

博士論文

未利用海藻に発現される糖タンパク質糖鎖の構造特性解析及び
海藻由来レクチンの精製と糖鎖結合特異性解析

2014年9月

吉家 猛雄

岡山大学大学院自然科学研究科
バイオサイエンス専攻

目次

略号

第1章 序論	1
第2章 瀬戸内海産の海藻（海草）及び淡水圏沈水性植物が産生する 糖タンパク質糖鎖の構造特性解析	
第1節 緒言	7
第2節 材料及び方法	8
第1項 材料・試薬	8
第2項 海藻，海草及び淡水圏沈水性植物	8
第3項 糖ペプチドの調製	10
第4項 Size-fractionation (SF-) HPLC による糖ペプチドの部分精製	11
第5項 糖ペプチドからの N-グリカンの遊離（ヒドラジン分解）	11
第6項 N-グリカンの蛍光標識（ピリジルアミノ(PA) 化）	12
第7項 Reversed-phase (RP) -HPLC による PA 糖鎖の部分精製	12
第8項 Size fractionation (SF) -HPLC による PA 糖鎖の精製	13
第9項 グリコシダーゼ消化による PA 糖鎖の構造解析	13
9-1 α -1,2-Mannosidase (<i>Aspergillus saito</i>) 消化	13
9-2 α -Mannosidase (Jack bean) 消化	14
9-3 α -1,3/4 Fucosidase (<i>Streptomyces</i> sp. 142) 消化	14
9-4 β 1-3/6-Galactosidase 消化	14
9-5 N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (<i>Diplococcus pneumoniae</i>) 消化	15

第 10 項	エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS)	15
第 3 節	結果	15
第 1 項	糖ペプチドの部分精製	15
第 2 項	蛍光標識 (PA-) 糖鎖の構造解析	17
2-1	RP-HPLC による PA-糖鎖の部分精製と SF-HPLC による糖鎖マッピング	17
2-2	グリコシダーゼ消化および ESI-MS による糖鎖構造解析	17
第 4 節	考察	26
第 3 章	ミル (<i>Codium fragile</i>) からのレクチンの精製と糖鎖結合特異性解析	30
第 1 節	緒言	30
第 2 節	材料及び方法	31
第 1 項	材料・試薬	31
第 2 項	ミルレクチン (CFL, <i>Codium fragile lectin</i>) の凝集活性測定	31
第 3 項	粗レクチンの調製	32
第 4 項	疎水クロマトグラフィーによるミルレクチンの精製	32
第 5 項	Sephacryl S-200 によるミルレクチンの精製	32
第 6 項	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)	33
第 7 項	アミノ酸配列分析	33
第 8 項	糖鎖アレイ分析	34
第 3 節	実験結果	36
第 1 項	<i>Codium fragile lectin</i> -I (CFL-I) と <i>Codium fragile lectin</i> -II (CFL-II) の精製	36
第 2 項	CFL-I および CFL-II の N-末端アミノ酸配列	39
第 3 項	CFL-I および CFL-II の糖鎖結合特異性解析 (糖鎖アレイ解析)	39
第 4 節	考察	42

第4章 総括	44
参考文献	47
謝辞	54

略号

PA, pyridylamino;

HPLC, high performance liquid chromatography;

RP-HPLC, reverse-phase HPLC;

SF-HPLC, size-fractionation HPLC;

ESI-MS, electrospray ionization mass;

MeCN, acetonitrile ;

Tris, tris (hydroxymethyl) aminomethane;

TBS, Tris buffer salined.

MES, 2-morpholinoethanesulfonic acid;

TFA, trifluoroacetic acid;

Man, D-mannose;

Gal, D-galactose;

Fuc, L-fucose;

Xyl, D-xylose;

GlcNAc / GN, *N*-acetyl-D-glucosamine;

GalNAc, *N*-acetyl-D-galactosamine;

Con A, Concanavalin A;

CFL, *Codium fragile* lectin;

β 1-2XylT, β -1,2-xylosyltransferase;

α 1-3FucT, α -1,3-fucosyltransferase ;

β 1-3GalT, β -1,3-galctosyltransferase;

β 1-2GlcNAcT, β -1,2-GlcNAc transferase;

α -Man'ase, α -mannosidase;

β -Gal'ase, β -galactosidase;

β -GlcNAc'ase, β -*N*-acetylglucosaminidase;

α -Fuc'ase, α -fucosidase;

M9, Man α 1-2Man α 1-6(Man α 1-2Man α 1-3)Man α 1-6(Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-3)Man β 1-4
GlcNAc β 1-4GlcNAc;

M5, Man α 1-6(Man α 1-3)Man α 1-6(Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc.

M1, Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc;

M2FX, Man α 1-3(Xyl β 1-2)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc;

M3X, Man α 1-6(Man α 1-3)(Xyl β 1-2)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc;

M3FX, Man α 1-6(Man α 1-3)(Xyl β 1-2)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc;

GN2M3FX,

GlcNAc β 1-2Man α 1-6(GlcNAc β 1-2Man α 1-3)(Xyl β 1-2)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-3)
GlcNAc;

Gal2F2GN2M3FX,

Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-2Man α 1-6(Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-2Man α 1-3)(Xyl β 1-2)
Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc;

第1章 序論

糖タンパク質糖鎖，特にアスパラギン結合型糖鎖（*N*-グリカン）の構造・機能相関解析は，これまで線虫，ショウジョウバエ，ほ乳動物，高等植物を研究対象として展開されて来ており，小胞体中での新生タンパク質のフォールディング機構への関与，分化あるいは，病態に伴う糖鎖構造変化，糖鎖構造変化によるタンパク質の *in vivo* 活性の変動等が明らかにされている¹⁾。また，ほ乳動物が産生する複合型 *N*-グリカンの化学構造については，動物種間や組織間で様々な構造多様性が見られるものの，Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6 (Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3) Manβ1-4GlcNAcβ1-4(±Fucα1-6)GlcNAcβ 構造ユニットが共通して見られる。一方，植物が産生する糖タンパク質には，動物由来の糖タンパク質には見られない植物特異的な構造を有する糖鎖が結合する^{1,2,3)}。これら植物複合型糖鎖は，β1-2 キシロース (Xyl) 残基とα1-3 フコース(Fuc)残基がトリマンノシルコア構造に結合する点が決定的であり，分泌型糖タンパク質の場合には，更に非還元末端領域にルイス a 抗原ユニット(Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1-)が結合する (図 1-1)。

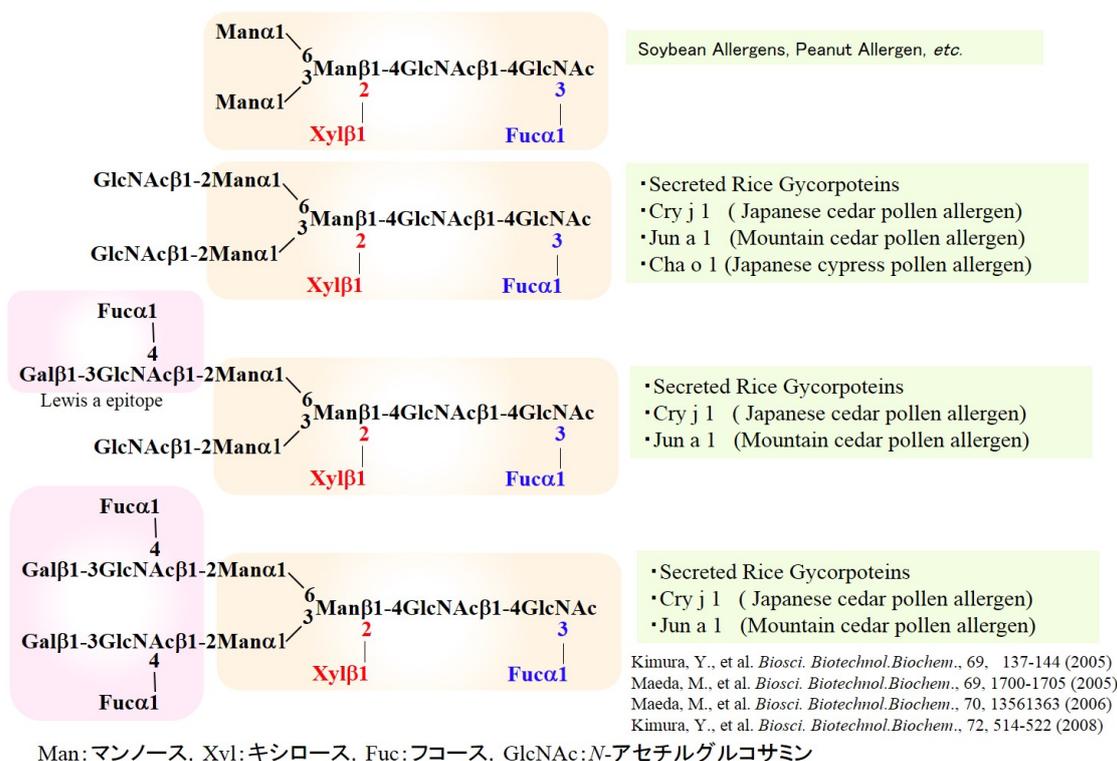


図 1-1 花粉、大豆アレルゲンに結合する植物複合型糖鎖の構造特性

しかしながら、これら複合型糖鎖の植物生理に関わる生物機能については未だ不明な点が多い。小胞体中での分泌タンパク質のフォールディング機構において、それらに結合する糖鎖とカルネキシンやカルレティキュリン等の糖鎖認識分子シャペロンとの結合が重要なステップであるため、グルコース含有のハイマンノース型糖鎖 (Glc₁Man₉GlcNAc₂-Asn)の生理機能は動植物に共通している。その一方で、植物特異的な複合型糖鎖の生合成に関与するグリコシダーゼ(α -マンノシダーゼ II(α -Man'ase II)⁴⁾)や、糖転移酵素 (GlcNAc 転移酵素 I (GnTI)⁵⁾, β 1-3Gal 転移酵素 (β 1-3GalT)⁶⁾, α 1-3Fuc 転移酵素 (α 1-3FucT)⁷⁾, β 1-2Xyl 転移酵素 (β 1-2XylT)⁸⁾遺伝子の欠損株や破壊株においては、植物複合型糖鎖のプロセッシングが抑制されているにも関わらず、植物体の成長には殆ど影響を与えず、それらの表現系も野生株と変わらないことが報告されている^{9,10)}。これらの結果から、植物複合型糖鎖は、植物の分化生長の方向を決定するような特異的機能を担っていないと考えられてきていたが、最近、複合型糖鎖へのプロセッシングが塩ストレスに対して重要な生理的意義を有することが報告されている。Kang らは、GlcNAc 転移酵素 I (GnTI) を欠損したアラビドプシス変異株では、塩濃度の上昇 (130 mM) により根の伸長が顕著に阻害されることを見出し、セルロース合成に関与する endo- β 1,4-glucanase Korrikan 1 / RADIALLY SWOLLEN 2 (KOR1/RSW2) の糖鎖構造不全がその活性低下を招くことを明らかにしている¹¹⁾。従って、植物複合型 N-グリカンの構築は、分化・成長そのものには必須ではないものの、環境ストレス耐性に寄与する可能性が考えられることから、植物生理に特異的なコンテキストでの糖鎖機能に興味を持たれる。

ほ乳動物の獲得免疫系に対して植物複合型糖鎖が示す抗原性は、花粉症などの免疫疾患への関与といった観点からも興味深い。 β 1-2Xyl 残基や α 1-3Fuc 残基を有する糖鎖構造は、Cross-reactive Carbohydrate Determinant (CDD)として花粉、食物、あるいは無脊椎動物抗原間の共通抗原性に関与している。ほ乳動物 N-グリカンには存在しない β 1-2Xyl 残基と α 1-3Fuc 残基が抗植物糖鎖抗体のエピトープであることは明らかになっているものの^{12,13)}、この抗原性糖鎖が花粉症あるいは植物食品アレルギー

を惹起するエピトープとなっているか否かについての明確な結論は得られていない¹⁴⁻¹⁹⁾。その一方で、岡野らは、スギ花粉症患者から調製した T 細胞をスギ花粉アレルゲン (Cry j1) で刺激する際に、遊離型植物 N-グリカンを追加すると、Th1 細胞からの IF- γ 産生には影響せず、Th2 細胞からの IL4 産生が有為に抑制されることを見出している¹⁹⁾。この結果は、植物複合型糖鎖が抗アレルギー薬剤として利用できる可能性を示唆するものであり、植物糖鎖の医薬あるいは食品産業への応用利用の観点からも興味を持たれる(図 1-2)。

スギ花粉症患者より樹立したCry j 1特異的 T 細胞株に対する
遊離型N-グリカンの応答性

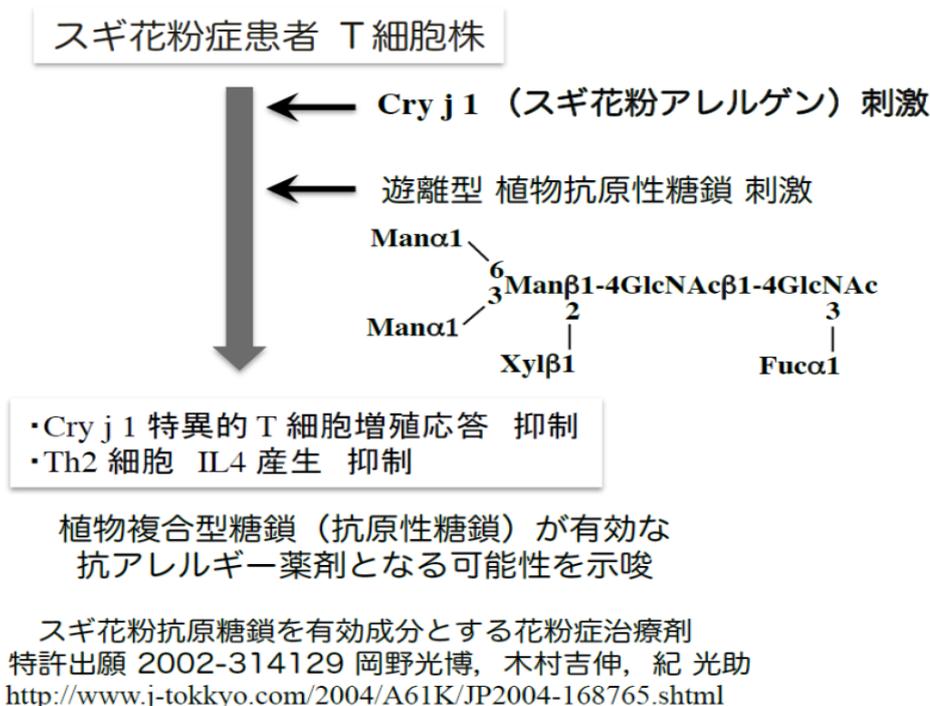


図 1-2 植物抗原性糖鎖の糖鎖薬剤への応用利用

更に、アスパラギン結合型糖鎖の医療産業や食品産業への応用の観点から植物糖タンパク質に結合する N-グリカンを捉えると、複合型糖鎖に加えて、ハイマンノース型糖鎖にも興味深い生物活性があり、産業利用への応用が期待できる。例えば、Man₉.₈GlcNAc₂ 構造のように Man α 1-2Man α 1-2Man ユニットを有する高分子ハイマン

ノース型糖鎖は、HIV 表面に発現している糖鎖を認識する抗 HIV 抗体の産生に有効であることが報告されており^{20,21)}、これらの抗体産生には、これらの高分子ハイマンノース型糖鎖を人工的に結合させた複合糖質の調製が必要となる。

糖鎖薬剤等の開発や応用に当たっては、多量の糖鎖が必要となるため、化学合成法の確立に加えて、天然資源からの機能性糖鎖の多量調製法の確立が課題である。木村らは、銀杏種子の貯蔵糖タンパク質に $\text{Man}_3\text{Xyl}_1\text{Fuc}_1\text{GlcNAc}_2$ 構造を主成分 (~90%)とする抗原性糖鎖が結合することを見出している²²⁾。最近、前田らは、銀杏種子貯蔵糖タンパク質からプロテアーゼ処置、イオン交換クロマト、ゲルろ過、親水性クロマトを組み合わせることにより、構造均一な抗原性糖鎖含有糖ペプチドの多量調製法を確立している²³⁾。また、木村らは雑豆の貯蔵糖タンパク質に注目し、12 種類の雑豆（大納言、小豆、ササゲ、金時、トラマメ、ウズラマメ、ひよこ豆、大福豆、紫豆、蚕豆、エンドウ、ナタマメ）の貯蔵糖タンパク質に結合する *N*-グリカンについてもそれらの網羅的な構造解析を行っている。その結果、トラマメ、大納言、小豆に含まれる貯蔵糖タンパク質にはそれぞれ $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ 構造のハイマンノース型糖鎖が多量蓄積していることが明らかになり、これらの雑豆が機能性糖鎖の有効な供給源となることが示された。しかしながら、ルイス a 抗原含有の植物複合型 *N*-グリカンについては、多くの植物に発現しているものの存在量が少ないため、抗原性糖鎖の免疫活性解析あるいは糖鎖薬剤開発のリード化合物としての利用が極めて困難である。これまで、植物糖タンパク質糖鎖の構造および機能解析については、主に陸生植物が産生する糖タンパク質を対象にして研究が行われており、海藻あるいは沈水性植物（海草、水草）が産生する糖タンパク質糖鎖の構造特性、生合成機構については未だ不明な点が多く、糖鎖機能に関する知見もほとんどない。

岡山県が南面する瀬戸内海には、古来、褐藻類、紅藻類、緑藻類等、多種多様な海藻が繁茂しており、食材として汎用される海藻も多いが、食材に適しない海藻は古来より肥料として利用されてきている。更に最近では、バイオエタノール生産の

原材料としての利用価値も高まりつつある。海藻は植物界に属するが、系統学的には異質な複数の分類群から成り立っており、形態をはじめ生物学的性質には大きな多様性が存在する。海藻は陸生植物と同様に光合成を行うものの、胞子を形成して増殖し、根・茎・葉の区別がない。一方、アマモ科のアマモ (*Zostera marina*) などは根・茎・葉の区別があり、単子葉植物に分類され、「海草」と表記し「海藻」とは区別される。上述のように、これら「海藻」および「海草」は陸生植物と同様、糖タンパク質を生合成しているものの、それらに結合する糖鎖の化学構造には不明な点が多い。そこで、本博士論文研究では、機能性糖鎖の有用な供給源を探索する目的で、未利用バイオマスとしての海藻および海草に注目し、それらに発現される糖タンパク質糖鎖、特に *N*-グリカンについて網羅的な構造特性解析を行った。また、木村らは、タバコ培養細胞を用いて、耐塩性獲得と糖タンパク質糖鎖構造変化に相関があることを見出しており²⁴⁾、植物の環境応答における糖鎖機能にも興味を持たれている。そこで、塩水環境と淡水環境で生育する植物が産生する糖タンパク質糖鎖の構造比較を行うことで、植物の環境応答に関わる糖鎖機能についての知見を得るために、淡水圏に生育する沈水性植物 (オオカナダモ (*Egeria densa*), コカナダモ (*Elodea nuttallii*), マツモ (*Ceratophyllum demersum*)) についても、*N*-グリカンの網羅的な構造特性解析を行った。

一方、海藻中には、低分子量のレクチンが発現されていることが明らかになってきており²⁵⁻⁴³⁾、それらレクチンの糖鎖結合特異性から海藻レクチンの医薬産業への応用利用が期待されている。例えば、ミル (*Codium*) から精製された 15 kDa レクチンは腫瘍抗原糖鎖 (Forssman 抗原) に特異的な糖鎖結合性を示すことや⁴²⁾、う蝕原因菌 *Streptococcus mutans* のバイオフィーム抑制能を有することが報告されており、医療試薬としての利用が期待されている⁴⁴⁾。そこで、本博士論文研究においても、緑藻であるミル (*Codium fragile*) に注目し、新規レクチン検索、精製、糖鎖アレイ分析を用いた糖鎖結合特異性解析を行い、未利用海藻の産業利用に向けた基礎研

究を進めた。

本博士論文は、これまで注目されていなかった瀬戸内海産の海藻・海草及び淡水圏沈水性植物に注目し、それらに発現される糖タンパク質糖鎖の構造特性と海藻レクチンの生化学的諸性質についての知見をまとめたものである。

第2章 瀬戸内海産の海藻（海草）及び淡水圏沈水性植物が産生する糖タンパク質糖鎖の構造特性解析

第1節 諸言

海藻及び海草の分泌型タンパク質は、陸生植物が産生する分泌型タンパク質と同様 *N*-グリコシル化を受けているが、それら糖タンパク質糖鎖の構造特性に関する知見は殆どない。従って、陸生植物が産生する植物特異的な抗原性糖鎖が、海藻糖タンパク質にも存在するか否かは不明であり、陸生植物に見られない新たな構造特性を持った新規 *N*-グリカンの存在も考えられる。一方、植物抗原性糖鎖が有する Th2 細胞からの IL4 産生抑制活性は、抗アレルギー薬剤への応用が期待されているものの、糖鎖薬剤開発に向けた糖鎖供給量の確保についての課題が残されている。また、化学合成による植物抗原性糖鎖の多量調製についても、未だ報告がなく、天然資源からの糖鎖調製の確立が望まれている。植物抗原性糖鎖のうち、 $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)(\text{Xyl}\beta 1-2)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}$ ($\text{Man}_3\text{Xyl}_1\text{Fuc}_1\text{GlcNAc}_2$) 構造の植物抗原性糖鎖については、最近、前田らが銀杏種子貯蔵糖タンパク質からの多量調製法を確立しており、数百ミリグラムの糖鎖供給が可能となっている²³⁾。しかしながら、還元末端にルイス a エピトープ ($\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}$) を有する植物複合型 *N*-グリカン ($\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-6(\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-3)(\text{Xyl}\beta 1-2)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}$ ($\text{Gal}_2\text{F}_2\text{GN}_2\text{M}_3\text{FX}$) や非還元末端に GlcNAc 2 残基を有するバイアンテナ型の植物複合型糖鎖 $\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-6(\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-3)(\text{Xyl}\beta 1-2)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc}$ ($\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{Xyl}_1\text{Fuc}_1\text{GlcNAc}_2, \text{GN}_2\text{M}_3\text{FX}$) については、有用な供給源が未だ見つかっていない。

そこで本章では、瀬戸内海で多量採取が可能な海藻および海草に注目し、海藻および海草に発現されている糖タンパク質糖鎖の構造解析を行った。次いで、淡水圏に生育する沈水性植物（オオカナダモ、コカナダモ、マツモ）についても糖タンパ

ク質糖鎖の構造解析を行い、塩環境と淡水環境の違いが糖鎖生合成にどのように反映されるかについての解析も行った。

第2節 材料及び方法

第1項 材料・試薬

ヒドラジンはナカライテスク社製のものを用いた。2-アミノピリジンは和光純薬工業製のものを n-ヘキサン中で再結晶させた後使用した。Dowex 50 x 2 (400 メッシュ以下) は室町化学社製のものを用いた。Sephadex G-25 (superfine) は GE ヘルスケアバイオサイエンス社製のものを用いた。Cosmosil 5C18-AR-300 カラム (10×150 mm) 及び Cosmosil 5NH2-MS カラム (10×250 mm) はナカライテスク社製のものを、Shodex Asahipak NH2P-50 4E カラム (4.6×250 mm) は昭和電工社製のものを用いた。Con A-Sepharose はタチナタマメより Con A を精製後、Sepharose 4B 樹脂に化学カップリングさせて調製した⁴⁴⁾。α1-2 マンノシダーゼ (α1-2 Man'ase) (*Aspergillus saitoi*) は生化工業社製のものを用いた。α-マンノシダーゼ (α-Man'ase) (Jack bean), β1-3/6 ガラクトシダーゼ (β1-3/6 Gal'ase) (recombinant) は Sigma 社製のものを用いた。β-N-アセチルグルコサミニダーゼ (β-GlcNAc'ase) (*Dipolococcus pneumoniae*) はベーリンガー・マンハイム社製のものを、α1-3/4 フコシダーゼ (α-Fuc'ase) (*Streptomyces sp.* 142) はタカラバイオ社製のものを用いた。その他の試薬は特級試薬を用いた。

第2項 海藻、海草及び淡水圏沈水性植物

海藻は、広島県廿日市市沿岸部で採取されたものであり、(独)水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所から譲渡を受けた。海草のアマモ (*Zostera marina* Linnaeus) は、岡山県瀬戸内市牛窓町沿岸部で採取したものを使用した。なお、アマモについては、岡山県から特別採捕許可証を取得した上で採取し実験に供した (許可番号 特第 24-29 号)。また、淡水圏の沈水性植物オオカナダ (*Egeria densa*),

コカナダモ (*Egeria dens*), マツモ(*Ceratophyllum demersum*) は, 岡山市あるいは倉敷市の用水路で採取したものを使用した。採取した後の海藻, 海草, 淡水圏沈水性植物 (海藻等) は, 一部の種類については乾燥させて実験開始までマイナス 80°Cで凍結させて保管した。なお, 使用した海藻等の名称と使用重量を表 2-1 に示す。

表 2-1. 使用した海藻等

		学名 (和名)	使用重量
Seaweed (海藻)	Brown algae (褐藻類)	<i>Sargassum fusiforme</i> (ヒジキ)	69.73 g (wet)
		<i>Sargassum fulvellum</i> (ホンダワラ)	100 g (dry)
		<i>Ishige okamurae</i> Yendo (イシゲ)	266 g (wet)
		<i>Sargassum horneri</i> (アカモク)	82.22 g (dry)
		<i>Sargassum autumnale</i> (アキヨレモク)	67.7 g (dry)
		<i>Sargassum thunbergii</i> (ウミトラノオ)	26.71 g (wet)
		<i>Sargassum piluliferum</i> (マメタワラ)	40.58 g (wet)
	Red algae (紅藻類)	<i>Gloiopeltis furcata</i> (フクロフノリ)	23.24 g (dry)
		<i>Gracilaria bursa-pastoris</i> (シラモ)	12.47 g (wet)
		<i>Gracilaria incurvata</i> (ミゾオゴノリ)	67.68 g (wet)
		<i>Hypnea charoides</i> (イバラノリ)	58.30 g (wet)
		<i>Chondrus ocellatus</i> (ツノマタ)	58.73 g (wet)
	Green algae (緑藻類)	<i>Ulva pertusa</i> (アナアオサ)	100 g (dry)
		<i>Codium fragile</i> (ミル)	216 g (wet)
Seagrass (海草)		<i>Zostera marina</i> Linnaeus (アマモ)	50 g (wet)
Water plant (淡水圏 沈水性植物)		<i>Egeria densa</i> (オオカナダモ)	50 g (wet)
		<i>Egeria dens</i> (コカナダモ)	50 g (wet)
		<i>Ceratophyllum demersum</i> (マツモ)	50 g (wet)

第3項 糖ペプチドの調製

凍結保管された海藻等は、使用前に洗浄を行った。洗浄は、流水で海水等を洗い流した後に、水を張ったボール内で漬浸洗浄を5~7回繰り返し実施した。漬浸洗浄を実施する際は、1回の洗浄毎に水を完全に換水して行い、目視で確認しながら小エビ等の微小生物の除去を行った。それぞれの海藻等を加熱処理(100°C, 5分間)し、内在タンパク質を変性させた。加熱処理に先だって海藻等を3~5cmの幅に切断し、切断した海藻等の全体が浸る程度(約200~500mL)に脱塩水を加えた。冷却後、加熱処理した試料を3%ギ酸中でホモジナイズし、ペプシン(100mg)を添加して37°Cで24時間消化を行った。24時間後にペプシン(100mg)を再度加えて、37°Cで48時間消化を続けることで、可溶性タンパク質と膜タンパク質からの糖ペプチド調製を行った。ペプシン消化後、反応液を10,160g(8,000rpm), 20分間遠心分離を行い、得られた上清をロータリーエバポレーターで100mL程度まで濃縮し、脱塩水(2L)に対して4°Cで透析を行った後、透析外液をロータリーエバポレーターで約200mLまで濃縮した。濃縮後、3%ギ酸を加えてpH3程度に調整した後、Dowex 50 x 2樹脂(100g)を加えた。ガラスフィルター上に移した後、脱塩水(1L)で樹脂を洗浄後、0.1Nアンモニア水(1L)を加えて吸着しているペプチド(糖ペプチドを含む)を溶出させた。溶出させた画分は、ロータリーエバポレーターで濃縮後、遠心分離により沈殿物を除去し、ゲル濾過に供して糖ペプチドを部分精製した。ゲルろ過には、Sephadex G-25 super fine (4.0x85cm)カラムを用い、0.1Nアンモニア水溶液で展開した。糖ペプチド画分は、フェノール硫酸法⁴⁶⁾により検出した。すなわち試験管内の試料液から約200 μ Lを量り取った後に、5%フェノール水溶液を同量添加し、続いて速やかに濃硫酸を1mL添加してよく攪拌した後、470nmの吸光度を測定し、糖ペプチド溶出画分(溶出容積400~480mL)を回収し減圧下で濃縮乾固した。

第 4 項 Size-fractionation (SF-) HPLC による糖ペプチドの部分精製

ゲルろ過により部分精製した糖ペプチドを 50% アセトニトリル(MeCN)/水に溶解後、不溶物を遠心分離で除いた後、Cosmosil 5NH2-MS (10×250 mm, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を付設した HPLC (Hitachi HITACHI L-6200) に供与した。80% MeCN/0.02%TFA 溶媒でカラムを充分洗浄することで非吸着物質 (非グリコシル化ペプチド) を除去した後、20% MeCN/0.02%TFA 溶媒に切り替えて糖ペプチドをカラムから溶出させた。流速は、1.0 mL/min で行い、ペプチドの検出は 230 nm の吸光度を測定することで行った。得られた部分精製糖ペプチドは、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固後、少量の脱塩水に溶解させ耐圧試験管に移した後、凍結乾燥を行った。

第 5 項 糖ペプチドからの N-グリカンの遊離 (ヒドラジン分解)

部分精製した糖ペプチド凍結乾燥標品に、無水ヒドラジン (約 1ml) を加え、ドライアイス/エタノール中で凍結後、減圧封管した。100°Cで 16 時間反応を行い、糖ペプチドから N-グリカンを遊離させた。冷却後、反応溶液をドライアイス/エタノール中で冷却したアセトン (25 mL) に加え糖鎖を沈殿させた後、10,160 g (8,000 rpm) で 20 分間遠心を行った。遠心分離後、上澄みを除去し、沈殿として回収した N-グリカンをデシケーター内で減圧乾固させた。減圧乾固後、飽和重炭酸ナトリウム溶液 (10 ml) で糖鎖を溶解後、無水酢酸 (100 µL) を加え、室温で N-アセチル化を行った。その後、反応液に約 20 mL の陽イオン交換樹脂 (Dowex 50×2) を加えて pH を 2 付近にした後、カラムに充填し、カラム体積の約 5 倍量の脱塩水で樹脂を洗浄することで、上記反応による夾雑物の除去を行い、素通り画分に N-グリカンを回収した。回収した N-グリカン画分は、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固させた後に、少量の脱塩水に溶解させ、ネジ蓋付きの試験管に移した後、凍結乾燥した。

第 6 項 *N*-グリカンの蛍光標識（ピリジルアミノ化 (PA 化)）⁴⁷⁾

凍結乾燥した *N*-グリカンを、400 μ L の 2-アミノピリジン試薬（2-アミノピリジン 1.0g を HCl 0.65 mL に溶解させたもの）に溶解後、90°C で 30 分間反応させた。反応終了後、40 μ L の還元試薬（NaBH₃CN 20 mg を蒸留水 12 μ L に溶解させたもの）を加えて再封管後、90°C で 1 時間還元反応を行った。還元反応終了後は、脱塩水 400 μ L で希釈した後、ゲルろ過に供与することで余剰の 2-アミノピリジンを除去した。ゲルろ過には、Sephadex G-25 super fine (2.7×35 cm) カラムを用い、0.1N アンモニア水溶液で展開した。PA-糖鎖の検出は、蛍光分光光度計（励起波長 (Ex) 310 nm, 蛍光波長 (Em) 380 nm, 日本分光 (株) 社製 FP-8200ST) を用い、蛍光強度を測定することにより行った。PA-糖鎖画分はロータリーエバポレーターで濃縮乾固させた。

第 7 項 Reversed-phase (RP) -HPLC による PA-糖鎖の部分精製

PA-糖鎖を 500 μ L の蒸留水に溶解後、遠心分離 (10,000 g, 5 分間) により不溶物を除去した。上清を Cosmosil 5C18-AR-300 (10×150 mm) を付設した HPLC (Jasco HPLC システム) に供与し、含まれる PA-糖鎖を部分精製した。PA-糖鎖の検出には蛍光分光光度計（励起波長 (Ex) 310 nm, 蛍光波長 (Em) 380 nm, Jasco 920-FP Intelligent Spectrofluorometer) を用いた。PA-糖鎖の溶出は、以下に示す溶媒系とプログラムを用い、1.2 mL/min の流速で行った。

RP-HPLC プログラム

	0 分	5 分	45 分	46 分
0.02% TFA-water	100 %	100 %	70 %	100 %
20%MeCN/0.02%TFA-water	0 %	0 %	30 %	0 %

N-グリカンの溶出位置は、予め糖鎖標品 (M3FX 及び M6B) を用いて溶出位置を確認した上で、上記プログラム開始後 20 分から 40 分までの 20 分間の溶出画分を

N-グリカンとして回収した。回収した画分は、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固後、少量 (100 ~ 200 μ L) の蒸留水に溶解後、マイナス 20°C で保存した。

第 8 項 Size fractionation (SF) –HPLC による PA-糖鎖の精製

RP-HPLC で部分精製した後に凍結乾燥した *N*-グリカンを 50% MeCN に溶解し、遠心分離 (10,000 g, 5 分間) により不溶性物質を除いた。得られた上清の一部 (70 μ L) を Shodex Asahipak NH2P-50 4E (4.6 \times 250 mm) を付設した HPLC (Jasco HPLC システム) に供与し、PA-糖鎖の精製を行った。PA-糖鎖の検出には蛍光分光光度計 (励起波長 (Ex) 310 nm, 蛍光波長 (Em) 380 nm, Jasco 920-FP Intelligent Spectrofluorometer) を用いた。PA-糖鎖の溶出は、以下に示す溶媒系とプログラムを用い 0.7 mL/ min の流速で行った。

SF-HPLC プログラム

	0 分	5 分	45 分	46 分
80% MeCN	90 %	90 %	50 %	90 %
20% MeCN	10 %	10 %	50 %	10 %

第 9 項 グリコシダーゼ消化による PA-糖鎖の構造解析

9-1 α -1,2-Mannosidase (*Aspergillus saitoi*) 消化

PA-糖鎖 5 μ L (~200 pmol) に α -1,2-Man'ase (*Aspergillus saitoi*) (0.1 unit /100 μ l H₂O) 5 μ L, 0.1M クエン酸緩衝液 (pH 5.0) 30 μ L, トルエン 1 μ L を加え (反応液最終量 46 μ L), 37°C で 24 時間酵素消化を行った。反応は沸騰水中に 5 分間加温することで停止した。反応停止後、遠心分離 (10,000 g, 5 分間) により不溶物を除去後、上澄みの一部 (~20 μ L) を SF-HPLC に供与し、反応生成物の分析を行った。SF-HPLC では、Shodex Asahipak NH2P-50 4E カラム (4.6 \times 250 mm) を使用し、PA-糖鎖の検出には、蛍光光度計 (Jasco 920-FP Intelligent Spectrofluorometer,

励起波長 (Ex) 310 nm, 蛍光波長 (Em) 380 nm) を用いた。PA-糖鎖の溶出は、以下に示す溶媒系とプログラムを用い 0.7 mL/ min の流速で行った。

SF-HPLC プログラム

	0 分	5 分	45 分	46 分
80% MeCN	100 %	100 %	50 %	90 %
20% MeCN	0 %	0 %	50 %	10 %

9-2 α -Mannosidase (Jack bean) 消化

PA-糖鎖 5 μ L (~200 pmol) に α -Man'ase (Jack bean) (2 unit /100 μ L H₂O) 10 μ L, 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 30 μ L, トルエン 1 μ L を加え (反応液最終量 46 μ L), 37°C で 48 時間酵素消化を行った。反応停止および SF-HPLC による反応生成物の分析については, α -1,2-Man'ase 消化の際と同じ条件で行った。

9-3 α -1,3/4 Fucosidase (*Streptomyces* sp. 142) 消化

PA-糖鎖 (~200 pmol) に α -1,3/4-Fuc'ase (*Streptomyces* sp. 142) (100 μ unit /100 μ L) 5 μ L, 0.1M MES 緩衝液 (pH 6.0) 20 μ L, トルエン 1 μ L を加え (反応液最終量 26 μ L), 37°C で 24 時間酵素消化を行った。反応停止および SF-HPLC による反応生成物の分析については, α -1,2-Man'ase 消化の際と同じ条件で行った。

9-4 β 1-3/6-Galactosidase 消化

α -1,3/4-Fuc'ase 消化物 (~200 pmol) に β 1-3/6 Gal'ase (1munit/ μ L) 3 μ L, リン酸緩衝液 (pH 6.0) 6 μ L, トルエン 1 μ L を加え (反応液最終量 26 μ L), 37°C で 48 時間酵素消化を行った。反応停止および SF-HPLC による反応生成物の分析については, α -1,2-Man'ase 消化の際と同じ条件で行った。

9-5 *N*-Acetyl- β -D-glucosaminidase (*Diplococcus pneumoniae*) 消化

PA-糖鎖 (~200 pmol) に β -1,2-GlcNAc'ase (*Diplococcus pneumoniae*) (100 μ unit /100 μ L) 5 μ L, 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 35 μ L, トルエン 1 μ L を加え (反応液最終量 46 μ L), 37°Cで 48 時間酵素消化を行った。反応停止および SF-HPLC による反応生成物の分析については, α -1,2-Man'ase 消化の際と同じ条件で行った。

第 10 項 エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS)

PA-糖鎖の ESI-MS 分析は, アジレントテクノロジー社製の G6520 型+G4240 型 HPLC-Chip/QTOF 質量分析計を使用して行った。PA-糖鎖の分離には G4240-62003 Graphitized Carbon Agilent HPLC-Chip を使用した。イオン化モードは, ポジティブモードで行い, イオン化電圧は VCap 1,700 V の設定で実施した。試料を 0.1%ギ酸に溶解させた後, 0.6 μ L/ min の流速で質量分析装置へ供した。また, CAD スペクトルを測定するのに当たっては, 衝突ガスにアルゴンガスを使用し, 衝突電圧は Auto MS/MS モードにより 3.7 V/(100 Da), Offset 2.5 V で行った。

第 3 節 結果

第 1 項 糖ペプチドの部分精製

海藻に発現されている糖タンパク質からの *N*-グリカンを調製する際, 当初は海藻を破砕後 1.2 M NaCl を含むトリス緩衝液で可溶性糖タンパク質を抽出した後, 塩析により回収することを試みたが, 十分な量の糖タンパク質を回収することができなかった。そこで, 膜糖タンパク質からも *N*-グリカンを回収することを目的として, 3% ギ酸中で海藻等をホモジナイズ後, そのホモジネートにペプシンを加えることで, 糖ペプチドの調製を行った。次いで透析を行い, 糖ペプチドを透析外液に回収後, 陽イオン交換樹脂と SF-HPLC を併用することで糖ペプチドの部分精製を行った。この結果, 細胞壁などから生成したオリゴ糖や非グリコシル化ペプチド等を効率的に除去することができるようになった。この操作により糖ペプチド試料の凍結

乾燥が可能となり、ヒドラジン分解による糖鎖遊離反応が効率的に進行し、*N*-グリカンの回収率が大幅に改善された。イオン交換樹脂に吸着したペプチド画分をSF-HPLCに供与し、糖ペプチド (*Ishige okamurae* Yendo, イシゲ) を部分精製したクロマトグラムの一例を Fig. 2-1 に示す。

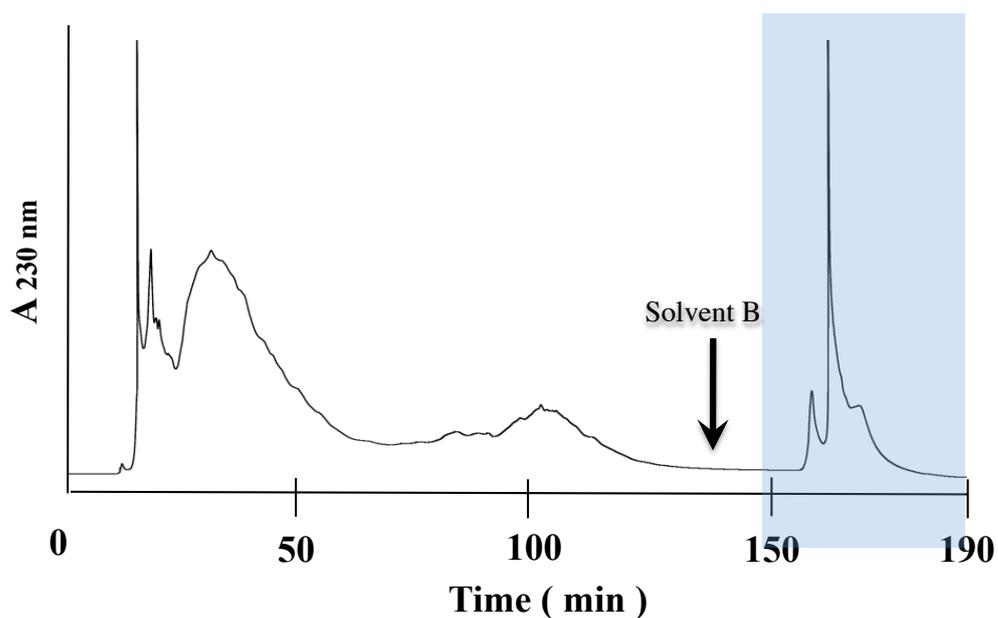


Fig. 2-1 SF-HPLC of Glycopeptides Prepared from *Ishige okamurae* Yendo (Ishige)
The adsorbed fraction eluted by Solvent B was used as glycopeptide-containing fraction.

Column : Cosmosil 5NH2-MS

Solvent A : 80% MeCN containing 0.02 % TFA

Solvent B : 20%MeCN containing 0.02 % TFA

Flow rate : 1.0 mL/min

第2項 PA-糖鎖の構造解析

2-1 RP-HPLC による PA-糖鎖の部分精製と SF-HPLC による糖鎖

マッピング

第一項で得られた部分精製糖ペプチド（褐藻7種，紅藻5種，緑藻2種，海草1種，淡水圏 沈水性植物3種）からヒドラジン分解により遊離した *N*-グリカン PA 化した後，RP-HPLC に供与することで，PA-糖鎖の部分精製を行った。*N*-グリカンは，使用した逆相カラム（Cosmosil 5C18-AR, 10×150 mm）では，プログラム開始後 20 分から 40 分までの間に溶出することを事前に確認した上で，この画分を *N*-グリカンとして回収した。*N*-グリカン画分は，濃縮乾固後，50% MeCN/水 に溶解させ，SF-HPLC に供与することで糖鎖構造解析を行った。海藻及び海草が産生する糖タンパク質から得られた *N*-グリカンについて，RP-HPLC で部分精製を行ったクロマトグラムを Fig2-2 に示し，SF-HPLC での溶出プロファイルを図 2-3 に示す。SF-HPLC による結果から，ほとんどすべての *N*-グリカンの溶出位置は，標準ハイマンノース型糖鎖 ($\text{Man}_{9,4}\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$)の溶出位置と一致したことから，海藻及び海草が産生する糖タンパク質の *N*-グリカンは，典型的なハイマンノース型糖鎖が主要構造であると推察された。緑藻 *Ulva pertusa* (アナアオサ) については，産生される糖タンパク質が他の海藻に比べて極端に少なく，*N*-グリカンもほとんど検出できなかつたものの，それらの溶出位置はハイマンノース型糖鎖のそれらと一致した。一方，淡水圏に生育する沈水性植物から得られた *N*-グリカンの SF-HPLC における溶出位置は，ハイマンノース型構造の標準糖鎖のそれらとは一致せず，植物複合型 *N*-グリカンの溶出位置と一致した。

2-2 グリコシダーゼ消化および ESI-MS による糖鎖構造解析

得られた海藻及び海草由来の *N*-グリカンが典型的なハイマンノース型構造であると推察されたため，*N*-グリカンの構造を α -1,2-Man'ase および α -Man'ase を用いた酵素消化法により解析した。その結果，ほとんど全ての *N*-グリカンは， α -1,2-Man'ase 消化により $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}[\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\alpha 1-6 (\text{Man}\alpha 1-3)$

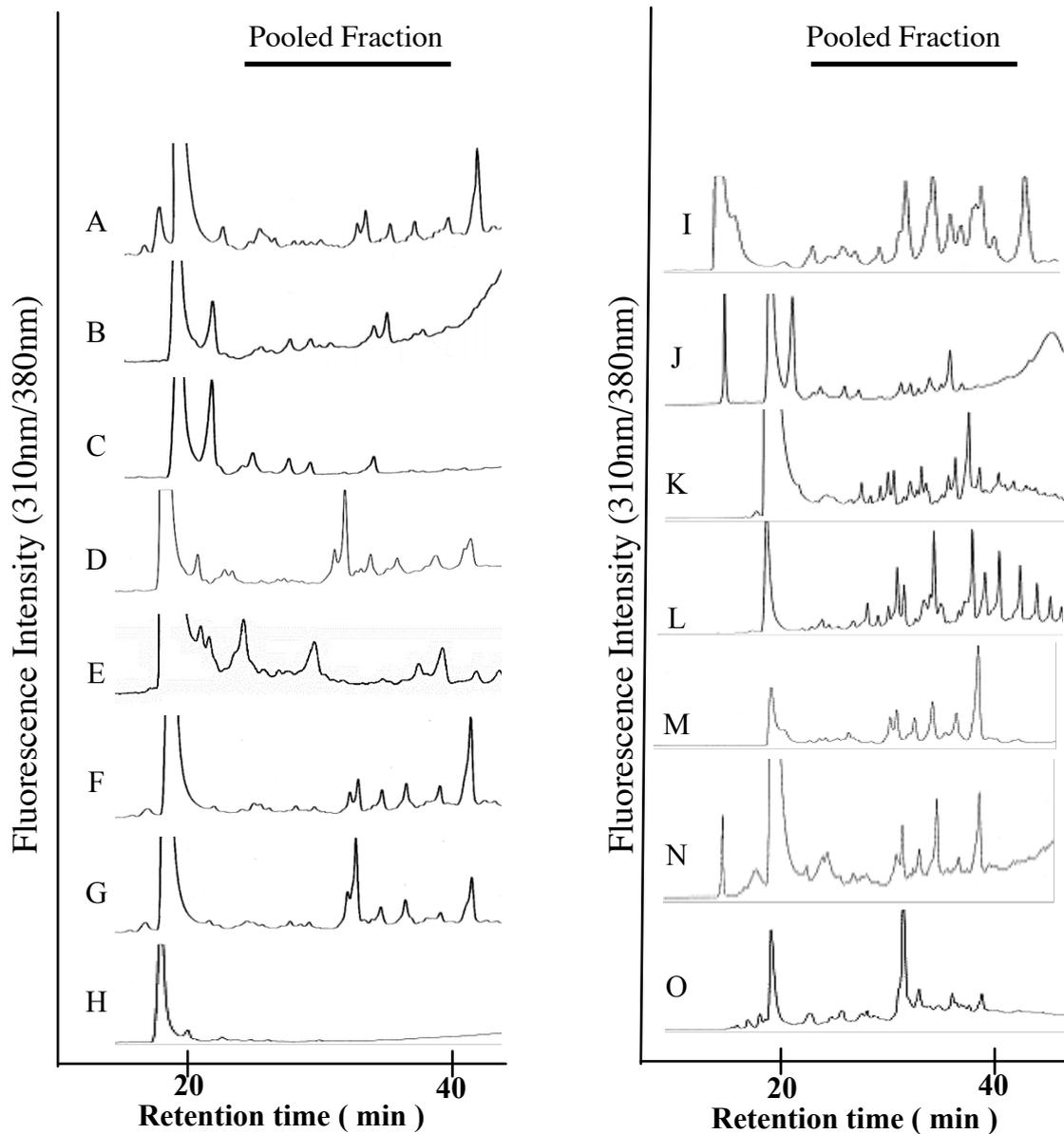


Fig 2-2. RP-HPLC of Pyridylaminated Glycans Prepared from Seaweed, Seagrass Glycopeptides.

The PA derivatives eluted from 20 min. to 40 min. were pooled as pyridilaminated *N*-glycans.

Sargassum fusiforme (Hijiki); B, *Sargassum fulvellum* (Hondawara); C, *Ishige okamurae* Yendo (Ishige); D, *Sargassum horneri* (Akamoku); E, *Sargassum autumnale* (Akiyoremoku); F, *Sargassum thunbergii* (Umitoranoo); G, *Sargassum piluliferum* (Mametawara); H, *Ulva pertusa* (Aosa); I, *Codium fragile* (Miru); J, *Gloiopeltis furcata* (Fukurofunori); K, *Gracilaria bursa-pastoris* (Shiramo); L, *Gracilaria incurvata* (Mizoogonori); M, *Hypnea charoides* (Ibaranori); N, *Chondrus ocellatus* (Tsunomata); O, *Zostera marina* Linnaeus (Amamo).

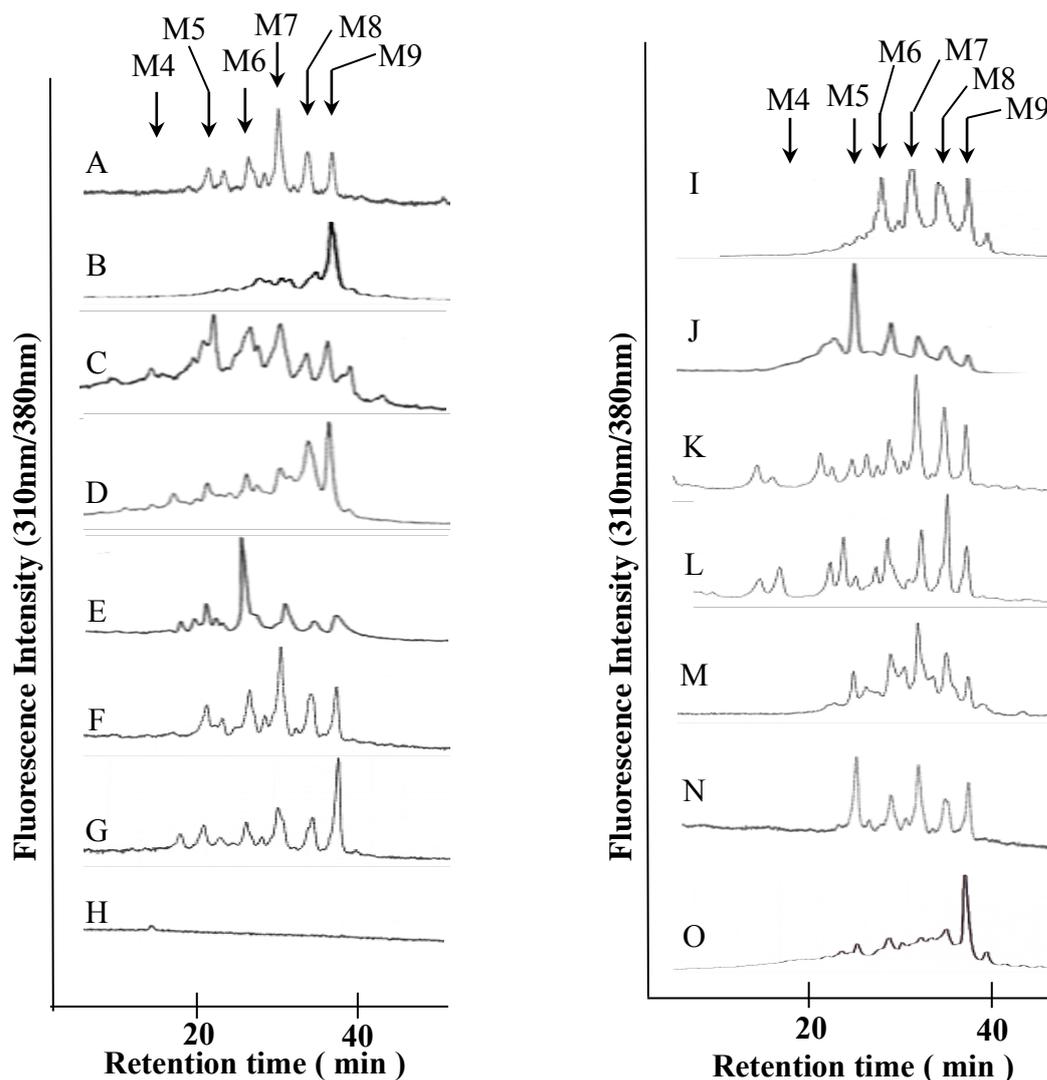


Fig 2-3. SF-HPLC of Pyridylaminated Glycans from Seaweed and Seagrass Glycoproteins.

SF-HPLC profiles using a Shodex Asahipak NH2P-50 4E column. Arrows (M9-M4) indicate the elution positions of authentic PA-sugar chains ($\text{Man}_{9,4}\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$). A, *Sargassum fusiforme* (Hijiki); B, *Sargassum fulvellum* (Hondawara); C, *Ishige okamurae* Yendo (Ishige); D, *Sargassum horneri* (Akamoku); E, *Sargassum autumnale* (Akiyoremoku); F, *Sargassum thunbergii* (Umitoranoo); G, *Sargassum piluliferum* (Mametawara); H, *Ulva pertusa* (Aosa); I, *Codium fragile* (Miru); J, *Gloiopeltis furcata* (Fukurofunori); K, *Gracilaria bursa-pastoris* (Shiramo); L, *Gracilaria incurvata* (Mizoogonori); M, *Hypnea charoides* (Ibaranori); N, *Chondrus ocellatus* (Tsunomata); O, *Zostera marina* Linnaeus (Amamo).

Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA]に収束し、更にこれらの生成物は ナタマメ由来の α -Man'ase により Man₁GlcNAc₂-PA (Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA)に収束した。フクロフノリ (紅藻) およびアマモ (海草) から得られた *N*-グリカンについての酵素消化による構造解析例を Fig. 2-4 (I. フクロフノリ, II. アマモ) に示す。以上の結果から、海洋圏に生育する植物が産生する糖タンパク質に結合する *N*-グリカンには複合型構造の糖鎖は存在せず、ほとんど全てがハイマンノース型構造の糖鎖であることが明らかとなった。特に、ホンダワラ (褐藻類) 及びアマモ (海草) の糖タンパク質には Man₉GlcNAc₂が主要構造として存在し、アキヨレモク (褐藻類) の糖タンパク質には Man₆GlcNAc₂が主要構造として存在することが分かった。これらハイマンノース型糖鎖については、ESI-MS 分析により構造確認を行った。Fig. 2-5 には典型例としてアカモク (紅藻) 由来の *N*-グリカンについての ESI-MS スペクトルを示す。(A, *m/z* 1314.4 [Hex₅HexNAc₂-PA+H⁺]; B, *m/z* 1476.5 [Hex₆HexNAc₂-PA+H⁺]; C, *m/z* 1637.5 [Hex₇HexNAc₂-PA+H⁺]; D, *m/z* 1800.6 [Hex₈HexNAc₂-PA+H⁺]; E, *m/z* 1961.6 [Hex₉HexNAc₂-PA+H⁺])

一方、淡水圏に生育する沈水性植物 (オオカナダモ, コカナダモ, マツモ) についても、海藻試料と同様にペプシン消化により糖ペプチドを調製後、糖ペプチドから PA-糖鎖を調製した。RP-HPLC により *N*-グリカン画分を部分精製した後、SF-HPLC により糖鎖マッピングを行った。その結果、ハイマンノース型糖鎖の溶出位置に一致する PA-糖鎖は検出されず、ほとんどの PA-糖鎖は植物複合型糖鎖の溶出位置と一致した (Fig. 2-6)。この結果から、淡水圏の沈水性植物が産生する *N*-グリカンの構造特性は、海洋圏植物の *N*-グリカンとは構造特性が大きく異なることが示唆された。これらのうち、オオカナダモから得られた *N*-グリカンについては、酵素消化法による詳細な構造解析を行った。Fig. 2-7 に示すように、オオカナダモから得られた *N*-グリカンの溶出位置は、イネ培養細胞由来の糖タンパク質⁴⁸⁾およびスギ花粉アレルゲン (Cry j 1, Jun a 1)^{49,50)}から得られた植物複合

型糖鎖の溶出位置と一致した。オオカナダモ由来の *N*-グリカンには、 α -1,4-Fuc'ase, β -1,3-Gal'ase, および β -1,2-GlcNAc'ase による連続消化により, そのほとんどが M3FX(Man₃Xyl₁Fuc₁GlcNAc₂-PA)に収束し(Fig. 2-7), 一部の糖鎖は M2FX(Man₂Xyl₁Fuc₁GlcNAc₂-PA)あるいは M3X(Man₃Xyl₁GlcNAc₂-PA)に収束した。以上の結果から, オオカナダモが産生する糖タンパク質には, ルイス a 抗原ユニット (Gal β 1-3(Fuc α 1-4GlcNAc β 1-))を非還元末端に有する植物複合型構造の *N*-グリカンが存在することが明らかになった。なお, コカナダモ, マツモから得られた *N*-グリカンの詳細な化学構造については, 最近, 前田らが ESI-MS 分析と酵素消化法を組み合わせることで明らかにしている⁵¹⁾。これら淡水圏に生育する沈水性植物の糖タンパク質には, ルイス a 抗原を有する *N*-グリカンおよび GN2M3FX 構造の糖鎖が多量に存在することが特徴的であった。

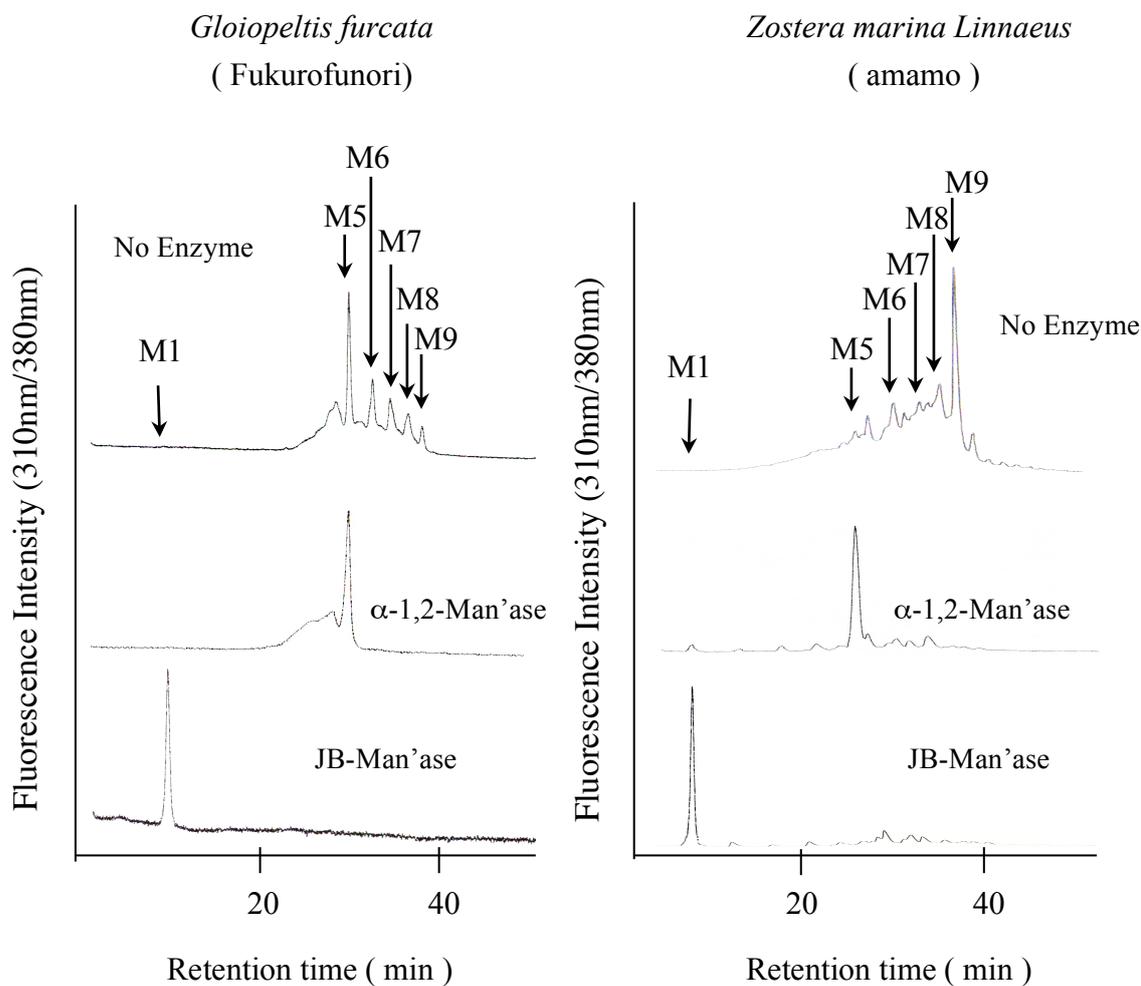


Fig. 2-4. SF-HPLC of Sequential exoglycosidase digests of *N*-glycans prepared from glycoproteins of seaweed (*Gloiopeltis furcata*, Fukurofunori) and seagrass (*Zostera marina* Linnaeus, Amamo) as typical examples.

Glycosidase digests of the pyridylaminated *N*-glycans were analyzed by SF-HPLC using a Shodex Asahipak NH2P-50 4E column. α -1,2-Man'ase, α -1,2-mannosidase digest; JB-Man'ase, jack bean α -mannosidase digest. M1-9 indicate the elution positions of authentic PA-sugar chains, $\text{Man}_{9,1}\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$.

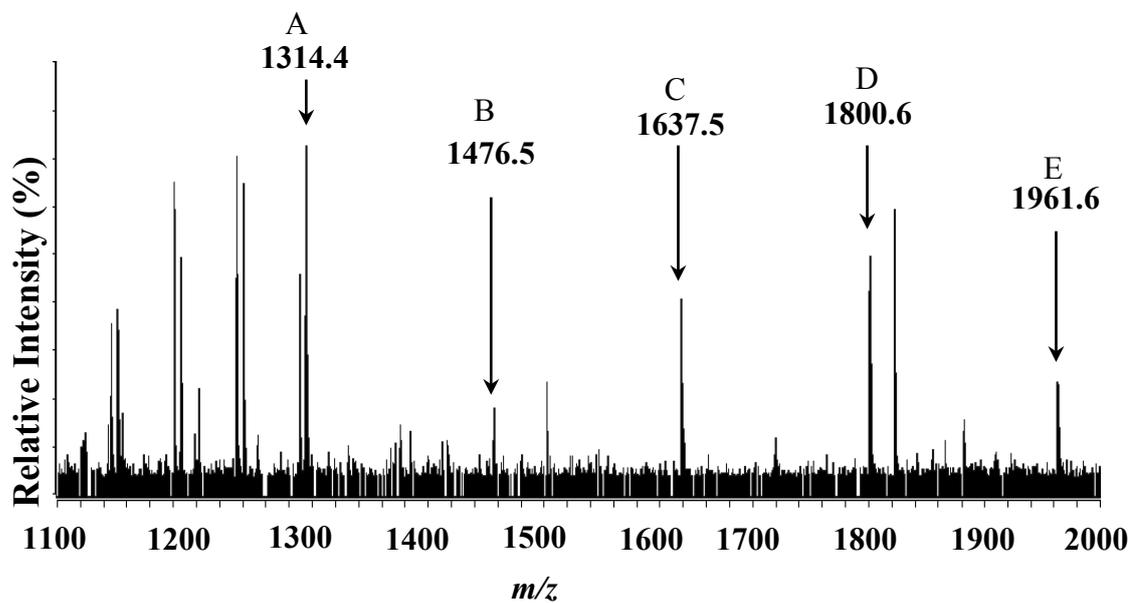


Fig. 2-5. ESI-MS Analysis of Pyridylaminated *N*-Glycans from *Sargassum horneri* (Akamoku) Glycoproteins as a typical example.

A, m/z 1314.4 [$\text{Hex}_5\text{HexNAC}_2\text{-PA+H}^+$]; B, m/z 1476.5 [$\text{Hex}_6\text{HexNAC}_2\text{-PA+H}^+$]; C, m/z 1637.5 [$\text{Hex}_7\text{HexNAC}_2\text{-PA+H}^+$]; D, m/z 1800.6 [$\text{Hex}_8\text{HexNAC}_2\text{-PA+H}^+$]; E, m/z 1961.6 [$\text{Hex}_9\text{HexNAC}_2\text{-PA+H}^+$]

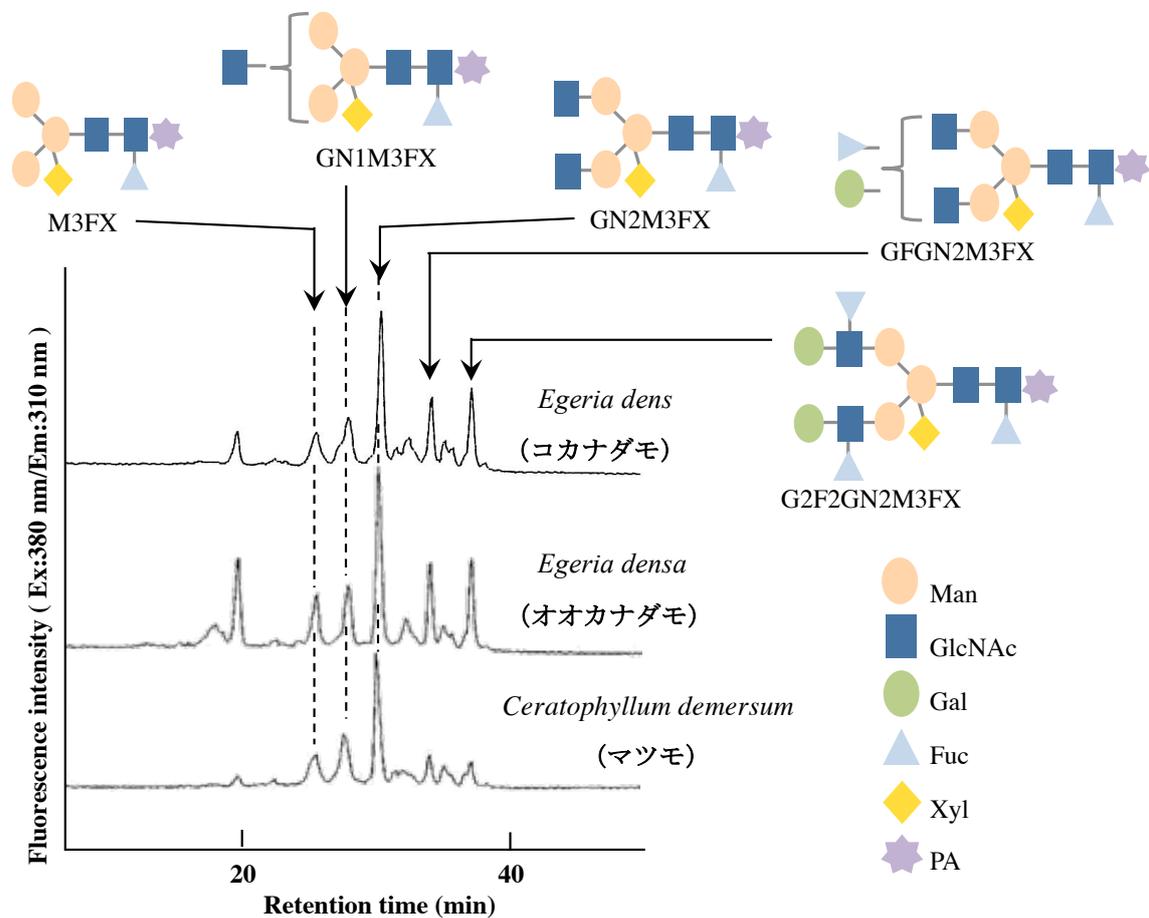


Fig. 2-6 SF-HPLC of Pyridylaminated *N*-Glycans from Glycoproteins of *Egeria dens* (kokanadamo), *Egeria dens* (ookanadamo), and *Ceratophyllum demersum* (matsumo) .

Pyridylaminated *N*-glycans obtained from water plant glycoproteins were analyzed by SF-HPLC using a Shodex Asahipak NH2P-50 4E column.

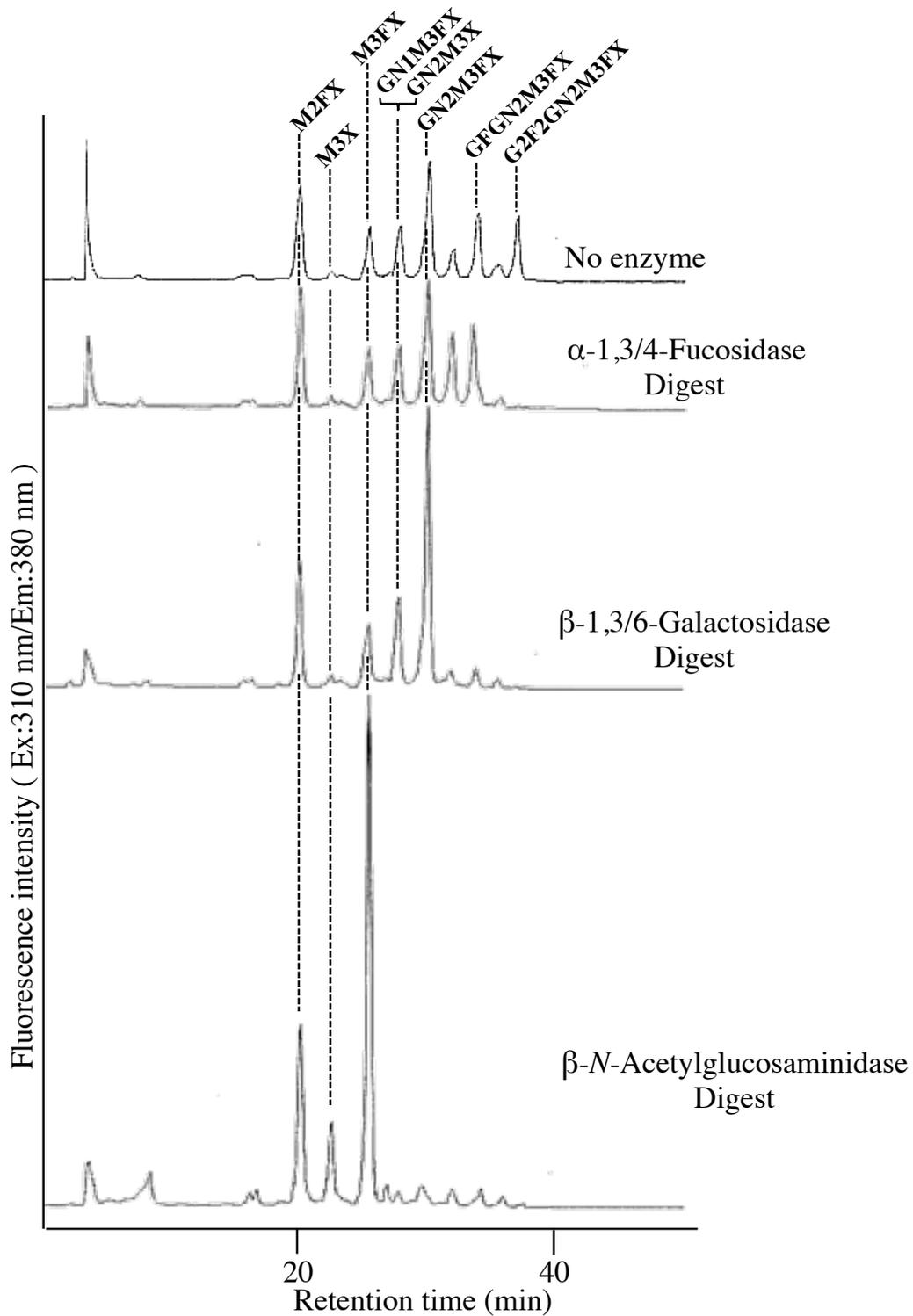


Fig. 2-7 SF-HPLC of Exoglycosidase Digests of Pyridylaminated *N*-Glycans Obtained from *Egeria densa* (ookanadamo) Glycoproteins.

Glycosidase digests of the pyridylaminated *N*-glycans were analyzed by SF-HPLC using a Shodex Asahipak NH2P-50 4E column.

第4節 考察

本章では、ほ乳動物に対して免疫活性を有する糖タンパク質糖鎖の有効な供給源を探索することを目的として、瀬戸内海に生育する海藻に発現される糖タンパク質糖鎖、特にN-グリカンに注目して網羅的な構造解析を行った。褐藻類7種(*Sargassum fusiforme* (ヒジキ), *Sargassum fulvellum* (ホンダワラ), *Ishige okamurae* Yendo (イシゲ), *Sargassum horneri* (アカモク), *Sargassum autumnale* (アキヨレモク), *Sargassum thunbergii* (ウミトラノオ), *Sargassum piluliferum* (マメタワラ)), 紅藻類5種(*Gloiopeltis furcata* (フクロフノリ), *Gracilaria bursa-pastoris* (シラモ), *Gracilaria incurvata* (ミゾオゴノリ), *Hypnea charoides* (イバラノリ), *Chondrus ocellatus* (ツノマタ)) 緑藻類2種(*Ulva pertusa* (アナアオサ), *Codium fragile* (ミル)), 海草1種(*Zostera marina* Linnaeus (アマモ)) の15種の海藻および海草を使用した。また、淡水圏に生育する沈水性植物3種(*Egeria densa* (オオカナダモ), *Egeria dens* (コカナダモ), *Potamogeton malaianus* (マツモ)) についても、生活圏の違い(海水圏と淡水圏)が糖タンパク質糖鎖の構造特性に反映されるか、あるいは糖タンパク質糖鎖の生合成機構に影響を与えるのかを調査する目的で、これら淡水圏の沈水性植物糖タンパク質の糖鎖構造解析を行った。

糖鎖構造解析に先立ち、まず糖ペプチドの調製法についての検討を行った。糖タンパク質糖鎖を効率よく回収するために、本研究では試料を3%ギ酸中でホモジナイズすることでタンパク質を変性させた後、ペプシンにより可溶性タンパク質および膜タンパク質から糖ペプチドを調製した。その後、糖ペプチドを陽イオン交換樹脂、ゲルろ過により部分精製精製を行い、最後にCosmosil 5NH2-MS樹脂を用いる親水性クロマトにより糖ペプチド画分を精製した。この精製操作により、糖ペプチドが可溶性タンパク質および膜タンパク質から効率よく回収することが可能となり、ヒドラジン分解による糖鎖遊離操作も簡便化された。特に、親水性クロマトによる糖ペプチド精製により、非グリコシル化ペプチド等の夾雑物が除去することが出来、ヒドラジン分解前の凍結乾燥標品の調製が容易になるとともに、ヒドラジン分解効率が向上した。

15種の海藻の全糖タンパク質から調製したN-グリカンの構造解析を行った結果、これら海水圏に生育する植物（海藻は植物圏に分類される）が発現する糖タンパク質糖鎖のほとんどがハイマンノース型構造を有することが明らかになった。陸生植物の分泌型糖タンパク質にはルイス a エピトープ [Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-] 含有のN-グリカンをはじめとする植物複合型糖鎖の存在量が多く、ハイマンノース型糖鎖は種子貯蔵糖タンパク質に結合する機会が多いのと対照的である^{2,3)}。また、陸生植物に見られるルイス a エピトープを有する複合型N-グリカン (Gal2F2GN2M3FX)や液胞あるいはプロテインボディーに蓄積する糖タンパク質に結合するパウチマンノース型構造 (M3FX) 構造の糖鎖は、海藻及び海草が産生する糖タンパク質からは見出されなかった。特に、アマモ (*Zostera marina* Linnaeus) は、孢子形成により増殖する藻類と異なり、多年生の沈水性 頭花種子植物であるが、アマモが産生する糖タンパク質糖鎖は、Man₉GlcNAc₂ 構造を主要構造とするハイマンノース型のみであった。アマモは、進化過程で一度海から陸上に上がり、陸上で進化した頭花植物が白亜紀に再び海水圏に戻った種子植物であると考えられている⁵²⁾。中世代（白亜紀）の陸生植物が産生していた糖タンパク質にどのようなタイプのN-グリカンが結合していたかは検証不能である。しかしながら、石炭紀（古世代）に出現したイチョウでは、種子貯蔵糖タンパク質糖鎖のほぼ100%が植物複合型糖鎖であることを考慮すると、陸生植物であったアマモが塩環境に適応するために、糖タンパク質糖鎖のプロセッシング機構を不活化させ、糖タンパク質の糖鎖構造をハイマンノース型に集約させたとも考えられる。事実、海藻及び海草とは対照的に、淡水圏で進化した沈水性植物 (*Egeria densa* (オオカナダモ), *Egeria densa* (コカナダモ), *Ceratophyllum demersum* (マツモ)) が産生する糖タンパク質のN-グリカンは、そのほとんどが植物複合型糖鎖であり、ルイス a エピトープを有する構造の存在量も多い。陸上で進化した植物が、一度獲得した糖タンパク質糖鎖の生合成機構、すなわち数種類の糖転移酵素群の遺伝子発現機構を海水圏に戻った際に失ったとするならば、高塩濃度環境に適応するためにはハイマンノース型糖鎖に

よるタンパク質修飾が塩環境適応に有利に働く可能性が考えられる。この仮説を立証するためには、今後、海水圏に生育する植物（特に海草類）のゲノム中に α -Man'ase II, α 1-3FucT, β 1-2XylT, β 1-3GalT, β 1-2GlcNAcT 等の植物複合型 N-グリカン生合成に必要とされる遺伝子（あるいは遺伝子断片）が存在するか否かを確認する必要がある。最近、複合型糖鎖形成に関わる β 1-2GlcNAcT 遺伝子をノックアウトさせた陸生植物 (*Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ)) が塩感受性となることが報告されている¹¹⁾。しかしながらこの変異株の場合は、 α -Man'ase I は機能しており、ハイマンノース型糖鎖のトリミングは正常に行われるため、Man₅GlcNAc₂型の糖鎖が蓄積することになり、海藻及び海草が産生する糖タンパク質糖鎖の構造特性とは少し異なる。また、*Arabidopsis thaliana* は水中で生育する沈水性植物ではないため、沈水性植物（オオカナダモ等）を用いた α -Man'ase I ノックアウト変異株の作成と耐塩性変化の解析が必要であると考えられる。

糖タンパク質糖鎖の応用利用の観点から本研究結果を捉えると、アマモあるいはホンダワラが産生する糖タンパク質糖鎖のほとんどは、Man₉GlcNAc₂構造が占めていることから、この2種の海水圏に生育する植物は抗 HIV 抗体を作成する際に必要となる糖鎖^{17,18)}を調製するための有用な海洋バイオマスであることが分かった。一方、淡水圏の沈水性植物であるオオカナダモが産生する N-グリカンは、それらのほとんどが、 β -1,2-Xyl 残基と α -1,3-Fuc 残基を有する植物複合型糖鎖であり、かつルイス a エピトープ含有の植物複合型糖鎖の存在量も多いことが明らかとなった。従って、これら淡水圏の沈水性植物は免疫活性糖鎖の重要な供給源であると考えられる。本研究で明らかになった海藻及び海草が産生する N-グリカンの全体像を表 2-2 に示し、淡水圏の沈水生植物が産生する N-グリカンについては表 2-3 に示す。

表 2-2. 海藻（海草）糖タンパク質に結合する N-グリカンの構造

	学名	和名	M5	M6	M7	M8	M9	
Brown Algae (褐藻)	<i>Sargassum fusiforme</i>	ヒジキ	+	+	+++	++	+++	Man α 1-2Man α 1-6 Man α 1-2Man α 1-3 Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-3 Man β 1-R M9
	<i>Sargassum fulvellum</i>	ホンダワラ	+	+	+	+	+++	
	<i>Ishige okamurae</i>	イシゲ	++	+	++	+	++	Man α 1-2Man α 1-6 Man α 1-3 Man α 1-6 Man β 1-R M8
	<i>Sargassum horneri</i>	アカモク	+	+	+	++	+++	Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-3
	<i>Sargassum autumnale</i>	アキヨレモク	+	+++	+	+	+	
	<i>Sargassum thunbergii</i>	ウミトラノオ	+	++	+++	++	++	Man α 1-6 Man α 1-3 Man α 1-6 Man β 1-R M7
	<i>Sargassum piluliferum</i>	マメタワラ	+	+	++	+	+++	Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-3
Red Algae (紅藻)	<i>Gloiopeltis furcata</i>	フクロフノリ	+++	++	+	+	+	Man α 1-2Man α 1-6 Man α 1-3 Man α 1-6 Man β 1-R
	<i>Gracilaria bursa-pastoris</i>	シラモ	ND	+++	++	+	+	
	<i>Gracilaria incurvata</i>	ミゾオゴノリ	+	+	++	+++	+	
	<i>Hypnea charoides</i>	イバラノリ	+	+	++	++	+	Man α 1-6 Man α 1-3 Man α 1-6 Man β 1-R M6
	<i>Chondrus ocellatus</i>	ツノマタ	+++	+	++	+	++	Man α 1-2Man α 1-3
Green Algae (緑藻)	<i>Ulva pertusa</i>	アナアオサ	ND	ND	ND	ND	ND	
	<i>Codium fragil</i>	ミル	ND	++	++	++	++	Man α 1-6 Man α 1-3 Man α 1-6 Man β 1-R M5
Sea Grass (海草)	<i>Zostera marina</i>	アマモ	+	+	+	+	+++	

+, $\leq 15\%$ of relative amount; ++, 16~30; +++, 31~45; +++++, 46% \leq

Yoshiie, T., Maeda, M., et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 1996-1998 (2012).

R: 4GlcNAc β 1-4GlcNAc

Man: マンノース,

GlcNAc: N-アセチルグルコサミン

表 2-3. 淡水圏沈水生植物の糖タンパク質に結合する N-グリカンの構造

学名 (和名)	M2FX	M3FX	GNM3FX GN2M3X	GN2M3FX	GalFGN2M3FX	Gal2F2GN2M3FX
<i>Egeria densa</i> (オオカナダモ)	++	+	+	++++	++	++
<i>Elodea nuttallii</i> (コカナダモ)	+	+	+	++++	++	++
<i>Ceratophyllum demersum</i> (マツモ)	+	+	++	++++	+	+

Man α 1-3/6Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc³ (M2FX) +, $\leq 10\%$ relative amount; ++, 11~15; +++, 16~25; +++++, 26% \leq
Xyl β 1² Fuca1³
コカナダモ, マツモ: 日本農芸化学会2014年度大会(東京)

Man α 1-6
Man α 1-3
Xyl β 1² Fuca1³ (M3FX)

GlcNAc β 1-2
Man α 1-6
Man α 1-3
Xyl β 1² Fuca1³ (GNM3FX)

GlcNAc β 1-2Man α 1-6
GlcNAc β 1-2Man α 1-3
Xyl β 1² Fuca1³ (GN2M3X)

GlcNAc β 1-2Man α 1-6
GlcNAc β 1-2Man α 1-3
Xyl β 1² Fuca1³ (GN2M3FX)

Gal β 1-3
Fuca1-4
GlcNAc β 1-2Man α 1-6
GlcNAc β 1-2Man α 1-3
Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc³
Xyl β 1² Fuca1³ (GalFGN2M3FX)

Fuca1⁴
Gal β 1-3GlcNAc β 1-2Man α 1-6
Gal β 1-3GlcNAc β 1-2Man α 1-3
Xyl β 1² Fuca1³ (Gal2F2GN2M3FX)

第3章 ミル (*Codium fragile*) からのレクチンの精製と糖鎖結合

特異性解析

第1節 緒言

海藻からは、これまでも有用なレクチンが精製され、それらの糖鎖結合特異性の解析が行われてきている²⁵⁻⁴²⁾。海藻から得られるレクチンは、しばしば海藻特異的レクチンと呼ばれ、陸生植物から見出されてきたレクチンとは異なり、(1) 低分子量 (20 kDa 以下) の単量体であり、(2) 熱安定性を示し、(3) レクチン活性に金属イオンを必要とせず、(4) 糖タンパク質糖鎖糖を認識し、単糖には結合性を示さない。特に、抗腫瘍活性や抗ウイルス活性を示すものも多く、HIV やインフルエンザウイルスのエンベロープ糖タンパク質に対する EC50 値が nmo/L から pmol/L であるレクチンも存在する³⁶⁾。これら海藻レクチンのうち、ミルから精製されたレクチンについても幾つかの分子種が報告されている⁴⁰⁻⁴³⁾。*Codium fragile* から精製されているミルレクチン (分子量 約 15kDa) は、ヒト血液型 A,B,O 型全てのタイプの赤血球を凝集させることが報告されているものの、その一方で α -N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 残基特異的であると報告されており、赤血球凝集活性と糖鎖結合特異性の間には矛盾がある。しかしながら、ミルレクチンの α -GalNAc 残基特異的な結合活性に注目して、ミル抽出物を虫歯予防剤としてする特許申請もなされており⁴⁴⁾、さらに、ミルレクチンが腫瘍抗原糖鎖である Tn 抗原(GalNAc α -Ser/Thr) , Forssman 抗原 (GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc) にも結合性を示すとの報告もある⁴²⁾。最近、堀らは、ミルの一種 (*Codium barbatum*) から新規レクチン (CBA, *Codium barbatum* agglutinin) を見出し、その精製、遺伝子同定、糖鎖結合特異性解析を行っている⁴³⁾。CBA は 9kDa のポリペプチドがジスルフィド結合で結合したホモダイマー構造 (18 kDa)を有し、動物型複合型糖鎖に結合特異性を示す。一方、*Codium fragile* から報告されているレクチン (CFL, *Codium fragile* lectin; 約 15 kDa)については、糖タンパク質や糖ペプチドを用いた糖鎖結合性が報告されてい

るものの、タンパク質化学的解析や糖鎖アレイを用いた詳細な糖鎖結合特異性解析はなされていない。そこで本章では、医療への応用が期待されるミルレクチンに注目して、精製、タンパク質構造解析、糖鎖マイクロアレイを用いた糖鎖結合特異性解析を行った。その結果、これまでに報告されていなかった新規レクチンを見出し、その分子種についてもタンパク質構造解析、糖鎖結合特異性解析を行った。

第2節 材料及び方法

第1項 材料・試薬

ミル (*Codium fragile*) は岡山県瀬戸内市牛窓町沿岸部で採取した。Cosmosil 5C18-AR-300 カラム (10×150 mm) はナカライテスク社製のものを用いた。Butyl-Toyopearl は東ソー (株) から、Sephacryl S-200 カラム (2.0 x 105 cm) は Pharmacia Biotech (現 GE ヘルスケア・ジャパン) から購入したものを用いた。遠心濃縮用メンブレン Spin-X UF20 (10,000MW) はコーニング社製のものを用いた。ヒト A 型, B 型, O 型, AB 型血液は、岡山大学保健管理センターにて、被験者の同意を得た上で採血した。ニワトリ血液は、岡山大学大学院 環境生命科学研究科 動物生理学研究ユニットの畑生俊光 准教授から譲渡を受けた。

第2項 ミルレクチン (CFL, *Codium fragile lectin*) の凝集活性測定

レクチン活性の検出は、ヒト A 型, B 型, AB 型, O 型の赤血球およびニワトリ赤血球を用いて、96 穴のマイクロプレート中で行った。まず、ニワトリ及びヒト血液から 5% (v/v) 濃度になるように赤血球懸濁液を調製した。次いで、マイクロプレートウェルに、生理食塩水を 50 μ L 加えた後、レクチン溶液 50 μ L (50~150 μ g) と 5% 赤血球懸濁液を 100 μ L ずつ加え、37°C で 1 時間反応させた。凝集の有無については、目視および顕微鏡観察により確認した。なお、赤血球懸濁液は日ごとに溶血して正確な測定が難しくなるため、採血後二週間以内の血液を使用した。

第3項 粗レクチンの調製

まずミル (2.2kg) を水道水による洗浄を繰り返し付着している微小生物等を除去した。洗浄したミルに対して5倍量 (11 L) のアセトンを加え、ホモジナイザーで破碎および脱脂を行った。ろ紙を用いたろ過により脱脂試料を回収し、室温で一晩乾燥させた。乾燥標品を 0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) に懸濁し、4°Cで16時間タンパク質の抽出を行った。抽出液をガーゼろ過した後、遠心分離 (10,160 g, 20 分間) を行った。得られた上澄み液に、100% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加えて塩析を行った。塩析後、遠心分離 (10,160 g, 20 分間) により塩析物を回収し、少量の脱塩水に溶解させた後、1時間の流水透析を行い、次いで 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) 5 L に対して、4°Cで48時間 (24時間後に透析外液を交換) 透析を行った。透析終了後、内液に最終濃度が 1.5 M になるように硫酸アンモニウムを加えた後、遠心分離 (10,160 g 20 分間) を行い、粗レクチン画分を得た。

第4項 疎水クロマトグラフィーによるミルレクチンの精製

上で得られた粗レクチン画分を、予め 1.5 M 硫酸アンモニウムを含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) で平衡化した Butyl-Toyopearl カラム (4.0×38 cm) に供与した。同緩衝液でカラムを充分洗浄後、硫酸アンモニウム濃度を 1.5 M から 0 M へと直線的に減少させることで、吸着したレクチンを溶出させた。レクチン活性の測定については、ヒト A 型, B 型, AB 型, O 型およびニワトリ赤血球を用いて、第2項に記した方法で行った。このクロマト操作によりレクチン活性が二つに分画された(CFL-I, CFL-II) ため、それぞれについて硫酸アンモニウム (100% 飽和) による塩析操作を行った。なお、本操作は低温室 (4°C) で行った。

第5項 Sephacryl S-200 によるミルレクチンの精製

疎水クロマトで得られた二つのレクチン活性画分について、遠心分離 (10,160 g, 20 分間) によりタンパク質を沈降させた後、少量の 0.1 M NaCl を含む 20 mM

Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) に溶解後, 同緩衝液 (5 L) に対して透析 (4°C, 一晚) した。透析後, 不溶物を遠心分離により除いた後, 試料 (1 mL) を予め 0.1 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) で平衡化した Sephacryl S-200 カラム (2 × 105 cm) に供与し, 同緩衝液で展開を行った。カラムは Jasco PU-980 型高速液体クロマトグラフィシステムに接続し, タンパク質の溶出は 280 nm の吸光度により追跡した。分子量は, 標準タンパク質としてウシ血清アルブミン (BSA, 67 kDa), 卵白アルブミン (OVA, 45 kDa), α -キモトリプシノーゲン (25 kDa), リボヌクレアーゼ (13.7 kDa) を用いて推定した。レクチン活性画分は, Spin-X UF20 (10,000MW) を用いて遠心濃縮を行った。

第 6 項 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は, Laemmli の方法⁵³⁾にしたがって, スラブ型泳動板を用い, ゲル組成は濃縮ゲルのついた SDS-トリス-グリシン系を用いた。ゲルろ過で得られたレクチン試料 (10 ml) を同量の試料用緩衝液 (2% SDS, 10% 2-メルカプトエタノール, 10mM Tris-HCl (pH 6.8), 40% グリセリン) と混合し, 100°C で 3 分間加熱して SDS 化処理を行った。その後, 20% アクリルアミドゲルを用いて, 150V, 30mA の定電流で SDS-PAGE (3 時間) を行った。0.25% クマシーブリリアントブルー R-250 (CBB R-250) によりゲルを染色後, 25% メタノール-7% 酢酸を用いて脱色した。分子量は, バイオラド社製の標準タンパク質 (Precision Plus Protein Standards, 250 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50kDa, 37kDa, 25 kDa, 20 kDa, 15 kDa, 10 kDa) を用いて測定した。

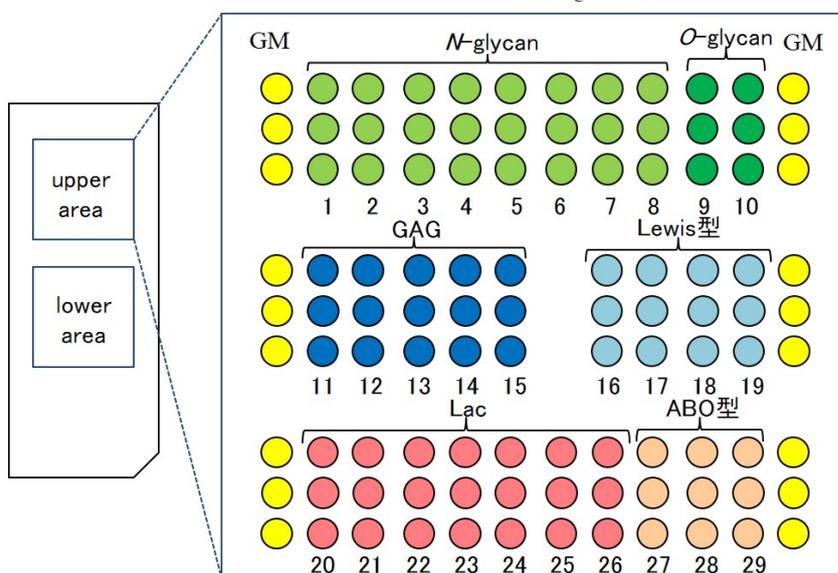
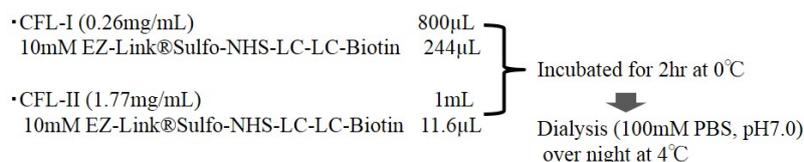
第 7 項 アミノ酸配列分析

SDS-PAGE 後, エレクトロブロットイングによってレクチンタンパク質を泳動ゲルから PVDF 膜に転写 (45V, 定電圧 45 分) した。タンパク質を CBB R-250 で染色し, エタノールで脱色した後, バンドを切り出しプロテインシークエンサー (島津社製 PPSQ) により N 末端アミノ酸配列を決定した。

第 8 項 糖鎖アレイ分析

精製ミルレクチンの糖鎖アレイ分析は、住友ベークライト株式会社の糖鎖固定アレイ法⁵⁴⁾を用いて行った。すなわち、精製ミルレクチン (CFL-I, 0.26 mg ; CFL-II, 1.77 mg) を 10 mM EZ-Link®Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Thermoscientific 社製) を用いて、0°Cで2時間ビオチン化を行った。次いで、ビオチン化レクチンを、29種類の糖鎖を固定したアレイ (糖鎖固定アレイ BS-X1711, 住友ベークライト社製) プレート上に展開した。室温で15分間インキュベートした後、リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄し、固定化糖鎖に結合しないレクチン分子を除去した。次いで、CyTM3-Streptavidin (GE Healthcare 社製) を反応させた後、糖鎖に結合したレクチンを Scan Array Lite (Perkin Elmer 社製) を用いて検出した。Fig. 3-1 に糖鎖アレイ分析の概略を示す。

〈ビオチン化〉



〈固定化糖鎖濃度〉

- upper area 0.5mg/ml(GAG)
0.2mM(N-glycan)
1.0mM(other glycan)
- lower area 0.1mg/ml(GAG)
0.04mM(N-glycan)
0.2mM(other glycan)
- GM, grid marker

〈固定化糖鎖(29種)〉

- N-glycan (1-8) M9,NA2,A2,NA2F,NGA2B,NA3,A3,NA4
- O-glycan (9-10) STn,T
- GAG (11-15) Heparin, Da2S Hep, De6S Hep, DeNS Hep, DeNS/AcHep
- Lewis型 (16-19) Le^a, Le^x, SLe^a, SLe^x
- Lac (20-26) Lac, 3SL, 6SL, 3SLNAc, 6SLNAc, LNT, LNnt
- ABO型 (27-29) A, B, O

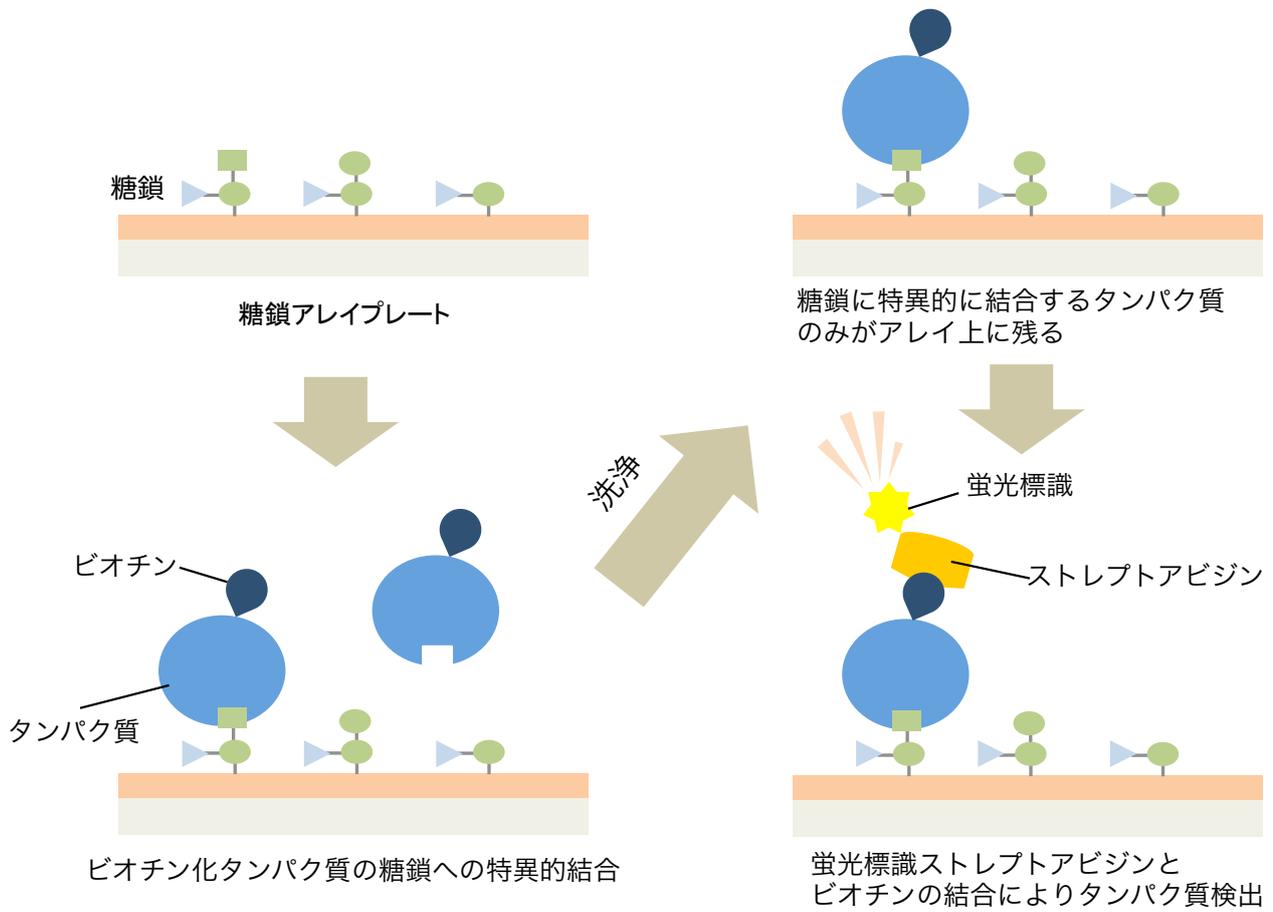


Fig. 3-1. Outline of Glycoarray Analysis

第3節 実験結果

第1項 *Codium fragile* lectin-I (CFL-I) と *Codium fragile* lectin-II (CFL-II) の精製

Fig. 3-2 に示すように、Butyl-Toyopearl を用いた疎水クロマトにより、二つのレクチン画分が得られた。それぞれを CFL-I (*Codium fragile* lectin- I), CFL-II (*Codium fragile* lectin- II) と命名した。CFL-I はヒト A 型, AB 型赤血球およびニワトリ赤血球に対して凝集活性を示したが, CFL-II はヒト A 型, B 型, AB 型, O 型全ての赤血球に対して凝集活性を示したが, ニワトリ赤血球に対しては凝集活性を示さなかった。また, CFL-I と CFL-II の赤血球凝集活性にも, 赤血球凝集体の形態に違いがあった。次いで, これら二つのレクチン画分をそれぞれ Sephacryl S-300 カラムクロマトに供与して精製を進めた。その結果, CFL-I と CFL-II は分子量を異にするレクチンであることが明らかになった (Fig. 3-3)。CFL-I の分子量はゲルろ過および SDS-PAGE で約 40 kDa, CFL-II の分子量はゲルろ過で約 13 kDa , SDS-PAGE では 約 12 kDa と算出された。また, ゲルろ過で精製した CFL-I および CFL-II について, 赤血球凝集活性を測定したところ, Fig. 3-4 に示すように, CFL-I と CFL-II は赤血球凝集活性 (レクチン活性) に違いがあることが明らかになった。CFL-I はヒト A 型, AB 型赤血球およびニワトリ赤血球に対して凝集活性を示したが, B 型および O 型赤血球には活性を示さなかった。従って, CFL-I は A 型抗原 ($\text{GalNAc}\alpha 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-2)\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}$) 特異的だと考えられる。それに対して, CFL-II はヒト A 型, B 型, AB 型, O 型全ての赤血球を凝集させたが, ニワトリ赤血球には活性を示さなかった。従って, CFL-II は A 型抗原, B 型抗原 ($\text{Gal}\alpha 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-2)\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}$), O 型抗原 ($\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}$) 抗原いずれにも結合するか, あるいは血液型抗原ではなく, ヒト赤血球表面特異的に遍在する糖鎖を認識していることが考えられた。また, CFL により凝集した赤血球の形態にも違いが見られ, CFL-I により凝集したヒト A 型, AB 型, ニワトリ赤血球が小粒の凝集体を形成したのに対して, CFL-II により凝集したヒト赤血球はプレートの底に張り付いた膜状の凝集体を形成した。

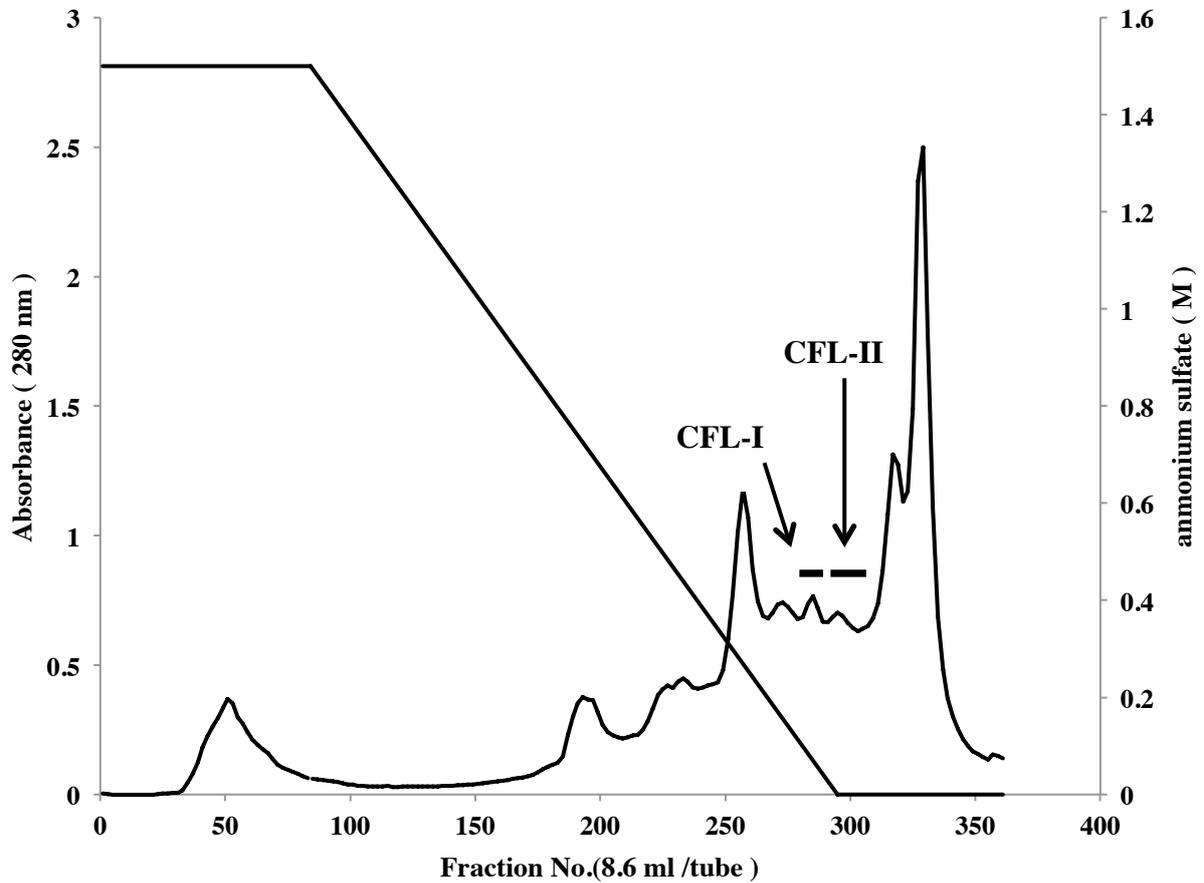


Fig. 3-2. Butyl-Toyopearl Chromatography of Crude Proteins obtained from *Codium fragile*.

Crude proteins dissolved in 20 mM Tris-HCl, pH 8.5, containing 1.5 M ammonium sulfate was applied on a Butyl-Toyopearl column, and bound proteins were eluted by decrease of concentration of ammonium sulfate in the linear gradient manner. CFL-I, *Codium fragile* lectin I; CFL-II, *Codium fragile* lectin II

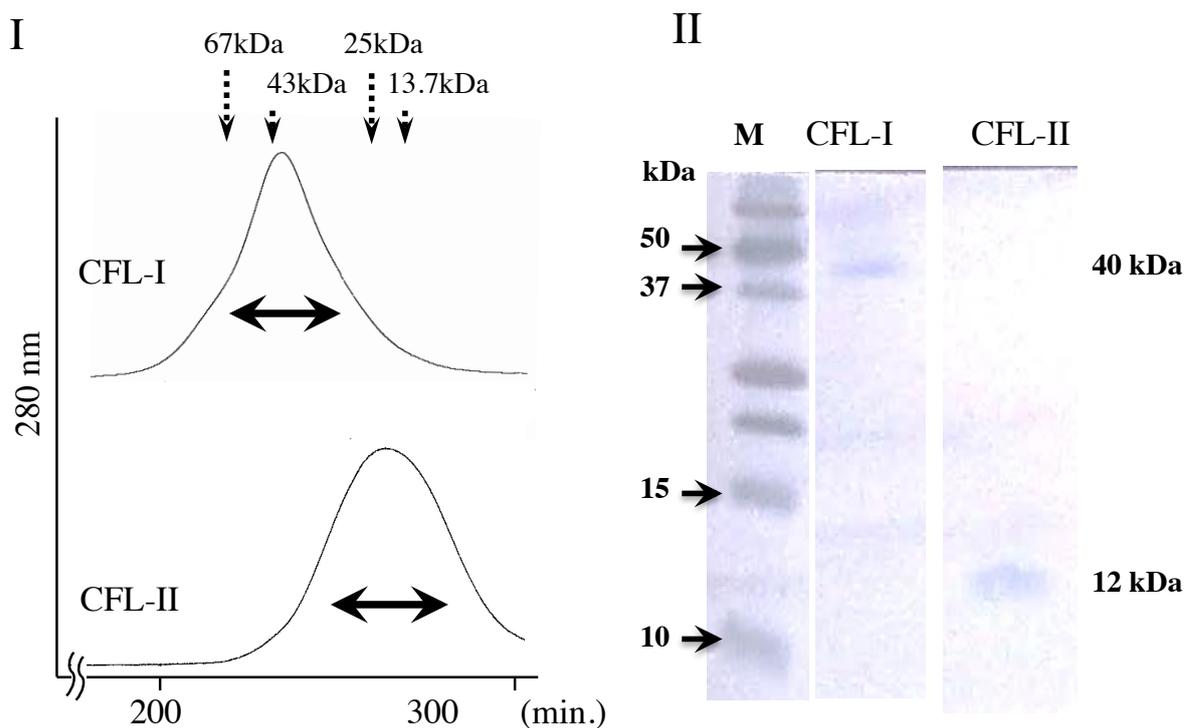


Fig. 3-3. Gel-filtration and SDS-PAGE of *Codium fragile* lectins, CFL-I and CFL-II.

I. Partially purified two *Codium fragile* lectins, CFL-I and CFL-II were put on a Sephacryl S-200 column (2 x 105 cm) previously equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.5., and developed with the same buffer. The fractions indicated by double head arrows were pooled.

II. SDS-PAGE of *Codium* lectins purified by the gel-filtration. Two *Codium* lectins purified by the gel-filtration were analyzed by electrophoresed on a 20% polyacrylamide slab gel. M, marker proteins.

	Chicken	A antigen	B antigen	AB antigen	O antigen
CFL-I					
CFL-II					

Fig. 3-4. Hemagglutinating activities of *Codium fragile* lectins, CFL-I and CFL-II

50 μ L (about 100 μ g of protein) was mixed with 50 μ L saline and 100 μ L of 5% erythrocytes suspended in 20 mM TBS, pH 7.8, and incubated 30 min. at 37°C.

第2項 CFL-I および CFL-II の N-末端アミノ酸配列

精製した CFL-I および CFL-II の N-末端アミノ酸配列を分析した結果、CFL-I は A-P-T-K-L-P-L-(X)-(X)-Y-, CFL-II は F-Q-T-G-I-V-Q-E-S-G-であった。SDS-PAGE 及びゲルろ過の結果から、CFL-I 及び CFL-II はともに単量体構造であることが分かっている (Fig. 3-3)。従って、CFL-I と CFL-II は異なるタンパク質、すなわち遺伝子を異にするレクチンである可能性が考えられた。

第3項 CFL-I および CFL-II の糖鎖結合特異性解析 (糖鎖アレイ解析)

得られた2種のミルレクチン (CFL-I および CFL-II) が、ヒト赤血球凝集活性の特異性を異にすることから、これら2種レクチンは糖鎖結合特異性を糖鎖アレイ分析により解析した。住友ベークライト社製の糖鎖固定化アレイを用いて、2種のビオチン化 CFL-I および CFL-II を固定化糖鎖に結合させた後、蛍光標識アビジンを用いて結合したレクチンを検出した。その結果、Fig. 3-5 (CFL-I), Fig. 3-6 (CFL-II) に示すように CFL-I および CFL-II は何れも A 型抗原糖鎖 (GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)GlcNAc)のみに結合特異性を示し、CFL-II は B 型抗原、O 型抗原には結合性は示さなかった。従って、CFL-II のヒト B 型 (Gal α 1-3(Fuc α 1-2)GlcNAc), O 型 (Fuc α 1-2GlcNAc)赤血球凝集活性は、血液型抗原のみではなく、ヒト赤血球表面に共通して存在する α アノマー構造の GalNAc 残基を有する糖鎖を認識していると考えられる。

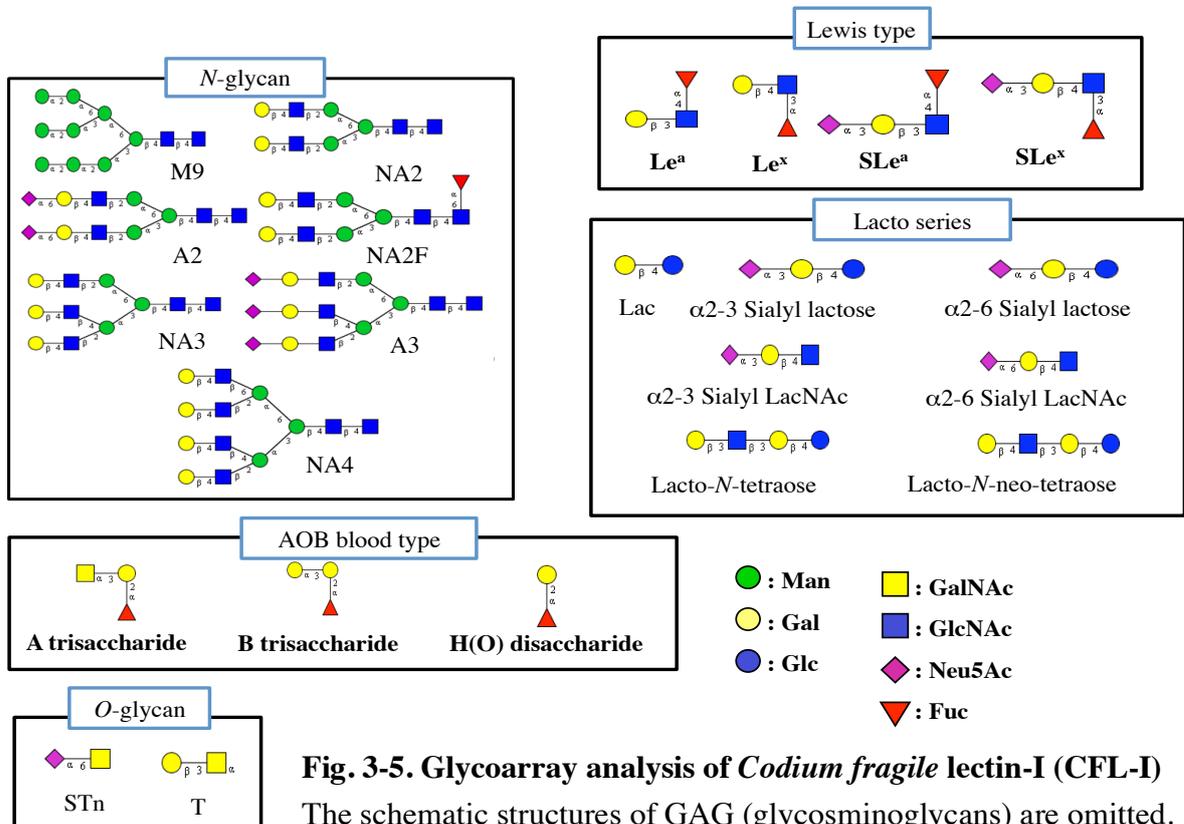
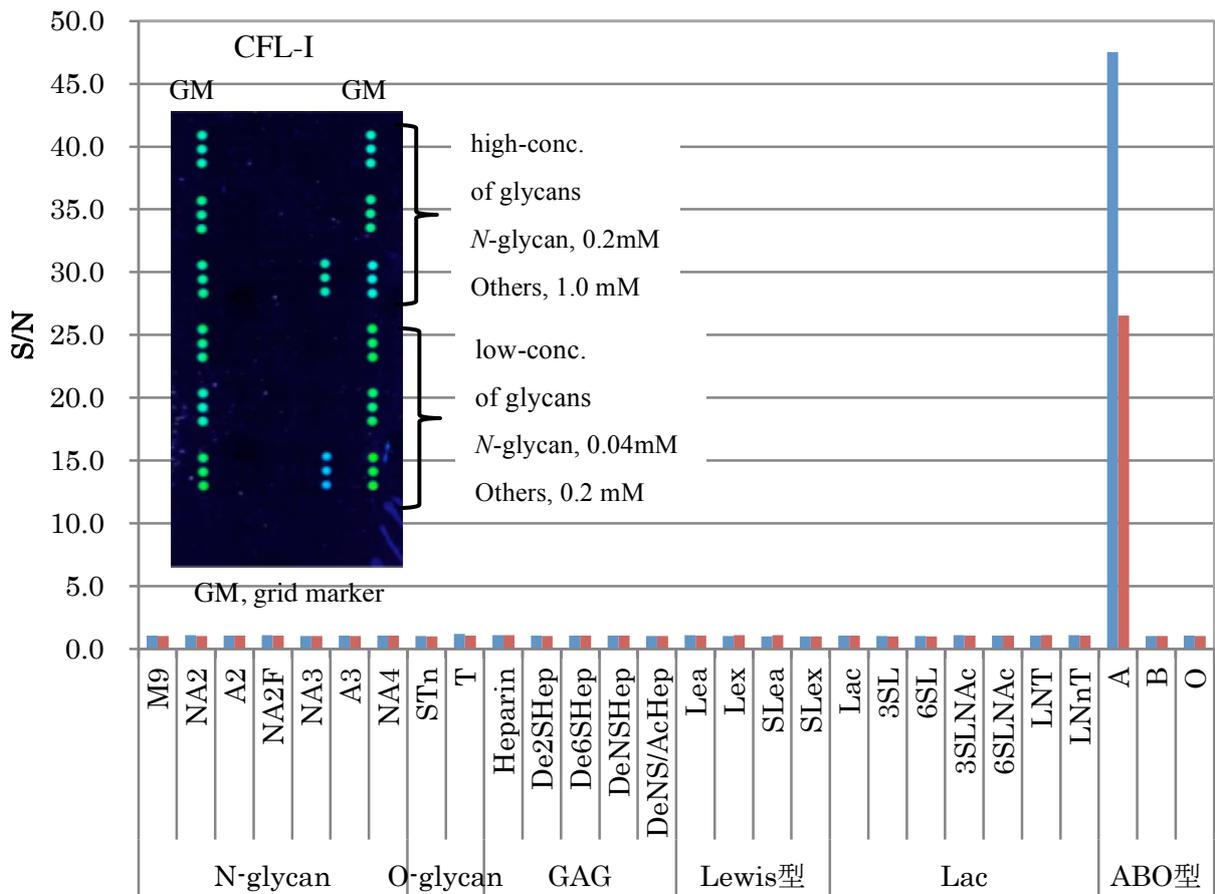


Fig. 3-5. Glycoarray analysis of *Codium fragile* lectin-I (CFL-I)
The schematic structures of GAG (glycosaminoglycans) are omitted.

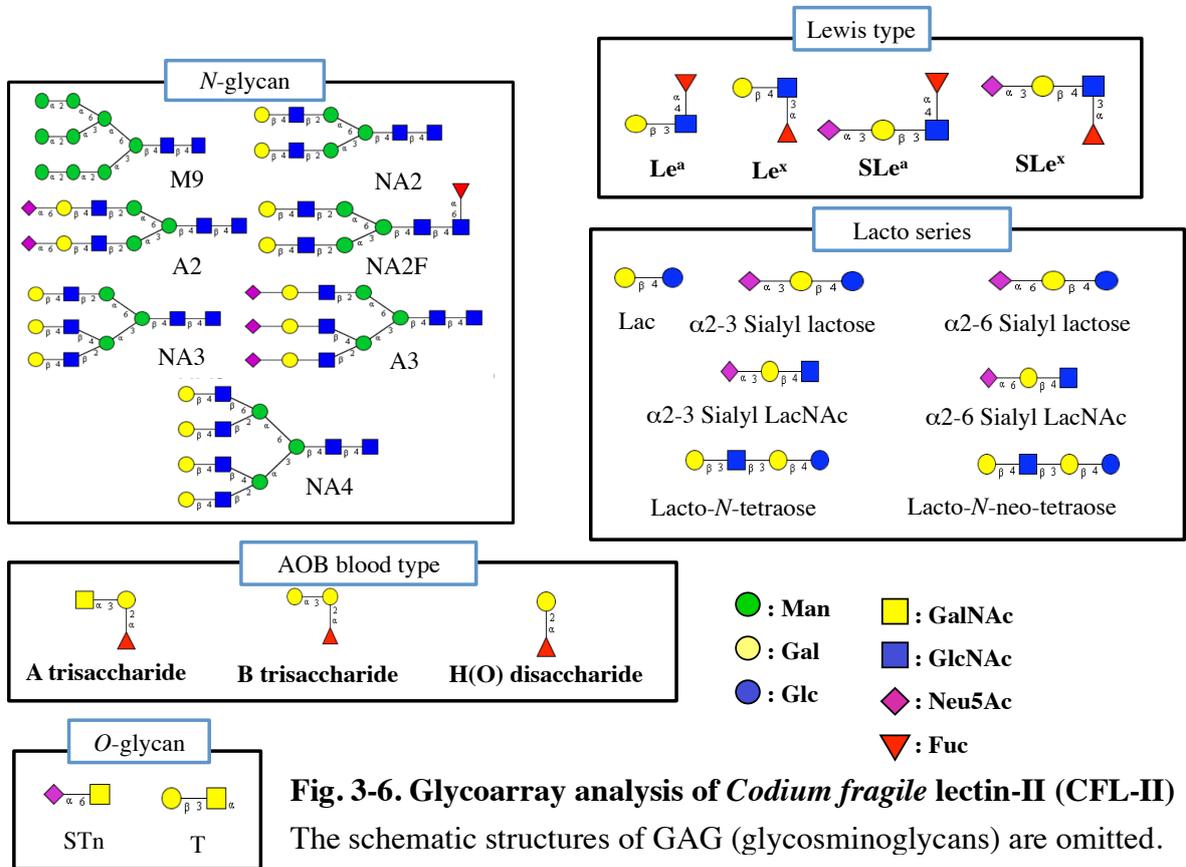
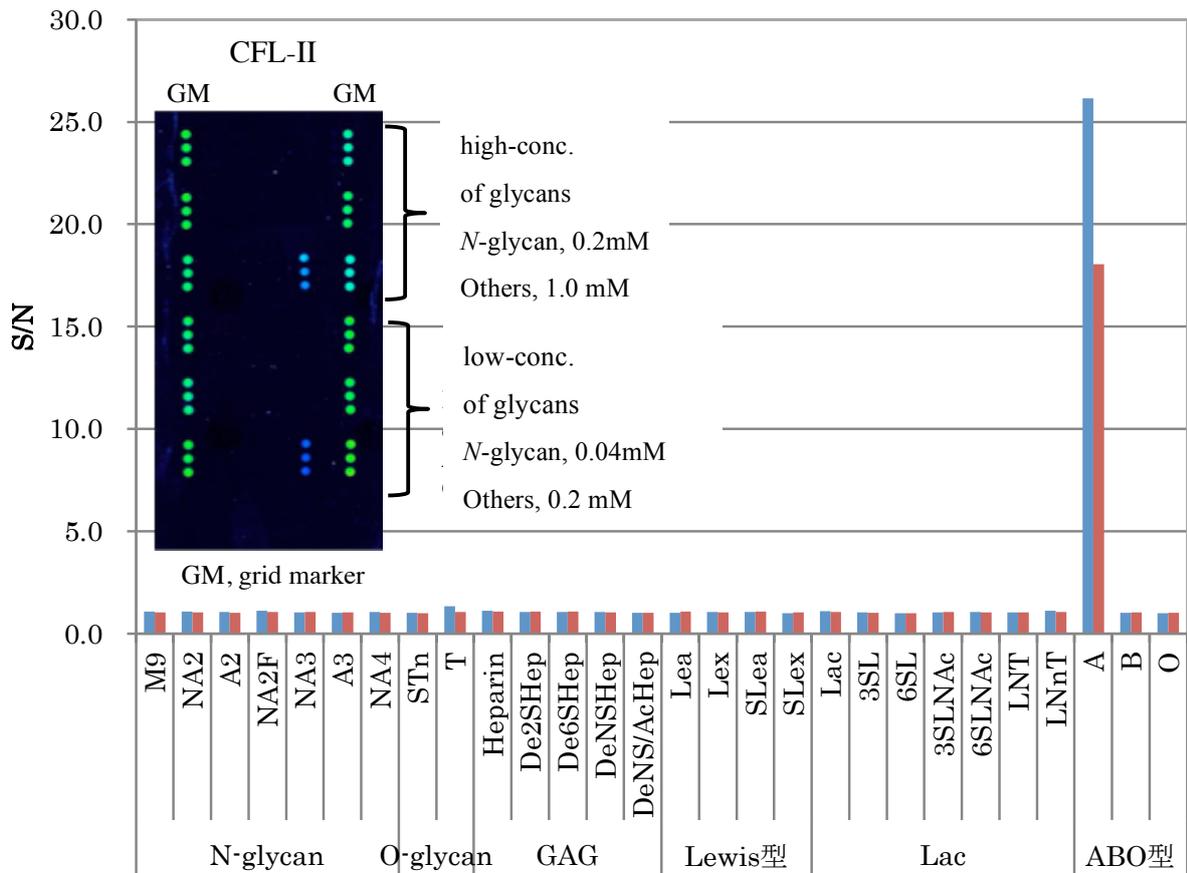


Fig. 3-6. Glycoarray analysis of *Codium fragile* lectin-II (CFL-II)
The schematic structures of GAG (glycosaminoglycans) are omitted.

第4節 考察

本章では、緑藻であるミル (*Codium fragile*) に注目して、レクチンの精製と糖鎖結合特異性解析を行った。ミルレクチン (分子量 約 12kDa) は、ヒト血液型 A,B,O 型全てのタイプの赤血球を凝集させることが報告されているものの、その一方で *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 残基特異的であると報告されており、赤血球凝集活性と糖鎖結合特異性の間には矛盾がある⁴⁰⁻⁴²⁾。一方、ミルレクチンが腫瘍抗原糖鎖と考えられている Tn 抗原や Forssman 抗原にも結合性を示すとの報告もあり⁴²⁾、ミルレクチンの有用性を判定するためには詳細な糖鎖結合特異性解析が必要であった。更に、*Codium fragile* レクチンについては、タンパク質構造に関する知見も得られていなかった。また、最近、ミルの一種 (*Codium barbatum*) から新規レクチンが精製され、ユニークな糖鎖結合特異性が報告されており⁴³⁾、ミル中には未だ報告がなされていないレクチンの存在も考えられた。そこで、本章では、既に精製と糖鎖結合特異性が報告されている *Codium fragile* レクチンについて、糖鎖結合特異性、タンパク質構造に関する詳細な情報を得ることを目的とした。その結果、2種類のミルレクチン (CFL-I, CFL-II) が精製され、CFL-II は 12 kDa の分子量を持つ既報のレクチンであったが、CFL-I は 40 kDa の分子量を持つこれまでに報告のない新規レクチンであった。興味深いことに、CFL-I と CFL-II ではヒト赤血球に対する凝集活性が異なり、CFL-I は A 型と AB 型赤血球およびニワトリ赤血球に対して特異的な凝集活性を示した。それに対して、CFL-II は A 型、B 型、AB 型、O 型全ての赤血球に対して凝集活性を示したが、ニワトリ赤血球に対しては活性を示さなかった。また、CFL-I の *N* 末端配列が A-P-T-K-L-P-L-(X)-(X)-Y-であるのに対して、CFL-II のそれは F-Q-T-G-I-V-Q-E-S-G-であった。一方、ゲルろ過と還元条件下での SDS-PAGE との結果から、CFL-I, CFL-II はどちらもモノマー構造を有することが明らかとなり、この二つのミルレクチン分子はタンパク質構造的にも異なる分子種であると考えられた。CFL-II の分子量 (12 kDa) を考慮すると、一個のドメ

インしか持ち得ないと思われる。しかも、単量体として挙動する CFL-II がどのような機構で赤血球凝集活性を發揮しているかに興味を持たれる。

赤血球凝集活性が異なることから、CFL-I と CFL-II の糖鎖結合特異性に違いがあることが推察されたため、糖鎖マイクロアレイを用いた糖鎖結合特異性を解析した。その結果、CFL-I、CFL-II はどちらも A 型抗原糖鎖に特異的な結合活性を示すことが分かった。この結合特性は、これまで報告されていた糖鎖結合特異性と一致した。しかしながら、CFL-II は、ヒト赤血球に対して血液型抗原特異的な凝集活性を示さないことから、CFL-II のヒト赤血球への結合は、A 型糖鎖抗原特異的な結合に加えて、A 型、B 型、AB 型、O 型赤血球全ての細胞表面に共通に存在する糖鎖に結合することが推察され、その糖鎖構造の同定に興味を持たれる。それらの候補としては、Forssman 抗原 ($\text{GalNAc}\alpha 1\text{-3GalNAc}\beta 1\text{-3Gal}\alpha 1\text{-4Gal}\beta 1\text{-4Glc}$) のような糖脂質糖鎖や Tn 抗原 ($\text{GalNAc}\alpha\text{-Ser/Thr}$) が考えられるが、これらはいずれも腫瘍マーカー糖鎖であるため、健常人の赤血球膜状に発現されているとは考えがたく、ヒト赤血球膜状に共通して存在し $\alpha\text{-GalNAc}$ 残基を非還元末端に有する未同定の糖鎖が存在することが考えられる。従って、今回精製した CFL-II をカップリングさせた担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、CFL-II に対するリガンド糖鎖の精製と同定が進むと期待される。また、CFL-I と CFL-II による赤血球凝集の形態についても違いが見られることから、この 2 種レクチンの糖鎖結合様式に違いがあることも考えられる。これらの点を明らかにするためにも、CFL-I と CFL-II の一次構造（遺伝子構造）を明らかにするとともに、X 線結晶構造解析による両レクチンの立体構造を明らかにする必要がある。

第4章 総括

本研究では、瀬戸内海に生育する海藻(海草)を未利用植物バイオマスとして捉え、機能性糖鎖の有効な供給源としての可能性を探索するために、それらが産生する糖タンパク質糖鎖、特にN-グリカンについて網羅的な構造解析を第2章で行った。

褐藻類7種 (*Sargassum fusiforme* (ヒジキ), *Sargassum fulvellum* (ホンダワラ), *Ishige okamurae* Yendo (イシゲ), *Sargassum horneri* (アカモク), *Sargassum autumnale* (アキヨレモク), *Sargassum thunbergii* (ウミトラノオ), *Sargassum piluliferum* (マメタワラ)), 紅藻類5種 (*Gloiopeltis furcata* (フクロフノリ), *Gracilaria bursa-pastoris* (シラモ), *Gracilaria incurvata* (ミゾオゴノリ), *Hypnea charoides* (イバラノリ), *Chondrus ocellatus* (ツノマタ)) 緑藻類2種 (*Ulva pertusa* (アナアオサ), *Codium fragile* (ミル)), 海草1種 (*Zostera marina* Linnaeus (アマモ)) の15種の海藻および海草から、ペプシン消化によりペプチドを調製した。次いで、イオン交換、ゲルろ過および親水性クロマトを組み合わせることで糖ペプチドを精製した後、ヒドラジン分解、N-アセチル化、ピリジルアミノ化により蛍光標識(PA-)糖鎖を調製した。それぞれのPA-糖鎖を逆相及び順相 HPLC で精製した後、ESI-MS 及び酵素消化法により構造解析を行った。その結果、海藻及び海草が産生する糖タンパク質には、陸生植物に遍在する複合型糖鎖(抗原性糖鎖)は見られず、ハイマンノース型糖鎖のみが結合することを明らかにした。特に、ホンダワラ、アマモでは、 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 構造が主要構造として存在することが明らかとなった。この構造の糖鎖は、HIV コートタンパク質に多量存在することが知られており、HIV ワクチン開発のターゲットとなっているため、抗 HIV 抗体作成への利用が可能である。一方、淡水圏で生育する沈水性植物 (*Egeria densa* (オオカナダモ), *Egeria dens* (コカナダモ), *Ceratophyllum demersum* (マツモ)) が産生する糖タンパク質糖鎖は、植物複合型(抗原性)糖鎖がほとんどを占めており、ルイス a エピトープを持つ糖鎖も比較的少量に存在することを明らかにした。この結果は、これ

らの沈水性植物が免疫活性を有する機能性糖鎖の重要な供給源になることを示すものであった。

細胞外に分泌あるいは細胞膜で機能するタンパク質のほとんどは *N*-グリコシル化を受けている糖タンパク質であり、それらに結合する *N*-グリカン糖鎖はタンパク質の *in vivo* 機能に重要な寄与をなしている。本研究において、海水圏に生育する沈水性植物が発現する糖タンパク質に結合する *N*-グリカン糖鎖がハイマンノース型糖鎖のみであるのに対して、淡水圏に生育する沈水性植物の糖タンパク質糖鎖では、それらのほとんどが複合型構造であることが明らかになった。これらの事実は、高塩環境適応あるいは淡水環境適応と糖タンパク質糖鎖の構造変化（糖鎖プロセッシング機構変化）との間に相関があることを示唆していた。

次いで、緑藻類であるミル (*Codium fragile*) に着目して、レクチンの精製と糖鎖結合特異性解析を行った。ミルからタンパク質を抽出した後、疎水クロマトとゲルろ過により2種のレクチン、CFL-I と CFL-II を精製した。CFL-I はヒト A 型、AB 型赤血球とニワトリ赤血球を特異的に凝集させたが、B 型および O 型赤血球に対しては凝集活性を示さなかった。それに対して、CFL-II はヒト A 型、B 型、AB 型、O 型全てのタイプの赤血球を凝集させたが、ニワトリ赤血球に対しては凝集活性を示さなかった。これらのことから、CFL-I と CFL-II の糖鎖結合特異性は異なることが推察された。CFL-I と CFL-II の分子量は、還元条件下の SDS-PAGE で、それぞれ 40 kDa および 12kDa であった。また、CFL-I の N 末端配列が A-P-T-K-L-P-L-(X)-(X)-Y-であるのに対して、CFL-II のそれは F-Q-T-G-I-V-Q-E-S-G-であり、ゲルろ過と還元条件下での SDS-PAGE との結果から、CFL-I、CFL-II はどちらもモノマー構造を有することが明らかとなった。従って、この二つのミルレクチン分子は、タンパク質構造的に異なる分子種であると考えられた。CFL-II は既に報告されているミルレクチンと同一であると考えられるが、N-末端配列は本研究で初めて明らかにされた。一方、CFL-I はこれまでに報告されていない新規ミルレクチンであった。これまで、ミルレクチン (CFL-II

に相当)は α -GalNAc 残基に特異的なレクチンとして報告されていたが,本研究では,糖鎖アレイ分析により詳細な糖鎖結合特異性を解析した。その結果, CFL-I, CFL-II ともに A 型抗原糖鎖にのみ結合活性を示し,糖鎖結合特異性は同一であることが明らかになった。従って,ヒト赤血球に対する CFL-II のレクチン活性は,血液型抗原糖鎖のみでなく,ヒト赤血球表面に遍在し,かつニワトリ赤血球表面には存在しないヒト特異的な赤血球表層糖鎖に結合することが考えられた。

参考文献

- 1) Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D, Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., and Etzler, M.E. eds. (2009) “Essential of Glycobiology” 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 2) Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Lainé, A-C., Gomord, V., and Faye, L. (1998) *N*-Glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant. Mol. Biol.*, **38**, 31-48.
- 3) Maeda, M., and Kimura, Y. (2013) Structural and Functional Features of Plant Glycoprotein Glycans. In “Chemistry, Molecular Sciences and Engineering” (Reedijk, J., ed) pp 2-15, Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.01500-6.
- 4) Strasser R, Schoberer, J., Jin. C., Glössl, J., Mach, L., and Steinkellner, H. (2006) Molecular cloning and characterization of *Arabidopsis thaliana* Golgi α -mannosidase II, a key enzyme in the formation of complex N-glycans in plants. *Plant J.*, **45**, 789–803.
- 5) Strasser, R., Stadlmann, J., Svoboda, B., Altman, F., Glössl, J., and Mach, L. (2005) Molecular basis of N-acetylglucosaminyltransferase I deficiency in *Arabidopsis thaliana* plants lacking complex N-glycans. *Biochem. J.*, **387**, 385–391.
- 6) Strasser, R, Bondili, J.S., Vavra, U., Schoberer, J., Svoboda, B., Stadlmann, J., Altman, F., Steinkellner, H., and Mach, L. (2007) A unique β 1,3-galactosyltransferase is indispensable for the biosynthesis of N-glycans containing Lewis a structures in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19**, 2278–2292.
- 7) Leiter, H., Mucha, J., Staudacher, W., Grimm, R., and Altman, F. (1999) Purification, cDNA cloning, and expression of GDP-L-Fuc:Asn-linked GlcNAc α 1,3-fucosyltransferase from mung beans. *J. Biol. Chem.*, **274**, 21830-21839.

- 8) Strasser, R., Mucha, J., Mach, L., Altman, F., Wilson, I.B.H., Glössl, J., and Steinkellner, H. (2000) Molecular cloning and functional expression of β 1, 2-xylosyltransferase cDNA from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, **472**,105–108.
- 9) von Schaewen, A., Sturm, A., O'Neill, J., and Chrispeels, M. (1993) Isolation of a mutant *Arabidopsis* plant that lacks *N*-acetyl glucosaminyl transferase I and is unable to synthesize Golgi-modified complex *N*-linked glycans. *Plant Physiol.*, **102**, 1109–1118.
- 10) Strasser, R., Altman, F., Mach, L., Glössl, J., and Steinkellner, H. (2004) Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex *N*-glycans lacking α 1,2-linked xylose and core α 1,3-linked fucose. *FEBS Lett.*, **561**, 132–136.
- 11) Kang, J.S., Fraank, J., Kang, C.H., Kajiura, H., Vikram, M., Ueda, A., Kim, S., Bahk, J.D., Triplett, B., Fujiyama, K., Lee, S.Y., von Schaewen, A., and Koiwa, H. (2008) Salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* requires maturation of *N*-glycosylated proteins in the Golgi apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 5933-5938.
- 12) Faye, L., Gomord, V., Fitchette-Lainé, A.-C., and Chrispeels, M.J. (1993) Affinity purification of antibodies specific Asn-linked glycans containing α 1-3 fucose or β 1-2 xylose. *Anal. Biochem.*, **209**, 104-108.
- 13) Bardor, M., Faveeuw, C., Fitchette-Lainé, A.-C., Gilbert, D., Gakas, L., Trottein, F., Faye, L., and Lerouge, P. (2003) Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core α (1,3)-fucose and core xylose. *Glycobiology* **13**, 427-434
- 14) Hijikata, A., Matsumoto, I., Kojima, K., and Ogawa, H. (1994) Antigenicity of the oligosaccharide moiety of the Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergen Cry j I. *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, **105**, 198-202.
- 15) Ogawa, H., Hijikata, A., Amano, M., Kojima, K., Fukushima, H., Ishizuka, I., Kurihara, Y., and Matsumoto, I. (1996) Structures and contribution of the antigenicity of oligosaccharides of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergen Cry j I:

- relationship between the structures of and antigenic epitopes of plant *N*-linked complex-type glycans. *Glycoconjugate. J.*, **13**, 555-566.
- 16) Garcia-Casado, G., Sanchez-Monge, R., Chrispeels, M. J., Armentia, A., Salcedo, G., and Gomez, L. (1996) Role of complex asparagine-linked glycans in the allergenicity of plant glycoproteins. *Glycobiology*, **6**, 471-477.
- 17) Fötisch, K., Altman, F., Haustein D., and Vieths, S. (1999) Involvement of carbohydrate epitopes in the IgE response of celery-allergic patients. *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, **120**, 30-42.
- 18) van Ree, R., Cabanes-Macheteau, M., Akkeraas, J., Milazzo, J-P., Loutelier-Bourhis, C., Rayon, C., Villalba, M., Koppelman, S., Aalberse, R., Rodriguez, R., Faye, L., and Lerouge, P. (2000) $\beta(1,2)$ -Xylose and $\alpha(1,3)$ fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J. Biol. Chem.*, **276**, 11451-11458.
- 19) Okano, M., Kimura, Y., Maeda, M., Michigamai, Kimura, M, Nishizaki. K. (2004) Role of pollen-derived oligosaccharides in human IgE and T cell responses in Japanese cedar pollinosis. *Clin. Exp. Allergy*, **34**. 770-778.
- 20) Scanlan, C.N., Pantophlet, R., Wormald, M.R., Ollmann Saphire, E., Stanfield, R., Wilson, I.A., Kattinger, H., Dwek, R.A., Rudd, P.M., and Burton, D.R. (2002) The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of $\alpha 1 \rightarrow 2$ mannose residues on the outer face of gp120. *J. Virol.*, **76**, 7306–7321.
- 21) Astronomo, R.D., Lee, H.K., Scanlan, C.N., Pantophlet, R., Huang, C.Y., Wilson, I.A., Blixt, O., Dwek, R.A., Wong, C.H., and Burton, D.R. (2008) A glycoconjugate antigen based on the recognition motif of a broadly neutralizing human immunodeficiency virus antibody, 2G12, is immunogenic but elicits antibodies unable to bind to the self glycans of gp120. *J. Virol.*, **82**, 6359–6368.
- 22) Kimura, Y., and Matsuo, S. (2000) Structural changes in *N*-linked oligosaccharides during seed development of *Ginkgo biloba*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 562-568.

- 23) Large-Scale Preparation of Asn-Glycopeptide Carrying Structurally Homologous Antigenic N-Glycan. Maeda, M., Takeda, N., Mano, A., Yamanishi, M., Kimura, M., and Kimura, Y. (2013) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1269-1274.
- 24) Kimura, Y., Watanabe, T., Kimura, M., Maeada, M., Murata, Y., Fujiyama, K. (2008) Salt-adaptation of Tobacco BY2 cells induces change in glycoform of N-glycans: Enhancement of exo- and endo-glycosidase activities by salt-adaptation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 514-522.
- 25) Bokesch, H.R., O'Keefe B.R., McKee T.C., Pannell, L.K., Patterson, M.L., Gardella, R.S., Sowder, R.CII., Turpin, J., Watson, K., and Buckheit, R.W.Jr. (2003) A potent novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium *Scytonema varium*. *Biochemistry*, **42**, 2578-2584. (2003).
- 26) Bewley, C.A., Cai, M., Ray, S., Ghirlando, R., Yamaguchi, M., and Muramoto, K. (2004) New carbohydrate specificity and HIV-1 fusion blocking activity of the cyanobacterial protein MVL: NMR, ITC and sedimentation equilibrium studies. *J. Mol. Biol.*, **339**, 901-914.
- 27) Mori. T., O'Keefe, B.R., Sowder, R.CII., Bringans, S., Gardella, R.S., Berg, S., Cochran, P., Turpin, J.A., Buckheit, R.W.Jr., McMahan. J.B., and Boyd, M.R. (2005) Isolation and characterization of griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia* sp . *J. Biol. Chem.*, **280**, 9345-9353.
- 28) Hori, K., Sato, Y., Ito, K., Fujiwara, Y., Iwamoto, Y., Makino, H., and Kawakubo, A. (2007) Strict specificity for high-mannose type N-glycans and primary structure of a red alga *Eucheuma serra* lectin. *Glycobiology*, **17**, 479-491.
- 29) Sato Y, Okuyama S, and Hori K. (2007) 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).
- 30) Sato, Y., Hirayama, M., Morimoto, K., and Hori, K. (2011) High mannose-specific lectin(KAA-2) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potently inhibits influenza virus

- infection in a strain-independent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **405**, 291-296.
- 31) Sato, Y., Hirayama, M., Morimoto, K., Yamamoto, N., Okuyama, S., and Hori, K. (2011) High mannose-binding lectin with preference for the cluster of alpha1-2-mannose from the green alga *Boodlea coacta* is a potent entry inhibitor of HIV-1 and influenza viruses. *J. Biol. Chem.*, **286**, 19446-19458.
- 32) Hung, L.D., Sato, Y., and Hori, K. (2011) High-mannose N-glycan-specific lectin from the red alga *Kappaphycus striatum* (Carrageenophyte). *Phytochemistry*, **72**, 855-861.
- 33) Hori, K., Matsubara, K., and Miyazawa, K. (2000) Primary structures of two hemagglutinins from the marine red alga, *Hypnea japonica*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1474**, 226-236.
- 34) Okuyama, S., Nakamura-Tsuruta, S., Tatenno, H., Hirabayashi, J., Matsubara, K., and Hori, K. (2009) Strict binding specificity of small-sized lectins from the red alga *Hypnea japonica* for core (α 1-6) fucosylated *N*-glycans. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 912-920.
- 35) Fukuda, Y., Sugawara, T., Ueno, M., Fukuta, Y., Ochi, Y., Akiyama, K., Miyazaki, T., Matsuda, S., Kawakubo, A., and Kato, K. (2006) The anti-tumor effect of *Euchema serra* agglutinin on colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Anticancer Drugs*, **17**, 943-947.
- 36) Ziolkowska, N.E. and Wlodawer, A. (2006) Structural studies of algal lectins with anti-HIV activity. *Acta Biochim. Pol.*, **53**, 617-626.
- 37) Ambrosio, A.L., Sanz, L., Sanchez, E.I., Todel, C.W., and Calvete, J.J. (2003) Isolation of two novel mannan-and-fucose-binding lectins from the green alga *Enteromorpha prolifera*: Biochemical characterization of EPL-2. *Arch. Biochem. Biophys.*, **415**, 245-250.
- 38) Sampaio, A.H., Roger, D.J., and Barwell, C.J. (1998) Isolation and characterization of the lectin from the green marine alga *Ulva lactuca* L. *Bot. Mar.*, **41**, 427-433.
- 39) Wang, S., Zhang, F.D., Zhang, Y.J., Wu, Z.J., Lin, Q.Y., and Xie, L.H. (2004) Molecular characterization of a new lectin from the marine alga *Ulva pertusa*. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, **36**, 111-117.

- 40) Fabregas, J., Munoz, A., Llovo, J., and Carracedo, A. (1998) Purification and partial characterization of tomentine. An *N*-acetylglucosamine-specific lectin from the green alga *Codium tumentosum* (Huds.)Stackh. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **124**, 21-30.
- 41) Alvarez-Hernandez, S., de Lara-Isassi, G., Arreguin-Espinoza, R., Arreguin, B., Hernandez-Santoyo, A., and Rodriguez-Romero, A. (1990) Isolation and partial characterization of giraffine, a lectin from the Mexican endemic alga *Codium giraffa* Silva. *Bot. Mar.*, **42**, 573-580.
- 42) Wu, A.M., Song, S.C., Chang, S.C., Wu, J.H., Chang, K.S., and Kabat, E.A. (1997) Further characterization of the binding properties of a GalNAc specific lectin from *Codium fragile* subspecies tomentosoides. *Glycobiology*, **7**, 1061-1066.
- 43) Praseptianga, D., Hirayama, M., and Hori, K. (2012) Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel lectin from the green alga, *Codium barbatum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 805-811.
- 44) 吉田靖弘, 高柴正悟, 伊東孝, 今村幸治, 竹内英明, 岡本英治 虫菌予防剤.特願 2011-101230, 特開 2011-246465, 2011 年 12 月 8 日公開
- 45) Wang, W.-C. and Cummings, R.D. (1988) The immobilized leucoagglutinin from the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked α -2,3 to penultimate galactose residues. *J. Biol. Chem.*, **263**, 4576-4585.
- 46) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Robers, P. A., and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.
- 47) Natsuka, S., and Hase, S. (1998) Analysis of *N*- and *O*-glycans by pyridylamination. *Methods Mol. Biol.*, **76**, 101-113.
- 48) Maeda, M., and Kimura, Y. (2006) Glycoform analysis of *N*-glycans linked to Glycoproteins expressed in rice culture cells: Predominant occurrence of complex type *N*-glycans. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 1356-1363.

- 49) Kimura, Y., Kamamoto, M., Maeda, M., Okano, M., Yokoyama, M., Kino, K. (2005) Occurrence of Lewis a epitope in *N*-glycans of a glycoallergen, Jun a 1, from the mountain cedar pollen. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 137-144.
- 50) Maeda, M., Kamamoto, M., Kimura, Y. (2005) Glycoform analysis of Japanese cedar pollen allergen, *Cry j 1*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 1700-17005.
- 51) 前田恵, 谷美里, 木村吉伸. 日本農芸化学会 2014 年度大会 (東京) 講演要旨集 3A02a05.
- 52) Lambers, H., Chapin, F.S., and Pons T.L. (1998) *Plant Physiological Ecology*. Berlin: Springer.
- 53) Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- 54) Oda, M., Kabura, M., Takagishi, T., Suzue, A., Tominaga, K., Urano, S., Nagahama, M., Kobayashi, K., Furukawa, K., Furukawa, K., and Sakurai, J. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 33070-33079.

謝辞

本研究を遂行し，本論文をまとめるにあたり，全構成にわたり御懇篤なる御指導，御鞭撻を賜りました岡山大学大学院 環境生命科学研究科 木村 吉伸 教授に深甚なる謝意を表します。

本研究を行うにあたり，有益なご指導を賜りました副指導教員である岡山大学大学院 環境生命科学研究科 生物機能化学講座の 稲垣 賢二 教授及び 田村 隆 教授に深い感謝の意を表します。

本研究を遂行し，本論文をまとめるにあたり，終始有益なる御指導，御激励を頂きました岡山大学大学院 環境生命科学研究科 前田 恵 助教に深い感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり，瀬戸内海に生育する海藻を御提供頂きました 水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所 内田 基晴 博士に深く感謝致します。

本研究を遂行し，本論文をまとめるにあたり，御協力頂きました岡山大学 農学部 糖鎖機能化学研究ユニット 永見 匡資 君，谷 美里 さん，縄田 苑子さん，およびご激励頂きました同研究室の皆様に厚く御礼申し上げます。