

クワイ (*Sagittaria trifolia L. var sinensis*) 塊茎からの α -Xylose, α -Galactose および α -Mannose 結合レクチンの単離と特性

三崎 旭¹⁾, 中田 忍²⁾, 賀来 華江³⁾, 角田 万里子⁴⁾
(¹⁾大阪市大*, (²⁾大阪教育大**, (³⁾(独)生物資源研***, (⁴⁾甲南女大・人間科学****)

* Isolation and Characterization of α -Xylose-, α -Galactose-, and α -Mannose-binding Lectins from the Tubers of Arrowhead, *Sagittaria trifolia L. var sinensis*

Akira MISAKI¹⁾, Shinobu NAKATA²⁾, Hanae KAKU³⁾ and Mariko KAKUTA⁴⁾
¹⁾Osaka City University, ²⁾Osaka Kyoiku University,
³⁾Agrobiol. Resource Inst. and ⁴⁾Konan Women's University

Summary

In the course of survey on biologically active substances in traditional plant foods, we have noted that tubers of arrowhead, *Sagittaria trifolia L. var sinensis*, contain unique lectins, particularly, specific to α -xylose residues, in addition to α -galactose- and α -mannose residues. Fresh tubers of arrowhead, grown in Suita region, were homogenized in PBS at cold. After separation of starch, the lectin-containing protein fraction was successively fractionated by using affinity columns, each lectin being further purified by gel filtration. The molecular properties and binding specificities of these lectins were characterized; α -xylose-specific lectin, first found in plant kingdoms, is a glycoprotein with molecular mass 5×10^4 , consisting of two subunits, 26 kDa. It binds to terminal α -xylose residue of xyloglucans. Possibly, it may also recognize terminal β -xylose residue. α -galactose-specific lectin is also glycoprotein, molecular mass 5.2×10^4 , with two subunits, 26 kDa. This lectin binds to terminal α -galactose residues of galactomannans, also with human blood B substance. α -Mannose-specific lectin, is a dimeric protein with subunit of 26 kDa. It recognized terminal α -mannose of yeast mannans and glycoconjugates, In addition, it also recognizes terminal α -d-arabinofuranose residues.

はじめに

オモダカ科 (*Alismataceae*) のクワイ (*Sagittaria trifolia L. var sinensis*) は中国原産でその塊茎は古くから正月料理などで食されているが、食味成分としての澱粉以外あまり知られていない。我々はこれまでクロッカス¹⁾、サフランモドキ²⁾など種々の単子葉植物の球根に含まれる α -mannoseに特異的に結合するレクチンの分離と性質を明らかにしてきた。この研究の発展過程で伝統的な食材中の生理活性物質に興味を抱いた。その一つとしてクワイの塊茎中に α -結合のxylose残基(Xyl)³⁾に結合する全く新しいレクチンの存在を認めた。この他に α -結合のgalactoseおよびmannoseを認識するレクチンも含まれることを認めた。ここでは主として、これらのユニークなクワイのレクチンの精製と分子のおよび結合特異性を報告する。

*現在：四条畷学園大学 所在地：大阪府大東市北条5丁目11-1 (〒574-0011)

**所在地：柏原市旭ヶ丘4-698-1 (〒582-8582)

***現在：明治大学農学部 生命科学 所在地：川崎市多摩区東三田1-1-1 (〒214-8571)

****所在地：神戸市東灘区森北町6-2-23 (〒658-0001)

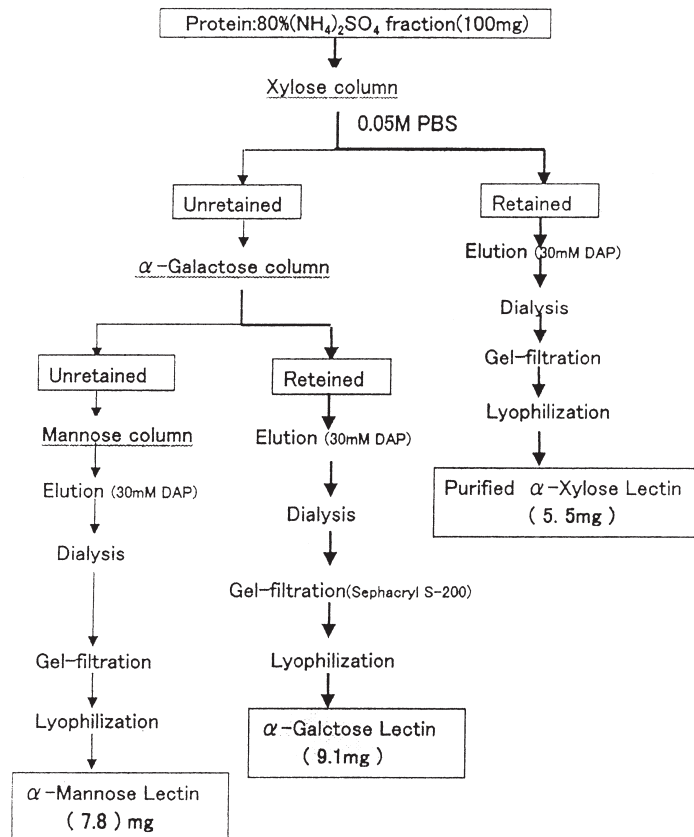
実験材料および実験方法

クワイ塊茎の分画とレクチンの分離精製法 吹田産のクワイ（慈姑）(0.5kg) を剥皮し不溶性の澱粉（92g）を cheese-cloth を用いて分離した後、0.1M の PBS（pH6.8）中で10℃で一晩攪拌し、遠心分離（10,000rpm, 20min）した。上清中の蛋白質を硫酸塩析（60-80%飽和）で沈澱させ、蒸留水で透析後凍結乾燥に付した（7.72g）。この硫酸沈殿の蛋白質画分中には、目的とするレクチンの他、amylase など、数種の glycosidase も存在するので、それぞれのレクチンに特異的な affinity column に系統的に通し、分離レクチンは gel filtration で電気泳動的に単一に精製した。系統的分画法は Scheme 1 に示す。

Affinity column による分画 Xyl 結合レクチン分離用の column として xylose-sepharose column（ミシガン大, Dr. Goldstein より供与）のほか、 α -xylosylglucose（isoprimerose）を AF-tresyl Toyopearl 650 に結合させた column³⁾ を作成した。 α -Gal^{a)} 結合レクチン用には α -galactose synsorb column, melibiose-agarose column（Sigma 社）、または、タラガム（tara gum）の galactomannan をクロス結合して作成した不溶性の column を用いた。 α -Man^{a)} 結合レクチンには市販の mannose-agarose column（Sigma 社）を用いた。通常、レクチン混合物を affinity column（1.5×15cm）にアプライし、まず 0.05M PBS（pH6.8）で非吸着物質を流出させ、次いで吸着蛋白（レクチン）を 20-30mM の diaminopropane（DAP, pH11）で溶離後、透析する。さらにゲルろ過（Sephacryl S-200 column, 1.5×100cm）で、電気泳動的に単一なるまでに精製した。

化学的分析法 一般に蛋白質またはレクチンの微量分析は micro Lowry 法によった。affinity column から溶離した蛋白質画分のモニターは通常 280nm における吸収で行った。

糖の化学的定量はマイクロ化したフェノール硫酸法によった。



Scheme 1 Fractionation and purification procedure

a) 糖鎖中の糖残基は、mannose: Man, galactose: Gal, xylose: Xyl, *N*-acetyl glucosamine: GlcNAcのごとく略名とした。

定量沈降反応 精製したレクチンと多糖, 糖蛋白およびオリゴ糖との定量沈降反応はこれまでの我々の方法に従い, 通常, 15-25 μg のレクチンと10-100 μg の多糖などを0.05MのPBS (pH6.8) 120 μl と共にmicro tube中で10-15 $^{\circ}\text{C}$, 48h反応させた後, 沈殿した蛋白質をLowry法で定量し沈降曲線を作成した。

結果および考察

レクチンの分離精製と分子のおよび糖鎖との結合特性

中国原産の慈姑(クワイ)は1000年以上も前から伝統的食品として利用されてきたが, 塊茎の構成成分に関しては澱粉以外に生理活性などの知見は得られていなかった。我々はこれまでに, 種々の単子葉植物球根から糖鎖末端の α -Manを特異的に認識するレクチンを分離し, それらの植物種による特異性の違いや機能性複合糖鎖などの生化学的分離手段あるいは, 発酵食品中のmannanの微量分析への利用など研究を行ってきた²⁾。本研究ではクワイ塊茎中の機能性物質の検索を試みた。予備実験で, 澱粉を分離後の蛋白質画分にはamylaseおよびglycosidaseなど, 数種の酵素の他に, ユニークな糖鎖結合性をもつ蛋白または糖蛋白性のレクチン, とくに, 植物界では初めて, 細胞壁マトリックスを構成するキシログルカン分子の末端の α -Xylを認識するレクチンを見出した。そのほかにも球根類に共通する α -Man, さらに, α -Galに特異的に結合するレクチンも見出したので, これらのレクチンの分離精製を行った。まず, 塊茎をホモゲナイズし, 澱粉^{註)}を除いた後, 0.8飽和の硫酸で沈澱した蛋白画分からこれらのレクチンをaffinity columnを用いて系統的に分離した。この目的のためには, それぞれの相当する糖鎖をリガンドとするcolumnを調製した。分画の例はScheme 1に示す。なお, columnによる分画順序は任意に変え得る。Fig. 1-A, Bにはそれぞれ, α -Xyl, α -Gal, また, Fig. 3には α -Man結合レクチンのaffinity columnからの溶出プロフィールを示す。すなわちcolumnにアプライした後, 非吸着物を0.05MのPBSで流出して除き, 吸着したレクチンをDAPで溶離する。得られたそれぞれのレクチンは, 最終的にはゲル濾過(sephacryl S200)で精製することが出来た。この方法で, 例えば, 100mgの硫酸沈澱画分からの α -Xyl, α -Galおよび α -Man結合レクチンの収量は, それぞれ, 5.5mg, 9.1mgおよび7.8mgであった。

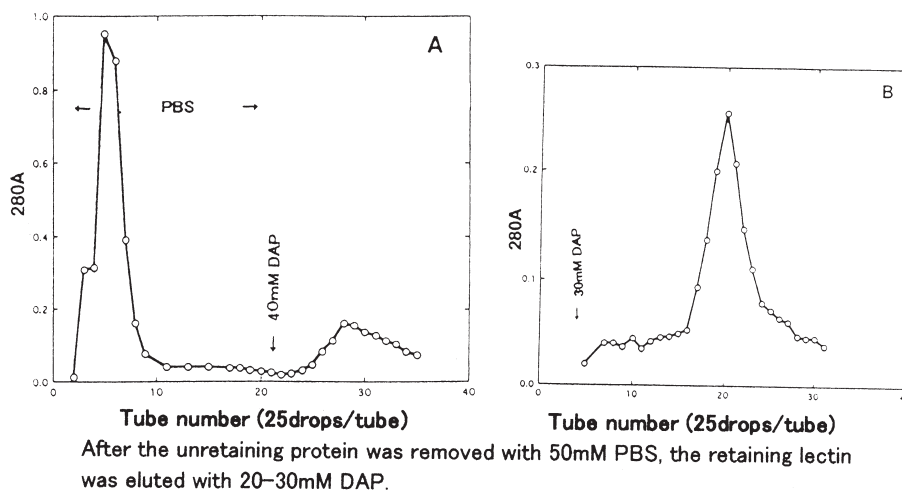


Fig. 1 Elution profiles of (A) α -xylose- and α -galactose-binding lectin from the corresponding affinity column
 A: xylose column, B: melibiose column (each, 1.5 \times 10cm)

註) 分離された澱粉は, ヨード反応では吸収 λ_{max} 550-580nmを示した。メチル化分析により分岐度は25~26である, 一方, 分岐切断酵素, isoamylaseとpullulanaseを作用させて, 生成するオリゴ糖の分布をLC (Dionex)で分析(HPAEC)した結果, mainのunit chainの長さは16~18であった。

精製したこれらのレクチンはFig. 2のようにSDS PAGE上いずれも単一なバンドを示した。

Table 1には精製された α -Xyl-および α -Gal-結合レクチンのアミノ酸分析の結果を示す。これらのレクチンの分子形態は似通っているように見えるが、アミノ酸組成は異なっている。さらに、N末端基からのアミノ酸配列順序の解析から、既知のレクチンと異なった化学構造をもつことを示す。

以下に個々のレクチンの分子形態、糖鎖結合特異性について述べる。

α -Xylose-specific レクチン

本レクチンはNativeおよび還元型(2% β -mercaptoethanolの存在)いずれもSDS PAGEで単一のband (M_r , 26 kDa)を示した。TOF MSによるmolecular massも21,000と算定された(Fig. 3)。ゲルろ過による分子量は、 5×10^4 で約5%の糖を含む糖蛋白である。酸加水分解を行い構成糖のHPAEC(Dionex社, BioLC)による液体クロマトグラフィーおよび, alditol acetate誘導体としてのガスクロマトグラフィー分析からmannoseとN-acetylglucosamine(GlcNAc)が2:3.2のモル比で得られた。さらにN末端からのアミノ酸配列は、G?PVFDQDILA...で、これまでのレ

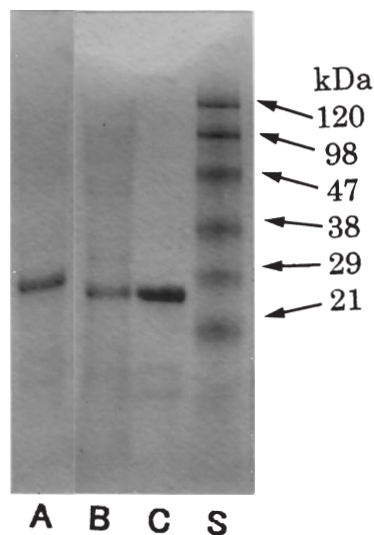


Fig. 2 SDS PAGE of Arrowhead tuber lectin on 15% sulfate-polyacrylamide gel (SPU-15S)
A: xylose lectin,
B: α -galactose lectin,
C: α -galactose lectin (bound on blood B-type column),
S: protein markers

Table 1 Amino Acid Composition of α -Xylose-, α -Galactose- and α -Mannose-Binding Lectins of Arrowhead Tubers

Amino Acid	Xylose-lectins (mol%)	Galactose-lectins (mol%)	Mannose-lectins* (mol%)
Asx	8.0	14.5	13.8
Thr	5.0	4.8	4.3
Ser	23.1	7.6	9.4
Glx	14.8	13.9	13.9
Gly	24.7	10.1	11.5
Ala	8.2	6.2	6.8
Val	3.8	6.6	4.3
Met	0	1.9	1.6
Ile	2.2	3.4	2.2
Leu	3.1	8.3	6.4
Tyr	1.5	3.7	2.2
Phe	1.6	5.4	3.4
His	3.5	3.0	2.4
Lys	0	4.2	6.0
Arg	0	6.5	5.0
Pro	ND	ND	7.4

Hydrolysis Condition: 6N HCl, 110°C, 24hr

*By courtesy of Prof. Y. Konishi, Osaka City U.

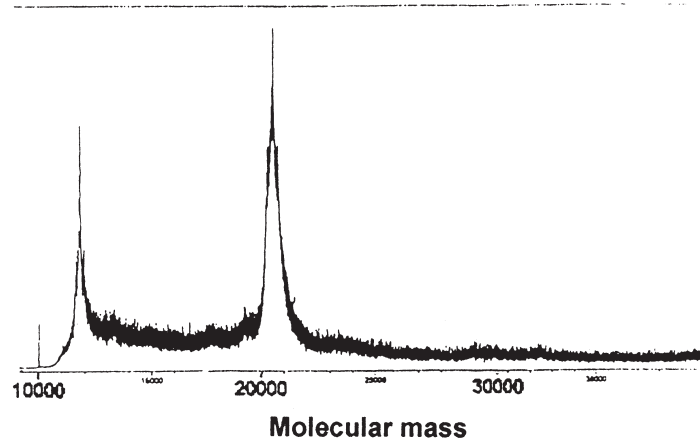


Fig. 3 Mass spectrum of α -Xylose-binding lectin

クチンや酵素蛋白についてのデータと一致するものはなかった。

この新しいレクチンはFig. 4に示すようにタマリンド (*Tamarindus indica*) 種子胚乳などの xyloglucan との沈降反応を示す。

また、この多糖の cellulase 分解により生成する、末端に α -Xyl を含むキシロオリゴ糖⁴⁾とも沈降反応することから xyloglucan の側鎖末端の α -Xyl を認識することは明らかである。また、ジュンサイ (*Brasenia schreberi*) の粘質多糖とも沈降反応を示すことが分かった (Fig. 4)。最近我々はジュンサイ粘質物の、ゲル発現に xyloglucan の存在が関与する事を示唆する結果を得ている (未発表)。一方このレクチンは植物の xyloglucan 以外にも微生物、特に真菌に属する *Crypt. neoformans* の夾膜多糖や *Tremella fuciformis* の細胞外多糖など、側鎖にも末端にも xylose 残基の付いた多糖とも沈降反応を示す。これらの多糖のこれまでの研究から、末端 Xyl は β -結合と示唆される。これが事実ならば、

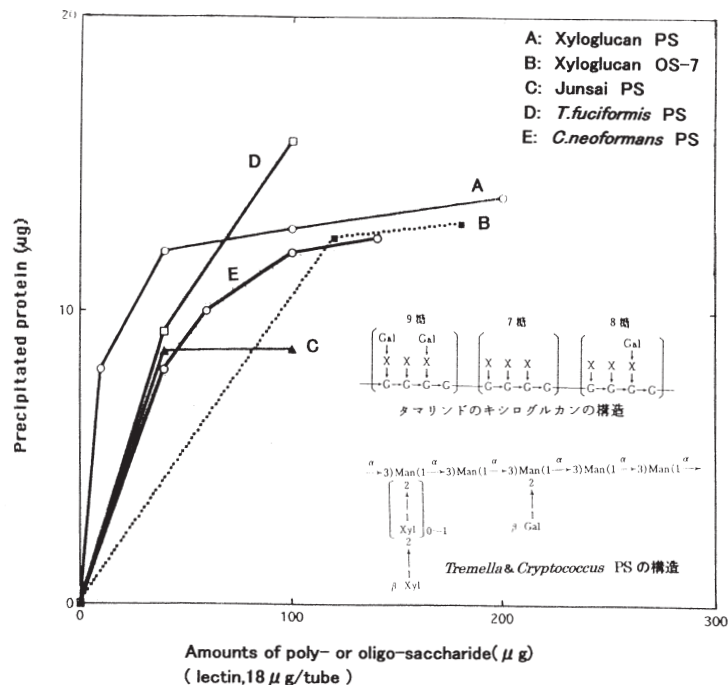


Fig. 4 Quantitative precipitation curves of Arrowhead xylose-lectin with xylose-containing poly- and oligo-saccharides

本研究で用いたXyl-総合レクチンは必ずしも α -型に特異的でなく、 β -Xylにも親和性をもつ可能性が考えられる。尤も、本レクチンは α -キシロオリゴ糖をリガンドとするaffinity columnに吸着されるので本質的には α -Xylに特異的なレクチンである。現在、 α -および β -キシロオリゴ糖による定量沈降反応の阻害などで検討を試みている。なお、これまでに、植物界からXyl-結合レクチンについて報告が無かった理由として、殆どの高等植物の細胞壁にはcelluloseとxyloglucan分子が会合して普遍的に存在することが挙げられよう。これに対して、塊茎や球茎の細胞は澱粉や貯蔵蛋白質 (protein body) など貯蔵物質が主体で細胞壁のxyloglucanが存在しないことも挙げられる。

α -Galactose-specificレクチン

α -Gal結合レクチンもSDS PAGE上で単一のバンドを示した。ゲル濾過による分子量は、 $5.2-5.4 \times 10^4$ で、26kDaのsubunitからなる糖蛋白質性の二量体である。この分子形態は α -Xylレクチンに似ているが、Table 1に示すようにアミノ酸組成はXylレクチンと著しく異なり、糖鎖末端の α -Galに特異的に結合する。糖蛋白として糖鎖を6.2%含むが、mannoseとGlnAcの比は3:2で、糖ペプチドとして存在する。*N*末端からのアミノ酸配列分析は成功しなかった。その理由の一つとして末端近傍に存在する糖鎖による妨害も考えられる。

本レクチンの糖鎖結合特異性は先に榧の種子胚乳から精製した α -Gal結合レクチン³⁾に似ており、グア (*Cyamopsis tetragonolobus*) 種子胚乳の多糖 (グアガム) やタラガムなど植物のgalactomannanの側鎖を形成する α -Galに結合することである。

Fig. 5はタラガムの多糖との定量沈降反応を示したものであり、本レクチンは榧の種子lectinと同様に、 α -Galを末端にもつヒト血液型B物質とも強く反応する。しかし α -GalNAcを末端にもつA型物質との反応は非常に低い。このレクチンは、ヒト血液型B型物質をリガンドとするaffinity columnに吸着し、電気泳動でも α galactose-columnで精製したレクチンと一致するバンドを示した (Fig. 2)。なお、A型物質のcolumnにはわずかの吸着しかみられなかった。

α -Mannose-specificレクチン

α -Xyl-および α -Gal-結合レクチンを順次affinity columnにかけてを分離した後、非吸着蛋白画分を、最終的にmannoseのaffinity columnにアプライすると、 α -mannose結合レクチンが25-30mMのDAPで溶離された (Fig. 6)。

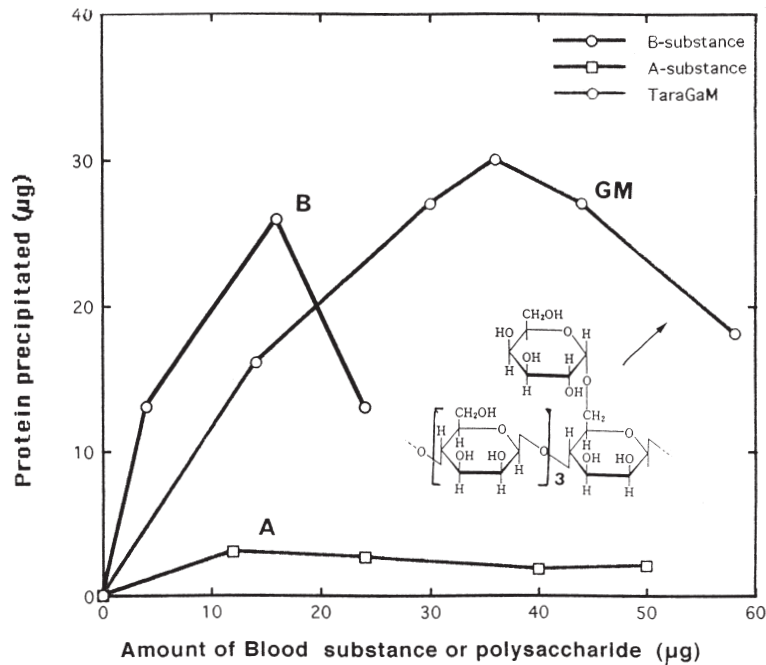
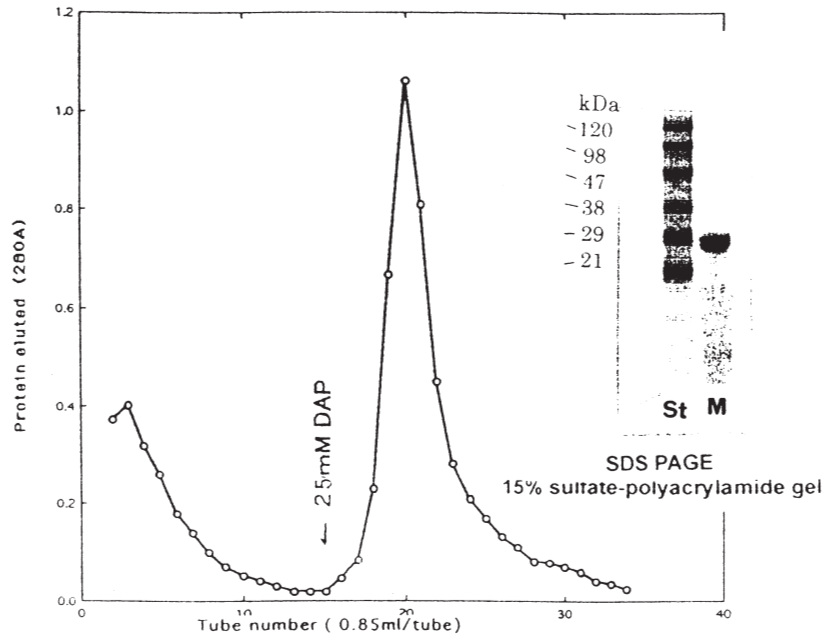


Fig. 5 Quantitative precipitation curves of Arrowhead α -Gal-lectin with Taragum Galman and blood group A and B substance



(The non-retaining proteins on Xyl- and Gal-affinity column was applied)

Fig. 6 Elution profile of α -Man-lectin on mannose-column

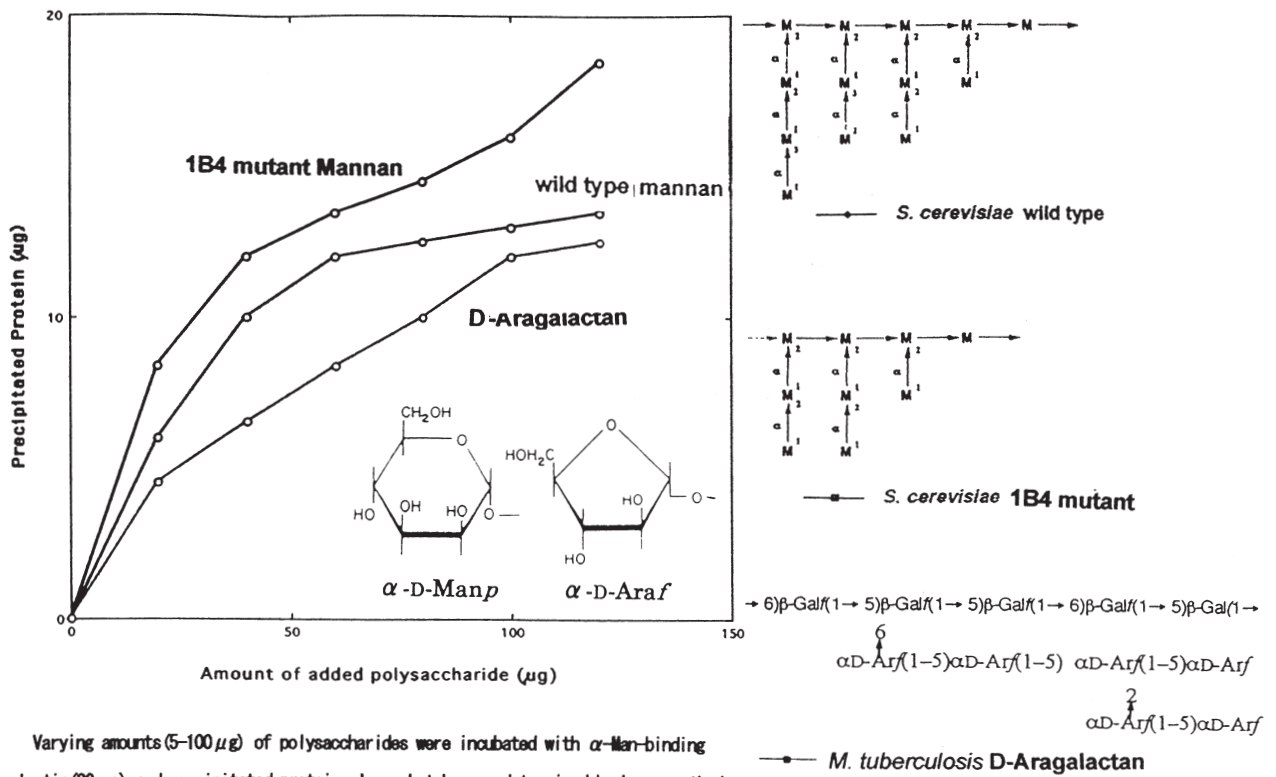
columnの非吸着画分にはなお、 α -amylaseおよび数種の酵素が含まれている。これらについては、ここでは省略する。

精製した α -Man結合レクチンはクワイのその他のレクチンと同様に分子量は $5-5.2 \times 10^4$ 、電気泳動的に単一で (Fig. 6)、26kDaのsubunitから成る二量体で、上の二種のレクチンと同じような大きさの蛋白分子と考えられる。

本レクチンはこれまでの球根の α -Man結合レクチンと同様に糖鎖を含まない蛋白質であった。しかし、我々がこれまでに分離した彼岸花科やクロッカス (*Crocus vernus*) の球根レクチン (CVA) とはアミノ酸組成が異なりさらに注目すべきことは、N末端からのアミノ酸配列 **D(N)QEIYPL?AAQDK?DP...** はスノードロップ (snow drop: *Galanthus nivalis*) のレクチン (GNA) など、これまでの α -Man結合レクチンとの間の相同性が認められず、クワイのレクチンが単子葉植物の球根とは異なったグループに属することを示している。糖鎖の結合特異性に関してはこのレクチンは彼岸花科の球根レクチンと同様、糖鎖末端の α -Manを認識し結合する。

Fig. 7に示したようにクワイのレクチンは、*Saccharomyces servisiae*の野生株のmannanおよび末端に1 \rightarrow 3結合のmannose unitの欠如した変異株 (1B4 mutant) のmannanとも結合する。なお、クロッカスのレクチンは1B4 mutantのmannanとは結合しない¹⁾。結合特異性について、興味あることは、本レクチンが α -mannose残基とOH基の立体配置のよく似た α -d-arabinofuranose残基 (α -d-Araf) にも親和性をもち、そのために、結核菌など、Mycobacteriaの抗原性のarabinogalactanとも結合し得る。

水田など水中に根茎を拡げるクワイに含まれるレクチンの生物機能については、微生物感染などに対する生体防御作用や水土中からの栄養物質の摂取作用なども考えられるが、よく分かっていない。ただ、 α -Man結合レクチンの酵母の凝集作用は極めて強く、細胞凝集は高濃度のmethyl α -mannosideによっても解離され難い。このことはクワイのレクチンが、微生物に対する生体防御作用となる一つの例かも知れない。



文 献

- 1) Misaki, A., Kakuta, M., Meah, Y. and Goldstein, I.J. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 25455-25461.
- 2) 角田万里子, 谷川晶子, 三崎 旭, 微量栄養素 (2001) **18**集 135-140.
- 3) 三崎 旭, 角田万里子, 賀来華江, 農化 **75** 講演要旨集 p.390 (2001).
- 4) Misaki, A., Sone, Y., Shibata, S. and Nagata, A. (1995), *J. Appl. GlycoSci.* **42** 28-37.