

## キクイモカルス由来レクチンによる酵母の凝集

中川良二・佐藤幸恵\*・八十川大輔・池田隆幸・長島浩二

Agglutination of Yeast Using Lectin from Callused *Helianthus tuberosus*

Ryoji NAKAGAWA, Yukie SATO, Daisuke YASOKAWA, Takayuki IKEDA and Koji NAGASHIMA

In a previous study, the authors identified that lectin purified from *Helianthus tuberosus* belongs to a group of lectins referred to as mannose/glucose-binding lectins and that this lectin has a high affinity for  $\alpha$ -linked manno-oligosaccharides. This study further reveals that HTA exhibits an even higher affinity for mannan from *S. cerevisiae* than  $\alpha$ -linked manno-oligosaccharides. It was also demonstrated that HTA agglutinates yeast cells possessing mannan on their surface. The optimum concentration of HTA for agglutinating *S. cerevisiae* was shown to be about 1.0 mg/ml. Twenty-two strains of yeast were agglutinated at various levels of HTA. The agglutinating activity induced by HTA remained nearly constant in a pH range of 6.0 to 8.5, but decreased drastically as pH was reduced from 6.0 to 5.0.

レクチンは細胞を凝集させたり、多糖類や糖蛋白質を沈降させるという特性をもった蛋白質の総称で、植物、動物、微生物など広く生物界に分布している。最近、細胞間相互作用や分化などにおける糖鎖の重要性が明らかになるにつれて、糖を特異的に認識するレクチンの価値は高まっている<sup>1)</sup>。

レクチンの利用は医学、生物学の分野を中心に、多くの分野で検討されている。例えば、病理臨床試験における主要な分離細菌とレクチンとの特異的な凝集は、細菌そのものを同定することになり、高価で、時間がかかる培養や血清学の検査を省くことができる。この方法で、炭疽菌はグイズ凝集素やカタツムリのレクチンを用いて容易に確認できる<sup>2)</sup>。また、タチナタマメから精製されたレクチンであるコンカナバリンAはイーストマンナンに結合し、*Saccharomyces cerevisiae* や *Candida rugosa* などの酵母を凝集する<sup>2,3)</sup>。この性質を利用したレクチンの食品加工分野への応用が研究されている<sup>4)</sup>。

キクイモ (学名: *Helianthus tuberosus* L.) カルスのレクチン (以下、HTA と略す) はコンカナバリンAと同様にマンノース/グルコース特異的レクチンであるが、各種の糖に対する親和性など諸性質は異なっている<sup>5)</sup>。

ここでは、酵母表層の糖鎖に結合して酵母を凝集させ、酵母の分離、検出への応用が期待できる HTA の酵母凝集能とその条件等について報告する。

## 実験方法

## 1. キクイモカルスの培養

キクイモの塊茎から誘導されたカルスは 1.0 mg/ml ベンジルアミノプリン (以下、BA と略す)、1.0 mg/ml ナフタレン酢酸 (以下、NAA と略す) を含む Murashige-Skoog の寒天培地<sup>6)</sup>で、26°C、40 日間、暗所で培養した (Fig. 1)。

## 2. キクイモカルスのレクチンの精製

キクイモのカルスは 2% イソアスコルビン酸を含む蒸留水中で、ポリトロンによって破砕した。粗抽出液を遠心分離により回収し、硫酸分画 (45% 飽和) 後、DEAE イオン交換クロマトグラフィー、マルトースアガロースアフィニティークロマトグラフィーの手順で精製した<sup>5)</sup>。

## 3. 糖および糖タンパク質による HTA 活性の阻害

マイクロタイタープレートに調製した各種の糖および糖タンパク質の 1/2 希釈系列 (25  $\mu$ l) を入れ、血球凝集に必要な最高希釈濃度の上記精製レクチン 25  $\mu$ l とトリ

\* 酪農学園大学食品科学科応用微生物学講座 (〒069 江別市文京台緑町 582-1)

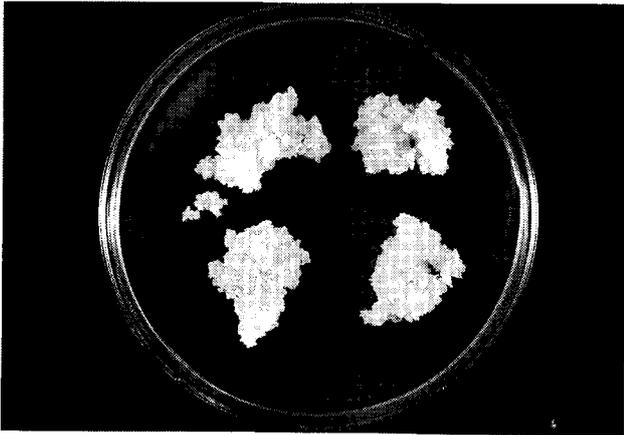


Fig. 1 Calluses of *H. tuberosus*  
Calluses cultured on an agar-solidified Murashige-Skoog salts medium containing BA and NAA concentrations of 1mg/ml for 40 days in darkness at 26°C

ブシン処理したウサギ赤血球液 25  $\mu$ l を加えてよく混和し、室温で1時間放置した後、凝集を判定した。用いた溶液は全てリン酸緩衝食塩水（以下、PBS と略す）である。

#### 4. 酵母の凝集

各種の酵母は YPD 液体培地で培養(25°C, 2日間)後、PBS で4回遠心洗浄(2,700 rpm, 7分, 4°C)した菌ペレットに、 $1 \times 10^9$ 個/ml になるように PBS を加え、酵母懸濁液を調製した。マイクロタイタープレートに調製した HTA 溶液(50  $\mu$ l, PBS 中)と酵母懸濁液 25  $\mu$ l を加えよく混和し、室温で1時間放置後、検鏡により凝集反応を調べた。酵母凝集の活性単位( $U_V$ )は1/2希釈系列で、凝集が陽性であると判定された最高希釈度で表わされた。

各種 pH での酵母の凝集は以下の様にして行った。各 pH に調整した PBS に懸濁した酵母液 25  $\mu$ l ( $1 \times 10^9$ 個/ml の *Saccharomyces cerevisiae* K-6) に、最終濃度 4.5 mg/ml, 1.1 mg/ml, 0.07 mg/ml, 0.012 mg/ml になるように HTA 25  $\mu$ l を添加し、室温で30分間放置後、トーマの計算盤を用いて、非凝集酵母数を検鏡により計測した。全酵母数から非凝集酵母数を差し引いたものを凝集酵母数とし、全酵母数に対する割合として表示した。

#### 5. 酵母の増殖

YPD 液体培地 200 ml に菌を接種し、HTA(最終濃度 0.15 mg/ml)を添加し、150 rpm, 30°C, 46時間、振盪培養した。2時間ごとにサンプルを取り、660 nm の吸光度から酵母増殖を測定した。

## 結果および考察

### 1. 糖および糖タンパク質によるレクチン活性の阻害

HTA はこれまでの研究から、マンノース/グルコースに特異性を示すレクチンであることが明らかにされ、特にマンノオリゴ糖に強い親和性を示した<sup>5)</sup>。本実験では末端にシアル酸が結合した Asn 型糖鎖(マンノースコア-の外部にシアル酸, ガラクトース, N-アセチルガラクトサミンが結合している)を持つ糖タンパク質のフェチュイン, シアル酸を除いたアシアロフェチュイン(末端はガラクトース又はN-アセチルグルコサミン)および枝分かれ構造を持つ *Saccharomyces cerevisiae* 由来のマンナンによるレクチン活性の阻害効果について試験した。対照として、グルコース, マンノースおよびマンノオリゴ糖を用いた。(Fig. 2)。本レクチンはシアル酸およびガラクトースに 12 mg/ml 濃度で阻害されなかったが、フェチュインおよびアシアロフェチュインはそれぞれ 6.25 mg/ml, 1.56 mg/ml まで活性阻害された。この結果はレクチンが末端の糖のみを認識していないことを示唆している。一方、マンナンは 0.0018 mg/ml 濃度まで活性を阻害し、フェチュインおよびアシアロフェチュインのおよそ 6,000 及び 1,000 倍、マンノースの約 300 倍の親和性を示した。また、これまでに調べられたオリゴ

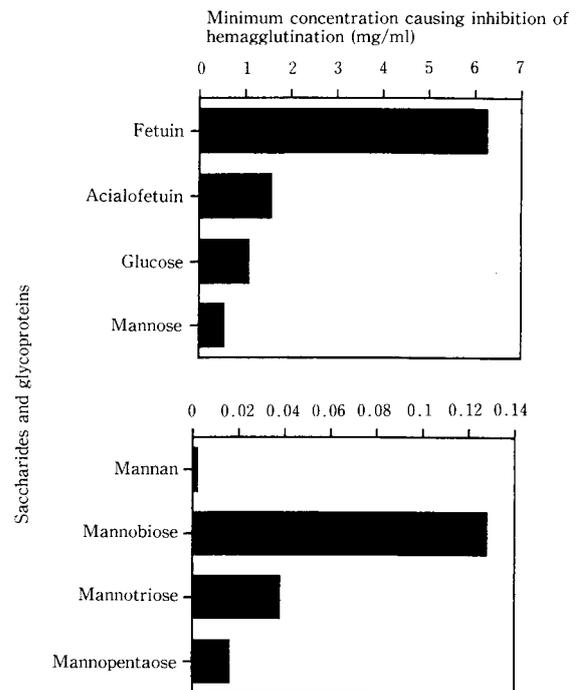
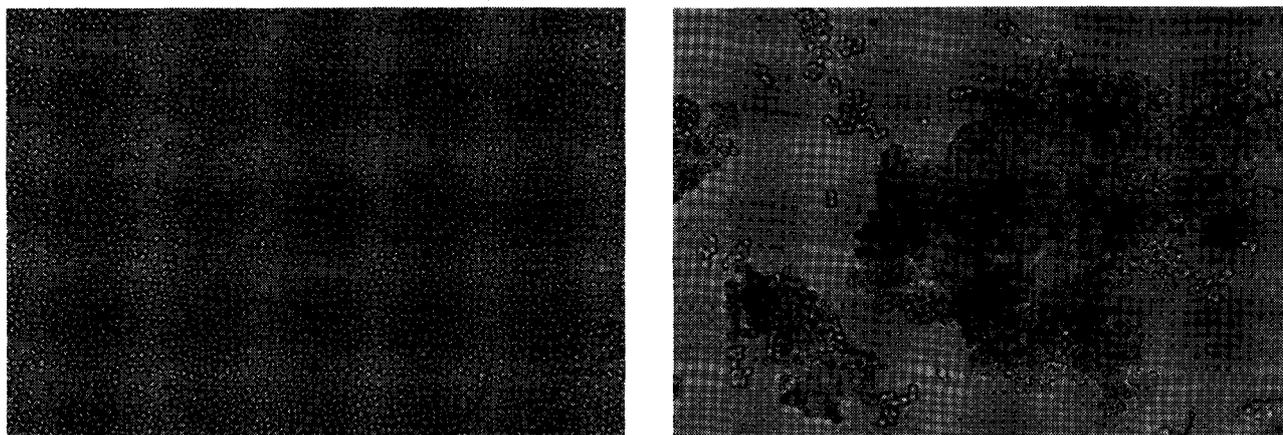


Fig. 2 Inhibition of hemagglutinating activity by saccharides and glycoproteins



**Fig.3 Agglutination of *S. cerevisiae* by HTA**

*S. cerevisiae* K-6 ( $1 \times 10^9$ /ml) cells were incubated in PBS without HTA (left) and with HTA (right) in a concentration of 0.2mg/ml. Photographed through a microscope at  $\times 300$

**Table 1 Cell agglutination of various species of yeast by HTA**

Strain	Activity ( $\text{Log}_2 U_V$ )
<i>Candida boidinii</i> IFO 10574	5
<i>Candida</i> sp. 1-B	3
<i>Candida</i> sp. 25A	6
<i>Hansenula polymorpha</i> DL-1	8
<i>Kluyveromyces fragilis</i> AHU 3174	4
<i>Kluyveromyces marxionus</i> AHU 4381	8
<i>Kluyveromyces marxionus</i> var <i>lactice</i> AHU 3967	5
<i>Saccharomyces bayanus</i> AHU 3554	6
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> AHU 3181	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AHU 3051	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AHU 3532	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AHU 3915	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5203	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BA-1	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> K-6	4
<i>Saccharomyces corevisiae</i> K-13	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> K-9	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> K-901	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Var. <i>ellipsoideus</i> AHU 3046	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Var. <i>ellipsoideus</i> K-1	3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Var. <i>ellipsoideus</i> K-3	3
<i>Shizosaccharomyces pombe</i> AHU 3176	*
<i>Shizosaccharomyces pombe</i> AHU 3179	*
<i>Zygosaccharomyces roxii</i> IFO 1876	7

\*It was difficult to assess induced agglutination activity due to presence of natural agglutination.

One unit (1  $U_V$ ) of agglutination activity was defined as the lowest concentration of lectin that gave visible agglutination.

糖の中で最も高い親和性を示したマンノペンタオースよりも約10倍強い親和性を示した。このことはHTAが*Saccharomyces cerevisiae*の表層糖鎖に結合し、酵母を凝集できることを強く示唆している。

## 2. HTAによる酵母の凝集

上記の結果に基づいて、HTAによる酵母の凝集反応を調べた。Fig. 3は*Saccharomyces cerevisiae* K-6のHTAによる凝集の結果を顕微鏡撮影したものである。酵母液にHTAを添加すると、酵母は凝集し、細胞塊を形成した(Fig. 3右図)。これにマンノースを添加すると、細胞は遊離しはじめ、凝集活性は阻害された。レクチンを添加しなかった場合、酵母は単一細胞として存在した(Fig. 3左図)。

Table 1はHTAによる24株の酵母の凝集反応の結果を示している。*Shizosaccharomyces pombe*の2種を除き、試験した全ての酵母で凝集が確認された。特に、*Hansenula polymorpha* DL-1および*Kluyveromyces marxianus* AHU 4381が最も強く凝集された。*Shizosaccharomyces pombe*はレクチンの添加なしに細胞凝集した。これは細胞表層がマンノース基以外の粘質多糖類で覆われているためであろうと考えられている<sup>7)</sup>。*Saccharomyces cerevisiae*など酵母の細胞表層にはマンノース鎖が存在し、マンノース糖鎖は非常に多様化している<sup>8)</sup>。酵母の種類でHTAの凝集活性に差異があったのは、この糖鎖構造の違いのためであろうと推察される。

## 3. pHおよびレクチン濃度の酵母凝集に及ぼす影響

レクチン活性は、pH、温度、レクチン濃度および細胞密度などの影響を受ける。ここではpHおよびレクチン濃度(最終濃度; 4.5 mg/ml, 1.1 mg/ml, 0.07 mg/ml, 0.012 mg/mlの4条件)のHTAによる酵母(*Saccharomyces cerevisiae* K-6)凝集に及ぼす影響を調べた(Fig. 4)。HTAの酵母凝集活性はレクチン濃度に関わらず、pH6以上で一定の活性を維持していたが、pH6以下では活性が減少し、pH5ではほぼ活性を失った。以前の報告<sup>9)</sup>で我々はHTAの赤血球凝集活性がpH7以下で減少し、pH5ではほぼ活性は消失することを示し、これがHTAのサブユニットへの解離によるものであることを明らかにした。従って、今回の場合も同様の理由であると考えられる。酵母凝集の至適レクチン濃度は1.1 mg/mlで、4.5 mg/mlでは逆に凝集率は減少した。この結果はレクチンの凝集活性にはレクチン濃度が重要な要因であることを示している。Stratfordら<sup>9)</sup>はコンカナバリンAというレクチンの*Saccharomyces cerevisiae*に対するpHおよびレクチン濃度による影響を調べ、細胞密度 $3 \times$

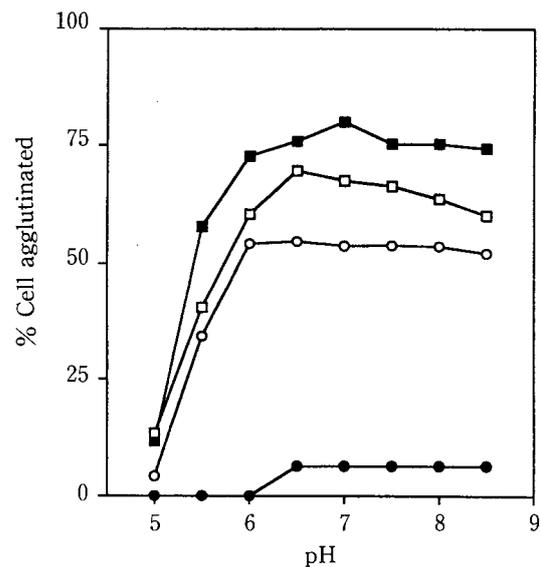


Fig. 4 Effect of HTA concentrations and pH on agglutination of *S. cerevisiae*

HTA was added to a suspension of *S. cerevisiae* K-6 (about  $1 \times 10^9$  cells/ml) under the indicated pH to a final concentration of 4.5 mg/ml (□), 1.1 mg/ml (■), 0.07 mg/ml (○) and 0.012 mg/ml (●). After incubating for 30 min at room temperature, the number of unagglutinated cells were measured microscopically. The percentage of cells agglutinated was calculated from the original cell concentration in suspension.

$10^7$ 個/ml, pH7, レクチン濃度 0.3 mg/ml で最も凝集活性が高いことを明らかにしている。レクチンが多すぎると凝集活性が阻害されるのは、レクチンが細胞表層の有効なレセプターのほとんどを占有するために二価のレクチンによる細胞間結合を妨げたためであろうと考察している。

## 4. レクチンの酵母増殖に及ぼす影響

レクチンが酵母を凝集することによって、酵母の増殖に何らかの影響を及ぼす可能性がある。そこで、*Kluyveromyces fragilis* AHU 3174 を用いて、HTAの存在下での酵母の増殖を測定した。Fig. 5は660 nm吸光度による生育曲線を示している。レクチンの添加、無添加で、その増殖曲線にほとんど差違はなく、レクチンの酵母増殖に対する影響は認められなかった。しかしながら、培地のpHがレクチンの凝集活性を示す範囲よりも低かったことや振盪培養時の回転数が速く、レクチンと酵母が結合できなかった可能性があるなど、いくつかの問題点があり、今後さらに検討する必要がある。

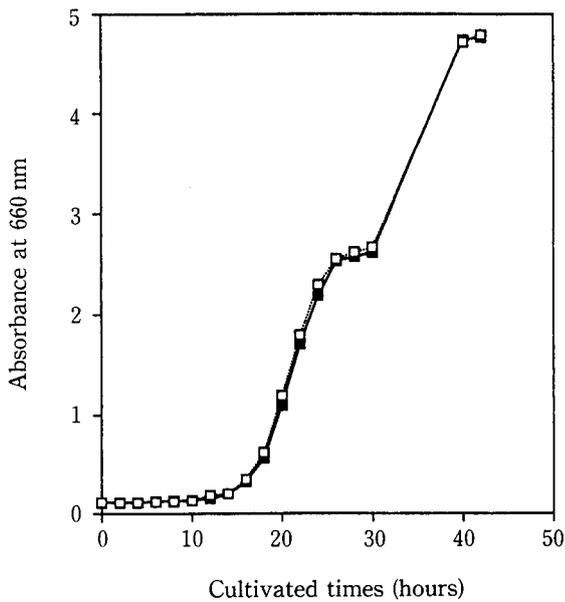


Fig. 5 Effect of HTA on the growth of *Kluyveromyces fragilis* AHU 3174  
 □, without HTA; ■, with HTA (0.15mg/ml).

### 要 約

キクイモのレクチンである HTA はマンノース/グルコースに特異性を持ち、マンノオリゴ糖に強い親和性を示すレクチンである。本実験で、*Saccharomyces cerevisiae* のマンナンがマンノオリゴ糖以上に強い親和性を示すことが明らかになった。

酵母に HTA を添加すると、酵母は凝集し、細胞塊を

形成することが顕微鏡観察の結果から明らかとなった。24 株の各種の酵母の凝集反応を調べたところ、菌体のみでも凝集する *Shizosaccharomyces pombe* の 2 株を除き、全ての酵母の凝集が確認された。

HTA による酵母の凝集は pH およびレクチン濃度に強く影響された。pH 6 以下で凝集活性は減少し、pH 5 でほぼ活性を失った。凝集活性におけるレクチンの至適濃度は 1.0 mg/ml 前後であった。

### 文 献

1. 渋谷直人：食品工業，40，11（1989）
2. ナタン・シャロン，ハリナ・リス：レクチン（学会出版センター，東京），p.125（1990）
3. I. J. GOLDSTEIN, C. E. HOLLERMAN, J. M. MERRICK; *Biochem. Biophys. Acta.*, **97**, 16（1965）.
4. R. A. PATCHETT, A. K. KELLY and R. G. KROLL; *J. Appl. Bacteriol.*, **71**, 277（1991）.
5. NAKAGAWA, R., YASOKAWA, D., IKEDA, T. and NAGASHIMA, K.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 259（1996）.
6. T. MURASHIGE and T. F. SKOOG; *Physiol. Plant.*, **15**, 473（1962）.
7. J. H. DUFFUS, C. LEVI and D. J. MANNERS; *Adv. Microb. Physiol.*, **23**, 151（1982）.
8. 糖鎖工学研究協議会：糖鎖工学（産業調査社，東京），p 384（1992）.
9. M. STRATFORD and C. J. BOND; *Biotech. and Bioeng.*, **40**, 835（1992）.