

# レクチンの本性を知ろう

たんぱく質界の異端児

笠井 献一（帝京大学）

TIA ナノバイオサマースクール(糖鎖・レクチン)

2017・9・8

御茶の水女子大学

レクチンは第三の生命暗号である糖鎖情報を解読し、生命現象の的確な展開を支えるたんぱく質だが、分子認識にたずさわるとんぱく質としては異端者である。

一般的な分子認識たんぱく質	:	酵素、レセプター、抗体など
一人のパートナー	=	厳密な特異性
ひたむきな愛情	=	強い結合
持続する愛情	=	持続的な結合

#### レクチンの糖鎖認識の特徴

不倫があたりまえ	=	特異性が甘く、多数の糖記号と結合
薄い愛情	=	弱い結合力
すぐに飽きる	=	解離速度が大きい

レクチンはドン・ファンだ！

レクチンは倫理に背くたんぱく質なのか？

レクチンを理解するには、人間的な道德観念に縛られるべきでない。

これがレクチンの *Raison d'être*。

メリットがあるから生命に不可欠な道具として使われている。

生命を支えるのは純愛たんぱく質だけではない。

レクチンの結合性の3大特徴には生物学的な意味がきっとある

甘い特異性

弱い結合力

速い解離

# なぜ甘い特異性が利用されるのか？

糖記号の特殊性を生かして使うには、厳格すぎる識別は実用的に問題がある

【理由】 糖鎖合成には不可避免的に不確定性がつきまとう。

特定の糖記号がいつも発現される保証がない。

ある程度の寛容さを持たせ、似ていれば許容するのが現実的な解決法になる。

特異性が厳格でないことにもメリットはある。

特異性が甘いセンサーでも、複数で使えば、広範な対象を高度に識別できる。

【理由】 特異性が厳格なセンサー(例:抗血液型抗体)は、特定の糖鎖の検出には優れるが、多様な糖鎖を識別するには不適(エリート以外は眼中にない)。

特異性の甘いセンサーはエリート以外の糖鎖も広く視野に入れる。何種類かのレクチンに対する親和性を測定し、データを多次元解析すれば、高い分解能を達成できる。

【例】 色覚ではわずか3種の光受容体で、何万もの色の違いを区別できる。

嗅覚では数百種の受容体で、数十万の匂い物質を識別する。

分析化学的には、2次元クロマトグラフィーは、分離、同定に威力を示す。

原子の特定には輝線が有効だが、分子の識別にはスペクトル(複数波長)の方が有効。

# なぜ弱い結合力が利用されるのか？

弱い結合のメリットは、解離しやすいこと。

速度論的には、解離速度定数が結合速度定数に対して相対的に大きい。

生体は多様かつ臨機応変な調節現象によって正常に維持されている。

弱い相互作用系の方が素早い調節に適している。

【理由】 調節現象は必要に応じて、迅速にスイッチをオン・オフせねばならない。

スイッチ・オンには分子間の結合(例:シグナル分子と受容体)が主に使われるが、目的達成後は速やかにスイッチ・オフにしなければならない。

強い結合では解離速度が小さいため、すぐにはオフにできない。

状況に応じて的確にオフできるように、結合力はあまり強くない方がよい。

識別の観点からも、弱い相互作用は点検頻度を高められるメリットがある。

細胞表面の糖鎖パターンを、レクチンが短時間内でスキャンしうる。

【例】 HPLCの分解能はなぜ高いのか？

極めて弱い疎水性相互作用を利用するので、短時間内に膨大な頻度で点検を繰り返すことができ、高い理論段数が達成される。

## レクチンに対する偏見を捨て、正當に評価しよう

3大デメリット(甘い特異性、弱い結合、速い解離)は、じつはメリットである。  
それを生かしたことで今の生物がある。

## レクチンの能力を見なおそう

広範囲の糖記号をカバーできる認識たんぱく質。

多次元認識を行えば、多様な糖鎖の微妙な違いも識別できる。

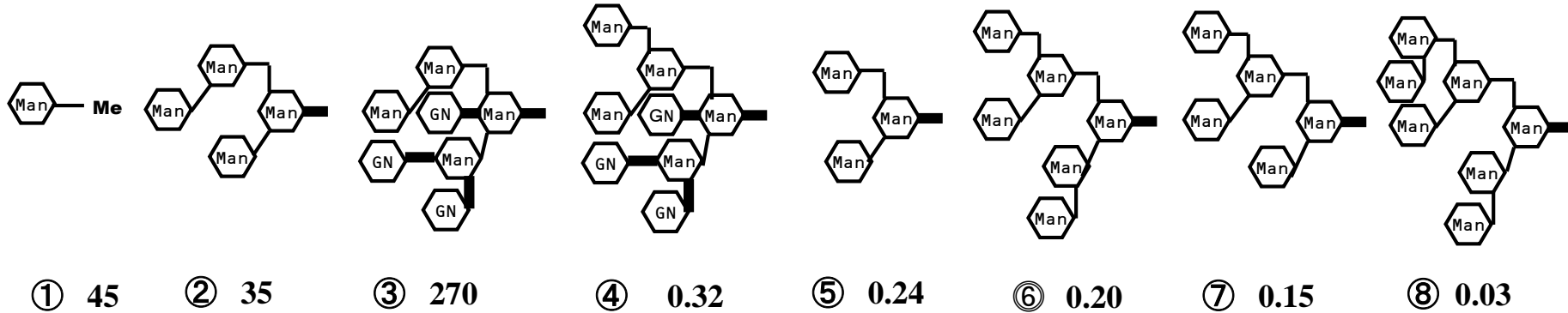
細胞の顔、表情の変化などを見分ける。

細胞外たんぱく質を修飾糖鎖の違いを利用して使い分ける。

調節現象のスイッチに利用すれば、オン・オフを素早くできる。

レクチンは標的糖鎖に対して幅広い結合力を示す

オバルブミンのN型糖鎖に対するコンカナバリンA (ConA) の結合力 (解離定数: mM)  
 フロントアルフィニティクロマトグラフィー (FAC) による測定



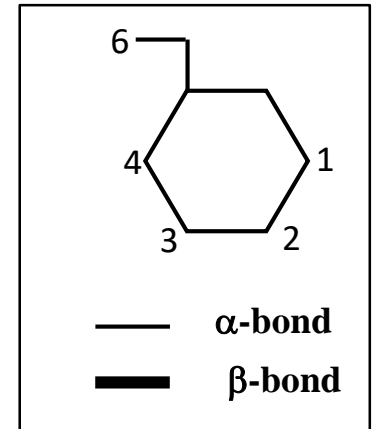
Ohyama, Y., Kasai, K. et. al., (1985) J. Biol. Chem., **260**, 6882

マンノースを含む糖鎖の間でも、構造によって結合力には1000倍もの差がある(②と⑧の比較)。パートナーか否かの境界線は明確でない。

⑤の構造 (tri-Man) が認識のかなめ (根元および上の分岐部分に現れる)。

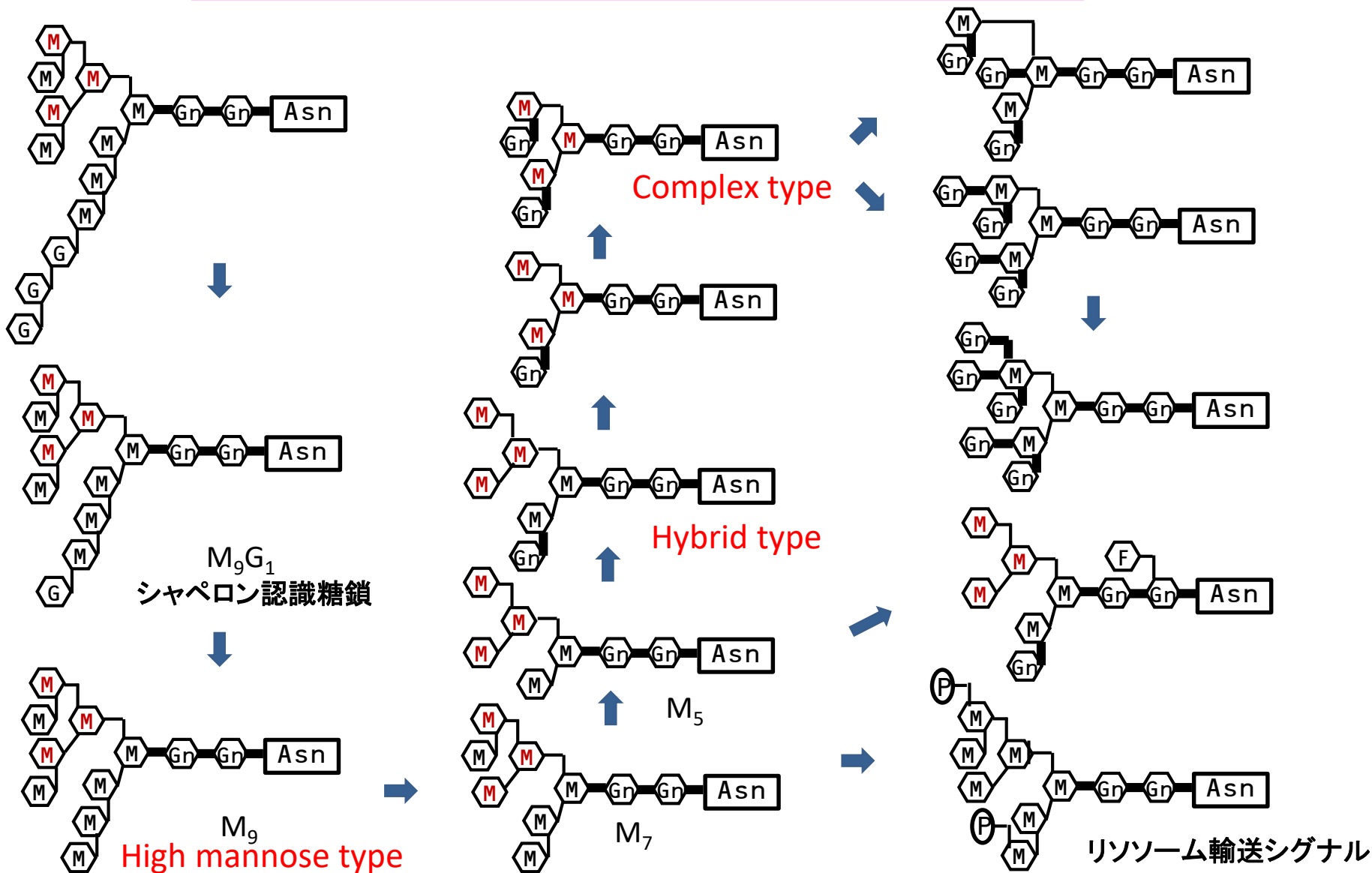
枝先の両Manの2位への置換は結合力を損ねない (例: 2本鎖 complex-type は強く結合できる) (1)。

ConAはN型糖鎖の基幹部分を標的にするよう設計されたのか?



(1) Mega, T., Oku, H., Hase, S., (1992) J. Biochem., **111**, 396

**N型糖鎖のプロセッシングの途上で、多数の中間体に、ConAが強く認識するtri-Man構造(赤字)が見られる！！**



ConAの起源はN型糖鎖の生合成と関係があるのか？



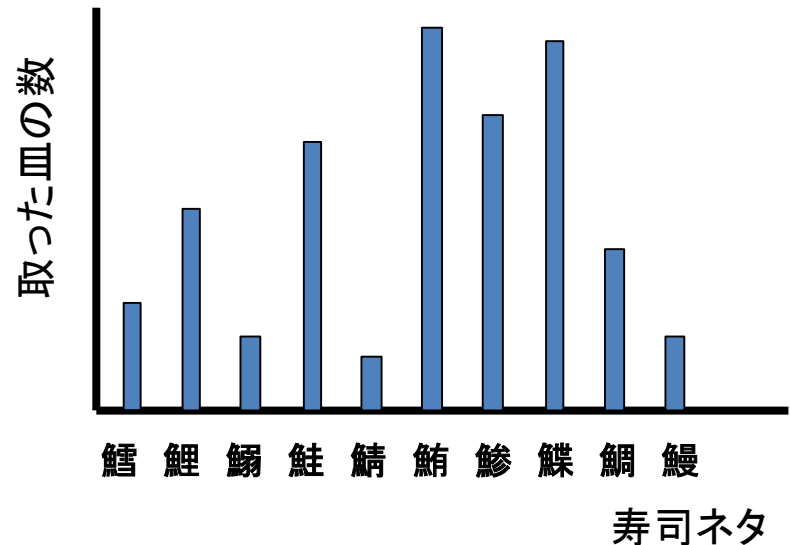
# レクチンのプロファイリング

レクチンの存在意義を理解するには、多様なパートナーに対する親和力を正確に比較できるデータ(親和性プロファイル)が必要。

プロファイリング実施に立ちはだかる壁  
弱い結合力の測定が本質的に難しい。  
調べるべき糖鎖が多様で、ほとんどが希少物質。  
結合が弱いほど、必要な糖鎖量が増える。

番外

にぎり寿司の好みのプロファイルは、重要な個人情報になるか？



# フロンタルアフィニティークロマトグラフィー (FAC)

レクチンのプロファイリングに適した実施可能な唯一の方法

分離を目的としないクロマトグラフィー

レクチンカラムに蛍光標識糖鎖(アナライト)を流して前端分析をする

利点: 弱い結合力の測定に最適

原理が明快

装置、操作が簡単

多数の糖鎖を連続的に測定できる

精度が高い(溶出前端を測定するため)

糖鎖はいくら低濃度でもよい

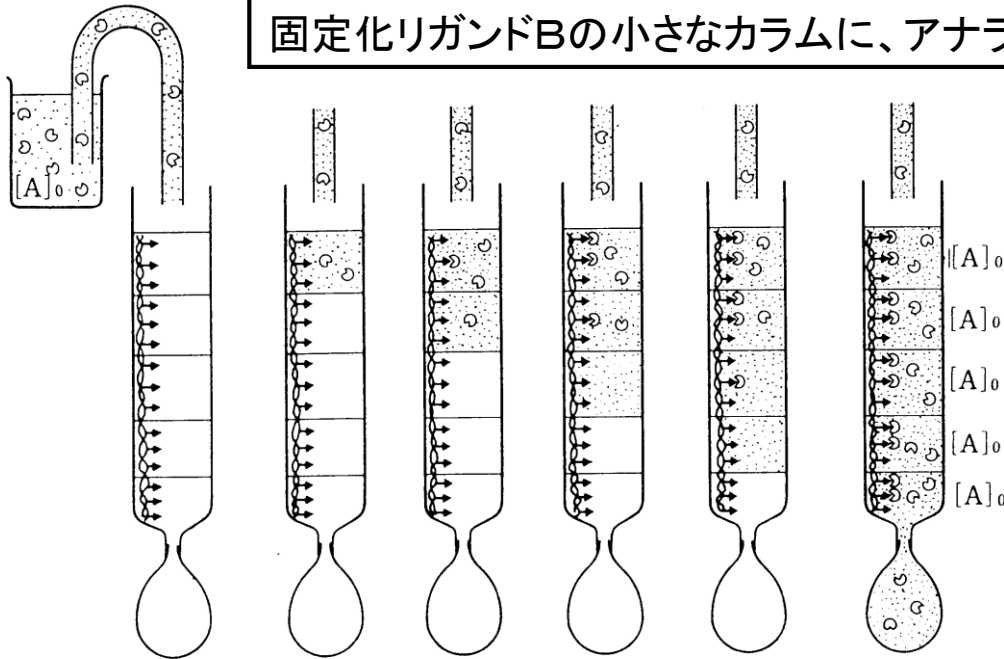
糖鎖濃度がわからなくてもよい

詳しくは以下を参照

Glycoforum. 2020 Vol.23 (2), A7 DOI: <https://doi.org/10.32285/glycoforum.23A7J>

# フロントルアフィニティークロマトグラフィー (FAC)

固定化リガンドBの小さなカラムに、アナライトA溶液を大量に注ぐ。



Bに捕らえられた分だけAの溶出は遅れる。

カラム内の遊離Aの濃度は、初濃度と変わらない。

Aの溶出の遅れから、Bと結合しているA量がわかる。

Aの濃度が十分に小さいとき

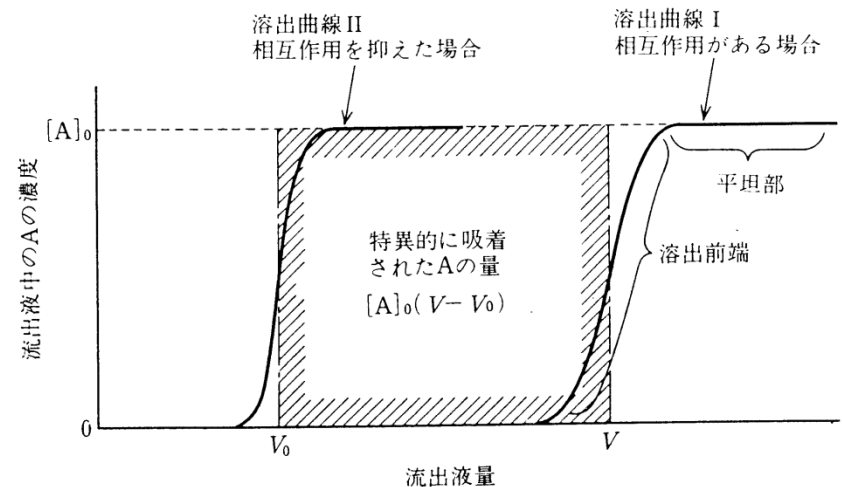
$$K_d = \frac{B_t}{V_m - V_0}$$

$K_d$ : 解離定数

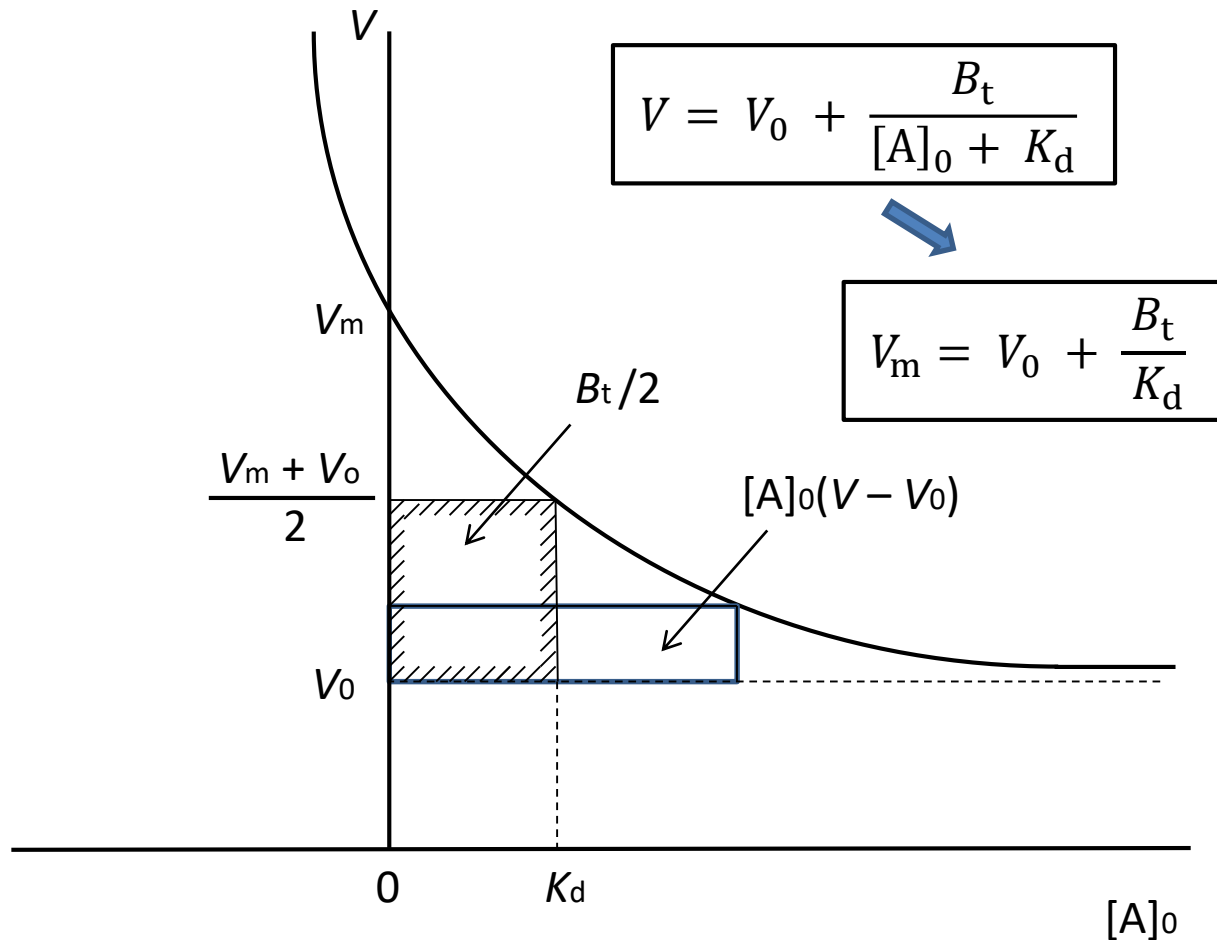
$B_t$ : カラム内の固定化レクチンの全量

$V_m$ : 低濃度糖鎖の溶出容積

$V_0$ : 素通り分子の溶出容積



# FACの基本式 ( $V$ vs. $[A]_0$ )



$[A]_0$  がほぼ 0 になると、 $V$  は最大値  $V_m$  に近づく。  
 $V_m$  を測定すれば  $K_d$  を決定できる。

## FACについての根本的疑問に対する答え

なぜアナライトがいくら低濃度でも良いのか？

なぜアナライト濃度を知る必要がないのか？

なぜ弱い相互作用であってもアナライト量を増やす必要がないのか？

【答】 リターデーションアナリシスだから。

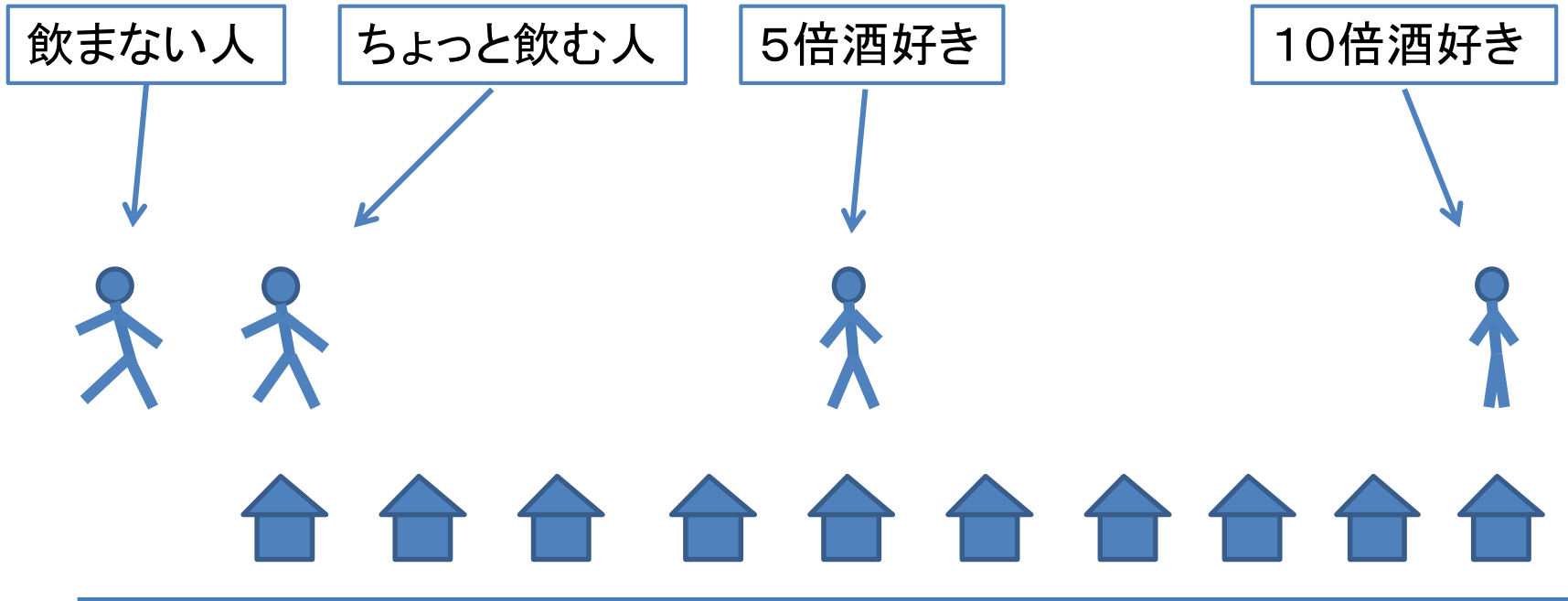
カラム内で自由に移動できる時間と、固定化リガンドに捕らえられて動けない時間の比を測定する。

そのデータと固定化リガンド濃度から解離定数を計算できる。

複合体量に依存しない測定法であり、遅延の度合さえわかれば結合力がわかる。

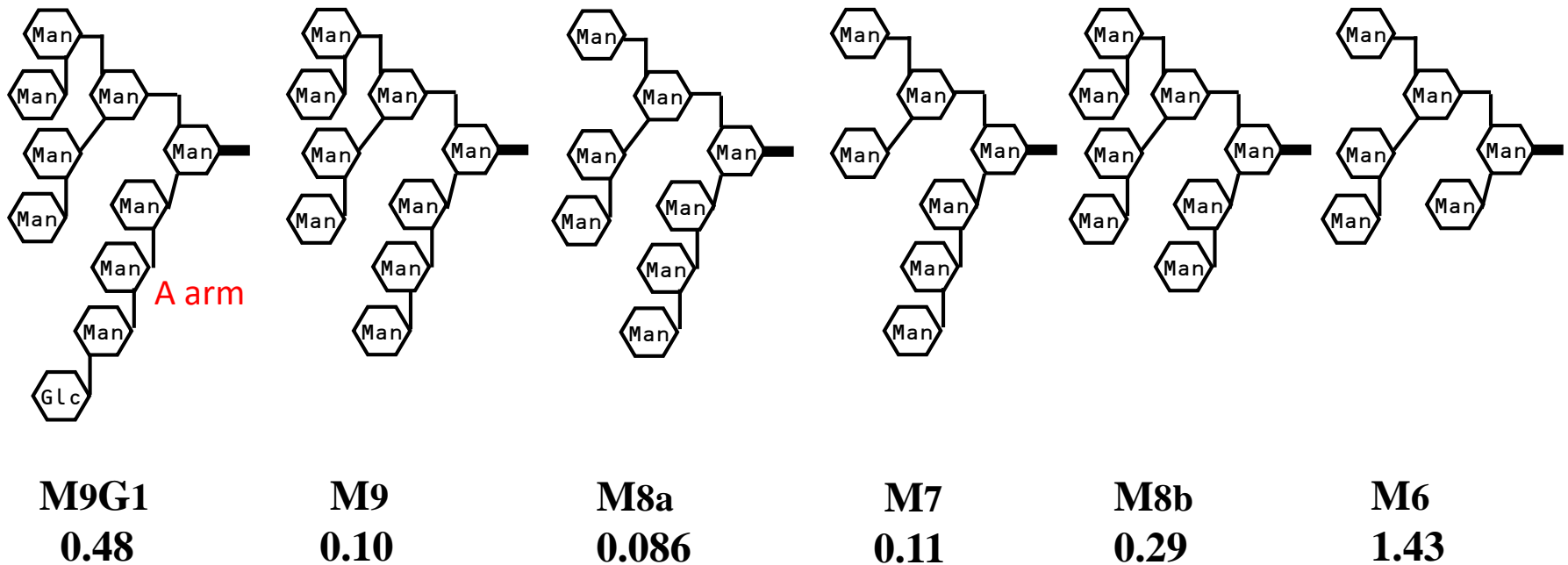
# FACの単純な原理

飲み屋小路を通り抜ける時間は  
飲み屋に対する親和性に比例する



## レクチンの弱い結合力をFACで精密に測定した例

VIP36に対する高マンノース型糖鎖の結合力 ( $K_d$ : mM)



VIP36: 小胞体とゴルジ体の中でN型糖たんぱく質を運搬するシャトルレクチン  
VIP36との結合力はA armのGlcが除去されると上昇し、Manが除去されると低下する。

Kamiya, Y., Yamaguchi, Y., et al. (2005) J. Biol. Chem., **280**, 37178

## レクチンによるファジーな糖記号認識の生物学的意義(仮説)

生命の成功には、純愛たんぱく質(強くて厳密な認識)だけではなく、不倫たんぱく質(弱くてファジーな認識)も必要だった。

核酸及びたんぱく質は、確実性、再現性、持続性に優れた情報システムを築き上げ、生命の基盤を確立した。

しかし因果関係がワンパターンなため、硬直化したシステムになり、環境の変動などの想定外の事態にはもろい。

第三の情報分子である糖鎖は、それらの対局にある。

レクチンが糖鎖情報を解読する際には、糖鎖情報の不確定性のため、常にあいまいさがつきまとい、結果にばらつきがもたらされる。

これが**多様性の導入と拡大**に貢献し、危機管理能力を向上させた。



## レクチンによるファジーな糖記号認識の生物学的意義(仮説)(続き)

糖鎖認識システムの採用は、生命現象の**因果関係に確率を介入**させた。

諸現象の結果が固定されず、常にゆらぐ。

同一起源の細胞(クローン)であっても、表面糖鎖の不均一さ、多様さにより個性が生まれ、レクチン等との親和性に差異が生じる。その結果、シグナルに対する感受性、活動性、増殖性などに、細胞ごとの差が現れる。

細胞が全員一致で画一的に応答・行動することのリスクを回避できる。

均一に作られたたんぱく質を、糖鎖修飾で不均一化することにより、活動効率、仕事の場、共同作業、寿命などに多様性がもたらされる。

既定路線から外れた選択肢が常に提供され、生命継続の可能性を高める。

【注】 生物進化の原因が、DNAの複製の不確実性にあることと似ている。

レクチンは生命の多様性、柔軟性、適応性、持続性などの向上に貢献してきた。

研究領域としては、未解明の謎に満ちていて、セレンディピティーの宝庫である。

### 参考書

「おしゃべりな糖 第三の生命暗号、糖鎖のはなし」 笠井献一著、岩波書店  
「糖鎖とレクチン」 平林淳著、日刊工業新聞社