

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：22701
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010(Apr)～2013(Mar)
 課題番号：22580226
 研究課題名（和文）海洋無脊椎動物 α -ガラクトシド結合レクチンの糖鎖依存細胞増殖制御因子としての評価
 研究課題名（英文）Novel cell signaling by different Gb3-binding marine lectins.
 研究代表者
 大関 泰裕 (OZEKI Yasuhiro)
 横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科・教授
 研究者番号：70275022

研究成果の概要（和文）：従来知られていなかった全く新規な一次構造を持つ α -ガラクトシド結合性レクチン MytiLec のアミノ酸配列を決定し、グロボトリオース(Gb3)糖脂質糖鎖結合性、Gb3 発現 Raji 細胞に対する増殖抑制を見出した。SUEL/ラムノース結合レクチンファミリーで Gb3 に結合したナマズ卵 SAL レクチンは同細胞の増殖に影響せず、多剤耐性トランスポーター遺伝子の発現を抑制した。両結果を総合すると、同一糖鎖に結合するレクチンでも、その結合力や価数の違いから、異なるシグナルを細胞内に伝達することが判明した。細胞増殖の調節に応じて適切なレクチンを投与することで、細胞研究における機能制御が可能と示唆された。

研究成果の概要（英文）： A 17kDa α -galactoside-binding lectin, MytiLec purified from the Mediterranean mussel was found to have a novel triple-tandem repeat structure. It recognized globotriose (Gb3) and appeared strong cell static activity against Gb3 expressing lymphoma Raji cells. Another α -galactoside-binding lectin, SAL, a member of SUEL/rhamnose-binding lectin family isolated from catfish egg did not influence the growth of Raji cells, though it down-regulated the expression levels of the multidrug-resistant transporter gene. Combining these results, it became clear that even lectins having same oligosaccharide binding specificity, can transmit different signals to cells according to the variations of their multivalency and dissociation constants. This new finding will be useful to study the cellular functions of these lectins to regulate cell proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：糖鎖生物学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：レクチン・MytiLec・一次構造・グロボトリオース・ABC トランスポーター・SUEL/ラムノース結合レクチンファミリー

1. 研究開始当初の背景

動物レクチンファミリーの SUEL/ラムノース結合レクチンは、1991 年、研究代表者がムラサキウニ卵 D-ガラクトシド結合レクチン (SUEL) の一次構造を報告以後、2012 年までに、魚卵レクチンなど 1,000 以上の構造ホモログが報告された。これを含め海洋動物由来のガラクトース結合レクチンの糖鎖認識を解析すると、 α -ガラクトシドを認識する分子が多く見つかり、その一次構造と糖鎖結合プロファイルの多様性が示唆された。

2. 研究の目的

海洋動物由来から精製したガラクトース結合レクチンの一次構造、糖鎖結合、高等動物細胞に対する増殖制御メカニズムを解析し、生命科学の研究発展の貢献に資する糖鎖関連分子としての特性を明らかにする。

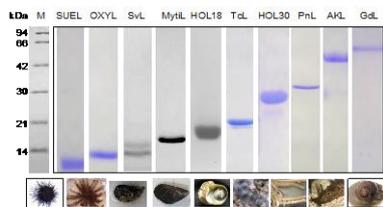
3. 研究の方法

種々の海洋動物からガラクトース結合レクチンをアフィニティークロマトグラフィにより精製する。得られたレクチンの糖鎖結合をフロントアルアフィニティークロマトグラフィ法でプロファイル化する。その一次構造を質量分析とエドマン分解により決定し、動物レクチンの新しい構造ファミリーを見出す。

結合プロファイルから判明した糖鎖を有す培養細胞に各レクチンを加え、増殖変化を測定する。レクチンを加えたことによる細胞内で起きた情報伝達分子の活性化や抑制を抗体や定量的 PCR 法で解析する。

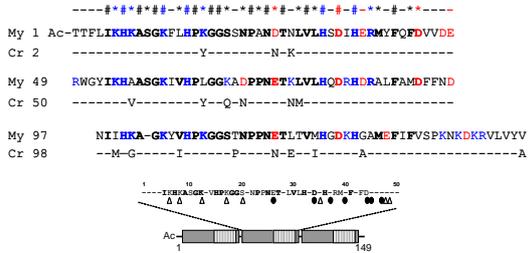
4. 研究成果

1) 海洋無脊椎動物ガラクトース結合レクチンの多様な糖鎖結合性とモデル海洋動物の糖鎖生物学：相模湾と東京湾から採取した海洋無脊椎動物からカイメン動物、軟体動物、環形動物、棘皮動物より分子量 11.6~67 kDa の 10 種類のガラクトース結合性レクチンが得られ、多様な糖鎖結合プロファイルが示された (論文 5, 6, 8, 11, 13)。文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトから提供されたニッポンウミシダ (棘皮動物) に 2 型ラクトサミンを認識する 14kDa レクチンが発見され、モデル動物を用いた糖鎖生物学の研究を可能にした (論文 8)

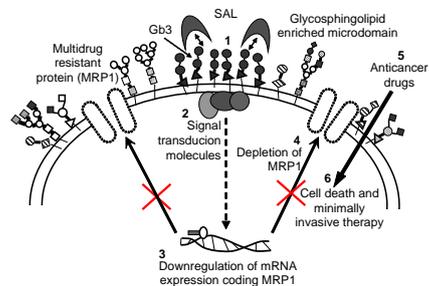


2) 新規なガラクトース結合レクチン MytiLec

の一次構造と直接的細胞死：ムラサキイガイ (二枚貝) からガラクトース結合レクチン MytiLec を得て、従来のタンパク質に無い新規な一次構造が見出された。グロボトリオース Gb3 の特異的な認識が判明し、本糖鎖を発現する Raji リンパ腫細胞を後期アポトーシス反応により殺傷した (論文 13)。



3) SULE/ラムノース結合レクチンによる遺伝子発現制御と低濃度抗癌剤による間接的細胞死：同ファミリーに属しナマズ卵から得た Gb3 結合レクチン SAL は MytiLec と異なり Raji 細胞を殺傷せず、代わりに抗癌剤ビンクリスチンの感受性を著しく高めた。ABC トランスポーター MRP1 タンパクの発現量を調べると、SAL レクチンと-Gb3 糖鎖の結合は多剤耐性トランスポーター遺伝子の発現を抑制し、その結果取り込まれたビンクリスチンが排出されず抗癌作用に働くことが証明された (論文 10)。



4) 糖鎖関連分子の研究発展に役立つ基盤技術の開発：現行のクマシーブリリアントブルー R250 を用いる染色法に比べ 100 倍高感度な迅速なタンパク質染色法の開発に成功し、企業を通じて商品化された (論文 1,2)。レクチン遺伝子を組み換えた大腸菌を従来より容易に大量培養する新たな技術を開発した (論文 14)。

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 16 件)

1) Yasumitsu H, Ozeki Y, Kawsar SMA, Toda T, Kanaly RA. CGP stain: An inexpensive, odorless, rapid, sensitive, and in principle in vitro

methylation-free Coomassie Brilliant Blue stain. Anal. Biochem. 406, 86-88 (2010)
DOI: 10.1016/j.ab.2010.06.035

2) Yasumitsu H, Ozeki Y, Kawsar SMA, Fujii Y, Sakagami M, Matsuo Y, Toda T, Katsuno H. RAMA stain: A fast, sensitive and less protein modifying CBB R250 stain. Electrophoresis 31, 1913-1917 (2010) DOI : 10.1002/elps.200900524

3) Katsuno H, Shirakawa R, Miyazaki K, Ozeki Y, Yasumitsu H. Production of Active MMP7 in *E. coli* and its application for metalloproteinase inhibitors screening. Protein Pept. Lett. 17, 568-572 (2010)
DOI:
<http://dx.doi.org/10.2174/092986610791112648>

4) Kawsar SMA, Mamun SMA, Rahman MS, Yasumitsu H, Ozeki Y. Inhibitory effects of RCG1, a β -galactoside-binding lectin from *Rana catesbeiana* (American bullfrog) oocytes against human and phytopathogens. Canadian J. Pure Appl. Sci. 4, 1141-1149 (2010)
ISSN: 1715-9997

5) Kawsar SMA, Matsumoto R, Fujii Y, Matsuo H, Masuda N, Chihiro I, Yasumitsu H, Kanaly RA, Sugawara S, Hosono M, Nitta K, Ishizaki N, Dogasaki C, Hamako J, Matsui T, Ozeki Y. Cytotoxicity and glycanbinding profile of a D-galactose-binding lectin from the eggs of a Japanese sea hare (*Aplysia kurodai*). Protein J. 30, 509-519. (2011)
DOI 10.1007/s10930-011-9356-7

6) Fujii Y, Matsumoto R, Kawsar SMA, Yasumitsu H, Ishizuka N, Dogasaki C, Hosono M, Nitta K, Hamako J, Matsui T, Ozeki Y. D-galactoside-binding lectin purified from coronate moon turban, *Turbo (Lunella) coreensis* with a unique amino acid sequence and the ability to recognize lacto-series glycosphingolipids. Comp Biochem. Physiol. B Mol. Biol. 158, 30-37 (2011) DOI:10.1016/j.cbpb.2010.09.002

7) Yasumitsu H, Mochida K, Yasuda C, Isobe M, Kawsar SMA, Fujii Y, Matsumoto R, Kanaly RA, Ozeki Y. Antiproliferative effects of galectin-1 from *Rana catesbeiana* eggs on human leukemia cells and its binding proteins in human cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 47 (10) 728-734. (2011)
DOI: 10.1007/s11626-011-9462-z

8) Matsumoto R, Shibata FT, Kohtsuka H, Sekifujii M, Sugii N, Nakajima H, Kojima N, Fujii Y, Kawsar SMA, Yasumitsu H, Ozeki Y. Glycomics of a novel type-2 N-acetyllactosamine-specific lectin purified

from the feather star (*Oxycomantus japonicus*) Pelmatozoa (class Crinoidea). Comp. Biochem. Physiol. B Mol. Biol. 158, 266-273 (2011)
DOI:10.1016/j.cbpb.2010.12.004

9) Kawsar SMA, Aftabuddin S, Mostafa G, Yasumitsu H, Ozeki Y. Toxicity assessment of a β -galactoside-binding lectin (galectin-1) from bullfrog *Rana catesbeiana* unfertilized eggs. Acta Pharma. Sci. 53, 107-115 (2011) ISSN: 13072080

10) Fujii Y, Sugawara S, Araki D, Kawano T, Tatsuta T, Takahashi K, Kawsar SMA, Matsumoto R, Kanaly RA, Yasumitsu H, Ozeki Y, Hosono M, Miyagi T, Hakomori S-I, Takayanagi Y, Nitta K. MRP1 expressed on Burkitt's lymphoma cells was depleted by catfish egg lectin through Gb3-glycosphingolipid and enhanced cytotoxic effect of drugs. Protein J. 31, 15-26 (2012)
DOI:10.1007/s10930-011-9369-2

11) Matsumoto R, Fujii Y, Kawsar SMA, Kanaly RA, Yasumitsu H, Koide Y, Hasan I, Ogawa Y, Im CH, Sugawara S, Hosono M, Nitta K, Hamako J, Matsui T, Ozeki Y. Cytotoxic and glycan-binding properties of an 18 kDa lectin isolated from the marine sponge *Halichondria okadai*. Toxins 4, 323-338 (2012) DOI:10.3390/toxins4050323

12) Yamamoto-Suzuki Y, Sakurai Y, Fujimura Y, Matsumoto M, Hamako J, Kokubo T, Kitagawa H, Kawsar SMA, Fujii Y, Ozeki Y, Matsushita F, Matsui T. Identification and recombinant analysis of botrocetin-2, a snake venom cofactor for von Willebrand factor-induced platelet agglutination. Biochemistry 51, 5329-5338 (2012)
DOI: 10.1021/bi300442c

13) Fujii Y, Dohmae N, Kawsar SMA, Matsumoto R, Hasan I, Koide Y, Kanaly RA, Yasumitsu H, Ogawa Y, Sugawara S, Hosono M, Nitta K, Hamako J, Matsui T, Ozeki Y. A lectin from the mussel *Mytilus galloprovincialis* has a highly novel primary structure and induces glycan-mediated cytotoxicity of globotriaosylceramide-expressing lymphoma cells. J. Biol. Chem. 287, 44772-44783 (2012) DOI:10.1074/jbc.M112.418012

14) Yasumitsu H, Tajima H, Isobe M, Kutsna S, Kawsar SMA, Fujii Y, Kanaly RA, Ozeki Y, Yokota E. Fine bubble mixing (FBM) culture of *E. coli*: a highly cost-effective middle scale-size culture system. Protein Pept. Lett. 20, 213-217 (2013)
DOI: 10.2174/0929866511320020014

15) Hosono M, Sugawara S, Tatsuta T, Hikita T, Kominami J, Nakamura-Tsuruta S, Hirabayashi J,

Kawsar SMA, Ozeki Y, Hakomori-S-I, Nitta K. Domain composition of rhamnose-binding lectin from shishamo smelt eggs and its a carbohydrate-binding profile. Fish Physiol Biochem. (2013)

DOI: 10.1007/s10695-013-9814-6

16) Kunihiro M, Ozeki Y, Nogi Y, Hamamura N, Kanaly RA. Benz[a]anthracene biotransformation and production of ring fission products by *Sphingobium* sp. strain KK22. Appl Environ Microbiol. DOI: 10.1128/AEM.01129-13

〔学会発表〕 (計 3 件)

1) Matsumoto R, Kawsar SMA, Fujii Y, Hasan I, Ozeki Y. Glycomics study on marine invertebrate lectins to find the cell regulative activity. 9th International Marine Biotechnology Conference 8-12 October 2010 口頭発表、第9回国際マリンバイオテクノロジー学会 中国、青島市、2010年10月8-12日

2) Matsumoto R, Shibata FT, Kawsar SMA, Fujii Y, Yasumitsu H, Ozeki Y. Hyper-diversification glycan-recognizing patterns and cell regulative activities of galactophilic lectins from marine invertebrates. 24th International Lectin Conference 27-29 July 2011 Brisbane Australia 第24回国際レクチン学会 豪州ブリスベン市2011年7月27-29日

3) Fujii Y, Sugawara, S., Nitta, K, Hosono M, Tatsuta T, Ogawa Y, Kawsar SMA, Matsumoto R, Koide Y, Hasan I, Hakomori S-I, Ozeki Y. Depletion of multidrug transporter protein on cancer cells caused by lectin-glycosphingolipid interaction enhanced the chemotherapeutic effects. 第26回国際糖質学会 (26th International Carbohydrate Symposium) スペイン共和国マドリッド市、2012年7月22-27日 <http://ics2012madrid.com/>

〔図書〕 (計 2 件)

1) Se-Kwon Kim 編 "Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications" (2013) Wiley-Blackwell (Thomson Oxford, UK) 出版 Chapter 8 "Activity of Diversified Marine Invertebrate Lectins to Regulate Cell Function" Ozeki Y, Kawsar SMA, Fujii Y, Ogawa Y, Sugawara S, Hasan I, Koide Y, Yasumitsu H, Kanaly RA. pp.167-184 ISBN:978-1-1183-7506-8

2) Close Up 実験法 Series222 CGP 染色:無臭・安価で迅速な高感度 SDS ゲル染色法 実験医学 30 巻 111-117 頁 安光英太郎、戸田年総、大関泰裕

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等
http://en.wikipedia.org/wiki/Galactose_binding_lectin_domain
<http://www.uniprot.org/uniprot/B3EWR1>
<http://www.shimoda.tsukuba.ac.jp/~jambio/ronbun.html#ozeki24>
<http://www.shimoda.tsukuba.ac.jp/~jambio/ronbun.html#ozeki201305>
http://jglobal.jst.go.jp/detail.php?JGLOBAL_ID=201202270059150450&q=cgp%E6%9F%93%E8%89%B2&t=0
<http://www.bioregen.co.jp/products/item/rbs02.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
大関泰裕 (OZEKI Yasuhiro)
研究者番号 : 70275022
(2) 研究分担者
安光英太郎 (YASUMITSU Hidetaro)
研究者番号 : 10182346