

平成 22 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19380122
 研究課題名（和文） 高マンノース型糖鎖特異的海藻レクチンライブラリの構築とその生物活性に関する研究
 研究課題名（英文） Library construction and biological activities of high mannose N-glycan-specific algal lectins

研究代表者
 堀 貫治（HORI KANJI）
 広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授
 研究者番号：50116662

研究成果の概要（和文）：高マンノース型糖鎖特異的藻類レクチン（タイプⅠ～Ⅲ）について、各タイプに属するレクチンの cDNA クローニングおよび活性組換え体（タイプⅡを除く）の調製に成功した。加えて、食用養殖種の 3 種紅藻からタイプⅠに属するレクチンを新たに見出した。タイプ別に抗 HIV 活性および培養癌細胞に対する増殖抑制能を明らかにし、これらレクチンは高マンノース型糖鎖混合物の簡易分別に有用であることを認めた。

研究成果の概要（英文）：We succeeded in the cDNA cloning and preparations of active recombinants of high mannose N-glycan-specific algal lectins that can be grouped into three types (Type I-III) based on the recognition moiety within the branched oligomannosides of the N-glycans. Furthermore, we newly isolated and characterized the lectins, which belong to type I, from the three cultivated species of edible seaweeds. We found that the type I-III lectins had the anti-HIV activity and inhibitory activity against the growth of the cultured cells which are derived from human colonic cancer. These lectins were also useful to separate easily the high mannose N-glycans to each other from their mixture.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：レクチン 藻類 高マンノース型糖鎖 生物活性

1. 研究開始当初の背景

海藻レクチンの多くは他生物由来のもの

とは異なる新規の糖結合特異性と一次構造を有することで、新しいレクチン群を形成す

る。特に、その糖結合特異性はユニークで、45 種類の糖鎖を対象とした詳細な結合性試験から、高マンノース型糖鎖特異的なもの、複合型糖鎖特異的なもの、両糖鎖に結合するもの、シアリルルイス X 型糖鎖特異的なもの、フォルスマン抗原糖鎖特異的なもの、複合型コア α (1, 6) フコース特異的なものなどが見出されている。単糖類に結合しない海藻レクチンの特定の糖鎖構造に対する厳密で選択性の高い糖鎖認識能ならびに高い結合定数 (nM レベル) は、他生物由来の既知レクチンにはみられないことから、その生物活性の新規性にも期待がもたれる。このように、海藻レクチンは「レクチンの構造と機能」に関する基礎学ならびに応用の両面から興味深い研究対象である。

この中で、高マンノース型糖鎖特異的レクチンに属するものは、高マンノース型糖鎖中の認識部位および N 末端アミノ酸配列に基づいて、以下の 3 つのタイプに細分類される。タイプ I は高マンノース型糖鎖中、D2 アームの非還元末端に α (1, 2) マンノースが付加されたものに対しては結合活性が著しく減少するもので、紅藻ミリン科 (*Eucheumaserra*、*E. amakusaensis*、*E. cottonii*(=*Kappaphycusalvarezii*、*Solieriarobusta*)、オゴノリ科 (*Gracilaria bursa-pastoris*) および淡水産藍藻 *Oscillatoriaagardhii* の各レクチンが属する。このうち、*E. serra* (ESA-2, 268 残基)、*E. amakusensis* (EAA-2, 268 残基) および藍藻 *O. agardhii* (OAA, 132 残基) の各レクチンについては全一次構造を明らかにし、互いに極めて高い配列相同性を示すこと、いずれも 67 アミノ酸で構成される相同ドメインのタンデムリピート構造からなる単量体タンパク質で、一分子当たりのリピート数と糖鎖結合部位数が一致する。ESA-2 はタンデムに配置した 2 つの相同な β -バレル構造からなる特異なドメインスワッピング構造を有し、糖鎖結合部位は各バレルの上下の底 (相同なループ部分) に計 4 箇所存在することが推定されるが、レクチン・糖鎖複合体の構造解析には至っていない。ESA-2 は細胞凝集、リンパ球分裂促進、ヒアルロン酸生合成の促進、ヒト癌由来培養細胞 37 系列すべてに対する増

殖抑制作用の他に、飲料として経口投与されたマウスの大腸癌発現を著しく抑制することから健康食品素材としての活用も期待されている。また、藍藻レクチン OAA は強い抗 HIV (宿主感染に機能する高マンノース型糖鎖を表面にもつヒト免疫不全ウイルス) 活性を有し、医薬素材としての利用に期待がもたれるが、その作用機構の解明には至っていない。

タイプ II は高マンノース型糖鎖中、非還元末端に α (1, 2) マンノースが付加されたものとは結合しないもので、緑藻アオモグサ *Boodleacoacta* レクチン (BCA) が相当する。本レクチンの一次構造は不明で、その生物活性とともに分子構造の解明が今後の課題となっている。

タイプ III は、単糖 (マンノース) およびオリゴマンノースにも結合するもので、緑藻ハネモ属 3 種、*Bryopsisplumose* (BPL-17)、*B. maxima* (BML-17) および *B. corticulans* (BCL-17) の各 17kDa レクチンが相当する。前 2 者の cDNA クローニングから演繹したアミノ酸配列は互いに共通しており、これらは新規タンパク質であることを認めた。BML-17 については、狂牛病等の原因タンパク質である悪性プリオンの高感度検出試薬として有望視されているニワトリモノクローナル抗体の簡易精製のためのアフィニティー精製用リガンドとしてきわめて有用であることが認められており、現在リコンビナント BML-17 の大量発現系の構築が待たれている。

これら海藻から見出した高マンノース型糖鎖特異的レクチンは新規で選択性の高い糖鎖プローブとしての有用性だけでなく、健康食品素材や医薬素材としての活用も期待されることから、本レクチングループの供給源の確保ならびに糖鎖認識と生物活性の分子基盤の解明が興味深い課題となっている。

2. 研究の目的

上記背景下、本研究では以下の項目を目的とした。

(1) 高マンノース型糖鎖特異的藻類レクチンライブラリの構築

①タイプ I、II および III に属する各レクチンの一次構造を解析し、認識部位の相違と分子構造の関連性を一次構造レベルで把握する。そのために一次構造未解析の BCA の同構造を明らかにする。加えて、有用な生物活性が認められているタイプ I については、食用養殖種を対象にさらに同タイプレクチンを検索し、タイプ I レクチンの新たな供給源を探る。

②タイプ I、II および III に属する各レクチンの糖鎖認識と生物活性の分子基盤を解明するために、OAA (タイプ I)、BCA (タイプ II) および BPL-17 (タイプ III) の各組換え体の大量調製法を構築し、分子構造解析に資する。

(2) 高マンノース型糖鎖特異的藻類レクチンの生物活性

①タイプ I、II、III に属する各レクチンの抗 HIV 活性とその作用機構を検討し、抗 HIV 薬としての可能性を探索する。

②タイプ I、II、III に属する各レクチンのヒト大腸癌由来培養細胞に対する増殖抑制能を測定・比較する。同抑制効果が認められた場合、同抑制が糖鎖結合を介した作用であるか検討を加える。

③タイプ I、II、III に属する各レクチンを用いて高マンノース型糖鎖混合物の簡易分別法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 高マンノース型糖鎖特異的藻類レクチンライブラリの構築

①タイプ I、II および III に属する各レクチンの一次構造解析と新規レクチン探索

一次構造はレクチンタンパク質の cDNA クローニングにより演繹した。すなわち、採取後 RNAlater 中で保存していた藻体を対象に、RNA 抽出、mRNA 精製および逆転写に供した。得られた 1st strand cDNA を鋳型に、レクチンタンパク質の部分アミノ酸配列を基に設計した縮重プライマーを用いて、5' および 3' RACE 法に供した。

新規レクチン探索については、食用養殖種を対象に、抽出液のレクチン活性を検索し、活性種については種々クロマトグラフィー

を用いてレクチンを単離し、その糖結合特異性を含む生化学的性状を調べた。また、レクチン抗体を用いて、養殖藻体中のレクチン含量を ELISA 法で測定するとともに、環境因子を測定して、藻体内レクチン含量の季節変化および環境因子との関連性を調べた。

②組換えレクチンの大量調製法の構築

レクチン遺伝子を pET28a(+) に挿入し、*E. coli* BL21 (DE3) に 6xHis/Factor Xa 融合タンパク質として誘導、発現させた。同融合タンパク質を培養菌体の破砕物から可溶性画分または封入体として回収し、後者の場合は変性剤で可溶化後、ニッケルキレートカラムを用いて精製した。変性剤で可溶化後の精製物については種々のリフォールディング条件に付し、活性融合タンパク質を得た。融合タンパク質を Factor Xa 処理後、逆相系 HPLC に供し、組換え体を精製した。融合タンパク質および精製組換え体について、赤血球凝集活性および糖鎖結合性を含む諸性状を調べた。

(2) 高マンノース型糖鎖藻類レクチンの生物活性

① タイプ I、II および III の各レクチンの抗 HIV 活性は MT-4 細胞を用いて、MTT 法により測定した (依頼分析)。

② タイプ I および II に属するレクチンのヒト大腸癌由来培養細胞 HT-29 に対する増殖抑制能を WST-8 アッセイ法を用いて測定した。また同抑制能を、レクチン活性を阻害する糖タンパク質および阻害しない糖タンパク質の各種濃度下で測定し、同抑制能がレクチン-糖鎖間相互作用を介したものであるか検討した。

③ 高マンノース型糖鎖混合物の簡易分別法を確立するために、タイプ I、II および III の各レクチンについて、2 種類の高マンノース型糖鎖、M9 (非還元末端に $\alpha(1,2)\text{Man}$ を含む) および M5 (非還元末端に $\alpha(1,2)\text{Man}$ を含まない) に対する結合性、ならびに高マンノース型糖鎖 10 種類の混合物に対する結合性を、遠心限外ろ過-HPLC 法を用いて精査した。

4. 研究成果

(1) 高マンノース型糖鎖特異的藻類レクチンライブラリの構築

①タイプ I、II および III に属する各レクチンの一次構造解析と新規レクチン探索

タイプ I に属するものとして、紅藻の食用養殖種 *E. cottonii* (= *K. alvarezii*) レクチン (ECA) について、配列が異なる 2 種イソレクチン、ECA-1 および ECA-2 をそれぞれコードする cDNA クローンを単離し、全長塩基配列を決定した。ECA-1 および ECA-2 の cDNA は 5' および 3' 非翻訳領域 (UTR) における配列類似性はほとんど認められなかったが、翻訳領域 (ORF) の塩基配列および演繹アミノ酸配列の同一率はそれぞれ 95.3 および 98.5% であった。また、ECA-1 および ECA-2 は ESA-2 とそれぞれ 98.1 および 98.9% のアミノ酸配列の同一率を示した。

また、藍藻 *Oscillatoria agardhii* のレクチン (OAA) については、同藍藻のゲノム DNA を鋳型として、新たに OAA 遺伝子を単離し、402bp の翻訳領域からなる塩基配列を決定した。この塩基配列から演繹したアミノ酸配列は、先にタンパク質化学的に決定した配列戸比較して、C 末端の 2 アミノ酸の配列順序のみが異なっていた (TLT/TTL)。レクチンタンパク質から解析した C 末端配列はカルボキシペプチダーゼ Y による酵素消化で経時的に遊離するアミノ酸の定量結果から求めたので、解析ミスしていた可能性が示唆される。

タイプ II に属する *Boodlea coacta* レクチンについては、2 種イソレクチン、BCA-1 および BCA-2 の全長塩基配列も決定した。両 BCA の演繹アミノ酸配列につき各種データベースによる相同性検索に供した結果、相同性を示すタンパク質は認められず、新規タンパク質であることが明らかとなった。興味深いことに、部分アミノ酸配列と塩基配列の比較により、標準遺伝コードで終止コドンに指定する TAA および TAG が、BCA では Gln 残基をコードすることが明らかとなり、これは絨毛虫または緑藻カサノリ科の遺伝コードと一致した。演繹アミノ酸配列を解析したところ、BCA-1 および BCA-2 はそれぞれシグナルペプチド 19 残基および成熟タンパク質 161 およ

び 162 残基からなり、後者は共通して Arg 残基を全く含有しておらず、また約 42 残基の相同配列 (同一率 45%) が 3 回繰り返した構造を有していた。BCA-1 と BCA-2 の成熟タンパク質の塩基配列およびアミノ酸配列の同一率はそれぞれ 89.4 および 87.3% であった。

タイプ III については、*Bryopsis plumosa* の 17kDa レクチンタンパク質 (BPA-17) を新たに単離するとともに、その全長塩基配列を決定した。BPA-17 はシグナルペプチド 40 残基および成熟タンパク質 168 残基からなり、後者は 6 個の Cys 残基を含み、リピート構造を有していなかった。B. maxima の 17kDa レクチン (BML-17) とは 3 カ所のアミノ産置換が見られるのみであった。

以上、タイプ I、II および III の各レクチンのアミノ酸配列は互いに明らかに異なっており、一次構造の違いは認識部位の違いに反映されていることを確認できた。

加えて本研究で、高マンノース型糖鎖特異的レクチンとしてタイプ I に属するものを、新たに食用養殖種 3 種に見出した。また、ベトナム産養殖種 *E. cottonii* (= *K. alvarezii*) については、藻体内のレクチン含有量は季節変化を示し、低海水温シーズンで高く、溶存態窒素量が高いとレクチン生産量が高いことを認めた。なお、同藻体の 3 種類の異なる色素系統間において、レクチン性状は同じであるが、含量に多少の差異があることを認めた。

②組換えレクチンの大量調製法の構築

タイプ I に属する OAA については、大腸菌発現系で活性組換え体を可溶画分として得、融合タンパクとして高収量で精製することに成功した (42 mg/L 培養液)。同融合タンパク質および酵素処理後の HPLC 精製 rOAA (14.8 mg/L 培養液) は野生型と全く同じ糖鎖結合特異性を示すことを確認した。本組換え体は立体構造解析や詳細な生物活性測定に資することが可能である。

タイプ III に属する BPL-17 については、大腸菌発現系で封入体として回収された。可溶化後のキレートカラムによる精製のあと、種々条件下のリフォールディング実験に供し、最終的に比較的高収量で活性融合タンパ

ク質 (14 mg/L 培養液) を得、酵素処理後の HPLC 精製 rBPL-17 (3.5 mg/L 培養液) は野生型と全く同じ糖結合特異性を示すことを確認した。本組換え体は種々の応用に資することが可能である。

タイプ II に属する *B. coacta* レクチン (BCA) の組換え体は時間的余裕がなく、試みるができなかった。

(2) 高マンノース型糖鎖特異的藻類レクチンの生物活性

① タイプ I、II および III に属する各レクチンの抗 HIV 活性

タイプ I に属する OAA については、すでに強い抗 HIV 活性を認めているが、新たにタイプ II の BCA およびタイプ III の BML-17 も同様の強い抗 HIV 活性を有することを認めた。IC₅₀ 値から、BML-17、BCA、OAA の順で高い傾向が見られた。

② ヒト大腸癌由来培養細胞 HT-29 に対する増殖抑制活性

タイプ I (ECA-2 および rOAA) および II (BCA) とともに標記活性を有することを認めた。IC₅₀ 値を両タイプ間で比較し、タイプ II の方が約 5 倍程度強いことを認めた。3 種類の糖タンパク質存在下で同活性を測定し、高マンノース型糖鎖含有糖タンパク質の存在下でのみ阻害活性が低下すること、同糖タンパク質の濃度依存的にその程度が高くなることを認めた。この結果から、これらレクチンによる培養癌細胞の増殖抑制は癌細胞表面の糖鎖受容体との結合を介していることが強く示唆された。

③ 高マンノース型糖鎖混合物の簡易分別法の確立

タイプ I (ESA-2、ECA-2 および rOAA)、タイプ II (BCA) およびタイプ III (BCL-17) の 5 種レクチンを用いて、まず 2 種類の高マンノース型糖鎖 (M9、非還元末端に $\alpha(1, 2)$ Man を含む; M5、非還元末端に $\alpha(1, 2)$ Man を含まない) に対する結合性を定量的に調べた。その結果は、3 タイプレクチンの認識部位に関する従来の結果と一致し、タイプ I は M5 により強く、タイプ II は M9 のみと、タイプ III

は両糖鎖と結合した。タイプ I の中では rOAA は M5 のみと結合したが、ESA-2 と ECA-2 は高濃度では M9 とも多少結合した。そこで、3 種レクチン (rOAA、BCA および BCL-17) について、高マンノース型糖鎖 10 種類の混合物との結合性を遠心限外ろ過法で調べ、rOAA (タイプ I) と BCA (タイプ II) を用いることにより、同糖鎖混合物を非還元末端 $\alpha(1, 2)$ Man 残基の有無 (特に D2 アーム上の) により分別できることを認めた。高マンノース型糖鎖は医薬あるいはサプリメントとして将来有用なケミカルになることが予想されており、産業スケールでの同糖鎖間の簡易分別法が必要とされている。この分野での上記藻類レクチンの利用が期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

① Hung Dinh Le, Tomomi Sato, Hiromi Shibata, and Kanji Hori: Biochemical comparison of lectins among three different colorstrains of the red alga *Kappaphycus alvarezii*. *Fish Sci.*, 75, 723–730 (2009) 査読有

② Tomomi Sato and Kanji Hori: Cloning, expression, and characterization of a novel anti-HIV lectin from the cultured cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. *Fish Sci.*, 75, 743–753 (2009) 査読有

③ Hung Le Dinh, Kanji Hori, and Nang Huynh Quang: Screening and preliminary characterization of hemagglutinins in Vietnamese marine algae. *J Appl Phycol*, 21, 89–97 (2009) 査読有

④ Le Dinh Hung, Kanji Hori, Huynh Quang Nang, Tran Kha, and Le Thi Hoa: Seasonal changes in growth rate, carrageenan yield and lectin content in the red alga *Kappaphycus alvarezii* cultivated in Camranh Bay, Vietnam. *J Appl Phycol*, 21, 265–272 (2009) 査読有

⑤ Yuichiro Sato, Satomi Okuyama, and Kanji Hori: Primary structure and carbohydrate binding specificity of a potent anti-HIV

lectin isolated from the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *J. Biol. Chem.* 282 (15), 11021-11029 (2007) 査読有

⑥ Kanji Hori, Yuichiro Sato, Kaori Ito, Yoshifumi Fujiwara, Yasumasa Iwamoto, Yasuyuki Makino, and Akihiro Kawakubo : Strict specificity for high-mannose type N-glycans and primary structure of a red alga *Eucheumaserralectin*. *Glycobiology* 17 (5), 479-491 (2007) 査読有

⑦ 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) (総説) 査読有

[学会発表] (計6件)

① Hiromi Sibata, Kenji Egawa, and Kanji Hori: Isolation and characterization of a high mannose-type N-glycan specific lectin from the red alga *Gracilariatikhahiae*, 5th World Fisheries Congress (Yokohama, Japan), October 23・24, 2008.

② Tomomi Sato and Kanji Hori: Expression and refolding of the recombinant lectin from the green alga *Bryopsis plumose*, 5th World Fisheries Congress (Yokohama, Japan), October 23・24, 2008.

③ Hung Le Dinh, Kanji Hori, Nang Huynh Quang, and Kha Tran: Seasonal changes of growth rate and lectin contents in the red alga, *Kappaphycus alvarezii* cultivated in Camranh Bay, Vietnam, 5th World Fisheries Congress (Yokohama, Japan), October 23・24, 2008.

④ Tomomi Sato and Kanji Hori: Cloning, Expression and characterization of a novel anti-HIV lectin, OAA from the Cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*: 23th International Lectin Meeting (Edinburgh & Stirling, UK), July 14, 2008

⑤ 柴田 ひろみ・江川 兼史・堀 貫治 :

食用紅藻 *Gracilariatikhahiae* のレクチンの精製と性状. 2009年度日本水産学会春季大会 (東京) 2008年3月30日

⑥ 佐藤智美・佐々木ふみ・堀 貫治 : 藍藻 *Oscillatoria agardhii* 由来抗HIVレクチンの遺伝子クローニング. 2009年度日本水産学会春季大会 (東京) 2008年3月30日

[産業財産権]

○取得状況 (計 0件)

○取得状況 (計 1件)

名称: 新規ポリペプチドおよびそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、並びにそれらの利用

発明者: 堀 貫治・松田 治男

権利者: 広島大学

種類: 特許

番号: 1860184号および10-0939073号

取得年月日: 2010年1月20日

国内外の別: 国外 (EP: スイス・リヒテンシュタインおよび韓国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 貫治 (HORI KANJI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号: 50116662

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし