

## 受賞者総説

## 海藻のレクチンに関する生化学的研究

(平成 12 年度日本水産学会賞進歩賞受賞)

堀 貫 治\*

広島大学生物生産学部

## Studies on Biochemical Properties of Phycolectins

Kanji Hori\*

*Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan*

糖結合性タンパク質であるレクチンは、糖鎖の相補的リガンドとして、細胞内、細胞間および生体間で重要な役割を担うと考えられている。この物質はウィルスから高等動物にいたる広範囲の生物種に存在し、その生理機能だけでなく医薬・試薬としての応用面からも興味もたれている。<sup>1)</sup>レクチンの分子構造や認識する糖構造は、一般に由来する生物種により異なり多様であるが、主に糖認識ドメインの配列相同性に基づいて動物、植物および細菌内でそれぞれいくつかのファミリーが存在することが明らかにされてきている。<sup>2)</sup>筆者らは、有用レクチンの開発および下等植物におけるレクチンの機能と分子進化を洞察するための基礎として、レクチン研究の中で未解明であった海藻のレクチンに着目し、その分布や生化学的特性を明らかにしてきた。<sup>3,4)</sup>本稿では、筆者らが行った研究の成果を中心に海藻レクチンの特性を概説したい。

## 1. 海藻における分布

日本産海藻の検索から、レクチン（赤血球凝集素）は多くの海藻種に存在すること、海藻のレクチンはヒトよりもウサギやヒツジの動物赤血球、特にそのプロテアーゼ処理したものに強い凝集活性をもつことがわかった。<sup>5,6)</sup>海藻レクチンの上記赤血球種に対する高い親和性は、その後の世界各地での検索結果からも確認されている。なお、スペインの研究グループは検索に魚類赤血球を用い、検索した海藻種すべてに同赤血球凝集活性を検出している。<sup>7)</sup>強い活性種は、緑藻ミル目、紅藻スギノリ目とダルス目に集中しており、海藻もレクチン資源として有望と思われる。そこで海藻からレクチンを単離してその性状を調べることにした。

## 2. 生物活性

単離した海藻レクチンの生物活性として、赤血球以外に藍藻、渦鞭毛藻、酵母、リンパ球、血小板、腫瘍細胞など各種細胞の凝集、<sup>8-12)</sup>リンパ球分裂促進、<sup>13-17)</sup>腫瘍細胞の増殖抑制、<sup>14)</sup>血小板凝集阻害、<sup>10)</sup>海産無脊椎動物の胚発生の阻害、<sup>13)</sup>赤潮生物を含む微細藻に対する殺藻作用<sup>11)</sup>を見いだした。リンパ球分裂促進作用はその後調べた海藻レクチンのすべてに検出されている。この中で、紅藻ミリン *Solieria robusta* のレクチン<sup>14)</sup>は陸上植物由来の代表的マイトゲンであるインゲンマメレクチン (PHA) と同等のマウスリンパ球分裂促進活性を示すが、同活性の至適濃度でマウス腫瘍細胞の FM3A や L1210 に対しては増殖抑制効果を示すことから、抗ガンもしくはガン研究試薬として有望と思われる。このように、海藻レクチンの中には臨床試薬、医薬ならびに生態環境薬として今後の利用開発に期待がもたれるものが数多く存在することがわかった。

## 3. 糖鎖認識

レクチンは主に生体膜糖鎖との結合を介して種々の生物活性を示すことから、それらが認識する糖構造に関する情報は重要である。また、この情報は糖鎖識別プローブとしてのレクチンの利用の面からも大切である。レクチンの糖結合特異性は、赤血球凝集活性を阻止する糖化合物を検索するハプテン阻止試験が簡便で信頼性もあり多用されている。そこで、まずこの方法を用いて海藻レクチンの糖結合特異性を調べた。その結果、海藻レクチンのほとんどの活性は単糖類で阻止されず、糖タンパク質および糖ペプチドでのみ阻止され、単糖（主にアミノ

\* Tel : +81-824-24-7931, Fax : +81-824-22-7067, E-mail : kanhori@hiroshima-u.ac.jp

高マンノース型糖鎖特異的レクチン

紅藻 *Sorielia robusta* 緑藻 *Boodlea coacta*  
*Eucheuma serra*  
*E. amakusaensis*  
*E. cottonii*  
 藍藻 *Oscillatoria agardhii*

複合型糖鎖特異的レクチン

紅藻 *Gracilaria verrucosa* 緑藻 *Bryopsis plumosa*

両型糖鎖結合性レクチン

紅藻 *Carpopeltis flabellata*

図1 藻類レクチンのN-グリコシド型糖鎖結合特異性

糖)で阻止されるものは数少ないことがわかった。<sup>8,12-19)</sup>さらに、種々の糖蛋白質を被覆したポリスチレンビーズを調製し、これらを用いて凝集活性およびハプテン阻止試験を行い、海藻レクチンは糖タンパク質に直接結合すること、同結合は単糖類で阻止されないことを確認した。<sup>20,21)</sup>なお、前者に属するものは低分子量の単量体構造を、後者に属するものは高分子量もしくは多量体構造を有する特徴をもつことを認めた。<sup>22)</sup>これらの性質は、他生物由来のレクチンの多くが単糖類に結合性をもち、多量体構造を有することと異なっていた。また、ハプテン阻止試験から、海藻レクチンは糖タンパク質との結合性に基づいて、N-グリコシド型糖鎖中、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、両型糖鎖に結合するものの3つに分類できることがわかった(図1)。<sup>23)</sup>さらに最近、厳選した45種類の糖鎖を対象として、遠心限外ろ過-HPLC法を用いて単離した海藻レクチンの糖鎖結合特異性を精査し、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、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など、既知レクチンとは異なって極めて選択性の高い糖鎖結合特異性をもつレクチンを数多く見いだした。本解析から、高マンノース型糖鎖特異的なものは非還元末端に $\alpha$ 1-2Man残基が付加すると結合活性が低下するものと、同残基が付加したものとしか結合しないものにさらに区別されること、複合型糖鎖特異的なものにはN-アセチルラクトサミンからなる分岐糖鎖の本数の違いにより結合活性が異なるものが存在することなど、それら糖鎖構造中の認識部位に関してもユニークな性質をもつことがわかった。したがって、これら海藻レクチンはユニークな新規の糖鎖識別プローブとして応用価値が高いだけでなく、タンパク質-糖鎖間の相互作用の分子基盤を解析するためのモデル物質としても有用と思われる。

## 4. 分子構造

海藻レクチンの多くは低分子量の単量体タンパク質で、活性発現に金属イオン要求性をもたない。また、N末端配列に関しては、少なくとも属内で保存されているが、一部のものを除き、他生物グループのものとは共通性がないことから、海藻レクチンは構造的にも新しいレクチン群に属すると推定された。<sup>3)</sup>紅藻カギイバラノリ *Hypnea japonica*からは種々の生物活性をもつ低分子量の単量体タンパク質の3種イソレクチン(hypnins)を単離したが、これらの凝集活性は100°Cで30分間加熱しても変化せず極めて耐熱性のものであった。<sup>12)</sup>海藻レクチンは一般に耐熱性の活性をもつが、このような強耐熱性のレクチンはこれまでに報告されていない。そこで海藻からは最初の例として、海藻レクチンの特徴を併せもつhypnin A-1とA-2の一次構造を解析した。<sup>24)</sup>その結果、両レクチンは活性発現に必須の2つの鎖内SS結合を含む90アミノ酸からなる単一ペプチド鎖で構成され、3箇所のアミノ酸だけが異なるイソレクチンであることがわかった。両レクチンのアミノ酸残基の半数近くがセリン、グリシン、プロリンの3種アミノ酸で構成されていた。したがって、本レクチンの強耐熱性は、この特異なアミノ酸組成と2つの鎖内SS結合から予想されるコンパクトに折り畳まれた立体構造に由来すると思われるが、その詳細はまだ不明である。このレクチンは血小板凝集阻害作用も有し、<sup>10)</sup>抗血栓剤の利用開発にも有用と思われるが、その配列中には血小板凝集阻害活性をもつ接着性トリペプチド配列(Arg-Gly-Asp)と類似のAsn-Gly-Asp配列が認められ、この部分が同阻害に関係する可能性が示唆される。既知のタンパク質中に、本レクチンと全体的な配列共通性をもつものは存在しないが、興味深いことにC-タイプ動物レクチンの糖認識ドメイン(CRD)と類似したモチーフを含んでいることがわかった。しかし、C-タイプCRDのCa<sup>2+</sup>および単糖との結合に直接関与する5アミノ酸残基のうち3残基が置換されており、この置換が本海藻レクチンが単糖結合性をもたないことと関連すると思われる。他方、hypninsの凝集活性は糖ペプチド以外に単純タンパク質であるホスホリパーゼA2でも阻害されることから、本レクチン分子はタンパク質結合部位をもつと推定される。したがって、リピート構造をもたない本レクチンは、単一ペプチド鎖に糖鎖結合部位(C-タイプCRD類似モチーフ)とタンパク質結合部位の2つの異なる結合部位をもつことにより細胞を凝集している可能性がある。これに関連して、生体膜ホスホリパーゼA2レセプターは分子内にC-タイプCRDをもつことが明らかにされているが、同CRD内にはhypninsの場合と同様のアミノ酸置換が認められており、糖結合性はまだ見いだされていない。なお、C-タイプ動物レクチンと植物レクチン間で類似モチーフが認められたのはこれが最初

である。最近、hypninsと同様に2つの鎖内SS結合をもつ91アミノ酸からなる単量体レクチンが、紅藻 *Bryothamnion triquetrum* から単離されており、<sup>25)</sup> 類似構造をもつレクチンが海藻中に広く存在する可能性も示唆される。

紅藻ミリン科の数種から単離したレクチンは腫瘍細胞の増殖抑制および強いリンパ球分裂促進作用をもち、また厳密な高マンノース型糖鎖結合選択性をもつことから応用面での開発が期待されるが、この科に属するレクチンは互いに共通したN末端配列をもつことがわかった。<sup>17)</sup> さらに、淡水産藍藻 *Oscillatoria agardhii* から単離したレクチンも紅藻ミリン科レクチンと同様のN末端配列と高マンノース型糖鎖結合選択性をもつことを見いだした。<sup>26)</sup> 興味深いことに、これら藻類レクチンは粘性細菌 *Myxococcus xanthus* から単離された凝集素<sup>27)</sup> と高いN末端配列共通性を有していることが判明した。紅藻ミリン科のトゲキリンサイ *Eucheuma serra* および淡水産藍藻 *O. agardhii* の各レクチンについては最近その全一次構造を明らかにした。その結果、上記の紅藻 (ESA-2, 268 残基)、藍藻 (OAA, 132 残基)、細菌 (MBHA, 267 残基) の各レクチンは互いに極めて高い構造共通性をもつことがわかった。いずれもN末端約67残基の相同配列のタンデムリピート構造をもち、リピート数はESA-2とMBHAで4回、OAAで2回であった。配列共通性はリピート構造単位で認められた。藻類由来の両レクチンは共通して厳密な高マンノース型糖鎖結合選択性をもつが、それぞれ単一ペプチド鎖中の糖鎖結合部位数とリピート配列数が一致することから、リピート配列部分が糖鎖認識ドメインと考えられる。このように両単量体レクチンは単一ペプチド鎖上の複数の糖鎖結合部位を介して細胞を凝集すると考えられる。真核生物と原核生物の間でレクチン分子の構造共通性が認められたのはこれが最初であり、細菌、藍藻、紅藻の下等生物間に新しいレクチンファミリーが存在することがわかった。MBHAの糖結合特異性はよく調べられていないが、構造共通性から推測して、同様の高マンノース型糖鎖特異性をもつものと思われる。この粘性細菌については、貧栄養下で凝集し子実体を形成することから多細胞化の機構を解明するための原型モデルとして現在活発な研究がなされているが、同凝集素は子実体形成期に特異的に発現されることが明らかとなっている。今後、上記の下等生物間におけるレクチンタンパク質の構造共通性をもつ生物学的意味に興味もたれる。

また、海藻中には、通常のレクチンとは生物活性は類似しているが抽出性や化学構造が異なるレクチン様成分、すなわち組織のプロテアーゼ処理に依存して抽出されるペプチジルグリカン性凝集素という興味深い成分が広く存在することも見いだした。<sup>28)</sup> このレクチン様成分

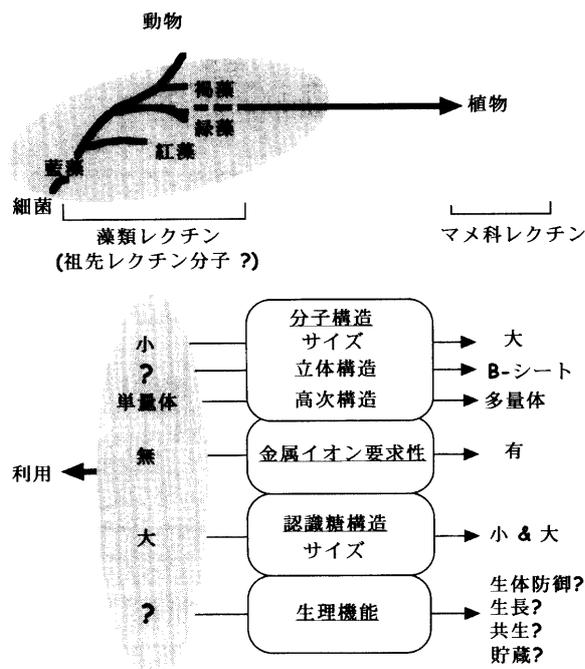


図2 藻類レクチンと陸上植物 (マメ科) レクチンの生化学的特性の比較

は抗菌およびリンパ球分裂促進作用をもち、海藻中の常在成分とも考えられ、その生理機能にも興味もたれる。

以上に述べたように、海藻レクチンの多くは分子サイズが小さいこと、単量体構造をとること、耐熱性で金属イオン非依存性の活性を示すことで、タンパク質分子の進化の点からもプリミティブと考えられる (図2)。この構造特徴が伸展した糖鎖構造のみを認識することと関連するようであるが、糖鎖認識能には高い選択性がみられる。これらの生化学的特性は応用上の利点でもあり、今後の構造生物学的アプローチと生理機能解明によって、その有用性がさらに明らかになると思われる。

## 謝 辞

本研究は、主に広島大学生物生産学部海洋生物資源利用学研究室で行われたものであり、研究対象となった海藻にたずさわる機会を与えていただいた故伊藤啓二先生に深く感謝申し上げます。研究成果の多くは卒業生、大学院生の協力によるものであり、ここに心よりお礼申し上げます。また、多くの共同研究者ならびに常にご指導と激励を賜った学生時代の恩師、先輩、同僚の各位に深謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Sharon N, Lis H. Lectins, Chapman and Hall Ltd., London, 1989
- 2) Weis WI, Drickamer K. Structural basis of lectin-carbohy-

- drate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 1996; **65**: 441-473.
- 3) 堀 貫治. 海藻のレクチン. 化学と生物 1989; **27**: 210-212, 1994; **32**: 586-594.
  - 4) 堀 貫治. 海藻から抽出されるレクチン-細胞を見分ける不思議なタンパク質-21世紀の海藻資源-生態機構と利用の可能性-水産学叢書2 (大野正夫編), 緑書房, 1996; 185-205.
  - 5) Hori K, Miyazawa K, Ito K. Hemagglutinins in marine algae. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 1981; **47**: 793-798.
  - 6) Hori K, Oiwa T, Miyazawa K, Ito K. Evidence for wide distribution of agglutinin in marine algae. *Bot. Mar.* 1988; **31**: 133-138.
  - 7) Fabregas J, Lopez A, Llovo J, Munoz A. A comparative study of seafish erythrocytes and agglutinins from seaweeds. *Comp. Biochem. Biophys.* 1992; **103A**: 307-313.
  - 8) Hori K, Miyazawa K, Ito K. Preliminary characterization of agglutinins from seven marine algal species. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 1986; **52**: 323-331.
  - 9) Kamiya H, Ogata K, Hori K. Isolation and characterization of a new agglutinin in the red alga *Palmaria palmata* (L.) O. Kuntze. *Bot. Mar.* 1982; **25**: 537-540.
  - 10) Matsubara K, Sumi H, Hori K. Platelet aggregation is inhibited by phycoclectins. *Experientia* 1996; **52**: 540-543.
  - 11) Hori K, Ogata T, Kamiya H, Mimuro M. Lectin-like compounds and lectin receptors in marine microalgae: hemagglutination and reactivity with purified lectins. *J. Phycol.* 1996; **32**: 783-790.
  - 12) Hori K, Miyazawa K, Fusetani N, Hashimoto K, Ito K. Hypnins, low-molecular weight peptidic agglutinins isolated from a marine red alga *Hypnea japonica*. *Biochim. Biophys. Acta* 1986; **873**: 228-236.
  - 13) Hori K, Matsuda H, Miyazawa K, Ito K. A mitogenic agglutinin from the red alga *Carpopeltis flabellata*. *Phytochemistry* 1987; **26**: 1335-1338.
  - 14) Hori K, Ikegami S, Miyazawa K, Ito K. Mitogenic and antineoplastic isoagglutinins from the red alga *Solieria robusta*. *Phytochemistry* 1988; **27**: 2063-2067.
  - 15) Okamoto R, Hori K, Miyazawa K, Ito K. Isolation and characterization of a new hemagglutinin from the red alga *Gracilaria bursa-pastoris*. *Experientia* 1990; **46**: 975-977.
  - 16) Kawakubo A, Makino H, Ohnishi J, Hirohara H, Hori K. The marine red alga *Euचेuma serra* J. Agardh, a high yielding source of two isolectins. *J. Appl. Phycol.* 1997; **9**: 331-338.
  - 17) Kawakubo A, Makino H, Ohnishi J, Hirohara H, Hori K. Occurrence of highly yielded lectins homologous within the genus *Euचेuma*. *J. Appl. Phycol.* 1999; **11**, 149-156.
  - 18) Hori K, Miyazawa K, Ito K. Isolation and characterization of glycoconjugate-specific isoagglutinins from a marine green alga *Boodlea coacta*. *Bot. Mar.* 1986; **29**: 323-328.
  - 19) Shiomi K, Hori K. Hemagglutinins from marine algae. In: Akatsuka J (ed) *An Introduction to Applied Phycology*. SPB Academic Publishing bv, The Netherlands, 1990; 93-108.
  - 20) 堀 貫治. 海藻のレクチン. 海洋, 1987; **21**: 362-367.
  - 21) 堀 貫治. 海藻レクチンの糖鎖認識. 電子情報通信学会誌 1998; **88**: 13-18.
  - 22) Rogers D, Hori K. Marine algal lectins; new developments. *Hydrobiologia* 1993; **260/261**: 589-593.
  - 23) Hori K, Miyazawa K, Ito K. Some common property of lectins from marine algae. *Hydrobiologia* 1990; **204/205**: 561-566.
  - 24) Hori K, Matsubara K, Miyazawa K. Primary structures of two hemagglutinins from the marine red alga, *Hypnea japonica*. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; **1474**: 226-236.
  - 25) Calvete JJ, Costa FHF, Saker-Sampaio S, Murciano MPM, Nagano CS, Cavada BS, Grangeiro TB, Ramos MV, Bloch Jr. C, Silveirs SB, Freitas B, Sampaio AH. The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. *CMLS cellular and molecular Life Sciences* 2000; **57**: 343-350.
  - 26) Sato Y, Murakami M, Miyazawa K, Hori K. Purification and characterization of a new lectin from a freshwater cyanobacterium, *Oscillatoria agradhii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 2000; **125B**: 169-177.
  - 27) Romeo JM, Esmon B, Zusman DR. Nucleotide sequence of the myxobacterial hemagglutinin gene contains four homologous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; **83**: 6332-6336.
  - 28) Hori K, Shimada Y, Oiwa C, Miyazawa K, Ito K. Occurrence of a novel group of hemagglutinins extractable by Pronase treatment in marine algae. *J. Appl. Phycol.* 1993; **5**: 219-223.