

琉球大学学術リポジトリ

レクチンに関する研究：1.
沖縄産豆科植物種子およびその他植物の赤血球凝集
活性の検索および大豆レクチンの精製(農芸化学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 福田, 亘博, 井上, 寿美男, 知念, 功, 四方, 治五郎, Fukuda, Nobuhiro, Inoue, Sumio, Chinen, Isao, Yomo, Harugoro メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4150

レクチンに関する研究

1. 沖縄産豆科植物種子およびその他植物の赤血球凝集活性の検索および大豆レクチンの精製

福田亘博*・井上寿美男*・知念 功*・四方治五郎*

Nobuhiro FUKUDA, Sumio INOUE, Isao CHINEN, Harugoro YOMO:
Studies on lectin. I Survey of Okinawan leguminosae seeds and
other plants for hemagglutination and purification of *Glycine max*
lectin cultivated in Okinawa islands.

I 緒言

赤血球凝集素-レクチン-は種々の植物、とくに豆科植物種子に存在することが広く知られており、主に蛋白質から構成されている。

レクチンはStillmark¹³⁾により1888年 *Ricinus communis* 種子より発見された。最初、レクチンには血液型特異性はないと考えられ、ほとんど注目されなかったが、Boyd²⁾により血液型特異性を有するレクチンが報告され、豆科植物を中心に精力的に検索された。その結果、現在に至るまで2,600種余りの植物が調べられ、変種を含めた600種以上の豆科植物において赤血球凝集活性が見出された^{2) 7) 9)}。

近年、レクチンのあるものには末梢リンパ球幼若化¹¹⁾、腫瘍細胞凝集¹⁾、多糖類および糖蛋白質との沈澱⁴⁾等の作用を有するものが見出され、とくにリンパ球幼若化および腫瘍細胞の凝集機構解明のためにより広範な研究が行なわれている。

一方、植物以外にも動物組織において赤血球凝集活性様物質が見出されている⁷⁾。

本研究では、沖縄諸島が熱帯および亜熱帯産豆科植物に富み220種以上存在すること⁶⁾から、赤血球凝集活性を有する豆科植物種子について検索した。ついで、レクチンに関する基礎的知見を得るため、また大豆レクチンの地域差による変動を見るため沖縄産大豆レクチンの諸性質を調べ、精製を試みた。

II 実験方法

1. 赤血球浮遊液の調製法¹⁴⁾

赤血球浮遊液はウサギ耳血管より採血したものより調製した。すなわち、Alserver's 溶液^{**})をあ

* 琉球大学農学部農芸化学科

** グルコース2.05g, クエン酸ナトリウム0.8g, 塩化ナトリウム0.42gを溶解し、クエン酸にてpH 6.1に調製したのち100mlとする。

琉球大学農学部学術報告 26: 105~113 (1979)

らかじめ注射筒内に吸入しておき、血液を耳血管より吸入した後、静かに攪拌し血液の凝固を防止した。未処理赤血球は生理食塩水で数回洗浄し遠心分離 (2,000 rpm, 15分) した後、4%浮遊液になるよう生理食塩水を用い調製した。トリプシン処理赤血球は先の4%赤血球浮遊液10容に対し、0.5%トリプシン (牛すい臓トリプシン, Sigma社製 type III) 溶液1容を加え、37°C 1時間インキュベートした後、生理食塩水で数回洗浄し4%浮遊液になるよう調製した。なお、トリプシン処理により凝集活性は未処理血球に比べ大豆粗レクチンを用いた場合、約1,000倍の活性増加が認められた。

2. 試料の調製

種子は昭和53年11月から昭和54年4月までの間に採取したものを用いた。種子は乳パチで粉末にした後、試料1gに生理食塩水10mlを加え蛋白質を抽出した。遠心後上清について赤血球凝集活性を測定した。

大豆種子は沖縄本島南部具志頭村で購入した。大豆レクチンの精製はFig.1に示す方法で行なった。

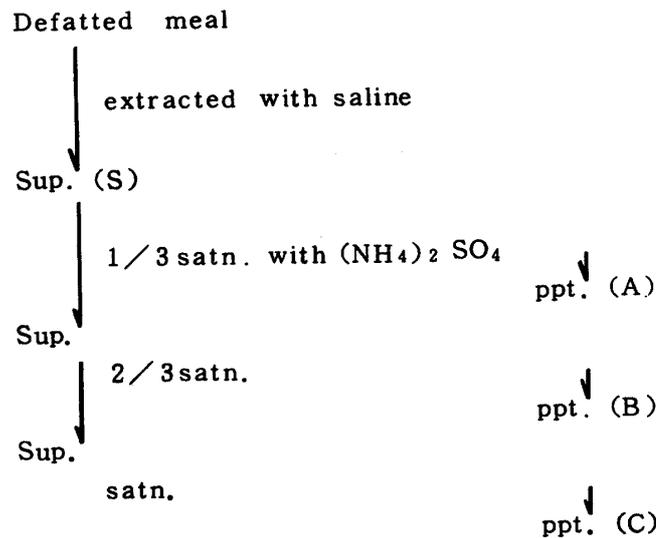


Fig.1 Procedure for extraction and fractionation of proteins present in *Glycine max.*

すなわち、脱脂大豆より生理食塩水を用い蛋白質を抽出した後、硫酸アンモニウムで部分分画し、粗レクチンを得た。粗レクチンはさらにハイドロキシルアパタイトカラムクロトグラフィーにより精製した。

3. 赤血球凝集活性の測定法¹⁴⁾

活性の測定は連続2倍希釈法により調製した試料0.5mlに4%赤血球浮遊液0.2mlを加え、37°C 2時間静置し肉眼で判定した。活性はtiterあるいはtiter/ μ g蛋白質/mlで表わした。

4. 赤血球凝集阻止活性の測定法¹⁰⁾

単糖による大豆粗レクチンの赤血球凝集阻止活性は、単糖の連続2倍希釈濃度列を作り、titer 4を示す粗レクチンを加え、室温で2時間静置した後、4%赤血球浮遊液0.2mlを加え測定した。

5. ハイドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーによる精製

ハイドロキシルアパタイトは生化学工業より購入した。0.001Mリン酸緩衝液 (pH 6.8) で数回洗浄し、2.2×9cm カラムに詰めた後、同緩衝液で平衡化した。蛋白質のカラムからの溶出はリン酸緩衝液濃度を段階的に増加させ行なった。

6. CM-セルロースカラムクロマトグラフィーによる精製

CM-セルロースは常法により活性化し、カラム (2×40cm) に詰めた後、0.01 M酢酸緩衝液 (pH 4.0) で平衡化し用いた。蛋白質の溶出は塩化ナトリウム濃度勾配法により行なった。

7. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法³⁾

7.5% アクリルアミド溶液 (pH 9.4) を用い、1チューブ当り 2mA の電流を負荷し泳動を行なった。染色 0.044% コマシーブリリアントブルー溶液を用い、脱色は 7% 酢酸溶液を用いた。

III 実験結果

1. 沖縄産豆科植物種子の赤血球凝集活性

赤血球凝集活性を Table 1 に示す。未処理赤血球を用いた場合、*C. gladiata* および *microcarpa*,
Table 1. Plants showing hemagglutination

Plants	Non - treated RBC	Trypsin - treated RBC	Plants	Non - treated RBC	Trypsin - treated RBC
<i>Albizia retusa</i>	-	-	<i>Glycine max</i>	+	+
<i>Bauhinia japonica</i>	-	-	<i>Leuoena leucocephala</i>	-	-
<i>Caesalpinia - pulcherrima</i>	-	-	<i>Mimosa pudica</i>	h	h
<i>Canavalia gladiata</i>	+	+	<i>Pongamia pinnata</i>	-	-
<i>Canavalia microcarpa</i>	+	+	<i>Psophocarpus - tetragonolobus</i>	-	+
<i>Cassia surattensis</i>	-	-	<i>Sesbania aculeata</i>	h	h
<i>Delonix regia</i>	-	-	<i>Sophora tomentose</i>	-	-
<i>Dolichos lablab, var 1</i>	+	+	<i>Vigna angustifolia</i>	h	h
<i>Dolichos lablab, var 2</i>	+	+	<i>Vigna marina</i>	-	-
<i>Erythrina variegata</i>	-	+	<i>Vigna sinensis</i>	-	-
<i>Galactia tashiroi</i>	+	+	<i>Alocasia odora</i>	-	+
			<i>Phoenix roebelenii</i>	-	-

The seeds were ground in a mortar. The powder (1g) was mixed with saline (10ml), and the mixture was stirred for 1 hour. After 1 hour the extract was centrifuged and the resulting opalescent supernatant was used for hemagglutinating activity. +; Hemagglutinating activity, -; no activity, h; hemolytic activity.

* *D. labab* var.1 および 2 は著者等が暫定的につけた名前で var. 1 は赤花, 赤枝, 豆荚がしぼむもの, var. 2 は赤花, 青枝, 豆荚が平なもの (cf. Cobley, L, S. 1963 An introduction to the botany of tropical crops p. 134 Longmans London.)

D. lablab var 1* および 2*, *G. tashiroi*, *G. max* 種子で活性が認められた。一方,トリプシン処理赤血球では,さらに*E. variegata* および*P. tetragonolobus* 種子で活性の発現が認められた。豆科以外では, サトイモ科に属する*A. odora* 抽出液でトリプシン処理赤血球は凝集した。*M. pudica*, *S. aculeata* および*V. augustifolia* では溶血活性があった。

2. 沖縄産大豆レクチンの性質および精製

硫酸アンモニウム部分分画より得られた蛋白質の赤血球凝集活性をTable 2に示す。画分B(0.3~0.6

Table 2. Hemagglutinating activities of fractions obtained by ammonium sulfate fractionation of *G. max* saline extract.

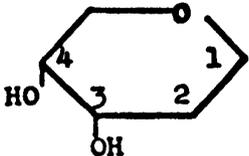
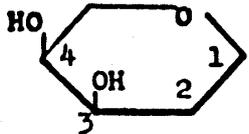
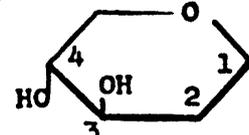
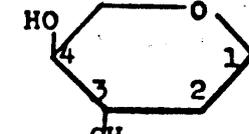
Fraction 1)	Hemagglutinating activity for non-treated RBC (titer/ μ g/ml)
S	0.353
A	0.068
B	0.122
C	0.010

1) See Fig. 1.

飽和)において最も強い活性が認められた。

赤血球凝集活性に及ぼす単糖類の影響をTable 3に示す。粗レクチンによる凝集活性はD-ガラクト

Table 3. Inhibition of crude lectin of *Glycine max* with various sugars.

Mäkelä's classification ⁹⁾ Configuration of carbon at 3 and 4	Sugars	Minimum amounts (mg/ml) completely inhibiting hemagglutination ¹⁾ non-treated RBC
1 	L-Fucose	>10
2 	D-Galactose N-Acetyl-D-Galactosamine Lactose L-Arabinose	< 0.625 < 0.625 < 0.625 =10
3 	D-Glucose D-Mannose D-Xylose N-Acetyl-D-Glucosamine	>10 >10 >10 >10
4 	L-Rhamnose	>10

1) Four titer was used in this inhibition assay as the lectin concentration.

トース, N-アセチル-D-ガラクトサミンおよびラクトースにより特異的に阻害された。一方, ヒト血液型に対する特異性は Table 4 に示すように認められなかった。

Table 4. Hemagglutinating activities of crude lectin with the red cell of human. 1)

Blood type (non-treated RBC)	Hemagglutinating activity (titer)
A	2
B	2
AB	2
O	2

1) 8 mg of crude lectin was used.

大豆粗レクチンのハイドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーによる精製を Fig. 2 に示す。

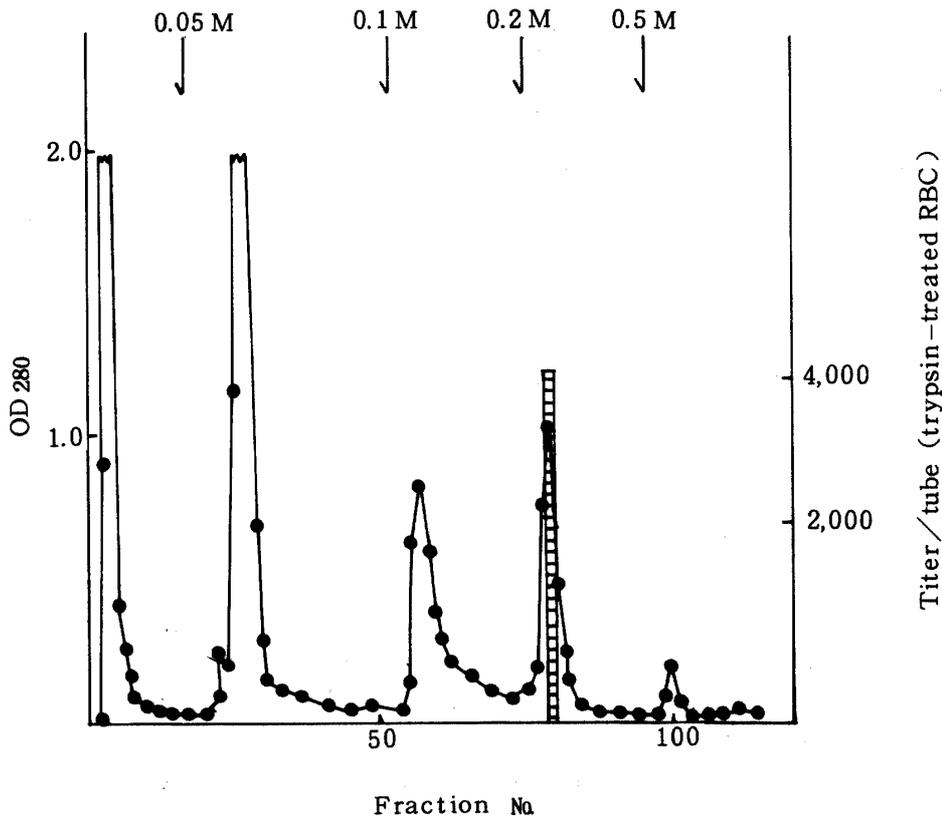


Fig. 2 Chromatography of crude *G. max* lectin on calcium phosphate. Crude lectin (600 mg) protein dissolved in 20 ml of 0.001 M phosphate buffer, pH 6.8, was applied to a column (2.2×9cm). Elution was performed by a stepwise increase of the concentration of the buffer as indicated in the Figure. Fractions of 10 ml

were collected at a flow rate of 20 ml per hour.

——, Optical density at 280 nm;  hemagglutinating activity.

リン酸緩衝液濃度を 0.001 M から 0.5 M まで段階的に増加させ、蛋白質を溶出させた場合、血球凝集活性は 0.2 M 濃度で溶出される画分でのみ認められた。これらの精製した画分の均一性を CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにより調べた (Fig. 3)。血球凝集活性は 2 番目の大きな単一ピーク画分

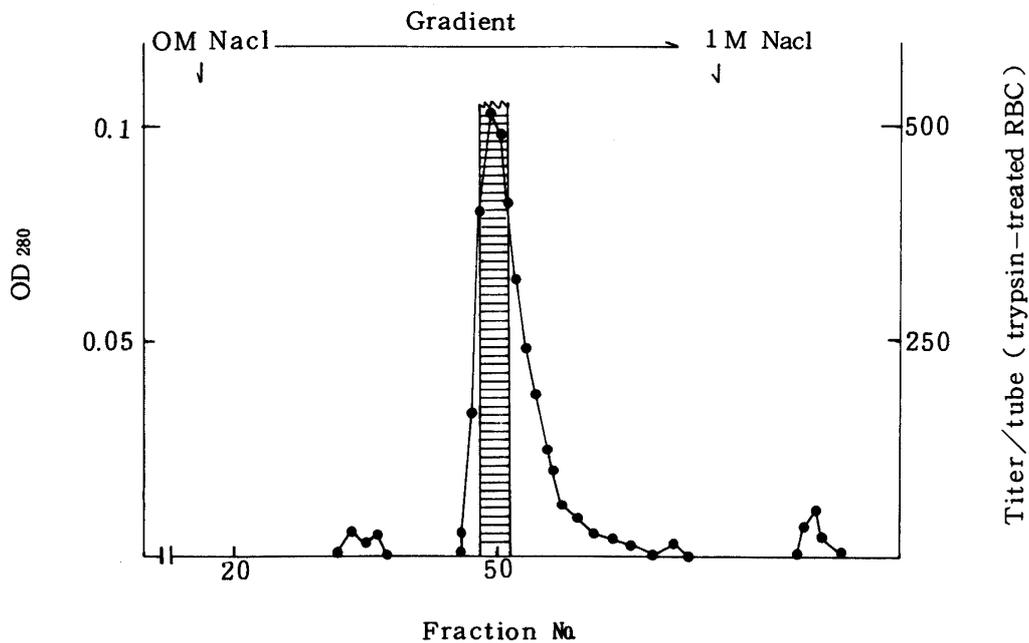
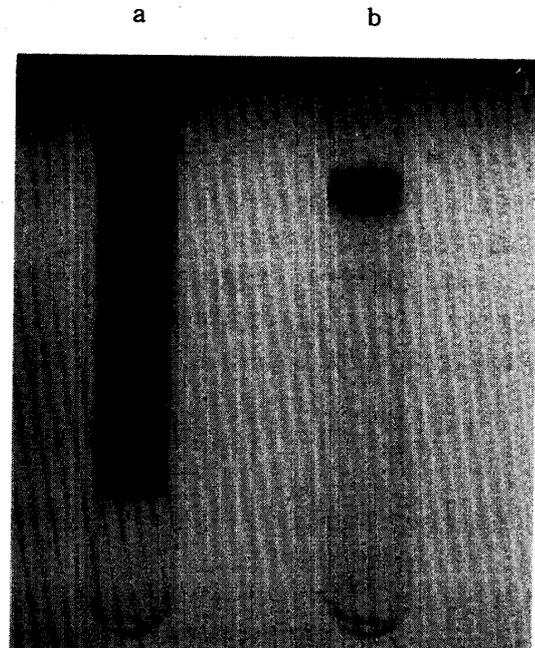


Fig. 3. Chromatography of purified *G. max* lectin on carboxymethyl cellulose. Purified lectin (15 mg) protein was dissolved in 5 ml of 0.1 M acetate buffer, pH 4.0 (starting buffer), and applied to a column (2 × 40 cm). Elution was performed by a linear increase of the concentration of NaCl. Fractions of 5 ml were collected at a rate of 20 ml per hour. ——, Optical density at 280 nm;  hemagglutinating activity.

で観察されたことから、ヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーによる粗レクチンの精製はほぼ完全であると考えられた。さらに、精製の程度をディスク電気泳動によっても調べた (Fig. 4)。硫酸アンモニウム部分分画法およびヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーにより単一なバンドにまで精製されたことが確認された。

Fig. 4. Electrophoresis of purified lectin in 7.5% polyacrylamide gel (pH 9.4) run at 2mA per tube for 120 min.
a; Crude lectin, b; Purified lectin.



IV 考 察

沖縄本島南部および中部において採取した豆科植物種子22種および豆科以外の植物2種についてウサギ赤血球に対する凝集活性を調べ、活性を有する豆科植物種子8種およびサトイモ科植物1種を見出した。赤血球凝集活性を有する豆科植物は現在まで変種も含めて600種以上確認されている²⁾⁷⁾⁹⁾。本研究における *D. lablab* var 1および2, *G. max*, *P. tetragonolobus* レクチンについて属、種ともすでに報告されている。一方, *C. microcarpa*, *G. tashiroi* および *E. variegata* では属のある種について報告されているが、これらの種について報告は見当らない。Hague⁵⁾は *Canavalia* 属の *Densiformis*, *gladiata* および *maritima* の3種のレクチンをセファデックスG-100カラムクロマトグラフィーで単離し、サブユニットのアミノ酸組成を比較した結果, *maritima* レクチンではメチオニン残基が、他2種では2モル有するのに対し、1モルしかないことを報告している。また, *Dolichos biflorus* および *Crotalaria aegyptica* レクチンは血型A型特異性を示すが、同属の *D. lablab* および *C. vitellina* レクチンは血液型非特異的レクチンである¹²⁾。このような結果は、同属で異種の種子レクチンは必ずしも同じ特異性あるいはアミノ酸組成を持つとはかぎらないことを示唆している。本研究において見出した先の3種のレクチンと同属種レクチンとの詳細な比較研究が必要であろう。

近年、レクチンは豆科植物以外の植物あるいは動物組織からも見出されている⁷⁾。本研究において、サトイモ科 *A. Odora* でトリプシン処理赤血球に対し活性が認められた。本レクチンに関する研究は属、種とも報告がないことから、きわめて興味あるものと思われる。

レクチンはアフィニティクロマトグラフィーの開発により数多く単離され、それらの諸性質は明らかにされてきている。一般に、レクチンは赤血球凝集阻止活性を有する単糖の3位および4位の水酸基の立体配位あるいは血液型特異性により、それぞれ簡便的に分類することが出来る⁹⁾。大豆粗レクチンの単糖による赤血球凝集阻止活性は、D-ガラクトース、N-アセチル-D-ガラクトサミンおよびラク

トースにおいて認められた (Table 3)。このことは、大豆レクチンがガラクトース型に属し、赤血球膜表面のN-アセチル-D-ガラクトサミン様残基を認識していることを示唆する。一方、Table 4に示すように、本レクチンは血液型非特異的レクチンであった。これらの結果は、レクチンとしての特異性に産地による差異はないことを示している。

大豆レクチンのヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーによる精製の結果、CM-セルロースおよび電気泳動的にはほぼ均一なレクチンが得られた。一方、このようにして得られた精製レクチンには、主要画分の他に少量の3つの活性を有する画分が報告されている⁸⁾。アフィニティクロマトグラフィーによる精製でも、同様の3画分が示されている⁸⁾。以上のように、本研究におけるカラムクロマトグラフィー段階では沖縄産精製大豆レクチンと他産地大豆との差異は明確でなかったが、イソレクチンの存在が示唆されることから、さらに詳細な比較研究が必要であろう。

V 要 約

沖縄産豆科植物種子およびその他植物の生理食塩水抽出液によるウサギ赤血球凝集活性の検索および大豆レクチンの精製を試みた。

未処理およびトリプシン処理赤血球に対し凝集活性を示す種子は、*Canavalia gladiata*および*microcarpa*, *Dolichos lablab* var 1および2, *Erythria variegata*, *Galactia tashiroi*, *Glycine max* および*Psophocarpus tetragonolobus*の8種であった。一方、豆科植物以外では*Alocasia odora*抽出液によりトリプシン処理赤血球は凝集した。

Glycine max (沖縄産大豆)レクチンの血液型および単糖に対する特異性を調べた結果、本レクチンはヒト血液型に対し非特異的であり、ガラクトース型レクチンであった。

硫酸アンモニウムによる部分分画およびヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーにより、CM-セルロースおよび電気泳動的に均一な精製レクチンが得られた。

本研究の一部は岡崎鉦産物株式会社よりの琉球大学農学部奨学寄付金により行なわれた。同会社に対し厚く御礼申し上げます。また、ウサギの貸与、採血等で御教示致いた琉球大学農学部助教授与那覇哲義氏、*P. tetragonolobus*を供与して致いた同大学農学部助手米盛重友氏、豆採取に協力して致いた農学部大学院生徳元正和氏に厚く御礼申し上げます。

References

1. Aub, J. G., Tieslan, C. and Lankester, A. 1963 Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes, 1 wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **50** 613-619
2. Boyd, W. C. and Regnera, R. M. 1949 Hemagglutinating substances in various plants, J. Immunol., **62** 333-339
3. Gordon, A. H. 著, 坂岸良克訳 1974 ゲル電気泳動法, 東京, 東京化学同人
4. Goldstein, I. J. and So, L. L. 1965 Protein-carbohydrate interaction IV Application of the quantitative precipitin method to polysaccharide-concanavaleine A interaction, J. Biol. Chem., **242** 1617-1622
5. Hague, D. R. 1975 Studies of storage proteins of higher plants

1. Concanavaline A from three species of the genus *canavalia*, *Plant Physiol.*, **55** 636-642
6. 初島住産, 天野鉄夫 1977 琉球植物目録, P. 55~68 沖縄, でいご出版社
7. Liener, I. E. 1976 Phytohemagglutinins (Phytolectins), *Ann. Rev. Physiol.*, **27** 291-319
8. Lis, H. and Sharon, N. 1972 Soy bean (*Glycine max*) agglutinin in *Method in Enzymology* ed. by Ginsburg, V. vol. 28 p 360-365 Academic Press, New York and London
9. Makela, O. 1951 Studies in hemagglutinin of leguminosae seeds, *Ann. Med. Exp. Fenn.*, **35** suppl. 11
10. Matsumoto, I. and Osawa, T. 1970 Purification and characterization of a *Cytisus*-type anti-H(O) phytohemagglutinin from *Ulex europaeus* seeds, *Arch. Biochem Biophys.*, **140** 484-491
11. Nowell, P. C. 1960 Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes, *Cancer Res.* **20** 426-466
12. 大沢利昭, 森良一, 1976 レクチン p. 1~13, 東京, 講談社
13. Stillmark, H. 1888 uber rizin, ein giftiges ferment aus dem samen von *Ricinus communis* L. und einigen andern Euphorbiaceen, *Inaug. Dis.*, Dorpat.
14. 高橋孝雄, 1976 フィトヘマグルチニン(フィトレクチン)蛋白質・核酸・酵素(別冊) p 273~279

Summary

Survey of extracts of Okinawan leguminosae seeds and other plants for hemagglutination and purification of *Glycine max* lectin were studied.

Leguminosae family seeds showing hemagglutinating activity for non- and trypsin-treated rabbit red blood cell (RBC) were as follows; *Canavalia gladiata* and *microcarpa*, *Dolichos lablab* var. 1 and var. 2, *Erythria variegata*, *Galactia tashiroi*, *Clycine max* and *Psophocarpus tetragonolobus*. While, *Alocasia odora* extracts which belongs to family of *Araceae* agglutinated trypsin-treated RBC.

The specificity of the crude *G. max* lectin was tested by hemagglutination-inhibition and human ABO types assays and was found to be galactose specific lectin and non-specific toward ABO types.

The purification of *G. max* lectin was accomplished first by fractional precipitation with ammonium sulfate, and then by hydroxylapatite column chromatography. Proteins so obtained revealed to be homogenous by CM-cellulose column chromatography and disk electrophoresis.