

イイダコ (*Octopus ocellatus*) 卵由来の赤血球凝集素について

細野 雅祐, 北川 和沙, 根井 敬之, 松田 厚志, 菅原 栄紀, 佐々木智子,
小川由起子, 高柳 元明, 仁田 一雄*

Studies of Hemagglutinin from *Octopus ocellatus* eggs

Masahiro HOSONO, Kazusa KITAGAWA, Takayuki NEI, Atsushi MATSUDA, Shigeki SUGAWARA,
Satoko SASAKI, Yukiko OGAWA, Motoaki TAKAYANAGI, and Kazuo NITTA*

(Received November 22, 2003)

Hemagglutinating activity was found in extract from *Octopus ocellatus* eggs. The hemagglutinin was partially purified by ammonium sulfate precipitation and DEAE anion exchange chromatography. DT300, a 300 mM NaCl-eluted fraction from DEAE column, possessed Ca^{2+} -dependent hemagglutinating activity on rabbit erythrocytes at concentrations from 0.47 to 30 $\mu\text{g/mL}$. Protein bands over 200 kDa were observed in DT300 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. On the other hand, ruthenium red staining gave an obvious single band on a cellulose acetate membrane. The protein and carbohydrate contents of DT300 were 24% and 2%, respectively. DT300-induced hemagglutination was inhibited by fetuin, asialofetuin, heparin, and DNA but not by heparan sulfate and mono- or oligosaccharides tested. This activity was resistant to heat and protease digestion. These results indicate that the active component having C-type lectin-like activity from octopus eggs may not be composed of protein.

Key words — hemagglutinating activity, Ca^{2+} dependent, octopus eggs, non-protein

海洋生物を生理活性物質のバイオマスとして利用する研究は、近年、多方面からのアプローチがみられるようになった。研究者の興味は、当初、医薬品への応用という見地からテトロドトキシンのような毒素¹⁻³⁾に代表される強力な作用をもった物質や抗菌活性あるいは抗腫瘍活性⁴⁻⁵⁾を有する比較的分子量の化合物によせられていた。しかし、これらの物質はほとんどが極微量成分であり、構造的にも複雑なものが多いことから、今日でも大量調製という点で困難が伴っている。一方、高分子物質、なかでもタンパク質性の生理活性物質については、近年、構造決定から大量調製にいたるまで、遺伝子レベルでのテクノロジーの進歩を背景として、いくつかの障壁が取り払われ、多数の興味ある知見が報告されている。また、このような潮流はマリンバイオテクノロジーと称され、医薬品に

限らず、特異的機能をもつ有用素材のシーズとして水産資源を利用し、実用生産レベルにまで到達可能な技術開発をしようとする動きが各方面で活発に行われている。

抗体産生機構をもたない無脊椎動物において、生体防御の尖兵となるのは、自然免疫の担い手であるマクロファージなどの食細胞や抗菌物質、⁶⁾フェノールオキシダーゼ系⁷⁾及びレクチン⁸⁾などの液性分子である。特にレクチンは、近年、レクチン経路といわれる補体活性化機構⁹⁾が明らかになり、下等動物の生体防御メカニズムの一端が説明されるようになった。この補体活性化機能をもつのは、マンノース結合性レクチン(MBL)¹⁰⁾やフィコリン¹¹⁾などのいわゆるコレクチンファミリー¹²⁾に属するレクチンで、無脊椎動物に限らず哺乳類にいたるまで広く体液中あるいは血清中に存在する。一方、脊椎動物で

ある魚類の体表粘液からは、同じC型レクチンに属する複数のレクチンの存在が知られており、^{13,14)} 病原性細菌に対する一次バリアーとしての役割を担っていると推測されている。最近、我々は魚卵中にこれらと類似したレクチンを見だし、構造的にもC型レクチンの一種であることを明らかにした。¹⁵⁾ また、魚卵中にはC型レクチンとは全く別の、L-ラムノースに強い親和性を有するレクチン(RBL)が広く存在することも報告している。^{16,17)} 産卵直前の水棲動物の卵巣は、種類にもよるが比較的均一に、しかも大量に採取できるという利点がある。

イカ、タコなどは分類学的には軟体動物門頭足綱に属するが、無脊椎動物の中では特異な存在で、大型のものになると捕食されることがないため、海中では食物連鎖のほぼ頂点に位置するものもあると考えられている。しかし、生理活性物質としてはイカ墨汁中に存在するムコ多糖-ペプチド複合体が抗腫瘍活性を有することが報告されている程度で、他にはあまり知られていない。¹⁸⁾ イイダコ (*Octopus ocellatus*) は全長20 cm、胴長5 cm程度の小型のタコであるが、卵は米粒状で直径6 mm前後と比較的大きく北海道以南の本州沿岸から朝鮮半島西岸・東シナ海の水深10 m前後の砂泥底や砂礫底に棲息し、日本沿岸では瀬戸内海や東京湾に多い。産卵前のメスの胴部(俗にいう、タコの頭)には、卵が一杯に詰まっており、その大きさと形が米粒そっくりなところから、イイダコ(飯蛸)と呼ばれる。産卵数は一体あたり300~400粒にすぎず、小型卵で十数万粒を産むマダコとは対照的である。今回、我々はこのイイダコ卵に着目し、赤血球凝集活性を指標としてレクチン活性の検索を試みた。

実験材料および方法

1. 材料

イイダコは産卵期(4月)のメスを長崎県有明漁協から購入した。

2. 抽出および部分精製

イイダコ卵(600 g)を冷生理食塩液中でホモ

ジナイズし、20倍量の冷アセトンに投入、脱脂後アセトン粉末とした。この粉末を30倍量の1 mM phenylmethanesulfonyl fluorideを含む冷生理食塩液中でホモジナイズし、10000 rpmで20分間遠心分離後、沈渣を除去した。この抽出液に対して40%飽和硫酸分画、次いで80%飽和硫酸分画を行い、それぞれ沈渣を回収した。沈渣は少量のH₂Oに溶解し、H₂Oに対して3日間透析した後内液を凍結乾燥した(80%飽和硫酸沈殿分画をAS80とする)。AS80(1 g)を20 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.2)で平衡化したDEAE-Toyopearlイオン交換カラム(2.1×23 cm)に添加し、同緩衝液で素通り画分(DT0)を溶出させた後、緩衝液中のNaCl濃度を50, 150, 300, 500 mMと段階的に上昇させて溶出した(それぞれDT50, DT150, DT300及びDT500)。各溶出画分は上記と同様の方法で透析、凍結乾燥後、さらに10DGカラム(Bio-Rad)により脱塩処理し、凍結乾燥した。

3. 赤血球凝集反応及び凝集阻害反応

赤血球凝集反応及び凝集阻害反応は、ウサギ赤血球を用い、Nittaらの方法¹⁹⁾に準じて行った。試料を0.15 M NaClを含む20 mM Tris-HCl緩衝液(TBS, pH 7.2)に溶解し、U型マイクロタイタープレートを用いて2倍希釈系列を作製した。キレート剤及び2価金属イオン存在下における凝集反応の場合、各ウェル5 mMとなるようにEDTA, CaCl₂, MgCl₂およびMnCl₂を添加し、2倍希釈系列を作製した。これに25 µLの2%ウサギ赤血球浮遊液(TBS)を加え、室温で10分間振とうし、30分間静置後判定した。凝集阻害反応は、被検試料溶液の2倍希釈系列(15 µL)に最低凝集価より3価高い濃度の凝集素溶液(10 µL)を加え、10分間振とう後20分間静置し、さらに2%ウサギ赤血球浮遊液を25 µL加えて10分間振とう、30分間静置後判定した。

4. 電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)はLaemmliらの方法²⁰⁾に準じ、8%分

離用ゲルを用いて行った。ゲルの染色には Coomassie Brilliant Blue R-250 を用い、タンパク質量の測定は DC プロテインアッセイキット (Bio-Rad) を用いて行った。セルロースアセテート膜電気泳動はセパラックス (フジフィルム) を用い、バルビタール緩衝液 (60 mM, pH 8.6) 中、1 mA/cm で 1 時間泳動を行った。染色はルテニウムレッド (Ca^{2+} 存在下の場合には 100 mM CaCl_2 を含む) により行った。

5. 糖含量の測定

中性糖の定量はグルコースを標準としたアントロン-硫酸法²¹⁾、またウロン酸の定量はガラクトロン酸を標準としたカルバゾール-硫酸法²²⁾により行った。

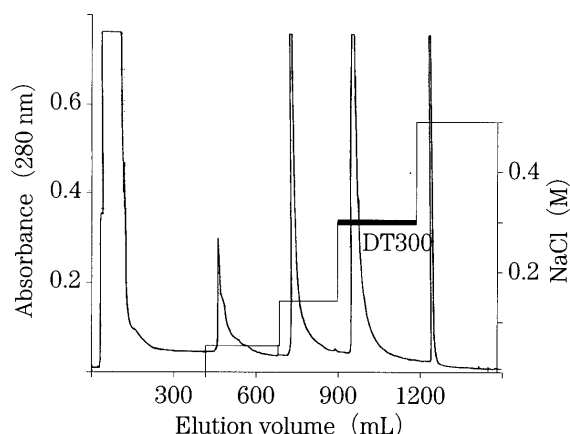


Fig. 1. Elution Pattern of AS80 on DEAE-Toyopearl Column.

AS80 (1 g) was dissolved in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) and applied to DEAE-Toyopearl column (2.1 x 23 cm). Elution was performed with a stepwise increase of the molarity of NaCl indicated with step lines. DT300 was emphasized by bold line.

6. DT300 の熱安定性及び酵素感受性の検討

熱安定性試験では、同量の DT300 溶液 (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, TBS) を 40, 60, 80 および 100 $^{\circ}\text{C}$ でそれぞれ 10 分間加温した後ただちに氷冷し、15000 rpm, 15 分間遠心分離後の上清を試料とし、未処理の DT300 溶液をコントロールとして赤血球凝集反応を行った。酵素感受性試験では、DT300 溶液 (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, TBS) 20 μL に proteinase K 溶液 (5 mg/mL, TBS) 5 μL を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 10, 30, 60, 120 分間それぞれインキュベートした後、100 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分間加温、直ちに氷冷し、上記と同様に処理した。

結 果

1. 赤血球凝集活性画分の分離

100 g のイイダコ卵アセトン脱脂粉末を生理食塩液で抽出し硫酸分画することにより、13 g の AS80 を得た。DEAE-Toyopearl による AS80 の分離パターンを Fig. 1 に示した。

各溶出画分の赤血球凝集活性を検討したところ、 Ca^{2+} イオン非存在下ではどの画分にも凝集活性は認められなかった。しかし、終濃度 2.5 mM の CaCl_2 の添加により、DT300 及び DT500 に活性が認められた。最低凝集濃度は DT500 において 3.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であったが、DT300 では凝集に至適濃度範囲が認められ、0.47 ~ 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で活性が認められた (Table 1)。

2. DEAE カラム溶出画分の SDS-PAGE

DEAE カラム溶出画分の SDS-PAGE パターンを Fig. 2 に示した。DT300 には 200 kDa 以上の、

Table 1. Hemagglutinating Activity of DT300 from *Octopus ocellatus* Eggs^{a)}

DEAE fraction	- Ca^{2+}	+ Ca^{2+}
DT0	>70	>175
DT50	>70	>175
DT150	>84	210
DT300	>48	0.37 - 30
DT500	>22	3.4

^{a)} Hemagglutinating activity was indicated by minimum concentration of protein causing obvious hemagglutination with or without CaCl_2 (final concentration of 2.5 mM) for 2% rabbit erythrocytes.

また DT150 には約 60 kDa 付近のバンドが認められた。DT50 を除く画分には濃縮ゲルと分離ゲルの境界付近にタンパク染色が認められた。DT0, DT50, DT150, DT300 及び DT500 のタンパク質含量はそれぞれ, 20%, 35%, 43%, 24% および 11% であった。また, DT300 の糖

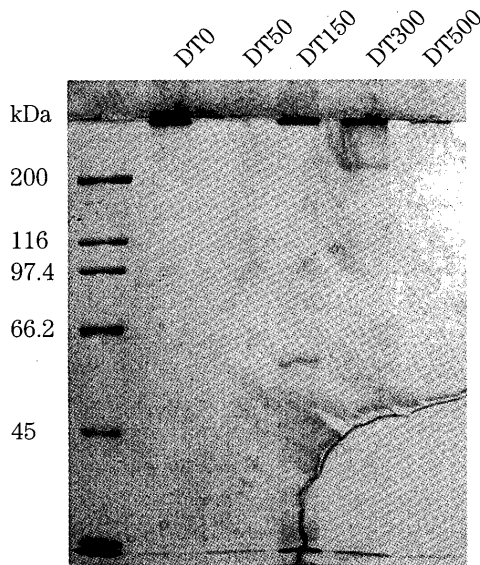


Fig. 2. SDS-PAGE Pattern of Each Fraction Eluted from DEAE-Toyoparl Column. Electrophoresis was performed by using homogeneous 8% gel with 2-mercaptoethanol. Marker proteins used were: myosin (200000), β -galactosidase (116000), phosphorylase B (97400), bovine serum albumin (66200), and ovalbumin (45000).

含量は, アントロン-硫酸法およびカルバゾール-硫酸法によりいずれも約 2% であった。

3. DT300 の赤血球凝集活性

DT300 の赤血球凝集活性は, 単糖およびオリゴ糖では終濃度 150 mM でも阻害されなかったが, フェツイン, アシアロフェツイン, ヘパリン及びサケ精巢 DNA で阻害された (Table 2)。一方, 硫酸基を除いた 3 種の修飾ヘパリンを用いたところ, 硫酸基の含量が低下すると阻害活性も低下する傾向が認められた。また, ヘパリン硫酸では阻害が認められなかった (Table 2)。

4. 2価金属イオン共存下での赤血球凝集反応

CaCl₂ 共存下での DT300 の赤血球凝集活性と比較して, MnCl₂ では弱い活性が観察されたが, MgCl₂ ではまったく凝集が認められなかった (Table 3)。

5. DT300 の熱安定性および酵素感受性

DT300 の赤血球凝集活性は, 100 °C で 10 分間の加熱処理によっても変化しなかった。また, proteinase K による 2 時間の酵素消化でも, 活性の低下は認められなかった (Fig. 3)。

6. セルロースアセテート膜電気泳動

セルロースアセテート膜電気泳動後, ルテニ

Table 2. Inhibition of DT300-induced Hemagglutination ^{a)}

Inhibitor	Minimum inhibitory concentration (μ g/mL) ^{b)}
Fetuin	250
Asialofetuin	31.3
Heparin	3.9
CDSNAc ^{c)}	>1000
CDSNS ^{c)}	1000
NDSNAc ^{c)}	125
Heparan sulfate	>1000
DNA	9.4 - 300

^{a)} Two percent of rabbit erythrocyte suspension were used with 8 HU of hemagglutinin. DT300-induced hemagglutination was not inhibited by 150 mM (final concentration) of D-galactose, L-galactose, D-glucose, L-glucose, D-mannose, L-mannose, D-xylose, L-xylose, D-arabinose, L-arabinose, D-fucose, L-fucose, N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-D-galactosamine, L-rhamnose, sucrose, lactose, maltose, melibiose, lactulose, and raffinose.

^{b)} Minimum concentration (μ g/mL) of inhibitors required for complete inhibition.

^{c)} Abbreviations and total sulfur contents are; CDSNAc, completely desulfated N-acetylated heparin, < 1.5%; CDSNS, completely desulfated N-desulfated heparin, 4.5 - 7.0%; NDSNAc, N-desulfated N-acetylated heparin, > 8.0%.

Table 3. Influence of Divalent Cations for DT300-induced Hemagglutination

Divalent cation ^{a)}	Hemagglutinating activity ^{b)}
Ca ²⁺	0.37 – 30
Mn ²⁺	12
Mg ²⁺	>48

^a Five mM of CaCl₂, MnCl₂, and MgCl₂ (final concentration) were used.

^b Hemagglutinating activity was indicated by minimum concentration of protein causing obvious hemagglutination for 2% rabbit erythrocytes.

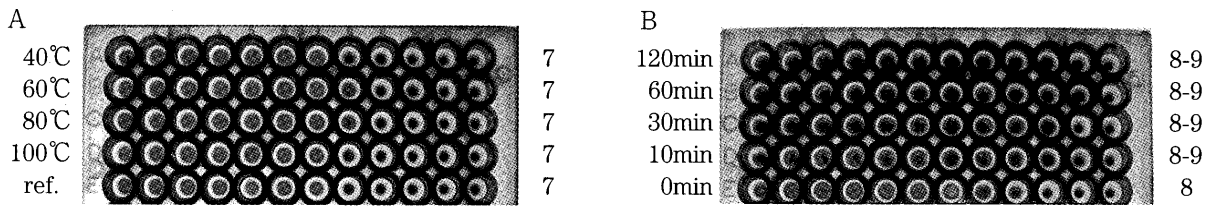


Fig. 3. Heat Stability and Enzymatic Susceptibility of DT300 for Hemagglutinating Activity.

A, DT300 solution (0.5 mg/mL) was heated at indicated temperatures for 10 min and then cooled on ice. After centrifugation at 15000 rpm for 15 min, the supernatant was applied for hemagglutination assay. B, DT300 solution (0.5 mg/mL) was incubated with proteinase K (5 mg/mL) for indicated times and then heated at 100 °C for 5 min. After cooling on ice and centrifugation at 15000 rpm for 15 min, the supernatant was applied for hemagglutination assay. Numerals cited at right side were the well numbers decided on the minimum concentration causing obvious hemagglutination.

ウムレッド染色した結果, リファレンスとして泳動したウシ血清アルブミンはほとんど染色されなかったが, DT300 は濃染された. このバンドの染色像は, 染色液に CaCl₂ を添加することにより低下した (Fig. 4).

考 察

本実験では, イイダコ卵におけるレクチン活性の検索を目標とした. アセトン脱脂粉末の生理食塩液抽出画分を硫酸分画し, 多くの可溶性タンパク質が沈殿する濃度である 80% 飽和硫酸沈殿画分, AS80 を対象とし, ウサギ赤血球凝集活性を指標として実験を開始した. AS80 そのものには赤血球凝集活性がみられなかったが, 陰イオン交換カラムで分画することにより, DEAE 樹脂に強く吸着する画分, DT300 および DT500 に Ca²⁺ イオン依存性の凝集活性が回収された (Fig. 1 及び Table 1). これらのうち, より比活性の高い DT300 について諸性質を検討した. DT300 の凝集活性には濃度依存性 (0.47 ~ 30 µg/mL) が認められたが, 一つの原因として,

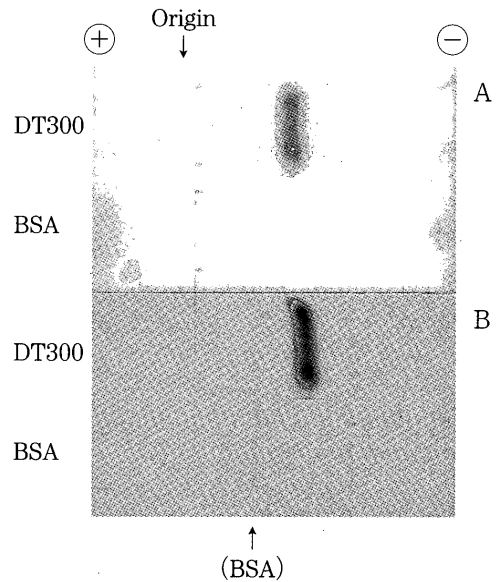


Fig. 4. Ruthenium Red Staining of DT300 on Cellulose Acetate Membrane.

DT300 and BSA solution were applied to the cellulose acetate membrane at the point indicated by arrow with "Origin" and electrophoresis was processed in barbital buffer (pH 8.6) at 1 mA/cm of membrane width for 1h. Membranes were stained with ruthenium red solution with (A) or without (B) 100 mM CaCl₂. Because BSA band displayed a slight staining, mobile position was indicated by arrow.

この画分には微量の凝集阻害成分が混在しており, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度ではその阻害活性が発揮されている可能性がある. DEAE カラムの各溶出画分は, いずれもタンパク質含量が低く (10 ~ 40%), SDS-PAGE 後のタンパク染色でも確認できたバンドは非常に少なかった (Fig. 2). DT150 のレーンに認められた約 60 kDa のバンドは活性成分ではないと考えられ, また DT300 のレーンに認められた 200 kDa を超えるバンドも, DT500 に同等のものが見られないことから, 活性成分であるか否かは明らかではない. DT50 を除く各レーンに認められた顕著なバンドは, タンパク質が凝集して高分子化したものと考えられるが, これも活性成分とは考えにくい. そこで, DT300 について糖含量の測定を行ったところ, アントロン-硫酸法で重量比 2% という結果であった. 試料は脱塩処理を施していること, また結果は示していないが, 臭化エチジウムを用い, 半定量的な DNA 染色を行ったところ, DT300 に DNA の混在は認められなかったことから, タンパク質, 糖質, 核酸以外の分子が存在する可能性が示唆された.

一方, DT300 のウサギ赤血球凝集活性に対する阻害剤の検討を行った. レクチンの糖結合特異性を試験する際に用いられる市販の単糖及びオリゴ糖を用いて凝集阻害実験を行ったところ, いずれも阻害活性を示さなかった (Table 2). これに対し, 糖タンパク質であるフェツイン及びアシアロフェツイン, ムコ多糖であるヘパリンで凝集の阻害が認められた. フェツインよりもアシアロフェツインの阻害活性が高いことから, この凝集反応へのシアル酸の関与は少ないものと考えられる. 次にヘパリンのもつ硫酸基の関与を検討するため, 脱硫酸ヘパリンを用いて阻害実験を行ったところ, CDSNAc (硫酸含量 1.5% 以下) < CDSNS (同 4.5 ~ 7.0%) < NDSNAc (同 8% 以上) の順で阻害活性が上昇した. この結果は DT300 の凝集活性への硫酸基の関与を示唆する. 一方, 硫酸含量がヘパリンよりは低いものの, 脱硫酸ヘパリンよりは高いヘパリン硫酸にはまったく阻害活性が認められないので, 単に硫酸基の量に起因するものでもない. また, DNA も阻害剤

として機能することから, 硫酸基に限らず, リン酸基も含めた負電荷が DT300 の赤血球凝集に必要であると考えられる.

上述したように DT300 は, 単独では赤血球凝集活性を示さず, 活性発現に Ca^{2+} イオンを必要とする (Table 1). また, 活性発現に必要な金属イオンとして, Mn^{2+} は若干寄与するところがあるが, Mg^{2+} の添加ではまったく凝集が起らなかった (Table 3). この結果は, 動物レクチンのカテゴリーの中で最も多い構成員数を有する C 型レクチンとの関連を想起させる. 古典的な定義では, レクチンは, 簡単な糖 (鎖) でその凝集活性が阻害される (糖) タンパク質であるとされている.²³⁾ しかし, 実際には糖結合特異性のはっきりしないもの, あるいは硫酸基やコアペプチド部分など, 糖鎖以外の構造に親和性を有するレクチンが, 特に C 型レクチンファミリーに多いことが知られている.²⁴⁾ 以上を勘案すれば, DT300 も C 型レクチン様の活性があると言えるが, その本質がタンパク質であるか否かを確認する必要がある. そこで, 加熱および酵素消化による赤血球凝集活性の変化を調べたところ, いずれの実験においても凝集活性の低下は認められなかった (Fig. 3). これらの結果は, DT300 の活性本体が非タンパク質成分であることを示唆している.

セルロースアセテート膜電気泳動の後, ルテニウムレッド染色を行ったところ, 陽極側に移動する染色バンドが観察された. このバンドは 100 mM CaCl_2 を含むルテニウムレッド溶液では染色が弱くなることから, カルシウムを含有する物質であると考えられる (Fig. 4). 結果は示していないが, 別に泳動したセルロースアセテート膜をクーマシー染色してもバンドは検出されなかった.

以上の結果から, DT300 の赤血球凝集活性は, 見かけ上, Ca^{2+} イオン依存性の C 型レクチン様活性を有するものの, 活性の本体はタンパク質ではないか, もしくは何らかの保護基質と結合することによって非常に安定状態で存在するタンパク質である可能性が示唆された. 活性の本体が明らかではないが, 赤血球凝集活性を有するレクチン様物質の報告は, 過去にいくつかな

されている。例えば、アボカド (*Persa americana*) 種子由来の凝集素は、糖親和性がなく、塩基性タンパク質やポリアミンに結合し、可溶化剤、タンパク質変性剤、プロテアーゼおよびヌクレアーゼに対して抵抗性であるため、非タンパク質性のレクチン様物質であると考えられた。²⁵⁾ また、紅藻類である *Gracilaria verrucosa* 由来の赤血球凝集素は、単糖あるいはオリゴ糖では阻害されないが、フェツインで活性が阻害される、糖含量が92%の硫酸化プロテオグリカンで、加熱により失活するものの、プロテアーゼや過ヨウ素酸化には非感受性であることが報告されている。²⁶⁾ これらはいずれも本研究と同様に、赤血球凝集活性を指標に生理活性物質を検索しようとする試みから得られたものであるが、凝集活性に糖鎖の関与がなく、さらには活性の本体が非タンパク質であるので、これらをレクチンとよぶことはできない。したがってこれらの赤血球凝集メカニズムを、レクチンの糖鎖認識機構によるアフィニティー結合に擬することも困難であると考えられる。このことは、「赤血球凝集」という現象が特異的な意味のある「活性」というよりはむしろ非特異的な、あるいは二次的な現象である可能性を物語っている。イイダコ由来の凝集素も同様であり、しかも(1)活性発現にCa²⁺イオンを必要とするが、それ自身もカルシウムを含んでいる可能性がある、(2)負電荷により凝集が阻害されると考えられるが、DT300自身も負に荷電していることから、膜表面に多くのシアル酸残基、すなわち負電荷を有する赤血球との相互関係をどのように説明するか、(3)凝集活性の本体は何か、などいくつかの課題が残っている。現在これらの疑問を解明すべく、実験を継続しているところである。

REFERENCES

- 1) Fusetani N., *Kagaku to Kogyo*, **37**, 737-740 (1984).
- 2) Nukina M., Koyanagi L. M., Scheuer P. J., *Toxicon*, **22**, 169-176 (1984).
- 3) Uemura D., *Kagaku to Seibutsu*, **23**, 435-441 (1985).
- 4) Hirata Y., Uemura D., *Pure Appl. Chem.*, **58**, 701-707 (1986).
- 5) Schmitz F. J., Bowden D. F., Toth S. I., "Marine Biotechnology" Vol.1, ed. by Attaway D. H., Zaborsky O. R., Plenum, New York, 1993, p.197.
- 6) Hoffman J. A., Kafatos F. C., Janeway C. A. Jr., Ezekowits R. A. B., *Science*, **284**, 1313-1318 (1999).
- 7) Söderhäll K., Cerenius L., *Curr. Opin. Immunol.*, **10**, 23-28 (1998).
- 8) Kawabata S., *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **45**, 679-689 (2000).
- 9) Endo Y., Fujita T., *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **45**, 671-678 (2000).
- 10) Kozutsumi Y., Kawasaki T., Yamashina I., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 658-664 (1980).
- 11) Lu J., Le Y., *Immunobiol.*, **199**, 190-199 (1998).
- 12) Malhotra R., Haurum J., Thiel S., Sim R. B., *Eur. J. Immunol.*, **22**, 1437-1445 (1992).
- 13) Oda Y., Ichida S., Mimura T., Maeda K., Tsujikawa K., Aonuma S., *J. Pharm. Dyn.*, **7**, 614-623 (1984).
- 14) Tasumi S., Ohira T., Kawazoe I., Suetake H., Suzuki Y., Aida K., *J. Biol. Chem.*, **277**, 27305-27311 (2002).
- 15) Hosono M., Sugawara S., Ogawa Y., Kohno T., Takayanagi M., Nitta K., submitted.
- 16) Hosono M., Nitta K., *Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo*, **40**, 21-43 (1993).
- 17) Hosono M., Ishikawa K., Mineki R., Murayama K., Numata C., Ogawa Y., Takayanagi Y., Nitta K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1472**, 668-675 (1999).
- 18) Takaya Y., Uchisawa H., Matsue H., Okuzaki B., Narumi F., Sasaki J., Ishita K., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 846-849 (1994).
- 19) Nitta K., Takayanagi G., Kawauchi H., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 315-320 (1983).
- 20) Laemmli U. K., *Nature (London)*, **227**, 680-685 (1970).
- 21) Dreywood R., *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **18**, 499 (1946).

- 22) Bitter T., Muir H. M., *Anal. Biochem.*, **4**, 330-334 (1962).
- 23) Goldstein I. J., Hughes R. C., Monsigny M., Osawa T., Sharon N., *Nature* (London), **285**, 66 (1980).
- 24) Sharon N., Lis H., "Lectins," Chapman and Hall, London, 1989.
- 25) Meade N. A., Staat R. H., Langley S. D., Doyle R. J., *Carbohydr. Res.*, **78**, 349-363 (1980).
- 26) Kanoh H., Kitamura T., Kobayashi Y., *Comp. Biochem. Physiol.*, **102B**, 445-449 (1992).