

博士論文

シアリル Tn 抗原結合アフィニティーカラムによる
緑藻ミル (*Codium fragile*) レクチンの
簡易精製法の確立と一次構造解析

2021 年 9 月

竹内 良太

岡山大学大学院
環境生命科学研究科

目次

| | |
|--|----|
| 略号 | 5 |
| 第一章 序論 | 7 |
| 第二章 ブタ膠様物ムチン様糖タンパク質由来シアリル Tn 抗原含有糖ペプチドの精製と構造解析 | 13 |
| 第一節 緒言 | 13 |
| 第二節 材料・試薬 | 14 |
| 第三節 実験方法 | 14 |
| 第一項 ブタ膠様物ムチン様糖タンパク質由来糖ペプチドの調製及び精製 | 14 |
| 1-1 ブタ膠様物ムチン様糖タンパク質由来糖ペプチドの調製 | 14 |
| 1-2 RP-HPLC による糖ペプチドの精製 | 15 |
| 第二項 糖ペプチドの構造解析 | 16 |
| 2-1 アミノ酸組成分析 | 16 |
| 2-2 ヒドラジン分解, PA 化による蛍光標識化糖鎖の調製 ³⁷⁾ | 16 |
| 2-3 RP-HPLC を用いた PA 糖鎖の精製 | 17 |
| 2-4 α2,3-シアリダーゼ消化 | 18 |
| 2-5 ESI-MS 及び MS/MS 分析による糖鎖構造解析 | 18 |
| 第四節 実験結果 | 19 |
| 第一項 ブタ膠様物ムチン様糖タンパク質由来糖ペプチドの調製と精製 | 19 |
| 1-1 ブタ膠様物ムチン様糖タンパク質由来糖ペプチドの調製 | 19 |
| 1-2 RP-HPLC による糖ペプチドの精製 | 19 |
| 第二項 ブタ膠様物由来糖ペプチドの構造解析 | 20 |
| 2-1 アミノ酸組成分析 | 20 |
| 2-2 ヒドラジン分解, PA 化による糖ペプチドの糖鎖構造解析 | 20 |

| | |
|--|----|
| 2-3 α2,3-シアリダーゼ消化による PA 糖鎖の構造解析..... | 21 |
| 2-4 ESI-MS 及び MS/MS による糖鎖構造解析..... | 21 |
| 第五節 考察 | 29 |
| 第三章 ミルレクチンの簡易精製法の確立 | 30 |
| 第一節 緒言 | 30 |
| 第二節 材料・試薬 | 31 |
| 第三節 実験方法 | 31 |
| 第一項 アフィニティーゲルの作成 | 31 |
| 第二項 疎水カラムクロマトグラフィーによる CFL の部分精製..... | 32 |
| 第三項 アフィニティーカラムクロマトグラフィーによる CFL の精製..... | 32 |
| 第四項 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) | 33 |
| 第五項 質量分析による精製 CFL の分子量決定..... | 33 |
| 第四節 実験結果 | 34 |
| 第一項 アフィニティーゲルの作成..... | 34 |
| 第二項 疎水カラムクロマトグラフィーによる CFL の部分精製..... | 34 |
| 第三項 アフィニティーカラムクロマトグラフィーによる CFL の精製..... | 34 |
| 第五節 考察 | 40 |
| 第四章 CFL の一次構造解析 | 41 |
| 第一節 緒言 | 41 |
| 第二節 材料・試薬 | 41 |
| 第三節 実験方法 | 41 |
| 第一項 N 末端アミノ酸配列分析 | 41 |
| 第二項 内部アミノ酸配列分析 | 42 |
| 3-1 トリプシン消化..... | 42 |

| | |
|-----------------------|----|
| 3-2 キモトリプシン消化..... | 42 |
| 3-3 ペプシン消化..... | 43 |
| 第四項 相同性解析 | 43 |
| 第四節 実験結果 | 43 |
| 第一項 N末端アミノ酸配列分析 | 43 |
| 第二項 内部アミノ酸配列分析 | 44 |
| 3-1 トリプシン消化..... | 44 |
| 3-2 キモトリプシン消化..... | 46 |
| 3-3 ペプシン消化..... | 48 |
| 第三項 相同性解析 | 50 |
| 第五節 考察 | 53 |
| 総括 | 54 |
| 参考文献 | 57 |
| 謝辞 | 63 |

略号

| | |
|--------------------|---|
| BPL-3 | : <i>Bryopsis plumose</i> lectin - 3 |
| CFL | : <i>Codium fragile</i> lectin |
| DTT | : Dithiothreitol |
| ESI | : Electron spray ionization |
| Gal | : D-Galactose |
| GalNAc | : N-Acetyl-D-galactosamine |
| GalNH ₂ | : D-galactosamine |
| GlcNAc | : N-Acetyl-D-glucosamine |
| HexNAc | : <i>N</i> -acetylhexosamine |
| HPA | : <i>Helix pomatia</i> agglutinin |
| HPLC | : High-performance liquid chromatography |
| Man | : D-Mannose |
| MeCN | : Acetonitrile |
| NCBI | : National Center for Biotechnology Information |
| NeuNAc | : N-Acetyl-D-neuraminic acid |
| PA | : 2-aminopyridine |
| PITC | : Phenyl Isothiocyanate |
| PVDF | : PolyvinylideneFluoride |
| QTOF | : Quadrupole time of flight |
| RP-HPLC | : Reverse-phase HPLC |
| S.mutans | : <i>Streptococcus mutans</i> |
| SDS-PAGE | : Sodium dodesyl sulphate -polyacrylamide gel electrophoresis |

TFA : Trifluoroacetic acid

Tris : Tris (hydroxymethyl) aminomethane

第一章 序論

真核生物の膜タンパク質や分泌タンパク質のほとんどが糖鎖修飾を受けた糖タンパク質である。糖タンパク質糖鎖は、その結合様式により *O*-グリカン（セリン（Ser）/スレオニン（Thr）結合型糖鎖）と *N*-グリカン（アスパラギン結合型糖鎖）に分類される¹⁾。

ムチンは、*O*-グリカンが結合した糖タンパク質であり、粘液の主成分として口腔や胃などの消化器官の粘膜の保護作用を担う。図1に示したように、ムチン型糖鎖は、主に Ser/Thr 残基の側鎖の水酸基に *N*-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc) が α -*O*-グリコシド結合した構造を持ち、Tn 抗原 (GalNAc α -Ser/Thr) や T 抗原 (Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr) などの腫瘍関連抗原の存在も知られている²⁾。これらの腫瘍関連抗原は更にシアル酸などの修飾を受ける場合もあり、シアリル Tn 抗原 (NeuNAc α 2-6GalNAc α -Ser/Thr) は、胃がんや卵巣がんの腫瘍部位に特徴的な糖鎖抗原のひとつとして、臨床検査において有用な腫瘍マーカーになっている³⁾。

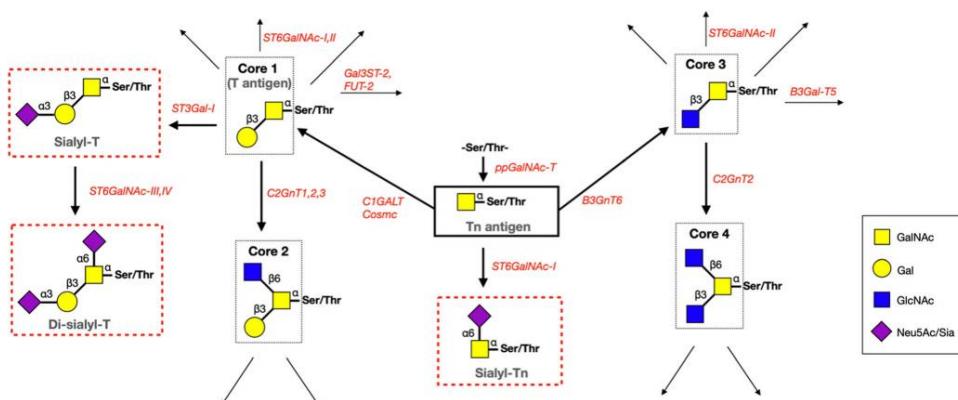


図 1 ムチン型糖鎖の合成経路と構造²⁾

Inka Brockhausen et al., *Glycoconj. J.*, **38**, 459-474 (2021)

唾液中のムチン型糖鎖は、口腔レンサ球菌の一種である *Streptococcus mutans* などの細菌と結合し凝集することで、口腔内細菌感染を阻害する作用がある（図 2D）⁴⁾。一方で、歯面上に結合した唾液中のムチン型糖鎖は、*S. mutans* などの細菌を吸着することで、口腔内細菌感染を促進してしまうという側面がある（図 2A）⁴⁾。

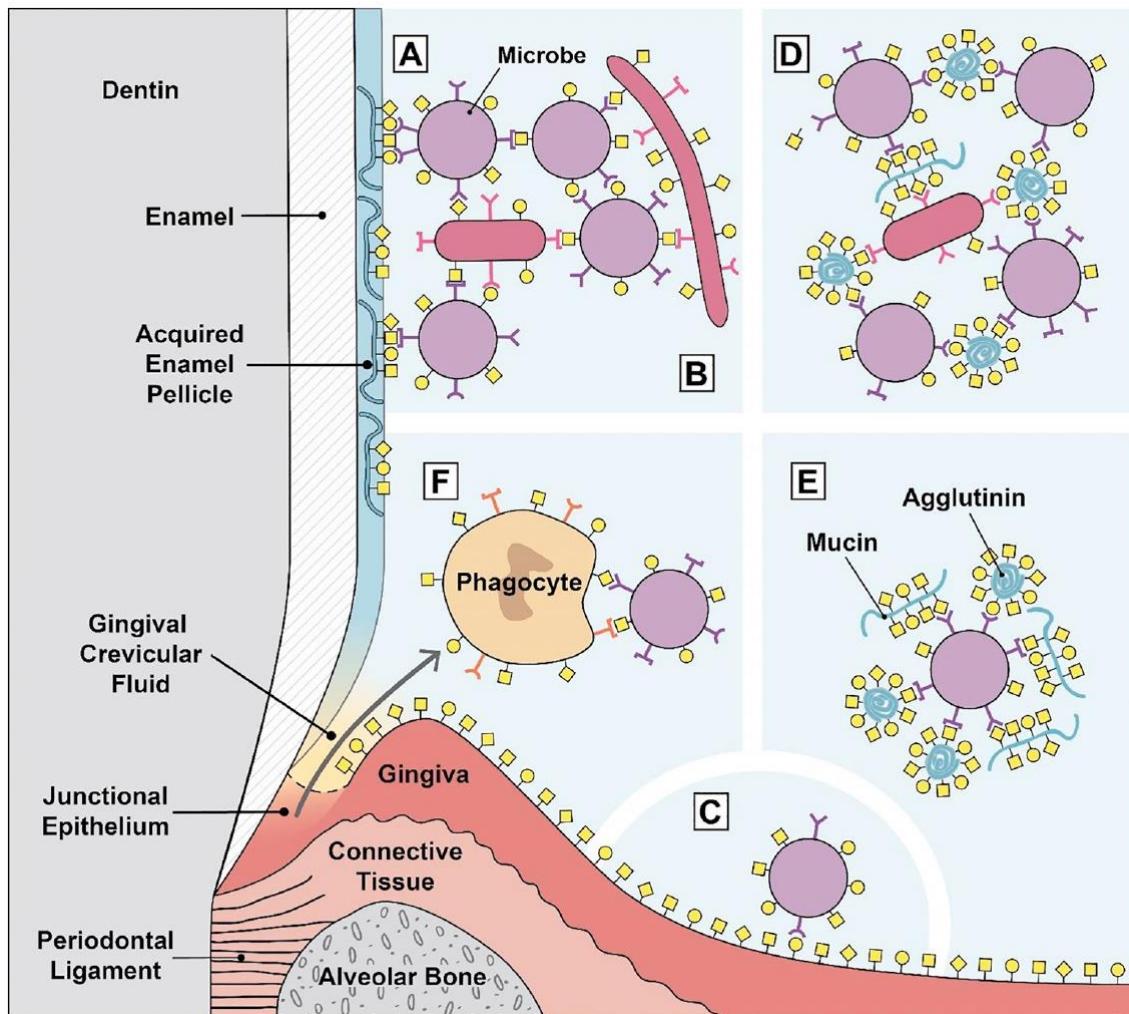


図 2 口腔内におけるムチン型糖鎖を介した細菌との相互作用⁴⁾

A, 細菌の歯面付着; B, 細菌間の結合; C, 細菌の口腔上皮細胞上のムチン型糖鎖への結合; D, ムチン型糖鎖による細菌の凝集; E, ムチン型糖鎖に覆われた細菌; F, 食細胞による細菌の食作用

B.W. Cross, and S. Ruhl., *Cellular Immunology*, 333, 19–33 (2018)

口腔内細菌感染において、歯面上の唾液被膜（ペリクル）を構成する唾液ムチン糖鎖への *S.mutans* などの口腔病原性細菌の結合は細菌感染を促進してしまう。そのため、口腔内感染症予防には、唾液ムチン糖鎖に結合するレクチンが有効である可能性が示唆されている（図 3）⁵⁾。

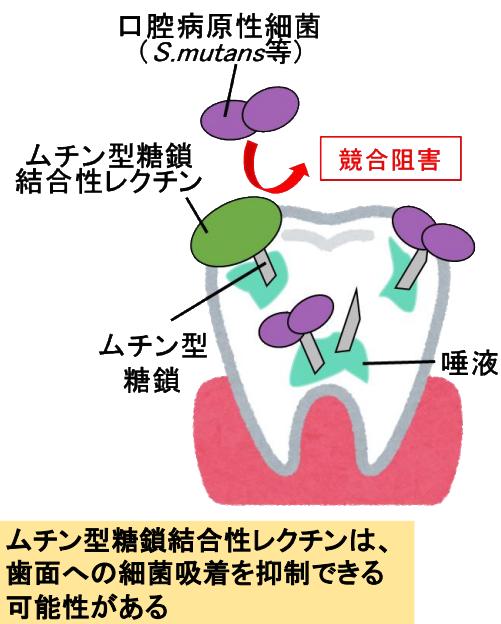


図 3 歯面におけるムチン型糖鎖結合性レクチンによる細菌吸着の阻害作用⁵⁾

Takashi Ito *et al.*, Glycoconj. J., 35, 41-51 (2018)

レクチンは、糖鎖に結合性を持つタンパク質であり、その結合は糖鎖構造に特異的である。腫瘍関連抗原への結合性を持つレクチンは、がん検査への応用利用が考えられる。これまでに、陸生植物から数多くのレクチンが単離されており、その構造的、機能的特性が詳細に検証してきた。近年、海藻由来のレクチンについても研究が進められており、新たなレクチンソースとして注目されつつある⁶⁻²¹⁾。表 1 にまとめたように、海藻レクチンの多くはマンノース (D-Man) 特異的な結合性を持ち、例えば、緑藻 *Boodlea coacta* に含まれるハイマンノース型糖鎖を認識するレクチンは、抗ウイルス活性などの有効性を示すという報告もある²²⁾。また、T 抗原

や Tn 抗原などの O-グリカンに結合する緑藻 *Codium fragile* 由来レクチンの存在も僅かに報告されているが、その一次構造や遺伝子は未だ同定されておらず、その糖鎖結合特異性に関する分子レベルでの研究は進んでいないのが現状である²³⁻²⁷⁾。

表 1 海藻由来レクチンの一覧とその特異性ごとの分類²³⁾

| List of Man-specific seaweed lectins | | | List of T/Tn-specific seaweed lectins | | |
|--------------------------------------|---|-------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|--------|
| Seaweed Family | Seaweed Species | Lectin | Seaweed Family | Seaweed Species | Lectin |
| Red algae | <i>Agardhiella subulata</i> | ASL-1, ASL-2 | Rhodophyceae | <i>Aglaothamnion oosumense</i> | AOL1 |
| | <i>Carpopeltis flabellata</i> | CFA | Chlorophyceae | <i>Codium fragile</i> | CFL |
| | <i>Eucheuma amakusaensis</i> | EAA-1 EAA-2 EAA-3 | | | |
| | <i>Eucheuma cottonii</i> | ECA-1 ECA-2 | | | |
| | <i>Eucheuma denticulatum</i> | EDA-1 EDA-2 | | | |
| | <i>Eucheuma serra</i> | ESA-1 ESA-2 | | | |
| | <i>Gracilaria bursa-pastoris</i> | GBPL | | | |
| | <i>Gratelouphia chiangii</i> | GCL | | | |
| | <i>Griffithsia</i> sp. | griffithsin | | | |
| | <i>Kappaphycus alvarezii</i> | KAA-2 | | | |
| | <i>Kappaphycus striatum</i> | KSA-2 | | | |
| | <i>Meristella echinocarpa</i> | MEL | | | |
| | <i>Meristotheca papulosa</i> | MPA-1 MPA-2 | | | |
| | <i>Solieria filiformis</i> | Sfl-1 Sfl-2 | | | |
| | <i>Solieria robusta</i> | SrL | | | |
| | <i>Hydropuntia (Gracilaria) fisheri</i> | HFA | | | |
| | <i>Porphyra umbilicalis</i> | NgL | | | |
| Yellow-green algae | <i>Nannochloropsis gaditana</i> | BU14 | | | |
| | <i>Boedlea coacta</i> | BCA | | | |
| | <i>Bryopsis plumosa</i> | BPL-2 | | | |
| | <i>Enteromorpha prolifera</i> | EPL-1/2 | | | |
| | <i>Halimeda renschii</i> | HRL40-1/2 | | | |
| Green algae | <i>Ostreococcus tauri</i> | OtL | | | |

| List of Neu5Ac-specific seaweed lectins | | |
|---|-----------------------------|--------|
| Seaweed Family | Seaweed Species | Lectin |
| Rhodophyceae | <i>Gracilaria tikvahiae</i> | GTL |
| | <i>Palmaria palmata</i> | PPL |
| | <i>Solieria chordalis</i> | ScL |
| Phaeophyceae | <i>Fucus vesiculosus</i> | ? * |

Annick Barre *et al.*, Mar. Drugs, **18**, 543 (2020)

これまでに緑藻 *Codium fragile* (和名 : ミル) 粗抽出物による、口腔レンサ球菌の一種である *S.mutans* の歯面上の唾液被膜 (ペリクル) を構成する唾液ムチン糖鎖への吸着抑制作用が報告されている^{5,25)}。図 4 に示したように、予備実験的にも緑藻 *Codium fragile* 粗抽出物によるだ液皮膜に対する *S.mutans* の吸着抑制作用が確認されている。この吸着抑制の機序は、唾液ムチン糖鎖に対する *S.mutans* の吸着を、*Codium fragile* に含まれるレクチンが競合的に阻害していると考えられ、口腔内細菌感染予防において、唾液ムチン糖鎖に結合するレクチンが有効である可能性が示唆されている。また、T 抗原に結合性を持つマッシュルーム由来レクチン (ABA) にも、同様の *S.mutans* に対する吸着抑制活性が報告されている⁵⁾。これらの結果は、口腔内細菌感染予防において、唾液ムチン糖鎖に結合するレクチンが有効である可能性を示唆している。

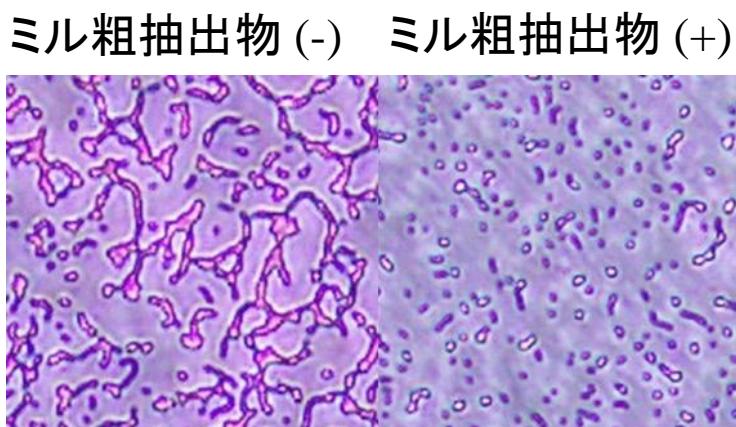


図 4 緑藻 *Codium fragile* 粗抽出物によるだ液被膜に対する *S. mutans* の吸着抑制

The 31st IFSCC Congress 2020 YOKOHAMA, Ryota Takeuchi, Poster-294

以上の先行研究により、*Codiumu fragile* の抽出物に含まれる CFL は口腔ケア剤としての応用利用が期待されている。しかしながら、その実用化において、有効成分である CFL 含量のロット間での規定が課題であり、一般的な品質管理システムに応用できる簡便な精製法が要求されている。そこで本研究では、*Codiumu fragile* に含まれる CFL 含量を迅速かつ簡便に分析するために、CFL が結合性を持つと報告されている Tn 抗原含有ムチン糖ペプチドを結合させたアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いた新規簡易精製法の確立を目的とした^{23,26,27)}。また、精製 CFL の糖鎖認識における分子メカニズムを明らかにするために、将来的な X 線結晶構造解析を目的とし一次構造解析を行った。

本論文では、まず第二章において、アフィニティーカラムのリガンドとして用いるシアリル Tn 抗原含有ムチン糖ペプチドをブタ膠様物に豊富に含まれるムチン様糖タンパク質から精製した。第三章では、第二章で精製したシアリル Tn 抗原含有ムチン糖ペプチドを結合させたアフィニティーカラムを作成し、*Codium fragile* 部分精製物より CFL を精製した。第四章では、第三章で精製した CFL の糖鎖認識における分子メカニズムを明らかにするため、一次構造解析を行った。

第二章 ブタ膠様物ムチン様糖タンパク質由来シリアル Tn 抗原含有 糖ペプチドの精製と構造解析

第一節 緒言

緑藻 *Codium fragile* (和名ミル) 粗抽出物は、口腔レンサ球菌の一種である *S.mutans* の歯面上の唾液被膜（ペリクリル）を構成する唾液ムチン糖鎖への吸着抑制作用を示す⁵⁾。この吸着抑制作用は、唾液ムチン糖鎖に対する *S.mutans* の吸着を、*Codium fragile* に含まれるレクチンが競合的に阻害していると考えられ、口腔内感染症予防において、唾液ムチン糖鎖に結合するレクチンが有効である可能性が示唆されている。そのため、緑藻 *Codium fragile* 由来レクチン (CFL) は口腔ケア剤としての応用利用が期待されている。しかしながら、その実用化において、粗抽出物中に含まれる有効成分である CFL の定性・定量が課題となつており、一般的な品質管理システムに応用可能な簡便な精製法が要求されている。そこで本博士論文では、*Codium fragile* に含まれる CFL の定性・定量を迅速かつ簡便に行うために、CFL の結合性が報告されているシリアル Tn 抗原含有糖ペプチドを結合させたアフィニティーカラムを用いた新規簡易精製法を確立することを目的とした。

CFL は、T 抗原 (Galβ1-3GalNAcα-Ser/Thr) や Tn 抗原 (GalNAcα-Ser/Thr) などのムチン型糖鎖への結合性が報告されているが、その一次構造や遺伝子は未だ同定されていない²³⁻²⁷⁾。そこで本章では、シリアル Tn 抗原に結合する CFL を単離するために必要なアフィニティーリガンドの精製を行った。リガンドの供給源には、シリアル Tn 抗原を含有するムチン様糖タンパク質を大量に含むブタ膠様物を選択した²⁸⁻³³⁾。ブタ膠様物は養豚場で人工授精の際に廃棄されるため、シリアル Tn 抗原含有糖ペプチドの多量精製に有用であると考えられた。まず、ブタ膠様物

に含まれるムチン様糖タンパク質から、アクチナーゼ消化、ゲルろ過、親水性分画、RP-HPLCによりシアリルTn抗原含有糖ペプチドの精製を行った。精製した糖ペプチドはアミノ酸組成分析に供し、ペプチドを構成しているアミノ酸組成を解析した。糖ペプチドの糖鎖構造は、ヒドラジン分解により糖鎖を遊離させ、蛍光ラベルし、RP-HPLCによる精製を行い、シアリダーゼ消化、ESI-MS及びMS/MSにより解析した。

第二節 材料・試薬

ブタ膠様物は岡山県農林水産総合センター畜産研究所の佐々木真也博士から提供されたものを用いた。アクチナーゼE (*Streptomyces griseus* 由来) は科研製薬株式会社のものを用いた。 α 2,3-シアリダーゼ (*Salmonella typhimurium* LT2 由来) は、タカラバイオ株式会社から購入したものを用いた。無水ヒドラジンはナカライテスク社製のものを用いた。2-アミノピリジンは富士フィルム和光純薬株式会社製のものを *n*-ヘキサン中で再結晶させた後使用した。Sephadex G-25 superfine は GEヘルスケア社製のものを用いた。Dowex 50 x 2 (400 メッシュ以下) はムロマチテクノス社製のものを用いた。Shodex Asahipak NH2P-50 resin は昭和電工社製のものを、Cosmosil 5C18-AR-II カラム (0.6 × 25 cm, 1.0 × 25 cm) と Cosmosil 5C22-AR-II (0.46 × 25 cm) はナカライテスク社製のものを用いた。

第三節 実験方法

第一項 ブタ膠様物ムチン様糖タンパク質由来糖ペプチドの調製及び精製

1-1 ブタ膠様物ムチン様糖タンパク質由来糖ペプチドの調製

ブタ膠様物は脱イオン水で洗浄後、凍結乾燥した。凍結乾燥ブタ膠様物 (3.19 g) は、0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8) 60 mL 中で、アクチナーゼE (300 mg) 消化を行

った (37°C, 72 h)。アクチナーゼ消化物は、遠心 (10,160 g, 20 min) し、得られた上清は 0.1 N NH₄OH で平衡化した Sephadex G-25 superfine カラム (4.0 × 92 cm) に供した (図 5)。糖ペプチド画分 (溶出体積 450-760 mL) は、フェノール硫酸法³⁴⁾により検出し、回収後、12 mL までエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥した。凍結乾燥糖ペプチド (2.0 g) は、親水性分画法に供するため³⁵⁾、60%アセトニトリル水溶液 (25 mL) に溶解した後、80%アセトニトリル水溶液で平衡化した Shodex NH₂P-50 resin (20 mL) と混合し (25°C, 10 min)，その混合物を遠心 (13,420 g, 20 min) し、上清を除去後、80%アセトニトリル水溶液 200 mL で 2 回樹脂の洗浄を行い、上清の糖ペプチドを含まない非吸着画分を除去した。次に、樹脂を 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) 200 mL と混合し、十分攪拌後、樹脂に吸着している糖ペプチドを溶出させ、遠心分離 (13,420 g, 10 min) し、0.1% TFA 画分として上清を回収した。更に、樹脂を 0.1 N NH₄OH 200 mL と混合し、十分攪拌後、樹脂に吸着している糖ペプチドやペプチドを溶出させ、遠心分離 (13,420 g, 10 min) し、0.1 N NH₄OH 画分として上清を回収した。それぞれの画分は濃縮後、凍結乾燥した。凍結乾燥後の重量は、0.1%TFA 画分が 0.77 g, 0.1 N NH₄OH 画分が 1.17 g であった。

1-2 RP-HPLC による糖ペプチドの精製

1-1 で得られた 0.1 N NH₄OH 画分には、糖ペプチドに加え、不純物となるペプチドも混在しているため、1-1 で調製した 0.1% TFA 画分の糖ペプチドを、超純水に溶解させ、遠心分離 (10,000 g, 5 min) により不溶物を除去し、上清を Cosmosil 5C18-AR-II カラム (1.0 × 25 cm) を付設した HPLC システム (Jasco HPLC システム) に供し、糖ペプチドの更なる精製を行った (図 14)。糖ペプチドの検出には、紫外可視吸光度検出器 (Jasco UV-4070) を用い A230 nm の吸収を検出した。糖ペプチドの溶出には、図 6 に示した溶媒系とプログラムを用い、流速 1.5

mL/min で行った。それぞれの糖ペプチド画分は、ロータリーエバボレーターで濃縮し、凍結乾燥した（図 6）。凍結乾燥後の重量は、F1 画分が 0.23 g, F2 画分が 0.39 g であった。

第二項 糖ペプチドの構造解析

2-1 アミノ酸組成分析

前項の 1-2 で得られた 0.1%TFA 画分 (100 µg), 0.1%TFA 画分を RP-HPLC に供して得られた F1 (100 µg), F2 (100 µg), 2.5 nmol/mL アミノ酸標準液 (30 µL), D-GalNAc (20 µg), D-GlcNAc (20 µg) をそれぞれアミノ酸組成分析用試験管にとり減圧乾固した。続いて 5.7 N HCl/0.02% 2-メルカプトエタノールを 100 µL 加え減圧封管し、加水分解 (110°C, 15 h) を行った³⁶⁾。その後開管し、エタノール：超純水：TEA = 1:1:1 を 100 µL 加え、中和を行った。サンプルを減圧乾固し、さらにエタノール：超純水：TEA = 7:1:1 を 100 µL, PITC を 3 µL 加えアミノ基にラベルをした。サンプルを再度減圧乾固し、0.14 M 酢酸ナトリウム/0.05% TEA (pH6.25) を 300 µL (アミノ酸標準液は 500 µL) 加え、遠心分離 (10,000 g, 5 min) により不溶物を除去し、その上清を Cosmosil 5C22-AR-II (0.46 × 25 cm) を付設した HPLC システム (HITACHI HPLC システム) に供し、PITC 誘導化アミノ酸やアミノ糖の分離を行った（図 7）。PITC 誘導化アミノ酸やアミノ糖の検出には、Diode Array Detector (HITACHI L-7455) を用い A257 nm の吸収を検出した。PITC 誘導化アミノ酸やアミノ糖の溶出には、図 7 に示した溶媒系とプログラムを用い、カラム温度 37°C, 流速 1.0 mL/min で行った。

2-2 ヒドラジン分解、PA 化による蛍光標識化糖鎖の調製³⁷⁾

0.1% TFA 画分から RP-HPLC により精製された F2 画分の糖ペプチドの 1/10 量

をねじ蓋付き試験管内に入れ、無水ヒドラジン (100 μL) を加えてヒドラジン分解 (100°C, 10 h) を行い、糖鎖を遊離させた。その後、反応液中に冷アセトン (10 mL程度) を加え、遠心分離 (17,000 g, 20 min) 後、上澄みを除去し、沈殿の遊離糖鎖を減圧乾燥した。減圧乾燥後、飽和重炭酸ナトリウム溶液 (2 mL) に糖鎖を溶解後、無水酢酸 (200 μL) を加え、N-アセチル化 (室温, 10 min) を行った。反応液に Dowex 50 x 2 樹脂を加え、pH が 2 付近であることを確認後、カラムに移して、カラム体積の 5 倍量の脱塩水で樹脂を洗浄することで脱塩し、素通り画分に遊離糖鎖が回収された。遊離糖鎖画分は、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固させた後に、少量の脱塩水に溶解させ、ねじ蓋付きの試験管に移した後に、凍結乾燥した。

続いて、凍結乾燥した糖鎖を、2-アミノピリジン試薬 (2-アミノピリジン 1.0 g を HCl 0.65 mL に溶解させたもの) 200 μL に溶解し、90°Cで 30 分間反応させた。次いで、20 μL の還元試薬 (NaBH₃CN 20 mg を蒸留水 12 μL に溶解させたもの) を加えて再び封管し、90°Cで 1 時間還元反応を行った。還元反応終了後は、反応液を 0.1 N NH₄OH で平衡化したゲルろ過 (Sephadex G-25 superfine, 3.0 × 40 cm) に供し、余剰の 2-アミノピリジンを除去した。PA 糖鎖の検出は、蛍光分光光度計 (励起波長 310 nm, 蛍光波長 380 nm, 日本分光株式会社製 FP-8200) 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 (図 8)。

2-3 RP-HPLC を用いた PA 糖鎖の精製

得られた PA 糖鎖は超純水 600 μL に溶解し、遠心分離 (10,000 g, 5 min) により不溶物を除去し、上清を Cosmosil 5C18-AR-II カラム (0.6 × 25 cm) を付設した HPLC システム (Jasco HPLC システム) に供し、含まれる PA 糖鎖を部分精製し

た（図 9）。PA 糖鎖の検出には、蛍光分光光度計（励起波長 310 nm, 蛍光波長 380 nm, Jasco 920-FP）を用いた。PA 糖鎖の溶出には、図 9 に示した溶媒系とプログラムを用い、流速 1.2 mL/min で行った。

2-4 α2,3-シアリダーゼ消化

α-2,3 結合したシアル酸の加水分解には、PA 糖鎖（5 μL）に α-2,3-シアリダーゼ（50 U/mL）を 3 μL, 0.5 M 酢酸緩衝液（pH 5.5）を 4 μL, 超純水を 8 μL 加え、37°Cで 30 分間の反応を行った。α-2,6 結合したシアル酸の加水分解には、PA 糖鎖（5 μL）に α-2,6-シアリダーゼ（50 U/mL）を 9 μL, 0.5 M 酢酸緩衝液（pH 5.5）を 4 μL, 超純水を 8 μL 加え、37°Cで 32 時間の過剰な反応を行った³⁸⁾。煮沸（100°C, 3 min）により反応を停止し、遠心分離（20,000 g, 5 min）後、上清を Cosmosil 5C18-AR-II カラム（1.0 × 25 cm）を付設した HPLC システム（Jasco HPLC システム）に供し、PA 糖鎖を分離した。（図 10）。PA 糖鎖の検出には、蛍光分光光度計（励起波長 310 nm, 蛍光波長 380 nm, Jasco 920-FP）を用いた。PA 糖鎖の溶出には、図 10 に示した溶媒系とプログラムを用い、流速 1.5 mL/min で行った。

2-5 ESI-MS 及び MS/MS 分析による糖鎖構造解析

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 μL/min の流速で質量分析装置へ供与した。また、CAD スペクトル測定には、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。

第四節 実験結果

第一項 ブタ膠様物ムチン様糖タンパク質由来糖ペプチドの調製と精製

1-1 ブタ膠様物ムチン様糖タンパク質由来糖ペプチドの調製

実験方法に従って、ブタ膠様物凍結乾燥物（3.2 g）のアクチナーゼ消化物を Sephadex G-25 superfine (4.0 × 92 cm) に供し、糖ペプチド画分を回収した（図 5）。得られた糖ペプチド画分は、濃縮後、凍結乾燥を行った。

凍結乾燥糖ペプチド（2.0 g）は、親水性分画法による糖ペプチドの分画を行うため、80%アセトニトリル水溶液で平衡化した Shodex NH₂P-50 resin に吸着させた後、80%アセトニトリル水溶液で非吸着物質を洗浄後、吸着している糖ペプチドを 0.1%TFA および 0.1N NH₄OH により溶出させ、それぞれ 0.1% TFA 画分、0.1 N NH₄OH 画分とした。また、フェノール硫酸法により 0.1% TFA 画分、0.1 N NH₄OH 画分に強い糖の発色を確認した。凍結乾燥し、それぞれの重量は、0.1%TFA 画分が 0.77 g、0.1 N NH₄OH 画分が 1.17 g であった。これまでに、0.1 N NH₄OH 画分には糖ペプチドに加えて、ペプチドも混在することが明らかであったため³⁵⁾、更なる糖ペプチドの精製には 0.1%TFA 画分を用いた。

1-2 RP-HPLC による糖ペプチドの精製

0.1% TFA 画分に含まれる糖ペプチドの更なる精製は、Cosmosil 5C18-AR-II カラム（1.0 × 25 cm）に供する事で行った。図 6 の RP-HPLC の結果から、F1 画分と F2 画分を分取し、その一部はアミノ酸組成分析に使用した。凍結乾燥後の重量は、F1 画分が 0.23 g、F2 画分が 0.39 g であった。糖ペプチドの RP-HPLC 溶出プロファイルから、F2 画分はピークがブローディングしており、精製した糖ペプチドは、ほとんど単一であり、「ペプチド鎖の長さ」や「ペプチドに結合している糖鎖の数」が僅かに異なっていると考えられた。

第二項 ブタ膠様物由来糖ペプチドの構造解析

2-1 アミノ酸組成分析

親水性分画により回収された 0.1% TFA 画分、この画分を RP-HPLC に供して分取した F1 画分および F2 画分をそれぞれアミノ酸分析に供した結果を図 7 に示した。どの画分においても、5 種類のアミノ酸残基 (S, G, T, A, P) のピークが検出され、ペプチド部分の構造はある程度は均一であることが示唆された。また、GalNAc を加水分解して得られる GalNH₂ のピークも全ての画分で検出され、糖ペプチドの糖鎖構造中に GalNAc を有することが明らかになった。F2 画分は、F1 画分のピーク溶出パターンと比べて、不純アミノ酸などの混在が少なく、RP-HPLC による F2 画分の分取により、ある程度は構造の均一な糖ペプチドを精製することに成功した。

2-2 ヒドラジン分解、PA 化による糖ペプチドの糖鎖構造解析

実験方法に従って、ブタ膠様物由来糖ペプチドの凍結乾燥物から、ヒドラジン分解 (100°C, 10 h) により、糖鎖を遊離させた。次いで N-アセチル化、Dowex 50x2 樹脂による脱塩を行い、遊離糖鎖画分を濃縮後、凍結乾燥を行った。続いて、2-アミノピリジンによる PA 化後、飽和シアノ水素化ホウ素ナトリウム水溶液を加えて還元反応を行った。得られた反応液は Sepharose G-25 superfine (3.0 × 40 cm) に供して余剰の PA 試薬を除去し、PA 糖鎖画分を回収した (図 8 下線部)。回収した画分は濃縮後、超純水 600 μL に溶解した。PA 糖鎖は、Cosmosil 5C18-AR-II カラム (0.6 × 25 cm) に供し、ピークがひとつ検出され、それを分取し濃縮した (図 9 下線部)。

2-3 α 2,3-シリダーゼ消化による PA 糖鎖の構造解析

RP-HPLC で部分精製した PA 糖鎖の非還元末端にシアル酸が存在していることを確認するため、 α 2,3-シリダーゼ消化を行い、RP-HPLC により溶出パターンを解析した。用いた酵素は主に α 2,3-シリダーゼ活性をもっているが、1/200 の活性で α 2,6-シリダーゼ活性も示す。従って、 α 2,3-シリダーゼ活性に十分な反応条件 (150 mU, 30 分)、 α 2,6-シリダーゼ活性に必要な過剰な反応条件 (450 mU, 32 時間) について、それぞれシリダーゼ消化を行った。その結果、ピークに含まれる PA 糖鎖は、 α 2,3-シリダーゼ活性に必要な条件 (150 mU, 30 分) では、ほとんど消化されず、過剰な反応条件 (450 mU, 32 時間) により、ピークに含まれる PA 糖鎖の消化が確認され、ピークの溶出位置が移動した。以上の結果から、F2 画分の精製糖ペプチドの糖鎖には α 2,6 結合したシアル酸が非還元末端に結合している事が明らかになった (図 10)。

2-4 ESI-MS 及び MS/MS による糖鎖構造解析

精製糖ペプチドから調製した PA 糖鎖を ESI-MS に供した結果、 $[(\text{NeuAc})(\text{HexNAc-PA})+\text{H}]^+$ に相当する m/z 591.3 のイオンが検出された (図 11 上)。また、MS/MS により、 $\text{NeuAc}_1\text{HexAc}_1\text{-PA}$ に相当する m/z 591.3 の親イオンから m/z 300.2 のフラグメントトイオンが検出された (図 11 下)。精製糖ペプチドのアミノ酸組成分析の結果から、アミノ糖として GalNAc が検出されたこと、シリダーゼ消化の結果を考慮すると、精製糖ペプチドに結合している糖鎖は、構造均一なシリル Tn 抗原 ($\text{NeuNAc}\alpha 2\text{-}6\text{GalNAc-PA}$) であると考えられた。

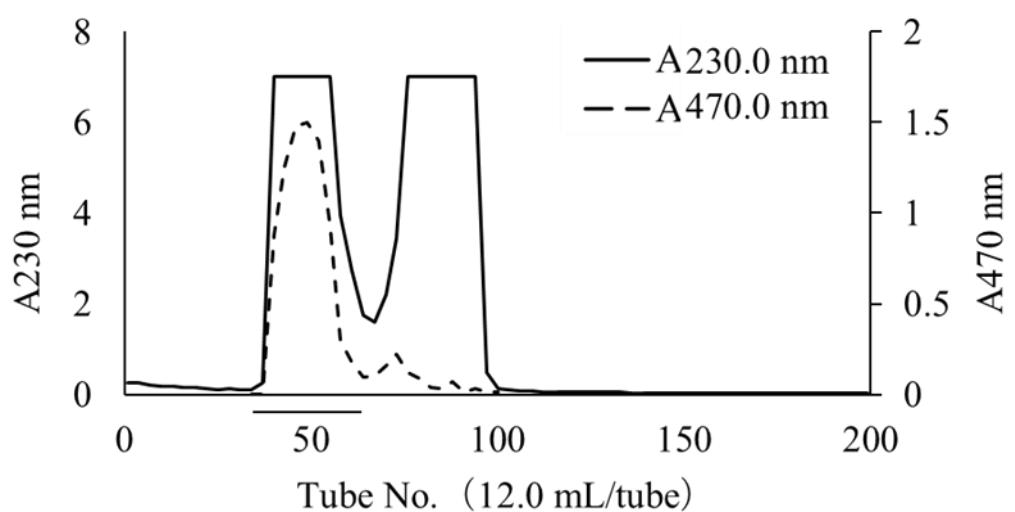


図 5 ブタ膠様物由来糖ペプチドのゲルろ過クロマトグラフィー

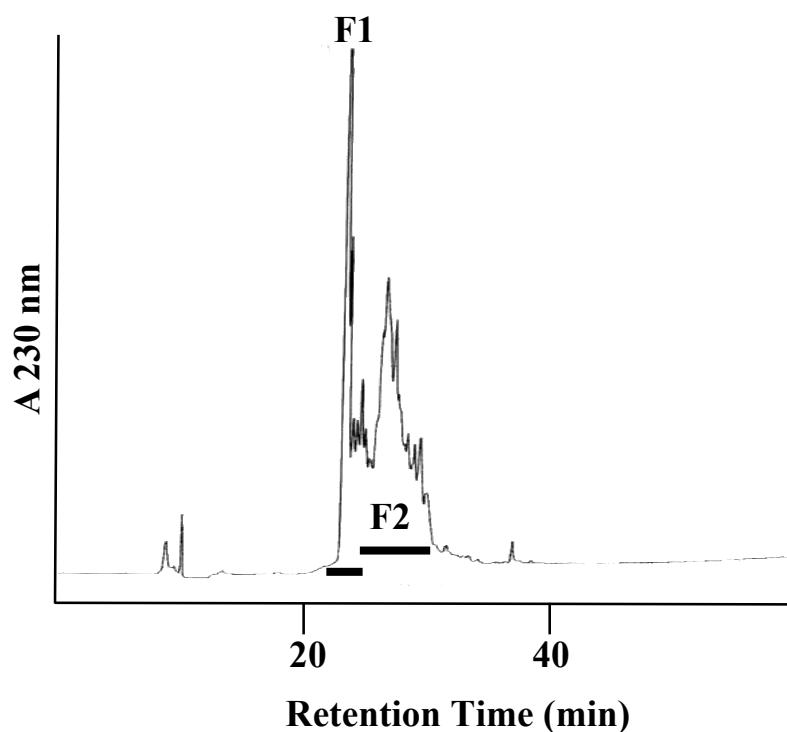


図 6 0.1%TFA 画分中に含まれるブタ膠様物由来糖ペプチドの RP-HPLC 精製

Column: Cosmosil Packed Column 5C₁₈-AR-II (1.0 × 25 cm)

Solvent A: 0.1%TFA

Solvent B: 0.1%TFA/80%アセトニトリル

| Time (min) | 0 | 5 | 65 | 66 |
|---------------|-----|-----|----|-----|
| Solvent A (%) | 100 | 100 | 20 | 100 |
| Solvent B (%) | 0 | 0 | 80 | 0 |

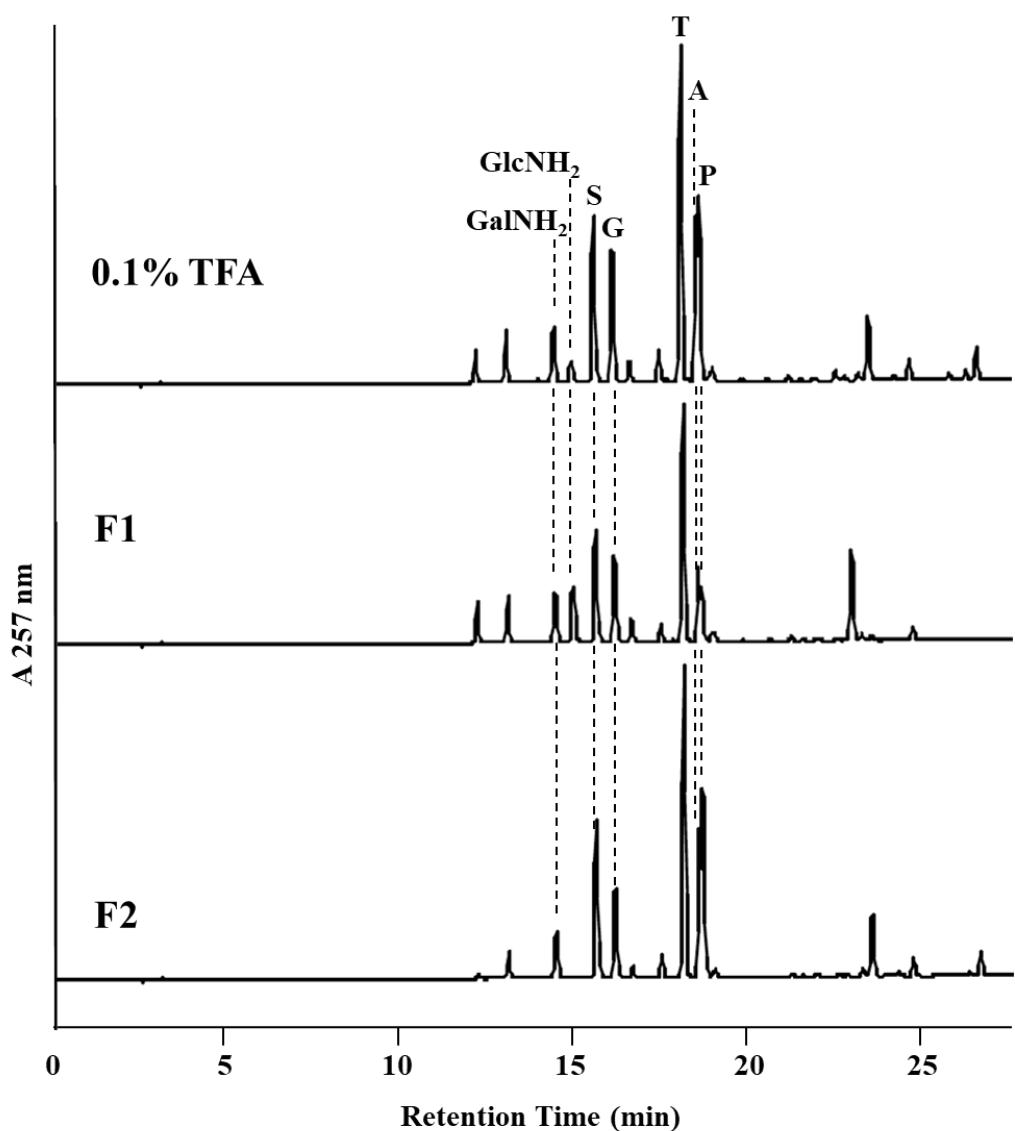


図 7 ブタ膠様物由来糖ペプチドのアミノ酸組成分析

上, 0.1%TFA 画分; 中央, RP-HPLC の F1 画分; 下, RP-HPLC の F2 画分

Column : COSMOSIL Packed Column 5C₂₂-AR-II Φ4.6 × 250 mm
 Solvent A : 0.14 M 酢酸ナトリウム/0.05% TEA/0.5%MeCN (pH 6.25)
 Solvent B : 60%MeCN

| Time (min) | 0 | 3 | 25 | 27 | 30 | 36 |
|---------------|-----|-----|----|-----|-----|-----|
| Solvent A (%) | 100 | 100 | 49 | 0 | 0 | 100 |
| Solvent B (%) | 0 | 0 | 51 | 100 | 100 | 0 |

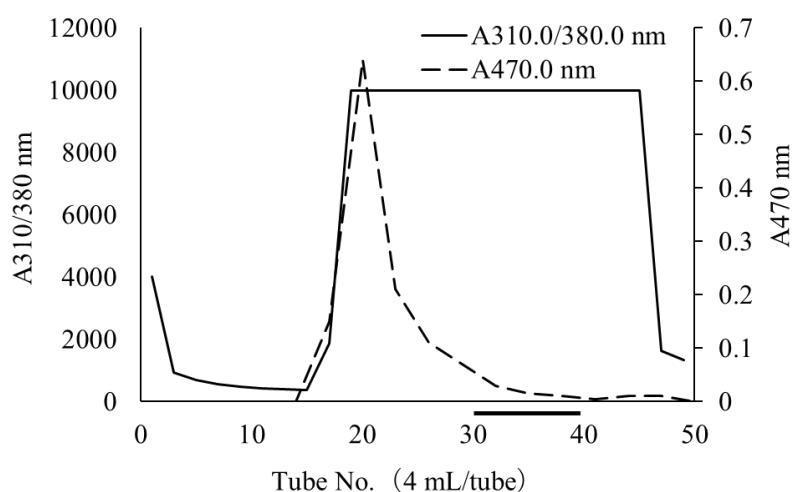


図 8 ブタ膠様物由来糖ペプチドから遊離させた糖鎖の PA 化後のゲルろ過

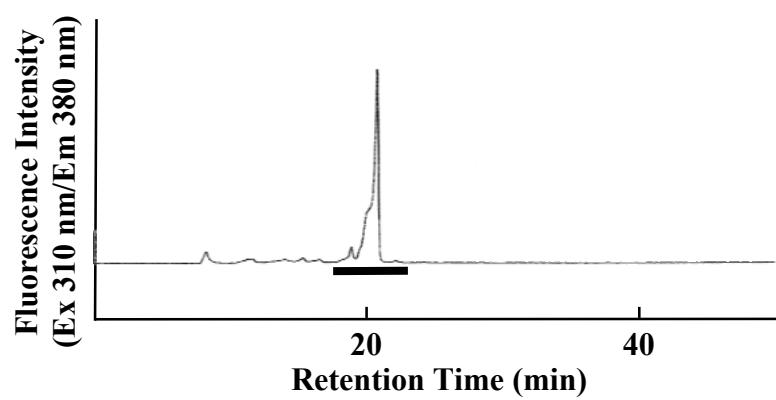


図 9 ブタ膠様物由来糖ペプチドから調整した PA 糖鎖の RP-HPLC 分取

Column : COSMOSIL Packed Column 5C₁₈-AR-II Φ6.0 × 250 mm)

Solvent A : 0.02% TFA

Solvent B : 20% MeCN/ 0.02% TFA

| Time (min) | 0 | 5 | 45 | 46 |
|---------------|-----|-----|----|-----|
| Solvent A (%) | 100 | 100 | 65 | 100 |
| Solvent B (%) | 0 | 0 | 35 | 0 |

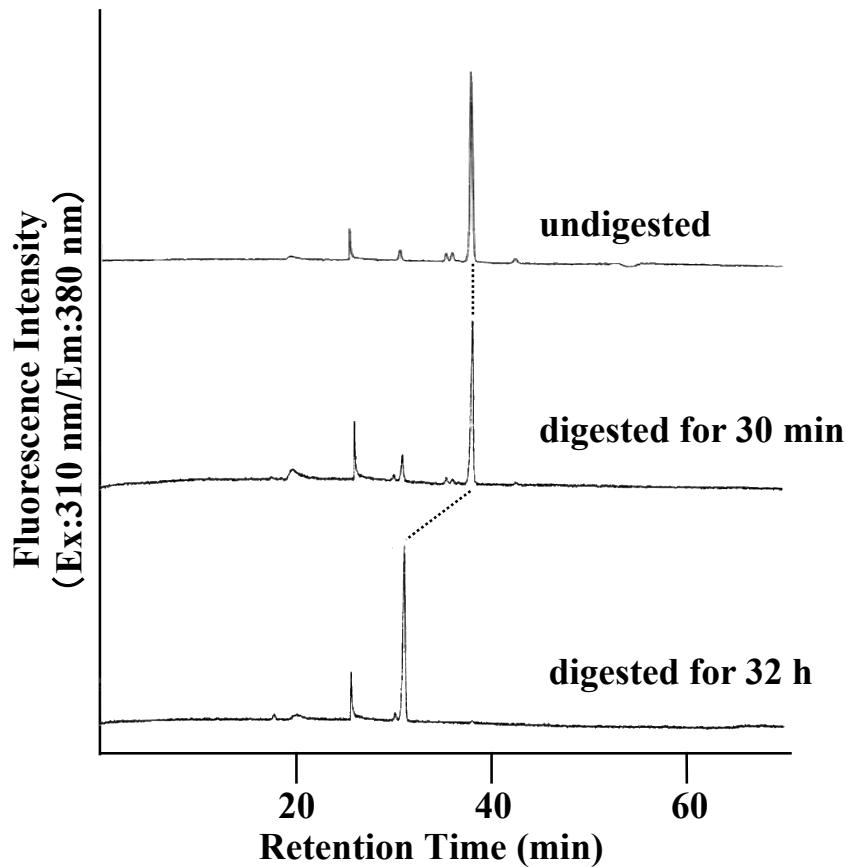


図 10 ブタ膠様物由来糖ペプチドから調整した PA 糖鎖の α 2,3-シアリダーゼ消化後の RP-HPLC プロファイル

上, 未消化; 中, 酵素量 150 mU, 消化時間 30 分; 下, 酵素量 450 mU, 消化時間 32 時間

Column : COSMOSIL Packed Column 5C₁₈-AR-II Φ10.0 × 250mm)
 Solvent A : 0.02% TFA
 Solvent B : 20% MeCN/ 0.02% TFA

| Time (min) | 0 | 5 | 65 | 66 |
|---------------|-----|-----|----|-----|
| Solvent A (%) | 100 | 100 | 65 | 100 |
| Solvent B (%) | 0 | 0 | 35 | 0 |

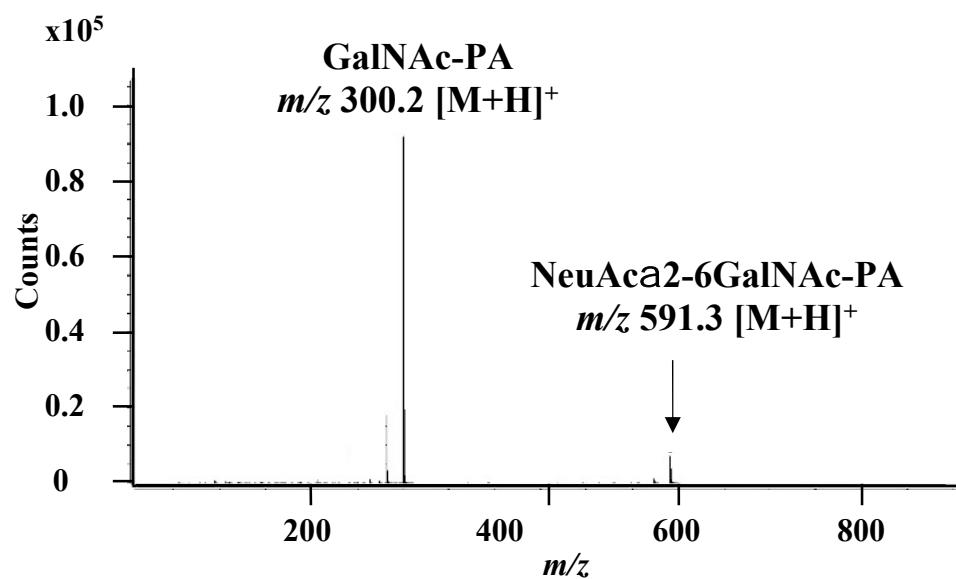
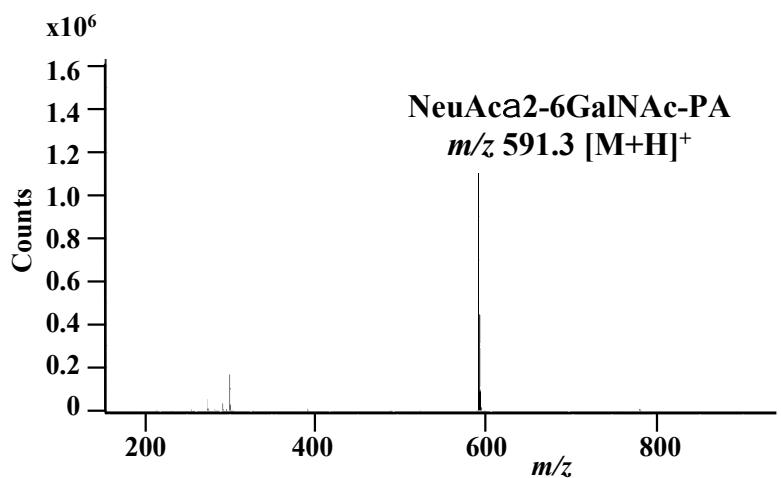


図 11 ブタ膠様物由来糖ペプチドから調整した PA 糖鎖の ESI-MS, MS/MS
上, ESI-MS; 下, MS/MS

第五節 考察

ブタの射出精液中に含まれる膠様物は、自然交配においては、精液の逆流漏出を抑制するために必要だと考えられているが、現在の人工授精技術においては不要物として廃棄されている。ブタ膠様物のムチン様糖タンパク質には、シアリル Tn 抗原が結合していると報告されており³³⁾、本章ではシアリル Tn 抗原に結合する CFL を単離するために必要なアフィニティーガンドの調整のために使用した。ムチン様糖タンパク質を豊富に含むブタ膠様物をアクチナーゼ消化し、ゲルろ過後、Shodex NH₂-P 樹脂を用いた親水性分画により、0.1% TFA 画分および 0.1 N NH₄OH 画分にほとんどの糖ペプチドが回収された。0.1 N NH₄OH 画分には糖ペプチドとペプチドが混在するため、0.1% TFA 画分の糖ペプチドを RP-HPLC に供し、更なる精製を行った。アミノ酸組成分析により、精製糖ペプチドは 5 種類のアミノ酸残基 (S, G, T, A, P) により構成されており、ペプチド部分の構造はある程度は均一であることが示唆された。また、GalNAc の加水分解生成物である GalNH₂ のピークも検出され、糖鎖構造中に GalNAc を有することが明らかになった。精製した糖ペプチドの糖鎖構造は、ヒドラジン分解により糖鎖を遊離させ、蛍光ラベルし、RP-HPLC による精製を行い、酵素消化、ESI-MS 及び MS/MS により解析した。その結果、精製糖ペプチドに結合している糖鎖はシアリル Tn 抗原 (NeuAcα2-6GalNAc) であることが確認された。本章では、凍結乾燥したブタ膠様物 3.2 g から、シアリル Tn 抗原含有糖ペプチド 0.39 g が精製された。ブタ膠様物は、養豚における廃棄物であるため、構造均一なシアリル Tn 抗原を含有した糖ペプチドの有用な供給源となる事が明らかになった。

第三章 ミルレクチンの簡易精製法の確立

第一節 緒言

これまでに緑藻 *Codium fragile* (和名 : ミル) 粗抽出物による、口腔レンサ球菌の一種である *S.mutans* の歯面上の唾液被膜 (ペリクル) を構成する唾液ムチン糖鎖への吸着抑制作用が報告されている。この吸着抑制の機序は、唾液ムチン糖鎖に対する *S.mutans* の吸着を、*Codium fragile* に含まれるレクチンが競合的に阻害していると考えられ、口腔内感染症予防において、唾液ムチン糖鎖に結合するレクチンが有効である可能性が示唆されている^{5,25)}。これらの報告に基づき、緑藻 *Codium fragile* 由来レクチン (CFL) は口腔ケア剤としての応用利用が期待されている。しかしながら、その実用化において、粗抽出物中に含まれる有効成分である CFL の定性・定量が課題となつておらず、一般的な品質管理システムに応用可能な簡便な精製法が要求されている。

そこで本章では、緑藻 *Codium fragile* に含まれる CFL の定性・定量を迅速かつ簡便に行うために、第二章で精製されたシアリル Tn 抗原含有糖ペプチドを結合させたアフィニティカラムを作成し、緑藻 *Codium fragile* の部分精製物からシアリル Tn 抗原結合アフィニティカラムにより CFL を精製可能な新規簡易精製法の確立を行つた。

第二節 材料・試薬

緑藻 *Codium fragile* (ミル) は三重県沿岸部にて採集した。臭化シアンは和光社製のものを用いた。Toyopearl Butyl は東ソー株式会社から、 Sepharose CL-4B および遠心濃縮用メンブレン VIVASPIN 15R (10,000 MW) は GE Healthcare Japan から購入したものを用いた。ヒト A 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。

第三節 実験方法

第一項 アフィニティーゲルの作成

前章に示す方法によりシアリル Tn 抗原含有糖ペプチド 600 mg を調製した。 Sepharose CL-4 B (200 mL) を 5 倍量の脱塩水で洗浄後、 0.5 M Na₂CO₃ 水溶液 (pH 10.5) を 40 mL 加え、緩やかに混合した。アセトニトリル (40 mL) に溶解させた臭化シアン (25 mg) を、加えることで樹脂の活性化を行った。その後、氷上で 4N NaOH 水溶液を滴下することで、pH が 10.5 になるよう調整した。臭化シアン活性化樹脂は 2 L の 0.1 M NaHCO₃ 水溶液で洗浄した。その後、シアリル Tn 抗原含有糖ペプチド (600 mg) を溶解した 30 mL の 0.1 M NaHCO₃ 水溶液を樹脂に加え混合し、氷上でスターラーを用いて 1 時間緩やかに攪拌、4°Cで 16 時間静置して糖ペプチドを樹脂へカップリングした。反応後の上清の吸光度 A230 nm を測定することにより、シアリル Tn 抗原含有糖ペプチドの樹脂への結合率を計算した。 反応後の樹脂は 1 L の 0.1 M NaHCO₃ 水溶液で洗浄後、塩酸エタノールアミン (10 g) を含む 0.1 M NaHCO₃ 水溶液に懸濁し、氷上でスターラーを用いて 3 時間緩やかに攪拌することで残存する活性基をブロックした。反応後の樹脂は、アジ化ナトリウムを含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.8) に平衡化し、4°Cで保存した。

第二項 疎水カラムクロマトグラフィーによる CFL の部分精製

緑藻 *Codium fragile* (2.5 kg) をミキサーで粉碎し、アセトン (12 L) によって脱脂した。アセトン脱脂物 (79.4 g) を 4 L の 0.1 M NaCl / 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.8) に懸濁し、可溶性タンパク質を 4°C で 1 時間抽出した。その後、2 枚重ねのガーゼでろ過し、ろ液を遠心分離 (12,000 g, 4°C, 20 min) し、上清を回収後、100%飽和硫酸アンモニウムにより塩析した。遠心分離 (12,000 g, 4°C, 20 min) 後、タンパク質沈殿物を少量の脱塩水で懸濁し、10 L の 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.8) に対して透析した (4°C, 24 h)。透析内液を遠心分離 (12,000 g, 4°C, 20 min) し、その上清のタンパク質溶液 (200 mL) を回収し、1.5 M 硫酸アンモニウムを含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) で平衡化した Butyl-toyopearl カラム (ϕ 4.4 × 36 cm) に供した。同じ緩衝液で非吸着画分を洗浄後、吸着しているタンパク質は、硫酸アンモニウム濃度をリニアグラジエントにより 1.5 M から 0 M まで下げることで溶出させた。各画分について、280 nm の吸光度測定及びヒト A 型赤血球懸濁液を用いた凝集活性測定を行い、凝集活性が検出された画分を回収した (図 12)。

第三項 アフィニティーカラムクロマトグラフィーによる CFL の精製

第二項で部分精製されたタンパク質溶液 (460 mL) は、0.1 M NaCl / 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.8) で平衡化された Sepharose CL-4B column (2.3 × 40 cm) に供し、非特異的に樹脂に結合するタンパク質を取り除いた。非吸着画分を回収し、第一項で作成したシアリル Tn 抗原結合アフィニティーカラム (2.3 × 40 cm) に供した。同じ緩衝液で非吸着画分を洗浄後、吸着しているタンパク質は、0.1 M グリシン-HCl 緩衝液 (pH2.0) を用いて溶出させた。この方法で溶出しなかったタンパク質は、4M グアニジン塩酸塩 / 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.8) を用いて

溶出させた。各画分について、280 nm の吸光度測定及びヒト A 型赤血球懸濁液を用いた凝集活性測定を行い、凝集活性が検出された画分を回収した（図 13）。

第四項 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は、Laemmli らの方法に従って行った。部分精製 CFL 試料 (10 μL) および精製 CFL (10 μL) について、それぞれ、サンプル用緩衝液 (2% SDS, 10% 2-メルカプトエタノール, 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8), 40% グリセリン) を等量混合し、5% 2-メルカプトエタノールの還元条件下で SDS 化処理 (100°C, 3 分) 行った。その後、15% ポリアクリルアミドゲルを用いて、20 mA の定電流で SDS-PAGE を行った。0.25% Coomassie Brilliant Blue R-250 によりゲルを染色後、25% メタノール-7% 酢酸を用いて脱色を行った。分子量は、TaKaRa 社製の標準タンパク質 (Protein Molecular Weight Marker (Low), 97.2 kDa, 66.4 kDa, 44.3 kDa, 29.0 kDa, 20.1 kDa, and 14.3 kDa) を用いて測定した。

第五項 質量分析による精製 CFL の分子量決定

Agilent 6520 series Q-TOF MS system with a dual-electrospray ionization source を使用した。測定は、ガス温度 325°C (ガス流量 5 L / min, フラグメントー 300 V, ネブライザ 20 psi, スキマー 66 V, VCap 3500 V) のポジティブモードで行った。精製 CFL を、アセトニトリル/水/ギ酸 (20/80 / 0.1%) に溶解し、0.1 mL / min の流量でシリングジポンプを使用して直接注入することによりイオン源に導入した。1 秒あたり 1 スキャンで m/z 100 から 3200 にかけて取込みを行った。デコンボリューションは、MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis with BioConfirm Software (version B.06.00, Agilent Technologies) を使用した。

第四節 実験結果

第一項 アフィニティーグルの作成

第二章で精製したシアリル Tn 抗原含有糖ペプチドを臭化シアン法により Sepharose CL-4B に結合させシアリル Tn 抗原結合アフィニティーカラムを作成した。その結合率は Sepharose CL-4B 1mLあたり糖ペプチド 2.8 mg であり、反応に用いたシアリル Tn 抗原含有糖ペプチドの 93%が担体に結合した。

第二項 疎水カラムクロマトグラフィーによる CFL の部分精製

実験方法で述べたように、緑藻 *Codium fragile* のアセトン脱脂物からタンパク質粗抽出液を調整し、Butyl-toyopearl カラムに供し、ヒト A 型赤血球に凝集活性を示した下線部を CFL 部分精製画分として得た（図 12）。

第三項 アフィニティーカラムクロマトグラフィーによる CFL の精製

実験方法で述べたように、疎水クロマトにより部分精製した CFL 画分は、シアリル Tn 抗原結合アフィニティーカラムへ供し、その大部分のタンパク質がシアリル Tn 抗原結合アフィニティーカラムに吸着した。樹脂に結合したタンパク質は、0.1 M グリシン-HCl 緩衝液 (pH2.0) による溶出後、4 M グアニジン塩酸塩 / 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.8) を用いて完全に溶出させた（図 13）。0.1 M グリシン-HCl 緩衝液 (pH2.0) 溶出画分は、赤血球凝集活性を示さなかったが、4 M グアニジン塩酸塩溶出画分は、変性剤の存在下であっても強い赤血球凝集活性を示した。4 M グアニジン塩酸塩溶出画分から精製された CFL は、赤血球凝集活性陽性画分を回収後、脱塩水に対して透析し、凍結乾燥した。以上の結果から、緑藻 *Codium fragile*（湿重量：2.5kg）のアセトン脱脂物 79.4 g から精製された CFL の収量は 7.0 mg であった。また、精製 CFL は SDS-PAGE により、還元条件下で 12

kDa 付近にシングルバンドとして検出され (図 14), ESI-MS により分子量は 12,309.8 であることが明らかになった (図 15)。

疎水クロマトグラム ($\varphi 4.4 \times 36\text{ cm}$)

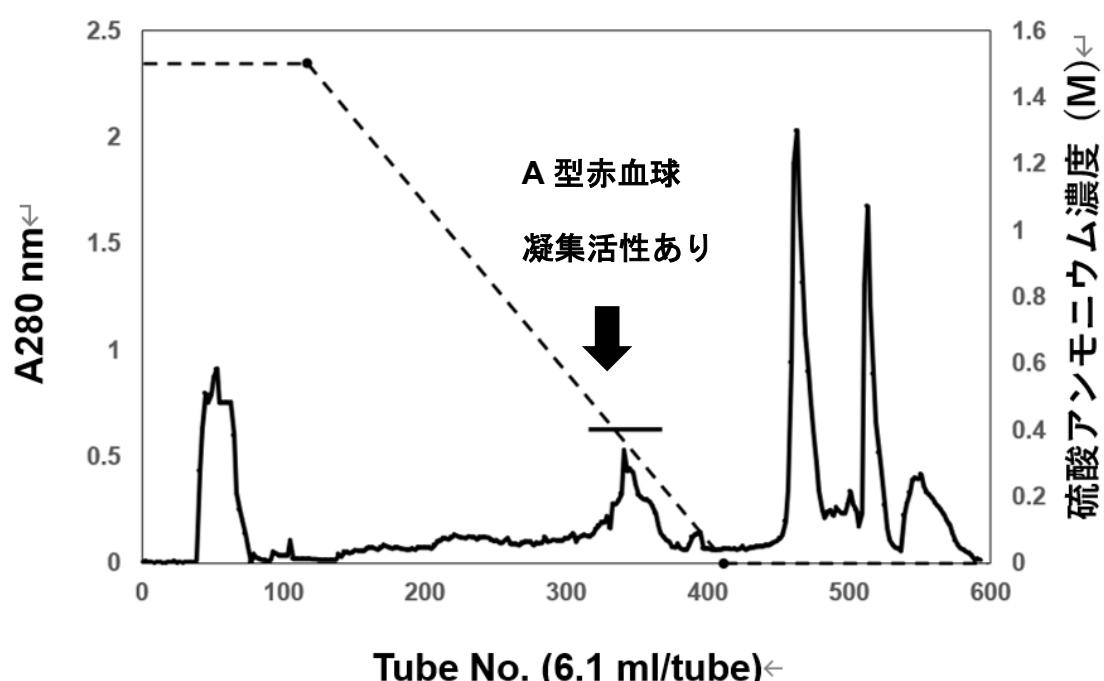


図 12 緑藻 *Codium fragile* 粗抽出物の疎水カラムクロマトグラフィー

シアリル Tn 抗原アフィニティーカラムクロマト ($\varphi 2.3 \times 40 \text{ cm}$) ↳

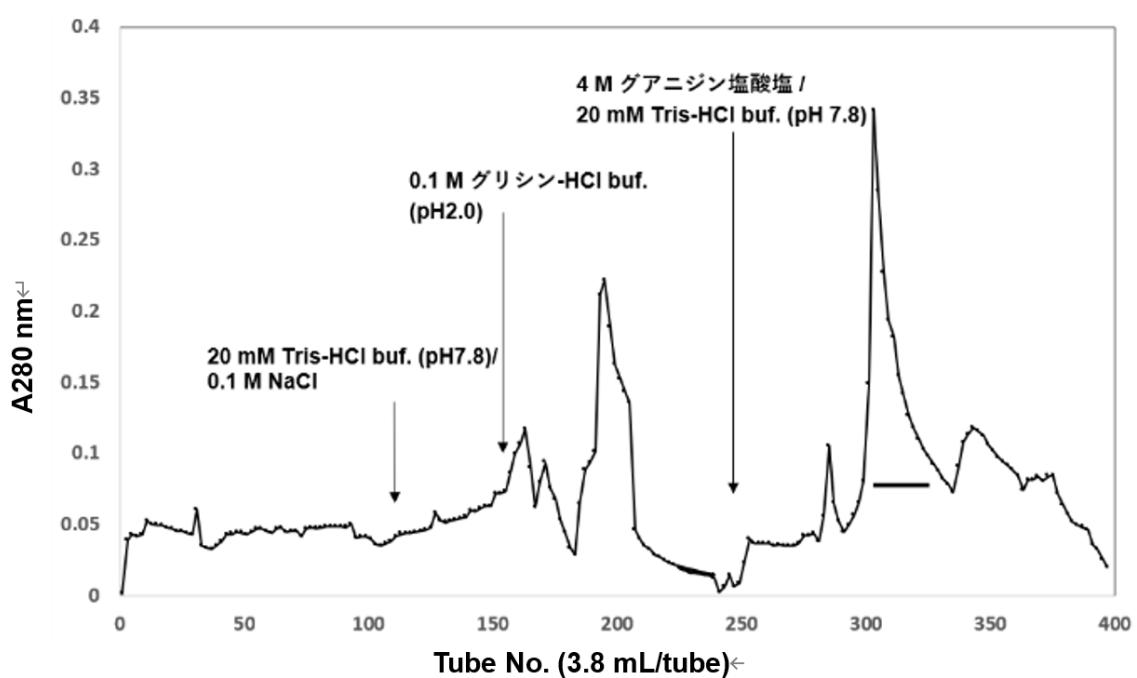


図 13 シアリル Tn 抗原結合アフィニティーカラムクロマトグラフィー

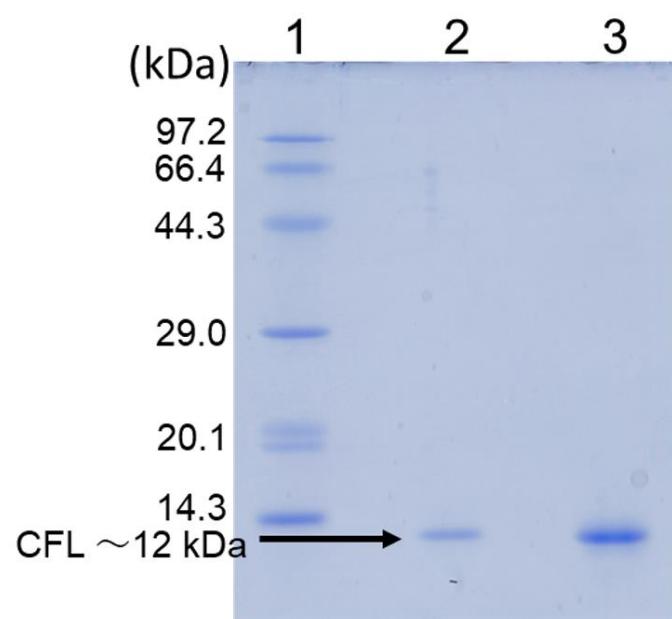


図 14 SDS-PAGE

1, Marker proteins; 2, 疎水カラムクロマトグラフィー部分精製画分; 3, シアリル Tn 結合アフィニティーカラムクロマトグラフィー精製画分

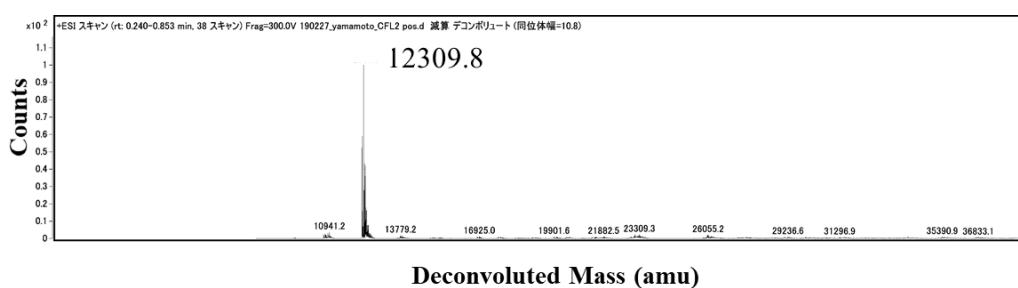


図 15 質量分析による CFL の分子量の決定

第五節 考察

本章では、第二章で精製したシアリル Tn 抗原含有糖ペプチドを臭化シアン法により Sepharose CL-4B に結合させシアリル Tn 抗原結合アフィニティカラムを作成した（結合率：糖ペプチド 2.8 mg/1 mL 樹脂）。疎水性クロマトグラフィーにより部分精製した CFL は、アフィニティカラムの担体である Sepharose CL-4B に供し、非吸着画分を、作成したシアリル Tn 抗原結合アフィニティカラムに供し、0.1 M グリシン-HCl 緩衝液 (pH2.0) による溶出後、4 M グアニジン塩酸塩を用いて CFL を溶出した。レクチン活性は、先行研究²⁴⁾にて CFL に A 型赤血球糖鎖への結合性が示されており、A 型赤血球の凝集活性を測定することで確認した。

0.1 M グリシン-HCl 緩衝液 (pH2.0) 溶出画分には、A 型赤血球への凝集活性が検出されず、精製 CFL は 4 M グアニジン塩酸塩画分から回収され、変性剤の存在下であっても A 型赤血球への凝集活性が保持されていたことから、CFL は安定な立体構造を有することが推察された。本章では、緑藻 *Codium fragile* のアセトン脱脂物 79.4 g から CFL を 7.0 mg 精製することに成功した。また、精製 CFL は SDS-PAGE により、還元条件下で 12 kDa 付近にシングルバンドとして検出され、ESI-MS により分子量は 12,309.8 であることが明らかになった。

以上の結果から、シアリル Tn 抗原含有糖ペプチドを結合させたアフィニティカラムを用いることで、緑藻 *Codium fragile* の粗抽出タンパク質溶液から CFL を簡易に精製する新しい方法を確立することができた。

第四章 CFL の一次構造解析

第一節 緒言

第三章では、シアリルTn抗原結合アフィニティカラムに、疎水性クロマトグラフィーにより部分精製したCFLを供し、0.1Mグリシン-HCl緩衝液(pH2.0)による溶出後、4Mグアニジン塩酸塩を用いてCFLを溶出した。精製CFLは4Mグアニジン塩酸塩画分から回収され、変性剤の存在下であってもヒトA型赤血球への凝集活性が保持されていたことから、CFLは安定な立体構造を有することが推察された。緑藻*Codium fragile*のアセトン脱脂物79.4gからCFLを7.0mg精製することに成功し、精製CFLはSDS-PAGEにより、還元条件下で12kDa付近にシングルバンドとして検出され、ESI-MSにより分子量は12,309.8であることが明らかになった。

そこで本章では、精製CFLの糖鎖認識における分子メカニズムを明らかにするためにX線結晶構造解析を目的として一次構造解析を行った。また、得られたCFLアミノ酸配列情報を用いて相同性解析を行った。

第二節 材料・試薬

トリプシン(ウシ膵臓由来)、 α -キモトリプシン(ウシ膵臓由来)、ペプシン(ブタ胃粘膜由来)はSigma-Aldrichから購入したもの用いた。Cosmosil 5C18-ARII(4.6 x 250 mm)はナカライトスク社製のものを用いた。

第三節 実験方法

第一項 N末端アミノ酸配列分析

精製CFLは、15%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにより分離後、エ

レクトロプロッティングによって泳動ゲルから Amersham Hybond-P polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に転写 (100 mA, 定電流, 1 時間) した。CFL を転写した PVDF 膜は、Coomassie Brilliant Blue R-250 による染色後、バンドを切り出し、ペプチドシーケンサー PPSQ-31A により N 末端アミノ酸配列分析を行った。

第二項 内部アミノ酸配列分析

3-1 トリプシン消化

精製 CFL (80 µg) は、6 M グアニジン塩酸塩／0.4 M 重炭酸アンモニウム (50 µL) の変性条件下、45 mM DDT (5 µL) を加え還元した (50°C, 15 分)。その後、0.1 M ヨードアセトアミドを 5 µL 加え、アルキル化を行った (室温, 15 分)。超純水を 140 µL 加えて希釀した後、トリプシンを 1 µg (精製 CFL の約 100 分の 1 量) を加え酵素消化した (37°C, 16 時間)。酢酸 (原液) を 30%になるよう加えることで、酵素反応を停止させ、遠心後、その上清を RP-HPLC に供与した。

3-2 キモトリプシン消化

精製 CFL (80 µg) は、6 M グアニジン塩酸塩／0.4 M 重炭酸アンモニウム (50 µL) の変性条件下、45 mM DDT (5 µL) を加え還元した (50°C, 15 分)。その後、0.1 M ヨードアセトアミドを 5 µL 加え、アルキル化を行った (室温, 15 分)。超純水を 140 µL 加えて希釀した後、 α -キモトリプシンを 1 µg (精製 CFL の約 100 分の 1 量) を加え酵素消化した (30°C, 16 時間)。酢酸 (原液) を 30%になるよう加えることで、酵素反応を停止させ、遠心後、その上清を RP-HPLC に供与した。

3-3 ペプシン消化

精製 CFL (1 mg) は、50% ギ酸を 100 μL 加え、溶解後、純水を 900 μL 加え終濃度 5% ギ酸とした。そこに、ペプシン 10 μg (精製 CFL の 100 分の 1 量) を加え酵素消化した (37°C, 20 時間)。酵素反応後、反応液を遠心し、その上清を RP-HPLC に供与した。

第四項 相同性解析

相同性解析は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の提供する Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて行った。multiple sequence alignment は、京都大学 Bioinformatics Center, GenomeNet の提供する CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) を用いて行った。ドメイン検索は、European Bioinformatics Institute の提供する Pfam version 34.0 (<http://pfam.xfam.org/>) を用いて行った。

第四節 実験結果

第一項 N 末端アミノ酸配列分析

ペプチドシーケンサーにより CFL の N 末端アミノ酸配列 (38 残基) を決定することが出来た (図 16)。

| | |
|---|----|
| F Q T G I V Q E S G F G D E S E C P V R | 20 |
| P W T T A Q S E A R E R F I P P V T | 38 |

図 16 CFL の N 末端アミノ酸配列

第二項 内部アミノ酸配列分析

3-1 トリプシン消化

トリプシン消化物を RP-HPLC に供し、得られたピークを分取後、ペプチド断片の N 末端配列の解析を行った (図 17)。同定されたアミノ酸配列は表 2 に示した。ピーカー 1 から精製されたペプチド断片のアミノ酸配列は、S-P-P-P-A- であった。ピーカー 2, 3, 4 については、CFL の N 末端配列が主要アミノ酸配列として同定され、混在するマイナーなペプチド断片のアミノ酸配列については決定することができなかった。

表 2 トリプシン消化物から同定されたアミノ酸配列

1. **S-P-P-P-A-**
2. **F-Q-T-G-I-**
3. **F-Q-T-G-I-V-Q-E-S-G-**
4. **F-Q-T-G-I-V-Q-E-S-G-**

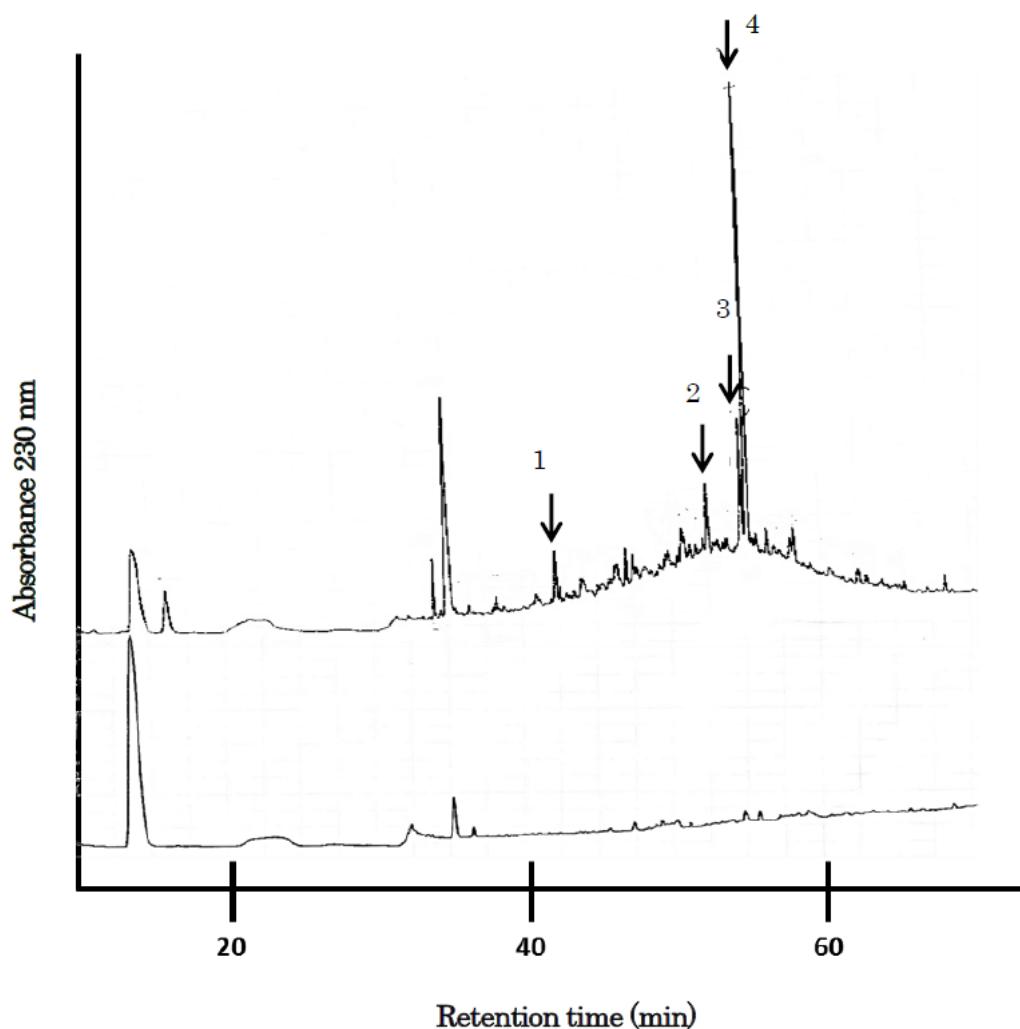


図 17 CFL のトリプシン消化物の逆相クロマトグラム

(上) CFL トリプシン消化物, (下) トリプシン自己消化物

Column : COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (4.6×250 mm)

Solvent A : 0.1%TFA

Solvent B : 0.1%TFA / 80% MeCN

| Time(min) | 0 | 20 | 85 | 86 |
|-----------|-----|-----|----|-----|
| Solvent A | 100 | 100 | 20 | 100 |
| Solvent B | 0 | 0 | 80 | 0 |

3-2 キモトリプシン消化

キモトリプシン消化物を RP-HPLC に供し、得られたピークを分取後、ペプチド断片の N 末端配列の解析を行った (図 18)。同定されたアミノ酸配列は表 3 に示した。ピーク 1 から精製されたペプチド断片のアミノ酸配列は、Q-L-D-P-V-A-S- であった。ピーク * については複数のペプチド断片の存在が確認されたため、アミノ酸配列情報を得ることはできなかった。

表 3 キモトリプシン消化物から同定されたアミノ酸配列

1. Q-L-D-P-V-A-S-

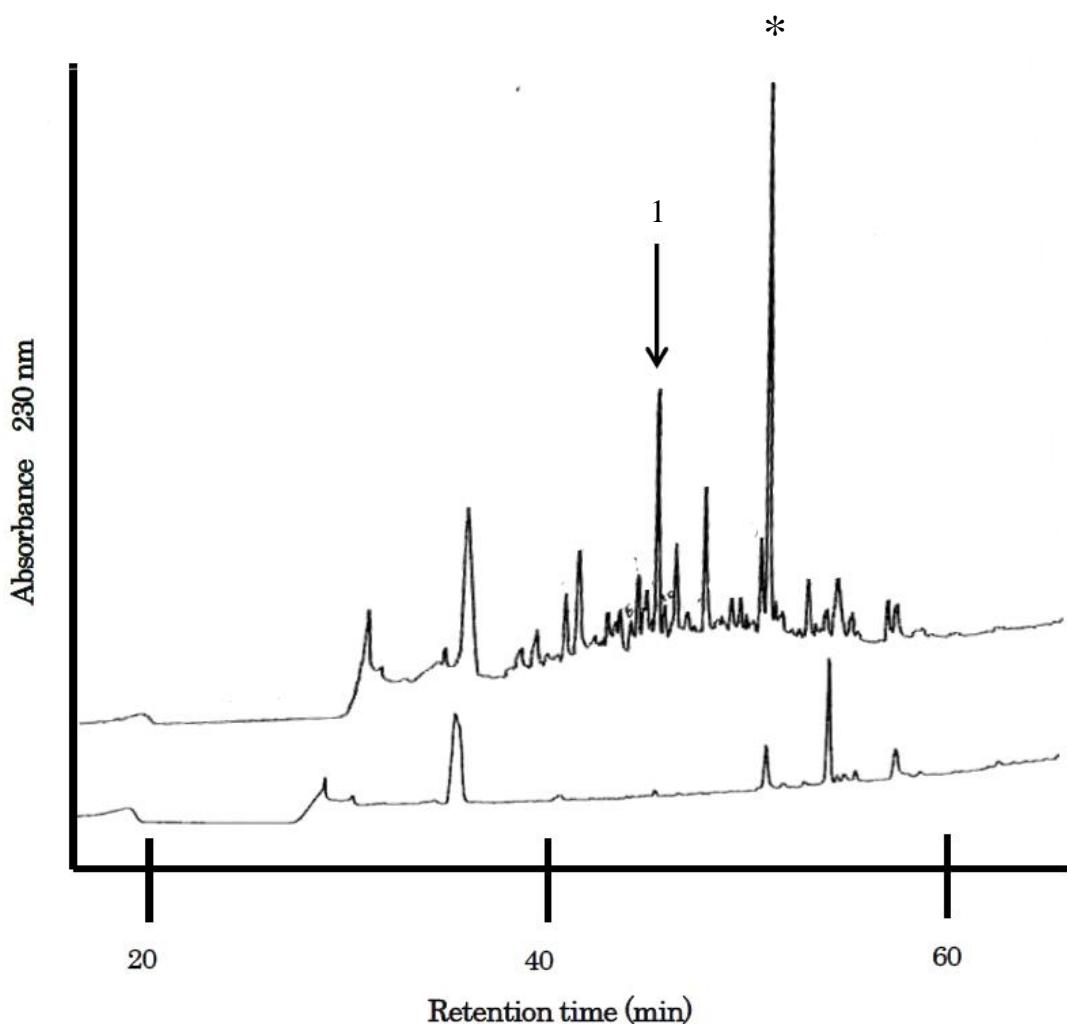


図 18 CFL のキモトリプシン消化物の逆相クロマトグラム
 (上) CFL キモトリプシン消化物, (下) キモトリプシン自己消化物

* Not identified

Column : COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (4.6×250 mm)

Solvent A : 0.1%TFA

Solvent B : 0.1%TFA / 80% MeCN

| Time(min) | 0 | 20 | 85 | 86 |
|-----------|-----|-----|----|-----|
| Solvent A | 100 | 100 | 20 | 100 |
| Solvent B | 0 | 0 | 80 | 0 |

3-3 ペプシン消化

ペプシン消化物を RP-HPLC に供し、得られたピークを分取後、ペプチド断片の N 末端配列の解析を行った(図 19)。同定されたアミノ酸配列は表 4 に示した。ピーケ 1, ピーケ 2, ピーケ 3 から精製されたペプチド断片のアミノ酸配列は、それぞれ A-R-D-V-T-, L-T-E-A-R-D-V-, V-R-E-D-V-K-Y-D-S- であった。ピーケ * については複数のペプチド断片の存在が確認されたため、アミノ酸配列情報を得ることはできなかった。

表 4 ペプシン消化物から同定されたアミノ酸配列

- 1. A-R-D-V-T-**
- 2. L-T-E-A-R-D-V-**
- 3. V-R-E-D-V-K-Y-D-S-**

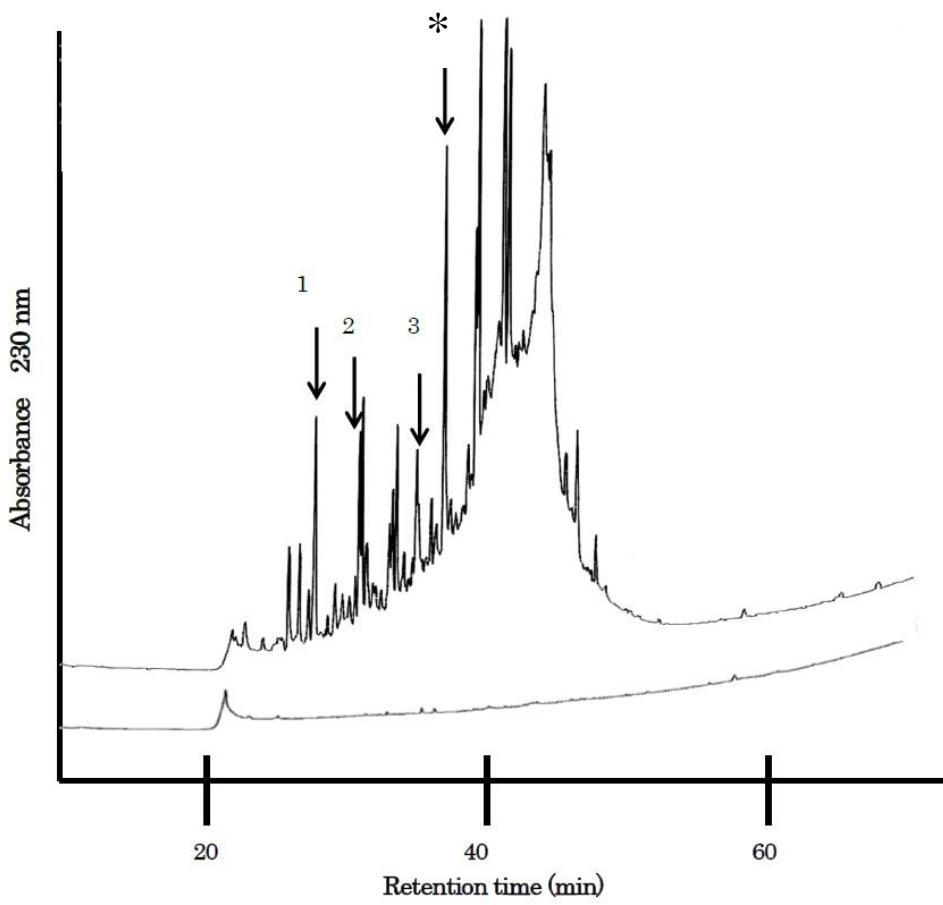


図 19 CFL のペプシン消化物の逆相クロマトグラム

(上) CFL ペプシン消化物, (下) ペプシン自己消化物

* Not identified

Column : COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (4.6×250 mm)

Solvent A : 0.1%TFA

Solvent B : 0.1%TFA / 80% MeCN

| Time(min) | 0 | 20 | 85 | 86 |
|-----------|-----|-----|----|-----|
| Solvent A | 100 | 100 | 20 | 100 |
| Solvent B | 0 | 0 | 80 | 0 |

第三項 相同性解析

CFL の N 末端アミノ酸配列分析により同定された 38 残基 (F-Q-T-G-I-V-Q-E-S-G-F-G-D-E-S-E-C-P-V-R-P-W-T-T-A-Q-S-E-A-R-E-R-F-I-P-P-V-T-) のアミノ酸配列情報を用いて、BLAST により相同性解析を行った結果、唯一、ハネモ科の緑藻である *Bryopsis plumose* に含まれるレクチン BPL-3 と高い相同性を有することが明らかになった（図 20）³⁹⁾。また、CLUSTALW による multiple sequence alignment により、ペプシン消化により得られた内部アミノ酸配列（L-T-E-A-R-D-V-, V-R-E-D-V-K-Y-D-S-）も BPL-3 との相同性が見出された（図 20）。CFL の分子量（12,309.8）からアミノ酸残基数をおよそ 112 残基と仮定すると、CFL のアミノ酸配列の約 48% を決定することが出来た。

また、BPL-3 は Pfam のドメイン検索により、GalNAc 結合性の H 型レクチンドメインを有する事が明らかになった（図 21）。このドメインは、Roman snail（エスカルゴ）のタンパク腺にある *Helix pomatia agglutinin* (HPA) レクチンに存在しており、X 線結晶構造解析により、単量体は 6 つの鎖から成る逆平行 β サンドイッチ構造を持つ事が知られている（図 21）⁴⁰⁾。CFL にも同様の H 型レクチンドメインが存在している可能性が示唆された。

| | | |
|----------------|----------|---|
| BPL-3// | 1 | TDVGSVQVRGLGDRSSCPVKPWTAAQTSAREKVVS |
| CFL// | | FQTGIVQESGFGDESECPVRPWTAAQSEARERFIP |
| | | : . * * * * . * . * * * : * * * * * : . * * * : . : . |
| 36 | | |
| BPL-3// | | VKFDIPYSSTPKVALSLSGMDMDTKYNTRINTSVE |
| CFL// | | PVT-----VREDVKYDS----- |
| | | : * . * * : : |
| 71 | | |
| BPL-3// | | NLTNEGFDLKVGWCNTYAYMLDVTYVVVPAPYAAAG |
| CFL// | | -LT-EARDV----- |
| | | * * * . * : |

図 20 CFL と BPL-3 との相同性解析

BPL-3, ハネモ科緑藻 *Bryopsis plumose* 由来レクチン³⁹⁾。黄色ハイライトは BPL-3 の H-type lectin domain を示す。

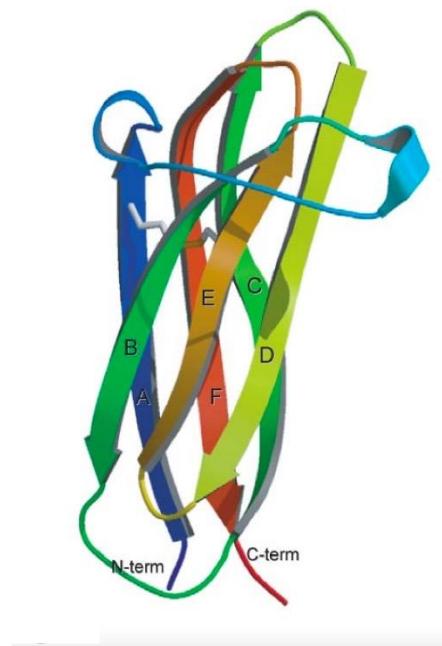


図 21 HPA の結晶構造⁴⁰⁾

Helix pomatia agglutinin (HPA), a GalNAc binding lectin, found in the albumen gland of the roman snail. Sanchez JF., et al., J. Biol. Chem., 281, 20171-20180 (2006) ここに示された単量体は 6 つの鎖から成る逆平行 β サンドイッチ構造を持つ。

第五節 考察

第三章で得られた精製 CFL を N 末端アミノ酸配列分析した結果、N 末端から 38 残基 (F-Q-T-G-I-V-Q-E-S-G-F-G-D-E-S-E-C-P-V-R-P-W-T-T-A-Q-S-E-A-R-E-R-F-I-P-P-V-T-) までが同定された。また、精製 CFL の各種プロテアーゼ（トリプシン、キモトリプシン、ペプシン）消化物を RP-HPLC に供し、得られたペプチド断片の N 末端配列分析により、複数の内部アミノ酸配列情報 (S-P-P-P-A-, Q-L-D-P-V-A-S-, L-T-E-A-R-D-V-, V-R-E-D-V-K-Y-D-S-) を得ることが出来た。しかしながら、CFL の一次構造の約 52%は同定に至っておらず、遺伝子同定のためにも、全アミノ酸配列の決定は、今後の重要な課題となった。

CFL の N 末端アミノ酸配列 (38 残基) を用いた相同性解析により、唯一、ハネモ科の緑藻である *Bryopsis plumose* に含まれるレクチン BPL-3 との高い相同性が明らかになった。この結果から、精製 CFL は、これまでに緑藻ミル科では報告のない新規レクチンであることが明らかになった。BPL-3 は、Jong Won Han らによってハネモ科の緑藻である *Bryopsis plumose* から同定されたレクチンであり、SDS-PAGE と MALDI-TOF MS により分子量 11.5 kDa の単量体であることが報告されている³⁹⁾。また BPL-3 は、D-GalNAc や D-GlcNAc 結合性であり、ヒト赤血球凝集活性については、全ての血液型に凝集活性を示し、特に D-GalNAc を非還元末端に有する A 型赤血球を優先的に凝集させる³⁹⁾。ドメイン検索により、BPL-3 には、D-GalNAc 結合性の H 型レクチンドメインが存在しており、シアリル Tn 抗原に結合性を持つ CFL にも同様のドメインが存在している可能性が推定された⁴⁰⁾。

総括

緑藻 *Codium fragile* 由来のレクチン (CFL) は、口腔感染症の最初期の段階である、レンサ球菌の歯面吸着を阻害する働きが報告されており、う蝕や歯周病といった口腔感染症の治癒・予防剤として利用できる可能性がある。このアプローチは、既存の治療法である抗菌剤を用いた口腔内洗浄⁴¹⁾と組み合わせることが可能であり、健康食品、医薬品等への応用が検討されている。しかしながら、その実用化において、粗抽出物中に含まれる有効成分である CFL の定性・定量が課題となつており、一般的な品質管理システムに応用可能な簡便な精製法が要求されている。

そこで本博士論文では、*Codium fragile* に含まれる CFL をハイスループットに定性・定量するために、CFL のリガンドとして報告されているシアリル Tn 抗原含有糖ペプチドを結合させたアフィニティカラムを用いた新規簡易精製法の確立を行った。また、精製 CFL の糖鎖認識における分子メカニズムを明らかにするために X 線結晶構造解析を目的として一次構造解析を行った。

まず第二章において、シアリル Tn 抗原に結合する CFL を単離するために必要なアフィニティリガンドの精製を行った。ムチン様糖タンパク質を豊富に含むブタ膠様物をアクチナーゼ消化し、ゲルろ過後、Shodex NH₂-P 樹脂を用いた親水性分画により、0.1% TFA 画分および 0.1 N NH₄OH 画分にほとんどの糖ペプチドが回収された。0.1 N NH₄OH 画分には糖ペプチドとペプチドが混在するため、0.1% TFA 画分の糖ペプチドを RP-HPLC に供し、更なる精製を行った。アミノ酸組成分析により、精製糖ペプチドは 5 種類のアミノ酸残基 (S, G, T, A, P) により構成されており、ペプチド部分の構造はある程度は均一であることが示唆された。また、GalNAc の加水分解生成物である GalNH₂ のピークも検出され、糖鎖構造中に GalNAc を有することが明らかになった。精製した糖ペプチドの糖鎖構造は、ヒド

ラジン分解により糖鎖を遊離させ、蛍光ラベルし、RP-HPLC による精製を行い、酵素消化、ESI-MS 及び MS/MS により解析した。その結果、精製糖ペプチドに結合している糖鎖はシアリル Tn 抗原 (NeuAcα2-6GalNAc) であることが確認された。本章では、凍結乾燥したブタ膠様物 3.2 g から、シアリル Tn 抗原含有糖ペプチド 0.39 g が精製された。ブタ膠様物は、養豚における廃棄物であるため、構造均一なシアリル Tn 抗原を含有した糖ペプチドの有用な供給源となる事が明らかになった。

第三章では、第二章で精製したシアリル Tn 抗原含有糖ペプチドを臭化シアン法により Sepharose CL-4B に結合させシアリル Tn 抗原結合アフィニティカラムを作成した（結合率：糖ペプチド 2.8 mg/1 mL 樹脂）。作成したアフィニティカラムに、疎水性クロマトグラフィーにより部分精製した CFL を供し、0.1 M グリシン-HCl 緩衝液 (pH2.0) による溶出後、4 M グアニジン塩酸塩を用いて CFL を溶出した。精製 CFL は 4 M グアニジン塩酸塩画分から回収され、変性剤の存在下であっても A 型赤血球への凝集活性が保持されていたことから、CFL は安定な立体構造を有することが推察された。本章では、緑藻 *Codium fragile* のアセトン脱脂物 79.4 g から CFL を 7.0 mg 精製することに成功した。また、精製 CFL は SDS-PAGE により、還元条件下で 12 kDa 付近にシングルバンドとして検出され、ESI-MS により分子量は 12,309.8 であることが明らかになった。

第四章では、CFL の一次構造解析を行い、N 末端アミノ酸配列を 38 残基 (F-Q-T-G-I-V-Q-E-S-G-F-G-D-E-S-E-C-P-V-R-P-W-T-T-A-Q-S-E-A-R-E-R-F-I-P-P-V-T-) 同定した。また内部アミノ酸配列を同定するため、CFL のペプシン消化物を RP-HPLC に供し、得られた 3 つのペプチド断片の N 末端アミノ酸配列を決定した (A-R-D-V-T-, L-T-E-A-R-D-V-, V-R-E-D-V-K-Y-D-S-)。これらの CFL アミノ酸配列情報を用いて相同性解析を行った結果、ハネモ科の緑藻である *Bryopsis plumose* に含まれるレクチン BPL-3 と高い相同性を有することが明らかになった。BPL-3 は GalNAc 結

合性の H 型レクチンドメインを有する事から、CFL にも同様のドメインが存在している可能性が推定された。

本博士論文では、ブタ膠様物に含まれるムチン様糖タンパク質 (3.2 g) からアクリナーゼ消化、ゲルろ過、親水性分画、RP-HPLC によりシアリル Tn 抗原含有糖ペプチド (0.39 g) を多量精製することができた⁴²⁾。更に、その精製シアリル Tn 抗原含有糖ペプチドを結合させたアフィニティカラムを作成し、緑藻 *Codium fragile* のアセトン脱脂物 (79.4 g) から CFL (7.0 mg) を精製し、CFL 簡易精製法の確立に成功した。また、シアリル Tn 抗原に結合性を持つ精製 CFL は、一次構造解析により同定されたアミノ酸配列情報を用いた相同性解析により、ハネモ科の緑藻 *Bryopsis plumose* のレクチン BPL-3 と高い相同性を示すタンパク質であり、これまでもに緑藻ミル科では報告のない新規レクチンであることが明らかになった。

参考文献

- [1] 北島 健, 佐藤ちひろ, 門松健治, 加藤晃一 (2020), 糖鎖生物学, 名古屋大学出版会, p.22-23
- [2] Inka Brockhausen, Jacob Melamed (2021) Mucins as anti-cancer targets: perspectives of the glycobiologist *glycoconjugate journal*, **38**, 459-474.
- [3] 渡辺 明彦, 中谷 勝紀, 澤田 秀智, 山田 行重, 山田 義帰, 矢野 友昭, 中野 博重 (1992) 胃癌における血清シアリル Tn 抗原の臨床的有用性について 日本消化器外科学会雑誌, **25**, 1948-1952
- [4] B.W. Cross, and S. Ruhl. (2018) Glycan recognition at the saliva - oral microbiome interface. *Cellular Immunology*, **333**, 19–33
- [5] Takashi Ito, Yasuhiro Yoshida, Yasuyoshi Shiota, Yuki Ito, Tadashi Yamamoto, Shogo Takashiba (2018) Effects of Lectins on initial attachment of cariogenic *Streptococcus mutans*. *Glycoconj J.*, **35**, 41-51.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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., McMahon. J.B., and Boyd, M.R. (2005) Isolation and characterization of griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from thered

alga Griffithsia sp. *J. Biol. Chem.*, **280**, 9345-9353.

- [9] Hori,K., Sato,Y., Ito,K., Fujiwara,Y., Iwamoto,Y., Makino,H., 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Okuyama, S., Nakamura-Tsuruta, S., Tateno, 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.
- [15] 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 serraagglutinin on colon cancer cells in vitro and in vivo. *Anticancer Drugs*, **17**, 943-947.
- [16] Ziolkowska, N.E. and Wlodawer, A. (2006) Structural studies of algal lectins with anti-HIV activity. *Acta Biochim. Pol.*, **53**, 617-626.
- [17] 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.

[18] 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.

[19] 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.

[20] 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.

[21] 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 endemicalga *Codium giraffa* Silva. *Bot. Mar.*, **42**, 573-580.

[22] 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.

[23] Annick Barre, Els J.M. Van Damme, Mathias Simplicien, Hervé Benoist and Pierre Rougé. (2020) Man-Specific, GalNAc/T/Tn-Specific and Neu5Ac-Specific Seaweed Lectins as Glycan Probes for the SARS-CoV-2 (COVID-19) Coronavirus, *Mar. Drugs*, **18**, 543

[24] 吉家 猛雄 (2014) 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, 岡山大学大学院自然科

学研究科博士論文

- [25] 塩田 康祥 (2015) 海藻由来レクチンを用いた口腔バイオフィルム感染症の制御～有効性と安全性の検討～, 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻博士論文
- [26] Albert M. Wu, Shuh-Chyung Song, Pei-Yi Hwang, June H. Wu, Kenneth S. S. Chang (1995) Binding Studies on the Combining Site of a GalNAcalpha1-Specific Lectin with Thomsen-Friedenreich Activity Prepared from Green Marine Algae *Codium fragile* Subspecies *Tomentosoides*. *Eur. J. Biochem.*, **233**, 145–151.
- [27] 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.
- [28] 佐藤 正光, 正木 淳二, 丹羽 太左衛門 (1980) 豚精液中の膠様物表面に付着する球状物質の組織化学および走査型電子顕微鏡による観察, 家畜繁殖学雑誌, **26**, 212-213
- [29] 佐藤 正光, 正木 淳二, 橋爪 力, 丹羽 太左衛門 (1982) ブタ射出精液中の膠様物表面に付着する球状物質の分泌部位について, **28(1)**, 56-57
- [30] E. F. HARTREE (1962) Sialic Acid in the Bulbo-urethral Glands of the Boar. *Nature*, **196**, 483–484
- [31] Boursnell JC, Hartree EF, Briggs PA. (1970) Studies of the bulbo-urethral (Cowper's)-gland mucin and seminal gel of the boar. *Biochem J.*, **117**, 981-8
- [32] Boursnell JC, Butler EJ. (1973) Studies on properties of the seminal gel of the boar using natural gel and gel formed in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, **34**, 457-65
- [33] Surjit S. Rana, E. V. Chandrasekaran, John Kennedy, Joseph Mendicino (1984) Purification and structures of oligosaccharide chains in swine trachea and Cowper's gland

mucin glycoproteins. *J Biol Chem.* **259**, 12899-907.

[34] Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Robers, P. A., Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.

[35] Maeda M, Takeda N, Mano A, Yamanishi M, Kimura M, Kimura Y. (2013) Large-scale preparation of Asn-glycopeptide carrying structurally homologous antigenic N-glycan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1269-74

[36] Bidlingmeyer BA, Cohen SA, Tarvin TL. (1984) Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. Chromatogr.*, **336**, 93-104

[37] Natsuka, S., and Hase, S. (1998) Analysis of N- and O-glycans by pyridylamination. *Methods Mol. Biol.*, **76**, 101-113.

[38] Hoyer LL, Roggentin P, Schauer R, Vimr ER. (1991) Purification and properties of cloned *Salmonella typhimurium* LT2 sialidase with virus-typical kinetic preference for sialyl alpha 2-3 linkages. *J. Biochem.*, **110**, 462-7.

[39] Jong Won Han, Kang Sup Yoon, Tatyana A. Klochkova, Mi-Sook Hwang, Gwang Hoon Kim (2011) Purification and characterization of a lectin, BPL-3, from the marine green alga *Bryopsis plumosa*. *Journal of Applied Phycology*, **23**, 745-753.

[40] Sanchez JF, Lescar J, Chazalet V, Audfray A, Gagnon J, Alvarez R, Breton C, Imbert A, Mitchell EP. (2006) Biochemical and structural analysis of *Helix pomatia* agglutinin. A hexameric lectin with a novel fold. *J. Biol. Chem.*, **281**, 20171-80

[41] Lang, N. P., and Brecx, M. C. (1986) Chlorhexidine digluconate-an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *J Periodontal Res.*, **21**, 74-89.

[42] Takeuchi R., Maeda M., Nakano M., Funahashi H., Kimura Y. (2021) Large-scale

preparation of sialyl-Tn antigen-containing peptides from mucin-like glycoproteins in boar seminal gel. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 85, 2022-2025

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 前田 恵 准教授に深甚なる謝意を表します。

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 木村 吉伸 教授に深い感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、有益な御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 田村 隆 教授に深い感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、ブタ膠様物をご提供頂きました 岡山県農林水産総合センター畜産研究所 佐々木真也 博士に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、緑藻 *Codium fragile* (ミル) をご提供頂きました 一丸フアルコス株式会社 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、多大なる御協力頂きました岡山大学農学部 糖鎖機能化学研究室 川上 祐佳 様、吉岡 優花 様、繩田 茹子 様、山本 千晴 様、八塚 真悟 様、中野 海藍 様に厚く御礼申し上げます。