

ソバ種実から得られる低分子性タンパク質の キチン結合活性ならびに抗真菌活性

坂本えり奈, 家本 敦子, 岡村 徳光, 堀江 登, 大杉 匡弘, 清原 利文
(武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科)

Chitin-Binding and Antifungal Properties of the Low Molecular Weight Proteins from Buckwheat Seeds

Erina Sakamoto, Atsuko Iemoto, Tokumitsu Okamura, Noboru Horie,
Masahiro Osugi and Toshifumi Kiyohara

*Department of Food Science and Nutrition,
School of Human Environmental Sciences,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663-8558, Japan*

The low molecular weight proteins which had affinity for chitin were purified in two types of crystalline forms from buckwheat seeds and named as buckwheat chitin-binding proteins I and II, BCP I and II, respectively. To elucidate biological properties of BCP II of them, chitin-binding and antifungal activities of the protein were examined in detail.

BCP II possessed the binding specificity for β -1, 4-linked N-acetylglucosamine polysaccharide, chitin, and bound to chitin, reversibly. It was found that the incubation of the protein with chitin at 30°C and pH 8.0 for 20 min was most suitable for the chitin-binding. The equilibrium absorption constant, K_a , and maximum amount of the bound protein, [PC]max, values for binding of BCP II with chitin were estimated to be 0.03 l/ μ mol and 18.2 μ mol/g, respectively. This [PC]max value indicates that approximately 87.3 mg of the protein utilizes 1 g of chitin for binding. BCP II also showed the growth inhibition against fungi, *Saccharomyces*, *Candida*, *Aspergillus* and *Penicillium* tested, though the growth of bacteria was not inhibited by the protein, suggesting that the protein may play an important role as defense protein against invasion of plant pathogenic fungi into seeds.

緒 言

キチンはアミノ糖であるN-アセチルグルコサミン残基が多数 β -(1, 4)結合した多糖類であり, 菌界, 植物界および動物界にわたって広く分布している¹⁾²⁾. 真菌類においては, キチンは生体構成成分の1つとして, 多くの場合, 細胞壁に存在しており, 本来の形態を維持したり, 外敵の化学的, 物理的あるいは機械的攻撃から自己を防御するために,

重要な役割を担っていると考えられている.

Broekaert W.F.らは, イラクサ(*Urtica dioica*)から分離した低分子性レクチン³⁾(UDA)は血液凝集活性は弱い, キチン結合と抗真菌の両活性をもつタンパク質であることを見出した. また, このレクチン(UDA)とは, 血液凝集活性を持たない点で異なる Hevein⁴⁾と呼ばれるキチン結合性の低分子抗真菌タンパク質の存在をパラゴムの木の樹液中に認めた. これらとは別に, アマランサス属, センニ

ソコク (*Amaranthus caudatus*) の種子から 2 種のキチン結合性ポリペプチド⁵⁾ (Ac-AMP1 および Ac-AMP2) を精製し、細菌と真菌に対して抗菌作用をもつことを明らかにし、これら単離した一連のタンパク質の抗菌性とタンパク質一次構造を調べ、これらは植物病原菌に対する生体防御タンパク質の 1 種であると報告している。

前報⁶⁾において、我々はキチンに結合する 2 種の低分子性タンパク質の存在をソバ種実中に認め、これらを結晶タンパク質 (BCP I および II) として精製し、2, 3 の理化学的性質を調べた。

本報では、本タンパク質の構造と機能の関係をさらに明らかにするために、主に、キチン結合活性ならびに抗菌活性に焦点をあわせ研究を行った。

方法

1. 材料

ソバ種実は前報⁶⁾において述べたものと同じ種実 (品種名; 信州大ソバ) を使用した。また、試薬類は分析用試薬あるいは試薬特級を用いた。

2. 試料の調製

前報⁶⁾において述べたように、ソバ粉からの抽出、キチンカラムによるアフィニティークロマトグラフィー、CM-セルロースカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過および結晶化によって精製した結晶試料 (BCP II) をそれ以上に精製することなく実験に供した。

3. 生物活性測定法

a キチン結合活性 ことわりがなければ、キチン結合活性の測定は次のように行った。

0.04M Britton-Robinson 緩衝液 (pH8.0) に溶解した試料溶液 (0.5mg/ml) 5ml に 50mg のキチンを加えて懸濁し、攪拌・振とうしながら、30℃、20 分間反応させた。反応液は遠心分離 (3000 回転/分、5 分間) し、得た上澄液の 280nm における残存吸光度からキチン結合活性を求めた。

b 抗菌活性 供試菌株は、酵母 2 株、カビ 4 株、細菌 4 株 (グラム陽性細菌 2 株およびグラム陰性細菌 2 株) の計 10 株を用いた。本タンパク質の抗菌力 (生育阻止) 試験は、抗生物質の試験に用いられるカップ法⁷⁾で、30℃、2~3 日間静置培養を行い阻止円の形成を観察した。

c 血液凝集活性 Peumans, W.S. および Nsimba-Lubaki, M. らの方法⁸⁾に準じて、調製した 10% 赤血球溶液 40 μ l に、試料 10mg を 1ml の生

理食塩水に溶解した溶液 160 μ l を加えて混和し、これを毛細管に入れ、1 時間放置した後、凝集活性を観察した。なお、対照として、ジャガイモレクチンを用いた。

d アンジオテンシン変換酵素阻害活性 アンジオテンシン変換酵素 (Angiotensin Converting Enzyme; ACE) の阻害活性は丸山らの方法⁹⁾に従って行った。盲検は試料の代わりに、緩衝液を用い、被検液との差から阻害率を計算した。

結果および考察

1. キチン結合性に及ぼす諸要因の検討

1) 反応 pH

BCP II のキチン結合に及ぼす pH の影響を調べるために、pH3~11 までの 0.04M Britton-Robinson 広域緩衝液を用いて、30℃、10 分間攪拌・振とうしながら反応させ、キチン結合活性を測定した。

その結果、BCP II は中性から微アルカリ領域、特に、pH8.0 付近に強いキチン結合活性を示し、アルカリ領域よりも酸性領域において、その活性はより低下の傾向を示すことが観察された (Fig. 1)。

この結果から、本タンパク質のキチンに対する結合最適 pH は 8.0 付近にあると判断した。

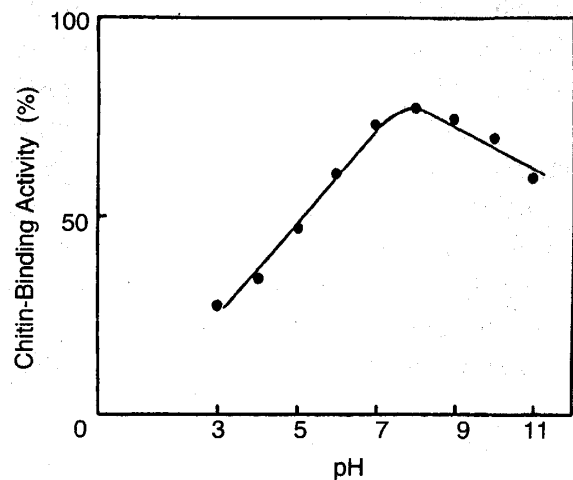


Fig. 1. Effect of Various pH's on the Binding of BCP II to Chitin. Each chitin, 50mg, suspended in 4ml of 0.04M Britton-Robinson buffer at various pH's was mixed with 1ml of the protein solution, 2.5mg/ml and the reaction mixture was incubated at 30℃ for 20min with shaking.

2) 反応温度

最適 pH である pH8.0 の上記の広域緩衝液を用い、10℃ から 80℃ までの各温度について検討した結果、Fig. 2 に示すように、10~30℃ の温度範囲ではキチン結合活性に殆ど変化はなく、40℃ 以上の温度では結合活性はやや減少する傾向が認められた。

以上の結果から、BCP II のキチン結合最適温度は 30℃ 付近であると推察した。この低い最適温度はアルカリ領域における本タンパク質の安定性に依存しているのかもしれない。

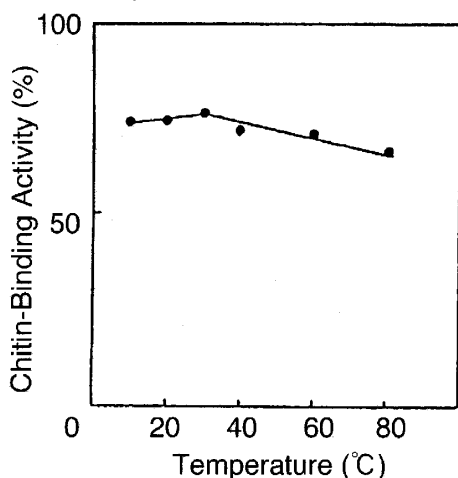


Fig. 2. Effect of Various Temperatures on the Binding of BCP II to Chitin. Incubation of the protein with chitin was performed at pH8.0 and the indicated temperatures for 20min.

3) 反応時間

既に述べた反応 pH および反応温度の結果を基に、BCP II のキチン結合に及ぼす反応時間の影響を調べたところ、時間の経過と共に結合活性は増加し、反応の開始から約 15 分で反応はほぼ完了した。したがって、以後の実験から反応時間は 20 分とした。

この 20 分間という比較的長い反応時間は、通常の溶液間の反応と異なり、個体と液体との反応に起因するためと判断された。

4) イオン強度

次に、反応に用いた Britton-Robinson 広域緩衝液 (pH8.0) のイオン強度の影響について検討した結果、用いた緩衝液 (0.01~1.0M) の濃度範囲内においては、イオン強度の影響は殆ど認められなかった。

以上の結果から、BCP II とキチンとの結合条件

は 0.04M Britton-Robinson 広域緩衝液 (pH8.0) を用い、30℃、20 分間の反応が最適であると判断した。

2. キチン結合活性

1) キチン濃度

上述のキチン結合に対する最適条件下で、キチン濃度の影響を調べた。その結果、キチン濃度の増加に伴い、結合活性は増大し、反応液 1ml (2.5mg/ml) 当たり 16mg のキチン量で約 90% の結合活性を示した。

このことから、キチンとの反応にはタンパク質 1mg 当たり少なくとも 6.5mg 以上のキチンを用いることが必要と考えられた。

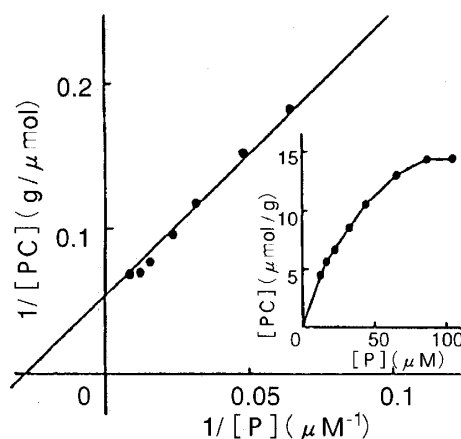


Fig. 3. Double-Reciprocal Plot of the Binding of BCP II to Chitin. Incubation of the protein with 10mg of chitin was carried out at 30℃ for 20min in 0.04M ammonium acetate buffer, pH8.0, using various amounts of the protein.

2) タンパク質濃度

次に、本タンパク質のキチンとの結合に及ぼす BCP II 濃度の影響を最適条件下で検討した。

[P] は遊離のタンパク質濃度 (μM) を、またキチン 1g に対するタンパク質の結合量 (μmol) を [PC] として求めたところ、タンパク質濃度の増加と共に、タンパク質の結合量は増加するという結果を得た (Fig. 3)。

そこで、横軸に遊離のタンパク質濃度の逆数 (X) を、また縦軸にキチンと結合しているタンパク質量の逆数 (Y) をとった結果、直線関係が得られたので、下記の Langmuir の式¹⁰⁾に従って、平衡吸着定数 (Ka) および最大キチン結合量 ([PC]max) を求め

た.

$$1/PC = 1/(K_a \cdot [PC]_{max}) \times 1/[P] + 1/[PC]_{max}$$

その結果、キチンとの親和性を表す K_a 値は $0.031/\mu\text{mol}$ と、また最大タンパク質結合量を示す $[PC]_{max}$ 値は $18.2\mu\text{mol/g}$ と算出された。この $[PC]_{max}$ 値はキチン 1g 当たり約 87.23mg の BCP II が結合することを示唆していた。

この K_a 値および $[PC]_{max}$ 値から推察して、キチンに対する親和性は決して高いとはいえない。しかし、前報⁶⁾で述べたように、pH8.0 でキチンに結合し、酸性領域(0.1M 酢酸)で解離するというこの低い親和性が温和な条件下でのアフィニティークロマトグラフィーを可能にし、本タンパク質の精製を容易ならしめたと考えられ、その親和性はアミノ酸組成およびアミノ酸配列に依存しているものと推察された。

Table 1. Growth Inhibition of Various Microorganisms by BCP II.

Microorganisms	MIC
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AKU 4100	<1
<i>Candida utilis</i> IFO 0619	<2
<i>Rhizopus javanicus</i>	<2
<i>Aspergillus oryzae</i>	<7
<i>Aspergillus niger</i>	<2
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<2
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO 3060	>10
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3007	>10
<i>Escherichia coli</i> K12 IFO 3208	>10
<i>Pseudomonas fluorescens</i> IFO 3081	>10

MIC; Minimum Inhibition Concentration(mg/ml)

3. 抗菌活性

BCP II の抗菌作用を調べるために、抗菌力試験を行った。その結果、用いた 10 菌株の微生物のうち、酵母およびカビに対して生育阻害を示し、抗菌作用を有することが認められたが、用いたグラム陽性およびグラム陰性の両細菌に対しては何等の生育阻止も示さなかった(Table 1 および Fig. 4)。

以上の結果から、本タンパク質は真菌類(酵母およびカビ)のようにキチンを細胞壁の構成成分とする微生物のみをターゲットとする結合特異性を有し、他のグルカンあるいはグリカンから成る細胞壁

をもつ細菌に対しては作用しない抗真菌タンパク質であることが推察された。

Broekaert, W.F. らはイラクサから得たレクチン³⁾(UDA)およびパラゴムの木から単離したタンパク質(Hevein⁴⁾)は真菌に対して、またセンニソクのポリペプチド(Ac-AMP1 および Ac-AMP2)は真菌およびグラム陽性細菌に対して作用すると報告している。Broekaert, W.F. らが得たこれらの抗菌タンパク質(UDA および Hevein)および抗菌ポリペプチド(Ac-AMP1 および Ac-AMP2)と BCP II とは非常に類似の特徴的なアミノ酸組成⁶⁾を有しており、このことは機能(抗菌作用)の点から判断して、これらのタンパク質が互いに類似の構造をもつ可能性を示唆している。

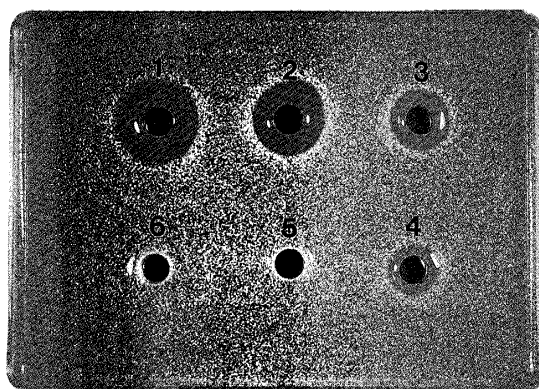


Fig. 4. Typical Growth Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* AKU 4100 by BCP II.

Numbers 1 to 6 show concentrations of the protein used; 1; 50, 2; 25, 3; 10, 4; 5, 5; 1, 6; 0, mg/ml, respectively.

4. 血液凝集活性

抗菌タンパク質の中には、レクチン³⁾(UDA)としての血液凝集活性を持つものが報告されているので、BCP II の血液凝集活性を調べたが、本タンパク質には、その作用は認められなかった。

前報⁶⁾で述べたように、BCP II はレクチンの 1 種である UDA と似たアミノ酸組成を有していたが、BCP II は血液凝集活性をもたない。このことは血液凝集活性をもつレクチン(UDA)とは、アミノ酸組成の僅かな差異が血液凝集活性の差として反映していることを示している。

5. アンジオテンシン変換酵素阻害活性

ソバの抽出液をアフィニティークロマトグラフィーに供することなくゲル濾過を行うと、本タン

パク質が溶出される画分に ACE を阻害する物質の存在が既に本研究室で認められている(未発表)。

そこで、本タンパク質の食品機能の観点から、ペプシン消化前後の ACE 阻害の有無を調べた。その結果、ペプシン消化前の intact のもの、および消化後の生成物のいずれについても、アンジオテンシン変換酵素の阻害は観察されなかった。

要 約

ソバから得られる低分子性のキチン結合タンパク質(BCP II)の構造と機能との関連性から、本タンパク質の生物活性、特に、キチン結合活性ならびに抗菌活性について実験を試みた。

その結果、BCP II とキチンとの結合の最適反応条件は pH8.0, 30℃, 20 分間であると、また緩衝液のイオン強度には殆ど影響されないことが分かった。

キチンに対する親和性を示す平衡吸着定数(Ka)は 0.03 l/ μ mol と、また最大タンパク質結合量([PC]max)は 18.2 μ mol/g と算出され、このことはキチン 1g に約 87.3mg の BCP II が結合することを示していた。

また、本タンパク質の抗菌活性を調べた結果、酵母、カビなど、細胞壁にキチンをもつ真菌類に対してのみ抗菌作用を示したことから、N-アセチルグルコサミンが β -(1, 4)結合したオリゴ糖あるいは多糖類を認識して特異的に結合するキチン結合性抗真菌タンパク質であることが示唆された。

本研究を行うにあたり、ご協力を頂いた神戸大学農学部助教授山形裕士博士ならびに鐘紡株式会社生化学研究所菅井隆二氏に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) キチン, キトサン研究会編:—最後のバイオマ—, キチン, キトサン, 技報堂, 1992 pp 1-9.
- 2) Muzzarelli R.A.A.; Chitin, Pergamon Press, New York, 1977 pp 6.
- 3) Peumans, W.J., Ley, M.D. and Broekaert, W.F., *Fed. of Eur. Biochem. Soc.*, **177**, 99-103(1959)
- 4) Parijs, J.V., Broekaert, W.F. and Peumans W.J., *Planta*, **189**, 258-264(1991)
- 5) Broekaert W.F., Marien W., Terras M.F., De Boll M.F.C., Proost J.V., Damme J.V., Dillen L., Claeys M., Rees S.B., Vanderleyden J. and Cammue P.A., *Biochemistry*, **31**, 4308-4314(1992)
- 6) 坂本えり奈, 家本敦子, 清原利文, 武庫川女子大紀要(自然科学), **46**, 11-16(1998)
- 7) 田中信男, 中村昭四郎, 抗生物質大要, 東京大学出版会, 第3版, 1985, pp19-23
- 8) Peumans, W.J. and Nsimda-Lubaki, M., *Planta*, **160**, 222-228(1984)
- 9) Maruyama, S. and Suzuki, H., *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1393-1340(1982)
- 10) Takeda D., Karita S., Takeuchi A., Ahsan M.M., Kimura T., Sakka K. and Omiya K., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1183-1185 (1996)