

サトイモの α -グルコシダーゼの精製と性質

間島英之*・山崎良樹・今野晴義

Purification and Properties of α -Glucosidase from Taro Tuber

Hideyuki MASHIMA, Yoshiki YAMASAKI and Haruyoshi KONNO

α -Glucosidase (EC 3.2.1.20) has been purified 2,500-fold from taro (*Colocasia esculanta* Shott) tuber by a procedure including fractionation with ammonium sulfate and ethyl alcohol, CM-cellulofine column chromatography, and preparative disc gel electrophoresis. The enzyme readily hydrolyzed maltose, nigerose, malto-oligosaccharides, and soluble starch. However, the enzyme hydrolyzed isomaltose only very weakly. The K_m values of the enzyme for maltohexaose and soluble starch were lower than that for maltose.

Key words: α -glucosidase, taro tuber, *Colocasia esculanta* Shott

緒 言

高等植物でのデンプンの加水分解は、最初に α -アミラーゼが作用してデキストリンを生産し、続いて β -アミラーゼ、 α -グルコシダーゼが作用してグルコースを遊離すると考えられている^{1,2)}。 α -アミラーゼは、植物生体中で生デンプンを加水分解することができる唯一の酵素であるとみなされているが、生デンプン粒を加水分解できる α -グルコシダーゼの存在がオオムギ種子³⁾とキビ種子⁴⁾で報告されている。また、イネ種子⁵⁾の α -グルコシダーゼは α -グルカンをよく加水分解し、テンサイ種子⁶⁻⁸⁾の α -グルコシダーゼは少糖類よりも多糖類によく作用する。一方、弱い β -アミラーゼ活性しか示さないライムギとオオムギ種子の変種が十分に発芽することから、 β -アミラーゼは生体内でのデンプン分解に関与せず、単なる貯蔵蛋白質であることが示唆されている⁹⁻¹²⁾。以上のように植物の生体内でデンプンがどのように分解されるかについてははまだ不明な点が多い。

本報では、デンプン分解への α -グルコシダーゼの関与の詳細を解明するための研究の一

環として、デンプン含量の高いサトイモ (*Colocasia esculanta* Shott) 塊茎に存在する α -グルコシダーゼを精製し、その諸性質に検討を加えた。

実 験 方 法

1. 実験材料と試薬

植物材料 市販の栽培用サトイモ (*Colocasia esculanta* Shott) 塊茎を用いた。

実験試薬 マルトース(H.H.H), マルトトリオース, マルトテトラオース, マルトペンタオース, マルトヘキサオース, マルトヘプタオース, イソマルトースは林原生物化学研究所, ラクトース, トレハロースは半井化学薬品株式会社, セロビオースは東京化成株式会社, ニゲロースはSigma社, CM-セルロファイン C-500は生化学工業株式会社の製品である。

2. 分析方法

α -グルコシダーゼ活性の測定 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 0.5 ml 中にマルトース 2.8 μ mole と適当量の酵素を加え、37°C で1時間反応させた。反応後、沸騰水液中に反応液を5分間浸漬して反応を停止させ、生成したグルコースを Dahlqvist¹³⁾が改変した Papadopoulos & Hess¹⁴⁾の方法で測定した。上記の反応条件下で1時間にマルトースからグルコース 1 μ mole を遊離させる酵素量を1単位とした。

蛋白質量の測定 蛋白質の定量は、Warburg & Christian¹⁵⁾の方法によった。カラムクロマトグラフィーの各々の画分の蛋白質は、280 nm における吸光度測定によった。

ディスク電気泳動 Reisfeld *et al.*¹⁶⁾の方法によりポリアクリルアミド中、pH 4.0で電気泳動を行った。

実験結果および考察

1. α -グルコシダーゼの精製

サトイモ塊茎 4 Kg を水洗後、1 M 塩化ナトリウムを含む50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.3) 10 l を加え、ミキサー(ナショナル製 MX-V253型)で破碎した。その懸濁液を 4°C で一夜静置後、不溶物をガーゼによる濾過と遠心分離(8,000 xg, 20分)で除去した。得られた粗酵素液に硫酸アンモニウムを0.9飽和まで加えた。生じた沈殿物を8,000 xg で20分間の遠心分離で集め、50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.3) に懸濁した。不溶物を8,000 xg で20分間の遠心分離で除去後、25 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.3) で一夜透析した。透析内液を 0°C 以下に保ちながら2倍量のエチルアルコールを加えた。生じた沈殿物を8,000 xg で10分間の遠心分離で集め、50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.3) に懸濁した。不溶物を8,000 xg で20分間の遠心分離で除去後、25 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.3) で一夜透析した。透析内液に同緩衝液で平衡化したCM-セルロファインイオン交換体を加え、15分間攪拌した。ガラスフィルター上での濾過によりイオン交換体を集め、1 M 塩化ナトリウムを含む同緩衝液で α -グルコシダーゼ画分を溶出した。溶出液を限外濾過器 (PM-10膜, アミコン社) で濃縮し、25 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.3) で一夜透析した。透析内液を同緩衝液で平衡化したCM-セルロファインイオン交換体カラム (4 × 30 cm) に添加した。カラムを同緩衝液で洗浄し未吸着画分を除去後、 α -グルコシダーゼ画分を同緩衝液で塩化ナトリウム濃度勾配 (0 ~ 0.8 M) によって溶出した。Fig. 1 のように3つ

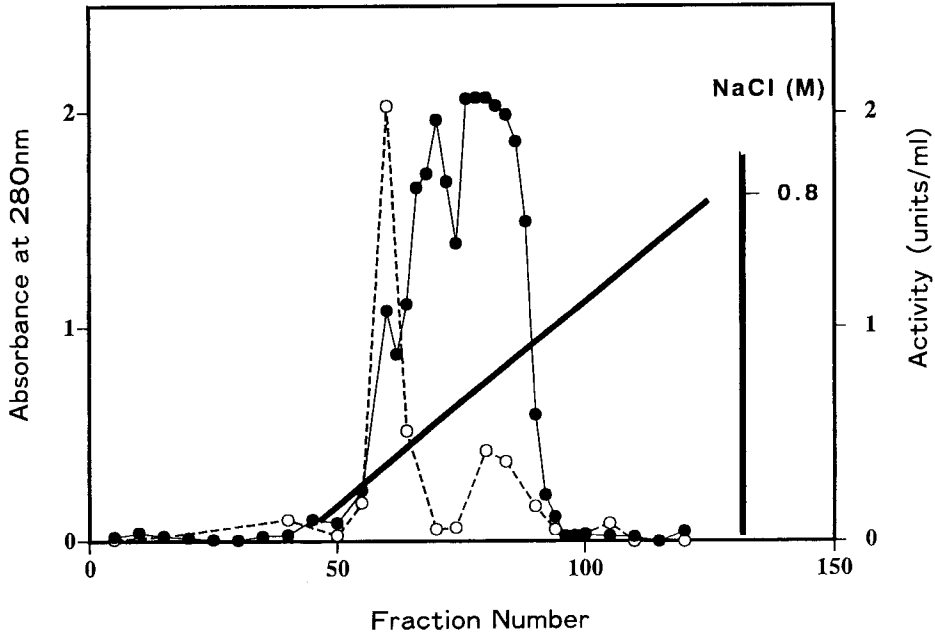


Fig. 1. CM-Cellulofine column chromatography of α -glucosidase from taro tuber. The experimental conditions are described in the text. Flow rate, about 50 mlhr⁻¹; fraction volume, 6.5 ml; ●—●, Absorbance at 280 nm; ○---○, maltose-hydrolyzing activity; -, NaCl concentration.

の蛋白質ピークに分離されたが、大部分の α -グルコシダーゼ活性は最初のピークに認められた。主要な活性画分を集め限外濾過器 (PM-10膜, アミコン社) で濃縮し、25 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.3) で一夜透析した。透析内液を調製用ディスク電気泳動でさらに精製した。泳動カラム (1.5×15 cm) に分離用ゲル16 ml と濃縮用ゲル3 ml を調整した。ゲルと電極用緩

Table 1. Summary of purification of α -glucosidase from taro tuber

Procedure	Total protein (mg)	α -Glucosidase activity		
		Total activity (units)	Specific activity (U/protein, g)	Yield (%)
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	559500	27.4	0.05	100
Ethyl alcohol fractionation	42210	14.4	0.34	52.6
CM-cellulofine column chromatography	51.7	2.8	54.16	10.2
Preparative disc gel electrophoresis	1.9	0.2	105.26	0.7

衝液は実験方法で述べたように調製した。25 mA で15時間の泳動後、分離用ゲルを0.5 cm 間隔で切り取り、磨砕後25 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.3) 5 ml に懸濁した。活性画分を集め、同緩衝液で一晩透析し、透析内液を酵素標品とした。Table 1 に本酵素標品の比活性と収率を示す。

2. α -グルコシダーゼの性質

(1)最適温度および耐熱性 標準組成の反応液を各種温度で反応させると、本酵素は50°C で最も高い活性を示した。また50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.3) で30分間各種温度で加温すると、本酵素は50°C まで約80%の残存活性を示した。

(2)最適 pH および pH 安定性 本酵素を各種 pH の50 mM Mcllvaine 緩衝液中で反応させると、pH 4.0 で最も高い活性を示した。また本酵素を各種 pH の50 mM Mcllvaine 緩衝液中で30°C、20時間処理すると、本酵素は pH 3.5-5.0 の間で安定であった。

(3)基質特異性 各種基質に対する酵素標品の作用を Table 2 に示した。本酵素は α -1,3-グルコシド結合のニゲロースに対して α -1,4-グルコシド結合のマルトースに対するのと同じ程度によく作用した。しかし α -1,6-グルコシド結合のイソマルトースには微弱にしか作用しなかった。また、 α -1,1-グルコシド結合のトレハロースにはまったく作用しなかった。一方、本酵素は α -1,4-グルコシド結合の少糖類と多糖に対しても二糖類のマルトースとほぼ同程度の分解速度および親和力を示し、6糖類のマルトヘキサオースに対する Km 値はマルトースよりも低い値であった。分子量は不明であるが、可溶性澱粉に対してもマルトースに対するよりも低いと考えられる Km 値であった。以上のように、本酵素は重合度の高い基質にも非常によく作用することから、生デンプン粒を直接加水分解できることが報告されているオオムギ種子³⁾とキビ種子⁴⁾ α -グルコシダーゼと類似した生体内での役割を演じていると推測される。

Table 2. Substrate specificity of α -glucosidase from taro tuber

	Relative rate of hydrolysis (%)	Km value (mM)
Maltose	100.0	0.854
Isomaltose	5.8	
Nigerose	123.2	
Trehalose	0.0	
Cellobiose	0.0	
Lactose	0.0	
Maltotriose	109.6	
Maltotetraose	91.8	0.600
Maltopentaose	118.8	0.577
Maltohexaose	90.0	
Maltoheptaose	99.4	
Soluble starch	98.2	0.500*

The reaction mixture (0.5 ml) containing 0.2 ml of enzyme solution (0.006 units), 0.1 ml of 1% substrate solution and 0.2 ml of 50 mM acetate buffer was incubated at 37°C for 1 hr.

*, mg/ml

(4)金属イオンによる影響 本酵素を各種の5 mM 金属イオン溶液中で37°C, 30分間処理すると, 本酵素は K^+ , Na^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , EDTA で影響を受けなかったが, Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} で阻害された。

摘 要

里芋塊茎を破碎し, その抽出液から α -グルコシダーゼを硫酸分画, エチルアルコール分画, CM-セルロフアインカラムクロマトグラフィー, 調製用ディスク電気泳動により約2,500倍に精製した。本酵素はニゲロースに対してはマルトースと同程度に作用したが, イソマルトースに対する作用は非常に弱く, トレハロースにはまったく作用しなかった。本酵素は少糖類や多糖類にもよく作用し, マルトヘキサオースや可溶性澱粉に対してはマルトースと同程度の相対速度比と, むしろ低めの K_m 値を示した。このことから本酵素が生体内で澱粉分解に密接に関わっていることが推測された。

キーワード: α -グルコシダーゼ, サトイモ, *Colocasia esculanta* Shott

文 献

- 1) Swain, R. R. and Dekker, E. E. 1966. Seed germination studies II. Pathways for degradation in germinating pea seedlings. *Biochim. Biophys. Acta* 122: 87-100.
- 2) Nomura, T., Kono, Y. and Akazawa, T. 1969. Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. II. Scutellum as the site of sucrose synthesis. *Plant Physiol.* 44: 765-769.
- 3) Sun, Z., Henson, C. A. 1990. Degradation of native starch granules by barley α -glucosidases. *Plant Physiol.* 94: 320-327.
- 4) Yamasaki, Y., Konno, H. and Mashima, H. 1996. Purification and properties of α -glucosidase from millet seeds. *Phytochemistry* 41: 703-705.
- 5) Yamasaki, Y. and Suzuki, Y. 1980. Two forms of α -glucosidase from rice seeds at the milky stage. *Agric. Biol. Chem.* 44: 707-715.
- 6) Chiba, S., Inomata, S., Matsui, H. and Shimomura, T. 1978. Purification and properties of an α -glucosidase (glucoamylase) in sugar beet seed. *Agric. Biol. Chem.* 42: 241-245.
- 7) Yamasaki, Y. and Suzuki, Y. 1980. Two forms of α -glucosidase from sugar-beet seeds. *Planta* 148: 354-361.
- 8) Yamasaki, Y. and Konno, H. 1989. α -Glucosidase of suspension-cultured sugar-beet cells. *Phytochemistry* 28: 2583-2585.
- 9) Beck, E. and Ziegler, P. 1989. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 95-117.
- 10) Daussant, J., Zbaszyniak, B., Sadowski, J. and Wiatroszak, I. 1981. Cereal β -amylase: Immunochemical study on two enzyme-deficient inbred lines of rye. *Planta* 151:

176-179.

- 11) Giese, H. and Hejgaard, J. 1984. Synthesis of salt-soluble proteins in barley. Pulse-labeling study of grain filling in liquid-cultured detached spikes. *Planta* 161 : 172-177.
- 12) Kreis, M., Williamson, M., Buxton, B., Pywell, J., Hejgaard, J. and Svendsen, I. 1987. Primary structure and differential expression of β -amylase in normal and mutant barleys. *Eur. J. Biochem.* 169 : 517-525.
- 13) Dahlqvist, A. 1961. Determination of maltase and isomaltase activities with a glucose-oxidase reagent. *Biochem. J.* 80 : 547-551.
- 14) Papadopoulos, N. M. and Hess, W. C. 1960. Determination of neuraminic (sialic) acid, glucose, and fructose in Spinal fluid. *Arch. Biochem. Biophys.* 88 : 167-171.
- 15) Warburg, O. and Christian, W. 1942. Isolation and crystallization of enolase. *Biochem. Z.* 310 : 384-421.
- 16) Reisfeld, R. A., Lewis, U. J. and Williams, D. E. 1962. Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature (London)* 195 : 281-283.