPYVGNHSS F ISGFT P VKISLDF	60	
Frutalin	GKAFDDGAF T GIREINLSYNKETAIGDFQVIYDLNGRPFVGNH S TFIKGFT P VKISLDF	60	
MPA	GVT F DDGAY T GIREIN F EY N SE T AIGGLRVTYDLNGMPFVAEDHKS F ITG F K P VKISL E F	60	
Morniga-G	G V AFDDGAY T GIREIN F EY N NE T AIG S IQV T YDVNG T PF E AK H AS F IKGFT Q VKISLDF	60	
TAA-G	G V S F DDG K Y T GIRE M N F EY N R R K T AIG G K Q V T YDLNG K P F AA E K H SS F IK D FT S VKISLDF	60	
	* :**** :*****:*.** :***** .:* **:* ** * : .:. * ****. .*. *****:*		
Jacalin	PSEYIMEVSGY T GNVSGY --VV VRSL T FK T N K K T Y G P Y G V T S G T PF N L P I E N G L I V G F K G	118	
AHL	PSEYITEVSGY T GNVSGY --VV VRSL T FK T N K K T Y G P Y G V T S G T PF N L P I E N G L I V G F K G	118	
Frutalin	PSEYI V EVSG H T G K V SGY --VV VRSL T FK T N K K T Y G P Y G V T S G T PF N L P I E N G L I V G F K G	118	
MPA	PSEYI V EVSGY V G K VEGY --TV VRSL T FK T N K Q T Y G P Y G V T N G T PF S L P I E N G L I V G F K G	118	
Morniga-G	PNEYI V EVSGY T G K LSGY --TV VRSL T FK T N K E T Y G P Y G V T S G T H F K L P T Q N G L I V G F K G	118	
TAA-G	PNEYI V EVSG H I G R V E G Y A E T V I R S L T FK T N K K T Y G P Y G V T N G A P F S L P I E N G I V G V K G	120	
	*.*** *****: .:.*** .*:*****:*****.*: *.* **:* **.***		
Jacalin	SIGY W L D Y F S M Y L S L	133	
AHL	SIGY W M D Y F S M Y L S L	133	
Frutalin	SIGY W M D Y F S M Y L S L	133	
MPA	SIGY W L D Y F S I Y L S L	133	
Morniga-G	SVGY W L D Y I G F H L S L	133	
TAA-G	SVGY W L D Y I G F H L S-	134	
	*:***:**:..:**		

Fig. 3-6. Comparison of the sequences of galactose-binding Jacalin-related lectins.

Notes: TAA-G sequence is aligned using CLUSTAL W [43] with other gJRLs, AHL: *Artocarpus hirsuta* lectin [86], Frutalin [87], Jacalin [88], MPA [88], Morniga G [61]. Shaded letters denote the residues found in the binding with T-antigen [89-91]. Asterisks indicate identical residues, and dashes or colons, similar residues. Arrows above sequence show β-strands of Jacalin (PBD code: 1UGW)

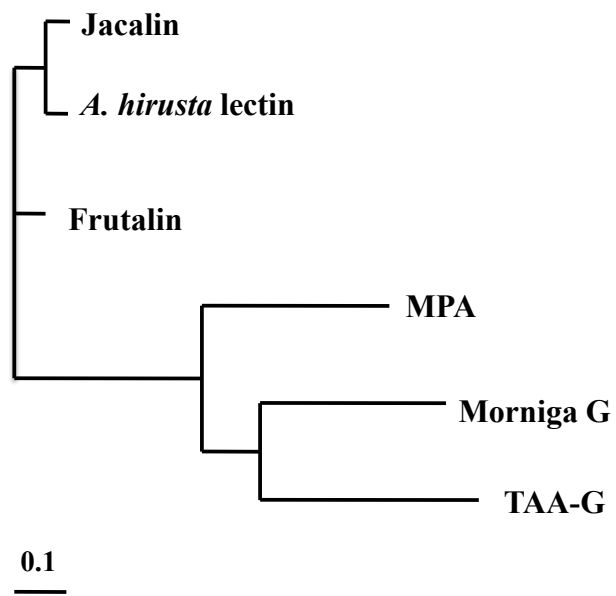


Fig. 3-7. A phylogenetic tree of gJRLs.
Notes: The phylogenetic tree based on Clustal W (ver. 1.83) was drawn by Phylodendron

3-5 中性糖の定量

フェノール硫酸法によりTAA-Gの糖含有量を測定した結果、1 mgのタンパク質当たり2.5 μg と少なかった (タンパク質1 mole当たり0.24糖残基)。

3-6 ELISA

TAA-Mは1次構造解析を行わなかったため、mJRLであるCCAの抗体を用いてELISAを行った。その結果、CCA抗体に対するCRLLの抗原抗体反応性を100%とした時、TAA-MのCCA抗体に対する反応性は38%であり、TAA-Gの反応性は18%であった。TAA-MはTAA-Gよりも高い抗原性を示した (Fig. 3-8)。

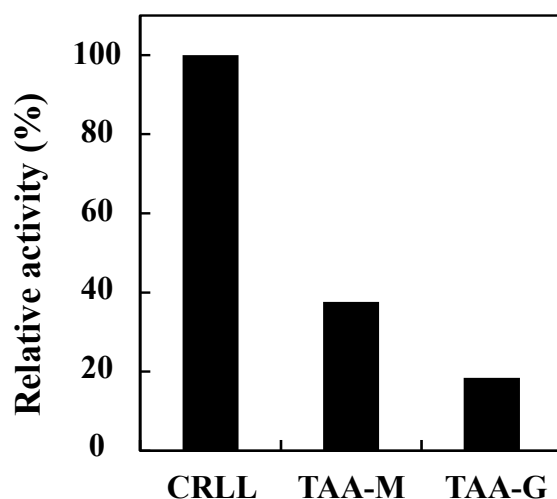


Fig. 3-8. Reactivities of TAAs against anti-CCA antibodies in comparison with CRLL.
Notes: The reactivities of lectin (2 μg) against anti-CCA antibodies were compared.
All the values were average of three determinations.

3-7 糖結合特異性

(1) 血球凝集活性阻害 (糖阻害)

TAA-GとTAA-Mに対する血球凝集活性阻害を調べた結果、TAA-Gに対する阻害効果はTAA-Mとは全く異なるものであった。TAA-Gはメチル- α -ガラクトシドとメリビオースによって阻害されたが、GalNAc- α -PNP、T抗原、Gal β 1-3GalNAc- α -PNPでは阻害されなかった。TAA-Gにはコア3糖鎖を持つGlcNAc β 1-3GalNAc- α -PNPが最も強力な阻害剤であったが、コア2糖鎖では阻害されなかった。糖タンパク質を用いた反応ではアシアロBSMが最も強力な阻害剤であったが、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ処理したアシアロBSMでは、アシアロBSMの血球凝集阻害濃度 0.156 μ g/mLと比較して0.624 μ g/mLとなり、血球凝集阻害効果は4分の1に低下した。これはTAA-GのアシアロBSMの認識にはコア3糖鎖構造が重要であることを意味している。これより、TAA-Gの糖鎖認識はこれまで報告されているgJRLsに比べて、ガラクトースを含む二糖やガラクトシドを他の糖よりも強く認識する、非常に特異的な糖鎖認識を示すレクチンであることを明らかにした。一方、TAA-Mはマンノース、メチル- α -マンノシド、オリゴマンノシド、高マンノース鎖を持った糖タンパクによって阻害された。アシアロサイログロブリンはTAA-Mの最も強力な阻害剤であることを明らかにした (Table 3-5)。

(2) グリカンアレイ

TAA-Gは Tn (*N*-アセチルガラクトサミン) または コア1糖鎖 (T抗原、Fig.3-11)は認識しなかった。構成糖鎖にTnとコア3糖鎖を含むアジアロBSMと構成糖鎖にコア1糖鎖を含むアジアログライコフォリンを強く認識した。またTAA-Gはコア3糖鎖 (Fig.3-11)とコア8糖鎖も認識した (Fig.3-10)。

Table. 3-5. Inhibition by sugars and glycoprotein of hemagglutinating activity of TAA-G and TAA-M

Inhibitor	Minimum inhibitory concentration	
	TAA-G	TAA-M
	(mM)	
Mannose	–	25
Man- α -Me	N.I. at 100	25
Man α 1-6(Man α 1-3) Man- α -Me	–	5.0
Mannopentaose	–	10.0
Gal- α -Me	25	N.I. at 100
Glc- α -Me	N.I. at 100	N.I. at 100
Melibiose	12.5	N.I. at 100
GlcNAc β 1-3GalNAc- α -PNP	1.56	–
	(ug / mL)	
BSM	1.0	–
Thyroglobulin (Bovine)	N.I. at 1000	125
Asialo-BSM	0.156	N.I. at 1000
Asialo-BSM (treated with N-acetyl glucosaminidase)	0.624	–
Asialo thyroglobulin (Bovine)	250	15.6
Asialofetuin	62.5	500
IgA	30	–
Quail ovomucoid	250	62.5

Minimum concentration required for the complete inhibition of titer 4 hemagglutinating activity. The following sugars and glycoproteins were not inhibitory: Galactose at 200mM; GalNAc, N-acetyl D-glucosamine, D-glucose and lactose up to 100mM; Gal- α -PNP at 50mM; Gal- β -PNP, GalNAc- α -PNP, GalNAc- β -PNP, Gal β 1-3GalNAc, Gal β 1-3GalNAc- α -PNP and core2- α -PNP at 25mM; fetuin and bovine thyroglobulin at 1mg/ml. N.I. = No inhibition, – ; No experiment

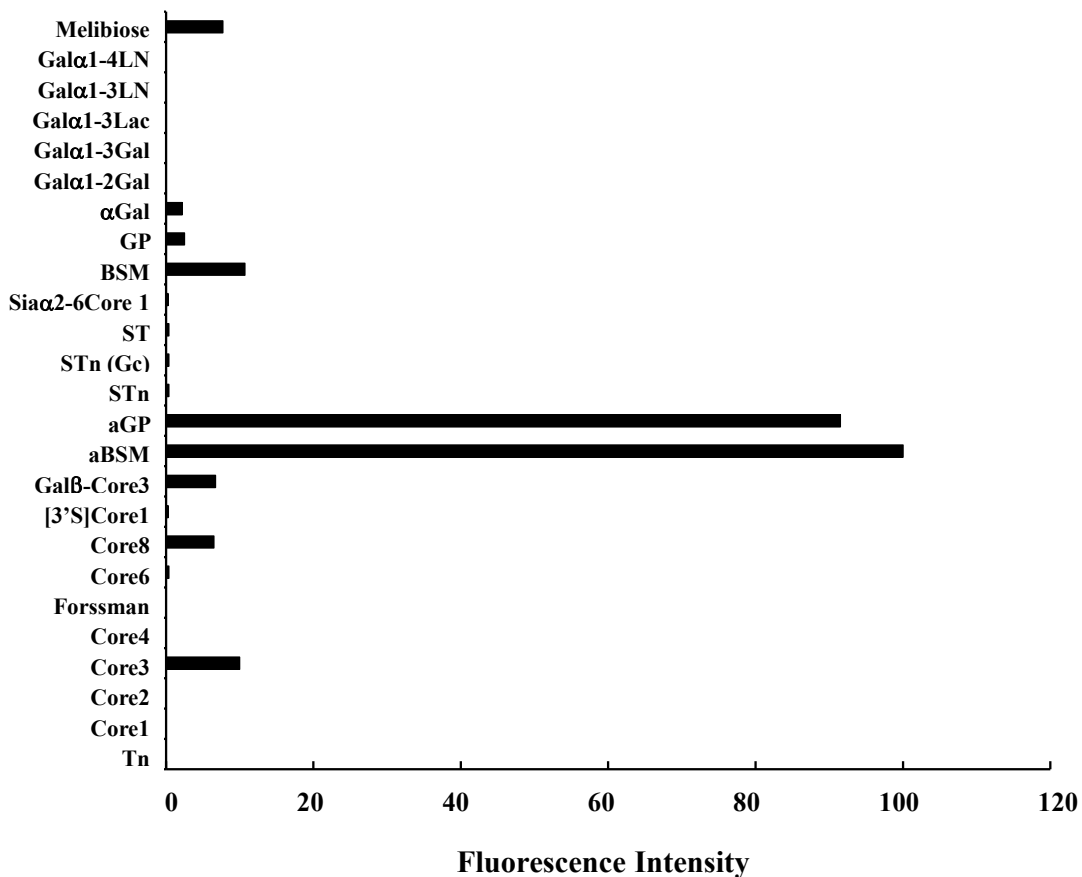


Fig. 3-10. Glycan array of TAA-G.
 Notes: Cy3-labeled TAA-G was applied on the glycoconjugate array, and binding was detected by the scanner. Scan image of TAA-G was analyzed with the Array Pro analyzer ver. 4.5.

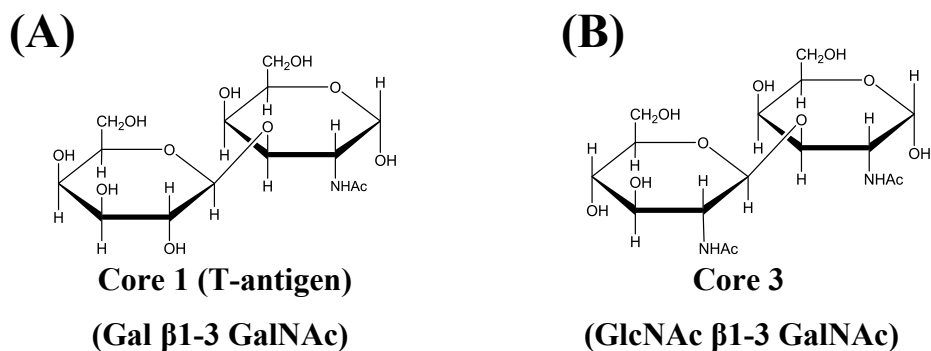


Fig. 3-11. Structural formulae of sugar ligands.

第四節 考察

クワ科植物パンノキ属に属するアフリカパンノキノ種子より、ガラクトースを認識するTAA-Gとマンノースを認識するTAA-Mを精製した。Limら[92]は、クワ科植物パンノキ属に属するチェンペダック (*Artocarpus integer*)に、ガラクトース認識タイプとマンノース認識タイプの2種類のJRLsを含んでいることを報告し、Van Dammeら[61]はクワ科植物クワ属に属するブラックマルベリーの種子と樹皮から同様の報告をしている。チェンペダック種子とブラックマルベリーの樹皮には、この2タイプのレクチンが豊富に含まれており、2種類のレクチンは全タンパク量の50%以上を占めている。一方、ブラックマルベリーの種子中に含まれるJRLsは少量である。ブラジルジャックフルーツ (*Artocarpus integrifolia*) 種子中にはgJRLであるジャカリンは多いが、mJRLであるKM+は非常に少ない。アフリカパンノキ種子は2種類のJRLsを含み、それらの合計は総可溶性タンパク質の約50%に相当した。TAA-GとTAA-MのNative PAGE とMALDI-TOF MS の結果は、タンパク質の不均一性を示した。JRLsではイソレクチンや糖鎖付加によるタンパク質の不均一性はよく見られる傾向であるため[57-59, 93]、TAA-Gへの糖鎖付加を確認するためにフェノール硫酸法によりTAA-Gの糖含有量を測定した結果、タンパク質1 mg当たり2.5 μ gと少なかった。さらに、TAA-Gの配列にN-結合型糖鎖修飾のコンセンサス配列である、Asn-X-Ser (Thr)は存在しなかったため、TAA-Gに糖鎖は付加していないと考えられ、TAA-Gのタンパク質の不均一性はイソレクチンに由来するものだと推測された。また、TAA-Gには β 鎖のN末端の欠損、 α 鎖の42残基目のグルタミン、62残基目のセリン、74残基目のリジン、94残基目のグリシン、102残基目のリジンとイソレクチンに由来する数個

のバリエーションの存在もアミノ酸配列解析により確認された。TAA-Gの糖鎖認識はマンノースアガロースカラムに対して吸着を示したため、ジャカリンやモルニガGと同様にマンノースを認識している[89, 94, 95]。また、グリカンアレイの結果より、コア3糖鎖に対しては他のgJRLsであるジャカリン[76]やMPA [77]と同様に、TAA-Gも高い親和性を示した。しかし、コア8糖鎖に対する親和性は、TAA-GとMPA [77]はコア8糖鎖に親和性を示したが、ジャカリンはコア8糖鎖[75]に対する親和性が非常に低かった。さらに、これまで報告されているgJRLsは、コア1糖鎖に対して高い親和性を示したが、TAA-Gはコア1糖鎖に対して親和性を示さなかった。また、血球凝集活性阻害の結果、TAA-GはGalNAc- α -PNP やGalNAc- α -Meでは血球凝集活性阻害を示さなかった。さらに、他のgJRL [67, 73, 74, 96]では、 α -ガラクトシドでアグリコンが疎水性のPNPや4-メチルウンベリフェリルに変わると相互作用が増大するが、TAA-Gではその効果も見られなかった。また、TAA-Gは他のgJRLs [73-75, 77]とは異なり、メリビオースによって強い血球凝集活性阻害を示した (Table. 3-5.)。

系統樹より、パンノキ属由来のTAA-Gは他のパンノキ属由来gJRLsからは系統的に遠く、クワ属由来gJRLのモルニガGと系統的に近いことが示された (Fig. 3-7)。しかし、糖鎖認識のパターンはモルニガGと他のgJRLsは類似しており、コア3糖鎖を特異的に認識するTAA-Gとは異なるものであった。

JRLsの基本構造は4つの β シートからなるGreek-Key構造3つで形成されている。gJRLsは基本構造を構成するGreek-Key構造の内の末端のターン部分が開裂し、1つの β シートからなる β 鎖と、残りの部分からなる α 鎖で構成される。gJRLsの結晶構造学的解析により、糖結合サイトは3個のループ(アミノ酸残基46-52、76-82、

122–125)と α 鎖のN末端のグリシンを含むことを示した[86, 88, 97, 98]。gJRLsの primary binding siteはガラクトースとN-アセチルガラクトサミン残基を認識することができる。しかしながら、TAA-Gは他のgJRLsの primary binding siteと共通する4残基のアミノ酸 (Gly1, Tyr122, Trp123, Asp125) 含んでいたが、T抗原といくつかのN-アセチルガラクトサミンの α -配糖体 (GalNAc- α -) を認識することはできなかつた。しかし、TAA-Gはコア3糖鎖やコア8糖鎖に対して親和性を示したため、TAA-Gの primary binding siteはコア3糖鎖やコア8糖鎖のGalNAc- α -残基を収容できるのかもしれない。TAA-Gの特異的な糖鎖認識は、 α 鎖のアミノ酸残基78番と79番に他のgJRLsにはない2残基のアミノ酸の挿入が関係し、糖とTAA-Gの相互作用に変化を与えていると推測した。なぜならば、MPAに含まれている78番目のチロシン と79番目のスレオニン (パンノキ属 gJRLsでは79番目のバリリン)が糖とレクチンの認識に関わっているからである。そこで、ジャカリンの結晶構造解析データ(PDB code: 1UGX)をもとに、タンパク質構造解析ソフトMOEを使用して、TAA-Gのホモロジーモデリングとドッキングシミュレーションを行った。しかし、ジャカリンとTAA-Gにおいて、T抗原とコア3糖鎖に対する糖鎖認識に大きな違いは見られなかつた。また、ジャカリンのアミノ酸配列の78番目にアラニン、79番目にグルタミン酸を加えた配列 (Jacalin+AE) をモデリングし、同じくドッキングシミュレーションを行った結果においても、T抗原とコア3糖鎖に対する糖鎖認識に大きな違いは見られなかつた。Ravalら[88]は、データベース解析を用いたジャカリン様レクチンの配列と構造と機能の関係について、20–23番目のアミノ酸残基から構成される4番目のループとその周辺のアミノ酸残基もまた構造に影響を与え、それ故にジャカリンの特徴が現れると報告

している。このループに含まれる20–23番目のアミノ酸残基と周辺の24番目と25番目のアミノ酸残基が、ジャカリンで示すところのアミノ酸残基、20番目のアスパラギンと50番目のグリシン、22番目のグルタミン酸と82番目のアルギニン、23番目のスレオニンとArg82番目のアルギニン、24番目のアラニンと75番目のバリン、25番目のイソロイシンと124番目のロイシンに対応し、相互作用を示す[86]。TAA-Gでは、22番目のグルタミン酸と50番目のグリシンが、リジンとアスパラギン酸にそれぞれ置換されている。さらに、79番目と80番に2残基のアミノ酸の挿入がされ、結果として82番目のアルギニンの位置がシフトしていると推測される。TAA-Gの糖結合特異性とタンパク質の構造の更なる解明のために、TAA-Gの結晶構造学的研究が必要である。

Fig. 3-8 は抗CCA抗体に対する、CRLIとアフリカパンノキ種子に含まれる2種類のレクチン（TAA-MとTAA-G）の反応性を示している。CRLI、TAA-M、TAA-Gの反応性はそれぞれ100%、37.6%、18.4%であり、アフリカパンノキ種子から得られた2種類レクチンはJRLsであることを示している。またTAA-Mは、血球凝集活性がトリマンノシドやマンノペンタオースで強く阻害され、これはモルニガM やアルトカルピンがこれらの糖鎖を強く認識するmJRLの特徴を持つことに合致する[99]。

gJRLsは幅広い糖結合特異性を持っている。しかし、TAA-Gはコア3糖鎖とコア8糖鎖を認識するが、T抗原とN-アセチルガラクトサミンは認識しない。TAA-Gの非常に特異的な糖結合特異性は、コア3糖鎖の検出に有用であり、新しい糖鎖検出のツールとして期待される。

第五節 小括

アフリカパンノキ種子よりマンノースアガロースカラムとメリビオースアガロースカラムを用いて、ガラクトース認識タイプのTAA-Gとマンノース認識タイプのTAA-Mの2種類のJRLsを精製した。それぞれの収量はTAA-Gが7.0 mg/g、TAA-Mが7.2 mg/gであった。TAA-Gの一次構造解析は、プロテインシークエンサーを用いて、N末端配列解析ならびに、プロテアーゼを用いた酵素消化断片を分析して決定した。TAA-Gのアミノ酸配列相同性は、これまでに報告されている gJRLsと比較して約70%と高かった。しかし、他のgJRLとは異なりTAA-Gには糖鎖認識部位の近傍に2残基のアミノ酸の挿入があった。gJRLの結晶構造学的解析では、他のJRLsのprimary binding siteはガラクトースとN-アセチルガラクトサミン、T抗原 (Gal β 1-3GalNAc α -) の還元末端に位置するN-アセチルガラクトサミンを認識することができる。しかしながら、TAA-Gは血球阻害活性やグリカンアレイ解析から、単糖のN-アセチルガラクトサミンやT抗原を認識せず、メリビオースやコア3 O-結合型糖鎖を認識することが明らかになった。

第四章 総括

本研究は、レクチンの多様な機能性に基づき、様々な分野でのレクチンの応用・利用の一助となるべく、シバフタケ子実体およびアフリカパンノキ種子から特異的な糖結合性を示す新規レクチンを単離し、構造と諸性質を明らかにしたものである。

本研究を開始するにあたり、最も留意すべき点はサンプルの採取場所と時期である。植物やキノコでは、生育時期が限られること、生育環境が異なると発現するタンパク質に差異があることが知られているため、実際に血球凝集活性や構造決定等を行ったサンプルは同時期、同じ場所で採取されたものを使用して研究を行った。

Kruger[38]らによって、2002年に欧米で食用キノコとされるシバフタケ子実体から MOA が単離された。MOA は B 型血球凝集活性を持ち、Gal α 1-3Gal に対して強い相互作用を示す RIP タイプのレクチンであることが報告されている。しかし、日本産シバフタケ子実体には、米国産シバフタケ子実体に含まれる MOA は存在せず、第一章の Table 1-1 に示した 12 種類の植物レクチンファミリーのうち、GNA (スノードロップレクチン) [50]様のレクチンである MOL が含まれることを明らかにした。これまで、GNA ファミリーのレクチンは、キノコを含む菌界のなかでは子囊菌亜門に属する *Fusarium verticillioides* [47]に遺伝子が見いだされていたがタンパク質としての性質は明らかにされていなかった。GNA ファミリーは、単子葉植物マンノース結合レクチン(Monocots mannose-binding lectin・MMBL)とも称され、このファミリーのレクチンについては最近

Bacteriocin との相同性が明らかになっている [100]。GNA の殺虫性については、これまでにも報告されており、この機能性を利用して遺伝子組み換え作物を製作する試みが行われてきている。MOL の糖結合特異性は、マンノースに特異的に結合する GNA とは異なるが、アシアロフェツイン糖鎖に高い親和性を持つという MOL の特徴を生かし、今後の広汎な応用に期待がもたれるであろう。

アフリカで食用とされているアフリカパンノキには、Adeniran ら [82]によって 2009 年にマンノース認識レクチンの存在が報告されていたが、その構造や性質などの詳細は明らかになってはいなかった。しかし、本研究によってアフリカパンノキの種子中にジャカリン近縁レクチン (JRLs)ファミリーに属する 2 種類のレクチンを確認した。これは、先行研究によって報告されていたレクチンとは異なるものであった。2 種類のレクチンは、ガラクトース認識型ジャカリン近縁レクチン(gJRL)とマンノース認識型ジャカリン近縁レクチン(mJRL)である。パンノキ属の植物に gJRL が含まれるという報告はこれまでにもされているが、gJRL と mJRL を同時に含む報告は、ブラックマルベリーやジャックフルーツなど数例である。また、TAA-G は従来の gJRLs とは異なり、糖鎖認識部位近傍のアミノ酸残基 78 番目と 79 番目の間に 2 残基のアミノ酸が挿入されている。さらに、血球凝集活性阻害と グリカンアレイ解析により、これまでの gJRL と異なり、T 抗原 (Gal β 1-3GalNAc α -) を認識せず、がん細胞の悪性化に関与するコア 3 O-結合型糖鎖 (GlcNAc β 1-3GalNAc α -) を特異的に認識することを明らかにした。TAA-G の糖結合特異性が、糖鎖認識部位近傍のアミノ酸 2 残基の挿入に起因するものかは、X 線結晶構造解析の精密な構造解析が待たれることとなる。一方、TAA-M は mJRL である日本クリレクチン抗体との反応性と糖結合特異性

から mJRL と判断した。TAA-M の糖結合特異性はトリマンノシドとマンノペンタオースに対して高く、典型的な mJRL の糖鎖認識を示した。

本研究でサンプルとして用いた、日本産シバフタケ子実体とアフリカパンノキは、欧米やアフリカにおいて一般的に食用とされているものである。今回、サンプルとして用いたものだけでなく、レクチンを含む食物は数多く存在する。これらをふまえてレクチンを含む食品を摂取した際に有害であるかどうか、人体に影響を与えるか否かを考察する必要があると考えられる。

一般的に食物に含まれるレクチンによって引き起こされる害には2種類ある。リシンタイプのレクチンのように [2]、特殊なレクチンによって惹起される場合と腸管に吸着する四角豆レクチンのように [101]、食品中に含まれるレクチンが腸管などの消化器官に吸着して細胞を損傷し、結果的に栄養成分の吸収が抑えられる場合がある。しかし、食品中に含まれるレクチンの場合、特に考慮しなければならないことは、糖に対する結合の強さ、食品中のレクチンの含有量、そしてレクチンのタンパク質としての安定性である。

豆科植物レクチンの食品成分としての毒性については古くから研究されており [102, 103]、最近の研究では、豆科植物レクチンについて、食品の質やリスクにどう関わるかをプロテオーム解析する試みも報告されている [104]。本研究で新たに発見された MOL や TAA-G、TAA-M についても食品としての安全性を検討する必要がある。

まずシバフタケ子実体については、MOA は RIP タイプのレクチンであると同時に、システインプロテアーゼ活性を保持している [12]。このため、ウサギを用いて MOA 抗体を調製しようとした結果、すべてのウサギが死亡してしまった。

これは MOA が RIP タイプのレクチンであったことが原因であるというよりも、MOA にプロテアーゼ活性が含まれていたことが原因であると考えられる。なぜならば、同様にウサギを用いて抗体作製を試みた RIP タイプのキノコレクチン PSL [105] では問題なく抗血清を調製できたためである。一方、MOL については、GNA 様のレクチンであり、MOL の含有量は 21.6 mg/100 g 子実体と算出された。GNA ファミリーのレクチンは他のレクチンファミリーと比較すると、血球凝集活性は高くない傾向にあり（数百–数千 titer/mg）、MOL の比活性も 1,500 titer/mg であった。この値は、豆科植物レクチンで認められる非常に高い比活性（5 万~）と比較するとかなり低いことが分かる。さらに、熱安定性も低く、70°C で 30 分の加熱により完全に血球凝集活性を失活したため、調理してあれば摂取時に問題はないと考えられた。また GNA 様レクチンの中で熱安定性が高いされる里芋 (*Colocasia antiquorum*) レクチンの毒性について検討されている [106]。このレクチンはマウス kg あたり 300 mg を腹腔内投与してもマウスは生存しており、1 mg/kg をウサギに腹腔内投与して死亡する MOA に比較すると毒性は極めて弱いと考えられる。

次に、アフリカパンノキに含まれる 2 種類の JRLs についてである。パンノキ属の種子は長い年月の間、食用・薬用とされて来たこと [107]、また TAA-G、TAA-M の熱安定性を調べたところ、TAA-G は 70°C、30 分で完全に血球凝集活性を失い、TAA-M は 75% の血球凝集活性を失った。これより、TAA-G と TAA-M も、熱安定性が低いという結果が得られ、アフリカパンノキのレクチンも基本的に食品としてのリスクはないと推測された。しかし、リンゴパンノキ (*A. lakoocha*) レクチンのように細胞毒性を示すものもあり [108]、TAA-G と

TAA-M の他の活性については今後の更なる研究が待たれることとなる。

本研究では、植物に存在するスノードロップ型レクチン (GNA 様レクチン) を担子菌・日本産シバフタケより初めて見出した。またアフリカパンノキから従来の gJRL とは異なるコア 3 O-結合型糖鎖に選択性の高い TAA-G を見出した。本研究結果は、レクチンの利用分野において新規糖鎖認識レクチンを提供するものである。

参考文献

- [1] Stillmark H. Uber Ricin ein giftigs Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L. und einigen andersen Euphobiaceen. 1888. Thesis Univ. Dorpat, Estonia
- [2] Cummings RD, Etzler ME. R-type lectins. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bortorzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. Essentials of Glycobiology 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. p. 403-414.
- [3] Landsteiner K, Raubitschek H. Beobachtungen über Hämolyse und Hemagglutination. Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung I. Originale. 1908-1945: 660-667.
- [4] Sumner JB. The globulins of the jack bean, *Canavalia ensiformis*. J. Biol. Chem. 1919; 37: 137-142.
- [5] Sumner JB, Howell SF. The identification of hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. J. Bacteriol. 1936; 32: 227-237.
- [6] Renkonen KO. Studies on hemagglutinins present in seeds of some representatives of leguminosae. Ann. Med. Exp. Fenn. 1948; 26: 66-72.
- [7] Boyd WC, M. R. Reguera RM. Hemagglutinating substances in various plants. J. Immunol. 1949; 62: 333-339.
- [8] Boyd WC, Shapleigh E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). Science. 1954; 119: 419.
- [9] Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T, Sharon N. What should be

called a lectin. *Nature*. 1985; 285: 66.

[10] Barondes SH. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends Biochem. Sci.* 1988; 13: 480-482.

[11] Endo Y, Tsurugi K. RNA *N*-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *J. Biol. Chem.* 262; 1987: 8128-8130.

[12] Cordara G, Egge-Jacobsen W, Johansen HT, Winter HC, Goldstein IJ, Sandvig K, Krenzel U. *Marasmius oreades* agglutinin (MOA) is chimerolectin with proteolytic activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2011; 408: 405-410.

[13] Van Damme EJM, Lannoo N, Peumans WJ. Plant lectins. *Adv. Bot. Res.* 2008; 48, 107–209.

[14] Ashwell G, Morell AG. Membrane glycoproteins and recognition phenomena. *Trends Biochem. Sci.* 1972; 2: 76-78

[15] Etzler ME, Suloria A, Cummings RD. L-type lectin. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bortorzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. *Essentials of Glycobiology* 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. p. 415-424.

[16] Vark A, Kornfeld S. P-type lectins. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bortorzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. *Essentials of Glycobiology* 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. p. 425-437.

[17] Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological

recognition molecules. *Glycobiology*. 2004; 14: 53R-62R.

[18] Tateno H, Mori A, Uchiyama N, Yabe R, Iwaki J, Shikanai Y, Angata T, Narimatsu H, Hirabayashi J. Glycoconjugate microarray based on an evanescent-field fluorescence-assisted detection principle for investigation of glycan-binding proteins. *Glycobiology*. 2008; 18: 789-798.

[19] Ovelaran O, Gildersleeve JC. Glycan arrays: recent advances and future challenges. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2009; 13: 406-413.

[20] Hirabayashi J, Yamada J, Atsushi, K, Tateno H. Lectin microarray: Concept, principle and applications. *Chem. Soc. Rev.* 2013; 42: 4443-4458.

[21] Caria O, Jose AT, Lucillia D. Recombinant lectins: An application of tailor-made glycan-interaction biosynthetic tools. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2013; 33: 66-80.

[22] Goldstein IJ. Lectin structure-activity: The story is never over. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 6583-6585.

[23] Van Damme EJM, Peumans WJ, Barre A, Rougé P. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit. Rev. Plant Sci.* 1998; 17: 575-692.

[24] http://www.kahaku.go.jp/userguide/hotnews/theme.php?id=000132911_0970943&p=2

[25] Pemberton RT. Hemagglutinins (lectins) in fruit bodies of British higher fungi. *Mycol. Res.* 1994; 98: 277-290.

[26] Yagi F, Sakai T, Shiraishi N, Yotsumoto M, Mukoyoshi R. Hemagglutinins (lectins) in fruit bodies of Japanese higher fungi. *Mycoscience*. 2000; 41: 323-330.

- [27] Kobayashi Y, Ishizaki T, Kawagishi H. Screening of lectins in wild and cultivated mushrooms from Japan and their sugar-binding specificities. *Int. J. Med. Mushroom.* 2004; 6: 117-129.
- [28] Singh RS, Bhari R, Kaur HP. Mushroom lectins: Current status, future perspectives. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2010; 30: 99-126.
- [29] Ford WW. The distribution of haemolysins, agglutinins and poisons in fungi, especially the Amanitas, the Entolomas, the Lactarius and the Inocybes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1910; 2: 285-318.
- [30] Fukumori F, Takeuchi N, Hagiwara T, Ito K, Kochibe N, Kobata A, Nagata Y. Cloning and expression of a functional fucose-specific lectin from an orange peel mushroom, *Aleuria aurantia*. *FEBS Lett.* 1989; 250: 153–156.
- [31] Tanaka S, Ko K, Kino K, Tsuchiya K, Yamashita A, Murasugi A, Sakuma S, Tsunoo H. Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8). An immunomodulator from a fungus, *Ganoderma lucidum*, having similarity to immunoglobulin variable regions. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 16372-16377.
- [32] Goldstein IJ, Winter HC: Mushroom Lectins. In: Kamerling JP. editor. *Comprehensive glycoscience*, vol. 3. Amsterdam; Elsevier; 2007. p. 601-621.
- [33] Goldstein IJ, Winter HC, Aurandt J, Confer L, Adamson JT, Hakansson K, Remmer H. A new alpha-galactosyl-binding protein from the mushroom *Lyophyllum decastes*. *Arch. Biochem. Biophys.* 2007; 467: 268-274.

- [34] Kobayashi Y, Tateno H, Dohra H, Moriwaki K, Miyoshi E, Hirabayashi J, Kawagishi H. A novel core fucose-specific lectin from the mushroom *Pholiota squarrosa*. J. Biol. Chem. 2012; 287: 33973-33982.
- [35] Sharon N, Lis H. Lectins as cell recognition molecules. Science. 1989; 246:227-246.
- [36] Fouquaert E, Hanton SL, Balzarini F, Peumans WJ, Van Damme EJM. Localization and topogenesis studies of cytoplasmic and vacuolar homologs of the *Galanthus nivalis* agglutinin. Plant Cell Physiol. 2007; 48: 1010-1021.
- [37] Liu Q, Wang H, Ng, TB. First report of a xylose-specific lectin with potent hemagglutinating, antiproliferative and anti-mitogenic activities from a wild ascomycete mushroom. Biochim. Biophys. Acta. 2006; 1760: 1914–1919.
- [38] Kruger RP, Winter HC, Simonson-Leff N, Stuckey JA, Goldstein IJ, Dixon JE. Cloning, expression, and characterization of the Gal α 1,3Gal high affinity lectin from the mushroom *Marasmius oreades*. J. Biol. Chem. 2002; 277: 15002-15005.
- [39] Koga K. Comparative chemical studies on the proteins in the quail and chicken egg whites (I) electrophoresis, CM-cellulose chromatography and gradient extraction with salt on the whole white. Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ. 1969; 7: 15-33.
- [40] Koga K, Fukunaga T. Comparative chemical studies on the proteins in the quail and chicken egg whites : (II) On the ovalbumin. Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ. 1974; 10: 103-116.
- [41] Hewick RM, Hunkapiller MW, Hood LE, Dreyer WJ. A gas-liquid phase peptide and protein sequenator. J. Biol. Chem. 1981; 256: 7990-7997.

- [42] Sanger F, Nicklen S, Chase A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1977; 74: 5463 – 5468.
- [43] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4: 406-425.
- [44] Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 1978; 166: 368-79.
- [45] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 256-275.
- [46] Peumans WJ, Barre A, Bras J, Rougé P, Proost P, Van Damme EJM. The liverwort contains a lectin that is structurally and evolutionary related to the monocot mannose-binding lectins. *Plant Physiol.* 2002; 129: 1054–1065.
- [47] Fouquaert E, Peumans WJ, Gheysen G, Van Damme EJM. Identical homologs of the *Galanthus nivalis* agglutinin in *Zea mays* and *Fusarium verticillioides*. *Plant Physiol.* 2011; 49: 46-54.
- [48] Van Damme EJM, Smeets K, Engelborghs I, Aelbers H, Balzarini J, Pusztai A, Leuven F, Goldstein IJ, Peumans WJ. Cloning and characterization of the lectin cDNA clones from onion, shallot and leek. *Plant Mol. Biol.* 1993; 23: 365-376.
- [49] Van Damme EJM, Nakamura-Tsuruta S, Smith DF, Ongenaert M, Winter HC, Rouge P, Goldstein IJ, Mo H, Kominami J, Culerrier R, Barre A, Hirabayashi J, Peumans WJ. Phylogenetic and specificity studies of two-domain GNA-related lectin: generation of multispecificity through domain duplication and divergent evolution. *Biochem. J.* 2007; 404: 51-61.

- [50] Van Damme, EJM, Kaku H, Perini F, Goldstein IJ, Peeters B, Yagi F, Decock B, Peumans WJ. Biosynthesis, primary structure and molecular cloning of snowdrop (*Galanthus nivalis* L.) lectin. Eur. J. Biochem. 1991; 202: 23-30.
- [51] Bhat GG, Shetty KN, Nagre NN, Neekhra VV, Lingaraju S, Bhat RS, Inamdar SR, Suguna K, Swamy BM. Purification, characterization and molecular cloning of a monocot mannose-binding lectin from *Remusatia vivipara* with nematicidal activity. Glycoconj. J. 2010; 27: 309-320.
- [52] Elo J, Estola E, Malmstrom N. On phytoagglutinins present in mushrooms. Ann. Med. Exp. Fenn. 1951; 29: 297-308.
- [53] Elo J, Estola E. Phytoagglutinins present in *Marasmius oreades*. Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. 1952; 30: 165–167.
- [54] Yagi F, Iwaya T, Haraguchi T, Goldstein IJ. The lectin from leaves of Japanese cycad, *Cycas revoluta* Thunb. (gymnosperm) is a member of the jacalin-related family. Eur. J. Biochem. 2002; 269: 4335-4341.
- [55] Tateno H., Winter HC, Petryniak J, Goldstein IJ. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of novel members of jacalin-related lectins from rhizomes of the true fern *Phlebodium aureum* (L) J. Smith (Polypodiaceae). J. Biol. Chem. 2003; 278: 10891-10899.
- [56] Peumans WJ, Hause B, Van Damme EJM. The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. FEBS Lett. 2000; 477: 186-192.
- [57] Young NM, Johnston RAZ, Szabo AG, Watson DC. Homology of the

D-galactose-specific lectins from *Artocarpus integrifolia* and *Maclura pomifera* and the role of an unusual small polypeptide subunit. Arch. Biochem. Biophys. 1989; 270: 596-603.

[58] Young NM, Johnston RA, Watson DC. The amino-acid-sequences of Jacalin and the *Maclura pomifera* agglutinin. FEBS Lett. 1991; 282: 382-384.

[59] Young NM, Watson DC, Thibault P. Mass-spectrometric analysis of genetic and posttranslational heterogeneity in the lectins Jacalin and *Maclura pomifera* agglutinin. Glycoconj. J. 1995; 12: 135-141.

[60] Pratap JV, Jeyaprakash AA, Rani PG, Sekar K, Surolia A, Vijayan M. Crystal structures of artocarpin, a Moraceae lectin with mannose specificity, and its complex with methyl- α -D-mannose: implications to the generation of carbohydrate specificity. J. Mol. Biol. 2002; 317: 237-247.

[61] Van Damme EJM, Hause B, Hu J, Barre A, Rougé P, Proost P, Peumans WJ. Two distinct jacalin-related lectins with a different specificity and subcellular location are major vegetative storage proteins in the bark of the black mulberry tree. Plant Physiol. 2002; 130: 757-769.

[62] De Miranda Santos IKF, Mengel Jr, Bunn-Moreno MM, Campos-Neto A. Activation of T and B cells by a crude extract of *Artocarpus integrifolia* is mediated by a lectin distinct from jacalin. J. Immunol. Methods. 1991; 140: 197-203.

[63] Brausch JN, Poretz RD. Purification and properties of the hemagglutinin from *Maclura pomifera* seeds. Biochemistry. 1977; 16: 5790-5794.

[64] Moreira RA, Ainouz IL. Lectins from seeds of Jack fruit (*Artocarpus integrifolia*

- L) - isolation and purification of 2 isolectins from the albumin fraction. Biol. Plant (Praha). 1981; 23: 186-192.
- [65] Chowdhary S, Ahmed H, Chatterjee BP. Purification and characterization of an α -D-galactosyl-binding lectin from *Artocarpus lakoocha* seeds. Carbohyd. Res. 1987; 159: 137-148.
- [66] Hashim OH, Ng CN, Gendeh GS, Nik Jaafar MI. IgA binding lectins isolated from distinct *Artocarpus* species demonstrate differential specificity. Mol. Immunol. 1991; 28: 393-398.
- [67] Gurjar MM, Khan MI, Gaikwad SM. α -Galactoside binding lectin from *Artocarpus hirsuta*: characterization of the sugar specificity and binding site. Biochim. Biophys. Acta. 1998; 1381: 256-264.
- [68] Moreira RA, Castelo-Branck CC, Monteiro ACO, Tavares RO, Beltramini LM. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. Phytochemistry. 1998; 47: 1183-1188.
- [69] Sarkar M, Wu AM, Kabat EA. Immunochemical studies on the carbohydrate specificity of *Maclura pomifera* lectin. Arch. Biochem. Biophys. 1981; 209: 204-218.
- [70] Chatterjee BP, Ahmed H, Chowdhary S. Further characterization of *Artocarpus-lakoocha* lectin (*Artocarpin*) purified using rivanol. Carbohyd. Res. 1988; 180: 97-110.
- [71] Ahmed H, Chatterjee BP. Further characterization and immunochemical studies on the carbohydrate specificity of jackfruit (*Artocarpus Integrifolia*) lectin. J. Biol. Chem. 1989; 264: 9365-9372.

- [72] Rahman MA, Karsani SA, Othman J, Rahman PSA, Hashim OH.
Galactose-binding lectin from the seeds of champedak (*Artocarpus integer*):
sequences of its subunits and interactions with human serum *O*-glycosylated
glycoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2002; 295: 1007-1013.
- [73] Wu AM, Wu JH, Lin JH, Lin SH, Liu JH. Binding profile of *Artocarpus
integrifolia* agglutinin (Jacalin). *Life Sci.* 2003; 72: 2285-2302.
- [74] Singh T, Wu JH, Peumans WJ, Rouge P, Van Damme EJM, Wu AM.
Recognition profile of *Morus nigra* agglutinin (Morniga G) expressed by monomeric
ligands, simple clusters and mammalian polyvalent glycotopes. *Mol. Immunol.* 2007;
44: 451-462.
- [75] Mahanta BJ, Sastry SK, Surolia A. Topography of the combining region of a
Thomsen-Friedenreich-antigen-specific lectin jacalin (*Artocarpus integrifolia*
agglutinin). A thermodynamic and circular-dichroism spectroscopic study. *Biochem. J.*
1990; 265: 831-840.
- [76] Tachibana K, Nakamura S, Wang H, Iwasaki H, Tachibana K, Maebara K, Cheng
LM, Hirabayashi J, Narimatsu H. Elucidation of binding specificity of Jacalin toward
O-glycosylated peptides: quantitative analysis by frontal affinity chromatography.
Glycobiology. 2006; 16: 46-53.
- [77] Huang J, Xu Z, Wang D, Ogata CM, Palczewski K, Lee X, Young NM.
Characterization of the secondary binding sites of *Maclura pomifera* agglutinin by
glycan array and crystallographic analyses. *Glycobiology.* 2010; 20: 1643–1653.
- [78] Iwai T, Kudo T, Kawamoto R, Kubota T, Togayachi A, Hiruma T, Okada T,

Kawamoto T, Morozumi K, Narimatsu H. Core 3 synthase is down-regulated in colon carcinoma and profoundly suppresses the metastatic potential of carcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005; 102: 4572-4577.

[79] Lee SH, Hatakeyama S, Yu SY, Bao X, Ohyama C, Khoo KH, Fukuda MN, Fukuda M. Core3 *O*-glycan synthase suppresses tumor formation and metastasis of prostate carcinoma PC3 and LNCaP cells through down-regulation of $\alpha 2\beta 1$ integrin complex. J. Biol. Chem. 2009; 284:17157-17169.

[80] Kabir S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunological research. J. Immunol. Methods. 1998; 212: 193-211.

[81] Bies C, Lehr CM, Woodley JF. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. Advanced Drug Delivery Reviews. 2004; 56: 425-435.

[82] Adeniran OA, Kuku A, Obuotor ME, Agboola FK, Famurewa AJ, Osasan S. Purification, characterization and toxicity of a mannose-binding lectin from the seeds of *Treculia africana* plant. Toxicol. Environ. Chem. 2009; 91: 1361-1374.

[83] Nakamura S, Ikegami A, Mizuno M, Yagi F, Nomura K. The expression profile of lectin differs from that of seed storage proteins in *Castanea crenata* trees. Biosci. Biotech. Biochem. 2004; 68:1698- 1705.

[84] Davis BJ. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum protein. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1964; 121: 404-427.

[85] Dubois M, Gilles KA, Hamilton HK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 1956; 28: 350-356.

- [86] Rao KN, Suresh CG, Katre UV, Gaikwad SM, Khan MI. Two orthorhombic crystal structures of a galactose-specific lectin from *Artocarpus hirsuta* in complex with methyl- α -D-galactose. *Acta Crystallogr. Sect.D.* 2004; 61: 1404-1412.
- [87] Oliveira C, Costa S, Teixeira JA, Domingues L. cDNA cloning and functional expression of the α -D-galactose-binding lectin frutalin in *Escherichia coli*. *Mol. Biotechnol.* 2009; 43: 212-220.
- [88] Raval S, Gowda SB, Singh DD, Chandra NS. A database analysis of jacalin-like lectins: sequence-structure-function relationships. *Glycobiology.* 2004; 14: 1247-1263.
- [89] Rougé P, Peumans WJ, Barre A, Van Damme EJM. A structural basis for the difference in specificity between the two jacalin-related lectins from mulberry (*Morus nigra*) bark. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2003; 304: 91-97.
- [90] Lee X, Thompson A, Zhang Z, Ton-that H, Biesterfeldt J, Ogata C, Xu L, Johnston RA, Young NM. Structure of the complex of *Maclura pomifera* agglutinin and the T-antigen disaccharide, Gal β 1,3GalNAc. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 6312-6318.
- [91] Jeyaprakash AA, Rani PG, Reddy GB, Banumathi S, Betzel C, Sekar K, Surolia A, Vijayan M. Crystal structure of the jacalin-T-antigen complex and a comparative study of lectin-T-antigen complexes. *J. Mol. Biol.* 2002; 321: 637-645.
- [92] Lim SB, Chua CT, Hashim OH. Isolation of a mannose-binding and IgE- and IgM-reactive lectin from the seeds of *Artocarpus integer*. *J. Immunol. Methods.* 1997; 209: 177-186.

- [93] Yang H, Czaplá TH. Isolation and characterization of cDNA clones encoding jacalin isolectins. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 5905-5910.
- [94] Bourne Y, Astoul CH, Zamboni V, Peumans WJ, Menu-Bouaouiche L, Van Damme EJM, Barre A, Rougé P. Structural basis for the unusual carbohydrate-binding specificity of jacalin towards galactose and mannose. *Biochem. J.* 2002; 364: 173-180.
- [95] Jeyaprakash AA, Jayashree G, Mahanta SK, Swaminathan CP, Sekar K, Surolia A, Vijayan, M. Structural basis for the energetics of Jacalin–sugar interactions: promiscuity versus specificity. *J. Mol. Biol.* 2005; 347: 181-188.
- [96] Gupta D, Rao NV, Puri KD, Matta KL, Surolia A. Thermodynamic and kinetic studies on the mechanism of binding of methylumbelliferyl glycosides to Jacalin. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 8909-8918 (1992).
- [97] Sankaranayanan R, Sekar K, Bannerjee R, Sharma V, Surolia A, Vijayan M. A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a *Moraceae* plant lectin with a β -prism fold. *Nature Struct. Biol.* 1996; 3: 596-603.
- [98] Jeyaprakash AA, Katiyar S, Swaminathan CP, Sekar K, Surolia A, Vijayan M. Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an X-ray and modeling study. *J. Mol. Biol.* 2003; 332: 217-228.
- [99] Nakamura-Tsuruta S, Uchiyama N, Peumans WJ, Van Damme EJM, Totani K, Ito Y, Hirabayashi J. Analysis of the sugar-binding specificity of mannose-binding-type Jacalin-related lectins by frontal affinity chromatography - an approach to functional classification. *FEBS J.* 2008; 275: 1227-1239.

- [100] Ghequire MG, Loris R, De Mot R. MMBL proteins; from lectin to bacteriocin. *Biochem. Soc. Trans.* 2012; 40: 1553-1559.
- [101] Higuchi M, Suga M, Iwai K. Participation of lectin in biological effects of raw winged bean seeds on rats. *Agric. Biol. Chem.* 1983; 47: 1879-1886.
- [102] Noah ND, Bender AE, Reaidi GB, Gilbert RJ. Food poisoning from raw kidney beans. *Brit. Med. J.* 1980; 281:236-237.
- [103] Grant G, More LJ, McKenzie NH, Pusztai A. The effect of heating on the haemagglutinating activity and nutritional properties of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *J. Sci. Food Agric.* 1982; 33:1324-1326.
- [104] Nasi A, Picariello G, Ferranti P. Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety. *J. Proteomics.* 2009; 72: 527-538.
- [105] Mo H, Winter HC, Goldstein IJ. Purification and characterization of a Neu5Aca2-6Galβ1-4Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the Polypore Mushroom *Polyporus squamosus*. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 10623-10629.
- [106] 除栄珠, 紙谷五月, 三好正満. さといもレクチンの耐熱性といもの保存や発芽における含量変化. *日本家政学会誌.* 1989; 40: 805-809.
- [107] Jagtap UB, Bapat VA. Artocarpus: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 2010; 129: 142-166.
- [108] Chatterjee U, Bose PP, Dey S, Singh TP, Chatterjee BP. Antiproliferative effect of T/Tn specific *Artocarpus lakoocha* agglutinin (ALA) on human leukemic cells

(Jurkat, U937, K562) and their imaging by QD-ALA nanoconjugate. *Glycoconj. J.*

2008; 25: 741-752.

謝辞

本研究を遂行し、本研究論文を執筆するにあたり、全構成にわたりご懇意なるご指導、ご鞭撻を賜りました鹿児島大学名誉教授 八木 史郎 先生に深甚なる感謝の意を表します。

本研究に入る端緒を与えられ、さらには本研究論文をまとめ、執筆するにあたり、終始ご懇意なるご指導を賜りました鹿児島大学農学部 生物資源化学科 南 雄二 准教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり懇切丁寧にご指導くださり、さらには本研究論文をまとめ、執筆するにあたり、様々なお助言を賜りました佐賀大学農学部 生命機能科学科 渡邊 啓一 教授に心よりお礼申し上げます。

本研究論文をまとめ、執筆するにあたり終始懇切なるご指導を賜り、さらに新たな研究の機会を与えていただいた鹿児島大学農学部 生物資源化学科 北原 兼文 教授に心よりお礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり懇切丁寧にご指導くださり、さらには本研究論文をまとめ、執筆するにあたり、様々なお助言を賜りました大学院連合農学研究科 応用生命科学専攻 先端応用生命科学講座 杉元 康志 教授に心よりお礼申し上げます。

本研究論文をまとめ、執筆するにあたり、様々なお助言を賜りました佐賀大学農学部生命機能科学科 食糧科学講座 光富 勝 教授に心よりお礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、技術指導ならびに共同研究を行っていただいた、独立行政法人 産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 主席研究員 平林 淳 先生、同センター 糖鎖レクチン工学研究チーム 主任研究員 舘野 浩章 さん、同チーム 比江森 恵子さんに心よりお礼申し上げます。

また、新たな研究分野へと誘い、研究の機会と様々な口頭発表等の機会を与えて下さり、学位取得の後押しをしていただいた鹿児島大学農学部 生物資源化学科 藤田 清貴 准教授に心よりお礼申し上げます。

本研究を通して、有益なるご助言や議論、ご協力を賜りました鹿児島大学農学部の諸先生方および、生分子機能学研究室、応用糖質化学研究室専攻生の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、学位を取得するにあたり、ここまで支援し育ててくれた父、母、協力してくれた姉、兄と友人たちに感謝いたします。本当にありがとうございました。