

紅藻カギイバラノリ由来のcore (α 1-6) Fuc特異的レクチンの 糖タンパク質との相互作用解析

奥山 里美*、堀 貫治*

1. はじめに

血液や細胞表面に存在する複合糖質の糖鎖については、疾病と関連して構造や発現量に変化が生じる場合があることが知られている¹⁾。したがって、糖鎖は疾病マーカーとしてだけでなく、治療の際のターゲット分子としても注目されており、迅速で簡便な糖鎖プロファイリング技術の開発が望まれている。この観点から、レクチンアレイを用いる糖鎖プロファイリングに期待がもたれている²⁾。この方法は、異性体の識別や混合物・複合糖質(糖タンパク質や糖脂質)状態での解析に難をもつ質量分析法にない利点を備えている。一方、糖鎖プロファイリングに用いるレクチンについては糖鎖構造に対する高い認識特異性が要求される。筆者らは藻類由来のレクチンライブラリの構築に努めてきているが、藻類レクチンは他の動植物レクチンとは異なり、一般に単糖に結合せず、特定の糖鎖構造とのみ極めて高選択的に結合するものが多いことを認めている³⁻⁵⁾。藻類レクチンの厳密な糖鎖結合特異性については、その分子基盤や生物学的意味の解明はこれからの課題であるが、糖鎖解析用ツールとしての有用性はきわめて高いと考えられる。

本研究で用いた紅藻カギイバラノリ *Hypnea japonica* 由来のレクチン(hypnin A)には、3種類のアイソフォーム(hypnin A1, A2およびA3)が存在する。いずれも凝集活性の発現に必須の2つの鎖内ジスルフィド結合を含む90アミノ酸からなる新規の単量体ポリペプチドで、各アイソフォーム間では3カ所のアミノ酸のみが異なる⁶⁾。本レクチンはセリン、グリシン及びプロリンに富み、全アミノ酸残基数の半数近くがこの3種類のアミノ酸で構成されており、その凝

* 広島大学大学院生物圏科学研究科

集活性は100°C、30分間の加熱処理でも変化せず、きわめて強耐熱性であるなどユニークな性質を呈する⁶⁾。本レクチンには、各種細胞の凝集、リンパ球分裂促進、腫瘍細胞の増殖抑制、血小板凝集阻害および海産無脊椎動物胚の正常な発生の阻害など多様な生物活性が認められている^{6,7)}。その後、近縁の紅藻数種からも90~91アミノ酸からなる類似レクチンが見いだされており⁸⁻¹⁰⁾、hypnin Aに代表される低分子量レクチンは紅藻中に広く分布していることが予想される。

本レクチンは他紅藻レクチンと同様に単糖に結合せず、その糖結合性については長い間不明であったが、最近、約100種類のピリジルアミノ標識(PA)オリゴ糖との結合性をフロンタルアフィニティークロマトグラフィー(FAC)法を用いて調べた結果、供試糖鎖中core (α 1-6) Fucを含む糖鎖とのみ結合することが判明した(特許出願中)。Core (α 1-6) Fuc含有N-グリカンに対する親和性は、bisecting GlcNAcを有するもので高く、分岐糖鎖数が多いもの、およびシアロ体で相対的に低いことから、core (α 1-6) Fuc残基の周辺糖構造による立体障害の影響を受けやすい傾向も見られる。3種イソレクチンとも同様の糖鎖プロファイリングを示すことから、イソレクチン間で異なる3カ所のアミノ酸残基は糖結合特異性には直接的には関与しないようである。本レクチンはFuc (α 1-2) Gal、Fuc (α 1-3) GlcNAc/Glc、またはFuc (α 1-4) GlcNAcを含む糖鎖とは全く結合しない。単糖を認識せず、core (α 1-6) Fuc含有N-グリカンのみを高選択的に認識するレクチンはこれまでに報告されていないことから、hypnin Aは新規のcore (α 1-6) Fuc認識プローブとして有用である。

Core (α 1-6) Fucは、肝癌などの腫瘍マーカーとしてだけでなく、抗体依存性細胞障害(ADCC)活性をもつ抗体(IgG)医薬の薬効を低減する糖残基としても応用上重要な糖構造である^{11,12)}。したがって、hypnin Aはcore (α 1-6) Fuc認識プローブとして高い知財性を有しているが、これまでの結果は遊離オリゴ糖との相互作用解析から得られたものであり、診断薬および抗体医薬の調製・品質管理などへの応用に際しては、糖タンパク質との相互作用に関する情報が求められる。

そこで、本研究では、hypnin Aの糖タンパク質との相互作用を赤血球凝集阻止試験および表面プラズモン共鳴(SPR)法を用いて解析するとともに、これまでに汎用されている既知のFuc結合性レクチンの同相互作用との比較を行った。

2. 実験方法

2.1 レクチン試料

紅藻カギイバラノリ *H. japonica* の3種イソレクチン(hypnin A1、A2およびA3)は既報⁶⁾に従って抽出、精製後、 -20°C に凍結保存していたものを使用した。また、カギイバラノリ藻体の50%エタノール抽出液から、新たに50-83%冷エタノール沈殿画分を得、150 mM NaClを含む20 mMリン酸緩衝液、pH7.2 (以下、PBSと略す) に対して透析して、粗レクチン画分(hypnin A)を調製した。一方、比較対象としたFuc結合性レクチン、すなわちヒドロチャワンタケ *Aleioa aurantia*レクチン(AAL)(Vector社製)、麹菌 *Aspergillus oryzae*レクチン(AOL)(東京化成株式会社製)、およびマメ科植物 *Ulex europus*レクチン(UEA-I)(Vector社製)はそれぞれ市販品を用いた。

2.2 供試糖タンパク質

本研究で使用した糖タンパク質; transferrin、fetuin、human immunoglobulin G (hIgG)、sheep immunoglobulin G (sIgG)、bovine thyroglobulin (BTG)、porcine thyroglobulin (PTG)、avidin、bovine submaximally mucin (BSM)、およびporcine stomach mucin (PSM)については、Wako製のBTGとavidinを除き、他のものはSigma社製を用いた。BTG、PTGおよびBSMの各アシアロ体は以下のように調製した。すなわち、5mgの各糖タンパク質を2.5mlの超純水に溶解し、これに等容の0.2N HClを加え、 80°C で1時間加熱処理した。本処理溶液を50mM重炭酸アンモニウム溶液に対して十分透析後、次に超純水に対して透析した。透析内液を回収し、凍結乾燥して各アシアロ体とした。これら赤血球凝集阻止試験に供した糖タンパク質のうち、hIgG、PSM、およびBTGについては表面プラズモン共鳴 (SPR) 法によるレクチンとの相互作用解析に供した。また、赤血球凝集阻止試験には上記糖タンパク質に加えて、フコイダン(Sigma社製)も供した。

2.3 赤血球凝集阻止試験

糖タンパク質およびフコイダンの各糖溶液について、それぞれ0.02% NaN_3 -0.85%NaCl-20 mMリン酸緩衝液、pH7.2 (PBSA) 中での連続2倍希釈液各25 μl を、96穴V型プレート上に調製した。これに、力価4のレクチン溶液25 μl をそれぞれ添加し、軽く攪拌後、1時間室温で静

置した。次に、各ウェルに2%トリプシン処理ウサギ赤血球浮遊液 (TRBC) 25 μ lを添加し、軽く攪拌後、1時間室温で静置した。凝集阻止能は肉眼で判定し、赤血球の50%以上が凝集していない場合を陽性とし、糖溶液の最小凝集阻止濃度を求めた。なお、本阻止試験には、粗レクチン画分(50~83%冷エタノール沈殿)を使用した。

TRBCの調製は以下のように行った。まず、血球容積2ml相当量のウサギ保存血(広島実験動物)を約50mlの生理食塩水で3回洗浄後、50mlの生理食塩水を加えて2%ウサギ赤血球浮遊液とした。これに1/10容の0.5%トリプシン-生理食塩水を加え、37°C下で1時間放置した後、生理食塩水で3回洗浄し、45mlの生理食塩水を加えて、TRBCとした。

2.4 表面プラズモン共鳴法による相互作用解析

2.4.1 リガンドの固定化

リガンドのセンサーチップ(CM5)(BIACORE社製)への固定化は、BIAcore2000(BIACORE社製)上アミノカップリング法を用いてマニュアルインジェクションにより行った。すなわち、センサーチップを70 μ lのNHS/EDC混液で活性化後、10mM酢酸緩衝液(pH4.0)中100 μ g/mlに調製した糖タンパク質(リガンド)溶液をセンサーチップ上に添加し、糖タンパク質の固定化を行った。次に、70 μ lのエタノールアミンを流して残存する活性NHS基をブロック後、10 μ lの100mM HClで洗浄した。全ての送液は流速10 μ l/minで行い、平衡化緩衝液として HBS (0.01 M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, BIACORE社製)、HBS-EP (0.01 M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% Surfactant P20, BIACORE社製)、または10mM CaCl₂を含むHBS-P (0.01 M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 0.005% Surfactant P20, BIACORE社製)(HBS-CaPと略す)を用いて平衡化した。

2.4.2 相互作用解析

レクチン(アナライト)の連続2倍希釈液を平衡化緩衝液中で調製した。これら種々濃度のアナライト溶液をリガンド固定化チップ上に流速30 μ l/minで3分間流した後、同流速で平衡化緩衝液を3分間流し、アナライトの結合・解離量を測定した。チップの再生、洗浄および平衡化については、hypnin A1の場合は25-100mM NaOHで再生後、平衡化緩衝液で十分に洗浄し、平衡化した。AAL、AOL、およびUEA-Iの場合は100mM Fucおよび25-100mM

NaOHを順次用いて再生後、平衡化緩衝液で十分に洗浄し、平衡化した。

データ解析には解析ソフトBIAevaluation 3.1を用いた。結合・解離速度が速く速度定数が算出できない場合には、アフィニティー解析を用いて結合定数(K_A)と解離定数(K_D)を算出した。それ以外の解析には、非線形最小二乗法によるカインेटイクス解析を用い、反応モデルとして1:1 (Langmuir) bindingを使用し、各定数(結合速度定数 k_a 、解離速度定数 k_d 、結合定数 K_A 、解離定数 K_D)を算出した。

3. 結果および考察

3.1 赤血球凝集阻止試験

結果をTable 1に示す。本阻止試験では、供試した糖タンパク質は、avidin とPSMを除いて、すべて阻止能を示した。阻止活性は asialo-PTG > asialo-BTG > PTG > BSM > BTG、hIgG、sIgG、asialo-transferrin、asialo-BSM > transferrin > fetuinの順で強かった。このうち比較的強い阻止活性を示したPTG、BTG、hIgG、およびsIgGはいずれもcore (α 1-6) Fuc構造を有するが、阻止活性を示さなかったPSMとavidinおよび阻止活性の弱かったfetuinは同構造を含まない。これらの結果は、以前のPA-オリゴ糖を用いるFAC解析で、本レクチンがcore (α 1-6) Fuc含有N-グリカンとのみ結合することとよく一致していた。なお、PSMはFuc (α 1-2) Gal 構造^{13,14)}を、avidin は bisecting GlcNAc 含有の混成型糖鎖と高マンノース型糖鎖を有する^{15,16)}。PTGおよびBTGの阻止活性については、いずれもasialo体の阻止活性が強かった。この結果も、PA-オリゴ糖とのFAC解析で得られた結果、すなわち非還元末端のシアル酸は本レクチンのcore (α 1-6) Fuc含有N-グリカンとの結合性に負の影響を与えることと関連していた。

一方、O-グリカンのみを有するBSM(最小阻止濃度、62.5 μ g/ml) とPSM(同、>2000 μ g/ml)の間で凝集阻止活性に顕著な差が見られた(Table 1)。BSMとPSMの糖鎖構造については、両者ともFuc (α 1-2) Gal構造は有するが、BSMはさらにFuc (α 1-3) GlcNAc 構造を含むルイスX抗原糖鎖 (Gal (β 1-4) [Fuc (α 1-3)] GlcNAc) を含むことが報告されている^{13,17,18)}。したがって、両者の阻止活性の違いは、ルイスX抗原糖鎖の有無に起因することも推測されるが、以前のFAC解析ではPA-ルイスX抗原糖鎖とは結合しないことが判明してお

り、その理由については現在のところ不明である。

Table 1 Hemagglutination-inhibition of hypnin A with a polysaccharide and glycoproteins.

Compound	Minimum inhibition concentration ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Polysaccharide</i>	
Fucoidan	> 2000
<i>Glycoprotein</i>	
N-linked glycoprotein	
<u><i>Complex type</i></u>	
Transferrin*	250
Asialo-transferrin*	62.5
Fetuin**	1000
Human immunoglobulin G (hIgG)*	62.5
Sheep immunoglobulin G (sIgG)*	62.5
<u><i>High mannose type</i></u>	
Yeast mannan	> 2000
<u><i>Complex type + High mannose type</i></u>	
Bovine thyroglobulin (BTG)*	62.5
Asialo-BTG*	7.8
Porcine thyroglobulin (PTG)*	31.2
Asialo-PTG*	3.9
<u><i>Hybrid type</i></u>	
Avidin***	> 2000
O-linked glycoprotein	
Bovine submaxillary mucin (BSM)	31.2
Asialo-BSM	62.5
Porcine stomach mucin (PSM)	> 2000

The inhibition assay was performed using crude hypnin A (titer = 4) and a 2% suspension of trypsin-treated rabbit erythrocytes. The single star mark (*) indicates glycoproteins bearing a core (α 1-6) fucose residue(s). Fetuin (**) contains both N- and O-glycans in the molecule. Avidin (***) contains both hybrid type and high-mannose type.

3. 2 SPR解析

多種類のオリゴ糖との相互作用解析 (FAC法) から、厳密な core (α 1-6) Fuc 特異性を示すことが判明している hypnin A について、糖タンパク質レベルでの相互作用においても同様の特異性がみられるかをSPR法を用いて調べた。なお、糖タンパク質としては、core (α 1-6) Fuc構造を有するものとしてhIgGとBTGを、core (α 1-6) Fuc構造を含まず (α 1-2) Fuc構造を有するものとしてPSMを供試した。また、供試レクチンとしては、hypnin A1以外に、core (α 1-6) Fuc特異的もしくはFuc特異的レクチンとして多用されているAAL^{19,20)}、AOL^{21,22)}、およびUEA-I²³⁾を用いた。

3. 2. 1 Hypnin AのhIgGとの相互作用

本解析では、レクチン(アナライト)としてhypnin A1、AALおよびAOLを、糖タンパク質(リガンド)としてhIgGとPSMを用い、各相互作用の解析結果を比較した。

3種レクチンとセンサーチップ上に固定化したhIgG (1318.6 RU) との相互作用のセンサグラムをFig.1に、カインेटクス解析結果をTable 2に示す。3種レクチンともhIgGに親和性を示

Table 2 Kinetic or affinity analyses of the interactions of hypnin A1, AAL, and AOL with hIgG or PSM.

Lectin	Association rate ka [M ⁻¹ s ⁻¹]	Dissociation rate kd [s ⁻¹]	Association constant K _A [M ⁻¹]	Dissociation constant K _D [M]
<u>With hIgG</u>				
Hypnin A1	1.03 × 10 ⁴	1.74 × 10 ⁻⁴	5.93 × 10 ⁷	1.69 × 10 ⁻⁸
AAL	-	-	2.62 × 10 ⁶	3.82 × 10 ⁻⁷
AOL	4.95 × 10 ³	1.94 × 10 ⁻³	2.57 × 10 ⁶	3.90 × 10 ⁻⁷
<u>With PSM</u>				
Hypnin A1	ND	ND	ND	ND
AAL	1.57 × 10 ⁵	2.76 × 10 ⁻⁴	5.69 × 10 ⁸	1.76 × 10 ⁻⁹
AOL	3.57 × 10 ⁵	5.4 × 10 ⁻⁵	5.40 × 10 ⁹	6.61 × 10 ⁻¹⁰

The minus mark (-) indicates that the reaction rate constant can not be calculated due to the fast association and dissociation rate. ND indicates that the interaction with PSM was not observed.

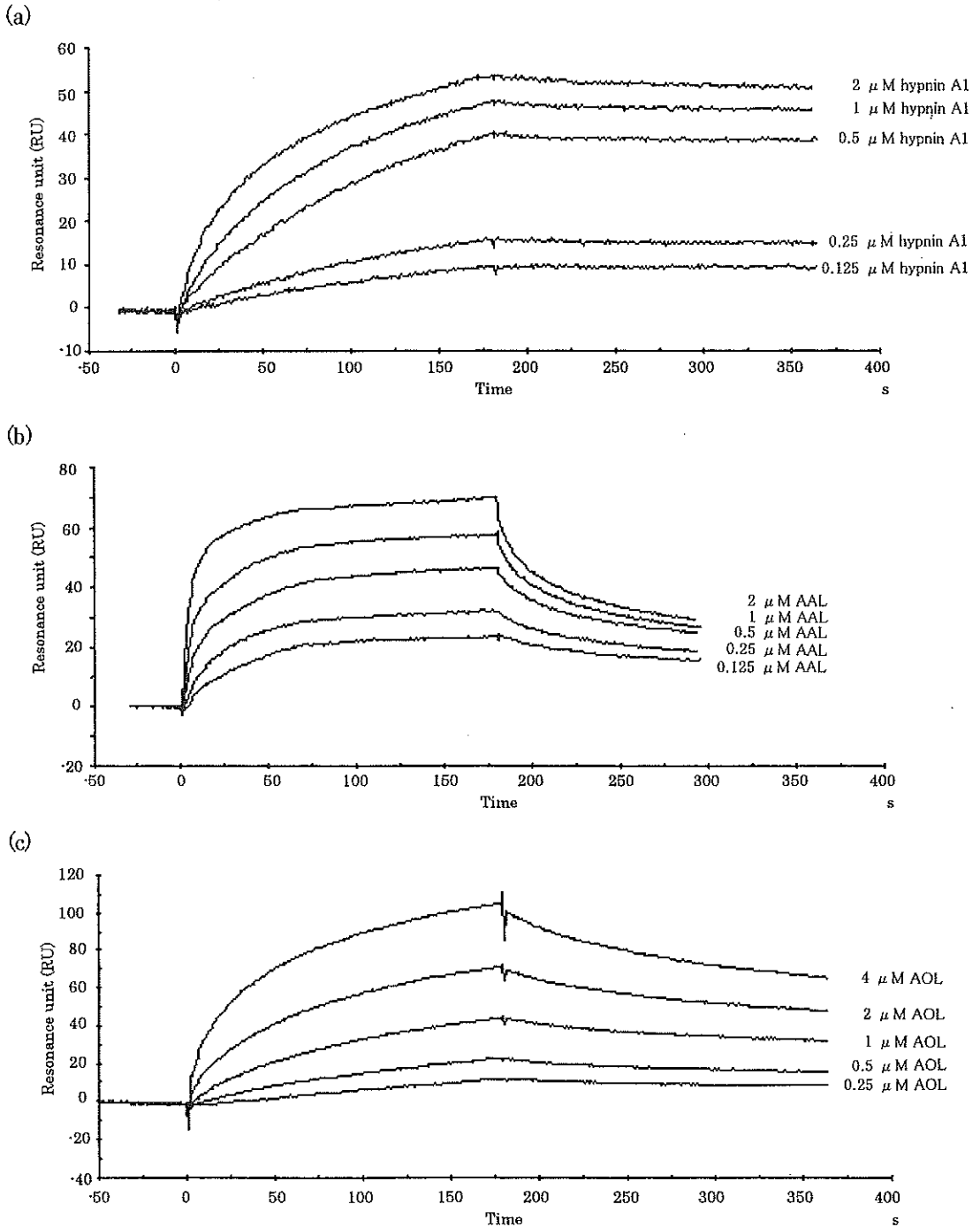


Fig. 1 SPR sensorgrams representing the interactions of hypnin A1 (a), AAL (b), and AOL (c) with human IgG.

したが、AALについては固定化hIgGとの結合・解離の速度が速くカイネティクス解析が困難だったので、アフィニティー解析により親和定数 (K_A) および解離定数 (K_D) のみを算出した。その結果、hypnin A1はhIgGに高い親和性 ($K_A=5.93 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) を示し、本親和定数はAALおよびAOLの同定数の約20倍に相当した。一方、固定化PSM(1068.7 RU)に対しては、hypnin A1は結合しなかったが、AALおよびAOLは強く結合し、親和定数はそれぞれ 5.69×10^8 および $5.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ であった (Fig. 2およびTable 2)。HypninA1については、AALおよびAOLの10倍濃度液を添加した場合でも結合は認められなかった (Fig.2)。hIgGは1分子内の2カ所に複合型糖鎖を有し、同糖鎖の85%以上にcore (α1-6) Fuc構造が存在する^{24,25)}。一方、PSMは (α1-2) Fuc含有O-グリカンをもつが、core (α1-6) Fuc構造をもたない^{13,14)}。本解析から、hypnin A1は core (α1-6) Fuc構造を有する糖タンパク質とのみ結合し、(α1-2) Fuc構造を含む糖タンパク質には結合しないことが明らかとなった。この結果は、以前に明らかにしたオリゴ糖との相互作用解析 (FAC法) で、カギイバラノリの3種イソレクチンはいずれも core (α1-6) Fuc含有オリゴ糖とは結合するが、(α1-2)、(α1-3)、または (α1-4) Fuc含有オリゴ糖とは結合しない結果とよく一致した。また、先の赤血球凝集阻止試験の結果も支持した。このように、(α1-2) Fuc構造を含む糖タンパク質とも結合するAALやAOLと比較して、hypnin A1はcore (α1-6) Fuc構造を含む糖タンパク質にきわめて高い結合選択性をもつレクチンであることがわかった。

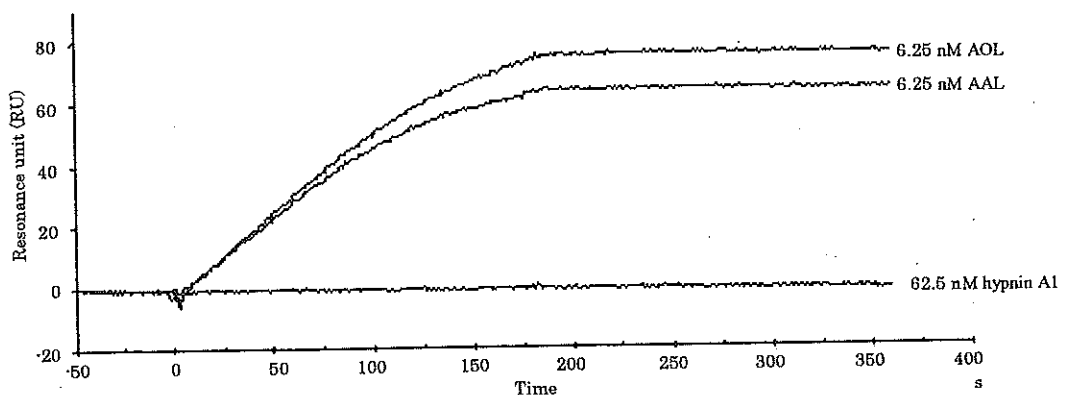


Fig. 2 SPR sensorgrams representing the interactions of hypnin A1, AAL and AOL with PSM.

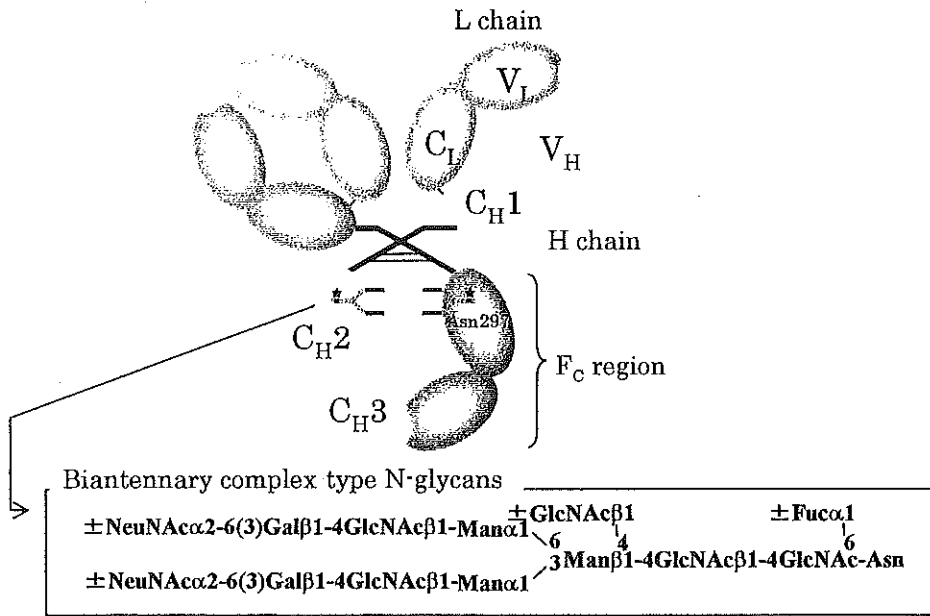


Fig. 3 Schematic drawing of human IgG oligosaccharide structure.
Human IgG molecule contains two chains of biantennary complex-type N-glycans in the CH₂ domains of the F_C regions.

なお、AALの糖鎖結合性については、固定化AALチップを用いるSPR解析から、(α 1-2)、(α 1-3)、(α 1-4)、および(α 1-6) Fuc含有ジサッカライド間で結合定数に大きな差異がないこと、同じサッカライドに対する親和力は同様のFuc含有トリサッカライドよりもいくぶん強いことが報告されている^{19,20)}。一方、他報²²⁾では、固定化AALおよびAOLチップ対するFuc含有オリゴ糖(ペンタサッカライド以上の糖鎖)の相互作用解析(SPR解析)で、両レクチンとも(α 1-6) Fuc含有オリゴ糖をより強く結合する傾向があることが報告されている。糖タンパク質固定化チップを用いる本SPR解析においては、AALとAOLはcore (α 1-6) Fuc含有糖タンパク質よりも(α 1-2) Fuc含有糖タンパク質により高い親和性をもつことが示された。この既報との多少の相違は、本解析では糖タンパク質をリガンドとし、レクチンをアナライトとしたことに由来する可能性もある。また、Fig. 3 に示すように、hIgGのFc領域に存在するcore (α 1-6) Fucを含む複合型糖鎖は、向き合った重鎖ペプチドの間に埋もれるように存在することが、立体構造解析から明らかにされている^{26,27)}。したがって、各Fuc結合性レクチンのhIgG糖

鎖への結合は、糖鎖周辺のペプチド部分に由来する立体構造の影響を受けることも予想される。本解析に使用したhypnin A1、AALおよびAOLの分子量はそれぞれ9,148、66,796および68,962であり、低分子サイズのhypnin A1は、分子サイズの大きいAALおよびAOLに比べて、内部に位置するhIgG糖鎖に接触しやいために相対的に高い親和定数を示すことも推測される。しかし、いずれにせよ、これらの結果は、AALとAOLはFuc結合様式に関係なくFuc含有のオリゴ糖および糖タンパク質を認識することを示している。

Hypnin Aはcore (α 1-6) Fuc構造に対して、オリゴ糖レベルおよび糖タンパク質レベルで、既知のFuc特異的レクチンよりも高い結合選択性と親和性をもつことが明らかとなった。本レクチンは肝癌腫瘍マーカーの高感度診断薬としてだけでなく、ADCC活性を有する高純度抗体医薬の調製や品質管理分野での貴重なツールとして応用性が高いことを確認できた。現在、hypnin A固定化カラムを用いて、core (α 1-6) FucをもたないhIgGの精製を試行しているところである。

3. 2. 2 Hypnin Aのcore (α 1-6) Fuc含有糖タンパク質との相互作用における Ca^{2+} の影響

藻類レクチンは一般に活性発現に二価金属イオンの影響を受けないことが明らかにされている⁶⁾。ここでは、hypnin Aの糖タンパク質との相互作用における Ca^{2+} の影響をSPR法により調べた。レクチン(アナライト)としてhypnin A1とUEA-Iを、糖タンパク質(リガンド)としてBTGとPSMを用い、各相互作用を比較した。なお、BTGは分子中にそれぞれ複数のcore (α 1-6) Fuc含有複合型糖鎖と高マンノース型糖鎖を有することが報告されている^{28,29)}。解析の際の緩衝液としては、 Ca^{2+} 非存在下での相互作用解析にはHBS-EPを、 Ca^{2+} 存在下の相互作用解析にはHBS-CaPを用いた。

Hypnin A1とBTG固定化センサーチップ(1700 RU)との相互作用のセンサグラムをFig. 4に、カイネティクス解析結果をTable 3に示す。このように、hypnin A1はBTGに対して Ca^{2+} の有無に関係なく強い親和性($K_A=2.14\sim 2.29 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$)をもつことがわかった。一方、PSM固定化センサーチップ(1100 RU)に対しては、 Ca^{2+} の有無に関係なく、濃度に依存したRUの増加が認められず、親和性をもたないことがわかった(データ未提出)。Hypnin A1のBTGに対する結合性は強く、200 nM hypnin A1を添加後のチップについては再生が不可能であった。そこで、解析に当たっては、BTG固定化センサーチップを2つ調製し、それぞれ Ca^{2+} 存在

下および非存在下用として測定した。

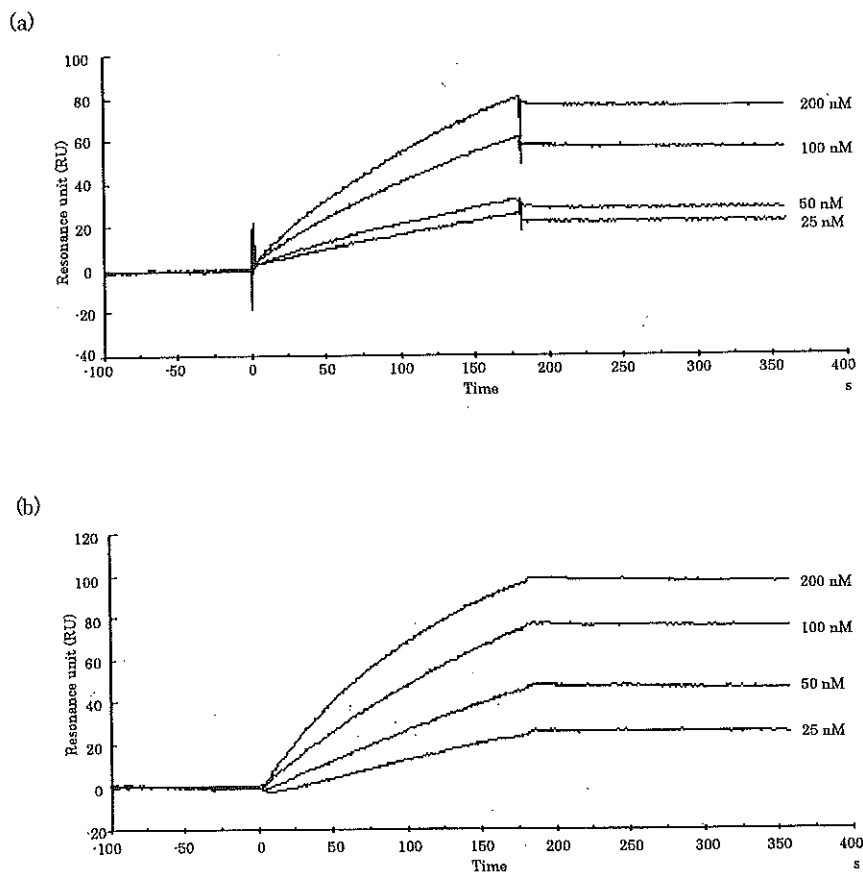


Fig. 4 SPR sensorgrams representing the interaction between hypnin A1 and BTG in the absence (a) and presence (b) of Ca^{2+} .

一方、UEA-I は、 Ca^{2+} の有無に関係なく、BTGには結合せず、PSMと結合することがわかった (Table 3)。PSMに対する親和定数および解離定数は、それぞれ Ca^{2+} の非存在下では $5.82 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ および $1.72 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、 Ca^{2+} の存在下では $5.66 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ および $1.72 \times 10^{-6} \text{ M}$ と算出され、結合性は Ca^{2+} 存在下で幾分高い傾向を示した。

このように、hypnin A1のBTG結合性は Ca^{2+} の影響を受けないこと、同様にPSMへの非結合性も Ca^{2+} に無関係であることがわかった。本レクチンは高マンノース型糖鎖を認識しないことから、BTGへの強い結合性は同分子内に複数存在するcore (α 1-6) Fuc含有複合型糖鎖を

Table 3. Kinetic analyses of the interactions of hypnin A1 and UEA-I with BTG or PSM in the absence and presence of Ca^{2+} .

Lectin	Buffer	Association rate k_a [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	Dissociation rate k_d [s^{-1}]	Association constant K_A [M^{-1}]	Dissociation constant K_D [M]
<u>With BTG</u>					
Hypnin A1	HBS-EP (- Ca^{2+})	2.67×10^4	1.25×10^{-4}	2.14×10^8	4.66×10^{-9}
	HBS-CaP (+ Ca^{2+})	3.47×10^4	1.52×10^{-4}	2.29×10^8	4.37×10^{-9}
UEA-I	HBS-EP (- Ca^{2+})	ND	ND	ND	ND
	HBS-CaP (+ Ca^{2+})	ND	ND	ND	ND
<u>With PSM</u>					
Hypnin A1	HBS-EP (- Ca^{2+})	ND	ND	ND	ND
	HBS-CaP (+ Ca^{2+})	ND	ND	ND	ND
UEA-I	HBS-EP (- Ca^{2+})	21.6	3.7×10^{-4}	5.82×10^4	1.72×10^{-5}
	HBS-CaP (+ Ca^{2+})	85.4	1.51×10^{-4}	5.66×10^5	1.77×10^{-6}

ND indicates that the interaction with BTG or PSM was not observed

介しているものと考えられる。UEA-Iについては、先に述べたAALやAOLと同様に、Fuc結合性レクチンとしてよく利用されているが、AALやAOLと異なり、BTGのようなcore (α 1-6) Fuc含有糖タンパク質とは結合しないことがわかった。

以上、本解析から、紅藻カギイバラノリの低分子量レクチン(hypnin A)は、単糖(Fucを含む)や多糖(フコイタンを含む)を認識せず、core (α 1-6) Fuc構造を含むオリゴ糖および糖タンパク質を極めて高選択的に認識し、その結合力も高いこと、(α 1-2)、(α 1-3)および(α 1-4) Fuc構造を認識しないことが明らかとなった。本レクチンが示すcore (α 1-6) Fuc結合特異性は既知レクチンには見いだされていないことから、本レクチンは新規の糖鎖プローブとして応用価値がきわめて高いと判断される。

本研究の一部は、杉山産業化学研究所研究助成の支援を得て遂行した。心から感謝の意を申し上げる。

参考文献

- 1) 谷口 直之(編), 糖鎖と病気, 遺伝子医学MOOK3, 株式会社メディカルドゥ, 2005
- 2) Kuno, A., Uchiyama, N., Koseki-Kuno, SW., Ebe, Y., Takashima, S., Yamada, M., and Hirabayashi, J., Evanescent-filed fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling. *Nat. Methods.* **2**, 851-856 (2005)
- 3) Hori, K., Sato, Y., Ito, K., Fujiwara, Y., Iwamoto, Y., Makino, H., and Kawakubo, A., Strict specificity for high-mannose type N-glycans and primary structure of a red alga *Eucheuma serra* lectin. *Glycobiology.* **17**, 479-491 (2007)
- 4) Sato, Y., Okuyama, S., and Hori, K., Primary structure and carbohydrate binding specificity of a potent anti-HIV lectin isolated from the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *J. Biol. Chem.* **282**, 11021-11029 (2007)
- 5) 堀 貫治, 海藻資源からの糖鎖標的医薬素材・生化学素材・健康食品素材の開発. 藻類 *Jpn.J. Phycol.* **55**, 33-38 (2007)
- 6) Hori, K., Matsubara, K., and Miyazawa, K., Primary structures of two hemagglutinins from the marine red alga, *Hypnea japonica*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1474**, 226-236 (2000)
- 7) Matsubara, K., Sumi, H., and Hori, K., Platelet aggregation is inhibited by phycolectins, *Experientia*, **52**, 540-543 (1996)
- 8) Calvete, J. J., Costa, F. H., Saker-Sampaio, S., Moreno-Murciano, M. P., Nagano, C. S., Cavada, B. S., Grangeiro, T. B., Ramos, M. V., Bloch, C. Jr, Silveira, S. B., Feitas, B. T., and Sampaio, A. H., The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. *Cell. Mol. Life Sci.*, **57**, 343-350 (2000)
- 9) Nagano, C.S., Moreno, F.B.M.B., Bloch Jr. C., Partes, M.V., Calvete, J.J., Sarker-Sampaio, S., Farias, W.R.L., Tavares, T.D., Nascimento, K.S., Grangeiro, T.B., Cavada, B.S. and Sampaio, A.H., Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. *Protein and Peptide Letters*, **9**,

159-165 (2002)

- 10) Nagano, C. S., Dabray, H., Nascimento, K. S., Pintó, V. P. T., Ccavada, B. S., Saler-Sampaio, S., Fraias, W. R. L., Sampaio, A. H. and Calvete, J. J., HCA and HML isolate from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin family. *Protein Sci.*, **14**, 2167-2176 (2005)
- 11) Sheilds, R. L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., Weikert, S. H., and Prest, L. G., Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc γ RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J. Biol. Chem.*, **277**, 26733-26740 (2002)
- 12) Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shohi-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, K., Satoh, M., Yamasaki, M., Hanai, N., and Shitara, K., The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting *N*-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, **278**, 3466-3473 (2003)
- 13) Karlsson, N. G., and Packer, N. H., Analysis of O-linked reducing oligosaccharides released by an in-line flow system. *Anal. Biochem.*, **305**, 173-185 (2002)
- 14) Yamada, K., Hyodo, S., Matsuno, Y., Kinoshita, M., Maruyama, S., Osaka, Y., Casal, E., Lee, Y. C., and Kakehi, K., Rapid and sensitive analysis of mucin-type glycans using an in-line flow glycan-releasing apparatus. *Anal. Biochem.* **371**, 52-61 (2007)
- 15) Lee, B., Krishnanchettiar, S., Lateef, S. S., Lateef N. S., and Gupta, S., Characterization of oligosaccharide moieties of intact glycoproteins by microwave-assisted partial acid hydrolysis and mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 2629-2635 (2005)
- 16) Stephens, E., Maslen, S. L., and Williams, D. H., Fragmentation characteristics of neutral N-linked glycans using a MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal. Chem.* **76**, 2343-2354 (2004)
- 17) Chai, W., Hounsell, E. F., Cashmore, G. C., Rosankiewicz, J. R., Bauer, C. J.,

- Feeney, J., Feizi, T., and Lawson, A. M., Neutral oligosaccharides of bovine submaxillary mucin -a combined mass spectrometry and ¹H-NMR study. *Eur. J. Biochem.*, **203**, 257-268 (1992)
- 18) Savage, A. V., Donohue, J. J., Koeleman, C. A. M., and Eijnden, D. H., Structural characterization of sialylated tetrasaccharides and pentasaccharides with blood group H and Le^x activity isolated from bovine submaxillary mucin. *Eur. J. Biochem.* **193**, 837-843 (1990)
- 19) Haselhorst, T., Weirnar, T., and Peters, T., Molecular recognition of sialyl Lewis^x and related saccharides by two lectins. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 10705-10714 (2001)
- 20) Wimmerova, M., Mitchell, E., Sanchez, J. F., Gautier, C., and Imberty, A., crystal structure of fungal lectin -six-bladed b-propeller fold and novel fucose recognition mode for *Aleuria auriantia* lectin. *J. Biol. Chem.* **278**, 27059-27067 (2003)
- 21) Ishida, H., Moritani, T., Hata, Y., Kawato, A., Suginami, K., Abe, Y., and Imayasu, S., Isolation of a novel promoter efficient protein production in *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1002-1008 (2002)
- 22) Matsumura, K., Higashida, K., Ishida, H., Hata, Y., Yamamoto, K., Shigeta, M., Mizuno-Horikawa, Y., Wang X., Miyoshi, E., Gu, J., and Taniguchi, N., Carbohydrate binding specificity of a fucose-specific lectin from *Aspergillus oryzae*: a novel probe for core fucose. *J. Biol. Chem.*, **282**, 15700-15708
- 23) Celestine, J. T., and Avadhesh, S., Kinetic analysis of the binding of *Ulex europeas* agglutinin I (UEA 1) to H-antigenic fucolipid. *Arch. Biochem. Biophys.* **345**, 8-12 (2000)
- 24) Raju, T. S., Briggs J. B., Borge S. M., and Jones, A. J. S., Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein the therapeutics. *Glycobiology*, **10**, 477-486 (2000)
- 25) Kobata, A., The N-Linked sugar chains of human immunoglobulin G: Their unique

- pattern, and their functional roles. *Biochim. Biophys. Acta* (2007), doi:10.1016/j.bbagen.2007.06.012
- 26) Harris, L. J., Skaletsky, E., and McPherson A., Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *J. Mol. Biol.*, **275**, 861-872 (1998)
- 27) Radaev, S., Motyka, S., Fridman, W., Sautes-Fridman, C., and Sun, P., D., The structure of a human type III Fc γ receptor in complex with Fc. *J. Biol. Chem.*, **276**, 16469-16477 (2001)
- 28) Rawitch, A. B., Pollock, H. G., and Yang, S., Thyroglobulin glycosylation: Location and nature of the N-linked oligosaccharide unit in bovine thyroglobulin. *Arch Biochem Biophys.*, **300**, 271-279 (1993)
- 29) Cummings, R. D., and Kornfeld, S., Characterization of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagine-linked oligosaccharides with immobilized *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins. *J. Biol. Chem.*, **257**, 11230-11234 (1982)