

## アガリクス (*Agaricus blazei*) 子実体に含まれる $\beta$ -ガラクトース認識レクチンの分離と性質

角田 万里子<sup>1)</sup>, 賀来 華江<sup>2)</sup>, 三崎 旭<sup>3)</sup>  
(<sup>1)</sup> 甲南女子大\*, (<sup>2)</sup> 国立生物資源研\*\*, (<sup>3)</sup> 大阪市大\*\*\*)

### Some Properties of $\beta$ -Galactose-binding Lectin Isolated from Fruiting Body of *Agaricus blazei*

Mariko KAKUTA, Hanae KAKU and Akira MISAKI

Beta D-galactose binding lectin was purified from the phosphate-saline (PBS) extract of fruiting body of *Agaricus blazei* by precipitation with 0.6 sat. ammonium sulfate followed by affinity chromatography on either asialofetuin-, N-acetyllactosamine or  $\beta$ -aminoethyl D-galactosidesephrose column, and gel filtration. The purified lectin consists of tetrametric glycopeptides with subunit of 16kDa.

N-terminal amino acid sequences up to 30 amino acid residues suggested that there was essentially no homology with hitherto known lectins. The *Agaricus blazei* lectin (AGbA) interacted with glycans and glycoproteins containing terminal  $\beta$ -galactose residues, such as asialofetuin, human salivary mucin, lactose-BSA, plant xyloglucan, *Lincorice* AGP etc. These precipitation reactions and the inhibition studies indicated that AGbA must recognize the  $\beta$ -galactose at the terminal end. AGbA was shown to be a glycoprotein (neutral carbohydrate, 5.2%; Man : Fuc=4.8 : 1.0), and the specific interaction with  $\alpha$ -mannose-binding *Crocuss* lectin suggested a possible glycopeptide chain with (1,3)  $\alpha$ -mannosyl mannose terminals.

これまで、多くの担子菌やその子実体から種々の 1,6 分岐の  $\beta$ -1,3グルカンの構造を有する多糖類が分離、精製され、その生理活性について明らかにされてきた。我々も、これまでにキクラゲ、靈芝、タモギタケやフクロタケなどの食用きのこのほか、シゾフィランやペスタロタンなど菌類の培養液から得ら

---

\* 所在地：神戸市東灘区森北町6-2-23 (〒658-0001)

\*\* 所在地：つくば市観音台2-1-2 (〒305-8602)

\*\*\* 所在地：大阪市住吉区杉本3-3-138 (〒558-0022) (名誉教授)

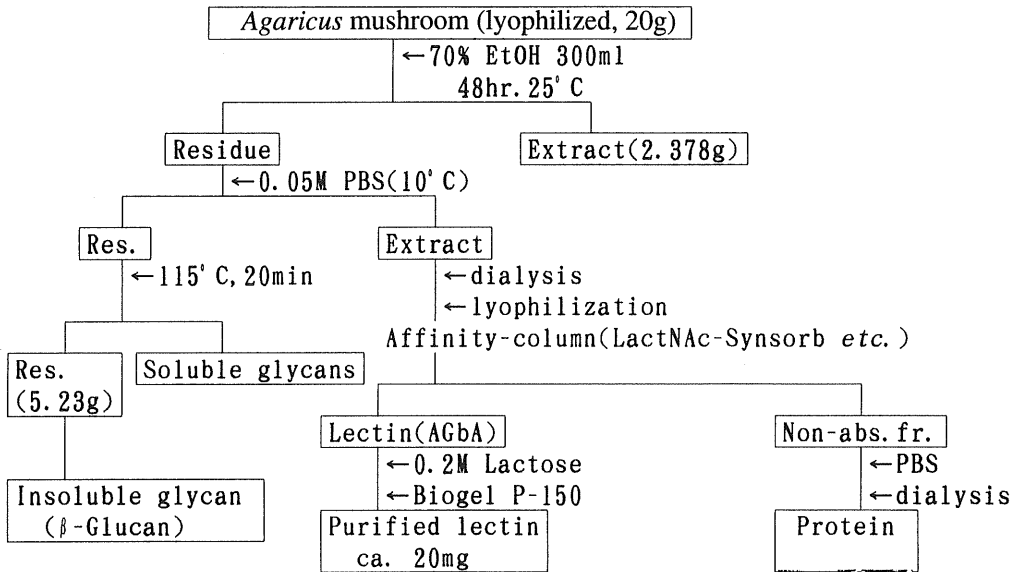
れる分岐 $\beta$ -1,3グルカンについて、構造と腫瘍抑制活性との関係について詳細な研究を行ってきた<sup>1),2)</sup>。

一方、近年“きのこ”に含まれる微量の生理活性蛋白(糖蛋白)であるレクチンについては、いくつかの報告がなされ、その免疫機能が検討されている。アガリクスについても、萩原ら(1988)による *A. blazei* のレクチンの分離<sup>3)</sup>、また、最近 Irazoquiら(1999)による *Agaricus bisporus* のレクチン (ABL) の T-Disaccharide の特異的認識に関する詳細な報告がある<sup>4)</sup>。我々は、アガリクスの機能性物質の分画の過程でレクチンの化学的性質と糖鎖結合特異性に興味をもち、新しいタイプのリガンドをもったアフィニティーカラムを作成して、レクチンの単離を試み、得られた精製 $\beta$ -ガラクトース認識レクチンの primary structure と結合特異性について若干の解明をおこなった。

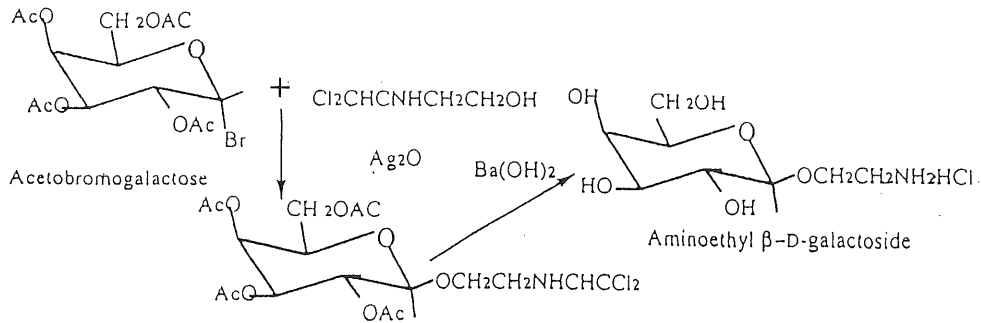
### 実験材料および方法

アガリクスは大愛(株)栽培の新鮮な“きのこ”またはその凍結乾燥標品を使用した。新鮮なアガリクスの凍結乾燥標品を0.05MのPBS (pH 7.2, 0.15M NaCl) 100mlともにホモゲナイズし、低温室で一晩攪拌抽出を行った後、遠心分離(8000r.p.m.×20min.)を行い、その上清液に60%硫酸を加えて塩析し、沈殿画分を少量のPBSに溶かして、PBS中で透析を行い、レクチンを含む蛋白を得た。

この蛋白画分を少量のPBSに溶かしたものを、或いはPBS抽出物を直接アフィニティークロマトグラフィにアプライした(scheme 1参照)。アフィニティークラムとしては asialofetuin-sepharose, N-acetyl-lactosamine-synsorbおよびわれわれの研究室で合成した aminoethyl- $\beta$ -galactoside<sup>5)</sup> (Scheme 2参照)をリガンドとした Sepharose column などを用いた。アフィニティークラムに吸着したレクチンは0.2Mのラクトースまたは0.2Mのエチル- $\beta$ -ガラクトシド (Ethyl- $\beta$ -galactoside) で溶離させた。さらに Sephadex



Scheme 1 Fractionation of *Agaricus* mushroom and Purification of Lectin



**Scheme 2** Procedure for synthesis of aminoethyl- $\beta$ -galactoside

G-150およびBio-gel P-150カラムを用いてゲルろ過を行い、SDS上で単一のバンドを示す精製レクチンを得た。

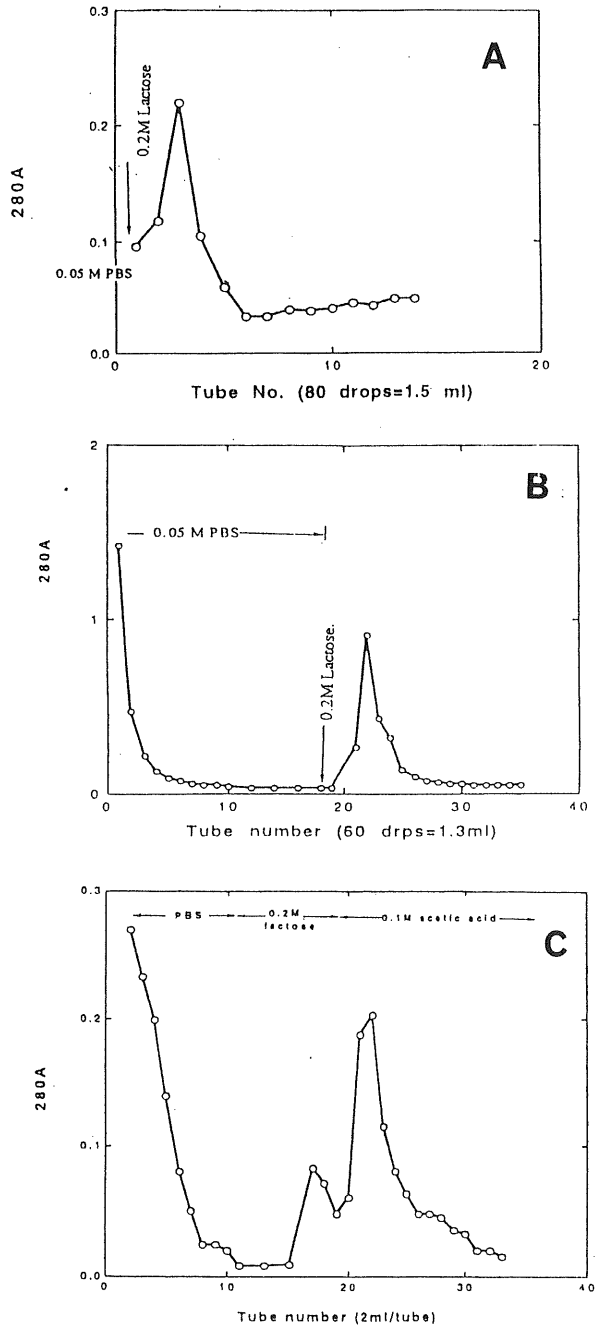
精製レクチンの分子量はゲルろ過およびTof MS分析で算出、Subunitの分子サイズはSDS PAGE上で求めた。またN-末端アミノ酸配列は生物資源研設置のprotein sequencerを用いて測定し、レクチンの含有する糖量は、フェノール硫酸法にて測定した。構成糖の分析は、3Mのトリフロロ酢酸で加水分解後、陰イオンクロマトグラフィー (HIPAEC, Dionex社) を用いて同定、かつ、定量した。

レクチンの糖鎖結合特異性は多糖および糖蛋白との定量沈降反応、および糖による沈降阻害活性により調べた。

## 結果および考察

### レクチン (AGbA) の精製

新鮮なアガリクス100gから60%硫酸塩析により310mgの沈殿蛋白が得られた。この粗レクチンの一部(80mg)を(A) Asialofetuin-sepharoseカラム、(B) LactosamineNac-synsorbおよび、(C) Aminoethyl- $\beta$ -galactoside-sepharoseのアフィニティークロマトグラフィーに供した。いずれの場合もレクチンはカラムに吸着するので $\beta$ -galactoseに特異的であることは明らかであるが、カラムからの溶離は主として0.2M lactoseに依ったが、カラム(C)の場合はEthyl- $\beta$ -galactosideで溶離するが、褐色系色素も溶離して280nmの吸収測定を阻害する傾向があり、場合によっては、0.1Mの酢酸で溶離させた。これらの結果はFig.1-A, B, Cに示す。アフィニティークロマトグラフィーで精製されたレクチンはSDS PAGEで単一の蛋白のバンド(Mr 16kDa)を示した(Fig. 2)。最終的にはゲルろ過(Sephadex G-150およびBiogel P-150)により精製レクチン(AGbA)が得られた。収量は生アガリクス100g(乾燥物18.6g)当たり約20mgであった。



**Fig. 1** Affinity chromatography of *Agaricus* lectin on a column of (A) Asialofetuin-sepharose, (B) Nacetyllactosamine-synsorb 100, and (C) Aminoethyl- $\beta$ -galactoside-sepharose.

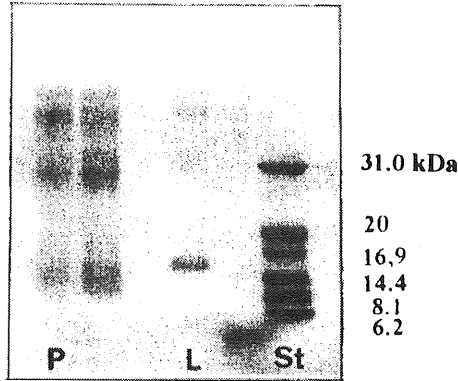
PBS extract or 0.6 sat. ammonium sulfate-precipitated protein was applied onto each affinity column. After washing with PBS the column-retained lectin was eluted with 200mM lactose from column A and B, and 200mM Aminoethyl- $\beta$ -galactoside or 0.1M acetic acid from column C.

レクチンの化学的性質

精製されたレクチンはSDS-PAGEにより, Fig. 2 に示すような単一なバンド (Mr, 16kDa) を与え, ToF MS分析の結果でも, 16,256の値が得られた。一方, ゲルろ過では58,000-62,000 (Sephadex G150, Biogel P-150) の値が得られたので本レクチンは16kDaのsubunitの3乃至4量体から成り, 萩原ら (1988) の報告<sup>3)</sup> と概ね一致した。

N-末端から30番目までのアミノ酸配列は, Table 1に示すが, N-末端にプロリンが配置されたユニークなペプチドで (萩原らのアミノ酸組成のデータではプロリンは7.4%含まれる), これまでに報告された何れのレクチンまたは酵素蛋白とも相同性はみられなかった。

本レクチンは, 5.26%の中性糖 (マンノースとして) を含む糖蛋白で, その糖組成はマンノース: フコースが4.8: 1.0であり, 少量のグルコサミンの存在も確認された。完全な糖鎖構造は推測の域を出ないが, コンカナバリンAの他, 我々が最近精製した糖鎖末端のMan (α1, 3) Manを厳密に認識するクロッカス球根のレクチン<sup>6)</sup> と結合する事実から, Fig. 3の様なバイアンテナの配列が推定される。



**Fig. 2** SDS PAGE of the purified AGbA on 5% sulfate polyacrylamide gel (NPU 15L)  
 P: Protein fraction (PBS), L: AGbA, St: Marker

**Table 1.** Molecular structure of *Agaricus blazei* lectin

Molecular mass of native lectin			
58,000 - 62,000 (gel-filtration)			
Sub unit			
16 kDa (SDS PAGE)			
16,256 (TOF MS)			
N-terminal amino acid sequence :			
1	5	10	15
P	V D Q	I N S N N T Y T L R N	
16	20	25	30
V	G N P N S V L D L X Q E D N		

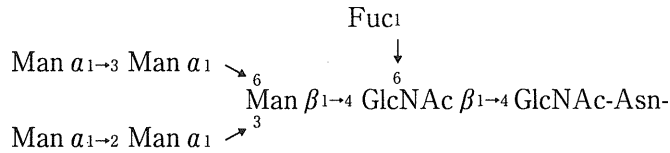


Fig. 3 Possible sequence of the glycopeptide moiety

### 結合特異性

本レクチンは兎の血球を強く凝集するが、ヒト血球の凝集は見られなかった。糖結合特異性を検討した結果、フェツインとの反応は見られなかったが、アシアロフェツインとは定量沈降反応する (Fig. 4)。この沈降反応は4mMのラクトースによって85.4%、また、8mMのEthyl- $\beta$ -galactosideにより54.9%阻害された。従って本レクチンは糖鎖末端の $\beta$ -ガラクトース残基を特異的に認識すると考えられる。さらに、本レクチンと $\beta$ -ガラクトース残基を末端にもつヒト唾液のムチン、Lactose-BSA、植物細胞壁キシログルカン、甘草 (*Lincorice*) のアラビノガラクトタン・プロテインなどの多糖および糖蛋白と結合することを認めた (Table 2)。このことは *Agaricus blazei* の子実体形成に際して寄生する、ホスト・プラントの多糖糖鎖認識に関係すると考えると興味深いことと思われる。本レクチンの結合特異性と生物機能に関しては今後、より詳細な研究を行う予定である。

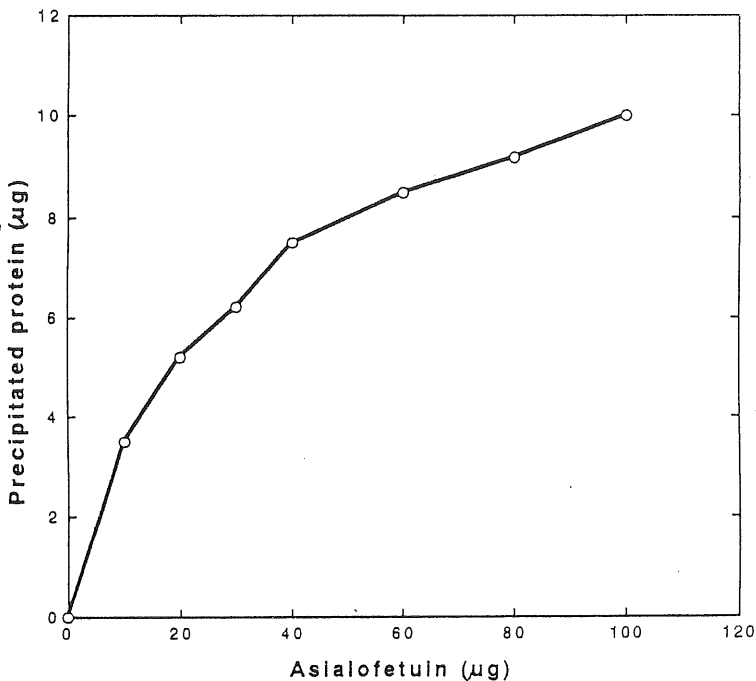


Fig. 4 Quantitative precipitation reaction of Agricus lectin (AGbA) with asialofetuin.

**Table 2.** Precipitation reaction with glycans and glycoconjugates \*

Fetuin	-
Asialofetuin	+
Lactose-BSA	+
<i>Lincorice</i> Arabinogalactan-protein	+
Tamarind Xyloglucan	+
Concanavalin A	+
<i>Zephyranthes</i> $\alpha$ -Man-binding lectin	+
<i>Crocus</i> $\alpha$ -1, 3-Man-binding lectin	+

\* Tested in capillary tube

**謝 辞**

本研究にあたり、試料を提供されました大愛(株)宮部健一郎氏に厚く感謝いたします。本研究の一部はミシガン大学生化学研究室 (I.J. Goldstein 教授) で行なわれたものであり謝意を表します。

**文 献**

- 1) Misaki, A., E. Kishida, M. Kakuta and K. Tabata (1993) Antitumor fungal  $\beta$ -1,3 glucans in *Carbohydrates and Carbohydrate polymers* YALPANI, M. ed., pp.116-129. ATL Press.
- 2) Misaki, A. and M. Kakuta (1997) : Fungal (1-3)  $\beta$ -glucans : Chemistry and antitumor activity in *Carbohydrates in Drug Design* Witczak Z.J., ed. pp.655-687, Marcell Dekker, INC.
- 3) Kawagishi, H., A. Nomura, T. Yuen and H. Mizuno (1988) *Carbohydr. Res.* 183:150-154
- 4) Irazoqui, F. J., M.A. Vides and G.A. Nores (1999) *Glycobiology* 9:59-64
- 5) 杉山 博 (1980) : 大阪市立大学生生活科学研究科 修士論文
- 6) Misaki, A., M. Kakuta and I.J. Goldstein (1997) *J. Biol. Chem.* 272 : 25455-25461.