第37回糖質科学懇話会

Screening for New Lectins and Their Applications

新規レクチンの探索とその応用

(株)J-オイルミルズ生化学研究所 課長代理

小林夕香 (こばやし ゆか)

Assistant Manager, J-OIL MILLS, Inc.

Yuka Kobayashi

1. はじめに

糖鎖研究は近年目をみはる進展を遂げてきた。基礎研究では、多くの機能や役割が解明され、知見や成果が医薬分野に応用されるようになりつつある¹⁾。(株)J-オイルミルズは、1983年から、糖鎖研究のための「レクチン類」、糖鎖の検出・分析をするための「キット類」、糖鎖の調製をするための「機器・器具類」および、糖鎖変化を生じる癌の早期診断を可能にする「診断薬原料」などを商品化し、糖鎖研究の発展や人々の健康に貢献してきた。現在、試薬として販売しているレクチンは約20種類であるが、2003年からのNEDOプロジェクトなどを経て、100種以上の有用なレクチンからなる「レクチンライブラリー」の構築を達成した。

2. レクチンライブラリーの構築

2003～2005年度には、NEDOプロジェクト「糖鎖エンジニアリング・糖鎖構造解析」に参画し、糖鎖とレクチンの相互作用を網羅的に調べる「ヘクト・バイ・ヘクト (100糖鎖 × 100レクチン) プロジェクト」への非市販レクチンの供給という役割を担った。その中で、必要とするレクチンをより選択的に探索する手法として、従来の赤血球凝集だけでなく、酵素で加工した赤血球を使う手法、水晶共振子マイクロバランス (QCM) などの機器を使う方法などを開発した。また実際に、それらの手法を組み合わせ、約1,000種の植物、動物、菌類の抽出液から新規レクチンの

探索を試み、結果として3年間のNEDOプロジェクトの間に、59種類の新規レクチンを供給し、(独)産業技術総合研究所と共同でそれらの詳細な糖結合特異性の解析を行った。NEDOプロジェクト終了後も、さらに探索手法を開発・改良し、新たにキャピラリー電気泳動 (CE) を使用して、糖鎖と結合する新規で有用なレクチンの探索を行った²⁻⁶⁾。

3. レクチンライブラリーの応用

フコース糖鎖の修飾は、癌や炎症に関与しているといわれているため、 α 1-2フコース、 α 1-3フコース、 α 1-4フコース、 α 1-6フコースなど、その結合様式ごとに識別できるレクチンの需要は高い (図1参照)。今回、 α 1-6フコース特異的レクチンとして有用なスギタケレクチン (*Pholiota squarrosa* lectin) を発見し、PhoSLと命名した^{7,8)}。電気泳動、MALDI-TOF MS、N末端アミノ酸配列分析の結果から、PhoSLはサブユニット分子量約4,500、等電点pI 4.0のタンパク質であり、そのN末端アミノ酸配列はNH₂-APVPVTKLVCDGDTYKCTAYLDFGDGRWVAQWDTNVFHTG-OHであった。レクチンのpH安定性はpH 2.0～11.0の間、温度安定性は0～100℃の間で安定であった。フロンタルアフィニティークロマトグラフィー (FAC) による134種の糖鎖との糖結合性評価では、N型糖鎖のコア (α 1-6) フコース糖にのみ結合し、 α 1-2、 α 1-3、 α 1-4のような他のフコース糖鎖には結合しなかった。さらに、PhoSLは腫瘍マーカーである α -フェトプロ

フコースの結合様式	模式図	機能など
α 1-3結合	$\rightarrow\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow$ $\text{Fuca}1 \xrightarrow{3}$	<ul style="list-style-type: none"> 血管内皮細胞との接着を介して転移に関与
α 1-4結合	$\rightarrow\text{Fuca}1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow$ $\rightarrow\text{Gal}\beta 1 \xrightarrow{3}$	<ul style="list-style-type: none"> 腫瘍マーカー (CA19-9など)
α 1-6結合	$\xrightarrow{4}\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}-\text{Asn}$ $\text{Fuca}1 \xrightarrow{6}$	<ul style="list-style-type: none"> 増殖因子受容体の機能制御 インテグリンを介する細胞接着 腫瘍マーカー (AFP-L3)

図1. フコシル化と機能

テイン (AFP) のフコシル化された AFP (AFP-L3) にはのみ結合し、フコシル化されていない AFP (AFP-L1) には結合しなかった (図2参照)。加えて、新しい知見として、大腸癌の組織染色においては、転移性と原発巣の組織表面上のフコシル化の違いを実証することができた。これらの結果から、PhoSL はフコース 1-6 糖鎖の機能解明のための有用なツールとなりえ、また、腫瘍マーカーの評価にも使用できることから、臨床への応用も期待できる。

現在、レンズマメレクチン (LCA) を使った肝臓がんのマーカーの糖鎖変化を検出する手法が、早期診断や予後判定に使用されている (和光純薬工業(株)AFP-L3%, 大阪)。このようなレクチンの医療応用例はまだ多くはないが、今後、基礎研究が進展し「疾病マーカーとなる糖タンパク質」や「疾病に伴う糖鎖変化」が発見されるようになれば、それらを選択的に検出するレクチンを使った診断薬等が可能となる。

図2. α-フェトプロテイン (AFP) の糖鎖の違い

図3. 糖鎖構造とレクチンの結合性

4. おわりに

今までに発見されたレクチンから性質などがよく調べられ、よく利用されているレクチンの種類と識別する糖鎖のタイプを図3に示す。レクチンは複雑な糖鎖構造の一部を認識するが、その特異性と結合の強さはレクチンによって異なる。

図3に示すレクチンは、発見されているもののほんの一部であるが、いくつかのレクチンとの結合性を利用して大まかな糖鎖の構造も推定できる。今後、PhoSLのように、安定で、特性の明確なレクチンが多く発見されるととても面白い。

文献

- 1) 小林夕香, 河岸洋和: 糖鎖を認識する高分子 レクチン. *Bio Industry*, **27** (2), 6-11 (2010).
- 2) Y. Kobayashi, T. Ishizaki and H. Kawagishi: Screening for lectins in wild and cultivated mushrooms from Japan and their sugar-binding specificities. *Int. J. Med. Mushr.*, **6**, 113-125 (2004).
- 3) Y. Kobayashi, K. Kobayashi, K. Umehara, H. Dohra, T. Murata, T. Usui and H. Kawagishi: Purification, characterization and sugar-binding specificity of an *N*-glycolylneuraminic acid-specific lectin from the mushroom *Chlorophyllum molybdites*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 53048-53055 (2004).
- 4) T. Suzuki, Y. Amano, M. Fujita, Y. Kobayashi, H. Dohra, H. Hirai, T. Murata, T. Usui and H. Kawagishi: Purification, characterization and cDNA cloning of a lectin from the mushroom *Pleurocybella porrigens*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 702-709 (2009).
- 5) M. Horibe, Y. Kobayashi, H. Dohra, T. Morita, T. Murata, T. Usui, S. Nakamura-Tsuruta, M. Kamei, J. Hirabayashi, M. Matsuura, M. Yamada, Y. Saikawa, K. Hashimoto, M. Nakata and H. Kawagishi: Toxic isolectins from the mushroom *Boletus venenatus*. *Phytochemistry*, **71**, 648-657 (2010).
- 6) T. Suzuki, K. Sugiyama, H. Hirai, H. Ito, T. Morita, H. Dohra, T. Murata, T. Usui, H. Tateno, J. Hirabayashi, Y. Kobayashi and H. Kawagishi: Mannose-specific lectin from the mushroom *Hygrophorus russula*. *Glycobiology*, **22**, 616-629 (2012).
- 7) (株)J-オイルミルズ, 独産業技術総合研究所, 国立大学法人静岡大学, 小林夕香, 平林 淳, 舘野浩章, 河岸洋和, 道羅英夫: フコース α 1→6 特異的レクチン, 特許第 4514163 号, 2010-05-21.
- 8) Y. Kobayashi, H. Tateno, H. Dohra, K. Moriwaki, E. Miyoshi, J. Hirabayashi and H. Kawagishi: A novel core fucose-specific lectin from the mushroom *Pholiota squarrosa*. *J. Biol. Chem.*, **287**, 33973-33982 (2012).