

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580137

研究課題名(和文)カルシウム依存性レクチンの糖鎖認識機構及び細胞膜内イオンチャネル形成機構の解明

研究課題名(英文)Carbohydrate-recognition and transmembrane ion-channel-formation mechanisms of calcium-dependent lectins

研究代表者

畠山 智充 (HATAKEYAMA, Tomomitsu)

長崎大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50228467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体防御系をはじめとして、生体内での分子認識に重要な役割を果たしているカルシウム依存性レクチンの糖鎖認識機構の解明を行うことを通して、糖認識部位アミノ酸を変異させることにより既存のレクチンの糖結合特異性を人為的に変換することに成功した。また、カルシウム依存的溶血性レクチンCEL-IIIの部位特異的変異実験及びそのオリゴマー構造の立体構造解析結果から、CEL-IIIの立体構造変化と、細胞膜中での膜貫通七量体形成機構を解明し、自然界に広く存在する細胞膜孔形成毒素タンパク質の機能発現機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Carbohydrate-recognition mechanisms of calcium-dependent lectins, which play important roles in molecular recognition systems in organisms, were analyzed, and a novel artificial lectin with a designed binding-specificity was produced. In addition, site-directed mutational and three-dimensional structural analyses of the hemolytic lectin CEL-III revealed that it forms heptamers in target cell membrane with extensive conformational changes, forming the transmembrane pores that lead to hemolysis or cell death. These results may provide valuable information on various pore-forming toxin proteins widely distributed in the nature.

研究分野：蛋白質科学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：レクチン 糖鎖 部位特異的変異 X線結晶構造解析 蛋白質工学

## 1. 研究開始当初の背景

レクチンは糖結合タンパク質の総称であり、多くの植物及び動物組織に見いだされている。特に動物レクチンについては、免疫、発生・分化、細胞内でのタンパク質輸送・フォールディングなど、糖鎖を介して分子認識や細胞間認識に重要な役割を果たすことが示されている。C型レクチンを始めとするカルシウム依存性レクチンは、生体内で多彩な役割を果たしているが、なかでも自然免疫等の生体防御機構において重要な機能を持つものが多いことが知られている。筆者らはこれまでに、無脊椎動物カルシウム依存性レクチンとして、棘皮動物グミ (*Cucumaria echinata*) から CEL-I, CEL-III, CEL-IV と名づけたレクチンの構造と機能について、その立体構造をX線結晶構造解析によって決定するとともに、大腸菌による発現系を確立して、部位特異的変異体を用いた研究から、特異的糖との相互作用について様々な検討を行ってきた。そこで本研究では、これまでの研究を基礎として、カルシウム依存性レクチンの糖結合特異性を人為的に部位特異的変異によって変換し、新たな特異性および生理活性を示すレクチンを創出するとともに、溶血性レクチン CEL-III の自己会合及びイオンチャンネル形成メカニズムを明らかにすることを旨とした。

## 2. 研究の目的

### 1) C型レクチンの部位特異的変異による糖認識機構解明

C型レクチンのアミノ酸配列の類似性は通常30%以下であるにもかかわらず、その基本的な主鎖構造が種間で非常に類似しており、糖結合部位を含むループ構造に多様性を持たせることにより、多彩な糖鎖との結合を可能にしている。このことから、糖結合部位を形成するループ領域のみを新たにデザインすることにより、その糖認識能を変化させることが可能であると考えられる。C型レクチンの場合、特に Gln-Pro-Asp (QPD) 及び Glu-Pro-Asn (EPN) モチーフが糖認識に深くかかわっていることから、CEL-I の QPD 配列を EPN に置換した変異体や、逆に CEL-IV の EPN 配列を QPD に置換することにより、特異性を変換したレクチンを創出することができることが期待される。特に、CEL-I については EPN 配列に変異させることにより、弱いマンノース特異性を示すことがこれまでに認められたことから、さらにマンノースとの親和性を上昇させるために他の糖結合部位アミノ酸残基の変異についても検討を行う。これらの知見をもとに、人工的にレクチンの糖認識能をデザインするための一般的な情報を得ることを目的とする。

### 2) 溶血性レクチン CEL-III 及びその部位特異的変異体のオリゴマー構造ならびにイオンチャンネル形成機構解析

CEL-III は標的細胞膜表面糖鎖と結合することが引き金となって細胞膜内でオリゴマー化し、イオンチャンネルを形成するが、水溶液中においても、高 pH、高イオン強度条件下のような特異的な状況下でラクトースなどの  $\beta$ -ガラクトシドと結合することにより、可溶性のオリゴマーを形成することが明らかになっている。このオリゴマーは標的細胞膜中で形成されるものと構造が類似したものであることが、いくつかの実験結果から示唆されている。すでに、このオリゴマーの結晶が作製され、6 以上の分解能で X 線回折を生じることが確認されていることから、この可溶性オリゴマーの結晶の改良を行うことにより、オリゴマーの立体構造を解析する。一方、CEL-III のドメイン 3 には、溶血活性に直接関与するアミノ酸残基として塩基性アミノ酸 (リジン、アルギニン) が複数同定されている。これは、細胞膜内のリン脂質との相互作用に参与していることが予想される。そこで、これらの残基について部位特異的変異体を作製することにより、溶血活性ならびにオリゴマー化能への影響を検討する。これらの情報をもとに、CEL-III のどの領域がオリゴマー化に寄与しており、どのようなメカニズムでオリゴマー化が進行するのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1) 糖鎖付加デンドリマーを用いたレクチン活性測定法の開発

レクチンの部位特異的変異体の糖結合活性測定は、簡便かつ微量で測定可能な方法を用いる必要があるが、現在よく用いられる赤血球凝集活性阻害法は、比較的多量のサンプルを必要とし、赤血球凝集能を示すレクチンにしか適用できない。また、凝集を目視で確認するため定量性、再現性に乏しいという難点がある。そこで、糖鎖を末端に付加した合成デンドリマーを用いたレクチン活性測定法の開発を行った。デンドリマーとして、末端に 64 個の一級アミノ基を有する第 4 世代のポリアミドアミンデンドリマー (PD) を用い、このアミノ基と二糖以上の還元糖のアルデヒド基を還元的アミノ化反応を用いて縮合させることにより、末端に多数の糖を付加した糖鎖付加デンドリマー (sugar-PD) を作製した。レクチンとの複合体形成反応は、動的光散乱法 (DLS) によってそのサイズを測定するとともに、濃度依存的な形成量の変化については、420nm のレイリー散乱光の強度をもとに測定を行った。結合させる還元糖のうち、マンノースオリゴ糖については、酵母マンナンを部分加水分解して得た長さの異なるマンノースオリゴ糖を用いた。

### 2) C型レクチンの部位特異的変異体作製とその糖結合特異性解析

これまでに、CEL-I の QPD 配列を EPN 配列に変換した部位特異的変異体を作製し、わ

ずかにマンノース特異性が上昇することを明らかにした。しかしながらその活性はそれほど大きいものではないために、CEL-I の糖結合部位に存在する他の残基について検討を行った。特に、糖の配向に影響を及ぼすことが考えられる Trp105 を His 残基に置き換えた部位特異的変異体遺伝子を作製し、大腸菌を用いて発現を行った。得られたタンパク質は封入体として沈殿画分から得られたため、これを回収し、6M グアニジン塩酸を用いて完全に変性させた後に、Arg 存在下でリフォールディングを行った。その結果、可溶性になったタンパク質 (EPNH-CEL-I) はマンノース固定化カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー及びゲルろ過によって精製した。精製されたタンパク質は CD スペクトルによって二次構造の形成を確認するとともに、マンノース含有 PD を用いて種々の糖との結合活性を調べるとともに、等温滴定カロリーメーター (ITC) を用いて糖との結合定数及び結合の熱力学的パラメーターの測定を行った。一方、EPNH-CEL-I 及びそのマンノースとの複合体の X 線結晶構造解析を行い、その糖結合様式についても検討した。

### 3) 溶血性レクチン CEL-III の部位特異的変異体作製

これまでの部位特異的変異の結果から、CEL-III のドメイン 3 の内部に存在するアミノ酸残基を Ala に置換することによって、活性が上昇するものが存在することが明らかになった。特に Lys405 を Ala に置換することにより、天然型 CEL-III よりも活性が高い変異体を得られ、これはドメイン 3 のコンフォメーション変化が促進されることによるものと考えられた。そこで、この Lys405 を逆の電荷を有する Glu 残基に置換することによって、その活性に及ぼす影響を検討した。部位特異的変異体は 6M グアニジン塩酸による完全変性後、リフォールディングを行い、アフィニティークロマトグラフィー及びゲルろ過によって精製した。得られたタンパク質の溶血活性を比較することによって、ドメイン 3 の構造変化と活性の関係について検討を行った。

### 4) CEL-III オリゴマーの X 線結晶構造解析

CEL-III オリゴマーの X 線結晶構造解析を行うことによって、そのオリゴマー形成機構を検討した。CEL-III オリゴマーは、水溶液中で特異的な糖と結合させることによって形成させた。得られた水溶性 CEL-III オリゴマーをカラムクロマトグラフィーで精製した後に、界面活性剤存在下において、種々の条件で結晶化を行った。その後、放射光を用いた X 線回折データ収集を行い、Pt 誘導体を用いた位相決定 (SIRAS 法) 及び構造の精密化を行った結果、2.9 Å で立体構造を決定した。得られた構造をもとに CEL-III のドメイン 3 がどのように構造を変化させオリゴマー

化し、細胞膜中にイオン透過性のポアを形成するかを明らかにした。

## 4. 研究成果

### 1) 糖鎖付加デンドリマーを用いたレクチン活性測定法の開発

本研究では、種々のレクチンの部位特異的変異体を作製し、その活性を検討する必要があるが、そのためには簡便かつ高感度な活性測定法が必要となる。しかしながら、現在一般に多く用いられているレクチン活性測定法は、感度や必要な試料量などの面で不都合な点が多いため、新規にデンドリマーを用いた活性測定法を開発した。末端に 64 個の一級アミノ基を有する PD に種々の二糖以上の還元糖のアルデヒド基を還元アミノ化反応を用いて縮合させることにより、末端に多数の糖を付加したデンドリマーを作製した (図 1)。レクチンとの結合活性は、動的光散乱法 (DLS) 及びレイリー散乱測定によって行った。モデルレクチンとしてグミの C 型レクチン CEL-IV を用いて、メリビオースを末端に付加した PD (melibiose-PD) との結合反応を DLS で測定したところ、10 nm 以下の直径であった CEL-IV が、melibiose-PD の濃度依存的に大きな複合体を形成し、最終的に 1µm 程度の粒子径を示した。さらに、420 nm のレイリー散乱光をもとに、結合の濃度依存性及び調べたところ、レクチン及び melibiose-PD とともに 10 µg/ml 以下の低濃度でも、効率的に結合が検出された。また、種々の阻害糖を用いた実験から、これまでに知られている CEL-IV の糖特異性と一致する阻害活性が得られ、信頼性のある簡便なレクチン活性測定法であることが明らかとなった。

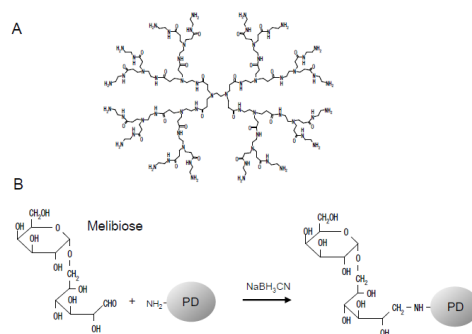


図 1. 第 2 世代 PD (A) と糖 (メリビオース) 付加 PD の結合様式

### 2) C 型レクチンの部位特異的変異体作製とその糖結合特異性解析

C 型レクチン CEL-I は GalNAc/Gal 特異的レクチンであるが、その糖結合部位に存在する糖認識モチーフである QPD 配列を EPN 配列にした部位特異的変異体は、わずかなマンノース結合性を示した。そこで、マンノース特異的レクチンであるマウスマンナン結合レクチン (MBL) の立体構造との比較から、

CEL-I の糖結合部位に存在する Trp105 を His に置換した変異体 (EPNH-CEL-I) を作製して大腸菌により発現させ、得られたタンパク質をリフォールディング後、アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、その糖結合特異性を sugar-PD 及び ITC を用いて測定した。その結果、EPNH-CEL-I はマンノースを固定化したカラムに結合するとともに、sugar-PD において、Man 及び Methyl- $\alpha$ -Man に高い親和性を示すが、Gal や Methyl- $\alpha$ , $\beta$ -Gal に対してはほとんど親和性を示さないことが明らかになった。しかしながら、ある程度の GalNAc 特異性も残存しており、これは GalNAc のアセトアミド基と相互作用する Arg115 及び Gln80 が EPNH-CEL-I にも存在しているためであると推定された。ITC からは、マンノースとの結合定数として、 $3.17 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  という値が得られ、一般的なレクチンと同等の結合力を有することが明らかとなった。

EPNH-CEL-I のマンノース認識機構を明らかにするために、マンノースとの複合体の X 線結晶構造解析を行ったところ、1.7 Å の分解能で回折データが得られ、分子置換法により解析した結果、その糖認識様式が哺乳類血清中に存在するマンナン結合レクチンと類似していることが明らかになった (図 2)。

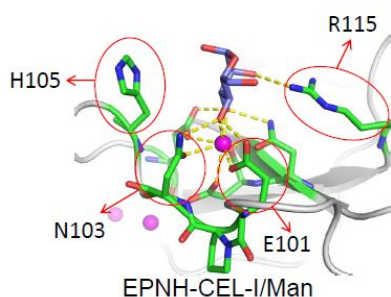


図 2. EPNH-CEL-I/マンノース複合体の糖結合部位構造

### 3) 溶血性レクチン CEL-III の部位特異的変異体作製とその機能解析

CEL-III の膜結合ドメイン (ドメイン 3) における活性に関与するアミノ酸残基を部位特異体変異を用いて検討した結果、Lys334, Lys351, Lys405, Lys420 を Ala に置換した変異体が、天然型 CEL-III 以上の高い活性を示すことが明らかになった。これらの残基はいずれも分子内部に位置しており、ドメイン 3 の構造の安定性に寄与しているものと考えられることから、その変異がドメイン 3 のコンフォメーション変化を促進し、標的細胞膜内でのオリゴマー化を進みやすくしたものと考えられた。特に Lys405 を Ala に置換した K405A は天然型 CEL-III 以上の活性を示したことから、Lys405 を逆の電荷を有する Glu 残基に置換した変異体 (K405E) を作製し、その活性を調べたところ、K405A 以上の溶血活性を示した。このことから、405 番目の残基

が負電荷をもったために、その近傍に位置する Asp371 の負電荷との静電反発によりドメイン 3 がコンフォメーション変化を起こしやすくなり、オリゴマー形成及び赤血球膜への膜孔形成反応が促進されたものと推定された。

### 4) CEL-III オリゴマーの X 線結晶構造解析

水溶液中で特異的糖であるラクツロースと、pH10, 1 M NaCl 存在下で結合させることによって CEL-III のオリゴマーを作製し、その結晶化を行った結果、pH 4.2 の酢酸ナトリウム緩衝液、100 mM の CdCl<sub>2</sub> 存在下でポリエチレングリコール 400 を沈殿剤として用いた時に良好な結晶が得られた。そこで、放射光を用いて X 線回折データを収集し、Pt 誘導体を用いた SIRAS 法によって初期位相を決定した後に精密化を行うことによって 2.9 Å 分解能で構造を決定することに成功した (図 3)。得られた構造は CEL-III 七量体であり、ドメイン 3 のもとも 2 本の  $\alpha$  ヘリックスを含んでいる領域が、2 本の長い  $\beta$  ストランドを形成し、さらにそれらが七量体中で長い (75 Å)  $\beta$  バレルを形成していた。この  $\beta$  バレルを膜内に挿入することによって、イオン透過性ポアを形成することが明らかになった。この  $\beta$  バレルの外側には疎水性アミノ酸、特に Val 残基の連続した配列などが見られ、我々がこれまでに想定していたポア構造が基本的に正しかったことが確認された。一方、ドメイン 1 と 2 はこのポア構造の上で平らなリングを形成しており、ラクツロースは糖結合部位に結合したままであった。このことから、ドメイン 1, 2 もこの膜孔構造を膜表面で安定化する役割を果たしているものと考えられた。このような  $\beta$  バレルによる膜孔構造は細菌由来の溶血性毒素タンパク質と非常に構造が類似しているが、一方では二次構造の変化過程がかなり異なっている面などもあり、新規なポア形成機構として、この一群のタンパク質の活性発現機構の解明に、今後大きな貢献をするものと考えられる。

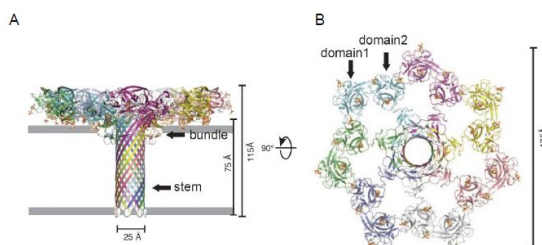


図 3. CEL-III 七量体の構造。A: 側面, B: 下面

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)



- (1) Hideaki Unno, Shuichiro Goda, and Tomomitsu Hatakeyama, Hemolytic lectin CEL-III heptamerizes via a large structural transition from  $\alpha$ -helices to a  $\beta$ -barrel during the transmembrane pore-formation process, *Journal of Biological Chemistry*, 査読有, 289, 2014  
DOI:10.1074/jbc.M113.541896
- (2) 上野幹憲、山西智大、畠山智充、山口健一、小田達也、海洋性棘皮動物グミ由来レクチン CEL-I 刺激によるマウスマクロファージ株細胞 RAW264.7 からの一酸化窒素及び腫瘍壊死因子- 放出に対するリコペンの影響, *日本食品化学学会誌*, 査読有, 20(3), 196-202, 2013
- (3) Tomomitsu Hatakeyama, Tomohiro Ishimine, Tomohiro Baba, Masanari Kimura, Hideaki Unno and Shuichiro Goda, Alteration of the carbohydrate-binding specificity of a C-type lectin CEL-I mutant with an EPN carbohydrate-binding motif, *Protein & Peptide Letters*, 査読有, 20(7), 796-801, 2013  
DOI:10.2174/0929866511320070009
- (4) Keigo Hisamatsu, Tomonao Nagao, Hideaki Unno, Shuichiro Goda, Tomomitsu Hatakeyama, Identification of the amino acid residues involved in the hemolytic activity of the *Cucumaria echinata* lectin CEL-III, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 査読有, 1830, 4211-4217, 2013  
DOI:10.1016/j.bbagen.2013.04.010
- (5) Shuichiro Goda, Hitoshi Sadakata, Hideaki Unno, and Tomomitsu Hatakeyama, Effects of detergents on the oligomeric structures of the hemolytic lectin CEL-III as determined by small-angle X-ray scattering, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 77(3), 679-681, 2013  
DOI:10.1271/bbb.120981
- (6) Hideaki Unno, Keigo Hisamatsu, Tomonao Nagao, Yuki Tateya, Naoki Matsumoto, Shuichiro Goda, and Tomomitsu Hatakeyama, Crystallization and preliminary crystallographic study of oligomers of the haemolytic lectin CEL-III from the sea cucumber *Cucumaria echinata*, *Acta Crystallographica Section F*, 査読有, F69, 416-420, 2013  
DOI:10.1107/S1744309113004065
- (7) Tomomitsu Hatakeyama, Ryota Karino, Yasuaki Terai, Masanari Kimura, Hideaki Unno, and Shuichiro Goda, An assay for carbohydrate-binding activity of lectins using polyamidoamine dendrimer conjugated with carbohydrates, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 76(10), 1999-2001, 2012  
DOI:10.1271/bbb.120520
- 〔学会発表〕(計 27 件)
- (1) 海野英昭, 松山一輝, 辻慶輝, 郷田秀一郎, 畠山智充, マガキ由来マンノース特異的レクチン CGL-1 の結晶構造と糖認識機構, 第 86 回日本生化学会大会, 横浜市, 2013.9.12
- (2) 長尾 知直, 貞方 仁, 海野 英昭, 郷田 秀一郎, 畠山 智充, 溶血性レクチン CEL-III の多量体化における構造変化の解明, 第 37 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 雲仙市, 2013.9.26
- (3) 真崎理沙, 長尾知直, 市瀬彩香, 久松啓伍, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充, 溶血性レクチン CEL-III の膜結合ドメイン内アミノ酸変異体の性質, 第 37 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 雲仙市, 2013.9.26
- (4) 辻慶輝, 松山一輝, 郷田秀一郎, 海野英昭, 畠山智充, マガキ由来マンノース特異的レクチンの精製および機能解析, 第 37 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 雲仙市, 2013.9.26
- (5) 森内 裕美, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山 智充, C 型レクチン CEL-I の糖結合部位アミノ酸置換による特異性変換, 第 37 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 雲仙市, 2013.9.26
- (6) Ayaka Ichise, Tomonao Nagao, Yoshiteru Tsuji, Keigo Hisamatsu, Hideaki Unno, Shuichiro Goda, and Tomomitsu Hatakeyama, Roles of the amino acid residues in domain 3 of the hemolytic lectin CEL-III as examined by site-directed mutagenesis, The 27th Annual Symposium of The Protein Society, Boston, 2013.7.21
- (7) Tomomitsu Hatakeyama, Shuichiro Goda, and Hideaki Unno, Transmembrane pore structure formed by the hemolytic lectin CEL-III heptamer, The 27th Annual Symposium of The Protein Society, Boston, 2013.7.21
- (8) 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充, 溶血性レクチン CEL-III の膜孔形成複合体結晶構造解析, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 鳥取市, 2013.6.12
- (9) 郷田秀一郎, 工藤彰洋, 牛島佑樹, 海野英昭, 畠山智充, サンゴ由来レクチン相同性タンパク質の糖認識機構の解明, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 鳥取市, 2013.6.12
- (10) 畠山智充, 森内裕美, 海野英昭, 郷田秀一郎, 棘皮動物グミ由来 C 型レクチン CEL-I の糖結合部位アミノ酸変異による糖特異性変換, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 鳥取市, 2013.6.12
- (11) 辻慶輝, 松山一輝, 郷田秀一郎, 畠山智充, 海野英昭, マガキ由来マンノース特異的レクチンの精製と構造解析, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 鳥取市,

2013.6.13

- (12) 長尾知直, 貞方仁, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充. 溶血性レクチンの多量体化における構造変化の解明. 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 鳥取市, 2013.6.13
- (13) 市瀬彩香, 長尾知直, 真崎理沙, 久松啓伍, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充. 溶血性レクチン CEL-III の膜結合ドメイン内アミノ酸変異体の性質. 平成 25 年度日本生化学会九州支部例会, 佐賀市, 2013.5.19
- (14) 森内裕美, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充. C 型レクチン CEL-I の糖結合部位変異導入による特異性変換. 平成 25 年度日本生化学会九州支部例会, 佐賀市, 2013.5.19
- (15) 辻慶輝, 松山一輝, 郷田秀一郎, 海野英昭, 畠山智充. マガキ由来マンノース特異的レクチンの精製および構造解析. 平成 25 年度日本生化学会九州支部例会, 佐賀市, 2013.5.19
- (16) 畠山智充, 郷田秀一郎, 海野英昭. 棘皮動物グミ由来溶血性レクチン CEL-III の細胞膜貫通オリゴマー構造. 日本農芸化学会 2013 年度大会, 仙台市, 2013.3.25
- (17) 辻慶輝, 松山一輝, 郷田秀一郎, 海野英昭, 畠山智充. マガキ由来マンノース特異的レクチンの精製と性質. 日本農芸化学会 2013 年度大会, 仙台市, 2013.3.25
- (18) 加藤裕太, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充. C 型レクチンファミリータンパク質マウス RegIV の大腸菌による発現とその性質. 日本農芸化学会 2013 年度大会, 仙台市, 2013.3.25
- (19) 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充. 溶血性レクチン CEL-III オリゴマーの結晶構造解析. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡市, 2012.12.16
- (20) 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充. 溶血性レクチン CEL-III の膜孔形成複合体結晶構造解析. 第 36 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 宮崎市, 2012.9.6
- (21) 辻慶輝, 馬場智大, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充. C 型レクチン CEL-I の糖結合部位アミノ酸の変異による糖特異性の変化. 第 36 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 宮崎市, 2012.9.6
- (22) 小松紗世, 海野英昭, 郷田秀一郎, 沖野望, 伊東 信, 畠山智充. 糖付加デンドリマーを用いたイトマキヒトレクチン及びその変異体の糖結合活性測定. 平成 24 年度日本農芸化学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会, 鹿児島市, 2012.9.29
- (23) 太田りつえ, 狩野良太, 中山大路, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充. ポリアミドアミンデンドリマーを用いたレクチン-糖質間相互作用測定. 平成 24 年度日

本農芸化学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会, 鹿児島市, 2012.9.29

- (24) 畠山智充, 小松紗世, 小笠原未紗, 馬場智大, 狩野良太, 海野英昭, 郷田秀一郎, 沖野望, 伊東 信 (長崎大院・工・物質科学, 1 九大院・農・生命機能). イトマキヒトレクチンおよびその変異体の糖結合活性測定. 日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都市, 2012.3.24
- (25) 本多麻美, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充. 糖結合部位に変異を導入した C 型レクチン CEL-IV の糖結合特異性と立体構造の解明. 平成 23 年度日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会, 宮崎市, 2011.9.17
- (26) 馬場智大, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充. C 型レクチン CEL-I の糖結合部位アミノ酸置換による結合特異性の変化. 平成 23 年度日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会, 宮崎市, 2011.9.17
- (27) 狩野良太, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充. 糖鎖付加デンドリマーを用いたレクチン活性測定法の開発. 平成 23 年度日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会, 宮崎市, 2011.9.17

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 畠山智充, 機能性糖質素材の開発と食品への応用 II 第 4 章 6 レクチンによる糖鎖認識 (井上國世 監修), 252-260, (株)シーエムシー出版, 2013

〔その他〕

ホームページ等

<http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/>

<http://www.ch.nagasaki-u.ac.jp/bio/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

畠山 智充 (HATAKEYAMA TOMOMITSU)

長崎大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 50228467

### (2) 研究分担者

海野 英昭 (UNNO HIDEAKI)

長崎大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 10452872