

## 担子菌類の血球凝集素

Hemagglutinins(Lectins) in Basidiomycetes

理学部生化学科 橋本 洋一

Department of Biochemistry, Faculty of Science

Yoichi HASHIMOTO

### 1. はじめに

担子菌類(Basidiomycetes)は、真菌類のうちで、肉質の高度に発達した子実体を形成する最も高等な菌類であり、その特徴は孢子形成の構造である担子器(basidium)にある。この菌群の大部分は落葉、木材あるいは動物の排泄物や遺体などに腐生分解して増殖するが、ナラタケ*Arimillaria mellea*のように樹木に寄生して枯死させる害菌も知られている。担子菌の子実体には独特の香気成分やグルタミン酸や種々のヌクレオチドなどのうま味が含まれ、糖類、蛋白質、ビタミン類の含量も高く、古くから自然食品として食用にされてきた。食菌の多くは、培養条件を制御すると容易に子実体を形成するが、マツタケ*Tricholoma matsutake*やホンシメジ*Lyophyllum shimeji*のように有名な食菌にも培養で子実体形成が困難な例が少なくない。この子実体形成は、変形菌類(粘菌類)とともに菌類の形態形成の対象として形態学、遺伝学及び生化学見地から詳細な研究が進められている。また、担子菌類には、少数ではあるが、その子実体に致死的な有毒成分を含むものがあり、化学者と生化学者の関心を引いていた。なかでも、H. Wielandと後継者たちが達成したテングタケ属*Amanitaceae*のタマゴテングタケ*Amanita phalloides*やドクツルタケ*A. virosa*の毒素、Phalloidinの単離、構造決定及び生理作用の解明は、代表的な研究成果である<sup>1)</sup>。毒性のきわめて高いペプチド性の毒素の他に、担子菌のなかには、有毒成分としてヒトやほ乳動物の赤血球を凝集する蛋白質(血球凝集素、レクチン)あるいは溶血活性を有する蛋白質(溶血素)を含む子実体を形成する菌が意外に多い。この総説では、担子菌のレクチンに焦点を当て、糖結合特異

性、蛋白化学的性質、一次及び高次構造の解析及び形態形成にともなう役割を最近の知見に基づいて解説する。

### レクチンについて

1888年にR. Korbertの門下でトウゴマ(ヒマ) *Ricinus communis*の種子の毒素、リシンの研究を行っていたH. Stillmarkがその作用に血球凝集活性を記録した論文がレクチンの発見の端緒になったと言われている<sup>2)</sup>。その後、しばらくの間研究の空白があったが、J. B. Sumnerによりタチナタマメ *Canavalia ensiformis*の種子から単離されたConcanavalin Aはヒト血球を血液型に関係なく凝集するばかりでなくグリコゲンと結合して沈澱を起こすことが明らかになった<sup>3)</sup>。1945年代以降、M. C. Boyd<sup>4)</sup>及び、K. O. Renkonenら<sup>5)</sup>によりマメ科植物を中心に広般な検索が進み、ABO式血液型を識別して特異的にまた非特異的にヒト赤血球を凝集する植物血球凝集素(Phytohemagglutinin, PHA)と総称される蛋白質が多数見い出された。*Dolichos biflorus*(A型)<sup>6)</sup>、*Bandeireae simplicifolia*(B型)<sup>7)</sup>、*Ulex europaeus*(O型)<sup>8)</sup>などが代表的な血液型に特異的な赤血球を凝集するPHAであり、血液型の判定に使用されることが多い。血液型物質(血液型に特異的な抗原となる糖蛋白質)の糖鎖構造の研究は赤血球膜にある抗原決定基の糖残基を認識結合し凝集を起こすPHAの作用を明らかにした<sup>9)</sup>。また、その他の血液型に関係なく非特異的に血球を凝集するPHAの糖結合特異性もまた種々の単糖、結合を異にする配糖体、少糖、多糖あるいは糖蛋白質などによる血球凝集阻止活性の測定により解明されるようになった。このような研究の展開を背

景にM.C.Boydは糖を特異的に認識結合する蛋白質の一般的名称としてレクチン (Lectin) を提唱し、<sup>14)</sup> 現在、広く使用されている。その後、1980年にこの分野の研究者が集まり、レクチンを“糖質を認識結合して沈降反応を起こす抗体以外の蛋白質”と定義した。<sup>15)</sup> したがって、糖結合蛋白質であるレクチンには単量体で分子内に2つ以上の結合部位があるものや多価の巨大分子もあるが、2量体か4量体で、サブユニットに一つの糖結合部位を有するレクチンが多い。

レクチンは植物の他に、細菌をはじめ微生物と無脊椎動物からは哺乳動物の組織に広く分布し、これまで蛋白的性質と糖結合特異性について多くの報告があり、その多様性が知られている。

適当な糖をリガンドとして結合させた支持体を用いたアフィニティクロマトグラフィーで容易に精製できる植物起源のレクチンは糖質の分離精製用のリガンド<sup>6)</sup>、<sup>18)</sup>沈降反応による多糖や糖蛋白質の識別同定、薄層クロマトグラフィーあるいはゲル電気泳動で分離した成分をブロットした膜上での糖脂質や糖蛋白質の検出、<sup>19)</sup>癌化など細胞の悪性化に伴う細胞表層複合糖質の微妙な構造変化の判別<sup>20)</sup>など利用の範囲が広い。また、植物のレクチンには、リンパ球の分裂促進活性を有するものがあり、免疫応答のモデルを構成できる。しかしながら、膨大な情報の蓄積も、根粒菌と共生関係にあるマメ科植物のレクチンのレセプターとしての役割など明確な研究成果もあるが、レクチンの植物体における生理的機能の解明に余り寄与していない。<sup>21)</sup>

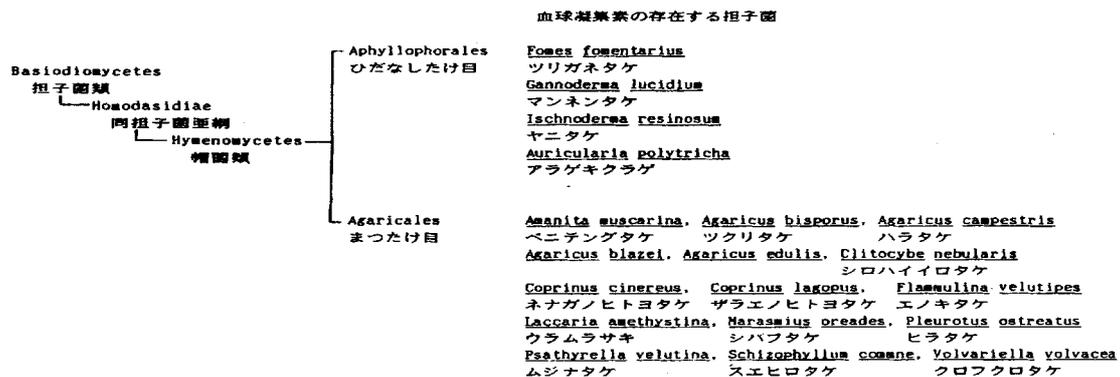
動物レクチンは可溶性型と膜結合型に大別される。これらレクチンはそれぞれ固有の糖結合特異性に依存して分子あるいは細胞レベルで相補的な糖質に結合し、細胞細胞間の接着、認識及び相互作用、細胞移動、免疫的防御、糖蛋白質の回収と分解、糖蛋白質の細胞内輸送と選別など多様な機能が認められ、細胞分化と器官形成、個体発生、生体防御等と関連して研究が急速に発展している<sup>22-27)</sup>

レクチン研究の最近の進展についてはすぐれた総説があり、参照されたい。<sup>17, 23-30)</sup>

### 担子菌のレクチン

R.SeegerとR.Weidemann、及びM.Coulet<sup>31)</sup>らによる広般な検索の結果、多くの担子菌の子実体にレクチンが分布している事実が明らかになった。しかしながら、食菌以外は、子実体を野外で採取できる期間及びその量が著しく限定されることもあり、最近までに精製が行なわれ、蛋白化学的性質や糖結合特異性が調べられた担子菌のレクチンの数は他の起源と比較して少ない。主要な担子菌は菌じん綱の単室担子菌亜綱に属し、この亜綱は大別すると、2つの主な目であるハラタケ目(Agaricales)とヒダナシタケ目(Aphyllphorales)に分かれる。図1には、この分類に従ってそれぞれの目に属している菌のうちでレクチンの性質が判明している菌名を挙げた。肉質の子実体をつくるハラタケ目の菌がレクチンの調製に適し、硬質のヒダナシタケ目では、4種の菌からレクチンが得られているに過ぎない。

図1 高等菌類の血球凝集素の分布



## 精製

レクチンはこれらの菌の子実体の菌糸をブレンダーで破碎して抽出するが、同時に種々の蛋白分解酵素もまた溶出されるため、抽出にはEDTA、ペプスタチンやPMSFなどの阻害剤を予め添加した緩衝液を使用してレクチンの二次的分解を防ぐ必要がある。レクチンの精製には、エノキタケ、*F. velutipes*のレクチンFVA<sup>35)</sup>やフクロタケ*V. voluacea*のレクチンVVA<sup>36)</sup>のようにイオン交換

クロマトグラフィーとゲル濾過法を組み合わせると高い収率で高純度の標品が調製できた例もあるが、セファロースやキチンあるいは特定の血液型のヒト血球膜をアクリルアミドゲルで固定したカラム使用したり、乳糖などのリガントを結合させた支持体を用いたアフィニティクロマトグラフィーが有効であった。表1に主な担子菌レクチンの精製方法をまとめた。

表1 担子菌レクチンの精製法

菌	精製方法	文献
エノキタケ	エタノール処理, イオン交換クロマトグラフィー (DEAE-セルロフィン, SP-セファロースC-50及びCM-セファロースCL-6B)	35
フクロタケ	イオン交換クロマトグラフィー (DEAE-セルロース-C-52及びCM-セルロースC-52)	36
スエヒロタケ	セファロースCL-4Bカラムによるアフィニティ クロマトグラフィー (溶出: 乳糖)	37
ヤニタケ	セファロース4Bカラムによるアフィニティ クロマトグラフィー (溶出: 乳糖)	38
マイタケ	酸処理セファロースCL-4BカラムとN-アセチル-D-ガラクトサミン結合トヨパール カラムによるアフィニティ クロマトグラフィー (溶出: 乳糖)	42
ウシグソヒトヨタケ ネナガノヒトヨタケ	乳糖結合セルロフィン (ラクタミルセルロフィン) カラム によるアフィニティ クロマトグラフィー (溶出: 乳糖)	39
ヒラタケ	イオン交換クロマトグラフィー (DEAE-セルロース) N-スクシニル-D-ガラクトサミン-セファロース4Bカラムによるアフィニティ クロマトグラフィー (溶出: EGTA)	40
ムジナタケ	キチンカラムによるアフィニティ クロマトグラフィー (溶出: N-アセチル-D-グルコサミン)	43
ツクリタケ	陰イオン交換クロマトグラフィー (DEAE-セルロース) ウシ頭下腺ムチン-グリコペプチド結合セファロース4Bカラム によるアフィニティ クロマトグラフィー (溶出: 0.1M アンモニア) 等電点電気泳動	41
ウラムラサキ	O型血球ストロマを含むポリアクリルアミドゲル カラムによる アフィニティ クロマトグラフィー (溶出: 乳糖またはL-フコース)	45
ハイイロタケ	N-アセチル-D-ガラクトサミンを結合させたポリアクリルアミドゲル (溶出: D-ガラクトース)	44
ツリガネタケ シバフタケ	$\alpha$ -D-ガラクトースを結合させたポリアクリルアミドゲル (溶出: D-ガラクトース)	
ヒイロチャワンタケ*	ゲル濾過 (セファデックスG-100) O (H) 型活性ブタ頭下腺ムチンまたは胃粘膜ムチン-グリコペプチド 結合セファロース4B カラムによるアフィニティ クロマトグラフィー (溶出: L-フコース) N-( $\epsilon$ -アミノカプロイル- $\beta$ -フコピラノシルアミン結合セファロース4B カラムによるアフィニティ クロマトグラフィー (溶出: L-フコース)	46~47
アラゲキクラゲ	陰イオン交換クロマトグラフィー (DEAE-トヨパール 650M) オボムコイド-Eupergit Cカラム によるアフィニティ クロマトグラフィー (溶出: グリシン-塩酸緩衝液, pH 2.2) ゲル濾過 (トヨパール HW-55F カラム)	48

\* 子囊菌

表2 担子菌のレクチン

菌	血液型特異性 ( ABO 式血液型 )	糖結合特異性 ( 血球凝集阻止試験 )	分子量 ( kDa )	参考文献
<u>Agaricus bisporus</u> ( ABA )	None ( Panagglutinin )	$\beta$ -Gal-(1-3)-GalNAc	58	C.A.Presant et al.
	ABA-I IV ( pI 6.7-5.33 )	$\alpha$ -Gal, $\beta$ -GalNAc $\beta$ -Gal-(1-3)- $\alpha$ -GalNAc -N-Tos-L-Ser	56-62 (16) Tetramer	S.Sueyoshi
<u>Agaricus campestris</u>	None ( Panagglutinin )	Mono- and Oligo- saccharides Inactive	64 (16) Tetramer	H.J.Sage et al.
<u>Agaricus blazei</u>	None ( Panagglutinin )	Asialo-BSM Asialo-fetuin	64 Tetramer	T.Kawagishi et al.
<u>Agaricus edulis</u>	None ( Panagglutinin )	Mono- and Oligo- saccharides Inactive	I 64 Tetramer II 32 Dimer	R.Eifler and P.Ziska
<u>Coprinus cinereus</u> ( CCA )	None ( Panagglutinin )	Asialo-fetuin Asialo-BSM Glycophorin Lipopolysaccharides	64 (16) (17) (18) Tetramer	M.Nakada et al.
<u>Clitocybe nebularis</u>	None ( Panagglutinin )	GalNAc, Gal	70 (19) (14.5)	V.Horejsi et al.
<u>Flammulina velutipes</u> ( FVA )	None ( Panagglutinin )	Mono- and Oligo- saccharides Inactive	20 (12) (8) Dimer	M.Tuda
		Human Glycophorin Fetuin, Transferrin	19 (11) Dimer	T.Yatohgo et al.
			12,746 (114 residues)	M.Yamada et al.
<u>Fomes fomentarius</u>	B-Agglutinin	$\alpha$ -Gal	60 (35) (21) (10)	V.Horejsi et al.
<u>Laccaria amethystina</u>	O-Agglutinin A-Agglutinin	L-Fuc GalNAc, Lactose	18 19	J.Guillet et al.
<u>Schizophyllum commune</u> ( SCA )	None ( Panagglutinin )	$\alpha, \beta$ -GalNAc $\alpha, \beta$ -Gal	32	T.Yatohgo et al.
<u>Volvariella volvacea</u> ( VVA )	None ( Panagglutinin )	Mono- and Oligo- saccharides Inactive	26 (13) Dimer	J-Y.Lin and T-B.Chou
<u>Auricularia polytricha</u>	None ( Trypsinized Human and Rabbit erythrocytes )	Gal, Lactose PNP- $\alpha, \beta$ -Gal	23	F.Yagi and K.Tadera
<u>Psathyrella velutina</u> ( PVL )	None ( Panagglutinin )	GalNAc, $\alpha, \beta$ -GlcNAc GlcNAc-(1-3)-GalNAc GlcNAc-(1-3)-GlcNAc 1-4-GlcNAc	40	N.Kochibe and K.L.Matta
<u>Ichthyoderma resinosum</u> ( IRA )	B > A, O	$\alpha$ -Gal, L-Fuc, $\beta$ -Gal lactose, lactulose	32 (16) Dimer	H.Kawagishi and T.Hizuno
<u>Ganoderma lucidum</u> ( LZ-B )	Sheep erythrocyte A potent mitogenic activity	—	12,420 (110 residues)	S.Tanaka et al.

括弧内の数字はサブユニットの分子量

panagglutinin: 血液型に非特異的な血球凝集素, O-agglutinin: O型血球凝集素, A-agglutinin: A型血球凝集素,  
mitogenic activity: リンパ球分裂促進活性

*Agaricus bisporus* (フリタケ), *A. campestris* (ハラタケ), *Coprinus cinereus* f. *microsporus* (ウシクソトヨタケ),  
*Clitocybe nebularis* (ハイイロシメジ), *Flammulina velutipes* (エノキタケ), *Fomes fomentarius* (ツリカネタケ),  
*Laccaria amethystina* (ウラムラサキ), *Schizophyllum commune* (スズヒヨタケ), *Volvariella volvacea* (フクロタケ),  
*Auricularia polytricha* (アラケキクラケ), *Psathyrella velutina* (ムシナタケ), *Ichthyoderma resinosum* (ヤニタケ),  
*Ganoderma lucidum* (マンネンタケ)

**糖結合特異性**

精製された担子菌のレクチンは、いずれも可溶性レクチンに属し、その糖結合特異性はスエヒロタケ *Schizophyllum commune* (SCA)<sup>3,7)</sup>、ヤニタケ *Ischnoderma resinsum* (IRA)<sup>3,8)</sup>、ネナガノヒトヨタケ *Coprinus cinereus* (CCA)<sup>3,9)</sup>、ヒラタケ *Pleurotus ostreatus* (POA)<sup>4,0)</sup>、ツクリタケ *Agaricus bisporus* (ABA)<sup>11)</sup>、マイタケ *Grifola frondosa* (GFA)<sup>12)</sup> 及びムジナタケ *Psathyrella velutina* (PVA)<sup>13)</sup> のレクチンにみられるように、ABO式血液型に非特異的で、D-ガラクトース(D-Gal)

あるいはN-アセチルガラクトサミン(D-GalNAc)に関連するも特異性を有するものが多い(表2)。表3-A、B、Cに D-Gal - D-GalNAcタイプのレクチン、SCA及びPOAの血球凝集阻止反応で調べた糖結合特異性をまとめた<sup>37,40)</sup>。SCAはC<sub>1</sub>配向に特異性があり、非還元末端のβ-D-Galまたはβ-D-GalNAc残基を認識結合するが、POAはC<sub>1</sub>における配向の影響を受けない。両者ともにモノ-及びジシアリルラクトースのように非還元末端のD-Gal残基が置換される

**表3 スエヒロタケ レクチン(SCA)の糖結合特異性**

A 単糖及び少糖類	血球凝集反応を完全に阻止するために必要な最小濃度 (mM) *	
	B型血球	O型血球
L-アラビノース	20.0	10.0
D-フコース	5.0	5.0
D-ガラクトース	5.0	2.5
N-アセチル-D-ガラクトサミン	2.5	1.25
メチル α-D-ガラクトシド	5.0	5.0
メチル β-D-ガラクトシド	1.25	1.25
フェニル α-D-ガラクトシド	5.0	2.5
p-ニトロフェニル α-D-ガラクトシド	0.63	0.31
フェニル β-N-アセチル-D-ガラクトサミン	0.31	0.16
ラクトース (乳糖)	2.5	2.5
メリビトース	5.0	2.5
(1-3)-β-D-ガラクトピロース	5.0	5.0
(1-4)-β-D-ガラクトピロース	5.0	5.0
(1-6)-β-D-ガラクトピロース	1.25	1.25
D-ガラクトヒトランシド β(1-3)-L-アラビノース	5.0	5.0
D-ガラクトヒトランシド β(1-4)-D-マンノース	5.0	5.0
ラフィノース	10.0	5.0
スタキオース	>20.0	>20.0
モノアリアルラクトース	>20.0	>20.0
ジアリアルラクトース		

\* O型及びB型血球、それぞれに対し1:8に調製したSCAによる血球凝集反応を完全に阻止する最小量 (mMまたはμg)。

B 糖蛋白質及び多糖	血球凝集反応を完全に阻止するために必要な最小濃度 (μg)	
	B型血球	O型血球
フェツイン	>5,000	>5,000
アシアロフェツイン**	2,500	2,500
ヒツジ頭下腺ムチン (OSM)	>5,000	>5,000
アシアロ-OSM	313	156
ブタ頭下腺ムチン (PSM)	>5,000	>5,000
アシアロ-PSM	1,250	1,250
ヒキカエル卵膜糖蛋白質 (BESGP)	>5,000	>5,000
アシアロ-BESGP	313	156
アカガエル卵膜糖蛋白質 (RESGP)	>5,000	>5,000
アシアロ-RESGP	1,250	1,250
ヒト血球グリコフォリン	>5,000	>5,000
アシアロヒト血球グリコフォリン	625	1,250
クロメクラウナギ人型血液型物質	156	156
キアコウB型血液型物質	2,500	1,250
アカシアガム (アラビアガム) ***	625	625
スミス分解したアカシアガム (1回)	313	313
スミス分解したアカシアガム (2回)	156	156
スミス分解したアカシアガム (3回)	313	313

\*\* 酸あるいは酵素処理により非還元末端のシアル酸を除去した試料。  
\*\*\* アラビノ-3,6-D-ガラクトタン プロテイン。

**表3 ヒラタケのレクチン(POA)の糖結合特異性**

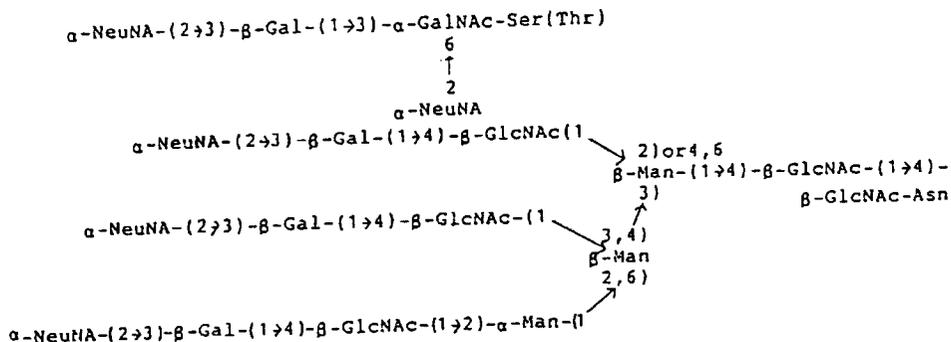
C 単糖及び少糖	血球凝集反応を50%阻止するために必要な最小濃度 (mM) *
D-ガラコース	>20
D-マンノース	>20
D-アラビノース	>20
L-アラビノース	>20
L-フコース	>20
N-アセチル-D-ガラクトサミン	>20
D-ガラクトロン酸	>20
D-フコース	3
D-ガラクトース	2.5
メチル α-D-ガラクトシド	2.5
メチル β-D-ガラクトシド	2.5
フェニル α-D-ガラクトシド	2.5
p-ニトロフェニル α-D-ガラクトシド	2.5
N-アセチル-D-ガラクトサミン	0.625
メチル α-N-アセチル-D-ガラクトサミン	1.25
フェニル α-N-アセチル-D-ガラクトサミン	2.0
p-ニトロフェニル β-N-アセチル-D-ガラクトサミン	5.0
ラクトース (乳糖)	5.0
(1-3)-β-D-ガラクトヒトランシド-D-アラビノース	5.0
(1-3)-β-D-ガラクトヒトランシド-D-マンノース	5.0
(1-3)-β-D-ガラクトヒトランシド-N-アセチル-D-ガラクトサミン	5.0
(1-3)-β-D-ガラクトヒトランシド-N-アセチル-D-ガラクトサミン	5.0
(1-6)-β-D-ガラクトヒトランシド-N-アセチル-D-ガラクトサミン	5.0
(1-3)-β-D-ガラクトヒトランシド-N-アセチル-D-ガラクトサミン	5.0
メリビトース	5.0
ラフィノース	5.0
スタキオース	5.0
モノアリアルラクトース	>20
ジアリアルラクトース	>20

\* O型血球に対し1:8に調製したPOAによる血球凝集反応を50%阻止するために必要な最小濃度 (mM)。

乳糖と比べて著しく阻止活性が低下する。これは、フェツイン(Fetuin)、ヒト赤血球膜の糖蛋白質グリコフォリンあるいはウシ顎下腺ムチンの糖鎖の非還元末端のシアル酸残基を除去すると、血球凝集阻止活性が増加する結果とよく一致している(図2)。また、SCAは結合を異にするガラクトピロースのうち、D-Gal β(1→6) D-Galにより最も強く阻止される。この特異性はβ-3,6-D-ガラクトタンが基本骨格でその側鎖のL-アラビノシル残基やその他の糖残基が結合した複雑な糖鎖構造のアラビアガムの阻止活性の変化により支持された。アラビアガムの阻止活性は低いが、スミス分解で結合した糖残基を除いて

図 2

フェツインの糖鎖構造



ヒト赤血球グリコフォリンの糖鎖構造

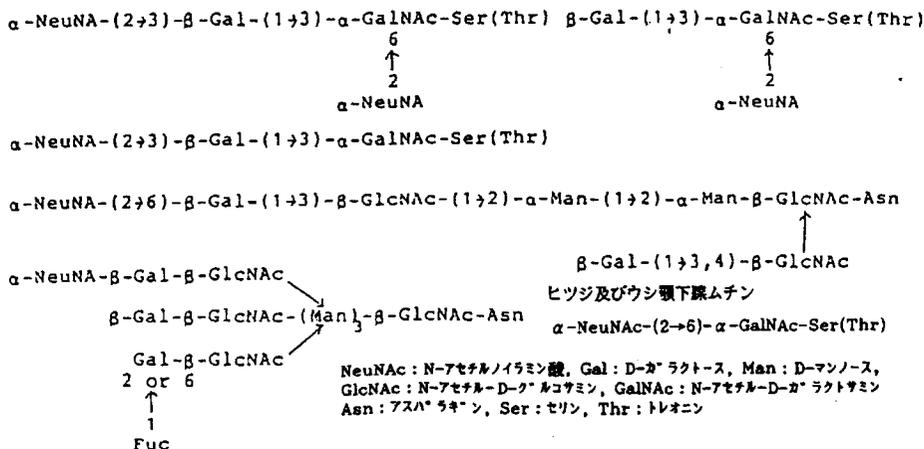


表4 担子菌レクチンによるほ乳類動物血球凝集の比較

動物	FVAの凝集活性 (titers/mg)	VVAの凝集活性 (titers/mg)	POAの凝集活性 (titers/5mg)
ヒト*	1,042	64(128, AB型)	128-512**
ウマ	1,042	-	凝集せず
ブタ	6,114	-	-
ウサギ	4,096	-	1,024
ラット	凝集せず	1,024	-
ヒツジ	-	-	2
イヌ(ネコ)	-	8,192(8,192)	16

側鎖を露出させると活性は増加し、さらに、再度スミス分解を行なってβ1-6結合したD-ガラクトシル残基からなる側鎖を分解した結果、再び阻止活性の低下が認められた。表4は種々のほ乳動物の赤血球に対するFVA、VVA及びPOAの凝集活性の比較で、いずれも、ヒトの血球の凝集では血液型により余り影響を受けないが、その他

FVA エノキタケのレクチン, VVA フクロタケのレクチン, POA ヒラタケのレクチン  
\*A型, B型, O型, 及びAB型血球, \*\*各血液型, 10検体の凝集活性の範囲

のは乳動物では明瞭な相違がある。図3はヒト血球に対するSCAの凝集活性の相違を血液型と個人のレベルで検討したデータを図示したものである。B型>A型の傾向は明らかにSCAの糖結合特異性(D-Gal>D-GalNAc)を反映している。O型では、SCAに対する感受性が異なる血球の広い分布があり、明瞭な個人差が認められた。この感受性の相違は血球膜表面にあるCad抗原の決定基である糖鎖構造、D-GalNAc- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6)-D-Galの量的相違に関連する可能性が考えられている。

血液型に特異的なレクチンは少なく、僅かにツリガネタケ *Fomes fomentarius* のB型凝集素<sup>44)</sup> ウラムサキ *Laccaria amethystina* のA型及びO型凝集素<sup>45)</sup> 及び子囊菌に属するヒロチャワンタケ *Aleuria aurantia* の子実体から精製されたL-フコース(L-Fuc)特異的レクチン(O型凝集素、AAA)<sup>46-47)</sup> が報告されているに過ぎない(表2)。このうち、子囊菌に属するヒロチャワンタケ *Aleuria aurantia* のレクチンAAAは数少ないL-Fuc結合レクチンで、リガントとして活性化させたセファロースに結合させ、それを用いたアフニテイクロマトグラフィーはヒト赤血球膜のL-Fucを含む糖質の分離や糖蛋白質のL-Fuc含有糖鎖の分離及び構造解析に使用された<sup>49-50)</sup>

### 蛋白化学的性質

分子量とサブユニット組成を見ると(表2)、担子

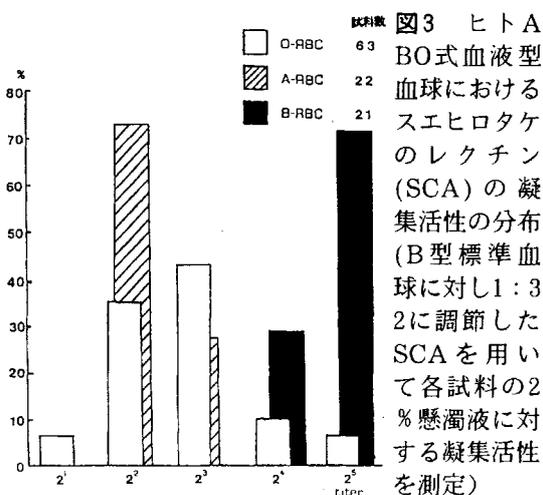


図3 ヒトA BO式血液型血球におけるスエヒロタケのレクチン(SCA)の凝集活性の分布(B型標準血球に対し1:32に調節したSCAを用いて各試料の2%懸濁液に対する凝集活性を測定)

菌のレクチンは見かけの分子量が植物や動物と同様に、FVAやVVAのような分子量が12-13kDaのサブユニットからなる2量体とABAとCCAに代表される16-18kDaのサブユニットから構成される4量体の二つのタイプにまとめられる。*F. fomentarius*や*C. nebularis*のレクチンについて報告されたサブユニットの分子量の多様性は<sup>41)</sup> 精製の過程で混在する蛋白分解酵素の作用を受けて部分的に分解した産物の可能性が高い。ABAとCCAは等電点電気泳動あるいはゲル電気泳動分析でそれぞれ等電点がpH 5.53-6.70とpH 9.80-10.20の5成分に分離し2種の異なるサブユニットにより構成される蛋白質であることが証明された。

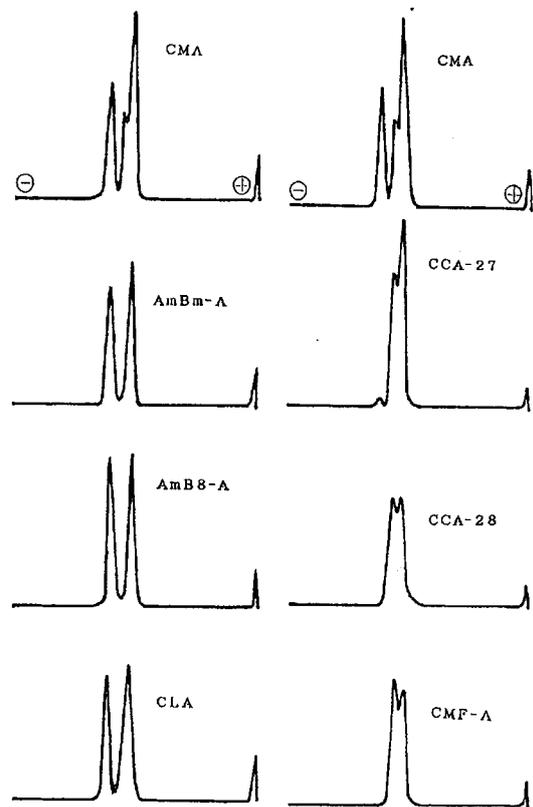


図4. ヒトヨタケ属担子菌のレクチンのサブユニット組成の比較(SDSゲル電気泳動パターン) ウシグソヒトヨタケのレクチン(CMA:野生株のレクチン;CMF-A,AmBm-A,AmB8-A:変異株のレクチン) ネナガノヒトヨタケのレクチン(CCA-27:IFO-30627株のレクチン,CCA-28:IFO-30628株のレクチン) ザラエノヒトヨタケのレクチン(CLA)

3種のアヒトヨタケ属 (*Coprinaceae*)の担子菌、ウシグソヒトヨタケ *C. cinereus* f. *microsporus* (Hongo)(CMA)、ネナガノヒトヨタケ *C. cinereus* S. F. Gray (CCA)及び、ザエノヒトヨタケ *C. lagopus* (Fr.)(CLA)の子実体からレクチンを精製してサブユニット組成と免疫的相関を調べた<sup>3,9)</sup> 図4

はSDS-ゲル電気泳動でレクチンの精製標品のサブユニットを分離した結果で、CMA、CCA及びCLAはそれぞれ分子量が16kDa(I)、17kDa(II)及び18kDa(III)、17kDa(II)と18kDa(III)、16kDa(I)と18kDa(III)のサブユニット組成であることを示し、ウシグソヒトヨタケ由来の変異株はCCAとCLAの2つのタイプのサブユニット組成に分かれた。また、4種の菌株から得たレクチンはCMAを抗原として作製した抗体と反応し免疫的には同一の蛋白質であることが判明した。これらの結果は3種の菌が分類学上きわめて近接している根拠を与え、また種の形成の過程を示唆し、興味深い知見である。

表5には、主な担子菌のレクチンのアミノ酸組成

表5. 担子菌レクチンのアミノ酸組成(mol%)

アミノ酸	ABA-I	CCA	CNA	FFA	FVA	HOA	SCA	VVA
Lys	3.0	5.4	2.6	6.5	6.6	3.6	9.6	5.5
His	ND	2.3	1.5	3.8	ND	2.1	1.1	ND
Arg	4.9	4.4	0.4	2.1	1.1	1.7	2.3	2.0
Asp	11.5	12.0	14.3	12.4	10.7	13.7	13.8	13.2
Thr	11.1	4.8	9.8	5.9	10.6	7.3	6.1	7.1
Ser	6.3	7.4	7.8	5.3	9.2	6.8	3.4	6.5
Glu	8.8	7.9	10.1	8.4	6.6	6.6	12.3	8.1
Pro	ND	7.7	6.1	3.0	4.2	3.3	2.3	4.6
Gly	15.2	7.3	9.5	10.9	13.2	7.4	9.2	13.1
Ala	7.9	9.6	7.4	10.0	6.1	8.5	5.7	8.3
Cys	0.5	ND	ND	1.2	ND	ND	ND	ND
Val	8.2	7.8	5.8	6.9	9.8	7.9	8.0	7.5
Met	6.4	ND	1.5	2.5	ND	2.9	ND	ND
Ile	3.4	7.6	6.3	5.4	5.8	6.9	7.3	5.1
Leu	4.6	7.8	8.6	6.2	5.4	6.3	6.1	8.0
Tyr	4.3	3.5	2.6	1.5	4.4	2.9	2.3	6.4
Phe	3.3	6.8	4.3	4.8	3.8	6.6	3.1	3.7
Trp	0.6	ND	1.3	3.2	2.5	4.4	2.4	1.0

ND: 検出されない。

ABA-1: *Agaricus bisporus* (ツクリタケ) レクチン-1, CCA: *Coprinus cinereus* (ネナガノヒトヨタケ) レクチン, CNA: *Clitocybe nebularis* (ハイイロシメシ) レクチン  
 FFA: *Fomes fomentarius* (ツリカネタケ) レクチン, FVA: *Flammulina velutipes* (エノキタケ) レクチン, MOA: *Marasmius oreades* (シハフタケ) レクチン,  
 SCA: *Schizophyllum commune* (スズヒロタケ) レクチン, VVA: *Volvariella volvacea* (フクロタケ) レクチン

成をまとめた。多くの植物及び動物起源のレクチンと共通して、酸性、水酸基および脂肪族アミノ酸の含有量が高く、含硫アミノ酸の含有量が少ないかあるいは全く含まない点に特徴がある。FVAとVVAは、それぞれサブユニットの分子量が12kDaと13kDaの2量体で、Met, CysおよびHisを欠くなど共通点が多い。したがって、これらレクチンのサブユニットは疎水あるいは水素結合、電荷などで結合してものと思われる。これに対して、ヒラタケのレクチン、POAはCysのジスルフィド結合でサブユニットが結合している糖蛋白質で、Ca<sup>2+</sup>に依存して糖に結合するなど他の担子菌のレクチンとは明らかに異なり、還元剤やEGTAの存在で容易に失活する。このタイプのレクチンは動物

	10	20	30	40	50	60
FVA	Ac-SATSLTFQLAYLVKKIDFDYTPNWGRGTPSSYIDNLTFFPKVLTDKKYSYRVVVGSDLGV					
LZ-8	Ac-SDTALIFRLAWDVKKLSFDYTPNWGRGNPNFIDTIVTFPKVLTDKAYTYRVAVSGRNLGV					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	
FVA	ESNFAVTPSGGQTINFLQYNGYGVADTKTIQVFFVVPDGTGNSEYIIAEWK					
LZ-8	KPSYAVESDGSQKVNFLYNSGYGIADTNTIQVFFVVPDPT--NNDFIIAQWN					
	70	80	90	100	110	

: 一致するアミノ酸残基  
 .: 塩基置換のアミノ酸残基  
 -: 挿入

エノキタケのレクチン (FVA)  
 マンネンタケの免疫調節蛋白質 (LZ-8)

図5 エノキタケ血球凝集素(FVA)とマンネンタケ免疫調節蛋白質の一次構造の相同性

界に広く分布している点、高等な菌類に見い出されたことは進化の観点から興味深い。

### 構造

植物や動物のレクチンとは異なり、真菌類のレクチンの一次構造に関する情報はきわめて乏しい。最近、われわれの研究室では、FVAの全アミノ酸配列をpeptide sequencerとFAB-MSを用いて蛋白分解酵素及び化学的部分分解で生じたペプチドのアミノ酸配列を解析して決定した<sup>51)</sup> FVAはN末端アミノ基がアセチル基で閉塞したSerで始まりC末端のThrで終わる114残基からなる単純蛋白質である。アミノ酸配列のデータベースを用いたFVAとの相同性の検索では、2,3の免疫グロブリンのL鎖の可変領域以外、配列に明瞭な相同性がある蛋白質はなく、FVAはきわめて特異な蛋白質であることが判明した。唯一の例外は、最近、そのアミノ酸配列が報告されたマンネンタケ*Ganoderma lucidum*の培養濾液から精製されたImmunomodulatory protein(LZ-8)で<sup>52-53)</sup> 挿入部分を入れて最適化するとFVAの112残基のうち69残基のアミノ酸配列が一致した(図5)。このきわめて高い相同性は、両者が同じ分子集団に属する蛋白質であることを示している。サブユニットの分子量とアミノ酸組成でFVAに類似するフクロタケのレクチンVVAも同じ分子グループである可能性が高い。

FVAは大阪大学蛋白質研究所の松浦研究室で結晶化され、X線解析による高次構造の決定が行われた<sup>54)</sup> その結果、折りたたまれた $\beta$ -シート構造とその外に伸展したN末端部分の $\alpha$ -ヘリックス構造の配置が推定された。そのデータとアミノ酸配列から、Robsonら<sup>55)</sup> の二次構造を予測し、図6Aに示したN末端部分の $\alpha$ -ヘリックスとそれに続く6個の $\beta$ -シートからなる構造が推定できた。また、Edmondsonら<sup>56)</sup> の方法に従い作製したHelical Wheelは他のレクチンにしばしばみられる電荷を有するアミノ酸や芳香族アミノ酸が配列する構造に相当し、X線解析による高次構造に整合するものであった(図6B)。一方、松浦研究室で

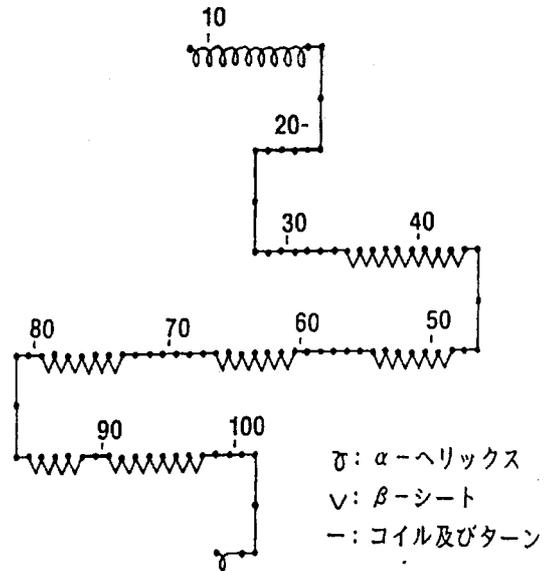


図6-A エノキタケのレクチン(FVA)の二次構造の推定 (Robsonの予測パラメータを用い、不定領域のN末端及びC末端から8残基は省略した。)



図6-B エノキタケのレクチン(FVA)のN末端におけるアミノ酸の分布 (1-18残基までをEdmondsonのHelical Wheelで表示した。) 斜線部分: 疎水性アミノ酸残基 白地部分: 親水性アミノ酸残基 黒地部分: 芳香族アミノ酸残基

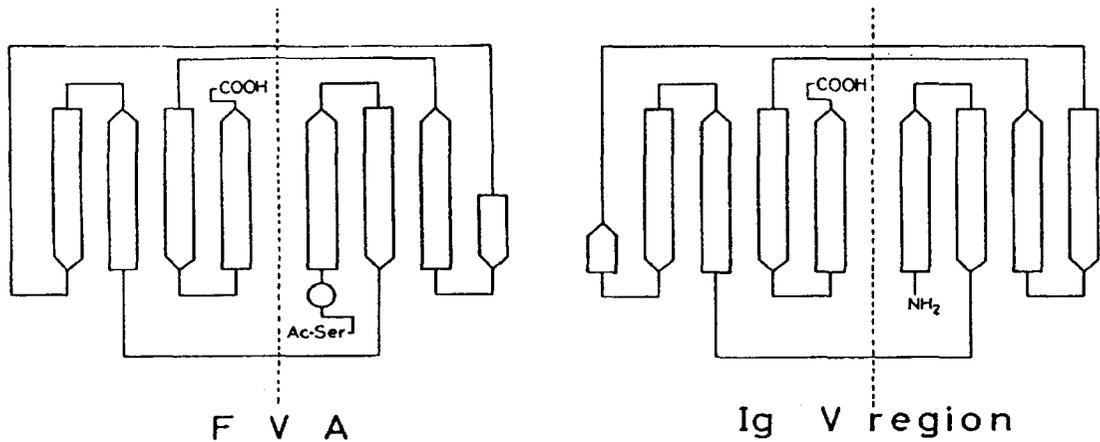


図7 FVAとIgの可変領域の高次構造の比較(2)

□ :  $\beta$ -シート ○ :  $\alpha$ -ヘリックス

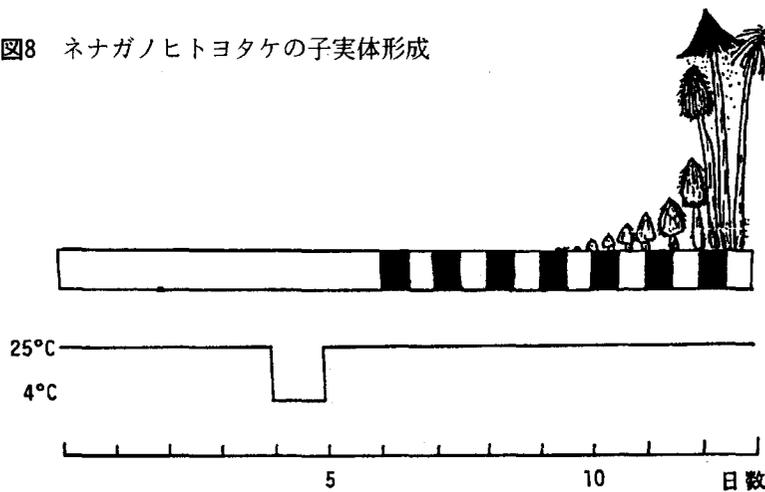
破線の右側が図23の紙面の手前側、左側が紙面奥に相当する。

行われた免疫グロブリン(IgV<sub>L</sub> $\lambda$ )のL鎖の可変領域とFVAの高次構造の比較により、両者の間にきわめて高い類似性が指摘された。図7は、 $\beta$ -シート間の連結と配置を示した模式図で、FVAのN末端部分の $\alpha$ -ヘリックス構造と $\beta$ -シートが一箇所欠除している点を除けば、L鎖の可変領域の $\beta$ -シート構造の折りたたみの配置と $\beta$ -シート間の連結に顕著な類似性がある。このような高次構造に関連して、免疫グロブリンの可変領域内の $\beta$ -シートの重点を置き、アミノ酸配列をデータベ

スを解析した結果、FVAの配列と一致するアミノ酸残基があり、A1NS47(マウス由来のIgV<sub>H</sub>)のように分子全体では24%に及ぶ例も少なくない。FVAの糖結合部位と抗原と結合部位である可変領域のアミノ酸配列の共通性はレクチンと免疫グロブリンとの間にある構造と機能上の密接な関連を示していると思われる。

細胞膜表層に局在する抗原性蛋白質やレセプターの構造解析のデータが蓄積するとともに免疫グロブリン、Igとの構造上の関連が明らかになり、

図8 ネナガノヒトヨタケの子実体形成



培養条件：暗所 - (4-5日) → 暗所低温 (4°C) 処理 (1日) → 暗所 (1日) → 明 - 暗処理 (12時間サイクル, 4-5日) → 子実体形成

最近では、そのような膜蛋白質をImmunoglobulin superfamilyとしてまとめ、機能や分子進化の観点から総合的な研究が進められている<sup>7-9)</sup>。このグループに属する多くの膜蛋白質にはアミノ酸配列、ジスルフィド結合を介して形成されるLoop構造、Hypervariable domain、糖鎖など共通点が多い。FVAがジスルフィド結合を欠くにも関わらず、図8のようなIgの類似する $\beta$ -シートの折りたたみ配置を持った高次構造を形成する分子である点蛋白質構造の進

化を考えるうえで興味深い知見と思われる。FVAにアミノ酸配列で高度の相同性があるマンネンタケのLZ-8は高次構造においても高度の類似性があることが予想されるが、FVAがヒツジ以外の5種のは乳動物の赤血球を凝集するのに対し、LZ-8の凝集はヒツジ血球のみに限定され、この明瞭な相違に関わる糖結合特異性と分子構造との関連の解明が今後の課題である。また、Concanavalin Aなど糖結合特異性が決定されているレクチンでは、糖に結合した状態(糖-レクチン複合体)のX-線解析が行われ、高次構造のレベルで糖結合部位が解明されている<sup>59-62)</sup> FVAについてもサブユニット間の結合部位とともに、親和性が高い糖構造を明らかにして三次元で糖結合部位を証明することが、この蛋白質の構造と機能の本質的な解明に必要であろう。

#### レクチンの機能

変形菌類や動物では、形態形成あるいは発生の過程におけるレクチンの関与について興味ある情報が蓄積している。細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* のアメーバ様細胞が集合し凝集して変形体を形成する過程でレクチン、Discoidin Iには細胞表面に局在する糖蛋白性のレセプターに結合して細胞間の接着に関与するほかに、その分子内にあるトリペプチド構造、Arg-Gly-Aspを通じて細胞に結合し、集合のための細胞の秩序立った流れをつくるという糖に結合する以外の機能がある<sup>63-64)</sup> また、Discoidin Iの量は細胞凝集(Cell aggregation) 期に最大に達し、他のレクチン、Discoidin IIのレベルは子実体形成の進行とともに増加する。このように2種のレクチンは異なる

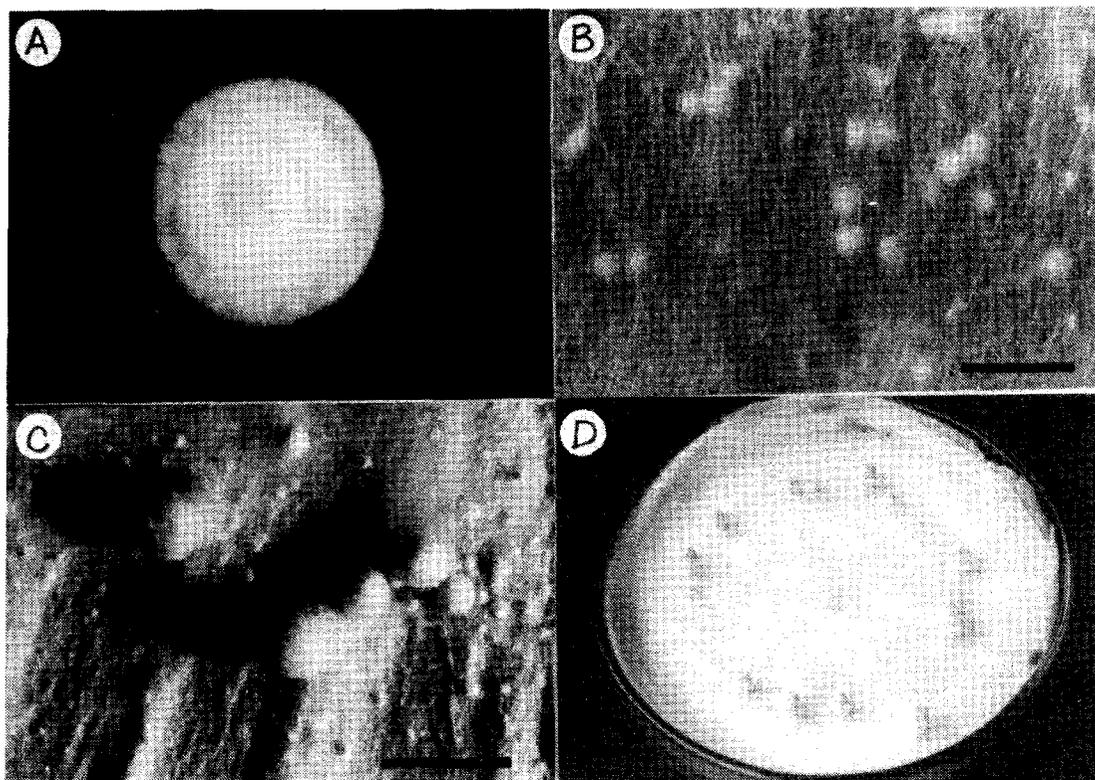


図9. ネナガノヒトヨタケの子実体原基及びFairy Ringの形成

A:4日目, 暗所, 25°Cで培養した菌糸

B:低温処理(4°C)後, 光照射(明-暗12時間サイクル)下8日間培養した菌糸及び子実体原基;—2mm

C:培養9日目の子実体—5mm

D:培養11日目に生じた子実体の輪(Fairy Ring)

機能を果たしてと思われるが、Discoidin IIの機能は全く解明されていない。粘菌は孢子の発芽から子実体形成までの生活環をほぼ24時間で終了するが、ウシグソヒトヨタケでは、一定の培養条件下で子実体形成まで約2週間を必要とする。しかし、この菌の子実体は大型で、レクチンの調製やその組織における分布などを検討するのが容易な利点がある。図8はウシグソヒトヨタケの子実体形成の過程を示した図で、4℃で24時間低温処理しさらに光照射下で培養すると、その名の通り子実体原基の菌柄が急速に発達伸長し、菌傘の担子器にある孢子の成熟が起こり、まもなく子実体が溶解する。例えば、シャーレで暗所で培養した菌糸をボラーで切りとった円盤(径5mm)を別のシャーレの培地の中央の置き暗所、25℃で培養すると、菌糸は同心円状の増殖する。4-5日後4℃で24時間低温処理を行い再び処理前の温度で光を当てて培養を続けると、低温処理後に増殖した菌糸部分に多くの子実体原基を生じその一部が発達してFairy Ringと呼ばれる子実体の輪ができる(図9)。このようにして得られる子実体形成の各段階の菌糸を集め、菌糸の抽出液について血球凝集活性の測定及び酵素免疫法、イムプロットング、二重免疫拡散法を用いてレクチンの有無と量的変化を調べた。図10は血球凝集活性を測定して得た結果であり、栄養増殖菌糸にはレクチンは全く検出されず、低温処理後の子実体原基の形成にともなってレクチ

ンが出現し、その発達とともに増加する。血球凝集活性やその他の免疫的方法によってもこの結果を支持するデータが得られた。エノキタケやスエヒロタケにおいても同様な結果であり、栄養増殖菌糸にはレクチンは存在せず、子実体原基の形成と同時にレクチンが合成されることが確認された。表6はエノキタケの子実体の菌傘と菌柄における

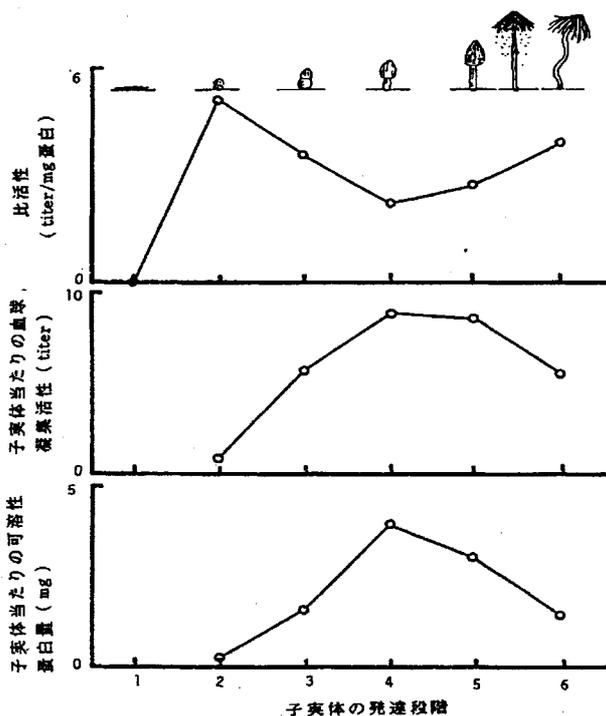


図10 ネナガノヒトヨタケの子実体形成過程におけるレクチンの量的変化

表6 エノキタケ子実体におけるレクチン(FVA)の含有量

	黄化した子実体*			子実体**		
	菌傘	菌柄上部	菌柄下部	菌傘	菌柄上部	菌柄下部
総蛋白質(mg/g*)	8.8	6.4	5.2	24.7	24.5	20.0
FVA含有量(mg/g*)	0.97	1.02	0.68	1.76	2.21	1.20
FVA/総蛋白質(%)	11.0	15.9	13.1	7.1	9.0	6.0

\*暗所で培養 \*\*光照射下で培養 \* 生重量

レクチンの含有量を測定したデータで、レクチンの量は変化するが、子実体全体に分布することを示している。ウシグソヒトヨタケにおいても子実体の菌傘、鱗毛及び菌柄の抽出液の血球凝集活性を測定して同様なレクチンの分布が得られた。レクチンが子実体形成の初期(原基の形成)に出現し、子実体のすべて組織細胞の分布ようになる事実は、この蛋白質が担子菌の形態形成に密接な関係があり、低温や光の刺激によって分化した細胞で特異的に合成され、子実体形成の開始(initiation)、発達及び成長に重要な機能を果たしていると思われる。この機能の解明には子実体を形成しないあるいはその形成が異常な変異株を用いた遺伝的レベルでの解析が有効である。子実体の形成の初期では、ある菌糸の先端が他の菌糸に接着して結び目状の構造(knot)をつくり、それにさらに菌糸がからみ、また菌糸の伸長もあって毛鞠状の原基ができる。ウシグソヒトヨタケの野生株(W)、knotはつくるが子実体には発達しない変異株(A2B2arg-3)及びknotをつくらない変異株(Kt-)を子実体形成の培養条件で培養し、菌糸の抽出液のレクチンを特異的抗体を用いイムノプロットングで調べた。<sup>6,5)</sup> W株以外、レクチンは検出されないが、いずれの株の抽出液にも共通してレクチンのサブユニットIIIのみが存在した。この結果は、knotの形成に先だててサブユニットIIが菌糸の細胞で合成され、knotが形成されたのちに菌糸にも依るが、サブユニットIとII、あるいはIまたはIIが新たに合成されてレクチンがその機能を発現するという調節機構を示唆している。さらに、W株の培地にこの菌の血球凝集活性を阻止し、また精製で用いたアフィニティークロマトグラフィーのリガンドである乳糖を高濃度で添加しておくくとknotの形成の阻害が観察された。このレクチンがknot形成で菌糸間の接着に関与している可能性は高いが、この菌の細胞壁にはD-ガラクトースはほとんど含まれず、レセプターとなる糖質の同定が課題であろう。

## おわりに

レクチンの研究はすでに一世紀を経たが、担子菌のレクチンの組織的研究はその端緒が開かれたばかりである。他の起源のレクチンと同様に糖結合特異性が高い担子菌レクチンは糖質の分離や同定に使用され、組織細胞におけるレクチンの機能も変異株の使用などによって解明の糸口がつかめている。また、エノキタケのレクチンFVAの構造解析にみられるように蛋白質の構造と機能の研究に一石を投じた結果もある。

担子菌は材料の入手に多少難点はあるが、その生態、子実体の形態、分布は多様であり、したがって、さらに特異な糖結合特異性を有するレクチンや血球凝集には関係のない糖結合蛋白質の存在も予想され、形態形成の生化学的研究と併せて夢多い研究分野といえることができる。

## 文 献

- 1) T. Wieland, "Peptides of Poisonous Amanita Mushrooms", Springer-Verlag, New York Berlin Heidelberg (1986)
- 2) T. Wieland, Naturwiss., 74, 367-373(1987)
- 3) N. Sharon and H. Lis, Trends Biochem. Sci., 12, 488-492(1987)
- 4) J. B. Sumner, J. Biol. Chem., 37, 137-142 (1919)
- 5) J. B. Sumner and S. F. Howell, J. Bacteriol., 32, 227-237(1936)
- 6) W. C. Boyd and R. M. Regura, J. Immunol., 62, 333-339(1949)
- 7) K. O. Renkonen, Ann. Med. Expl. Biol. Fenn., 26, 66-72(1948)
- 8) I. J. Goldstein and C. E. Hayes, Adv. Carbohydrate Chem., 35, pp226-231(1978)
- 9) I. J. Goldstein and C. E. Hayes, Adv. Carbohydrate Chem., 35, pp262-267(1978)
- 10) I. J. Goldstein and C. E. Hayes, Adv. Carbohydrate Chem., 35, pp289-291(1978)
- 11) W. M. Watkins and W. J. T. Morgan, Nature, 196, 825-826(1952)

- 12) W. J. T. Morgan and W. M. Watkins, *Brit. J. Exp. Path.*, 34, 285, 66(1980)
- 13) 山本 茂 “血液型” 化学同人 (1986)
- 14) W. C. Boyd and E. Shaleigh, *Science*, 119, 419(1948)
- 15) I. J. Goldstein, M. Monsigny, T. Osawa and N. Sharon, *Nature*, 94 - 103(1953)
- 16) H. Lis and N. Sharon, “Biology of Carbohydrates”, Vol. 3, Wiley Interscience, pp1 - 85(1986)
- 17) H. Lis and N. Sharon, “The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine”, Academic Press, New York, pp293 - 370(1986)
- 18) E. D. Green and J. U. Baenziger, *Trends Biochem. Sci.*, 14, 168 - 172(1989)
- 19) A. Haselbeck and W. Hosel, *Glycoconjugate J.*, 7, 63 - 74(1990)
- 20) A. M. C. Rapin and M. M. Burger, *Adv. Cancer Res.*, 20, 1 - 91(1974)
- 21) M. E. Etzler, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 36, 209 - 234(1985)
- 22) D. Mirelman (ed.) “Microbial Lectins and Agglutinins: Properties and Biological Activity”, Wiley-Interscience (1986)
- 23) H. Lis and, N. Sharon, “Lectins in Higher Plants”, *The Biochemistry of Plants*, Vol.6, Academic Press, pp371 - 447(1981)
- 24) N. Sharon and H. Lis, *Science*, 177, 949 - 959(1972)
- 25) S. H. Barondes, *Science*, 223, 1259 - 1264 (1984)
- 26) S. H. Barondes, *Ann. Rev. Biochem.*, 50, 207 - 231(1981)
- 27) K. Olden and J. B. Parent (eds.), “Vertebrate Lectins”, Van Nostrand Reinhold Co. New York (1987)
- 28) K. Drickamer, *J. Biol. Chem.*, 263, 9557 - 9560(1988)
- 29) S. H. Barondes, *Trends Biochem. Sci.*, 13, 480 - 482(1988)
- 29) N. Sharon and H. Lis, *Science*, 246, 227 - 234(1989)
- 30) H. Franz, *Naturwiss*, 77, 103 - 109(1990)
- 31) R. Seeger and R. Weidemann, *Arch. Toxikol.*, 29, 189 - 217(1972)
- 32) M. Coulet, and A. -M, Merland, *C. R. Seances, Soc. Biol. Ses. Fil.*, 154, 2293 - 2296 (1960)
- 33) A. -M. Merland and M. Coulet, *C. R. Seances, Soc. Biol.*, 155, 2348 - 2352(1961)
- 34) M. Coulet, A. M. Labro, J. Guillot and R. Laget, *C. R. Seances Soc. Biol. Ses. Fil.*, 164, 2518 - 2521(1970)
- 35) T. Yatohgo, M. Nakata, Y. Tsumuraya, Y. Hashimoto and S. Yamamoto, *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1485 - 1493(1988)
- 36) J. Y. Lin and T. B. Chou, *J. Biochem.*, 96, 35 - 40(1984)
- 37) T. Yatohgo, MS Thesis, Saitama Univ., Dept, Biochem. (1986)
- 38) H. Kawagishi and T. Mizuno, *FEBS Lett.*, 227, 99 - 102(1988)
- 39) 橋本洋一, 中田宗広, 八藤後武美, 急式弘之, 円谷陽一, 山本 茂. 第8回糖質シンポジウム講演要旨集, pp9 - 80(1986)
- 40) K. Itoh, MS Thesis, Saitama Univ. Dept. Biochem.(1987)
- 41) S. Sueyoshi, T. Tsuji and T. Osawa, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366, 213 - 221(1985)
- 42) H. Kawagishi, A. Nomura, T. Mizuno, A. Kimura and S. Chiba, *Biochim. Biophys. Acta*, 1034, 247 - 252(1990)
- 43) N. Kochibe and K. L. Matta, *J. Biol. Chem.*, 264, 173 - 177 (1989)
- 44) V. Horejsi and J. Kocourek, *Biochim, Biophys. Acta*, 538, 299 - 315(1978)
- 45) J. Guillet, L. Genaud, J. Guengnot and M. Damez, *Biochemistry*, 22, 5365 - 5369 (1983)

- 46) N. Kochibe and K. Furukawa, *Biochemistry*, 19, 2841-2846(1980)
- 47) N. Kochibe and K. Furukawa, *Methods in Enzymol.*, 83, 373-377(1982)
- 48) F. Yagi and K. Terada, 52, 2077-2079 (1988)
- 49) S. Yazawa, K. Furukawa and N. Kochibe, *J. Biochem.*, 96, 1737-1742(1984)
- 50) K. Yamashita, N. Kochibe, T. Ohkura, I. Ueda and A. Kobata, *J. Biol. Chem.*, 260, 4688-4693(1985)
- 51) M. Yamada, MS Thesis, Saitama Univ., Dept. Biochem. (1990)
- 52) K. Kino, A. Yamashita, K. Yamaoka, J. Watanabe, S. Tanaka, K. Ko, K. Shimizu, and H. Tsunoo, *J. Biol. Chem.*, 264, 472-478(1989)
- 53) S. Tanaka, K. Ko, K. Kino, K. Tsuchiya, A. Yamashita, A. Murasugi, S. Sakuma and H. Tsunoo, *J. Biol. Chem.*, 264, 16372-16377(1989)
- 54) 松浦良樹, 理研シンポジウム要旨集, 89-25, 12(1990)
- 55) B. Robson and D. J. Osguthor, *J. Biol. Chem.*, 620, 97-120(1978)
- 56) A. B. Edmondson and M. Schiffer, *Biophys. J.*, 7, 121-135(1967)
- 57) A. F. Williams and A. N. Barclay, *Ann. Rev. Immunol.* 6, 381-405(1988)
- 58) C. Chothia, A. M. Lesk, A. Tramontano, M. Leviit, S. J. Smith-Gill, G. Air, S. Sheriff, E. A. Padlan, D. Davies, W. R. Tulip, P. M. Colman, S. Spinelli, P. M. Alzari and R. J. Poljak, *Nature*, 342, 877-883(1989)
- 59) J. W. Becker, G. N. Reek Jr, J. L. Wang, *J. Biol. Chem.*, 250, 1513-1524(1975)
- 60) G. M. Edelman and J. L. Wang, *J. Biol. Chem.*, 253, 3016-3022(1975)
- 61) C. S. Wright, *J. Mol. Biol.* 111, 493-457 (1977)
- 62) C. S. Wright, F. Gavilanes and D. L. Peterson, *Biochemistry*, 23, 280-287(1984)
- 63) W. R. Springer, D. N. W. Cooper and S. H. Barondes, *Cell*, 39, 557-564(1984)
- 64) H-J. Gabius, W. R. Springer and S. H. Barondes, *Cell*, 42, 449-456(1985)
- 65) T. Kanda, Dr. Sci. Thesis, Tokyo Univ, (1986)