

バナナ (*Musa acuminata*) レクチンによる多糖の内部鎖の特異的認識 —グルカン分子中の α -1,3および β -1,6グルコシド結合の認識—

三崎 旭¹⁾, 角田 万里子²⁾, 中田 忍³⁾, I. J. Goldstein⁴⁾

(¹⁾四条畷学園大学*, (²⁾甲南女子大学人間科学部**, (³⁾大阪教育大学***, (⁴⁾ミシガン大学医学部****)

Novel Recognition by Banana (*Musa acuminata*) Lectin of Internal α -1,3 and β -1,6-linked D-Glucosyl Residues

Akira MISAKI¹⁾, Mariko KAKUTA²⁾, Shinobu NAKATA³⁾ and I. J. GOLDSTEIN⁴⁾

¹⁾Shijonawate-gakuen University, ²⁾Konan Women's University,

³⁾ Osaka Kyoiku University and ⁴⁾ University of Michigan Medical School

Summary

A new α -Man/Glc binding lectin, designated BanLec, was isolated from banana (*Musa acuminata*) fruits by Koshte *et al* (1990). The extensive study by Peumans *et al* (2000) indicated that the lectin is present in the pulp of ripe fruits, and related to that from plantain (*Musa* spp). Goldstein and coworkers (2001) found unexpectedly that this lectin binds not only branched α -mannan and glucan but also linear α -glucans, such as nigeran and elsinan by recognizing their internal 1,3-glucosidic linkages. It also appeared that BanLec binds to some 0-6-branched β -glucans. In the present study the lectin was newly isolated by affinity column of α -1,3-glucan or branched *Auricularia* β -glucan.; the lectin was dimer of 14 kDa protein. The binding capability of BanLec was confirmed by use of the lectin-conjugated affinity column. Among various linear α -glucans, nigeran (1,3/1,6) and elsinan (1,3/1,4), but pullulan (1,6/1,4) was not able to bind. Interestingly BanLec was found to recognize *Agaricus* β -1,6-glucan, and other β -1,6-glucans, *e.g.*, pustulan and *Gyrophora* glucan, but not β -1,3-glucans, such as curdlan. Thus, the banana lectin was proved to be a unique lectin, recognizing the specific internal linkages of α - and β -glucans.

レクチンは、植物、動物組織や微生物細胞に至るまで、広く自然界に分布し、多糖や生体組織中の複合糖鎖を特異的に認識結合する。生体細胞の認識、免疫反応を含めてレクチンの生体機能における役割は益々重要視されている。自然界で最初に発見された植物レクチンとしては糖鎖末端の α -Glc/Manを認識するコンカナバリンA (ConA) が代表的なものであるが、単子葉植物の球根には α -Manのみを認識するレクチンがあり、その特異性については詳しい研究がある。Koshteら(1990)は、バナナ (*Musa acuminata*) 果実のhomogenateからマンノ・オリゴ糖と結合するレクチン (BanLec) をSephadex columnを用いて分離した。このレクチンは13kDaの蛋白の二量体でヒトのIgG4に結合する事を報告している¹⁾。

その後Peumansら(2000)²⁾は、このレクチンが完熟したバナナの果実の pulp 中に存在すること、その抽出物を mannose-affinity column に吸着させ、 α -メチル-マンノシドでeluteすることに依って15kDaの蛋白の二量体であるこ

*所在地：大東市北条5-11-10 (〒574-0011)

**所在地：神戸市東灘区森北町6-2-23 (〒658-0001)

***所在地：柏原市旭ヶ丘4-698-1 (〒582-8582)

****所在地：Ann Arbor, MI 48109-0606, USA.

と、結合性は α -Man>Glc,さらに、クローニングによりJacalin種のレクチンと同じような三次元構造をもつ事を明らかにしている。

レクチンの糖鎖認識特異性はConAのように基本的には多糖や複合糖鎖の末端の糖残基を認識する。しかし、最近我々が報告したように、単子葉植物の α -Man結合レクチンのなかには*Crocus*球根の α -Man結合レクチン³⁾, また、*Listeria ovata*の葉から分離したレクチンのなかには α -マンナン糖鎖中の1,3結合を認識するものもある⁴⁾。

Peumansらの研究に続いてGoldsteinら(2001)^{5,6)}はBanLecの糖鎖結合特異性の研究を行ったが、定量沈降反応および結合阻害を調べてこのレクチンが酵母の α -マンナン、グリコーゲンとは結合するが、 α -1,4-,1,6-結合の直鎖のpullulanには結合しないこと、他方、内部に α -1,3-結合を有する直鎖のnigeranやelsinan(α -1,3/1,4)⁷⁾などと結合することを見出した。さらに彼らは、このレクチンが1,6分岐の β -1,3グルカンにも結合する事を見出した⁶⁾。このことは、バナナのレクチンがこれまでレクチンの概念を越えたユニークな糖鎖認識性をもつ可能性を示唆した。

これらの研究のさらなる過程で、我々は、バナナのレクチンが*Agaricus blazei*の子実体に含まれる水抽出性の β -1,6グルカン⁸⁾とも結合する可能性がある事を見出したので、新たにBanLecをリガンドとするaffinity column chromatographyを用いて結合の異なる α -および β -グルカンに対する結合機能を明らかにしようと試みた。

実験方法および結果

BanLecの分離精製 新鮮なバナナ(650 g)を潰し、50 mMのPBS (pH 6.5) 中で、数時間攪拌(25℃)後、澱粉など不溶物をチーズクロスで濾過し、濾液を遠心分離後、上清に0.8飽和の硫酸を加えた。沈殿した蛋白画分を α -1,3グルカン(*Streptococcus* HHT 由来), またはキクラゲから得た不溶性の β -1,6/1,3グルカンのカラムにアプライし、吸着したレクチンを0.2 M α -Me-mannosideまたは、25 mM diaminopropane (DAP, pH 11) でeluteさせ、透析後Sephacryl S-200のカラムで精製した(収量, 25 mg)。精製レクチンは電気泳動的に均一(14 kDaのdimer)であった(Fig. 1)。

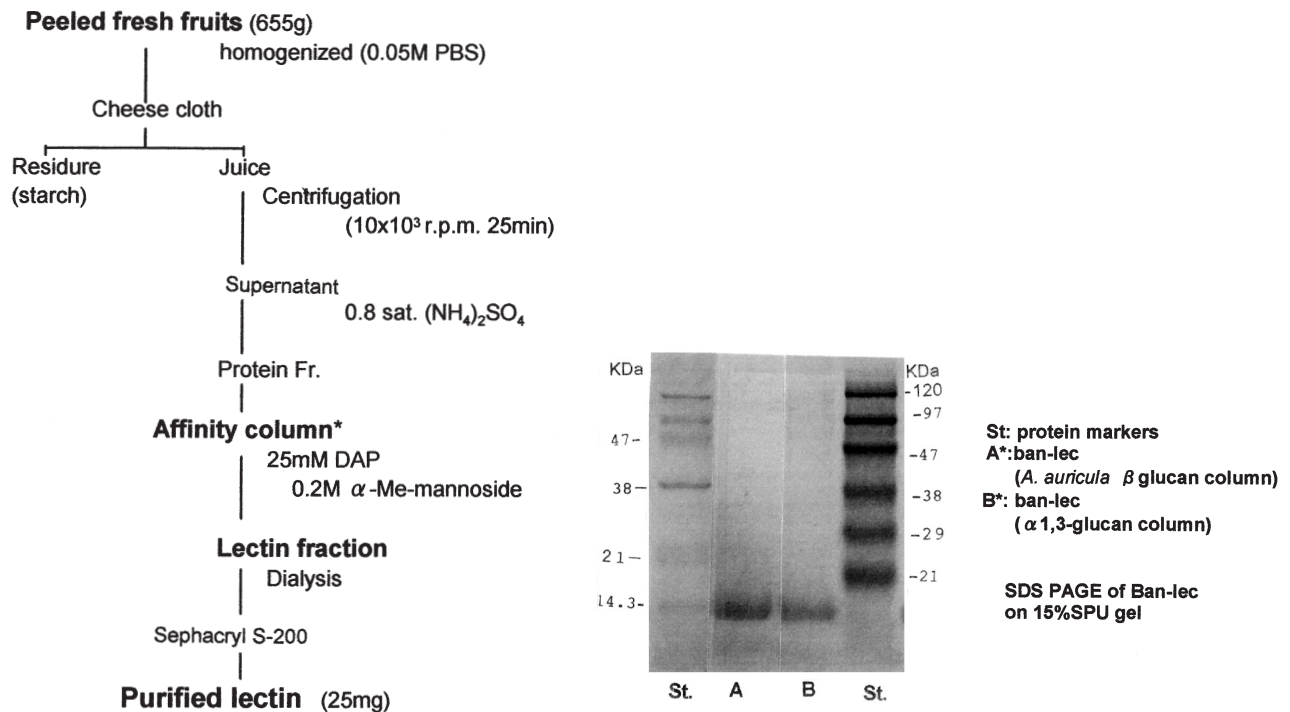


Fig. 1 Fractionation and purification of Banana lectin (BanLec).

定量沈降反応 一般的には1.5 ml容のcentrifuge tube中でレクチン25-30 μg に多糖, またはオリゴ糖 (10-120 μg) を50 mMのPBS (pH 6.8) 150 μl 中で反応 (10 $^{\circ}\text{C}$, 48 hr) させ, 沈降蛋白をmicro Lowry法で定量 (750 nm) した。その結果はFig. 2およびFig. 3に示す如く α -グルカンのなかでは, 我々が見出した *Elsinoe leucospila* の生産する elsinan (1,3/1,4直鎖) とよく反応する。Fig. 4に示すごとく, このグルカンはBanLecと特異的に反応するが, ConAとは本質的に反応しない。この事実は重要であり, さらに興味あることは α -1,6-と1,3の交互結合をもつ1355 dextranともある程度反応するが, α -1,6/1,4-結合のpullulanとは反応しないことである。また, BanLecは糖鎖末端の α -Manおよび α -Glcに特異的で β -結合の末端とは結合しないにも関わらず, ある種の β -結合のグルカン, とくに, β -1,6結合のアガリクスの水溶性グルカンや地衣類の一種イワタケの β -1,6-richのグルカンとよく反応する。 O -6分岐結合の β -1,3グルカンであるschizophyllanとも反応するが, 枝のグルコシル基を還元したschizophyllan polyolとは反応しない。このことは, β -1,3グルカンを認識出来ないことを示す。BanLecは β -1,6結合のgentioheptaoseとも反応するので, このレクチンは β -1,6結合の分枝に特異性をもつというよりむしろ, β -1,6の結合鎖を認識すると考えられる。この点については更に明確にしたい。

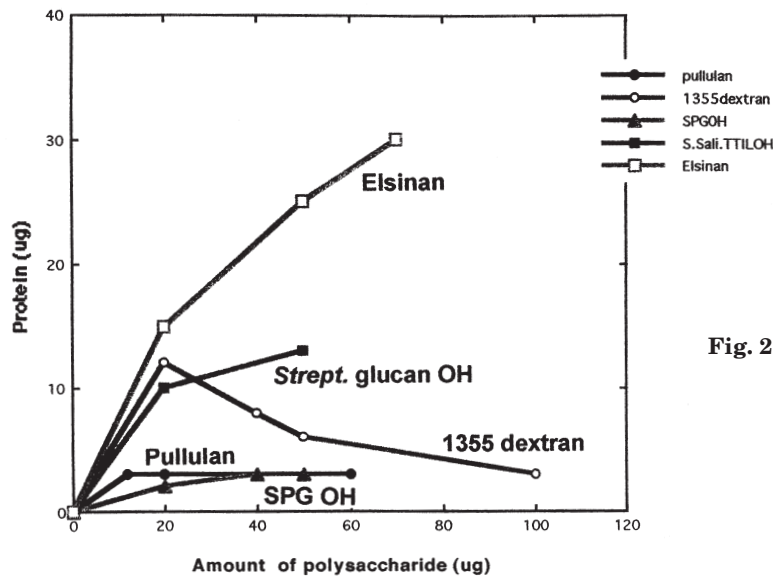


Fig. 2 Quantitative precipitation curves of BanLec with some α -glucans (elsinan, 1355 dextran, pullulan) and glucan polyol of *Streptococcus salivarius* branched 1,3-glucan and schizophyllan polyol.

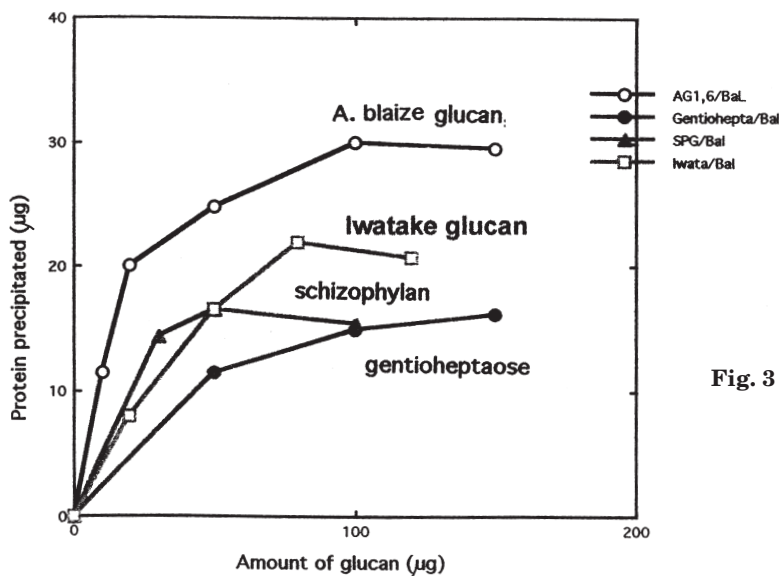


Fig. 3 Quantitative precipitation curves of BanLec with β -glucans of *Agaricus blazei*, Iwatake, schizophyllan and gentioheptaose.

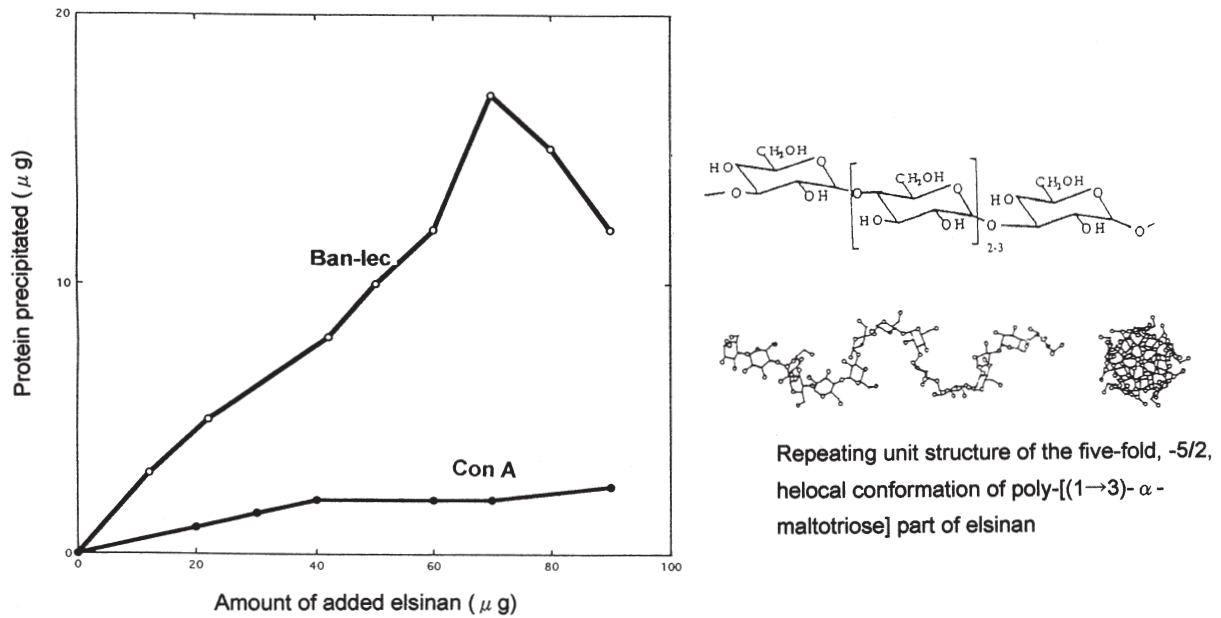


Fig. 4 Quantitative precipitation curves of elsinan with BanLec and ConA (Note; ref. 5).

BanLecの affinity columnの作成と多糖の chromatography *Crocus* 球根の α -Man 結合レクチンに準じ, BanLec (15 mg) を AF-tresyl Toyopearl (Toso Co: 650 mg) と 100 mM PBS (pH 8.0) 中で 25°C, 6 hr, 次いで 10°C, 4 hr, 緩やかな攪拌によって結合させる。未反応の tresyl group を 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で blocking した。これにより約 65% のレクチンが conjugate されていた。この BanLec の lectin conjugate を小カラムに充填 (1 × 6 cm) したものを affinity column とした。このカラムによる多糖の分離としては酵母マンナンその他, 構造の明確な α -および β -グルカンまたはその混合物 (0.5-1 mg) を PBS に溶かして, カラムにアプライし, 最初は PBS で非吸着画分を流し出した後, 20-25 mM の DAP で retain した多糖を elute させる。流出液は通常 0.5-0.75 ml ずつ分取し, 糖量はフェノール硫酸試薬で比色定量 (490 nm) した。

Fig. 5 にはこれら多糖の affinity chromatography による分離結果の例を示した。BanLec は糖鎖末端の α -Man に特異的で, そのため酵母の分岐マンナンは BanLec column に retain する。これは affinity column の有効性を示す。

このレクチンは分岐構造の α -グルカンである glycogen と結合するが, α -1,6/1,4-結合の pullulan は retain 出来ない。これとは対照的に内部に 1,3 結合をもつ elsinan は強く retain した。このレクチンは α -1,3 結合の nigeran column に吸着する事実と符合する。 β -結合のグルカンのうち 6 位に分岐をもつ 1,3 結合の schizophyllan は弱く吸着する。

これに反して *Agaricus* の子実体グルカンのうち水抽出性の精製 β -1,6 結合の, 本質的に非分岐グルカン (ConA column の非吸着画分) は強く retain される。なお直鎖の β -1,3 グルカンである curdlan (不溶性) には吸着されなかった (Fig. 6)。

このことは BanLec が α -1,3-グルカンには特異的に結合するが, β -1,3-グルカンには結合出来ないという結果を示す。

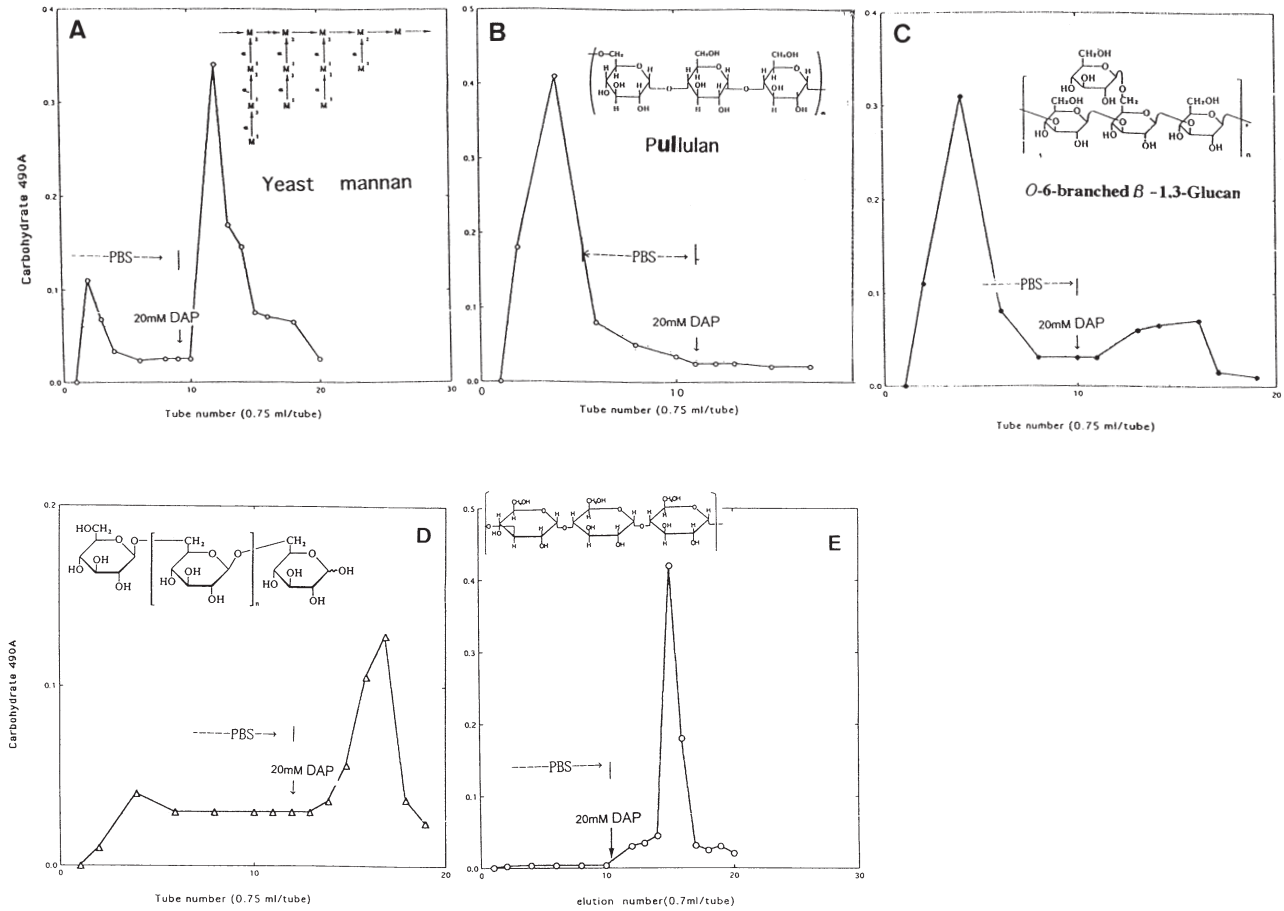


Fig. 5 Elution profiles of some polysaccharides from BanLec affinity column
A: yeast mannan, B: pullulan, C: schizophyllan, D: *Agaricus* β -1,6-glucan E: elsinan
Each 0.5-1 mg of glycan was applied on BanLec column (1 x 5.5 cm); after not-retaining fraction was removed with PBS, then the retaining glycan was eluted with 25 mM DAP.

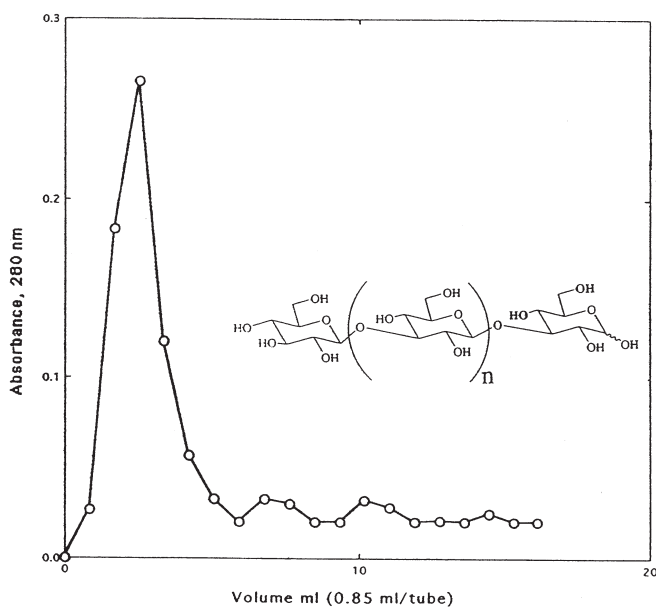


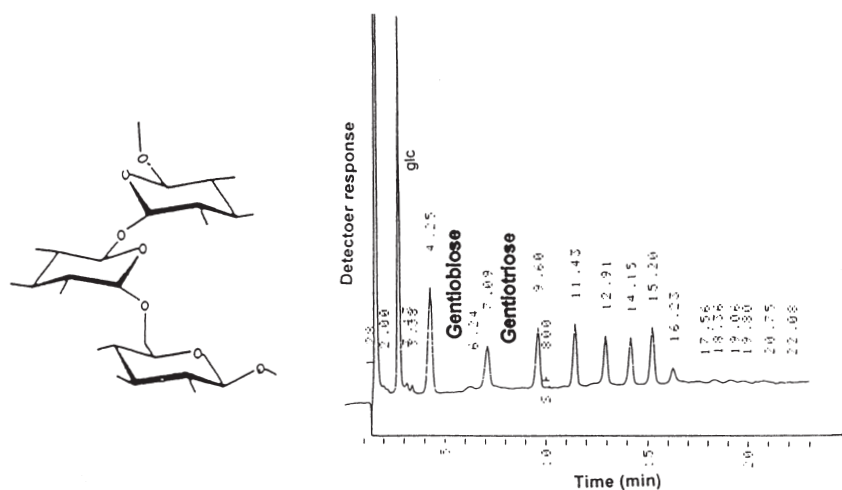
Fig. 6 Elution profile of BanLec (1.5 mg) from curdlan column (0.6 x 5 cm)
Most lectin was eluted with 50 mM PBS, and minor fraction was eluted with 100 mM α -Me-mannoside.

考 察

19世紀の終わりに豆科植物の種子中から発見されたヒト赤血球の凝集素(フィトヘマグルチニン)とよばれたレクチンは、その後、植物、動物および微生物から新しい特異性をもつものが発掘され、現在、糖鎖科学・工学の分野で重要な情報および機能解析の手段となっている。植物レクチンのうち、 α -Glc/Manを特異的に認識するものとしてはConAで代表されるように、主として豆科の種子から分離されてきた。しかし、KoshteおよびPeumansら(1990, 2000)はバナナ(*Musa acuminata*)の果実中にも α -Manに特異的で、かつ、強いT-細胞の刺激活性をもつ分子量約30万のレクチン(BanLec)を分離精製した。また、このレクチンは完熟したバナナ果実のバルブ中に存在し、mannose columnやSephadex columnによって分離しうることを示唆している。我々はBanLecを不溶性の α -1,3-グルカンやキノコの1,6-分枝をもった β -1,3-グルカンの小カラムに吸着させることに依って、比較的簡単に電気泳動的に均一なレクチン(14 kDaの蛋白の二量体)を得た。

BanLecの糖鎖結合特異性については、当初、これまでのレクチンと同様に多糖の末端糖鎖に限定されるものと考えられていたが、種々の多糖、オリゴ糖と定量沈降反応で調べてみると、ある種の直鎖型のグルカン、特に、内部に α -1,3-結合の糖残基をもつnigeranやelsinan^{7,9)}(Fig. 7)と強く反応した。このことはBanLecが*Streptococcus*の α -1,3-グルカンのカラムに吸着する事実⁴⁾と一致する。しかし、 α -1,4-,1,6-結合の直鎖のpullulanには結合しないことが分かった。さらに、本レクチンは β -1,6グルコシド結合のオリゴ糖およびそのポリマーを特異的に認識する事実が定量沈降反応の結果から明らかにされた(Fig. 2, Fig. 3)。一方、schizophyllanなど0-6分岐をもった β -1,3-グルカンもある程度BanLecと反応するが、分枝のGlcを修飾したschizophyllan-polyolでは反応しないこと(Fig. 2, 3)、さらに、直鎖の β -1,3グルカンであるcurdlanのカラムには吸着しないことから、分岐 β -1,3グルカンの結合は分枝を形成する β -1,6グルコシル基に依ると考えられる。

本研究における我々の目的の一つは、BanLecをリガンドとするaffinity columnによって*Agaricus blazei*の子実体の水抽出画分に含まれる β -1,6グルカン⁸⁾を単離し得るかという事であった。このキノコに含まれる主要な多糖成分は水不溶、アルカリ可溶の1,6分岐の β -グルカンであるが、水抽出物からグリコーゲンをConAカラムに吸着させて除くと抗腫瘍活性を示す、本質的に直鎖構造の β -1,6グルカン(分子量:20-25万)が得られた。その詳細な構造は化学的解析、 C^{13} n.m.r., さらに β -1,6-glucanhydrolaseによる一連のゲンチオ・オリゴ糖の生成から確認された⁸⁾(Fig. 8)。このグルカンの他、地衣類のpustulanおよびイワタケ(*Gyrophora esculenta* Miyoshi)¹⁰⁾に含まれる1,6-richのグルカン



HPAEC profile of Con-A column unabsorbed glucan after hydrolysis by β 1,6-glucanase

Fig. 7 *Agaricus blazei* β -1,6-glucan and gentio-oligomers formed by β -1,6-glucanase action.

もBanLecによって認識されたのは最初の例である。なお、定量沈降反応でも7糖 (gentioheptaose) が結合する事 (Fig. 2)からも支持される。

今後の課題としてBanLecが認識できる最少限の1,6-鎖を確定すべきと考える。上述のように本レクチンは、非還元末端が関与しない特定の内部結合の直鎖のグルカンを認識しうる、これまでのレクチンの概念を越えたユニークな糖鎖認識性をもつ可能性を示唆している。これは恐らく、特定の内部のグルコシル残基で規定されるグルカンのコンホメーションが関与するとも考えられる。将来BanLecのような糖鎖の特定の内部結合を認識する新しいレクチンが開発され、種々のグリカンの分画精製の有用なプローブとして利用される事が期待される。

まとめ

1. Banana fruitsのレクチンは末端の α -Man/Glcに特異的であると想定されていたが、elsinanやnigeranなどの糖鎖内部の α -1,3結合をも認識することが分かったので、特定の構造の多糖のカラムを用いて精製した。(dimeric 14 kDa)
2. 結合の異なる種々の α -および β -グルカンとの結合性を定量沈降反応、およびBanLecをリガンドとするカラムにおけるaffinityから比較した。その結果、直鎖の α -グルカンとして、1,3結合を含むelsinanやnigeranと強く結合するが、 α -1,6結合のpullulanは結合しなかった。
3. β -グルカンでは、 β -1,6のpustulanと結合するが、 β -1,3のcurdianとは結合しない。しかしschizophyllanなど0-6分岐の1,3グルカンとはある程度の結合性を示した。
4. アガリクス (*Agaricus blazei*) の熱水抽出画分からCon A非結合性のグルカンを分離精製し、これが直鎖に近い構造の β -1,6グルカンであることを化学的、酵素分解およびBanLecのaffinity column chromatographyで確かめた。
5. 以上の結果から、このレクチンは、特定 (α or β) の糖鎖末端基に特異的であるという従来の概念を越えて多糖鎖の特定の内部結合をも認識しうることを示した最初の例であろう。

参考文献

- 1) L. Koshte, W. Duk, M. E. Stelt, R. C. Aalberse, *Biochemical J.* 272, 721-726 (1990).
- 2) W. J. Peumans, W. Zhang, A. Barre, C. H. Astoul, P. J. Balint-Kuirti, P. P. Rouge, *et. al, Planta.* 211, 546-554 (2000).
- 3) A. Misaki, M. Kakuta, Y. Meahs, I. J. Goldstein, *J. Biol. Chem.* 272 25455-25461 (1997).
- 4) K. Saito, K. Komae, M. Kakuta, E. J. M. Van Damme, W. J. Peumans, I. J. Goldstein, A. Misaki, *Eur. Biochem. J.* 217, 677-681 (1993).
- 5) H. Mo, H. Winter, E. C. Van Damme, W. Peumans, A. Misaki, I. J. Goldstein, *Eur. J. Biochem.* 268, 2609-261 (2001).
- 6) I. J. Goldstein, H. C. Winter, H. Mo, A. Misaki, E. J. M. Van Damme, W. J. Peumans, *Eur. J. Biochem.* 268, 2616-2619 (2001).
- 7) A. Misaki, Y. Tsumuraya, S. Takaya, *Agric. Biol. Chem.* 42. 491 (1978).
- 8) 三崎 旭, 宮部真司, 角田万里子『微量栄養素研究』第20集 39-47 (2003).
- 9) K. Ogawa, T. Yui, K. Okamura, A. Misaki, *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 1338-1340 (1993).
- 10) Y. Sone, M. Johmura, A. Misaki, *Biosci., Biotech. Biochem.*, 60, 213-215 (1996).