

チェリートマトの精製レクチンの糖鎖結合特異性と 抗体を利用した組織化学的研究

斎藤 景子¹⁾, 八木 洋美¹⁾, 中野 教子¹⁾
角田 万里子²⁾, 三崎 旭²⁾
(¹⁾大阪市大・生活科学*, ²⁾甲南女子大・家政**)

Carbohydrate-binding Properties of the Purified Cherry Tomato (*Lycopersion esculentum* var. Cherry) and Immunohistochemical Application

Keiko SAITO¹⁾, Hiromi YAGI¹⁾, Noriko NAKANO¹⁾, Mariko KAKUTA²⁾ and Akira MISAKI²⁾
¹⁾Faculty of Human Life Science, Osaka City University and ²⁾Konan Women's University

A blood group non-specific hemagglutinin which recognizes *N*-acetyl chitosaccharides was isolated from the homogenate of cherry tomato (*Lycopersion esculentum* var. Cherry), which showed the highest hemagglutinating activity among genetically diverse 28 kinds of tomatoes, by conventional ion exchange chromatographic techniques, and also by affinity chromatography on a chitin column. The purified cherry tomato lectin (LEcA) was a hydroxyproline-rich single polypeptide glycoprotein (*M_r* 100,000), containing 50% carbohydrate moiety (94% L-arabinose and 4% D-galactose).

The carbohydrate-binding specificity of the purified lectin was studied by quantitative precipitation and hapten inhibition assay. This lectin was highly specific to $\beta(1\rightarrow4)$ -linked *N*-acetyl glucosaminyl units. It strongly reacted with *N*-acetyl-chitobiose-BSA, but not with *N*-acetyl-glucosamine-BSA. The interaction of LEcA with thyroglobulin on GLISA (glycoprotein-lectin immunosorbent assay) was inhibited by *N*-acetyl-chitosaccharides, in order, $[\text{GlcNAc}]_5 > [\text{GlcNAc}]_4 > [\text{GlcNAc}]_3 > [\text{GlcNAc}]_2$, having approximately 194-times, 32-times and 5-times greater potency, respectively, than $[\text{GlcNAc}]_2$. The periodate-oxidized and reduced derivative of $[\text{GlcNAc}]_4$ and $[\text{GlcNAc}]_5$ were also good inhibitors, which showed similar inhibitory potency as the intact $[\text{GlcNAc}]_2$ and $[\text{GlcNAc}]_3$, respectively, strongly suggesting that LEcA recognizes internal *N*-acetyl-chitosaccharide sequence.

Although, LEcA showed non-inhibitory activity for sugar-hydrolytic enzymes from animal digestive tract, LEcA appeared to inhibit the active transport of sugar to some extent, on the epidermal membrane

*所在地：大阪市住吉区杉本3-3-138 (〒558)

**神戸市東灘区森北町6-2-23 (〒658)；別冊請求先

of rat small intestinal, as examined by using the everted sac. The histochemical study by immunostaining using anti-LEcA antibodies visualized the localization of the lectin on the rat brush-border membrane. This strongly suggested the cherry tomato lectin can bind to either the intestinal epidermal cell surface or the secreted glycoprotein which contain $\beta(1\rightarrow4)$ -linked *N*-acetyl-glucosaminyl sugar chains although it may not affect to the nutritional function.

本研究は、可食性植物のうち、我々が日常的に生で摂取し、しかも毒性を示さないトマトのうち、特にチェリートマトより、新たに *N*-acetyl-glucosamine (GlcNAc) 認識レクチンを単離し、その性質と生化学的・生理学的機能を明らかとすることを目的とした。

多くの植物性食品中には糖鎖を認識・結合する血球凝集素（レクチン）が含まれていることは、広く知られている¹⁾。しかし、植物レクチンの反栄養的作用に関しては、強い生体毒性を持つマメ科のレクチン以外には詳しい知見は得られていない。ナス科の野菜であるトマトは、生食されることが多く、またその果肉中に血球凝集性のレクチン²⁻⁴⁾を含むことが知られているが、生体に対して毒性を発現しない¹⁾。我々はこの点に興味を持ち、28種類の栽培品種のトマトのうち、最も血球凝集活性の高かったチェリートマトより精製した、新たな $\beta(1\rightarrow4)$ -GlcNAc 鎖結合レクチンの詳細な糖結合特異性を検討するとともに、栄養学的観点から本レクチンの生体の消化機能に対する影響の解明を試みた。

実験方法

大阪府農業試験場より供与された28種類の在来栽培品種のトマトをスクリーニングし、最も高い血球凝集活性を有するトマトよりレクチンを精製した。レクチンは、トマト果実より PBS (10mM リン酸緩衝液; pH 7.2, 0.15M NaCl) にて抽出し、粗抽出液の80%飽和硫酸画分を採取し、粗レクチンとした。これを種々のイオン交換クロマトグラフィー (DEAE-Sephadex A-50, および CM-Sephadex C-50 column), またはキチンを担体とするアフィニティー・クロマトグラフィーに供してレクチンを画分、精製し、最終的にゲルろ過 (Sephacryl S-300 column) によって精製レクチンを得た。

精製レクチン (LEcA) の分子量は、ゲルろ過 (Sephacryl S-300 column) と SDS-PAGE (Douct 法)⁵⁾ によって求め、分子内糖鎖の構成糖組成はガスクロマトグラフィーで、また構成アミノ酸組成はアミノ酸アナライザーで分析した。

抗 LEcA ウサギ抗体は、精製チェリートマト・レクチンをフロイントの完全アジュバントに懸濁し、ウサギ皮下に週に1回、4回免疫して得られた抗 LEcA 血清を、Protein A アフィニティー・カラムによって精製した。

LEcA の糖結合特異性は、抗 LEcA ポリクローナル抗体と糖タンパク質を利用した ELISA 改良法⁶⁾ の GLISA (glycoprotein-lectin immunosorbent assay) 法⁷⁾ によって、定量沈降反応および阻害実験を行い、検討した。ELISA プレートにレクチンの抗原となる糖鎖をもつ糖タンパク質をコートし、LEcA を作用させ、その糖タンパク質糖鎖へのレクチンの結合量を抗 LEcA ウサギ抗体と酵素標識した抗ウサギ IgG ヤギ抗体を用いて定量した。また、ハプテン糖によるレクチンの結合阻害実験には、最も LEcA と強い

結合活性を示した thyroglobulin (ブタ) を用いた。

チェリートマト・レクチン (LEcA) の高等動物に対する栄養学的挙動に関しては、ラットの小腸反転サック⁸⁾を用いて、LEcA が小腸組織に結合することによる絨毛上皮細胞における糖の取り込みに対する影響、およびLEcA による種々の糖質分解酵素の活性阻害を検討した。また、ラット消化管にLEcA を作用させた際の生体へのレクチンの作用を検討するため、ウサギ抗LEcA 抗体を用い、2次抗体としてFITC 標識抗体を用いることによって、小腸上皮組織を染色した。チェリートマト・レクチンの果実組織内の局在も同様に、作製した抗LEcA ウサギ抗体を用いた免疫蛍光法によって組織染色を行い、観察した。

結果および考察

大阪府農業試験場より供与された28種類の在来栽培品種の中で、最も高い血球凝集活性を有したチェリートマト (*Lycopersion esculentum* var. Cherry) よりレクチンを精製した (Fig. 1)。チェリートマト・レクチン (LEcA) は、果実 (40kg) よりPBS (10mM リン酸緩衝液; pH 7.2, 0.15M NaCl) にて抽出し、粗抽出液の80% 飽和硫酸画分 (27g) を得て、粗レクチン画分とした。これを陰イオンおよび陽イオンの2本のイオン交換クロマトグラフィー (DEAE-Sephadex A-50, CM-Sephadex C-50 column), またはキチンを担体とするアフィニティー・クロマトグラフィーに供してレクチンを分離 (Fig. 2), 最終的にゲルろ過 (Sephacryl S-300 column) によって精製レクチン (40mg) を得た (Table 1)。イオン交換カラム, キチン・カラム, いずれを用いた場合も同様にレクチンを得ることが可能であった。

LEcA は電気泳動およびゲルろ過のいずれにおいても単一であり、分子量はSDS-PAGEで $M_r = 130kDa$, ゲルろ過 (Sephacryl S-300 column) で $M_r = 100,000$ であり (Fig. 3), これらのことより本レクチンが、これまでに報告されている在来種トマトからのレクチン (LEA) とは、部分的には異なる性質を持つことが示唆された。LEcA は L-arabinose (Ara; 94%) と D-galactose (Gal; 4%) から成る糖

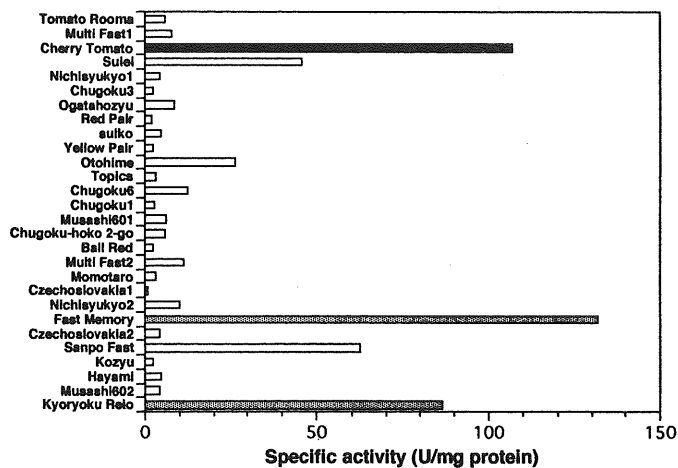


Fig. 1. Comparison of hemagglutination activities in various kinds of tomatoes.

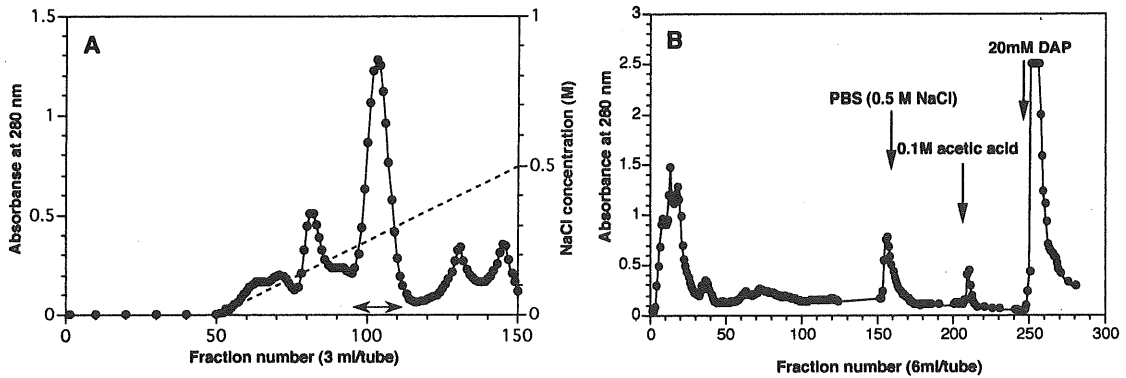


Fig. 2. Elution profile of cherry tomato lectin on CM-Sephadex C-50 column (A), and Elution profile of LECa from chitin affinity column (B). A: The protein from cherry tomato extract which unbound on DEAE-Sephadex A-50 was applied to the column and eluted with 10mM phosphate buffer containing a linear gradient of 0 to 0.5M NaCl. Each fraction was assayed for hemagglutination. Arrows indicate hemagglutinin activity. B: The 80% ammonium sulfate precipitate fraction was applied to a chitin column. After unbound material was eluted, the bound proteins were eluted with 10mM PBS containing 0.5M NaCl and 0.1M acetic acid. LECa was desorbed with 20mM DAP.

Table 1. Purification of cherry tomato lectin (LEcA)

	Protein (mg)	Total activity (units)	Specific hemagglutination activity (U/mg protein)	Purified activity (-fold)
Crude extract	27,000	5.13×10^5	19	1
80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitate	5,920	9.54×10^4	20	1
Purified LECa	41	6.00×10^4	3,400	178

*LEcA was purified by DEAE-Sephadex A-50, CM-Sephadex C-50 and Sephacryl S-300.

鎖を約50%含み、hydroxyproline と serine に富む polypeptide から成る単量体の糖タンパク質であることが分かった (Table 2)。

本レクチンの糖結合特異性を検討するために用いた GLISA (glycoprotein-lectin immunosorbent assay) 法は、従来の血球凝集阻害実験や定量沈降実験よりも微量で、かつ高感度にレクチンと糖鎖の親和性を測定することを可能にした。血球凝集阻害試験の結果からも、本レクチンが β -(1→4) 結合の *N*-acetyl-glucosamine (GlcNAc) 鎖に特異的であることは明らかにされていたが、さらに LECa が (i) *N*-acetyl-chitobiose-BSA には強く結合するが、*N*-acetyl-glucosamine-BSA とはほとんど反応しないこと、(ii) またブタの thyroglobulin の糖鎖とは強く結合するが、ウシ由来の thyroglobulin の糖鎖とは反応しないという、興味深い知見が得られた (Fig. 4)。

N-acetyl-chitosaccharides を用いた結合阻害実験において (Table 3), LECa とブタ thyroglobulin

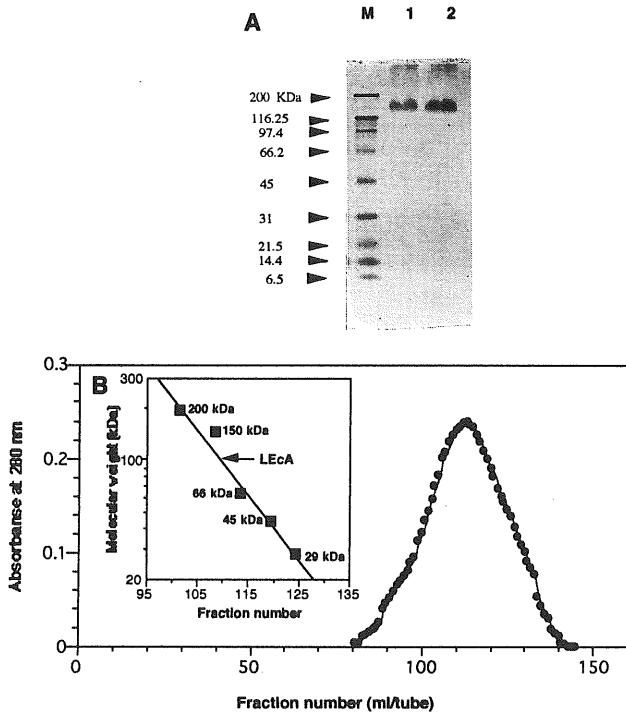


Fig. 3. Molecular weight of LEcA on SDS-PAGE (A) and gel filtration on a Sephacryl S-300 HR column (B). A: Ten% SDS slab gel was used. Lines; line 1, in the presence of 5% 2-mercaptoethanol; line 2, in the absence of mercaptoethanol; line M, Mr reference proteins myosin (200kDa), β -galactosidase (116.25kDa), phosphorylase b (97.4kDa), bovine serum albumin (66.2kDa), ovalbumin (45kDa), carbonic anhydrase (31kDa) trypsin inhibitor (21.5kDa) lysozyme (14.4kDa) and aprotinin (6.5kDa). The protein on the gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250. B: LEcA eluted from the column (0.5 \times 110cm) was monitored by A₂₈₀. Inset, Molecular weight determination of native LEcA by gel filtration. The molecular weight markers were myosin (200kDa), bovine serum albumin (66kDa), ovalbumin (45kDa) and carbonic anhydrase (29kDa).

との結合反応は [GlcNAc]₅ > [GlcNAc]₄ > [GlcNAc]₃ > [GlcNAc]₂ の順に重合度に応じて、強く阻害をうけることが分かった。この結果から、LEcA が、これまでによく知られている GlcNAc 結合性の *Griffonia simplicifolia* II (GS-II) などとは異なり、単糖単位の GlcNAc よりも、ある程度の長さ(重合度 4-5 程度)の β -(1 \rightarrow 4)-GlcNAc 糖鎖 (N-acetyl-chitosaccharide) により強い親和性をもつことが証明された。さらに [GlcNAc]₄ および [GlcNAc]₅ の還元および非還元末端の糖残基を修飾したオリゴ糖誘導体によっても LEcA の結合活性が、それぞれ [GlcNAc]₂ と [GlcNAc]₃ と同程度に阻害されたことより、LEcA が直鎖糖鎖内部の糖残基を認識しうる新しい知見を得た。

さて、食品生化学的見地から見ると、チェリートマトはレクチン (LEcA) が生体に対して毒性を発現しないため、生のままで食することが可能である。しかし、これまで強い生体毒性を持つマメ科のレクチン比べ、このような低毒性のレクチンの生体に及ぼす栄養学的影響についての詳しい知見は得られ

Table 2. Amino acid composition of Solanaceae lectins

Amino acid	Residue	INT	LEcA	Mol %		
				LEA*	STA**	DSA***
Hyp	152.63	153	23.5	17.8	20.3	13.5
Gly	88.16	88	13.5	10.4	12.3	12.9
Glx	70.13	70	10.7	8.3	6.9	6.7
1/2 Cys	63.73	64	9.8	7.1	10.6	12.3
Ser	52.71	53	8.1	14.1	12.6	12.9
Ala	36.53	37	5.7	2.5	4.1	3.9
Asx	29.45	29	4.4	5.0	4.9	6.7
Pro	22.32	22	3.4	11.6	6.9	6.2
Ile	21.87	22	3.3	0.8	1.6	1.1
Thr	20.27	20	3.1	5.4	5.7	5.6
Leu	19.62	20	3.1	0.0	1.2	1.7
Val	16.34	16	2.5	0.0	0.4	5.6
Arg	15.69	16	2.5	2.5	1.2	2.8
Lys	12.60	13	2.0	4.6	3.7	1.7
Phe	8.86	9	1.4	0.0	0.4	1.1
Tyr	7.89	8	1.2	2.5	3.2	2.2
His	7.67	8	1.2	1.2	0.4	0.7
Met	3.95	4	0.0	2.9	0.4	0.7
Trp	0.00	0		3.3	3.2	1.7
Carbohydrate cont.			50	50	50	37
Ara			94	85	95	74
Gal (%)			4	15	5	14

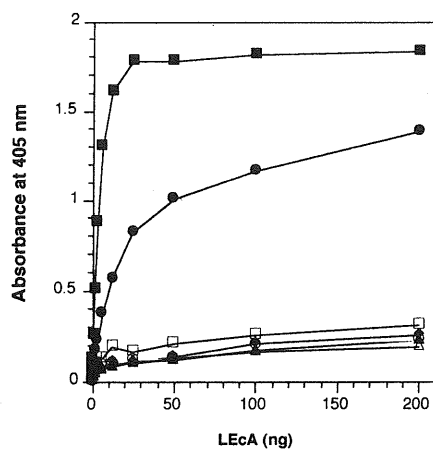
* Data are from M. S. Nachbar *et al.*⁴⁾** Data are from A. K. Allen *et al.*⁹⁾*** Data are from N. N. Desai *et al.*¹⁰⁾

Fig. 4. Quantitative presipitation curves of LEcA with some glycoproteins in GLISA (glycoprotein-lectin immunosorbent assay). Various amounts of glycoproteins were allowed to react with 100ng of LEcA. (●), *N,N'*-acetyl-chitobiose-BSA; (○), *N*-acetyl-glucosamine-BSA; (■), thyroglobulin (porcine); (□), thyroglobulin (bovine); (▲), fetuin; (△), asialofetuin; (◆), mucin.

ていない。そこで、高等動物に対する本レクチンの挙動をラットの小腸反転サックなどを用いて検討した。その結果、LEcA は小腸絨毛上皮細胞における glucose (3-O-methyl-glucose) の移送をある程度阻害することが分かった (Fig. 5)。そこで、このような取り込み阻害の作用機構を検討するため、ウサギ抗 LEcA 抗体を用いて、本レクチンを作用させた小腸上皮組織を染色し、観察した。その結果、LEcA と特異的に結合するムチンなどの glycoconjugate は小腸絨毛上皮の微絨毛膜、あるいは粘液分泌腺に、

Table 3. Hapten inhibition of three GlcNA-binding lectins by various sugars

Hapten sugars	Concentration for 50% inhibition	LEcA	Inhibitory potency	
			WGA *	DSA **
	mM			
<i>N</i> -acetyl-glucosamine	600	0.0005	0.0076	0.011
β -Me-glucosammonoside	260	0.0012	0.009	13%, 40mM
<i>N</i> -acetyl-lactosamine	2.4	0.125	>0.047	1.67
<i>N,N'</i> -acetyl-chitobiose	0.3	1	1.0	1.0
<i>N,N',N''</i> -acetyl-chitotriose	0.059	5.1	28.13	6.25
<i>N,N',N'',N'''</i> -acetyl-chitotetraose	0.0094	31.9	34.62	11.11
<i>N,N',N'',N''',N''''</i> -acetyl-chitopentaose	0.00155	193.5	45.0	0%, 8mM
NaBH ₄ -reduced chitobiose	16	0.019	0.09	0.57
NaBH ₄ -reduced chitotriose	0.15	2	3.46	5.26
NaBH ₄ -reduced chitotetraose	0.015	20	32.46	
NaBH ₄ -reduced chitopentaose	0.0032	93.8		
periodate oxidized and NaBH ₄ -reduced chitotetraose	0.3	1	2.5	
periodate oxidized and NaBH ₄ -reduced chitopentaose	0.017	17.6		

* Data are from I. J. Goldstein *et al.*¹¹⁾

** Data are from J. F. Crowley *et al.*¹²⁾

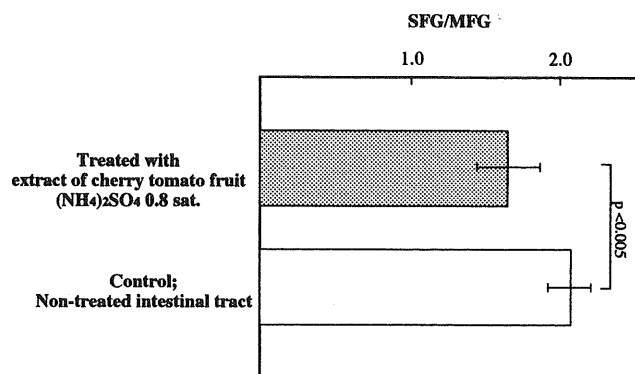


Fig. 5. Effect of cherry tomato extracts for 3-O-methyl-D-glucose transport activity on rat small intestine. The everted sacs of rat small intestine were treated and non-treated with the extract of cherry tomato fruit; (NH₄)₂SO₄ 0.8sat. fraction (5mg protein/ml). The transport ratio of 3-O-methyl-D-glucose was estimated by HPLC.

選択的に分布していることが分かる (Fig. 6)。一方, *in vitro* の実験で, LEcA が唾液や膵液の α -アミラーゼ, および小腸絨毛膜に局在する終末分解酵素 (glucoamylase, sucrase, maltase など) の活性を阻害しなかった (Table 4)。このことは, 免疫化学的な組織観察と併せて, トマトには血球凝集性のレクチンが含まれるにも関わらず, 生食しても生体に対して反栄養作用を発現しないのは, チェリートマト・レクチン (LEcA) がじゅう毛組織内の分泌性ムチンにルーズに結合しており, 生体組織に直接結合しないためではないかと考えられた。

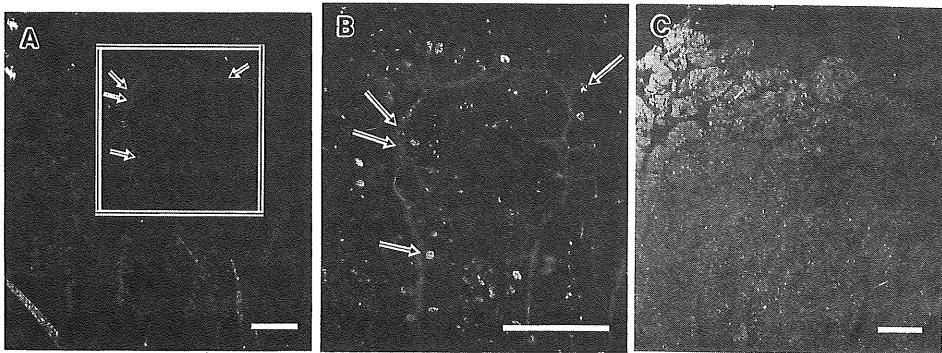


Fig. 6. Immunofluorescence staining of LEcA in thin sections of rat small intestinal epithelium. (A) and (B); Sections of rat small intestine were stained with anti-LEcA antibodies using immunofluorescent technique, bars=500 μ m. (C); in the presence of 0.25M [GlcNAc]₄. No fluorescence was observed, bar=500 μ m. Arrows indicate immuno-stained LEcA.

Table 4. Inhibition of enzyme activity of various α -glycosidases by LEcA and other plant lectins

Lectins	Human saliva	Porcine pancreas	Rat small intestine			<i>Asp. oryzae</i>
	α -amylase		glucoamylase	sucrase	maltase	α -amylase
LEcA	—	—	—	—	—	28
STA	—	—	—	—	—	10
Con A	16.2	13	16.5	14	—	35
PHA	23.4	5	23.4	5.5	16.0	28
PCA-I	64	70	30	—	29	50

Con A = *Canavalia ensiformis* agglutinin

PHA = *Phaseolus vulgaris* agglutinin

PCA-I = *Phaseolus coccineus* agglutinin

STA = *Solanum tuberosum* (potato) agglutinin

参 考 文 献

- 1) GOLDSTEIN, I.J. and PORETZ, R.D. (1986) Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: Liener, I.E., Sharon, N., Goldstein, I.J. eds, *The Lectins*:

Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. Academic Press, New York : pp. 33-248

- 2) KILPATRICK, D.C. (1980) *Biochem. J.* 185 : 269-272
- 3) KILPATRICK, D.C. (1983) Tomato (*Lycopersion esculentum*) lectin and serologically related molecules. In: Goldstein, I.J., and Etzler, M.E. eds., *Chemical Taxonomy, Molecular Biology, and Function of Plant Lectins*, Alan R. Liss, Inc., N.Y. : pp. 63-70
- 4) NACHBAR, M.S., OPPENHEIM, J.D., and THOMAS, J.O. (1980) *J. Biol. Chem.* 255 : 2056-2061
- 5) DOUCT, J.P., and TRIFARO, J.M. (1988) *Anal. Biochem.* 168 : 265-271
- 6) ENGVALL, E., and PERLMANN, P. (1971) *Immunochemistry* 8 : 871-879
- 7) KOTTGEN, E., HELL, B., MULLER, C., and TAUBER, R. (1988) *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* 369 : 1157-1166
- 8) WILSON, T.H., and WISEMAN, G. (1954) *J. Physiol.* 123 : 116-125
- 9) ALLEN, A.K., DESAI, N.N., NEUBERGER, A., and CHREETH, J.M. (1978) *Biochem. J.* 171 : 665-674
- 10) DESAI, N.N., ALLEN, A.K., and NEUBERGER, A. (1981) *Biochem. J.* 197 : 345-353
- 11) GOLDSTEIN, I.J., HAMMARSTROM, S. and SUNDBLAD, G. (1975) *Biochem. Biophys. Acta* 405 : 63-67
- 12) CROWLEY, J.F., GOLDSTEIN, I.J., ARNARP, J., and LONNGREN, J. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 231 : 524-533