キクイモ塊茎由来レクチンの

清酒酵母に対する凝集特性

中川良二・八十川大輔・奥村幸広・長島浩二

(北海道立食品加工研究センター)

平成12年1月5日受理

Agglutination of Sake Yeast by Lectin
from *Helianthus tuberosus* TuberRyoji NAKAGAWA, Daisuke YASOKAWA,
Yukihiro OKUMURA, and Koji NAGASHIMA
(Hokkaido Food Processing Research Center,
589-4, Bunkyo-dai Midori-Machi, Ebetsu,
Hokkaido 069-0836, Japan)

Lectin isolated from the *Helianthus tuberosus* tuber (tHTA) is a mannose/glucose-binding lectin that has a very similar saccharide binding specificity to lectin isolated from callus (cHTA). In this study, we showed that tHTA had a very similar yeast agglutinating activity to cHTA at a suitable pH and yeast density. However, we found that tHTA could agglutinate all the sake yeast strains tested and its ability was not effected by trypsin-treatment of yeast, on the other hand cHTA could agglutinate some sake yeast strains that had been treated with trypsin that were known to adhere to the surface of air bubbles.

Key words : レクチン, 清酒酵母, 凝集

緒 言

我々はキクイモのカルスからマンノース/グルコース特異的レクチン (cHTA と略す) を精製し, 幾つかの性質を明らかにした¹⁾。Van Damme らはキクイモの塊茎から同様のマンノースの特異的レクチン (tHTA と略す) を発見した²⁾。この2種のレクチンはトリブシン処理したウサギ赤血球を強く凝集でき, α -マンノオリゴ糖に強い新和性を有することなど非常に良く似た性質を示した。しかしながら, アミノ酸配列を比較するとその相同性は38%であり, カルスと塊茎

からそれぞれ得られる mRNA を用いた RT-PCR 分析から, cHTA と tHTA は異なる発現部位にあることが示された³⁾。

植物レクチンは, Van Damme らによってその構造と性質から7種類のグループに分類されている⁴⁾。その中で, マンノースに親和性を有するレクチンはコンカナバリン A (ConA) などのマメ科レクチン⁵⁾, スノードロップ (GAN) やラップズイセン (NPA) のレクチン^{6,7)} が属する単子葉植物特異的マンノース結合レクチンおよび tHTA と cHTA が属するジャカリン関連レクチンの3グループに存在する。

これらのマンノース結合レクチンの多くは酵母凝集能を有することが知られているが, 清酒酵母に対する凝集特性については調べられていなかった。そこで, 我々は前報⁸⁾で, ConA, GNA, NPA および cHTA の清酒用きょうかい酵母に対する凝集特性を調べた。その結果, ConA, GNA, NPA は, 全ての酵母に対して同様な凝集活性を示し, 酵母のトリブシン処理によっても凝集活性に変化は見られなかった。一方, cHTA はトリブシン処理した高泡形成酵母 (清酒酵母きょうかい7号, 9号など) に対してのみ特異的に強い凝集活性を示した。しかし, 最近発見された tHTA の酵母凝集に関しては全く調べられていない。

そこで本研究では, cHTA とレクチンとしての性質が非常に似た, 同じキクイモ由来レクチンである tHTA の清酒酵母に対する凝集特性を調べ, 本レクチンが cHTA とは異なる酵母凝集特性を持つことを示す。

実 験 方 法

1. 供試菌株および培養方法

清酒酵母きょうかい6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 701, 901号の9株を実験に供した。これらの菌株をYPD培地 (2%グルコース, 2%ポリペプトン, 1%酵母エキス) を用い, 27°Cにおいて静置培養した。

2. 供試レクチン

cHTA は, 以前の報告¹⁾で示した手順により精製した。tHTA も, カルスレクチンの精製方法に準じて精製した。

3. 酵母凝集活性の測定

酵母懸濁液は, リン酸緩衝食塩水 (PBS; 0.15 M NaCl を含む 0.01 M リン酸緩衝液, pH 7.4) で3度遠

心洗浄 (2,700 rpm, 7 分, 4°C) した菌ペレットに、菌体密度が一定 OD₆₆₀ 値になるように PBS を加えて調製した。マイクロタイタープレートを用いて、調製した HTA の 1/2 希釈系列 (50 µl, PBS 中) を作成し、これに酵母懸濁液 25 µl を加え、よく混合し、室温で 30 分間放置後、目視により凝集を判定した。酵母凝集活性は、凝集が陽性と判定された最高希釈度で表した。

4. 酵母のトリプシン処理

20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) の酵母懸濁液 (菌体密度: OD₆₆₀=8) に、最終菌体密度が 0.18 mg/ml になるようにトリプシン (生化学工業) を加え、37°C, 60 分間の反応後、菌体を PBS で 3 度遠心洗浄 (2,700 rpm, 7 分, 4°C) し、試験に供した。

実験結果

1. tHTA の酵母凝集における pH の影響

tHTA の酵母凝集活性は、pH 6.5~pH 8.5 でほぼ一定の値を維持したが、pH 6 以下で減少した (Fig.1)。この結果は、前報⁹⁾ で示した cHTA の場合と

Fig. 1 Effect of pH on the agglutination of sake yeast Kyokai No.7 and No.701 by tHTA.

The yeast solutions were washed three times in PBS at the indicated pH and were then resuspended in PBS at the indicated pH. A 25 µl sample of tHTA (0.6 mg/ml) was serially diluted twofold with PBS in a microtiter plate, and then 25 µl of a solution of yeast (OD₆₆₀=2) was added. The plate was kept at room temperature for 30 min, and then the agglutinating activity was examined visually. Agglutinating activity was at the maximum dilutions of lectin that gave visible agglutination. Sake yeast Kyokai No.7 (○), sake yeast Kyokai No.701 (●).

同様であった。cHTA の場合、このような性質は pH の低下によってレクチンがサブユニットに解離するため起こることが示唆されている⁹⁾。tHTA は約 16 kDa の同一サブユニットから成る 4 量体²⁾であり、pH 5.0 では cDNA と同じくサブユニットに解離すると共に凝集活性を失う (未発表データ)。従って、tHTA は 4 量体を形成することによって、複数の糖認識部位を持つことで酵母凝集能を示すと考えられる。

2. tHTA の酵母凝集における基質濃度およびレクチン濃度の影響

一般的に、細胞凝集反応においてレクチンが基質量に比べて過剰に存在すると、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、レクチンの細胞間結合が妨げられ、凝集が阻害されることが知られている⁹⁾。そこで、きょうかい 7 号を用い、tHTA の酵母凝集に対するレクチン量と酵母密度の関係を調べた。至適な酵母密度はレクチン濃度が、0.3 mg/ml の場合、OD₆₆₀=0.9~1.2 付近に存在し、その密度以上および以下では凝集活性が減少した (Fig.2)。従って、1 mg/ml レクチン濃度では至適基質量が約 OD₆₆₀=3.0 となり、この結果も cHTA の至適条件⁹⁾ と非常に良く一致した。

3. tHTA の清酒用酵母の凝集

前報で述べたように cHTA はトリプシン処理した高泡形成酵母 (清酒酵母 きょうかい 7 号, 9 号など) に対して強い凝集能を示す一方、泡なし酵母 (清酒酵母 きょうかい 701 号および 901 号) に対しては非常に弱い活性を示した⁸⁾。そこで同じキクイモ由来の tHTA

Fig. 2 Effect of tHTA on agglutination of sake yeast Kyokai No.7.

The experiment was carried out as indicated in the legend of Fig.1 using PBS (pH 7.4) and the indicated density of yeast.

Fig. 3 Agglutination of sake yeasts by tHTA.

A yeast solution ($OD_{660}=8$, 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5) containing 0.18 mg/ml of trypsin was incubated at 37°C for 60 min. The yeast cells were harvested by centrifugation at 2,700 rpm for 7 min. The cells were washed three times in PBS and were resuspended in PBS. A 25 μ l sample of tHTA (0.6 mg/ml) was serially diluted twofold with PBS in a microtiter plate, and then 25 μ l of a solution of trypsinized or untrypsinized yeast ($OD_{660}=2$) was added. The plate was kept at room temperature for 30 min, and then the agglutinating activity was examined visually. Agglutinating activity was at the maximum dilutions of lectin that gave visible agglutination. Trypsin treated yeast (□), untreated yeast (■).

の各種清酒酵母に対する凝集特性について調べ、その結果を Fig. 3 に示した。tHTA は cHTA と異なり、泡なし酵母に対しても高泡形成酵母と同様に高い凝集活性を示した。また、この凝集活性は酵母をトリプシン処理してもほとんど変わらなかった。このような性質は、前報⁹⁾で示した ConA, GNA, NPA と類似した挙動であり、cHTA とは異なる凝集活性を有していた。

考 察

清酒酵母の細胞表層では、マンナン-タンパク質複合体が最外層構造を形成しているが、高泡形成酵母とその変異株である泡なし酵母で違いは認められていない^{10,11)}。また、高泡形成酵母の表層は、疎水的なタンパク質が露出している状態で存在するが、泡なし変異株のそれは親水的なマンナンでマスクされていると考えられている^{12,13,14)}。従って、ConA, GNA, NPA, tHTA などのマンノース結合レクチンは、表層のタンパク質に影響されずマンノース糖鎖に結合できるレクチンで

あろうと考えられる。一方、tHTA と非常に類似の糖特異性と酵母凝集条件を示す cHTA は、酵母凝集活性が高泡形成酵母をトリプシン処理することによって高まることから、この凝集性の上昇は酵母表層タンパク質によってレクチン活性が阻害されるために起こると思われる。泡なし変異株における cHTA の挙動は、前回の報告⁹⁾で述べたように表層タンパク質が変異などによりトリプシン耐性を示し、そのために依然として凝集できない状態にあるか、あるいは大内ら^{12,13)}が推察するように、泡なし変異株の最外層が親水的なホスホマンナンでマスクされているためにトリプシンが作用できず cHTA が依然として凝集できない状態にあるのかもしれない。

最近、7号酵母の気泡付着性に関与すると思われる AWA1 遺伝子が発見された¹⁵⁾。この遺伝子を破壊した細胞株は高泡形成能を失った。AWA1 遺伝子は、泡なし変異株である 701 号酵母では発現していないことから、泡なし変異株は、気泡付着性に関与する細胞外層タンパク質を欠損しているのかもしれない。今のところ、他の高泡形成酵母における高泡形成に関与する遺伝子については報告されていないが、AWA1 遺伝子を含めた高泡形成能に直接関与するタンパク質遺伝子産物と cHTA や tHTA を含めたレクチンの酵母凝集能との関係に興味を持たれる。

要 約

キクイモ (*Helianthus tuberosus*) 塊茎には、カルスレクチン (cHTA) と非常に良く似た性質を有するレクチン (tHTA) が存在する。この酵母凝集活性の至適 pH および至適レクチン濃度は、cHTA と同様にそれぞれ pH 6.5~8.5 および 1.1 mg/ml 付近 (酵母密度; 約 $OD_{660}=3.0$) にあった。しかしながら、tHTA は cHTA と異なり、泡なし酵母に対しても高泡形成酵母と同様に高い凝集活性を示し、この凝集活性は酵母をトリプシン処理してもほとんど変化がなかった。

参 考 文 献

- 1) R. NAKAGAWA, D. YASOKAWA, T. IKEDA and K. NAGASHIMA: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 259-262 (1996).
- 2) E.J.M. VAN DAMME, A. BARRE, A.M. MAZARD, P. VERHAERT, A. HORMAN, H.

- DEBRAY, P. ROUGE and W.J. PEUMANS :
Eur. J. Biochem., **259**, 135-142 (1999).
- 3) R. NAKAGAWA, D. YASOKAWA, Y. OKUMURA
and K. NAGASHIMA : *Biosci. Biotech. Bio-*
chem., 印刷中
- 4) E.J.M. VAN DAMME, W.J. PEUMANS, A.
BARRE and P. ROUGE : *Crit. Rev. Plant Sci.*,
17, 575-692 (1998).
- 5) N. SHARON and H. LIS : "Lectins", p.2-65,
Chapman & Hall, New York, (1989).
- 6) E.J.M. VAN DAMME, A.K. ALLEN and W.
J. PEUMANS : *FEBS Lett.*, **215**, 140-144
(1987).
- 7) E.J.M. VAN DAMME, A.K. ALLEN and W.
J. PEUMANS : *Physiol Plant.*, **73**, 52~57
(1988).
- 8) 中川良二, 八十川大輔, 池田隆幸, 長島浩二 :
醸協, **94**, 411-415 (1999).
- 9) M. STRATFORD and C.J. BOND : *Biotech.*
and Bioeng., **40**, 835-843 (1992).
- 10) 熊谷知栄子, 布川弥太郎, 秋山裕一 : 農化, **55**,
209-216 (1981).
- 11) 熊谷知栄子, 布川弥太郎, 秋山裕一 : 農化, **55**,
217-220 (1981).
- 12) K. OUCHI and Y. NUNOKAWA : *I. Ferment.*
Technol., **51**, 84-95 (1973).
- 13) 大内弘造, 菊池東, 布川弥太郎 : 醸工, **52**, 811-
817 (1974).
- 14) 熊谷知栄子, 布川弥太郎, 秋山裕一 : 農化, **55**,
391-398 (1981).
- 15) 下飯仁, R. ATTIL, 坂本和俊, 岩下和裕, 伊藤
清 : 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.262,
(1999).