

α-マンノース結合レクチン・カラムの多糖・糖タンパク研究への利用 — 醗酵酒類中のマンナンの微量分析 —

角 田 万里子¹⁾, 谷 川 晶 子¹⁾, 三 崎 旭^{2)*}
(¹⁾甲南女子大**, (²⁾大阪市大***)

Preparation of Affinity Columns of α-Mannose-binding Bulb Lectins and Resolution of Mannose-containing Glycans: Microanalysis of Brewing Products

Mariko KAKUTA¹⁾, Akiko TANIGAWA¹⁾ and Akira MISAKI²⁾

¹⁾Dept. of Human Environments, Konan Women's University

²⁾Osaka City University

Affinity columns of two unique α-mannose-binding lectins, isolated from bulbs of *Zephyranthes carinata* (ZCA) and *Crocus vernus* (CVA), the latter highly specific to Man (α-1,3) Man, were used as probes of biochemical fractionation of glycans and glycoproteins. Thus, the α-mannan of yeast cell-wall was selectively separated from glyco-gen, either by CVA or ZCA column. The horse radish peroxidase glycoprotein (PDG), which contains biantennary mannose-terminated carbohydrate moiety, was purified by ZCA-column. When the purified PDG was further applied onto CVA column, two fractions were separated, one (65%) not retained on the column, and the other (35%) retained was eluted with 20mM diaminopropane (DAP), suggesting structural heterogeneity of PDG, with regard to the carbohydrate sequence.

The ZCA-column, strongly binds to terminal α-mannose residues (Man), was used for fractionation of brewing liquor products, including several kinds of commercial beer and "happou-shu", wine and also sake, and to provide a one-step microanalysis of content of yeast mannan. A small aliquot of each sample was dialyzed, and the non-dialyzable fraction (Mw. > 6,000) was applied onto the affinity column, from which starch and other non-retaining polymers were removed. The column retained α-mannan, which should be liberated from yeast during fermentation process was eluted with 20 - 40mM DAP. Thus, most of commercial beer (either domestic or imported) showed similar elution profiles and mannan contents, 20 - 25mg/100ml of beer, whereas all "happou-shu" samples showed lower mannan contents, approximately 10mg/100ml, suggesting different brewing process. On the other hand, the sake samples were shown to contain 60mg/100ml of mannan, their elution profiles were not same from each other, probably due to a variety of fermentation process.

はじめに

我々は、これまでに植物由来の種々の α-マンノース結合レクチンを分離し、その結合の特異性を明らかにしてきた^{1), 2), 3), 4)}。それらの中で、クロッカスの球根から得られたレクチン (CVA) とサフランモドキの球根から得られたレクチン (ZCA) は、糖鎖中の α-マンノース残基の結合の認識が微妙に異なる。

*名誉教授

**所在地：神戸市東灘区森北町6-2-23 (〒658-0001)

***所在地：大阪市住吉区杉本3-3-138 (〒558-0022)

Table 1 は、これら球根レクチンの性質を簡単にまとめたものであるが、今回、その特異性の異なるレクチンの Affinity column を作製した。そして、これらのカラムを用いて、酵母の細胞壁マンナンとグリコーゲンの分画および糖たんぱくの一種、わさびの *Peroxidase*⁵⁾ や生化学的に重要な糖タンパクの分画精製をおこなうことができた。

さらに、工業的な利用法の一つとして、ビール、ワインや清酒など醸造工程の異なる発酵飲料中に微量に含まれる酵母由来のマンナンの分画と定量化を試み、興味深い結果を得ることができた。

Table 1. α -Mannose-binding Bulb Lectins of Some Monocots

	<i>Amaryllidaceae</i> (ヒガンバナ科)		<i>Iridaceae</i> (アヤメ科)	
	<i>Zephyranthes</i> (たますだれ) 属	<i>Cooperia</i> 属		<i>Crocus</i> 属
	<i>Z. carinata</i> サフランモドキ(ZCA)	<i>Z. candida</i> タマスダレ(ZCdA)	<i>Cooperia drummondii</i> デラモンデ(CDA)	<i>Crocus vernus</i> クロッカス(CVA)
Molecular mass	20,000	20,000	21,000	44,000
Sub unit	12 KDa	12 KDa	12 KDa	11 KDa
	7.5 KDa	7.5 KDa	9.0 KDa	
Amino acid sequence	High homology with GNA			High homology with GNA 8.3%
pH stability	2 - 9.8		3 - 7.5	4 - 7.5
Binding specificity	Terminal α -D-Mannose		Man α (1 $\rightarrow$ 3)Man	
	α -D-Arabinose			
	Not with α -D-Glucose			

実験材料および方法

α -マンノース結合レクチン：アヤメ科 (*Iridaceae*) のクロッカス (*Crocus vernus*) およびヒガンバナ科 (*Amaryllidaceae*) のサフランモドキ (*Zephyranthes carinata*) の球根から当研究室で精製したレクチン (CVA および ZCA) を用いた^{1),3)}。

Affinity column の作製：CNBr-活性型 Sepharose-4B (Pharmacia Biotech 製) 3g のゲル (15ml) に、精製レクチン (CVA, ZCA) 約 15mg を加えて、0.5M 食塩を含む 0.1M NaHCO₃ 緩衝液 (pH 8.3) 中で攪拌しながら 1 晩 (4℃) 反応させた。約 5 倍量の緩衝液で洗った後、カラム (5mm X 50mm) に充填し 0.05M PBS (pH 7.0) で洗った。

試料： α -結合のマンノースを含む多糖としては、パン酵母細胞壁のアルカリ抽出で得られたマンナンとグリコーゲンの混合物 (1 : 1)、糖タンパクの例としては、ワサビの peroxidase を分析に用いた。

発酵飲料の試料としては、ビール 4 銘柄 (国産 3 種 ; KF, AD, MT および外国産 1 種 ; HNK)、発泡酒 3 銘柄 (MG, TN, Hon)、ワイン 2 銘柄 (赤, 白) および清酒 4 銘柄 (HS, KZ, HaGN, RaGN) を用いた。

Affinity column による分画：多糖混合物、糖タンパク、あるいはヒト血清 (1~3mg) を 0.1ml の PBS (0.05M リン酸緩衝液, pH 7.0, 生理食塩水) に溶かし column に apply した。PBS で非吸着画分を溶出した後、20mM diamino-propane (DAP) で吸着画分を溶離させた。0.65ml づつ分画した各フラクションのタンパクは 280nm の吸収でモニターした。糖についてはフェノール硫酸法により 490nm の吸光度を測定した。

ビールおよび清酒などの発酵飲料中の酵母に由来するマンナンの微量分画は、あらかじめ少量 (5-10ml) を蒸留水に対して透析し、デキストリン等、低分子画分 (Mw < 6,000) を除いた後、透析膜内の高分子画分を 2.5ml に濃縮してその一定量を column に apply した。非吸着画分の多糖量はマンナンに比して圧倒的に大きいため、通常 2-5 μ l を、吸着したマンナン画分については、100 μ l を分析に供した。

ビールのマンナン含量は、カラム吸着部分を、DAP で溶離させ、各画分を集めてフェノール硫酸法で定量し、もとのビール 100ml 当りの量に換算した。

結果および考察

Concanavalin A と異なり我々が球根から分離したレクチンは、糖鎖の末端に位置する α 結合のマンノースのみを認識する。

Fig. 1 には、酵母細胞壁の表層マンナンとグリコーゲンの混合物 (1:1) をクロッカスレクチン (CVA) のカラムで分画したプロフィールを示すが、 α -マンナンのみがカラムに吸着され、グリコーゲン (α -グルカン) から明確に分離できることを示す。

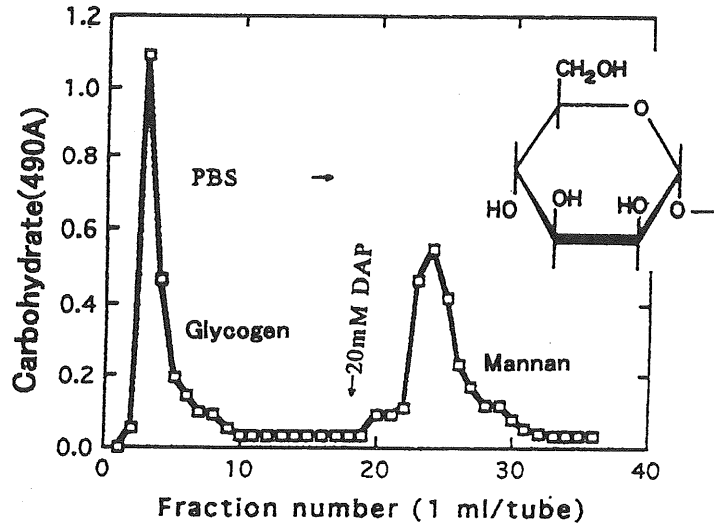


Fig. 1 Elution Profile of Mixture of Glycogen and Mannan of Yeast

サフランモドキから精製されたレクチン (ZVA) のカラムも同様な挙動を示すが、興味あることは ZCA と CVA とは α -マンノースの結合位置に関して、明確な差異があることである。すなわち、CVA はマンナンの末端に位置する Man (α -1, 3) Man に特異的であるが、ZCA は末端の α -Man と強く結合し、高濃度の α -Methyl mannoside でも解離が困難である。従って、CVA と ZCA の特性を利用することにより精確な分画を行うことができる。

Fig. 2 はワサビの peroxidase (構造参照) を ZCA の affinity column にかけたプロフィールであるが、大部分がカラムに吸着される (Fig. 2-a)。次いで、ZCA カラムに吸着された peroxidase (糖蛋白) を CVA のカラムにかけると Fig. 2-b のごとく、major 部分は非吸着であるが、minor 部分 (35%) は CVA カラムに吸着する。この事実から糖鎖構造に heterogeneity があり⁵⁾、Man (α -1, 3) Man のほかに、Man (α -1, 2) Man の末端をもつ糖鎖も存在することが示唆された。

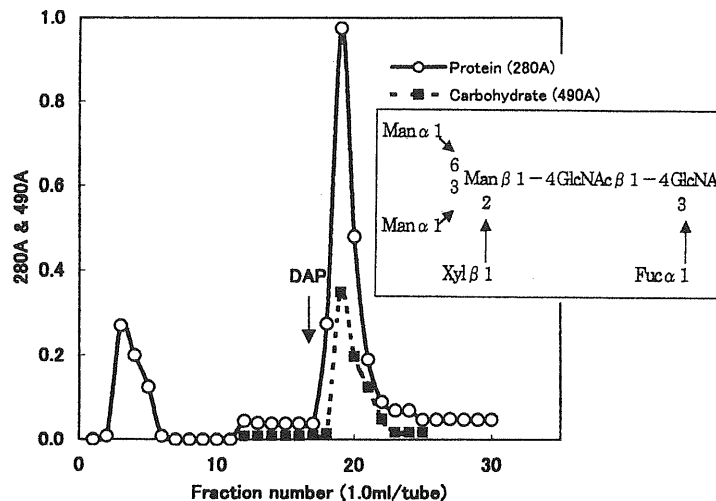


Fig. 2-a Elution profiles of horse radish peroxidase on ZCA-affinity column

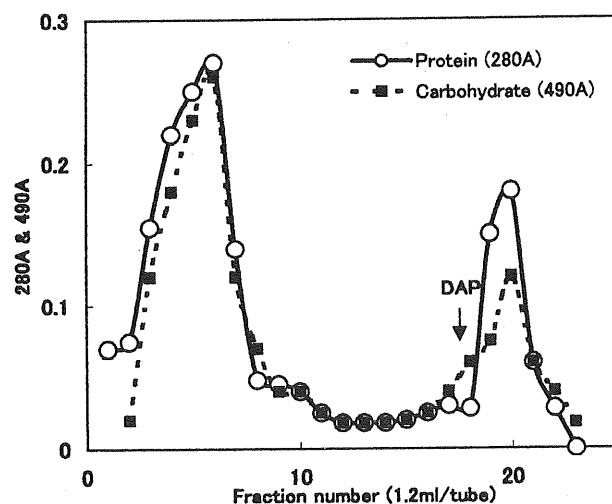


Fig. 2-b Elution profiles of ZCA-binding glycoprotein of horse radish peroxidase on CVA-affinity column

Fig. 3はヒトの血清をZCAカラムにapplyした時の溶出プロフィールを示したものである。吸着画分はSDA-PAGEに関する限りIgAに相当することを示す。

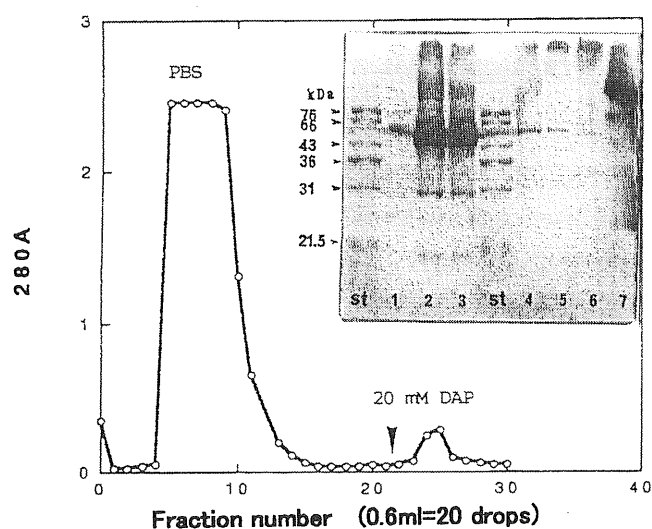


Fig. 3 Fractionation of human serum on ZCA-sepharose column and SDS PAGE of DAP-eluted fraction

1. mouse IgE, 2. whole serum, 3. pass-through fraction (PBS),
4. column-retained fraction (DAP eluate), 5. IgA, 6. IgM, 7. IgG

次にこれらのレクチンカラムをビールや清酒など醗酵飲料の醸造工程のモニターに応用できないかと考えた。たとえばビールの場合、大麦の麦芽を原料として得た麦汁は酵母で醗酵される。すなわちその醸造中の、酵母の自己消化の過程で、細胞表層のマナンが遊離することが考えられる。従って、醗酵製品中の微量のマナンを簡単な操作で定量できれば、醸造過程をモニターできるはずである。

このような工業的な応用も考えて、市販のビール、発泡酒、ワインおよび清酒などの発酵飲料を分析した結果は、Fig. 4～7である。

また、ビールおよび発泡酒に含まれる糖含量とマナン量を比較したところ (Table 2)、全糖量はビールでは3%前後、発泡酒は全体的にそれより少し多く含まれている。しかしながら、マナン含量は、ビールでは20～25mg/100mlであるのに対して、発泡酒では10mg/100ml程度しか含まれず、通常のビールの半分以下であり、発酵過程が異なることを強く示唆した。いずれの場合も銘柄による違いはほとんど認められなかった。清酒はビールに比べてマナ

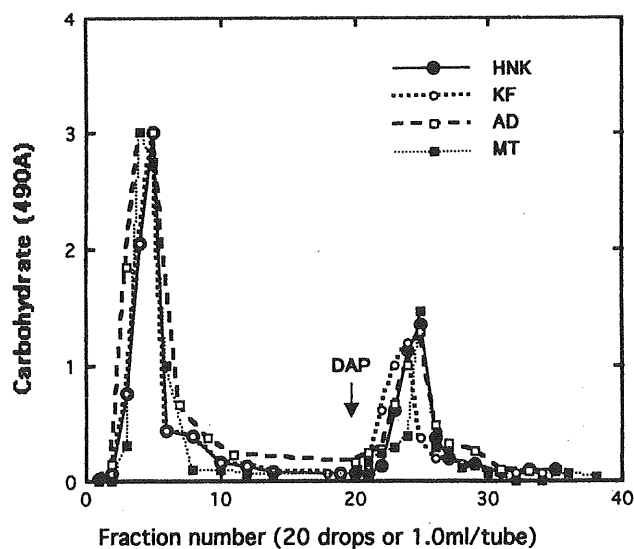


Fig. 4 Elution profiles of commercial beers on ZCA-sepharose column
The non-dialyzable fraction ($M_w > 6,000$) was applied
Domestic ; KF, AD, MT, Imported ; HNK

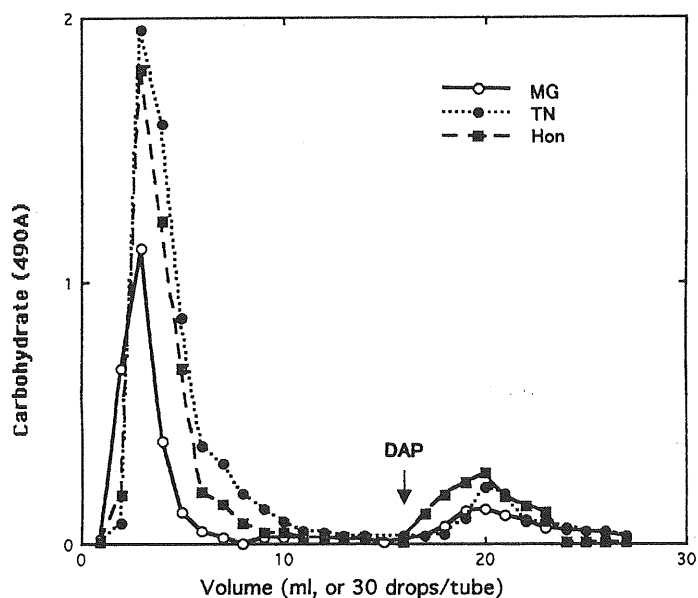


Fig. 5 Elution profiles of "Happou-shu", MG, TN and Hon from ZCA-sepharose column

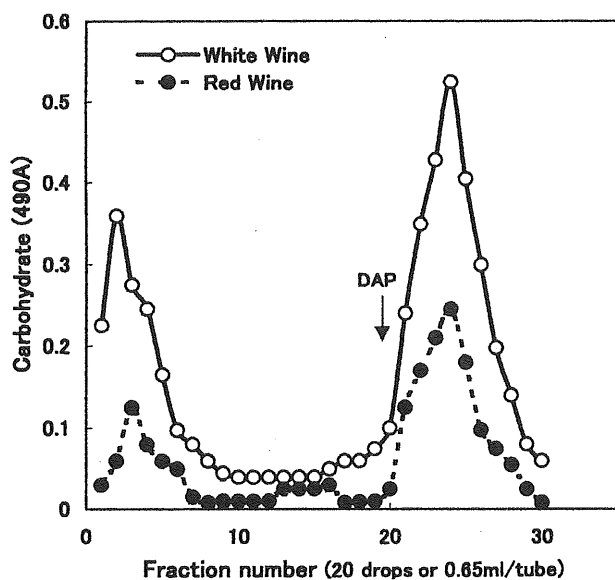


Fig. 6 Elution of Red and White wine from ZCA-sepharose column
(non-dializable fraction $M_r > 3,000$ was applied)

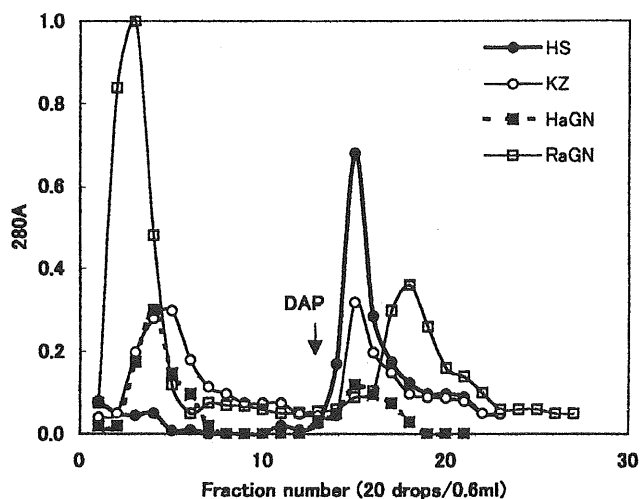


Fig. 7 Elution profiles of commercial sake (HS, KZ, HaGN and RaGN) on ZCA-column (non-dialyzable fraction)

Table 2. Comparison of content of α -mannan in commercial beer and “happou-shu”, assayed by ZCA-affinity column

	Name	Total carbohydrate (g / 100ml)	Mannan from yeast (mg / 100ml)
Beer	KF	3.0 (1.55)*	26.4
	AD	2.8	20.16
	MT	3.3	25.6
Happou-shu	TN	3.4 (2.0)*	9.6
	HN	3.6 (1.4)*	11.15
	MG	3.7 (1.4)*	10.3

* higher saccharides (Mw. > 6,000)

ン量は一般に高く (約60mg/100ml), また仕込み法の違いによって, 各銘柄間のマンナン量が異なることも明らかになった。

この様に, レクチンの特異性を利用した, Affinity chromatographyは, 種々の多糖および糖たんぱくの微量分析および解析に one step で simple, かつ再現性のある方法として応用できることを示した。

文 献

- 1) Misaki A., Kakuta M., Y. Meah and I. J. Goldstein (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 25455 - 25461.
- 2) Saito K., Komae A., Kakuta M., Van Damme, E. J. M., W. J. Peumans, and I. J. Goldstein (1993) *Eur. J. Biochem.* 217, 677 - 681.
- 3) 三崎 旭, 角田万里子, 谷川晶子 日本農芸化学会講演要旨集 pp278 (1998).
- 4) 三崎 旭, 角田万里子, 齊藤景子, 賀来華江 第20回糖質シンポジウム要旨集 pp 34 (1998).
- 5) Takahashi N., K. B. Lee, Nakagawa H., Tsukamoto Y., Masuda K. and Y. C. Lee (1998) *Anal. Biochem.* 255, 183 - 187.