

ムカゴに存在するアミラーゼおよび α -D-galactose結合レクチンについて

三崎 旭¹⁾, 中田 忍²⁾, 角田 万里子³⁾
(¹⁾四條畷学園大*, (²⁾大阪教育大学**, (³⁾甲南女子大学人間科学部***)

Isolation and Functional Properties of Amyolytic Enzyme and α -D-Galactose-binding Lectin from Bulbils of Yam (*Dioscorea japonica* Thumb)

Akira MISAki¹⁾, Shinobu NAKATA²⁾ and Mariko KAKUTA³⁾
¹⁾Shijonawate-gakuen University, ²⁾Osaka Kyoiku University, ³⁾Konan Women's University

Summary

In a course of research on chemical properties and functions of Japanese traditional plant foods, our interests were drawn to “Mukago”, bulbils of Japanese yam, *Dioscorea japonica* Thumb., since our preliminary study indicated that it contains α -galactose-recognizing lectin (α -Gal-Lec) beside unique amyolytic enzyme(s).

Fresh Mukago was homogenized in PBS at cold. After removal of starch, protein was precipitated with ammonium sulfate(0.6 sat.), which was fractionated using affinity chromatographic techniques, involving β -cyclodextrin (CD) for α -amyolytic enzyme, and α -Galactose-conjugate column for a specific lectin, respectively. The purified α -Gal-Lec, showing a single band on SDS PAGE(38 kDa) was a dimeric molecule. This lectin interacted with various α -Gal-containing polysaccharides, e.g.plant galactomannans and also human blood type B substance, but not type A. Thus, chemical and binding properties of α -Gal-Lec appeared resemble to that of arrow-head tuber. The amyolytic enzyme, purified through β -CD was homogenous on SDS PAGE(31 kDa). Its action pattern on starch was appeared an intermediate manner of salivary (or bacterial) and funji (Takaamylase) types. It readily hydrolyzes Mukago starch, which might contain rather short α -1, 4 linked branches.

古くから根茎に“薯蕷”と呼ばれる粘質物を含むヤマイモ (*Dioscorea opposita*) のうち、とくに自然薯 (*Dioscorea japonica* Thumb) やナガイモ (*Dioscorea batatas* Dence) は、蔓の葉腋に球形状のムカゴ(零余子)と云われる肉芽を形成する(photo 1)。“零余子飯”などとして親しまれているムカゴの名は、古くは、平家物語^{註)}にも記されている、この物語によれば、清盛の名前は零余子に由来する(?)といわれている。

註) 平家物語卷六祇園女御より²⁾ (岩波文庫, 平家物語(二))

白河院がお忍びで祇園女御のもとに御幸されし時、護衛(北面の平忠盛が祇園御堂の近くで曲者を取り押さえた事があり、その功に感じて、院は寵愛の祇園女御を忠盛に下賜された。女御は院の子を孕んでいたが「女子ならば朕の子に、男子ならば、忠盛とりて、弓矢とり仕立てよ」と仰せらる。生まれたのは男の子であったので忠盛の子とした。—或時白河院、熊野へ御幸なる。紀伊国糸鹿坂というところに暫く御休息ありけり。その時(平)忠盛、藪に幾らもありける零余子を袖にとり入れ、御前に参り、畏つて、「いもが子のはふほどにこそなりにけれ」と申されたりければ、院やがてお心得あって、「ただもり取りてやしなひにせよ」とぞ附けさせしける。さてこそわが子とはもてなされけれ。この若君あまりに夜泣きをし給ひしかば、院、聞し召して、一首の御詠を遊ばいてぞ下されける、「夜泣きすとただもり立てよ末の世に清く盛ふる事もこそあれ」それよりしてこそ、清盛とは名乗られけれ……。

*所在地：大阪府大東市北条5丁目11-1 (〒574-0011)

**所在地：柏原市旭ヶ丘4-698-1 (〒582-8582)

***所在地：神戸市東灘区森北町6-2-23 (〒658-0001)



Photo 1 Mukago.

さて、ムカゴは地上に落ちて発芽し蔓状に伸びて成長する。すなわち、根茎に頼らない生命体として原始的な繁殖機能を内蔵すると考えられる。我々はこれまでに、伝統的な植物性食材に含まれる機能活性成分について研究を進めてきたが、その過程で、ムカゴに含まれるユニークな澱粉分解酵素および α -galactose 認識レクチンを見出した。多糖としては短鎖の分枝をもつ澱粉が含まれるが、ヤマモ根茎の粘りの主体である、我々が最初に見出した、マンナン-蛋白複合体¹⁾は存在しないようである。ここでは、ムカゴから分離したアミラーゼおよびレクチンの特性について検討した結果を報告する。

実験方法および結果

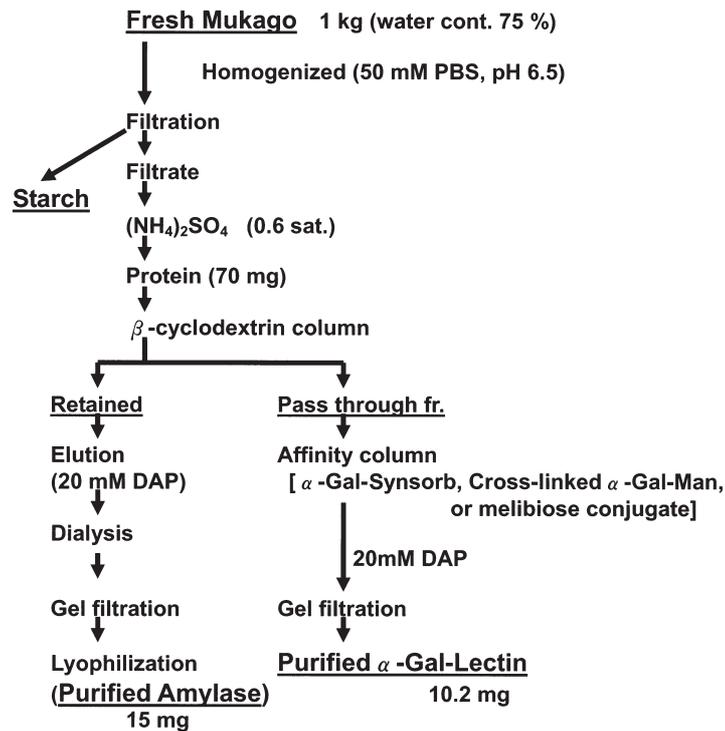
1. ムカゴの高分子成分の分画と酵素およびレクチンの分離精製

2002年10月に鳥取および兵庫（丹波）で収穫された新鮮なムカゴ約1 kg（水分約75%）を50 mM PBS（2 L）中blenderでホモゲナイズ後、10℃、24 h 攪拌して、抽出をおこなう。ガーゼでろ過、皮の部分を除き、抽出物を一晩静置後、沈澱物（澱粉）と抽出液に分けた。抽出液をさらに、低温で遠心分離（10,000 rpm, 20 min）して得られた上清を硫酸分画にかける。最終的に0.6飽和の硫酸で沈澱する蛋白画分を採取した。非沈澱画分にはヤマモ根茎に特有の粘性はなく、いわゆる、マンナン-蛋白¹⁾はほとんど含まれていないことが示唆された。蛋白画分に存在する酵素（amylase）は不溶性の β -シクロデキストリン（CD）のカラムに吸着させて分離した。非吸着画分の蛋白はヒトB型物質と反応するが、この画分からアフィニティークロマトグラフィーの手段により α -D-Galactose 残基（ α -D-Gal）を特異的に認識するレクチンを分離精製した。Scheme 1にはムカゴ構成成分の分画の概要を示す。

2. アミラーゼの精製と特性

ムカゴのPBS抽出液の蛋白画分にはレクチンのほかに澱粉分解酵素（amylase）が含まれる。この酵素は主として α -（or β -）amylaseと考えられるので、その精製分離には水不溶の β -cyclodextrin（CD）を充填したカラム（1 x 10 cm）をaffinity columnとして用いることを試みた。すなわち、0.6飽和硫酸により沈澱した蛋白質画分（70 mg）を少量の50 mM PBS溶液としてこのカラムに低温（10℃）でアプライした。最初にPBSをカラムに流し、次にカラムに吸着された蛋白（酵素）を20 mMのDAP（diaminopropane, pH 11）で溶出させた。溶離蛋白をPBS中、ついで蒸留水中で透析した後、凍結乾燥に付した（yield, 15 mg）。この蛋白はSDS PAGE上で単一のバンド（31 kDa）を与えた（Fig. 1）。これをさらにゲル濾過（Sephacryl S200 column）にかけ単一の蛋白を得た。この精製酵素は α -（もしくは β -?）と考えられた。そこで基質特異性、とくに分解の作用形式を明らかにしようとした。

すなわち、澱粉、アミロース画分およびマルトオリゴ糖に作用させ分解生成物を高速液体クロマトグラフィー（Dionex LC）で分析した。その結果、1)可溶性澱粉に作用させるとglucose（G1）、maltose（G2）およびmaltotetraose



Scheme I Fractionation and Purification Procedure.

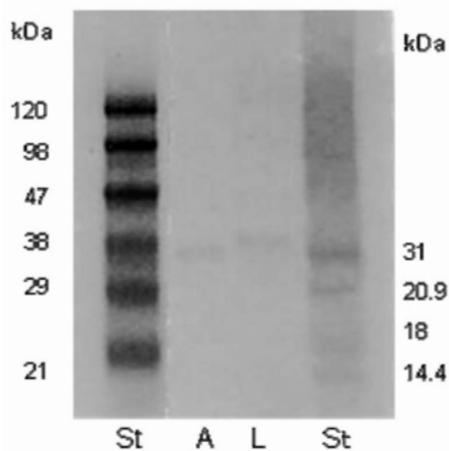


Fig. 1 SDS-PAGE of Amylase (A) and Lectin (L) (15 % SPU-Gel).

(G4) が11 : 26 : 117のモル比で生成したので当初、β-amylase様の酵素と考えられたが、2) アミロース (DP *ca.* 20) に作用させると最終的にG1, G2, G3が生成した。(Fig. 2A)

次に、3) maltoheptaose (G7) に作用させると、生成物はG1, G2, G3, G4, G5 (ratio, 1 : 3 : 2 : 1) と微量のG6の生成が認められた (Fig. 2B)。この結果から、本酵素はα-1, 4鎖を内部から切断するα型のamylaseであり、G7→G5 + G2, G5→G2 + G3 + G1のような分解形式をもつことがわかった。別の基質として、この酵素をG3とG4単位が1→3で結合した繰り返し単位をもつ、茶に寄生するカビの産生するα-グルカンであるエルシナン (elsinan)³⁾ に作用させると、Fig. 2Cに示すようにタカアミラーゼ (Takaamylase) 作用の場合と同じく、1→3結合を含む3糖、4糖、7糖…など、一連のオリゴ糖が生成した。このことは、ムカゴのα-amylaseは通常の液化型酵素とは異なり、唾液型 (細菌型) とカビ型 (Takaamylase) の中間的な基質特異性を有することを強く示唆する。後述するように、このような澱粉の分解様式はムカゴ特有の鎖状構造の澱粉の効率的な分解利用にも関連していると思われる。なお、本酵素の活性 (可溶性澱粉を基質とする) は30~60℃にわたって安定であった (Fig. 3)。

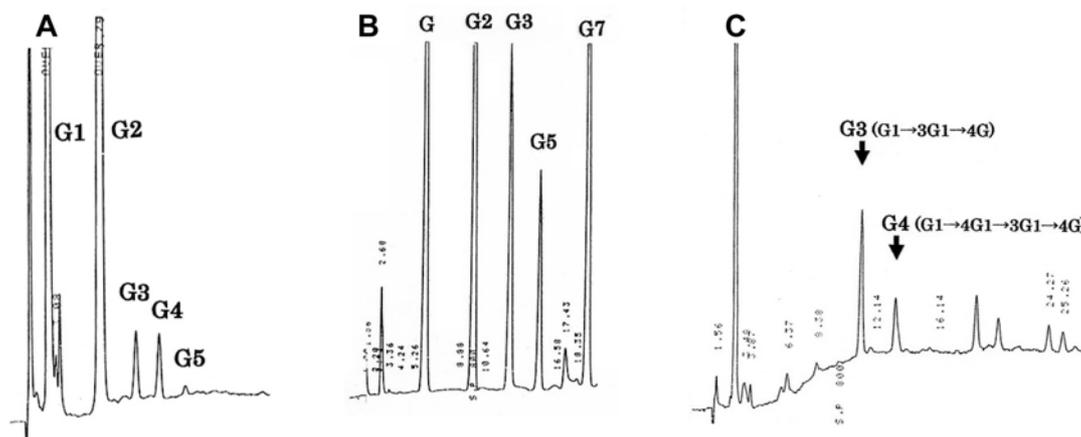


Fig. 2 HPAEC-Profile of Mukago Amylase Digests of
A: Amylose (HAM), B: Maltoheptaose, C: Elsianan.

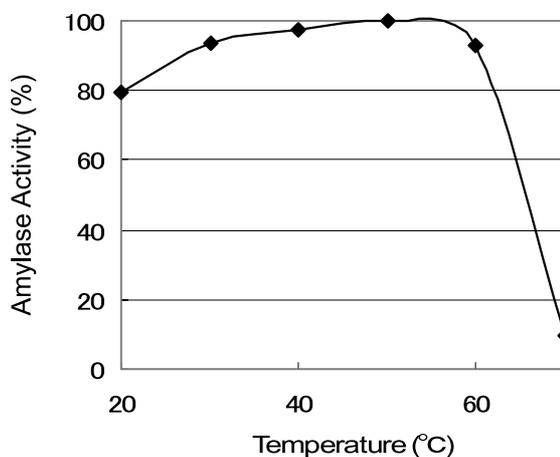


Fig. 3 Temperature Dependence of Mukago Amylase Activity.

3. ムカゴ澱粉の構造特性

ムカゴから分離した澱粉は、その粒型はヤマイモの根茎澱粉に似ているが、Photo 2のごとく沃度による染色性は根茎のそれより強い青色 (λ_{\max} 610 nm) を示す。さらにこの澱粉の大部分はアミロースに特徴的なチモール複合体を形成する。このことは、アミロースに近い直鎖、または、短い側鎖の鎖状構造をもつことを示唆する。化学的な構造の知見を得るために、この澱粉についてメチル化分析を行った。その結果、2, 3, 4, 6-tetra-, 2, 3, 6-tri-および2, 3-di-o-methyl glucoseが1 : 25.5 : 1.1の比で生成し、平均鎖長27~28の分岐構造をもつことが示された。次に酵素的な解析として、これに先述のムカゴ amylase を作用させたところ、根茎澱粉と同様にG2, G3およびG4が生成した。一方、澱粉の1, 6-分岐切断酵素 (isoamylase と pullulanase) の逐次作用で生成する、分枝に由来するオリゴ糖を Dionex による HPAEC で解析し、 α -1, 4結合の unit chain 鎖分布を示すと Fig. 4aのごとく DP3 (maltotriose) と DP4 (maltotetraose) が主体で、通常の澱粉から得られる DP 10から35に至る一連の unit chain の分布が見られない (例えばクワイ澱粉 Fig. 4b)。このことはムカゴの澱粉が根茎など、通常の澱粉に比べて側鎖が短い構造をもつことを意味し、ムカゴの発芽時の内在澱粉の利用の観点から極めて興味ある現象である。

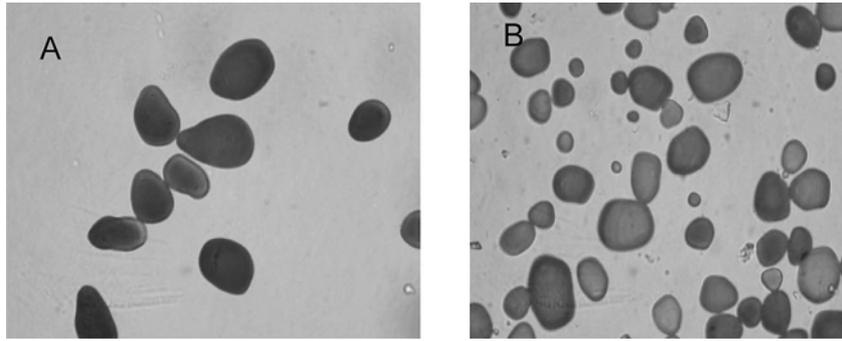


Photo 2 I₂-Stained Starch of A: Mukago, B: Yam.

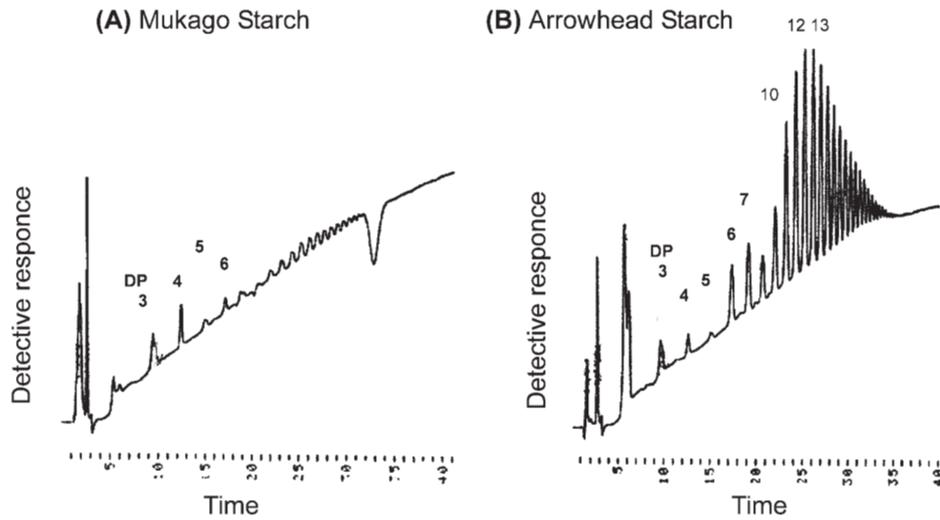


Fig. 4 Comparison of HPAEC-Profiles of Isoamylase-pullulanase Digests of Mukago and Arrowhead Starch.

4. α -galactose結合レクチンの精製と認識特異性

ムカゴのPBS抽出で得られる蛋白画分にはグアガム、タラガムなどの α -Galを側鎖にもつ galactomannan (α -GalMan), および、ヒト血液B型物質と沈降反応する特性をしめす事実から、 α -Galを認識するレクチン (α -Gal-Lec) を含むと考えられたので、0.6飽和硫酸沈澱で得られた蛋白画分をScheme 1に示すごとく蛋白中のamylaseを β -CDカラムに吸着して分離した後、非吸着画分を α -Galactose-synsorb column, または、化学的にcross-linkingした不溶化タラガムのcolumnや melibiose-agarose columnなどにアプライした。カラムに50 mMのPBSを流して非吸着物を除き、吸着されたレクチンは30 mMのDAP (diaminopropane) を流すことにより溶離させた (Fig. 5A, B, C)。得られたレクチンをゲル濾過 (Sephacryl S200 column) で精製した (10.1 mg)。分離したレクチンはFig. 1に示すごとくSDS PAGE上で単一のバンド (38 kDa) を示し、さらに、ゲル濾過ではMw 72,000に相当したのでこのレクチンはMw 38 kDaのsubunitの2量体である。

5. レクチンの化学的特性

精製 α -Galactose-bindingレクチンは上述のごとく、分子量3.8万の蛋白の2量体である。糖含量に関しては、フェノール硫酸法による糖定量では5.4% (中性糖) で、このレクチンを酸加水分解 (2 M TFAで120 $^{\circ}$ C, 3 h), 構成糖をHPAEC (Dionex LC) で分析した結果ManとN-Acetyl glucosamine (GlcNAc) が2.5 : 1.0の比で得られた。この結果本レクチンはGlcNAcとManを糖鎖末端にもつ、先に我々が報告したクワイのレクチン⁴⁾と類似した糖蛋白と考えられる。

Table 1には本レクチンの構成アミノ酸の分析値をクワイの α -Gal-Lecのそれと比較した結果を示す。この結果から両者のアミノ酸組成は非常によく似ており、両者は化学的によく似た糖蛋白と考えられる。

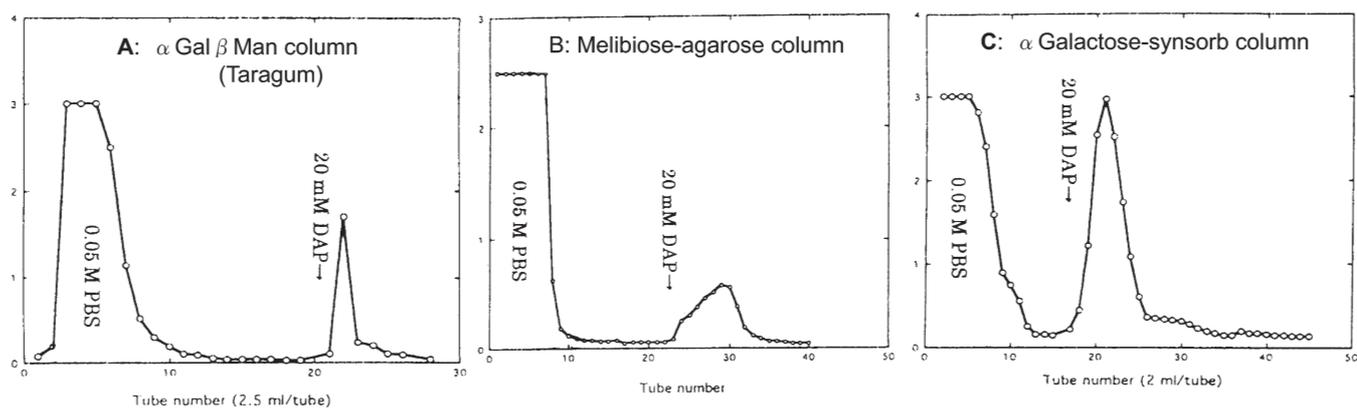


Fig. 5 Affinity Chromatographic Separation of Mukago Lectin.



Table 1 Comparison of Amino Acid Composition of Mulago and Arrowhead α -Gal-Lectin

| Amino Acid | Mukago (mol %) | Arrowhead Tubers (mol %) |
|------------|----------------|--------------------------|
| Asx | 13.0 | 14.5 |
| Thr | 5.5 | 4.8 |
| Ser | 12.4 | 7.6 |
| Glx | 12.3 | 13.9 |
| Gly | 14.4 | 10.1 |
| Ala | 9.3 | 6.2 |
| Val | 5.3 | 6.6 |
| Met | N.D. | 1.9 |
| Ile | 4.1 | 3.4 |
| Leu | 7.1 | 8.3 |
| Tyr | 1.2 | 3.7 |
| Phe | 3.5 | 5.4 |
| His | 1.6 | 3.0 |
| Lys | 4.2 | 4.2 |
| Arg | 3.7 | 6.5 |
| Pro | 2.5 | ND |

Asx = Asp+Asn; Glx = Glu + Gln; ND not detected Hydrolysis Condition: 6 N HCl, 110°C, 24 h.

6. 糖鎖結合特異性

本レクチンは先述のごとく α -Gal を末端にもつヒト血液B型物質や、 α -Gal を側鎖にもつ種々の植物の galactomannan (α -GalMan), あるいはある種の微生物の酸性多糖 (脱ピルビン酸した *Klebschila* 29 a細胞外多糖など) と沈降反応を起こす (Fig. 6)。また, Fig. 5は種々の α -Gal conjugateをリガンドとしたcolumnに対する affinityを示したものである。さらに, 本レクチンをヒト血液B型物質のカラムにアプライした時の elution profileを Fig. 7に示した。ただし, 糖鎖末端が α -GalNAcとなっているA型物質をリガンドとするカラムには部分的にしか吸着されなかった。

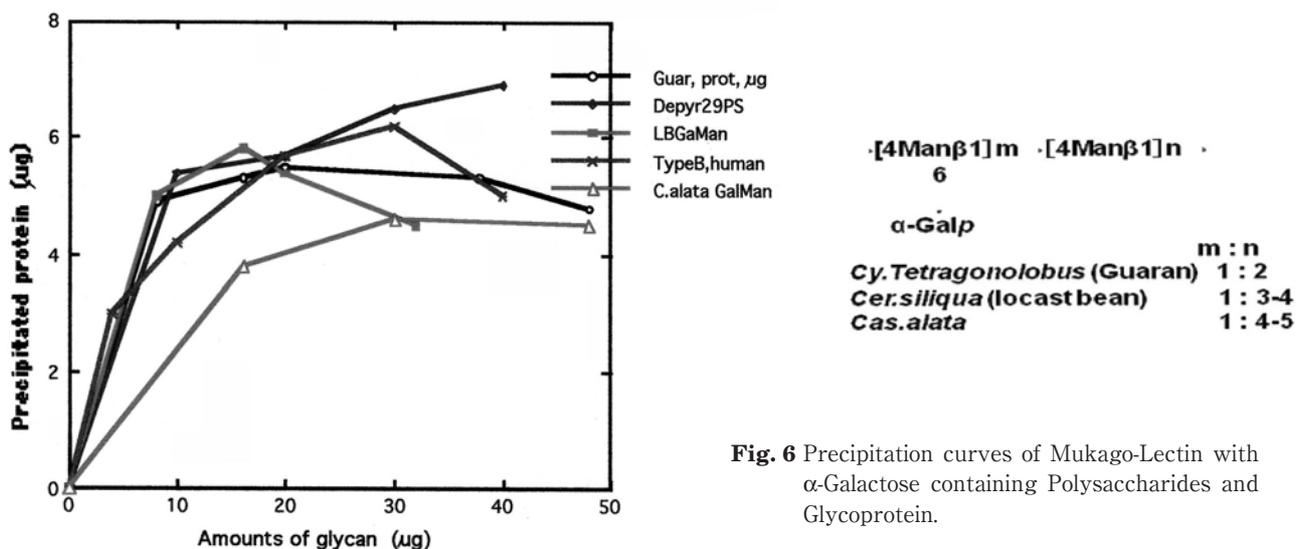


Fig. 6 Precipitation curves of Mukago-Lectin with α -Galactose containing Polysaccharides and Glycoprotein.

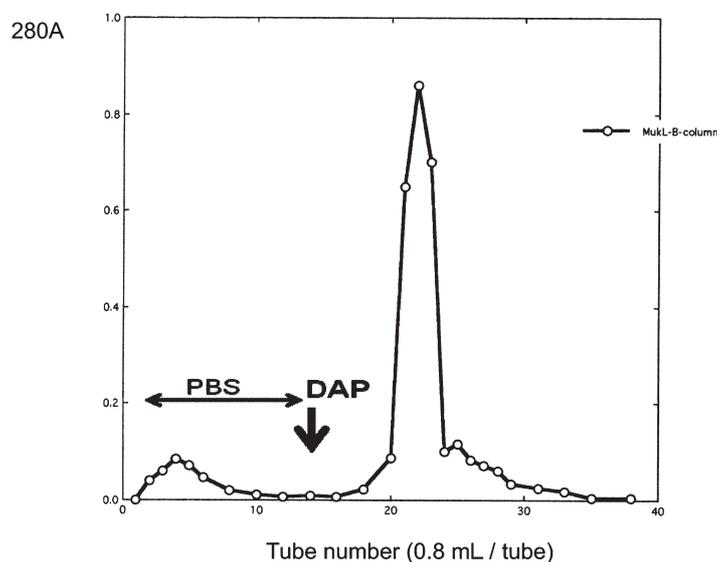


Fig. 7 Elution Profile of Mukago Lectin on Human B-substance Column (1.5 x 10 cm).

考 察

伝統的な日本人の食生活のなかで零余子飯などとして親しまれてきたムカゴは自然薯などのヤマノイモの蔓の葉脈に形成される肉芽である。ムカゴの構成成分としては、最近の食品成分表によると、水分75%の他に、糖質20.6%、蛋白質2.9%、脂質0.2%、ミネラルとしてはK 570 mg, Na 3 mg (100 mg中)を含み、大凡の組成は根茎と大差はないようである。一方、植物学的にはムカゴは原始的ではあるが、それ自身、有効な自己繁殖の機能を内包しているように見える。当初、我々は、伝統的な食品素材に潜在する生物機能に関連して、ムカゴの発芽と生育に関与する、構成成分、とくに、糖質(澱粉)や内在する酵素などに興味を持った。その過程でムカゴにはクワイ根塊と同様に α -Galに特異的なレクチンも存在することに注目して研究を行った。そこで、新鮮なムカゴをホモゲナイズし、澱粉を分離した後、硫酸分画で得られる蛋白から β -シクロデキストリン(CD)のカラムによって先ず酵素(amylase)を吸着分離した。 α -1, 4 glucosylの環状結合物であるCDを分解しない点から、当初この酵素は β -amylaseの可能性もあったが、種々の基質特異性から α -amylaseと証明された。

次に、CDカラムに非吸着の蛋白画分を不溶化したタラガムなど、 α -Galを末端にもつ、種々のconjugateをリガンドとするaffinity columnを用いて α -Gal-Lecを選択的に分離精製することができた。

ムカゴの α -Gal-Lecは電気泳動的に均一な38 kDaの二量体(Mw 7.2万)で、先にクワイから精製したレクチン⁴⁾とアミノ酸組成、糖含量など化学的性質が類似していた。参考までにTable 2にはこれまでに我々が精製した樫の実⁵⁾、クワイおよびムカゴの α -Gal-Lecの化学的性質を比較した。いずれのレクチンも α -Galに対する結合特異性はよく似ており、 α -Galを側枝に持つGalactomannanやKlebschira (29a株)のGalacto-glucurono-mannanなどと結合する。さらに、複合糖脂質として末端に α -Galのついた血液型B物質とも特異的に結合するが、 α -GalNAcを持つA型物質に対する認識性は弱かった。

一般に植物中のこれらの糖鎖に特異的なレクチンの存在は感染などに対する生体防御作用にあると云われる。その他に、ムカゴの α -Gal-Lecなどでは、地上に落ちて発芽する際周辺の高等植物への接着寄生など、潜在的な機能も想定できる。

次に本研究の結果から惹起された別の興味は、ムカゴに含まれる多糖、とくに澱粉の性状と内在するAmylaseの澱粉に対する作用形式であった。いわゆる、薯蕷などヤマノイモの根茎にはアセチル化Mannanと蛋白¹⁾からなる、粘稠物質(とろろ)が含まれているが、ムカゴにはこのような粘性物質は存在せず、多糖のほとんどは、通常の澱粉と若干異なる鎖状構造を持つ澱粉であると考えられた。すなわち、沃度呈色反応はアミロースに近く、また、thymolとcomplexを形成すること、さらに、 α -1,6分岐を切断する酵素を作用させると、オリゴ糖としてDP3ないし4の短いunit-chainのみが遊離する事などから、多数の短い枝がついた鎖状構造であると推定される。また、ムカゴからの精製Amylaseは唾液型とカビ型の中間的な分解パターンをもつ分解形式を持つことが分かった。この酵素をムカゴ澱粉に作用させると急速にG2, G3およびG4が遊離する。このことは、ムカゴの発芽に際して、澱粉が内在する酵素によって容易に分解され、成長に必要なエネルギーを得るのに適したものと推定される。この点から、原始的ではあるが、ムカゴに生理的にも合理的な能力を内包しているように見える。機会があれば、今後検討を加えてみたい。

Table 2 Comparison of Properties of α -Galactose-binding Lectin

| | Kaya | Arrowhead | Mukago |
|----------------|-------------------------|---|--------------------------|
| Botanical name | <i>Torreya nucifera</i> | <i>Sagittaria trifolia</i> L.var. <i>sinensis</i> Makino | <i>Dioscorea batatas</i> |
| Part | Seed | Tuber | Bulbil |
| MW | 150,000 | 52,000-54,000 | 72,000 |
| Subunit | 37.6 kDa | 26 kDa | 38 kDa |
| | Tetramer | Dimer | Dimer |
| Sugar cont. | 6.4 % | 6.2 % | 5.4 % |
| Sugar ratio | Man:GlcNAc:Fuc 4:2:1 | Man:GlcNAc 3:2 | Man:GlcNAc 2.5:1.0 |

要 約

ヤマノイモの葉脈に形成されるムカゴからユニークな特性を持つ澱粉分解酵素(アミラーゼ)と α -Galactoseに特異的なレクチン(α -Gal-Lec)をaffinity columnを用いて分離精製し、性質を調べた。

1. β -cyclodextrinのカラムに吸着したアミラーゼはSDS PAGEで均一なバンド(31 kDa)を示し、澱粉および種々のマルチオリゴ糖に対する作用から唾液型とカビ型(Takaamylase)の中間型の α -アミラーゼと考えられる。

2. ヤマイモの根茎と異なりムカゴには粘性のマンナン-蛋白は存在しない。

大部分が澱粉であるが、化学的およびイソアミラーゼなどの分岐切断酵素の作用などから、比較的短い側鎖のついた鎖状構造で発芽に際して容易に酵素分解を受けることが示唆された。

3. α -Galactoseに特異的なレクチンはSDS PAGE上で均一で38 kDaのsubunitの二量体である。クワイなどのレクチンとよく似た糖蛋白で、そのアミノ酸組成、糖鎖認識特異性も類似している。

4. このレクチンは植物のガラクトマンナンなど α -Galを側鎖にもつ多糖や、ヒトB型物質に特異的に反応するが、A型物質との反応性は弱い。

終わりにアミノ酸分析を担当された大阪市大小西洋太郎教授に謝意を表します。

参考文献

- 1) Misaki A, Ito T, Harada T (1972) Constitutional studies on the mucilage of “Yamanoimo”, *Dioscorea batatas* Dence. *forma* Tsukune: Isolation and structure of a mannan. Agr. Biol. Chem 36: 761 - 771.
- 2) 平家物語巻六, 岩波文庫, 平家物語 (二): pp. 309 - 310.
- 3) Misaki A, Tsumuraya Y (1978) A new fungal α -D-glucan, elaborated by *Elsinoe leucospila*. Carbohydr. Res. 66: 53 - 66.
- 4) 三崎 旭, 中田 忍, 賀来華江, 角田万里子 (2005) クワイ塊茎からの α -xylose, α -galactoseおよび α -mannose結合レクチンの単離と特性, 微量栄養素研究 22 : 31 - 38.
- 5) 三崎 旭, 賀来華江, 角田万里子 (2001) カヤ種子に含まれる α -ガラクトースに特異的なレクチンの精製. 2001年度 日本農芸化学会 (京都) 講演要旨集 : 390.