

組換えガレクチンタンパク質の 発現と精製に関するノート



西 望

1975年大阪大学理学部化学科卒業。1980年大阪大学大学院理学研究科後期課程(博士)終了。理学博士。日本学術振興会奨励研究員、南カリフォルニア大学研究員、香川医科大学助手を経て香川大学総合生命科学研究センター准教授。この間、株式会社ガルファーマ社外取締役(2000年 - 2009年)。現在、香川大学客員研究員。

研究内容は、光合成細菌、前立腺/増殖因子、ガレクチンと変化しましたが、私の本質は古典的なタンパク質生化学者です。

序 文

このノートは、大腸菌を利用したヒトガレクチンファミリーの発現と精製に関する未発表データなどをまとめたものです。これまでガレクチンに馴染みがなく、新たに組換えガレクチンタンパク質の発現・精製を行う研究者(特に、生化学研究の経験が比較的浅い研究者)の参考になればと思います。

はじめに *p2*

1. 基本的な発現・精製方法と組換えガレクチンタンパク質の収量 *p2*

2. 各ガレクチンに関する注意点 *p6*

3. 補足 *p11*

Glycoforum <https://www.glycoforum.gr.jp/>

組換えガレクチンタンパク質の発現と精製に関するノート
<https://www.glycoforum.gr.jp/article/23A15J.html>

DOI : <https://doi.org/10.32285/glycoforum.23A15J>



この作品はクリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際ライセンスの下に提供されています。

はじめに

筆者が理研バイオリソースセンターに寄託・譲渡したガレクチンクローン（ヒト約60種類、マウス及びラット約20種類）を、Table 1に簡単な説明を付してまとめてあります。各クローンの情報には理研バイオリソースセンターのホームページからアクセスできます：理研バイオリソースセンター → 遺伝子材料開発室 > リソース情報 > 検索&リスト > 寄託者リスト → Nishi, Nozomu → 各クローン。詳しい説明が必要なクローンに関しては、対応するガレクチンの項に留意事項を記載しました。Table 1にはpTrc-HisB vector（ポリヒスチジン配列を含む分子量4,000～5,000のタグがN-末端側に付加される、大腸菌用発現ベクター）を使用したものが含まれていますが、ほとんどの場合、ガレクチンの発現にこれらのクローンを利用するメリットはありません。本文や図表中で使用するガレクチンの略称（例：ガレクチン-1、G1）については、Table 1の右端の欄を参照して下さい。Table 2は、組換えタンパク質の分子量などの情報をまとめたものです。このノートで使用するアミノ酸残基番号は、特に注意書きがない限り、開始コドンに対応するメチオニン残基を1としています。

プロトタイプ型ガレクチンは1個の糖鎖認識ドメイン（carbohydrate recognition domain, CRD）のみで構成されますが、キメラ型ガレクチン（G3）はN-末端側の非糖鎖認識ドメイン（コラーゲン様ドメイン）+ CRD、タンデムリピート型ガレクチン（G4, G8, G9, G12）はN-末端側CRD + リンカーペプチド + C-末端側CRDから成ります。G3のコラーゲン様ドメインとCRD、あるいはタンデムリピート型ガレクチンにおけるCRDとリンカーペプチドの境界を厳密に決定することは困難なので、以下に記載するCRDの領域もある程度の曖昧さを含むものです。また、ここで使用するCRDという名称は、糖鎖結合に必須な最小単位を意味するのではなく、プロトタイプ型ガレクチンであれば、その分子全体を指しています。

1. 基本的な発現・精製方法と組換えガレクチンタンパク質の収量

Table 3は、大腸菌を宿主とした組換えタンパク質の生産（収量）に関するデータです。ガレクチンの発現実験はこれまでに数多く行ってきましたが、実験条件が同一ではないため、このノートを作成するにあたってデー

タを取り直しました。G1, G3, G4, G7, G8M, G9Sについては、3種類の発現条件（37° C, 2 h; 30° C, 3 h; 20° C, 16 h）、それ以外は単一条件（20° C, 16 h）で各2回行った実験データをそのまま記載しました。GST融合タンパク質（G2, G4, G10, G13, G14/PPL13）の場合、GSTタグを除去したものを精製タンパク質としました（Fig. 2参照）。発現・精製条件をFig. 1（pET vector）とFig. 2（GST vector）に示します。Fig. 1の内容はGlycoPOD（GlycoScience Protocol Online Database; Sugar binding proteins: Expression and purification of recombinant human galectin-9）に記載したものと基本的に同じですが、一部変更があります。なお、このノートでは大腸菌以外の宿主については触れませんが、ガレクチンファミリーの中で最も発現が困難なメンバーの1つであるG9の場合、これまでに試みた宿主（大腸菌、酵母 [*S. cerevisiae*, *P. pastoris*]、バキュロウイルス感染昆虫細胞 [expres SF+]、哺乳動物細胞 [COS-1/7, HEK293, CHO]、コケ [*Physcomitrella patens*]）の中では、大腸菌が最も優れていることが分かっています。また、codon optimizationもG9の発現には効果がありませんでした。大腸菌以外の宿主に関するデータの大部分は、（株）ガルファーマ（外注を含む）において得られたものです。

現在、ガレクチンの発現はすべて20° C, overnight（14 - 18 h）で行っています。Table 3の精製タンパク質の収量データ（mg, mg/L culture）から分かるように、発現温度と時間を変えて収量を比較したすべてのガレクチンで、20° C, 16 hの条件が最も高収量となっています。しかし、収量を菌体湿重量あたり（mg/*E. coli* [g]）で比較すると、G1やG7では発現温度による差はほとんど認められず、精製タンパク質の収量は菌体収量の違いを反映していることを示しています。一方、G3とG9Sの場合、20° C以外では収量が極端に低く、十分な収量を得るためには低温での発現が必須と考えられます。Table 3のデータは小スケールの発現実験で得られたもので、一般的には、スケールアップにより収量（mg/L culture）は増加します。

組換えタンパク質の各精製段階におけるSDS-PAGEのパターン（後述）を調べると、菌体抽出液をlactose-agaroseでバッチ処理した後の遠心上清（非吸着画分）や、カラムの洗浄画分に相当量の組換えタンパク質が含まれている場合があります。G1とG8Mについて、非吸着画分と洗浄画分から組換えタンパク質を回収したデータをTable 3に赤字で示してあります*。かなりの量を回収することができますが、操作には手間がかかります。

ますので、十分な収量が得られている場合、回収操作を行うメリットは少ないと思います。洗浄画分へのロスに関しては、洗浄用緩衝液の量を減らすことで、最終標品の純度を落とすことなく、ある程度防ぐことができると思われます。**glutathione-Sepharose**の場合、少なくともカラムの洗浄画分への組換えタンパク質の漏出はほとんどありません。

* 非吸着画分は菌体抽出液と同様にバッチ法で、洗浄画分は1 mLのゲルをバックしたカラムを用いて精製した。ゲルの洗浄、溶出、透析などの条件はFig. 1 (Step 18/19 - 24)と同じ。

各発現・精製ステップ (Fig. 1, 2) に関するコメント

• Step 1

GST Gene Fusion Systemのマニュアル (GST Gene Fusion System Handbook 18-1157-58 AD 11/2014, GE Healthcare Life Sciences ; 以下、GST マニュアル) では、この段階から培地として2xYT (+ ampicillin) を使用しています。

• Step 3

今回の発現実験では、1,000 mLのフラスコに220 mLの培地 (+ overnight culture) を入れて培養を行っています。同じフラスコで400 mL程度の培地を用いても、収量 (mg/L culture) に大きな違いはありませんでした。但し、この発現実験ではフラスコの栓 (カバー) として2枚重ねのアルミ箔を使っていますので、通気性の低い培養栓を用いた場合、収量に差が出る可能性があります。

GST マニュアル : overnight culture を発現用培地で1:100に希釈。

• Step 4

吸光度*をチェックするための培地のサンプリングは、フラスコをインキュベーターシェーカーにセットしたまま行っていますので、完全に無菌的な条件ではありません。IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) を添加後、30° Cあるいは20° Cで培養を行う場合、吸光度が0.5程度になった時点で、装置の設定温度を下げています。ほとんどの実験で600 nmにおける吸光度が0.60 - 0.65になったタイミングでIPTGを加えていますが、一般的な分光光度計で大腸菌培養液の吸光度を測

定した場合、測定値が安定しないため、厳密な値とはいえません。

* 実際には吸収ではなく、大部分は測定光の散乱によるものです。

GST マニュアル : $A_{600 \text{ nm}} = 0.5 \sim 2$ でIPTG添加 (最終濃度0.1 ~ 1 mM)。

• Step 8

菌体懸濁用緩衝液として10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 1 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride, synonym: benzylsulfonyl fluoride) * を使用していますが、ガレクチン用に最適化したものではありません。スケールアップする場合は、同じ割合 (培養液の18%、Triton X-100を加えて20%) の緩衝液を使用しています。PMSFは水中では不安定です。DMSO (dimethylsulfoxide) に溶解した場合でも、DMSOに含まれる水分によって分解が進みますので、用時調製が原則です。

* G1/mG1の場合は、さらに1 mM DTT (dithiothreitol) を添加 (G1の項参照)。DTTは、G1/mG1のレクチン活性以外に、組換えタンパク質の純度や収量にも影響を与える可能性があります。この点についての検討は行っていません。

GST マニュアル : 菌体懸濁用緩衝液として、培養液100 mLに対して5 mLのPBSを使用。

• Step 9

音波処理の際、冷却効率を上げるためにロゼットクーリングセル (Rosette Cooling Cell; Fig. 3A) を氷水に浸けた状態で使用しています。音波処理に伴う温度上昇が最終標品の収量や活性にどの程度影響するのかわかりませんが、冷却効率の悪い容器を使用する場合、1回の処理時間を短くするなどの変更が必要かもしれません。

• Step 10

組換えタンパク質の可溶化を促進する目的でTriton X-100 (最終濃度1%) を加えています (GST マニュアルと同じ条件)。菌体懸濁用緩衝液と同様、習慣的に使用しているもので、ガレクチンの精製に関して十分な検討は行っていません。

• Step 14

通常、400 - 500 mLの培養液に対して1.5 mLのゲルを使用しています。バッチ法で吸着を行う場合、その後のステップでのロスを考えるとゲルの量が少なすぎるのは問題なので、この実験では200 mLの培養液に対して1 mLのゲルを使用しました。手元にある **lactose-agarose** (ホーネンコーポレーション)の製品添付文書には、結合容量とし **Peanut agglutinin (molecular weight = 98,000), 5.0 mg/mL gel (= 51 nmol/mL gel)** 以上、と記載されています。Table 3の精製タンパク質収量(mg)から計算すると、G1の場合(20°C, 16 h)約600 nmol(ダイマーを1分子とすると約300 nmol)、G8Mの場合は約200 nmolが1 mLのゲルを使って精製されたこととなります。前述のように、非吸着画分と洗浄画分に相当量の組換えタンパク質が含まれる場合があることを考慮すると、発現量の多いガレクチンの場合、ゲルの量が不十分である可能性は否定できません。GSTマニュアルでは、400 mLの培養液あたり0.2 mLの **glutathione-Sepharose**ゲルを使用(但し、バッチ法ではなくカラム法を推奨; GST-tagged proteinの収量を1 mgと想定)していますが、やや少なすぎるように感じます。**glutathione-Sepharose 4B**の結合容量は、製品添付文書ではGST, > 5 mg/mL gel、GSTマニュアルでは、**horse liver GST, 25 mg/mL gel**と記載されています。

吸着法としてバッチ法を用いているのは、他の組換えタンパク質を精製する際に、菌体抽出液の粘度が高く、実質的にカラム法が使えない場合があったためです。但し、ガレクチンの発現実験で抽出液の粘度が高くなることは経験していません。

• Step 15

Fig. 3B参照。

• Step 18

Econo-Column Chromatography Column (1.0 x 10 cm, Bio-Rad)を使用しています。ゲルのパッキングと洗浄時は、流速を上げるためにカラムの出口に長さ10 cm程度のチューブを着けています(Fig. 3C; 溶出時にはチューブを外す)。

• Step 19

洗浄用緩衝液は0.03% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)を含んでいます。両性(両イオン性)界面活性剤であるCHAPSは、タンパク質を扱う上で様々な利点を持つ

ているため好んで使用していますが[1]、比較的高価なことが欠点です。界面活性剤を含まない、あるいは **Tween 20**などの非イオン性界面活性剤*を含む洗浄液を使用しても、精製標品の純度への影響は少ないと思います。

*一般的に、非イオン性界面活性剤には、1) 透析で除きにくい(臨界ミセル濃度が低く、ミセル量が大きいため)、2) 細胞毒性が高い、3) 280 nmに強い吸収を持つことが多い、などの問題があります。非イオン性界面活性剤を使用した場合、溶出前に界面活性剤を含まない緩衝液でゲルを洗浄する必要があります。

• Step 20 (Fig. 1)

lactose-agaroseゲルの場合、溶出液として習慣的に **TBS, 0.2 M lactose**を使用しています。ガレクチンファミリーの中で **lactose**に対して比較的高い親和性を示す **G9**は、10 - 15 mM **lactose**で **lactose-agarose**から溶出されますので(精製した **G9**を **lactose-agarose**に結合させた後、グラジエント溶出を行った場合の溶出ピークの **lactose**濃度)、溶出液の **lactose**濃度を50 - 100 mM程度まで下げて問題ないと思います。**galactose**は **lactose**と較べて高価なのでメリットは少ないですが、溶出剤として500 mM **galactose**を使うことも可能です。**G9**は200 - 250 mM **galactose**で溶出されます(上述の条件)。ガレクチンのX線結晶解析に際して、精製過程で **lactose**を使用した場合、十分に透析を行っても一部のガレクチン分子に結合した **lactose**が結晶中に検出されることがあります[2]。確認は行っていませんが、**lactose**の代わりに **galactose**を使うことで、糖をほとんど含まない結晶が得られる可能性があります。

精製に使用したゲル (**lactose-agarose, glutathione-Sepharose**) は、再生して繰り返し使用しています。使用後のゲルに防腐剤(0.05% **NaN₃**など)を加えて4°Cで保存し、ある程度溜まった(~20 mL)ところでまとめて再生します。ゲルをカラム (**Econo-Column Chromatography Column, 2.5 x 10 cm**)に充填し、ゲルベッドの2倍量の **PBS**、2倍量の6 M **guanidine hydrochloride**水溶液、5倍量の **PBS**、の順番で洗浄し、最終的に50% (v/v) **slurry**となるように **PBS, 0.05% NaN₃**に懸濁して4°Cで保存しています。再生回数は特に限定していません。Fig. 2 (Step 21以降)に示したように、GST融合タンパク質がゲルに結合した状態で **thrombin**処理を行った場合は、**GST-free**の組換えタンパク質を回収した後、ゲルを保存する前に50 mM

Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM glutathione を使って glutathione-Sepharose に結合している GST を溶出 (1 mL x 4、各溶出の間に5分間のインターバル) しています。

• Step 21 (Fig. 1)

透析の条件 (透析外液の量、時間、交換回数) も習慣的に用いているものです。おそらく、外液の量を減らし、短時間で外液を交換する (交換回数は増やす) ことで、より効率良く lactose などを除くことができると思われますが、裏付けとなるデータは持っていません。

• Step 24 (Fig. 1)

精製標品の安定性については各ガレクチンの項で触れますが、一般的にタンデムリピート型ガレクチン (Null タイプの改変体を除く) は、比較的短期間で分解されます (混入しているプロテアーゼによるリンカーペプチドの切断)。また、不溶化する可能性があるため、凍結保存する際は注意が必要です。

• Step 20 (Fig. 2)

Fig. 2 では glutathione-Sepharose ゲルに結合した状態で thrombin 処理を行っています (Step 21 以降)。GST 融合タンパク質としてそのまま使用する、あるいは融合タンパク質を溶出した後に thrombin 処理を行う場合は、このステップで 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM glutathione を使って溶出します。GST 融合タンパク質を溶出する際の注意点については、GST マニュアルを参照して下さい。

• Step 21, 22 (Fig. 2)

ボルテックスミキサーを使って、カラム内でゲルと thrombin 溶液を混合しています。overnight 処理の間も、十分な混合効果が得られるわけではありませんが、出口のコックを閉じ、上部をパラフィルムで覆ったカラムをインキュベーターシェイカーで攪拌しています。今回、一律に overnight 処理を行いましたが、数時間で反応がほぼ完了する場合があります。大腸菌由来のプロテアーゼによる分解が問題となる場合は、時間を短縮するなど (必要に応じて thrombin を増量する)、処理条件の検討が必要です。

• Step 23 ~ 27 (Fig. 2)

ステップ 23, 24 で得られる GST-free 組換えタンパク質を含む溶液の吸光度 ($A_{280 \text{ nm}}$) はかなり高い値を示しますが、透析・遠心後の上清の吸光度は大幅に低下し

ます。以下は G4 の例 (20°C, 16 h) です。supernatant は eluate-1 と eluate-2 (1st & 2nd) を混合して透析した後、遠心、汙過滅菌したサンプルです。

Sample	Volume (mL)	$A_{280 \text{ nm}}$
eluate-1	1.0	1.346
eluate-2 (1st)	1.0	1.241
eluate-2 (2nd)	1.0	0.348
supernatant	2.9	0.204

各サンプルの SDS-PAGE データは、透析・遠心や汙過滅菌によるロスではこの差を説明できないことを示しています (data not shown)。eluate-1, -2 の紫外外部吸収スペクトルのピークがおよそ 260 nm、supernatant は 280 nm であることを考え合わせると、eluate-1, -2 は核酸 (透析で除去可能な核酸) を含んでいる可能性が高いと考えられます。他の GST 融合タンパク質の場合も同様です。

最終標品は thrombin を含んでいます。必要に応じて benzamidine-Sepharose や HiTrap benzamidine FF (HS) カラム (GE Healthcare Life Sciences) を用いて thrombin を除くことができますが (GST マニュアル参照)、benzamidine は中性付近の pH では正に荷電 (酸解離定数: 11.90 ± 0.40) しているため、注意が必要です。等電点が低い G2 ($pI = 5.92$) の場合、Fig. 2 の方法で得られた eluate-1, -2 (PBS 溶液) をそのまま HiTrap benzamidine カラムにアプライすると、thrombin だけでなく G2 (GST-free G2) も担体に結合します (Fig. 4D AFT; 図の説明は下記参照)。予め NaCl 濃度を 0.5 M に上げておくことで (例えば、1 mL の PBS 溶液あたり約 0.08 mL の 5 M NaCl を加える)、この問題を回避できます (Fig. 4D BFT)。

Fig. 4D の説明

eluate-1 + eluate-2 (この実験は Fig. 2 の 2 倍のスケールで行ったため、約 6 mL) を 2 等分し、一方 (A) はそのまま、他方 (B) には 5 M NaCl を加えて NaCl 濃度を 0.5 M に調整し、benzamidine 固定化カラム (HiTrap benzamidine FF(HS), 1 mL) に流した (流速、0.5 mL/min)。カラムの平衡化緩衝液として、A サンプルの場合は PBS、B サンプルの場合は 20 mM Na-Pi (sodium phosphate) (pH 7.5), 0.5 M NaCl を使用した。非吸着画分 (素通り画分) を保存し、カラムに結合した成分を、A サンプルの場合は 20 mM Na-Pi (pH 7.5), 0.5 M

NaClと0.1 M Glycine-HCl (pH 2.7) (各2 mL)、Bサンプルの場合は0.1 M Glycine-HCl (pH 2.7) (2 mL)で溶出した。染色バンドを直接比較できるように、各レーンにアプライするサンプル量を調整してある。なお、Fig. 4 - 7 & 9に示すSDS-PAGEでは2種類の分子量マーカー (Unstained Protein Standard, Broad Range [10-200 kDa], P7704 & P7717, New England BioLabs) を使用しています (Fig. 4Dの場合はP7717)。

G2 : eluate-1 + eluate-2

AFT, BFT : 非吸着画分

AE1 : 20 mM Na-Pi (pH 7.5), 0.5 M NaCl 溶出画分

AE2, BE2 : 0.1 M Glycine-HCl (pH 2.7) 溶出画分

GSTマニュアル : benzamidine固定化担体を使用する場合の平衡化・結合緩衝液として、0.05 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.4を使用。

2. 各ガレクチンに関する注意点

Fig. 4A - C, Fig. 5A - C, Fig. 6A - C, Fig. 7A, C, D, Eに、各ガレクチンの発現・精製過程におけるSDS-PAGEパターンを示します。Table 3のデータを得た際のサンプル (2回行った実験の何れか一方) を使用しています。以下は泳動サンプルについての説明です。

H0 : IPTGを加える直前のサンプル (Step 4)

H (37H/30H/20H ; 以下同様) :

菌体懸濁液を音波処理・Triton X-100処理した後のサンプル* (Step 11)

S : Triton X-100処理後の遠心上清 (Step 12)

P : Triton X-100処理後の遠心沈渣 (Step 12)

LFT : lactose-agaroseバッチ処理後の遠心上清 (Step 16)

GFT : glutathione-Sepharoseバッチ処理後の遠心上清 (Step 16)

LE : 最終精製標品 (purified G1 etc.) (Step 23, Fig. 1)

GE : 最終精製標品 (purified G2 etc.) (Step 27, Fig. 2)

泳動サンプル量 :

H0 - LFT/GFT, 0.1 mg wet pellet equivalent** /10 μ L (10 μ L/lane)

LE/GE (= purified protein), ガレクチンにより異なる (図の説明に記載)

* 理由は不明ですが、Triton X-100処理を行う前のサンプル (Step 8, 9) を用いた場合、ガレクチンの種類によっては、SDS-PAGEで発現タンパク質のバンドが確認できないことがあります。

** H - LFT/GFTの場合、1レーンあたりの泳動量は、Step 7で得られた*E. coli*ペレットの湿重量 (Table 3, *E. coli* yield) 0.1 mgに相当/由来する (0.1 mg wet pellet equivalent) サンプルです。例えばG1の場合 (37°Cの1回目)、菌体湿重量は0.7 gなのでStep 10/11では0.7 g *E. coli*/40 mL (36 mL [菌体懸濁用緩衝液] + 4 mL [10% Triton X-100]) ; 菌体沈渣による体積の変化は無視する) \rightarrow 17.5 μ g wet *E. coli* pellet/ μ L (17.5 μ g wet pellet equivalent/ μ L)となります。下記は0.1 mg wet pellet equivalent/10 μ Lの泳動サンプルを100 μ L作製する場合の条件です。

Step 11のサンプル, 57.1 μ L +

SDS sample buffer (4X)*, 25 μ L + H₂O, 17.9 μ L

* 0.25 M Tris-HCl (pH 6.8), 8%(w/v) SDS, 20%(v/v) mercaptoethanol, 25%(w/v) glycerol

H0の場合は、Step 6で得られる培養液 (overnight culture) のA_{600 nm}の値を測定し、菌体湿重量と培養液のA_{600 nm}の関係を計算します。上述のG1の例では、A_{600 nm} = 1.0の培養液1 mLから得られる菌体湿重量は2.38 mgとなります。この値はクローンによってかなりのばらつきがあります (50個のデータの平均と標準偏差 : 1.93 \pm 0.55 mg)。IPTGを加える直前にサンプリングした培養液 (H0) はA_{600 nm} = 0.63であったため、前述の関係を当てはめると、この培養液1 mLを遠心して得られる菌体ペレットの湿重量は、1.50 mgとなります*。このペレットに150 μ LのSDS sample buffer (1X)を加えて処理すれば、0.1 mg wet pellet equivalent/10 μ Lの泳動サンプルが得られることとなります (菌体沈渣による体積の変化は無視する)。Step 4に関するコメントの中で触れたように、一般的な分光光度計で大腸菌培養液の吸光度を厳密に測定することは困難です。また菌体密度とA_{600 nm}の値は、菌体密度が高くなると比例しなくなりますので、Step 6の培養液の場合、測定値が概ね0.7以下になるように希釈して測定しています。

* 菌体ペレット (H0サンプル) は、菌体湿重量と培養液 (overnight culture) のA_{600 nm}の関係が計算できるまで凍結保存

・ G1

ガレクチンは当初、レクチン活性の発現に還元型のシステイン残基 (-SH基) が必要なレクチンファミリーと考えられ、C型レクチンとの対比でS型レクチンと呼ばれていました (この呼称は現在でも使われています)。よく知られているように、これはG1がシステイン残基の酸化 (分子内/分子間ジスルフィド結合の形成) に伴う構造変化によってレクチン活性を失うためであって、-SH基が糖鎖との結合に必須なためではありません [3]。G1/mG1の場合、Step 8 (Fig. 1, 2) では1 mM DTTを添加した菌体懸濁用緩衝液を使用していますが、最後に使用する透析外液には還元剤を加えていません。このままの状態では保存すると、G1の場合、10日後には活性 (赤血球凝集活性) は約1/4に低下します [4]。最終標品に1 mM DTTを加えた場合でも、20日後には同程度まで低下します。赤血球凝集活性は、レクチン活性の指標として広く利用されている鋭敏な測定方法です。一般的に、培養細胞に対するガレクチンの作用発現には、赤血球凝集活性と比べてより高い濃度を必要としますので、赤血球凝集活性を検出可能な標品でも、培養細胞などに対する作用が実質的に失われている場合があります (G7, G8の項参照)。

CSG1はG1の全てのCys残基をSer残基に置換した変異体で、還元剤が存在しない条件下で長期間保存しても活性は低下しません [4]。この変異は立体構造や糖鎖結合特異性に影響を与えませんので、CSG1をG1の代替物として利用することができます。G1はレクチンとして以外に、神経栄養因子としての機能を持つことが知られています。分子内で3本のジスルフィド結合を形成したoxidized G1は、レクチン活性を失う一方で、マクロファージなどを介した末梢神経の再生促進活性を獲得することが報告されています [5]。従って、酸化によって神経栄養因子としての機能を獲得する可能性がないという点で、CSG1はG1の完全な代替物ではありません。

・ G2

G2はlactoseに対して親和性を示さないわけではありませんが [6,7]、lactose-agaroseを用いたアフィニティー精製は実質的に不可能です。なお、文献6, 7ではPA-化 (pyridylamination) あるいはpNP-化 (p-nitrophenylation) された糖鎖を用いたFAC (frontal affinity chromatography) によって親和性を測定していますので、アガロースゲルに固定化されたlactoseの場合は多少異なる可能性があります。精製G2標品 (Fig. 4C) に含まれている分子量約26,000のバンドは、切断され

たGST-tagの混入と考えられます (Fig. 7B参照)。

・ G3

Fig. 5Aの右側に各発現温度での精製G3標品 (3 µg/10 µL [10 µL/lane]) の泳動パターンを並べて示してあります。この実験で用いた精製標品の濃度は47 µg/mL (37° C), 323 µg/mL (30° C), 2.40 mg/mL (20° C) なので、SDS sample buffer (4X)を使用した場合、発現温度が20° Cの標品以外は3 µg/10 µLの泳動サンプルを作製することはできません。そのため、37° C/30° Cの標品は、SDS処理する前にSCR (StrataClean Resin) を使って濃縮しています。SCRに関する説明は「補足」の項を参照して下さい。

G3はキメラ型サブファミリーに属する唯一のガレクチンで、N-末端側の非レクチンドメイン (コラーゲン様ドメイン) とC-末端側CRDから構成されています。G3CRD (Ile¹¹⁵ - Ile²⁵⁰) はこのC-末端側CRDに相当します*。Table 3とは条件が異なりますが、以前に行った実験 (pET-G3CRD; 20° C overnight) における精製標品の収量は約3 mg/L cultureで、G3の1/10以下でした。

* pET-G3CRDの産物はN-末端側にベクター配列由来のMetが付加される。

・ G4

G4をlactose-agaroseを用いてアフィニティー精製することはG2と同様、実質的に不可能です。

G3の場合と同じように、G4の精製標品 (G4の場合は全ての温度) もタンパク質濃度が低いため、SDS処理する前にSCRを使って濃縮しています (Fig. 5B, 37GE*/30GE*/20GE*)。濃縮した3つの精製標品でバンドの濃さは同じになるはずですが、明らかに異なります。これは、サンプル (特に発現温度が37° Cと30° Cの精製標品) がタンパク質以外の不純物 (おそらくは核酸) を含んでいるため、A_{280 nm}から計算したタンパク質濃度が実際よりも高くなっているためと思われます。精製標品に含まれている分子量約76,000と63,000のバンドは、各々大腸菌シャペロンのDnaKとGroELです (各バンドのN-末端アミノ酸配列を確認*)。G4が結合した状態のglutathione-SepharoseをATP溶液で洗浄することによって、DnaKをある程度除くことができます (G10の項参照)。

* 分子量約76,000のバンド: GKIIGIDLGT
分子量約63,000のバンド: AAKDVKFGNDARVKM

G4Null, G4NT, G4CTの構造は以下のとおりです。

G4Null: N-末端側CRD (Met¹ - Gln¹⁵³) + リンカーペプチドの一部 (Pro¹⁵⁴-Leu¹⁵⁵ + Thr¹⁸⁷ - Pro¹⁹¹) + C-末端側CRD (Val¹⁹²- Ile³²³)

G4NT: N-末端側CRD (Met¹ - Gln¹⁵³) + リンカーペプチドの一部 (Pro¹⁵⁴ - Tyr¹⁶⁶)

G4CT: リンカーペプチドの一部 (Thr¹⁸¹- Pro¹⁹¹) + C-末端側CRD (Val¹⁹² - Ile³²³)

1度だけの実験データですが (Table 3とほぼ同じ条件)、G4Null, G4NT, G4CT (GST-tagを除いた精製標品)の収量は、各々、約1.6 mg/L culture, 10 mg/L culture, 20 mg/L cultureでした。

・ G7

G7R54Hは、糖鎖結合サイトを形成する重要なアミノ酸残基の1つであるArg⁵⁴をHisに置換した変異体です。ほぼ糖鎖結合活性を失っていますが、赤血球凝集活性は検出できる可能性があります。他のガレクチンの場合も同様です (G8の項参照)。

・ G8

ヒトG8には、リンカーペプチドの構造のみが異なる少なくとも2種類のアイソフォーム (スプライシングアイソフォーム: G8M, G8L) が存在します。G8MとG8Lのリンカーペプチドは、28残基と70残基です。G8L (pET-G8L)の収量はG8Mと同等です。G8MR69H (G8LR69H)とG8MR233H (G8LR275H)は、各々G8M (G8L)のN-末端側CRDとC-末端側CRDの糖鎖結合サイトを形成するArgをHisに置換した変異体、G8MR69,233H (G8LR69,275H)は両方のCRDに変異を導入したものです。G8の場合、lactoseに対する親和性はN-末端側CRDとC-末端側CRDで大きく異なり、N-末端側CRDが高い親和性を持つ一方で、C-末端側CRDはほとんど親和性を示しません [6,7]。従って、N-末端側CRDが不活性化されたR69H変異体を、lactose-agaroseを用いてアフィニティー精製することはできません。以前の論文にG8MR69Hがasialofetuin-agaroseに結合することを示すデータを載せていますが、asialofetuinの場合でもサンプル添加後のカラム洗浄を最小限に留めないと、G8MR69Hはカラムに保持されません [8]。

G7の項でも触れましたが、糖鎖結合サイトを形成するArgをHisに置換した変異体が、赤血球凝集活性を示

す可能性があります。Fig. 8はG8MとG8MR69,233Hの赤血球凝集活性を比較した結果です。測定方法については、「補足」の項を参照して下さい。条件を揃えるため、両者ともGST-fusionとして発現させた後、GST-tagを除去した標品を用いています。ガレクチンファミリーの中で、G8Mの赤血球凝集活性は比較的low、今回使用した条件下で活性を検出できる最小濃度は0.2 - 0.4 μMです (Fig. 8A)。G8MR69,233Hは6.4 μM以上で活性を示し、G8Mの3 - 6%程度の活性を保持している可能性があります。G8Mの作用は50 mM lactoseによって阻害されますが、高濃度 (12.8, 25.6 μM) のG8Mによる赤血球凝集は阻害されにくく、インキュベーション時間を2時間に延長すると、12.8 μMでも弱い阻害効果が認められるようになります (Fig. 8B)。一方、G8MR69,233Hの場合、50 mM lactoseによる阻害は観察されず、インキュベーション時間を2時間に延長しても結果は変わりません (Fig. 8C)。G8MR69,233Hが高濃度で赤血球凝集活性を示すことは確認できましたが、これが残存するレクチン作用に基づくものかどうかは、明らかではありません。

G8LR197AはG8Lのリンカーペプチドに存在するArg¹⁹⁷をAlaに置換した変異体です。G8Lのリンカーペプチド (G8Mには存在しない部分)にはthrombinが認識するサイト (-IAPRT-)が存在し、この部位のArg¹⁹⁷をAlaに置換するとthrombinで切断されなくなります [9]。従って、この変異を導入していないGST-G8L (pGEX-G8(L), pGEX-G8(L)R69H, pGEX-G8(L)R275H, pGEX-G8(L)R69,275Hの産物)をthrombinで処理すると、GST-tagが除去されるだけでなく、リンカーペプチドの切断によって2つのCRDが分離してしまいます。

タンデムリピート型ガレクチンに存在するリンカーペプチドは、一定の立体構造を形成しないdisorder領域 (disordered region) であり (「補足」の項を参照)、様々なプロテアーゼによって容易に分解されます。組換えタンパク質の場合も、アフィニティー精製だけでは大腸菌由来のプロテアーゼの除去は完全ではありません。G8NullはG8のリンカーペプチドをほぼ除去した変異体で、プロテアーゼによる分解に対して高い耐性を示します [10]。G8Null (pET-G8Null)の収量は約40 mg/L cultureです。なお、変異体発現用ベクターを作製した際に利用したNdeI siteが2つのドメインの繋ぎ目に存在しますので、このサイト (CATATG) に由来する余分な2アミノ酸残基 (HM) が含まれます。G8Null, G8NT, G8CT, G8NCRD, G8CCRDの構造は以下のと

おりです。アミノ酸残基番号はG8Mの番号です。

G8Null : N-末端側CRD* (Met¹ - Ser¹⁵⁵) + NdeI site由来の配列 (HM) + C-末端側CRD (Arg¹⁸⁴ - Trp³¹⁷)

G8NT : N-末端側CRD* (Met¹ - Ser¹⁵⁵) + リンカーペプチドの一部 (Asp¹⁵⁶ - Thr¹⁶⁸)

G8CT : リンカーペプチドの一部 (Ser¹⁷¹ - Leu¹⁸³) + C-末端側CRD (Arg¹⁸⁴ - Trp³¹⁷)

G8NCRD : N-末端側CRD* (Met¹ - Phe¹⁵³)

G8CCRD : C-末端側CRD (Arg¹⁸⁴ - Trp³¹⁷)

* G8のN-末端側CRDは (Met¹ - Ser¹⁵⁵) と考えた方がより適切と思われます。

・ G9

ヒトG9には、リンカーペプチドの構造のみが異なる少なくとも3種類のアイソフォーム (G9S, G9M, G9L) が存在します。リンカーペプチドは各々、33残基、45残基、77残基です。以前の論文ではC-末端側CRDを Thr¹⁶⁶ - Thr³¹¹ (G9Sのアミノ酸残基番号) としましたが [10]、立体構造から判断すると Pro¹⁸² - Thr³¹¹ の方が適切だと考えられます。G9の場合、組換えタンパク質の収量はアイソフォーム間で異なり、一般的な生化学実験に使用する量のG9Lを得るのは困難です。G9Mの収量はG9Sの30%程度であり、リンカーペプチドの分解はG9Sより速くなります。Fig. 6Bの30LE*と20LE*でバンドの濃さが異なっているのは、G4の場合と同様、30LEのタンパク質濃度が過大評価されていることが原因の1つである可能性があります。また、G9を含むいくつかのガレクチン標品で、SDS抵抗性の多量体/凝集体の形成 (ゲル上端のバンド) が認められます (G13, G14/PPL13の項参照)。精製標品間での多量体/凝集体形成の差も、メインバンドの濃さに影響していると思われる。

G9MR65H, G9MR239H, G9MR65,239HはG8と同様、N-末端側CRDとC-末端側CRD (あるいは両方) の糖鎖結合サイトを形成するArgをHisに置換した変異体です。

G9NullはG9のリンカーペプチドの一部を除去した変異体ですが、上述のようにリンカーペプチドと考えられる約16アミノ酸残基と、G8の場合と同様、NdeI siteに由来する余分な2アミノ酸残基 (HM) が含まれています。G9Nullはプロテアーゼによる分解に対して高

い耐性を示し、また組換えタンパク質の収量も向上しています [10]。G9 (G9Nullを含む) は、lactose-agarose から lactose で溶出された時点では、ある程度高い濃度の溶液として存在しています。しかし、溶出液は直ちに濁り始め、PBSなど生理的なpHの緩衝液に対して透析すると、大部分が不溶化します。野生型より溶解性の向上したG9Nullの場合でも、PBS中で安定して存在できる濃度は400 µg/mL以下です。このため精製に際しては、通常であれば廃棄するG9濃度の低い溶出画分と高濃度の溶出画分を予め混合しておくことで、透析後の収量を上げることができます。但し、透析前に400 µg/mLまで希釈した場合でも、透析によるある程度の不溶化は避けられないため、透析前の濃度を下げすぎると、最終標品の濃度が低くなります。Table 3のG9SとG9Nullのデータはこのような方法を用いて得られたものです。G9の不溶化は、溶出液、透析外液のpHを下げることでかなりの程度防ぐことができます [11]。酸性条件下での精製については「補足」の項を参照して下さい。G9NullR65D/G9NullR211DはG9MR65H/G9MR239Hに対応する変異体です。G9NullR65H/G9NullR211Hは実質的に組換えタンパク質が得られなかったため、これらの変異体を使用しています。

G9がプロテアーゼに高い感受性を示すという問題はG9Nullによって解消されましたが、生理的pHでの可溶性の問題はあまり改善していません。ssG9 (highly stable and soluble form of G9) はこの問題を解決するために作製した変異体です [12]。G9Nullに残っているリンカーペプチドのうち10アミノ酸残基を除去し、1つのアミノ酸置換を導入しています。この改変体は、生理的pHにおいて少なくとも2 mg/mL程度の溶液として長期間安定に保存することができます。プロテアーゼ耐性とレクチン活性はG9Nullと同等あるいはそれ以上です。ssG9は2つのCRDの間に6アミノ酸残基HPPYPM (野生型の配列はHPAYPM) が存在する構造です。余分なアミノ酸残基の挿入はありません。野生型G9 cDNAにはBamHI siteが存在しますが、ssG9 (pET-ssG9) ではこの配列を変更してあります (GGATCC → GTATCC)。G9Null, ssG9, G9NT, G9CT, G9NCRD, G9CCRDの構造は以下のとおりです。アミノ酸残基番号はG9CTのみがG9M、他はG9Sの番号です。

G9Null : N-末端側CRD (Met¹ - Gln¹⁴⁸) + NdeI site由来の配列 (HM) + リンカーペプチドの一部 (Thr¹⁶⁶ - Met¹⁸¹) + C-末端側CRD (Pro¹⁸² - Thr³¹¹)

- ssG9 : N-末端側 CRD (Met¹ - Gln¹⁴⁸) + 改変されたリンカーペプチドの一部 (HPPYPM) + C-末端側 CRD (Pro¹⁸² - Thr³¹¹)
- G9NT : N-末端側 CRD (Met¹ - Gln¹⁴⁸) + リンカーペプチドの一部 (Pro¹⁴⁹ - Thr¹⁶⁷)
- G9CT : リンカーペプチドの一部 (Ile¹⁶⁰ - Met¹⁹³) + C-末端側 CRD (Pro¹⁹⁴ - Thr³²³)
- G9NCRD : N-末端側 CRD (Met¹ - Gln¹⁴⁸)
- G9CCRD : リンカーペプチドの一部 (Thr¹⁶⁶ - Met¹⁸¹) + C-末端側 CRD (Pro¹⁸² - Thr³¹¹)

・ G10

G10を lactose-agarose を用いてアフィニティー精製することは実質的に不可能です。

精製 G10 標品は濃度が低いため、SDS 処理する前にメタノールを使って濃縮しています (Fig. 7A, 20GE*)。濃縮方法については、「補足」の項を参照して下さい。

G4と同様、精製標品に大腸菌シャペロンが含まれていますので、GST マニュアルで推奨されている DnaK 除去方法の効果を G10 で確認してみました (Fig. 7B)。GST マニュアルではアフィニティー精製の前 (菌体抽出液) に ATP とインキュベートすることを推奨していますが (ATP 固定化カラムの利用にも触れています)、Fig. 7B の実験では、GST-G10 が glutathione-Sepharose に結合した状態で処理を行いました。また、thrombin 処理は Fig. 2 の条件ではなく、GST-G10 をゲルから溶出した後に行っています。GST-G10 が結合した glutathione-Sepharose を ATP を含む緩衝液とインキュベートすると、DnaK が遊離してきます (Fig. 7B ATP-W)。精製標品を比較すると、ATP で処理したサンプル (Fig. 7B 右側の G10) では処理しないものと較べて DnaK が減少しています。GroEL の含量も若干減少しているようです。

Fig. 7B の説明

Fig. 2 の 2 倍のスケールで Step 17 まで進める。Step 18 でゲルを 2 本のカラムにパックし (1 mL gel/column)、Step 19 と同じ条件で洗浄する。一方のカラム (カラム A) から 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM glutathione で GST-G10 を溶出する。もう 1 つのカラム (カラム B) に 1 mL の 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM ATP, 10 mM MgCl₂ を加え (流出液は廃棄)、37° C で 10 分間インキュベートする。この操作を 3 回繰り返し、2 回目と 3 回目の流出液を ATP 洗浄画分として保存す

る。カラムを 3 mL の TBS, 0.03% CHAPS で洗浄した後、50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM glutathione で GST-G10 を溶出する。カラム A, B の溶出液に 30 μL の thrombin 溶液 (1 u/μL) を加え、25° C で 16 h インキュベートする。Fig. 2 Step 25, 26 の条件で透析・遠心する。得られた上清を glutathione-Sepharose カラム (0.5 mL gel) に流し、非吸着画分を集めて精製標品とした。各サンプル 30 μL に 10 μL の SDS sample buffer (4X) を加えて熱処理した後、SDS-PAGE で分析した (10 μL/lane)。

- GE : 10 mM glutathione によるカラム溶出画分
- GE·Th : thrombin 処理した GE
- GE·Th·d : GE·Th を透析・遠心後の上清
- G10 : 精製標品
- ATP-W : ATP 洗浄画分 (カラム B)

・ G12

Table 1 に記載したクローンと Fig. 2 の方法を用いて、可溶性の G12, LNG12, G12NT, G12CT を得ることは実質的に不可能です*。精製標品 (Fig. 7C, 20GE) のメインバンドは、GroEL と思われます。

G12 は Yang et al. [13] に記載されているクローンに対応します。Hotta et al. [14] は、Yang et al. の論文に記載されている開始コドンよりも 5' 上流側に、もう 1 つの開始コドンが存在することを報告しており、LNG12 はこのクローンに対応します。LNG12 は G12 よりも N-末端側に 22 アミノ酸残基延長しています。何れの論文でも、G12 タンパク質の発現確認にはウェスタンブロット法もしくは放射性アミノ酸標識を用い、精製組換えタンパク質を対象とした実験は行われていません。なお、*in vitro* 翻訳系を利用して作製した G12 ([³⁵S]Met 標識) は、lactose-agarose に弱い親和性を示します [14]。G12NT, CT の構造は以下のとおりです。

- G12NT : N-末端側 CRD (Met¹ - Leu¹⁶¹) + リンカーペプチドの一部 (Asn¹⁶² - Ser¹⁷⁰)
- G12CT : リンカーペプチドの一部 (Pro¹⁷⁴ - Val¹⁸⁸) + C-末端側 CRD (Pro¹⁸⁹ - Ser³¹⁴)

G12 の立体構造は報告されていないため (*in silico* analysis を除く)、CRD / リンカーペプチドの範囲は暫定的なものです。

* Maller et al. [15] は、pET-28a ベクターと真核生物のタ

ンパク質発現に適した大腸菌株 (Rosseta 2(DE3)pLysS: 大腸菌で使用頻度の低い7種類のコドン、AGA, AGG, CGG, GGA, AUA, CUA, CCCに対応するtRNAの発現量を高めた大腸菌株)を用いて、可溶性のマウスG12の発現・精製を報告しています。この方法で発現させたマウスG12 (Hisタグ付き)は、Ni-NTA担体やlactose-Sepharoseでは精製できないため、Q-SepharoseとCM-Sepharoseを用いたイオン交換クロマトグラフィーで精製しています(収量: 5 mg/L culture)。

・ G13, G14/PPL13

G13, G14ともにlactose-agaroseを用いたアフィニティー精製は実質的に不可能です。

精製G14/PPL13標品は濃度が低いため、SDS処理する前にメタノールを使って濃縮しています(Fig. 7E, 20GE*)。濃縮方法については、「補足」の項を参照して下さい。なお、G14/PPL13の精製標品は多量の不純物(おそらくGroEL)を含んでいますので、Table 2の“Protein concentration (mg/mL, A280 nm = 1.0)”、Table 3の“Purified protein yield”等は信頼できる値ではありません。

Fig. 7Dの20GE^Sと20GE*,^Sは、泳動前に熱処理を行っていないサンプルです。精製したG13標品をSDS sample buffer (1X)中で熱処理(98°C, 3 min)すると、SDS抵抗性の多量体/凝集体が形成されます(Fig. 7D, 20GE/20GE*)。同じような多量体/凝集体の形成がG9S等でも認められますが、必ずしも熱処理とは関連しません。

3. 補足

SDS-PAGEのためのタンパク質溶液の濃縮

濃縮や透析はタンパク質を扱う際に比較的頻繁に行われる作業ですが、生物活性を損なわないことが必要な場合、煩雑で時間のかかる作業でもあります。一方、SDS-PAGE (Coomassie染色、Western blot、Lectin blotなど)のために希薄なタンパク質溶液を濃縮する際は、より簡便な方法を利用することができます。ガレクチン研究と特別な関係はありませんが、精製ガレクチン標品の濃縮に利用した方法(メタノール沈殿法とSCR吸着法)とTCA-DOC (trichloroacetic acid-deoxycholic acid)沈殿法を記載しておきます(以下メタノール法、SCR法、TCA-DOC法)。Fig. 9に3つの濃縮法の実施例を示します。

Fig. 9の説明

Fig. 9A, 9Bは各々、ラットの組織抽出液に上述の3種類の濃縮法を適用した結果と精製ガレクチン標品(+BSA, bovine serum albumin)に2種類の濃縮法(メタノール法とSCR法)を適用した結果です。C (control sample)はFig. 9Aの場合7.5 µg protein/lane、Fig. 9Bの場合は1 µg protein/lane。MeOH, TCA-DOC, SCRは各々、メタノール法、TCA/DOC法、SCR法で濃縮したサンプルです。ラット組織抽出液の場合、下記の実験条件ではメタノール法が最も良い結果を示しています。SCR法では、回収率の低い、あるいはほとんど回収できないバンド(Fig. 9A, arrowheads)がいくつかあることが分かります。精製ガレクチン標品の場合もほぼ同様で、分子量がある程度大きいキメラ型ガレクチンやタンデムリピート型ガレクチンでは、メタノール法とSCR法の間で大きな違いはありませんが、SCR法ではプロトタイプ型ガレクチン(とBSA)の回収率が低下しています。SCR法は簡便で優れた濃縮法ですが、利用に際しては注意が必要です。SCRのプライミング(下記SCRの項参照)がタンパク質の回収率に与える影響については、比較実験を行っていないため、明らかではありません。Fig. 9BのG4標品は、保存に伴って生じた分解物を含んでいます。G13標品はすべて熱処理を行っていません(G13, G14/PPL13の項参照)。

・メタノール法

硫酸沈殿などと同様、タンパク質沈殿法の1つです。沈殿法は、一般的には希薄なタンパク質溶液には適用できず、タンパク質濃度が1 mg/mL程度以上が目安ですが、Fig. 9のデータは、敢えて低濃度のタンパク質溶液(100 µg/mLのラット組織抽出液と20 µg/mLのガレクチン溶液)に適用した結果です。試料に対しての4倍量のメタノールを加えています(最終メタノール濃度は約80%)。

Rat tissue extract (100 µg/mL in TBS), 300 µL in a 2-mL tube

- ↓ + 1.2 mL of methanol, followed by mixing
- ↓ 30 min on ice
- ↓ cent., 14,000 rpm (15,000 xg at R_{av}), 20 min

Ppt.

- ↓ residual methanol was removed by an additional brief centrifugation and careful aspiration
- ↓ dissolved in 40 µL of SDS sample buffer (1X),

and then subjected to heat treatment

SDS-PAGE

Galectin solution (20 µg/mL in PBS), 200 µL in a 1.5-mL tube

- ↓ + 0.8 mL of methanol, followed by mixing
- ↓ 30 min on ice
- ↓ cent., 14,000 rpm, 20 min

Ppt.

- ↓ residual methanol was removed by an additional brief centrifugation and careful aspiration
- ↓ dissolved in 40 µL of SDS sample buffer (1X), and then subjected to heat treatment

SDS-PAGE

• SCR法

SCRはヒドロキシル化されたシリカ粒子で、DNA溶液から制限酵素などを除く際に、フェノール・クロロフォルム処理に代わるものとして使われています。また、SCRが非特異的にタンパク質を吸着する性質を利用して、タンパク質溶液の濃縮にも利用することができます。SCRを用いるタンパク質の濃縮は沈殿法とは異なり、希薄なタンパク質溶液にも適用可能で、短時間で行うことができます。下記の実験例では300 µlの試料(100 µg protein/mL)あるいは200 µLの試料(20 µg protein/mL)に対して10 µlのSCR slurryを加えていますが、SCRの吸着容量内であれば、試料を増やすことができます。メタノール沈殿と同様、主としてSDS-PAGEや質量分析用の試料を調製するための方法であり、生理活性を保ったままSCRに吸着したタンパク質を回収するのは困難と思われる。界面活性剤はSCRとタンパク質の結合を阻害しますので、界面活性剤を含む溶液の場合は注意が必要です。

Otto et al.は、SCRを利用したタンパク質の濃縮と保存について詳しい検討を行っています [16]。この文献に記載されている方法では、最初にSCRのプライミング(塩酸中で100° C, 6 hの熱処理)を行っていますが、下記の実験ではプライミングは行わず、市販のSCRをそのまま使用しています。なお、SCRはかなり高価な試薬です。

Rat tissue extract (100 µg/mL in TBS), 300 µL in a 1.5-mL tube

Galectin solution (20 µg/mL in PBS), 200 µL in a 1.5-

mL tube

- ↓ + 10 µL of SCR slurry (50%[v/v] in H₂O)
- ↓ mixed for 1 min
- ↓ cent., 30 sec (table top centrifuge)

Ppt.

- ↓ residual supernatant was removed by an additional brief centrifugation and careful aspiration
- ↓ suspended in 40 µL of SDS sample buffer (1X), and then subjected to heat treatment
- ↓ cooled on ice
- ↓ cent., 30 sec (table top centrifuge)

Sup.

↓

SDS-PAGE

• TCA-DOC法

この方法は、妨害物質を含む試料のタンパク質濃度をLowry法で定量するために開発されたものです [17]。沈殿法の1つですが、DOCを一種のキャリアとして利用することで、希薄なタンパク質溶液にも適用可能です。沈殿剤としてTCAを用いているため、メタノールでTCAを除く処理を加えています (Lowry法の試料とする場合は不要な操作です)。

Rat tissue extract (100 µg/mL in TBS), 300 µL

- ↓ + 300 µL of TBS
- ↓ + 5 µL of 2% sodium DOC*, followed by mixing
- ↓ 15 min at room temperature
- ↓ + 150 µL of 30% TCA, followed by mixing
- ↓ 15 min on ice
- ↓ cent., 14,000 rpm (15,000 xg at R_{av}), 20 min

Ppt.

- ↓ residual supernatant was removed by an additional brief centrifugation and careful aspiration
- ↓ + 1 mL of methanol, followed by mixing
- ↓ cent., 14,000 rpm, 5 min

Ppt.

- ↓ residual supernatant was removed by an additional brief centrifugation and careful aspiration
- ↓ dissolved in 40 µL of SDS sample buffer (1X), and then subjected to heat treatment

SDS-PAGE

* デオキシコール酸ナトリウムを溶解する際は、NaOH溶液でpHを8~8.5程度の弱アルカリ性に調節する。保存中に濁りを生じることがあるが、懸濁してそのまま使用可能。

赤血球凝集活性測定

赤血球凝集活性測定には様々なプロトコールが存在しますが、このノートでは下記の方法を用いました。

96-well plate, V-bottom (U-bottom)

- ↓ + 50 μ L/well of sample (serially diluted with PBS, 10 mg/mL BSA, 0.05% NaN₃)
- ↓ + 50 μ L/well of 2% (v/v) suspension of trypsinized, glutaraldehyde-fixed rabbit erythrocytes (diluted with PBS, 10 mg/mL BSA, 0.05% NaN₃), and then mixed by pipetting several times using a multichannel pipette set at 50 μ L
- ↓ stand for 1 h (2 h) at room temperature

The extent of hemagglutination was observed visually.

赤血球凝集活性測定では肉眼的に凝集の有無を評価するため、レクチンの性質によっては、最小有効濃度を決定するのが難しい場合があります。また、使用するプレートの形状や赤血球懸濁液の濃度も判断に影響を与えることがあります。Fig. 10にG8M, G8MR69,233H, G9Null, CSG1の例を示します。G9Nullの場合、プレートの形状(V-bottomあるいはU-bottom)は、最小有効濃度の判断に影響しませんが、G8MR69,233Hの場合は、U-bottomプレートを使用すると判断が難しくなります。また、G8MとCSG1(特にCSG1)は、濃度の上昇に伴って徐々に赤血球の凝集状態が変化するため、どちらのプレートを使っても、判断が恣意的になる可能性があります。

タンデムリピート型ガレクチンのdisorder領域

Fig. 11はガレクチン(G1 - G13)のdisorder領域予測のデータです。以前にPOODLE (Prediction Of Order and Disorder by machine LEarning)のwebサービスを利用して得られたデータです。現在このサービスは終了していますが、プログラムをダウンロードし、ローカルPC上で実行することは可能なようです(Protein Structure Prediction Active Workflow: <https://togo.medals.jp/active.html>)。G3のN-末端側の非レクチン

ドメインとタンデムリピート型ガレクチンのリンカーペプチドに相当する領域のdisorder probabilityが高くなっています。リンカーペプチドの大部分を除去したG8NullとG9Nullの場合、disorder領域と予測される部分は存在しません。他のタンデムリピート型ガレクチンとは異なり、LNG12/G12には典型的なdisorder領域は存在しないようです。ややdisorder probabilityが高くなっている領域も、リンカーペプチドと思われる領域とは一致していません。これは、G12の特殊な細胞内分布(分化した3T3-L1細胞のlipid dropletの内面に局在する)[15]、と関係があるのかもしれませんが。プロトタイプ型に属するG7とG13にもdisorder probabilityが若干高い領域が存在しますが、理由はよく分かりません。

酸性条件下でのG9の精製

Fig. 1のStep 20以降を下記の方法に変更してG9Nullを発現・精製した結果を以下に示します(培養液、200 mL; 20° C, 16 h)。

酸性条件*: 0.708 mg/mL** x 3.85 mL

Fig. 1の条件*: 0.385 mg/mL x 5.00 mL

* 直接比較できるように、同時に2つの条件で行った実験の結果。

** G9Nullの280 nmにおける吸光係数が、pH 7.5とpH 6.0で同じと仮定した値。

精製標品のvolumeが異なっているのは、G9の項で説明したように、後者(Fig. 1の条件)では濃度の低い溶出画分を加えて透析しているためです。Fig. 1の方法ではStep 22で相当量の沈殿(不溶化したG9Null)が得られます。この沈殿から、lactoseを含む酸性の緩衝液(20 mM Na-Pi (pH 6.0), 0.15 M NaCl, 0.2 M lactose)を使ってG9Nullの回収を試みましたが、大半は可溶化されませんでした(data not shown)。

- 20) Wash the gel with 2 gel-bed volumes of 0.15 M NaCl.
 - ↓
- 21) Elute the recombinant protein from the gel with 20 mM Na-Pi (pH 6.0), 0.15 M NaCl, 0.2 M lactose.
 - ↓
- 22) Dialyze the eluate against 20 mM Na-Pi (pH 6.0), 0.15 M NaCl*.
 - *1st, 4 - 5 h (500 mL); 2nd, overnight (1,000 mL); 3rd, 4 - 5 h (500 mL)
 - ↓

23) Transfer the dialyzed solution to a centrifuge tube, and then spin down the insoluble material at 25,000 xg for 20 min.

↓

24) Sterilize the supernatant with a sterile filter (0.2 μm).

↓

25) Store the sterilized solution at 4 °C.

謝辞

本稿の作成・公開にあたり、ご協力とご支援を頂きました。伊藤愛子博士（香川大学総合生命科学研究センター）、中村隆範教授（香川大学医学部）、平林淳博士（産業技術総合研究所生命工学領域）に深謝いたします。

Abbreviations

BSA:	bovine serum albumin
CHAPS:	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate
CRD:	carbohydrate recognition domain
DMSO:	dimethylsulfoxide
DOC:	deoxycholic acid
DTT:	dithiothreitol
FAC:	frontal affinity chromatography
G1 - G14:	galectin-1 - galectin-14
GST:	glutathione S-transferase
IPTG:	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
Na-Pi:	sodium phosphate
PA:	pyridylaminated/pyridylation
PMSF:	phenylmethanesulfonyl fluoride (別名: benzylsulfonyl fluoride等)
pNP:	p-nitrophenylated/p-nitrophenylation
SCR:	StrataClean Resin
TBS:	Tris-buffered saline
TCA:	trichloroacetic acid

References

- Matuo, Y., Nishi, N., Muguruma, Y., Yoshitake, Y., Masuda, Y., Nishikawa, K., and Wada, F. (1988) Stabilization of fibroblast growth factors by a non-cytotoxic zwitterionic detergent, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS). *In Vitro Cell Dev Biol* 24, 477-480
- Nonaka, Y., Ogawa, T., Yoshida, H., Shoji, H., Nishi, N., Kamitori, S., and Nakamura, T. (2015) Crystal structure of a *Xenopus laevis* skin proto-type galectin, close to but distinct from galectin-1. *Glycobiology* 25, 792-803
- Hirabayashi, J., and Kasai, K. (1991) Effect of amino acid substitution by sited-directed mutagenesis on the carbohydrate recognition and stability of human 14-kDa beta-galactoside-binding lectin. *J Biol Chem* 266, 23648-23653
- Nishi, N., Abe, A., Iwaki, J., Yoshida, H., Itoh, A., Shoji, H., Kamitori, S., Hirabayashi, J., and Nakamura, T. (2008) Functional and structural bases of a cysteine-less mutant as a long-lasting substitute for galectin-1. *Glycobiology* 18, 1065-1073
- Horie, H., Kadoya, T., Hikawa, N., Sango, K., Inoue, H., Takeshita, K., Asawa, R., Hiroi, T., Sato, M., Yoshioka, T., and Ishikawa, Y. (2004) Oxidized galectin-1 stimulates macrophages to promote axonal regeneration in peripheral nerves after axotomy. *J Neurosci* 24, 1873-1880
- Hirabayashi, J., Hashidate, T., Arata, Y., Nishi, N., Nakamura, T., Hirashima, M., Urashima, T., Oka, T., Futai, M., Muller, W. E., Yagi, F., and Kasai, K. (2002) Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* 1572, 232-254
- Iwaki, J., Tateno, H., Nishi, N., Minamisawa, T., Nakamura-Tsuruta, S., Itakura, Y., Kominami, J., Urashima, T., Nakamura, T., and Hirabayashi, J. (2011) The Galbeta-(syn)-gauche configuration is required for galectin-recognition disaccharides. *Biochim Biophys Acta* 1810, 643-651
- Nishi, N., Shoji, H., Seki, M., Itoh, A., Miyanaka, H., Yuube, K., Hirashima, M., and Nakamura, T. (2003) Galectin-8 modulates neutrophil function via interaction with integrin alphaM. *Glycobiology* 13, 755-763
- Nishi, N., Itoh, A., Shoji, H., Miyanaka, H., and Nakamura, T. (2006) Galectin-8 and galectin-9 are novel substrates for thrombin. *Glycobiology* 16, 15C-20C
- Nishi, N., Itoh, A., Fujiyama, A., Yoshida, N., Araya, S., Hirashima, M., Shoji, H., and Nakamura, T. (2005) Development of highly stable galectins: truncation of the linker peptide confers protease-resistance on tandem-repeat type galectins. *FEBS Lett* 579, 2058-2064
- Nonaka, Y., Ogawa, T., Oomizu, S., Nakakita, S., Nishi, N., Kamitori, S., Hirashima, M., and Nakamura, T. (2013) Self-association of the galectin-9 C-terminal domain via the opposite surface of the sugar-binding site. *J Biochem* 153, 463-471
- Itoh, A., Fukata, Y., Miyanaka, H., Nonaka, Y., Ogawa, T., Nakamura, T., and Nishi, N. (2013) Optimization of the inter-domain structure of galectin-9 for recombinant production. *Glycobiology* 23, 920-925
- Yang, R. Y., Hsu, D. K., Yu, L., Ni, J., and Liu, F. T. (2001) Cell cycle regulation by galectin-12, a new member of the galectin superfamily. *J Biol Chem* 276, 20252-20260
- Hotta, K., Funahashi, T., Matsukawa, Y., Takahashi, M., Nishizawa, H., Kishida, K., Matsuda, M., Kuriyama, H., Kihara, S., Nakamura, T., Tochino, Y., Bodkin, N. L., Hansen, B. C., and Matsuzawa, Y. (2001) Galectin-12, an Adipose-expressed Galectin-like Molecule Possessing Apoptosis-inducing Activity. *J Biol Chem* 276, 34089-34097
- Maller, S. M., Cagnoni, A. J., Bannoud, N., Sigaut, L., Perez Saez, J. M., Pietrasanta, L. I., Yang, R. Y., Liu, F. T., Croci, D. O., Di Lella, S., Sundblad, V., Rabinovich, G. A., and Marino, K. V. (2020) An adipose tissue galectin controls endothelial cell function via preferential recognition of 3-fucosylated glycans. *FASEB J* 34, 735-753
- Otto, A., Maass, S., Bonn, F., Buttner, K., and Becher, D. (2017) An Easy and Fast Protocol for Affinity Bead-Based Protein Enrichment and Storage of Proteome Samples. *Methods Enzymol* 585, 1-13
- Bensadoun, A., and Weinstein, D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem* 70, 241-250

Table 1. Galectin clones deposited in the RIKEN Bioresource Center DNA Bank

Catalog # ¹⁾	Name of clone	Vector (cloning site)	Expressed recombinant protein
Galectin-1			
RDB04217	pGEX-G1-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI)	Human galectin-1 (G1), GST fusion protein
RDB08392	pET-G1-1a	pET-11a (NdeI/BamHI)	G1, tag-free protein
RDB08448	pGEX-CSG1-2a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI)	G1 in which all Cys residues are substituted with Ser residues (G1C3,17,43,61,89,131S: CSG1), GST fusion protein
RDB08449	pET-CSG1-1a	pET-11a (NdeI/BamHI)	CSG1, tag-free protein
RDB08433	pGEX-mG1-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI)	Mouse galectin-1 (mG1), GST fusion protein
RDB08434	pET-mG1-1a	pET-11a (NdeI/BamHI)	mG1, tag-free protein
Galectin-2			
RDB04218	pGEX-G2-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/EcoRI)	G2, GST fusion protein
RDB08435	pGEX-mG2-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/EcoRI)	mG2, GST fusion protein
Galectin-3			
RDB04219	pGEX-G3-1a	pGEX-4T-2 (EcoRI/XhoI)	G3, GST fusion protein
RDB08393	pET-G3-1a	pET-11a (NdeI/BamHI)	G3, tag-free protein
RDB08394	pGEX-G3CRD-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/EcoRI)	G3 (C-terminal lectin domain/carbohydrate recognition domain, G3CRD), GST fusion protein
RDB08395	pET-G3CRD-1a	pET-11a (NdeI/BamHI)	G3CRD, tag-free protein
RDB08436	pGEX-mG3-3a	pGEX-4T-2 (BamHI/EcoRI)	mG3, GST fusion protein
Galectin-4			
RDB08396	pGEX-G4-1a	pGEX-4T-2 (EcoRI/XhoI)	G4, GST fusion protein
RDB04220	pTrec-G4-1a	pTrec-HisB (XhoI/EcoRI)	G4, (His) ₆ -containing-tag protein
RDB18238	pGEX-G4Null	pGEX-4T-2 (EcoRI/XhoI)	G4 with a truncated linker peptide (G4Null), GST fusion protein
RDB18237	pGEX-G4NT	pGEX-4T-2 (EcoRI/XhoI)	G4 (N-terminal CRD with a part of the linker peptide, G4NT), GST fusion protein
RDB08398	pGEX-G4CT-1a	pGEX-4T-2 (EcoRI/XhoI)	G4 (C-terminal CRD with a part of the linker peptide, G4CT), GST fusion protein
RDB08437	pGEX-mG4-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/EcoRI)	mG4, GST fusion protein
Galectin-7			
RDB04221	pGEX-G7-5a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI)	G7, GST fusion protein
RDB08399	pET-G7-1a	pET-11a (NdeI/BamHI)	G7, tag-free protein
RDB08400	pGEX-G7R54H-12a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI)	G7 with an R54H mutation ²⁾ , GST fusion protein
RDB08438	pGEX-mG7-7a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI)	mG7, GST fusion protein
RDB08439	pET-mG7-1a	pET-11a (NdeI/BamHI)	mG7, tag-free protein
Galectin-8			
RDB04222	pGEX-G8(M)-2a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI) ³⁾	G8 (the predominant isoform of G8 in most cell and tissue types, G8(M)/G8M), GST fusion protein
RDB08404	pET-G8(M)-1a	pET-11a (NdeI/BamHI) ⁴⁾	G8M, tag-free protein
RDB08405	pGEX-G8(L)-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI) ³⁾	G8 with a long linker peptide (G8(L)/G8L), GST fusion protein
RDB08410	pET-G8(L)-12a	pET-11a (NdeI/BamHI) ⁴⁾	G8L, tag-free protein
RDB08401	pGEX-G8(M)R69H-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI) ³⁾	G8M with an R69H mutation ²⁾ , GST fusion protein
RDB08402	pGEX-G8(M)R233H-2a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI) ³⁾	G8M with an R233H mutation ²⁾ , GST fusion protein
RDB08403	pGEX-G8(M)R69,233H-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI) ²⁾	G8M with R69,233H mutations ²⁾ , GST fusion protein
RDB08454	pGEX-G8Null-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI) ³⁾	G8 with a truncated linker peptide (G8Null), GST fusion protein
RDB08455	pET-G8Null-5a	pET-11a (NdeI/BamHI)	G8Null, tag-free protein
RDB08411	pGEX-G8NT-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI) ³⁾	G8 (N-terminal CRD with a part of the linker peptide, G8NT), GST fusion protein
RDB08412	pGEX-G8CT-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI) ³⁾	G8 (C-terminal CRD with a part of the linker peptide, G8CT), GST fusion protein
RDB08406	pGEX-G8(L)R69H-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI) ³⁾	G8L with an R69H mutation ²⁾ , GST fusion protein
RDB08407	pGEX-G8(L)R275H-3a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI) ³⁾	G8L with an R275H mutation ²⁾ , GST fusion protein
RDB08408	pGEX-G8(L)R69,275H-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI) ³⁾	G8L with R69,275H mutations ²⁾ , GST fusion protein
RDB08409	pGEX-G8(L)R197A-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI) ³⁾	G8L with an R197A mutation ⁵⁾ , GST fusion protein
RDB08413	pGEX-G8NCRD-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI) ³⁾	G8 (N-terminal CRD, G8NCRD), GST fusion protein

Table 1. Galectin clones deposited in the RIKEN Bioresource Center DNA Bank

RDB08414	pGEX-G8CCRD-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI) ³⁾	G8 (C-terminal CRD, G8CCRD), GST fusion protein
RDB08440	pGEX-mG8(M)-2a	pGEX-4T-2 (BamHI/XhoI)	mG8 (the predominant isoform of mG8 in most cell and tissue types, mG8(M)/mG8M), GST fusion protein
RDB08441	pET-mG8(M)-1a	pET-11a (NdeI/BamHI)	mG8M, tag-free protein
RDB08456	pET-mG8Null-2a	pET-11a (NdeI/BamHI)	mG8 with a truncated linker peptide (mG8Null), tag-free protein
RDB08445	pGEX-RaG8(M)-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/EcoRI)	Rat G8 (the predominant isoform of rat G8 in most cell and tissue types, RaG8(M)/RaG8M), GST fusion protein
RDB08446	pET-RaG8(M)-1a	pET-11a (NdeI/BamHI)	RaG8M, tag-free protein
Galectin-9			
RDB08415	pGEX-G9(S)-1a	pGEX-4T-2 (EcoRI/XhoI)	G9 with a short linker peptide (G9(S)/G9S), GST fusion protein
RDB08416	pET-G9(S)-3a	pET-11a (NdeI/BamHI) ⁴⁾	G9S, tag-free protein
RDB04223	pGEX-G9(M)-1a	pGEX-4T-2 (EcoRI/XhoI)	G9 (the predominant isoform of G9 in most cell and tissue types, G9(M)/G9M), GST fusion protein
RDB08420	pET-G9(M)-4a	pET-11a (NdeI/BamHI) ⁴⁾	G9M, tag-free protein
RDB08421	pGEX-G9(L)-2a	pGEX-4T-2 (EcoRI/XhoI)	G9 with a long linker peptide (G9(L)/G9L), GST fusion protein
RDB08422	pET-G9(L)-5a	pET-11a (NdeI/BamHI) ⁴⁾	G9L, tag-free protein
RDB08417	pGEX-G9(M)R65H-2a	pGEX-4T-2 (EcoRI/XhoI)	G9M with an R65H mutation ²⁾ , GST fusion protein
RDB08418	pGEX-G9(M)R239H-1a	pGEX-4T-2 (EcoRI/XhoI)	G9M with an R239H mutation ²⁾ , GST fusion protein
RDB08419	pGEX-G9(M)R65,239H-1a	pGEX-4T-2 (EcoRI/XhoI)	G9M with R65,239H mutations ²⁾ , GST fusion protein
RDB08451	pET-G9Null-11a	pET-11a (NdeI/BamHI)	G9 with a truncated linker peptide (G9Null), tag-free protein
RDB08452	pET-G9NullR65D-2a	pET-11a (NdeI/BamHI)	G9Null with an R65D mutation ²⁾ , tag-free protein
RDB08453	pET-G9NullR212D-3a	pET-11a (NdeI/BamHI) ⁴⁾	G9Null with an R212D mutation ²⁾ , tag-free protein
RDB15282	pET-ssG9	pET-11a (NdeI/BamHI)	G9Null with a 10-amino acid deletion and a single amino acid mutation at the remaining linker peptide (ssG9), tag-free protein
RDB08423	pGEX-G9NT-1a	pGEX-4T-2 (EcoRI/XhoI)	G9 (N-terminal CRD with a part of the linker peptide, G9NT), GST fusion protein
RDB08424	pGEX-G9CT-1a	pGEX-4T-2 (EcoRI/XhoI)	G9 (C-terminal CRD with a part of the linker peptide, G9CT), GST fusion protein
RDB08425	pGEX-G9NCRD-1a	pGEX-4T-2 (EcoRI/XhoI)	G9 (N-terminal CRD, G9NCRD), GST fusion protein
RDB08426	pGEX-G9CCRD-1a	pGEX-4T-2 (EcoRI/XhoI)	G9 (C-terminal CRD, G9CCRD), GST fusion protein
RDB08442	pGEX-mG9(M)-2a	pGEX-4T-2 (BamHI/EcoRI)	mG9 (the predominant isoform of mG9 in most cell and tissue types (mG9(M)/mG9M), GST fusion protein
RDB08443	pET-mG9(M)-1a	pET-11a (NheI/BamHI)	mG9M, tag-free protein
RDB08444	pET-mG9(L)-3a	pET-11a (NheI/BamHI)	mG9 with a long linker peptide (mG9(L)/mG9L), tag-free protein
RDB08457	pET-mG9Null-5a	pET-11a (NdeI/BamHI)	mG9 with a truncated linker peptide (mG9Null), tag-free protein
RDB08458	pET-mG9NullR64H-1a	pET-11a (NheI/BamHI) ⁶⁾	mG9Null with an R64H mutation ²⁾ , tag-free protein
RDB08459	pET-mG9NullR211H-2a	pET-11a (NheI/BamHI) ⁶⁾	mG9Null with an R211H mutation ²⁾ , tag-free protein
RDB08447	pTrc-RaG9(M)-2a	pTrc-HisB (XhoI/PstI)	RaG9 (the predominant isoform of RaG9 in most cell and tissue types (RaG9(M)/RaG9M), (His) ₆ -containing-tag protein
Galectin-10			
RDB08427	pGEX-G10-8a	pGEX-4T-2 (BamHI/EcoRI)	G10, GST fusion protein
RDB04224	pTrc-G10-4a	pTrc-HisB (BglII/EcoRI)	G10, (His) ₆ -containing-tag protein
Galectin-12			
RDB08428	pGEX-G12-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/EcoRI)	G12, GST fusion protein
RDB04225	pGEX-LNG12-3	pGEX-4T-2 (BamHI/EcoRI)	G12 with an N-terminally extended NCRD (LNG12), GST fusion protein
RDB08429	pGEX-G12NT-1b	pGEX-4T-2 (BamHI/EcoRI)	G12 (N-terminal CRD with a part of the linker peptide, G12NT), GST fusion protein
RDB08430	pGEX-G12CT-1b	pGEX-4T-2 (BamHI/EcoRI)	G12 (C-terminal CRD with a part of the linker peptide, G12CT), GST fusion protein
Galectin-13			
RDB08431	pGEX-G13-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/EcoRI)	G13, GST fusion protein
Galectin-14/PPL13			
RDB08432	pGEX-PPL13-1a	pGEX-4T-2 (BamHI/EcoRI)	G14/PPL13, GST fusion protein

1) Catalog number in RIKEN BioResource Center DNA bank.

2) The mutations abolish lectin activity of respective CRD almost completely.

3) The insert sequence was amplified using forward and reverse primers tagged with extra 5' BglII and Sall sequences, respectively. The amplified cDNA was digested with BglII and Sall, and the resulting cDNA fragment was inserted into the BamHI-XhoI sites of pGEX-4T-2.

4) The insert sequence was amplified using forward and reverse primers tagged with extra 5' NdeI and BglII sequences, respectively. The amplified cDNA was digested with NdeI and BglII, and the resulting cDNA fragment was inserted into the NdeI-BamHI sites of pET-11a.

5) The mutation abolishes thrombin sensitivity of G8L.

6) The insert sequence was amplified using forward and reverse primers tagged with extra 5' NheI and BglII sequences, respectively. The amplified cDNA was digested with NheI and BglII, and the resulting cDNA fragment was inserted into the NheI-BamHI sites of pET-11a.

Table 2. Molecular properties of galectins

	cDNA insert-encoded protein			pET-11a vector (Tag-free protein)		pGEX-4T-2 vector (GST-fusion protein) (GST-free protein ²⁾)				Protein concentration (mg/mL, A280 nm = 1.0) ³⁾		
	Residues	M. W.	pI ¹⁾	Residues	M. W.	Residues	M. W.	Residues	M. W.	Tag-free protein	GST-fusion protein	GST-free protein
Galectin-1												
G1	135	14,715	5.18	← ⁴⁾	←	361	41,008	137	14,860	1.69	0.697	1.57
CSG1	135	14,619	5.18	←	←	361	40,911	137	14,763	1.63	0.730	–
mG1	135	14,866	5.17	←	←	361	41,158	137	15,010	1.99	–	–
Galectin-2												
G2	132	14,644	5.92			358	40,936	134	14,788		0.739	1.36
mG2	130	14,880	7.39			356	41,172	132	15,024		–	–
Galectin-3												
G3	250	26,188	8.88	←	←	480	52,844	256	26,696	0.550	0.555	–
G3CRD	136	15,470	9.84	137	15,601	362	41,762	138	15,614	1.11	–	–
mG3	264	27,514	8.60			490	53,806	266	27,658		–	–
Galectin-4												
G4	323	35,940	9.44			553	62,597	329	36,449		–	0.852 ⁵⁾
G4Null	292	32,609	9.58			522	59,265	298	33,117		–	0.844 ⁵⁾
G4NT	166	18,709	8.88			396	45,366	172	19,218		–	0.683 ⁵⁾
G4CT	143	15,783	9.98			373	42,439	149	16,291		0.630	1.38
mG4	326	36,371	9.40			552	62,663	328	36,515		–	–
Galectin-7												
G7	136	15,075	7.54	←	←	362	41,367	138	15,219	1.03	–	–
G7R54H	136	15,056	6.78			362	41,348	138	15,200		–	–
mG7	136	15,202	6.43	←	←	362	41,494	138	15,346	1.38	–	–
Galectin-8												
G8M	317	35,808	8.39	←	←	543	62,100	319	35,952	1.20	0.829	1.25
G8MR69H	317	35,788	7.97			543	62,081	319	35,933		–	–
G8MR233H	317	35,788	7.97			543	62,081	319	35,933		–	–
G8MR69,233H	317	35,769	7.44			543	62,062	319	35,914		–	–
G8L	359	40,397	9.33	←	←	585	66,689	361	40,541	1.33	0.829	–
G8LR69H	359	40,378	9.18			585	66,670	361	40,522		–	–
G8LR275H	359	40,378	9.18			585	66,670	361	40,522		–	–
G8LR69,275H	359	40,359	8.99			585	66,651	361	40,503		–	–
G8LR197A	359	40,312	9.17			585	66,604	361	40,456		–	–
G8Null	291	33,065	9.03	←	←	517	59,357	293	33,209	1.16	–	–
G8NT	168	18,893	8.18			394	45,186	170	19,038		0.661	1.55
G8CT	147	16,690	9.13			373	42,982	149	16,834		0.554	1.04
G8NCRD	153	17,345	9.15			379	43,637	155	17,489		–	–
G8CCRD	134	15,295	8.50			360	41,587	136	15,439		–	–
mG8M	316	36,161	9.25	←	←	542	62,453	318	36,305	–	0.675	1.02
mG8Null	290	33,321	9.27	←	←					–	–	–
RaG8M	316	36,072	9.40	←	←	542	62,364	318	36,216	1.06	0.729	–
Galectin-9												
G9S	311	34,690	8.10	←	←	541	61,347	317	35,199	1.05	–	–
G9M	323	35,887	8.10	←	←	553	62,544	329	36,396	0.824	–	–
G9MR65H	323	35,868	7.78			553	62,525	329	36,377		–	–
G9MR239H	323	35,868	7.78			553	62,525	329	36,377		–	–
G9MR65,239H	323	35,849	7.40			553	62,506	329	36,358		–	–
G9L	355	39,517	9.37	←	←	585	66,174	361	40,026	–	–	–
G9Null	296	33,144	8.10	←	←					1.00	–	–
G9NullR65D	296	33,103	7.36	←	←					–	–	–
G9NullR212D	296	33,103	7.36	←	←					–	–	–
ssG9	284	31,803	8.10	←	←					1.02	–	–
G9NT	167	18,323	7.35			397	44,980	173	18,832		0.661	1.03
G9CT	164	18,476	8.49			394	45,133	170	18,985		0.622	0.981
G9NCRD	148	16,345	7.30			378	43,002	154	16,854		–	–
G9CCRD	146	16,549	8.43			376	43,205	152	17,057		–	–
mG9M ⁶⁾	322	36,543	8.75	325	36,833	548	62,835	324	36,687	–	–	–
mG9L ⁶⁾	353	40,021	9.56	356	40,310					–	–	–
mG9Null	295	33,453	8.55	←	←					–	–	–
mG9NullR64H ⁶⁾	295	33,434	8.35	298	33,723					–	–	–
mG9NullR211H ⁶⁾	295	33,434	8.35	298	33,723					–	–	–
RaG9M	322	36,340	8.56									
Galectin-10												
G10	142	16,481	7.23			368	42,773	144	16,625		0.643	0.853 ⁵⁾

Table 2. Molecular properties of galectins

Galectin-10												
G10	142	16,481	7.23			368	42,773	144	16,625		0.643	0.853 ⁵⁾
Galectin-12												
LNG12	336	37,541	9.26			562	63,833	338	37,685		–	–
G12	314	35,220	9.02			540	61,513	316	35,365		–	–
G12NT	170	19,178	7.87			396	45,470	172	19,322		–	–
G12CT	141	15,612	10.26			367	41,904	143	15,756		–	–
Galectin-13												
G13	139	16,118	5.36			365	42,410	141	16,262		–	1.13
Galectin-14												
G14/PPL13	139	16,113	7.21			365	42,405	141	16,257		–	1.40 ⁵⁾
GST												
GST ⁷⁾	224	26,166	6.10								0.549	

- 1) The theoretical isoelectric point values calculated using GENETYX (GENETYX Corporation).
- 2) Number of amino acid residues and molecular weight of recombinant proteins after removal of the GST tag with thrombin.
- 3) Protein concentration (mg/mL) of a solution exhibiting absorbance at 280 nm of 1.0.
- 4) The same as for the cDNA insert-encoded protein.
- 5) These preparations contain a significant amount of contaminants, mostly *E. coli* chaperones.
- 6) The cDNA was inserted in the NheI-BamHI sites of the pET-11a vector.
- 7) GST moiety obtained on thrombin digestion of GST-fusion proteins.

Table 3. Summary of the yields of human galectins expressed in *E. coli*

Galectin	Temp. (°C)	<i>E. coli</i> yield (g, wet weight)	Purified protein			Purified protein yield		
			Volume (mL)	Conc. (mg/mL)	Conc. (μM)	mg	mg/ <i>E. coli</i> (g)	mg/L culture
Galectin-1 (pET-G1)								
	37	0.70	2.35	1.13	77.0	2.66	3.80	13.3
	37	0.69	2.40	1.22	83.0	2.93	4.24	14.6
	30	1.11	2.40	1.85	126.0	4.45	4.00	22.2
	30	1.00	2.55	1.89	128.5	4.82	4.82	24.1
	20	2.15	3.90	2.67	181.6	10.41	4.84	52.1 (11.3*)
	20	2.02	4.05	2.14	145.3	8.65	4.28	43.3 (13.9**)
CSGalectin-1 (pET-CSG1)								
	20	1.89	2.55	2.01	138.0	5.14	2.72	25.7
	20	1.85	4.00	1.39	95.2	5.56	3.01	27.8
Galectin-2 (pGEX-G2)								
	20	2.04	2.90	0.518	35.5	1.50	0.737	7.51
	20	2.00	3.00	0.505	34.6	1.51	0.757	7.57
Galectin-3 (pET-G3)								
	37	0.67	1.00	0.047	1.78	0.047	0.070	0.23
	37	0.60	1.00	0.031	1.20	0.031	0.052	0.16
	30	0.91	2.30	0.323	12.3	0.743	0.816	3.71
	30	0.86	2.30	0.332	12.7	0.764	0.888	3.82
	20	1.42	3.85	2.40	91.5	9.23	6.50	46.2
	20	1.24	4.00	1.72	65.7	6.89	5.55	34.4
Galectin-4 (pGEX-G4)								
	37	0.71	1.85	0.043	1.19	0.080	0.113	0.40
	37	0.70	2.95	0.048	1.31	0.141	0.201	0.70
	30	0.92	2.90	0.080	2.20	0.232	0.252	1.16
	30	0.94	2.95	0.137	3.77	0.405	0.430	2.02
	20	1.56	2.90	0.174	4.77	0.504	0.323	2.52
	20	1.64	2.95	0.181	4.99	0.535	0.326	2.68
Galectin-7 (pET-G7)								
	37	0.66	4.00	1.03	68.1	4.12	6.24	20.6
	37	0.66	3.95	0.91	60.6	3.61	5.47	18.1
	30	1.00	3.90	1.98	131.0	7.71	7.71	38.6
	30	0.83	3.90	2.11	140.0	8.24	9.93	41.2
	20	1.53	4.00	2.90	192.4	11.62	7.59	58.1
	20	1.44	4.00	2.46	162.9	9.84	6.83	49.2
Galectin-8M (pET-G8M)								
	37	0.56	2.40	0.792	22.1	1.90	3.39	9.50
	37	0.64	2.40	0.736	20.5	1.77	2.76	8.83
	30	0.76	2.50	0.974	27.2	2.44	3.21	12.2
	30	0.84	2.40	1.11	30.9	2.65	3.16	13.3
	20	1.30	3.80	1.98	55.3	7.52	5.79	37.6 (5.85*)
	20	1.32	3.80	2.15	60.0	8.16	6.18	40.8 (8.98**)
Galectin-9S (pET-G9S)								
	37	0.71	1.10	0.012	0.35	0.013	0.018	0.06
	37	0.70	1.10	0.020	0.58	0.022	0.031	0.11
	30	0.98	1.10	0.040	1.15	0.044	0.045	0.22
	30	1.03	2.35	0.059	1.70	0.138	0.134	0.69
	20	2.25	5.40	0.221	6.35	1.19	0.529	5.95
	20	1.90	5.35	0.212	6.11	1.13	0.597	5.67
Galectin-9Null (pET-G9Null)								
	20	1.73	5.50	0.380	11.5	2.09	1.21	10.45
	20	1.92	5.35	0.384	11.6	2.05	1.07	10.27
Galectin-10 (pGEX-G10)								
	20	1.81	2.90	0.155	9.41	0.450	0.249	2.25
	20	1.70	3.00	0.113	6.88	0.340	0.200	1.70
Galectin-12 (pGEX-G12)								
	20	1.16	–	–	–	–	–	–
	20	1.29	–	–	–	–	–	–
Galectin-13 (pGEX-G13)								
	20	1.79	3.10	1.73	106.0	5.36	2.99	26.8
	20	2.02	3.10	2.11	129.0	6.53	3.23	32.7
Galectin-14/PPL13 (pGEX-PPL13)								
	20	1.88	3.00	0.162	9.96	0.487	0.259	2.44
	20	1.98	2.90	0.195	11.9	0.564	0.285	2.82

* Recovered from the unadsorbed fraction obtained on batch affinity adsorption.

** Recoverd from the column wash fraction.

pET vector

Procedure

- 1) Inoculate 10 mL of LB-broth containing 100 µg/mL ampicillin with a loop full of frozen glycerol stock BL21(DE3)* cells carrying the expression plasmid.
* In the case of pET vectors, an expression host containing a chromosomal copy of the T7 RNA polymerase gene under lacUV5 control, e.g., *E. coli* BL21(DE3), must be used.
↓
- 2) Incubate the inoculum at 37° C overnight with shaking (200 rpm) in a shaking incubator.
↓
- 3) Dilute 4.4 mL of the overnight culture with 220 mL of 2xYT medium containing 100 µg/mL ampicillin in a 1,000-mL flask.
↓
- 4) Incubate the inoculum at 37° C for ~ 2 h with shaking until the absorbance at 600 nm ($A_{600\text{ nm}}$) reaches 0.6 - 0.7*.
* Measurements of absorbance were done on samples collected at intervals by withdrawing culture liquid from the flask.
↓
- 5) Add 0.22 mL of 0.1 M IPTG (isopropyl-β -thiogalactopyranoside) solution to the culture (final concentration, 0.1 mM).
↓
- 6) Incubate the culture at 37° C for 2 h/at 30° C for 3 h/at 20° C for 16 h (overnight) with shaking (200 rpm).
↓
- 7) Transfer 200 mL of the overnight culture to centrifuge tubes and then spin down the cells at 6,000 xg for 10 min.
↓
- 8) Resuspend the pellet in 36 mL of 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)*
* 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM DTT (dithiothreitol) was used for G1 and mG1.
↓
- 9) Transfer the cell suspension to a cooling cell and then lyse the *E. coli* cells using a sonicator*.
* When using a rosette cooling cell and a Sonifier 250 (Branson) equipped with a 1/2" diameter horn, sonicate the cell suspension for 2 min x 2 and an additional 1 min (with 1-min intervals between the bursts) with the following settings: % duty cycle, 100; output control, 5.0. Place the cooling cell in an ice-water bath during the sonication.
↓
- 10) Add 4 mL of 10% (w/v) Triton X-100 to the cell lysate (final concentration, 1%).
↓
- 11) Mix the lysate for 30 min at 4° C with a magnetic stirrer.
↓
- 12) Transfer the lysate to a centrifuge tube and then spin down the cell debris at 18,000 xg for 30 min at 4° C.
↓
- 13) Transfer the supernatant to a 100-mL bottle.
↓
- 14) Add 2 mL of the lactose-agarose slurry (50%[v/v] in TBS [Tris-buffered saline: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl]) to the supernatant.
↓
- 15) Mix the lactose-agarose gel suspension by rotating the bottle for 1 h on a tube rotator*.
* Do not use a magnetic stirrer to avoid destruction of the gel beads.
↓
- 16) Transfer the gel suspension to a 50-mL conical tube and then spin down the gel at 1,500 xg for 5 min.
↓
- 17) Discard the supernatant and then suspend the gel pellet in an appropriate volume of TBS, 0.03% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate).
↓
- 18) Pack the gel into a column.
↓
- 19) Wash the gel with 20 gel-bed volumes of TBS, 0.03% CHAPS.
↓
- 20) Elute the recombinant protein from the gel with 4 mL (1 mL x 4) of TBS, 0.2 M lactose.
↓
- 21) Dialyze the eluate against PBS*.
* 1st, 4 - 5 h (500 mL); 2nd, overnight (1,000 mL); 3rd, 4 - 5 h (500 mL)
↓
- 22) Transfer the dialyzed solution to a centrifuge tube, and then spin down the insoluble material at 25,000 xg for 20 min.
↓
- 23) Sterilize the supernatant with a sterile filter (0.2 µm).
↓
- 24) Store the sterilized solution at 4° C.

Fig. 1. Expression and purification protocol for galectins (tag-free proteins).

pGEX vector

Procedure

- 1) Inoculate 10 mL of LB-broth containing 100 µg/mL ampicillin with a loop full of frozen glycerol stock BL21 cells carrying the expression plasmid.
↓
- 2) Incubate the inoculum at 37° C overnight with shaking (200 rpm) in a shaking incubator.
↓
- 3) Dilute 4.4 mL of the overnight culture with 220 mL of 2xYT medium containing 100 µg/mL ampicillin in a 1,000-mL flask.
↓
- 4) Incubate the inoculum at 37° C for ~ 2 h with shaking until the absorbance at 600 nm (A₆₀₀ nm) reaches 0.6 - 0.7*.
* Measurements of absorbance were done on samples collected at intervals by withdrawing culture liquid from the flask.
↓
- 5) Add 0.22 mL of 0.1 M IPTG solution to the culture (final concentration, 0.1 mM).
↓
- 6) Incubate the culture at 37° C for 2 h/at 30° C for 3 h/at 20° C for 16 h (overnight) with shaking (200 rpm).
↓
- 7) Transfer 200 mL of the overnight culture to centrifuge tubes and then spin down the cells at 6,000 xg for 10 min.
↓
- 8) Resuspend the pellet in 36 mL of 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 1 mM PMSF*
* 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 1 mM PMSE, 1 mM DTT was used for G1 (GST-G1) and mG1 (GST-mG1).
↓
- 9) Transfer the cell suspension to a cooling cell and then lyse the *E. coli* cells using a sonicator*.
* When using a rosette cooling cell and a Sonifier 250 (Branson) equipped with a 1/2" diameter horn, sonicate the cell suspension for 2 min x 2 and an additional 1 min (with 1-min intervals between the bursts) with the following settings: % duty cycle, 100; output control, 5.0. Place the cooling cell in an ice-water bath during the sonication.
↓
- 10) Add 4 mL of 10% (w/v) Triton X-100 to the cell lysate (final concentration, 1%).
↓
- 11) Mix the lysate for 30 min at 4° C with a magnetic stirrer.
↓
- 12) Transfer the lysate to a centrifuge tube and then spin down the cell debris at 18,000 xg for 30 min at 4° C.
↓
- 13) Transfer the supernatant to a 100-mL bottle.
↓
- 14) Add 2 mL of the glutathione-Sepharose slurry (50%[v/v] in TBS) to the supernatant.
↓
- 15) Mix the glutathione-Sepharose gel suspension by rotating the bottle for 1 h on a tube rotator*.
* Do not use a magnetic stirrer to avoid destruction of the gel beads.
↓
- 16) Transfer the gel suspension to a 50-mL conical tube and then spin down the gel at 1,500 xg for 5 min.
↓
- 17) Discard the supernatant and then suspend the gel pellet in an appropriate volume of TBS, 0.03% CHAPS.
↓
- 18) Pack the gel into a column.
↓
- 19) Wash the gel with 20 gel-bed volumes of TBS, 0.03% CHAPS.
↓
- 20) Wash the gel with 2 gel-bed volumes of PBS.
↓
- 21) Add 1 mL of thrombin solution (50 u/mL in PBS) to the gel in the column, and then mix.
↓
- 22) Incubate the gel suspension (in the column) at 25° C for 16 h (overnight) with shaking (120 rpm).
↓
- 23) Drain the GST-free recombinant protein solution from the column (eluate-1).
↓
- 24) Elute the GST-free recombinant protein from the gel with 2 mL (1 mL x 2) of PBS (eluate-2).
↓
- 25) Dialyze the combined eluates (eluate-1 and eluate-2) against PBS*.
* 1st, 4 - 5 h (500 mL); 2nd, overnight (1,000 mL); 3rd, 4 - 5 h (500 mL)
↓
- 26) Transfer the dialyzed solution to a centrifuge tube, and then spin down the insoluble material at 25,000 xg for 20 min.
↓
- 27) Sterilize the supernatant with a sterile filter (0.2 µm).
↓
- 28) Store the sterilized solution at 4° C.

Fig. 2. Expression and purification protocol for galectins (GST-fusion proteins).

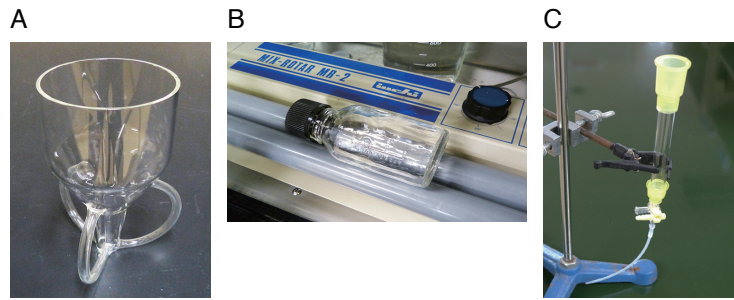


Fig. 3. Laboratory ware used in the purification of recombinant proteins.

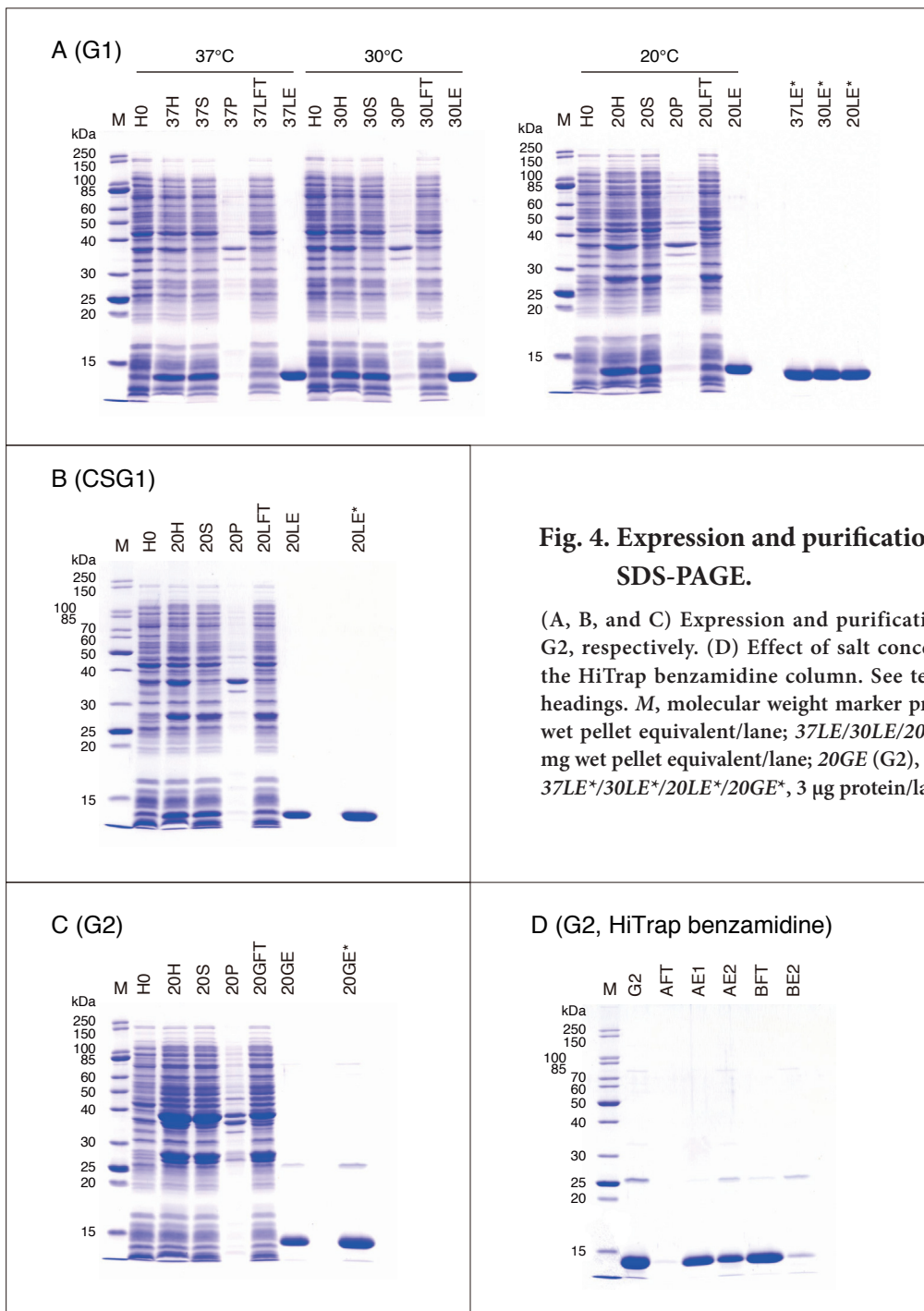


Fig. 4. Expression and purification profiles of galectins on SDS-PAGE.

(A, B, and C) Expression and purification profiles of G1, CSG1, and G2, respectively. (D) Effect of salt concentration on binding of G2 to the HiTrap benzamidine column. See text for explanation of the lane headings. *M*, molecular weight marker proteins. *H0* ~ *LFT/GFT*, 0.1 mg wet pellet equivalent/lane; *37LE/30LE/20LE* (G1) and *20LE* (CSG1), 0.5 mg wet pellet equivalent/lane; *20GE* (G2), 2 mg wet pellet equivalent/lane; *37LE*/30LE*/20LE*/20GE**, 3 μ g protein/lane.

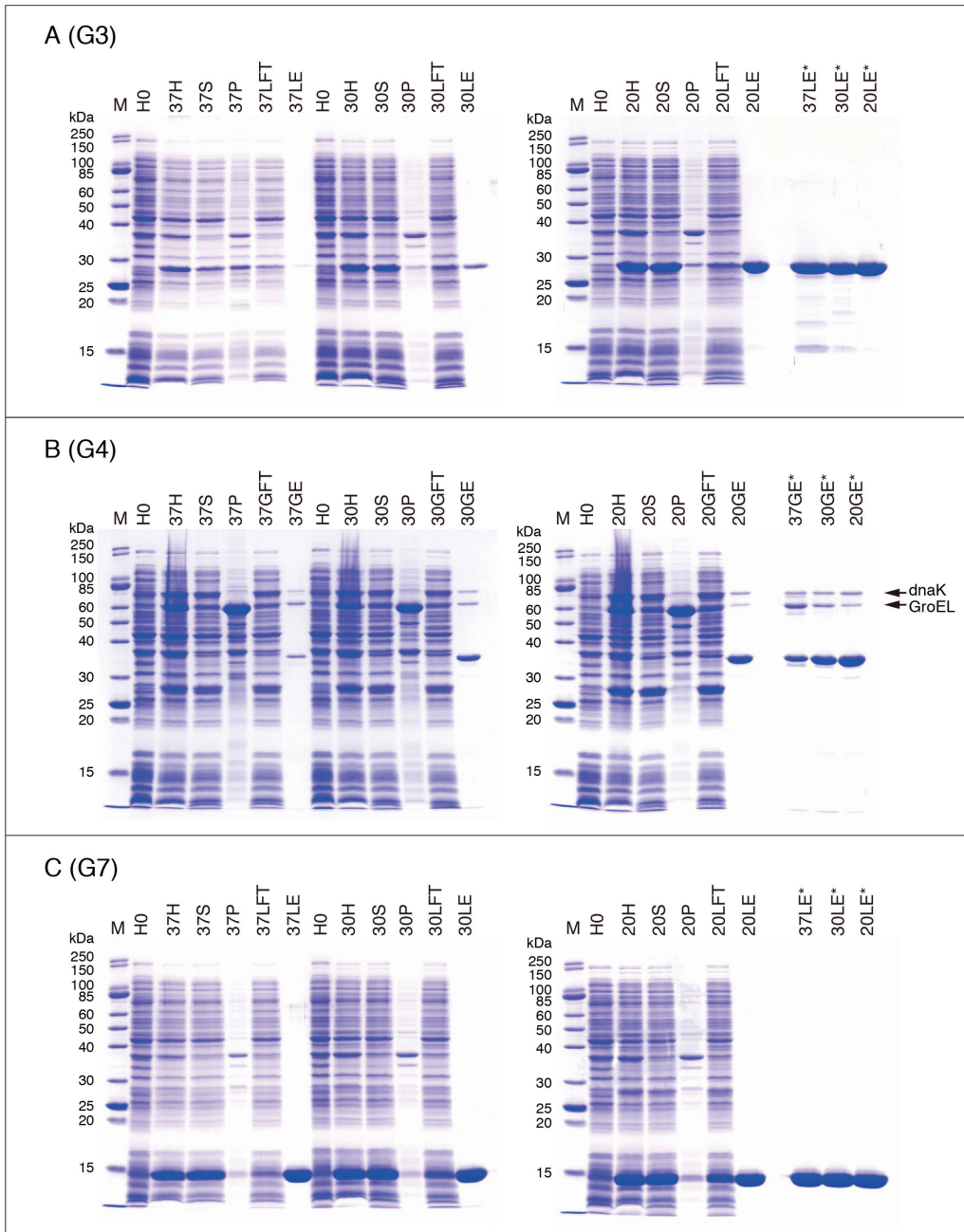


Fig. 5. Expression and purification profiles of galectins on SDS-PAGE.

(A, B, and C) Expression and purification profiles of G3, G4, and G7, respectively. See text for explanation of the lane headings. *M*, molecular weight marker proteins. *H0* ~ *LFT/GFT*, 0.1 mg wet pellet equivalent/lane; *37LE/30LE/20LE* (G3 and G7), 0.3 mg wet pellet equivalent/lane; *37GE/30GE/20GE* (G4), 5 mg wet pellet equivalent/lane; *37LE*/30LE*/20LE*/37GE*/30GE*/20GE**, 3 μ g protein/lane.

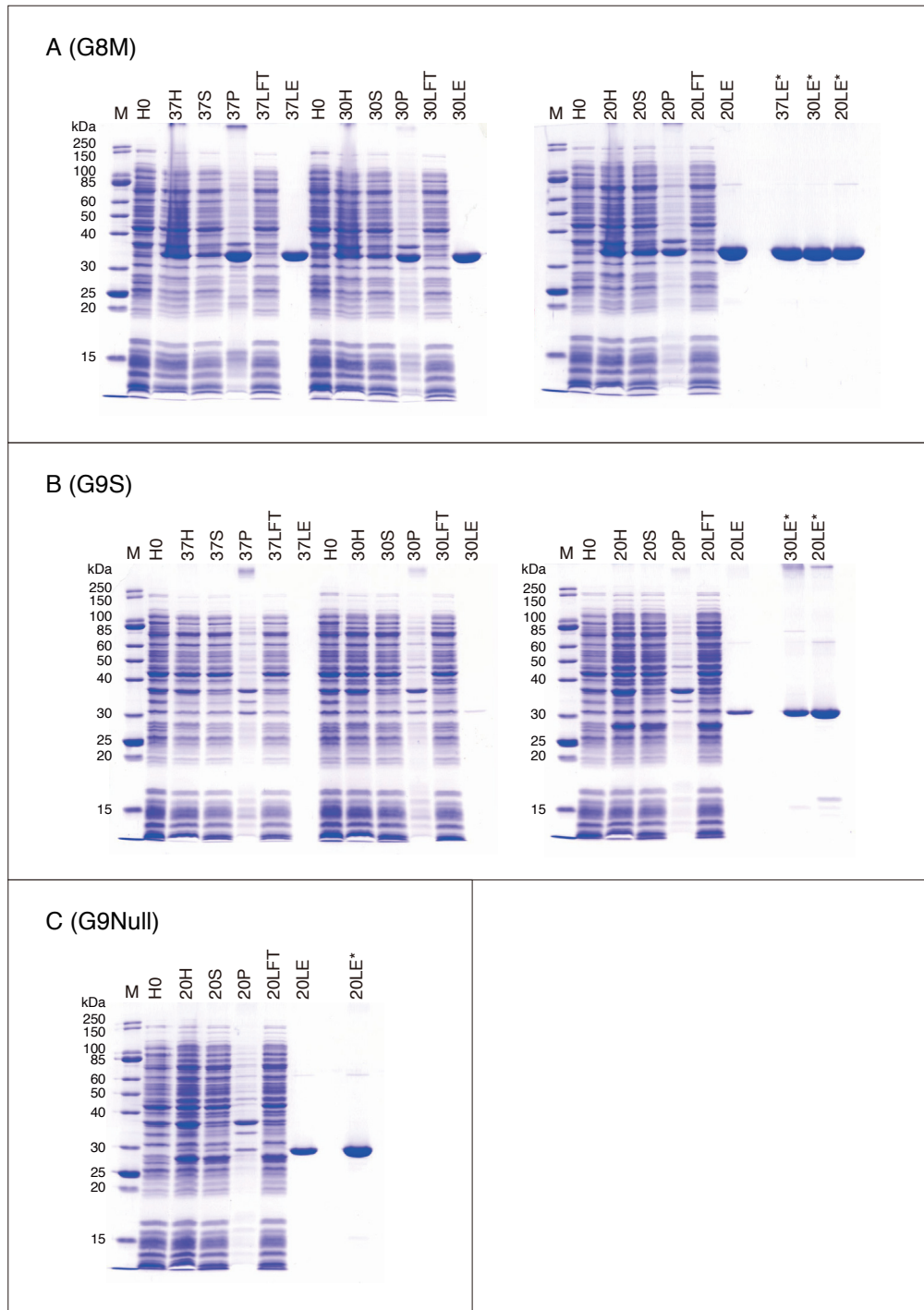


Fig. 6. Expression and purification profiles of galectins on SDS-PAGE.

(A, B, and C) Expression and purification profiles of G8M, G9S, and G9Null, respectively. See text for explanation of the lane headings. *M*, molecular weight marker proteins; *H0* ~ *LFT*, 0.1 mg wet pellet equivalent/lane; *37LE/30LE/20LE* (G8M), 0.3 mg wet pellet equivalent/lane; *37LE/30LE/20LE* (G9S) and *20LE* (G9Null), 1 mg wet pellet equivalent/lane; *37LE*/30LE*/20LE**, 3 μ g protein/lane.

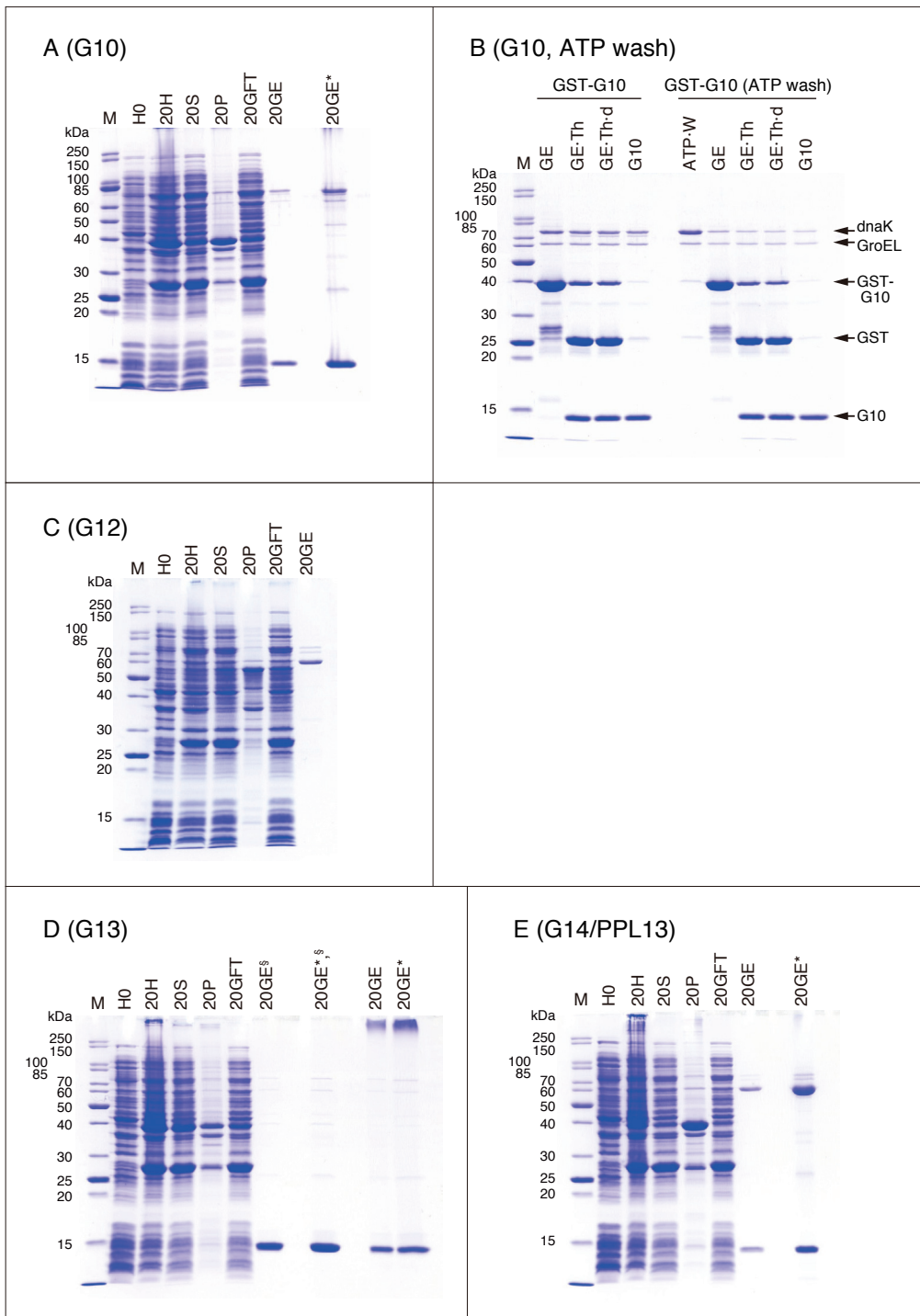


Fig. 7. Expression and purification profiles of galectins on SDS-PAGE.

(A, C, D, and E) Expression and purification profiles of G10, G12, G13, and G14/PPL13, respectively. (B) Effect of ATP washing on the content of *E. coli* chaperones in the G10 preparation. See text for explanation of the lane headings. *M*, molecular weight marker proteins; *H0* ~ *GFT*, 0.1 mg wet pellet equivalent/lane; *20GE* (G10, G12, and G14/PPL13), 2 mg wet pellet equivalent/lane; *20GE* (G13), 0.5 mg wet pellet equivalent/lane; *20GE**, 3 μ g protein/lane; *20GE^S*, *20GE^{S,S}*, heat treatment was not performed.

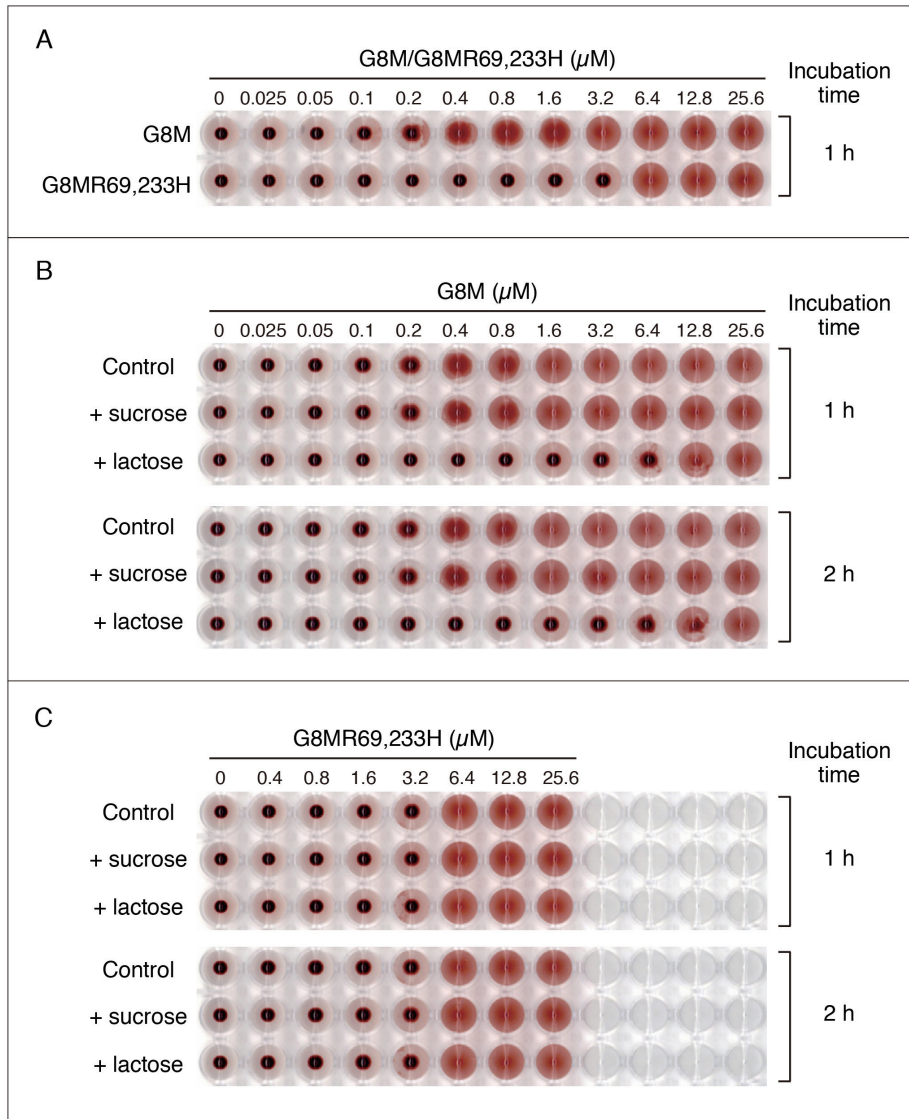


Fig. 8. Hemagglutination assay of G8M and G8MR69,233H.

(A) Twofold serial dilutions (in PBS, 10 mg/ml BSA, 0.05% NaN_3) of purified GST-free G8M and G8MR69,233H were prepared and then added to the wells of V-bottom 96-well plates (50 μL /well). Trypsinized, glutaraldehyde-fixed rabbit erythrocyte suspension (2% [v/v] in PBS, 10 mg/ml BSA, 0.05% NaN_3) was added to each well (50 μL /well) and then mixed by pipetting several times using a multichannel pipette set at 50 μL , followed by 1-h incubation at room temperature. (B and C) Effect of sucrose and lactose on the hemagglutination activity of G8M (B) and G8MR69,233H (C). Sucrose or lactose was added to both the sample solution and the erythrocyte suspension at a concentration of 50 mM. Hemagglutination was evaluated after 1- and 2-h incubation. The plate was scanned with a flat bed scanner.

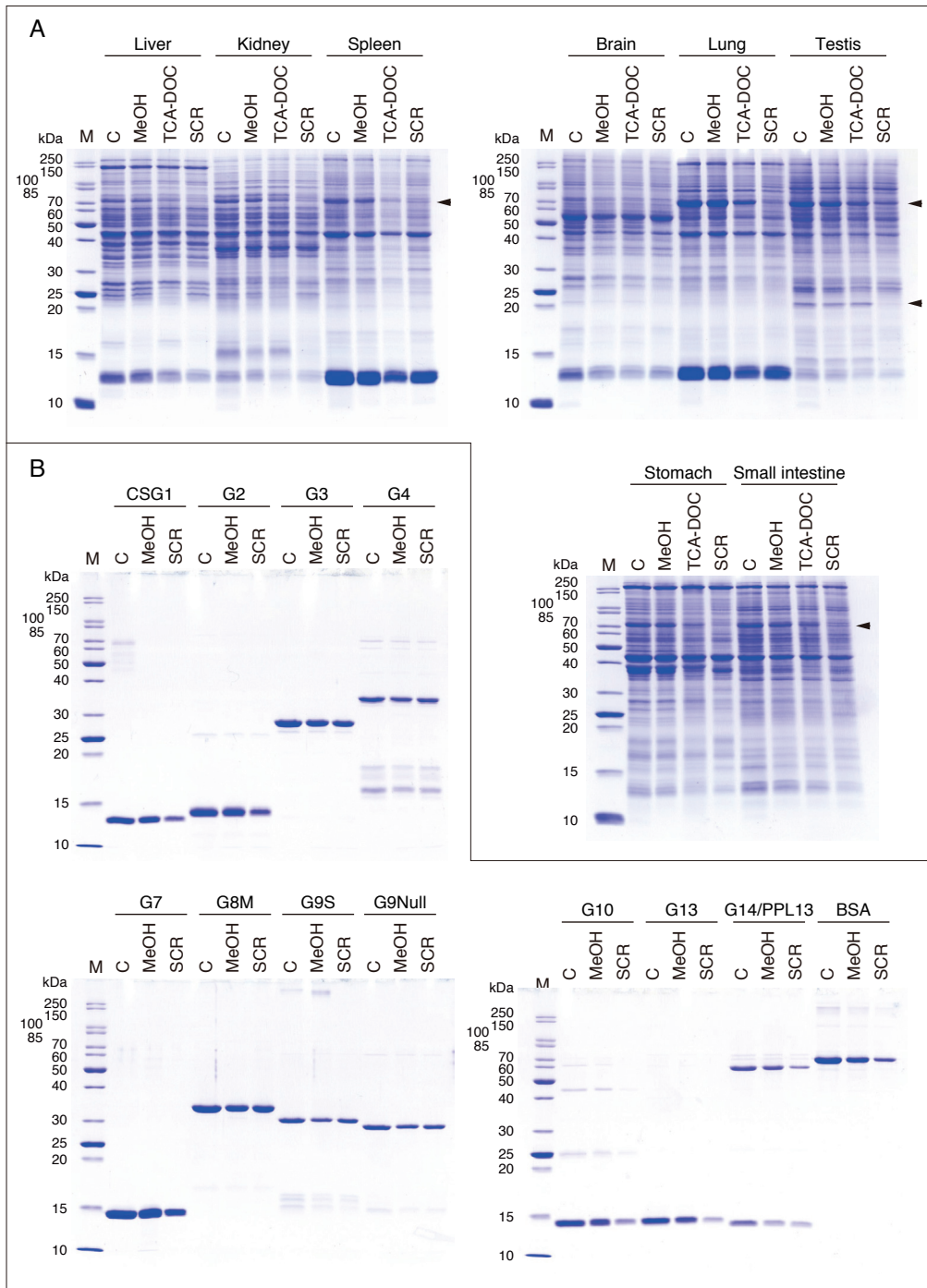


Fig. 9. Comparison of protein enrichment protocols for SDS-PAGE.

(A) Rat tissue extracts concentrated by the three methods (methanol method, TCA-DOC method, and SCR method) were analyzed by SDS-PAGE. (B) Purified galectin preparations and BSA concentrated by two methods (methanol method and SCR method) were analyzed by SDS-PAGE. *M*, molecular weight marker proteins; *C*, 7.5 μ g protein/lane (rat tissue extracts) and 1 μ g protein/lane (purified galectin preparations and BSA); MeOH, samples concentrated with methanol method; TAC-DOC, samples concentrated with TAC-DOC method; SCR, samples concentrated with SCR method.

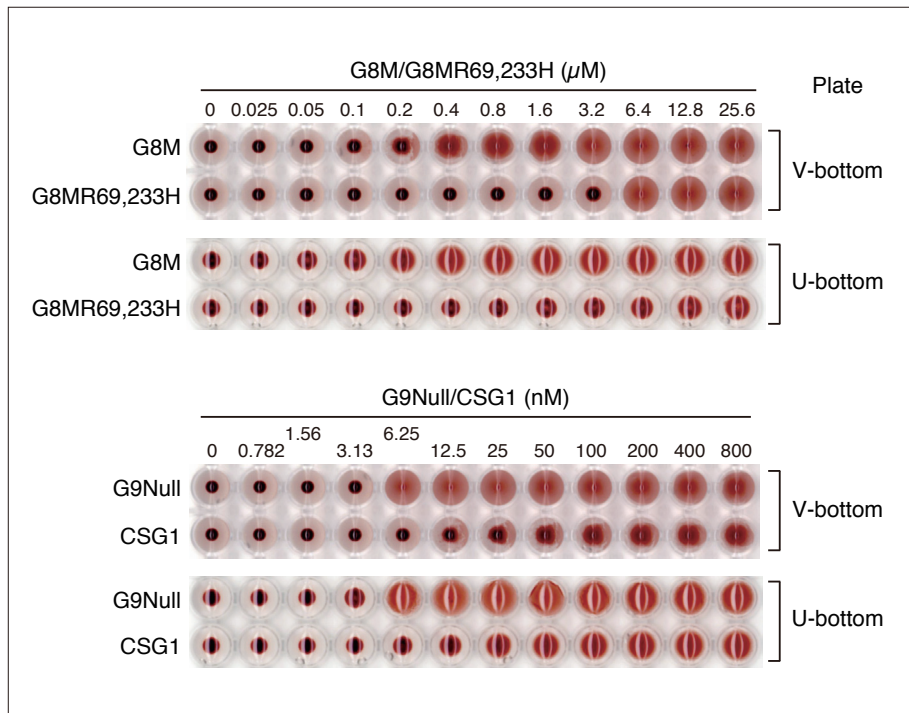


Fig. 10. Hemagglutination assay of G8M, G8MR69,233H, G9Null, and CSG1.

Hemagglutination assay was performed as described in the legend to Fig. 8, except that two types of 96-well plates (V-bottom and U-bottom) were used. G9Null and CSG1 were expressed as tag-free forms (pET vector).

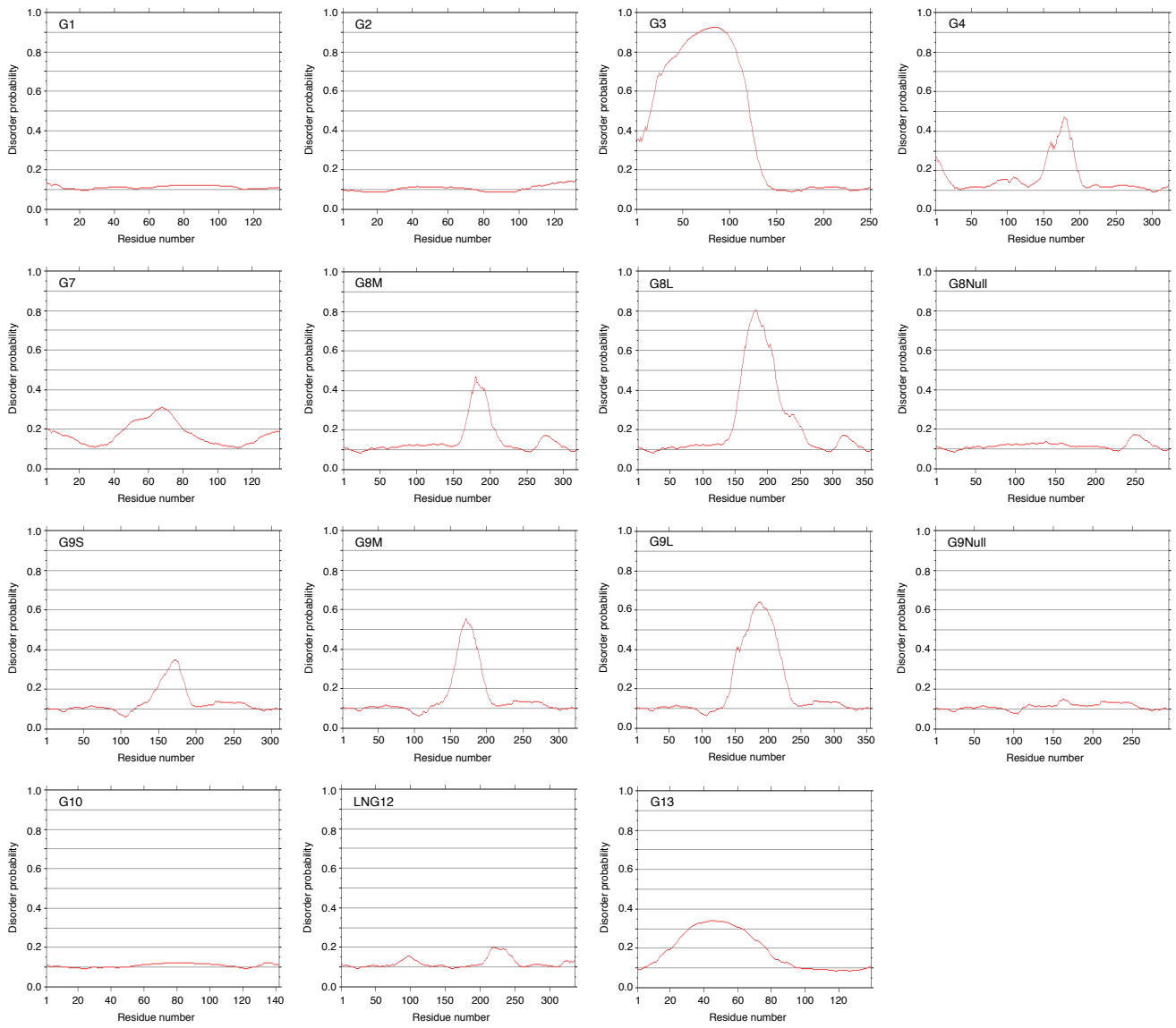


Fig. 11. The prediction of disordered regions of galectins with POODLE.