

ガマ花粉の Debranching Enzyme の精製と性質

中山章文*・井手 武**・田端司郎**

* 県立奈良病院 中央臨床検査部 〒631 奈良市平松町 127-1

** 奈良県立医科大学 化学教室 〒634 橿原市四条町 840

Purification and Some Properties of Debranching Enzyme from *Typha latifolia* Pollen.

Akifumi NAKAYAMA*, Takeshi IDE** and Shiro TABATA**

* *Department of Clinical Laboratory, Nara Prefectural Nara Hospital, Hiramatsu-cho, Nara, 631, Japan.*

** *Department of Chemistry, Nara Medical University, Kashihara, Nara, 634, Japan.*
(1990年3月13日受理)

Debranching enzyme, isoamylase, was purified from pollen grains of *Typha latifolia*. The isoamylase was homogeneous on polyacrylamide gel electrophoresis and its molecular weight was estimated to be about 100,000 by gel filtration using TOYOPEARL HW-55S. The enzyme hydrolyzed amylopectin, glycogen, their phosphorylase limit dextrins and β -amylase limit dextrins to release each oligosaccharide of outer branches.

The enzyme, however, was less active in hydrolyzing the maltosyl branch than the maltotriosyl branch of glycogen β -limit dextrin.

Key words : *Typha latifolia* pollen, Isoamylase, Debranching enzyme.

緒 言

生体中に存在する澱粉を分解消化するには α -1, 4-glucoside 結合および分枝点である α -1, 6-glucoside 結合が分解されなければならない。

ガマ (*Typha latifolia*) の成熟花粉中には多量の澱粉が含まれ、花粉の発芽の間にこの澱粉は急速に消失する。この過程で α -1, 4結合の分解には α -アミラーゼではなく、ホスホリラーゼが主として関与していることが報告されている。⁽¹⁾ この澱粉がさらに完全

に分解されるためにはアミロペクチンの分枝点の α -1, 6結合を切断する酵素, Debranching enzyme の共存が示唆される。そこでガマ花粉中の Debranching enzyme 活性を検索したところ、イソアミラーゼ (EC 3. 2. 1. 68) とブルラナーゼ (EC 3. 2. 1. 41) の2種の Debranching enzyme 活性が認められた。この報告では2種のうちのイソアミラーゼの精製とその酵素の2, 3の性質について述べる。

実験材料および方法

1. 材料

gamma花粉は1988年5月に採集されたものを名城大学農学部原彰先生より恵与され、使用時まで -20°C に保存した。

2. 試薬類

グリコーゲン (Oyster), アミロペクチン, プルラン, プルラナーゼ (*Aerobacter aerogenes*) は Nacalai tesque 社製, β -アミラーゼ (Potato), ω -Aminobutyl Agarose は Sigma chemical company 製, ホスホリラーゼ a (Rabbit muscle) は Boehringer Mannheim 社製, QAE-TOYOPEARL, DEAE-TOYOPEARL, TOYOPEARL HW-55 S は TOSOH 社製を使用した。

3. ホスホリラーゼ限界デキストリン (以下 ϕ -LD と略す) の調製

グリコーゲンおよびアミロペクチン 200 mg を 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 15 ml に溶解し, ホスホリラーゼ a 30 単位を加え 30°C で 1 時間反応後 1 l の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して室温で 24 時間透析しながらさらに反応させた。これを 100°C で 5 分間加熱し, 遠心分離して沈澱物を除去後蒸留水 1 l に対して 3 回透析した。

4. β -アミラーゼ限界デキストリン (以下 β -LD と略す) の調製

グリコーゲンおよびアミロペクチン 100 mg を 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.8) 10 ml に溶解し, β -アミラーゼ 50 単位を加え, 37°C で 1 時間反応させた。酵素を加熱失活させた後蒸留水 1 l に対して 3 回透析した。

5. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

糖分析の HPLC は, Carbowac PA-1 カラムを附した DIONEX 社, BioLC-Model 4500 i 装置を用いた。溶離液には 150 mM NaOH (A 液) と 0.5 M 酢酸ナトリウムを含む 150 mM NaOH (B 液) との直線的濃度勾配法 (最初 A 液 100% で, 30 分後に B 液 100%) を用い, 1 ml/min の流速で溶出した。糖の検出は電気化学検出器 (PAD II) (DIONEX 社) に

よった。

6. 蛋白質測定

蛋白質の測定は, 280 nm における吸光度により, Bovine serum albumin と同一の吸光係数 ($A_{280}^{1\%} = 6.6$) として定量した。

7. Debranching enzyme の活性測定

(A) プルラナーゼ活性測定 6 mg/ml のプルランを含む 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 100 μ l に酵素液 100 μ l を加えて 30°C で 24 時間反応後, 生成された還元糖を Somogyi-Nelson 法⁽²⁾によって測定した。ただし, Somogyi 液を加えた後, 100°C で 30 分間煮沸した。

(B) イソアミラーゼ活性測定 6 mg/ml グリコーゲン ϕ -LD 50 μ l と 1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 50 μ l に酵素液 100 μ l を加えて 30°C で 24 時間反応後, 100°C で 1 分間加熱し反応を停止させ, 0.025% ヨウ素溶液 200 μ l を加え, 500 nm の吸光度を測定した。

実験結果

1. Debranching enzyme の精製

gamma花粉 20 g を 400 ml の 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に懸濁させ, フレンチプレスにて破碎後, 12,000 \times g で 20 分間遠心分離した。上清 (370 ml) を 10% グリセロールを含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) (以下 10 mM Tris-glycerol 緩衝液と略す) に対して透析した。これを同緩衝液で平衡化した QAE-TOYOPEARL カラム (130 ml) に通し, 0.1 M NaCl を含む同緩衝液で洗浄した後に 0.1 M NaCl と 0.5 M NaCl を含む同緩衝液とで構成される NaCl の直線的濃度勾配法で溶出した (Fig. 1)。これを前述した 2 種の方法によって Debranching enzyme 活性を調べた。プルランを分解する画分 (プルラナーゼ) が 0.25 M NaCl 付近に溶出され, ϕ -LD のヨード呈色を増大させる画分 (イソアミラーゼ) は 0.4 M NaCl 付近に溶出された。プルラナーゼ画分はプルランに対しては高い活性を示すが, アミロペクチンや ϕ -LD にはあまり作用しないことから澱粉の分解にはイソアミラーゼが主に関与していると考えられるので,

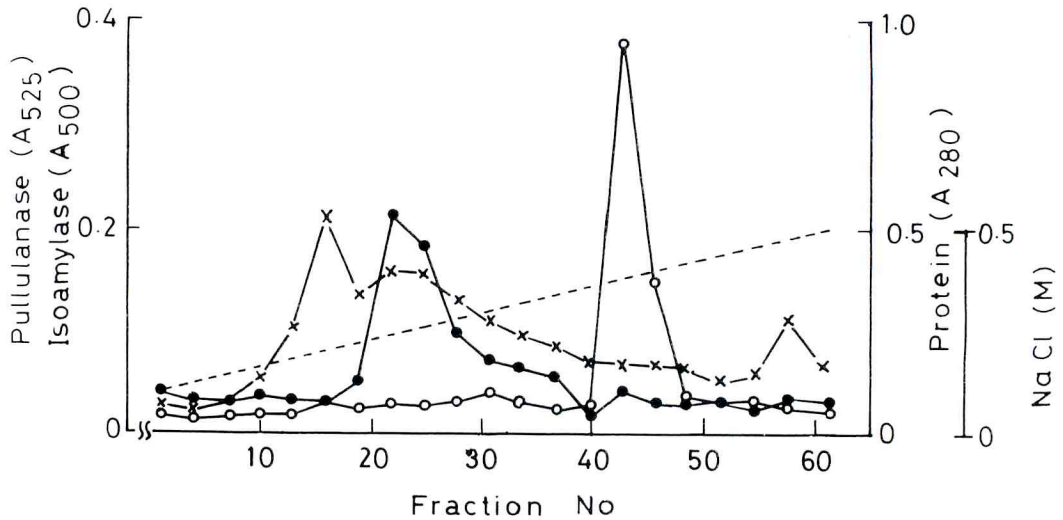


Fig. 1. Chromatography of pullulanase and isoamylase on QAE-TOYOPEARL column. Fractions of 20ml were collected. ●, pullulanase activity; ○, isoamylase activity; ×, protein (A₂₈₀); ---, NaCl concentration.

ここではイソアミラーゼについてさらに精製を行った。

QAE-TOYOPEARL カラムクロマトグラフィーによって得られたイソアミラーゼ画分を 10 mM Tris-glycerol 緩衝液に対して透析し、DEAE-TOYOPEARL カラム (10 ml) に吸着させ 0.05 M と 0.35 M NaCl を含む同緩衝液とで構成される NaCl の直線的濃度勾配で溶出した。活性画分を 10 mM Tris-glycerol 緩衝液に対して再び透析し、 ω -Aminobutyl Agarose カラム (35 ml) に吸着させ NaCl を含まない同緩衝液と 0.5 M の NaCl を含む同緩衝液とで構成される NaCl の直線的濃度勾配で溶出した。活性画分をアミコン YM 10 およびセントリコン 30 で約 1/10 量に濃縮し、それについて TOYOPEARL HW-55 S カラム (2.7 × 35 cm) を用いてゲル濾過を行なった (Fig. 2)。イソアミラーゼ活性のピークは蛋白質のピークと一致して溶出した。この活性画分をアミコン YM 10 で約 1/10 量に濃縮した。最終的に花粉 20 g から 450 μ g の精製酵素を得た。精製したイソアミラーゼをポリアクリルアミドゲル電気泳動⁽³⁾後、蛋白質染色によって調べた結果単一のバンドを示した

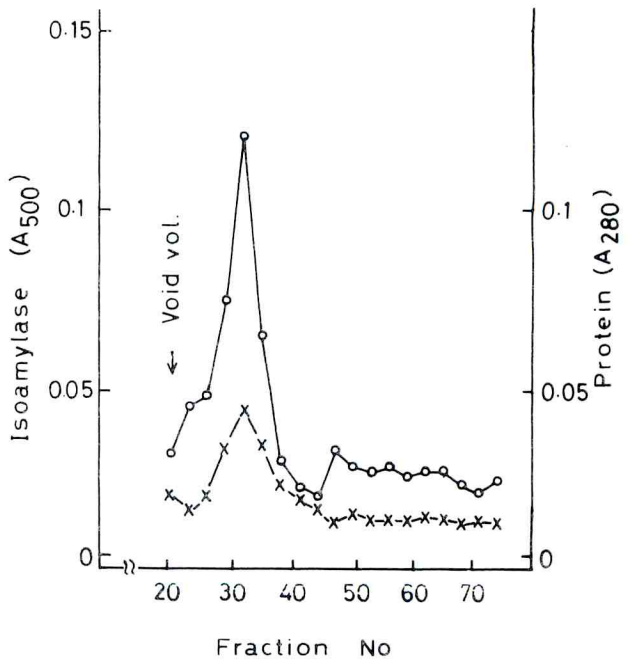


Fig. 2. Gel filtration of isoamylase with TOYOPEARL HW-55S. Fractions of 2.2 ml were collected. ○, isoamylase activity; ×, protein (A₂₈₀).

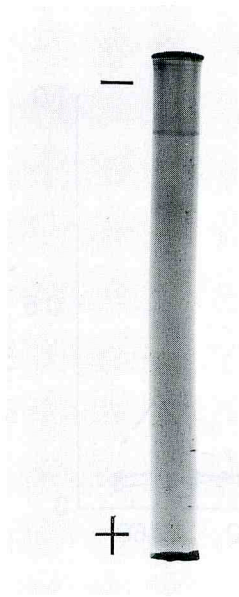


Fig. 3. Disc polyacrylamide gel electrophoresis of isoamylase. About 4 μ g of purified enzyme was electrophoresed with 7.5% polyacrylamide gel. Protein was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

(Fig. 3).

2. イソアミラーゼの諸性質

イソアミラーゼは至適 pH を 7.0 付近に有し、分子量はゲル濾過法 (TOYOPEARL HW-55 S) より約 10 万と計算された。また、イソアミラーゼをグリコーゲン ϕ -LD に作用させたときのヨード呈色の吸収スペクトルを ϕ -LD のそれと比べると極大吸収波長は長波長側に移行した (Fig. 4)。これはグリコーゲン ϕ -LD の外側の α -1, 6 結合が加水分解されることにより、枝が切り落とされ、分枝点より内部にヨードが包接された結果と考えられる。

3. 基質特異性

アミロペクチン、グリコーゲンおよびそれらの ϕ -LD、 β -LD とプルランを基質に用い、反応によって生じた還元糖を測定した (Table 1)。イソアミラーゼは各限界デキストリンよりもその起源の多糖に対してやや高い活性を示した。また、プルランに対しても他に比べて低いながらも活性を認めた。しかし酵素反

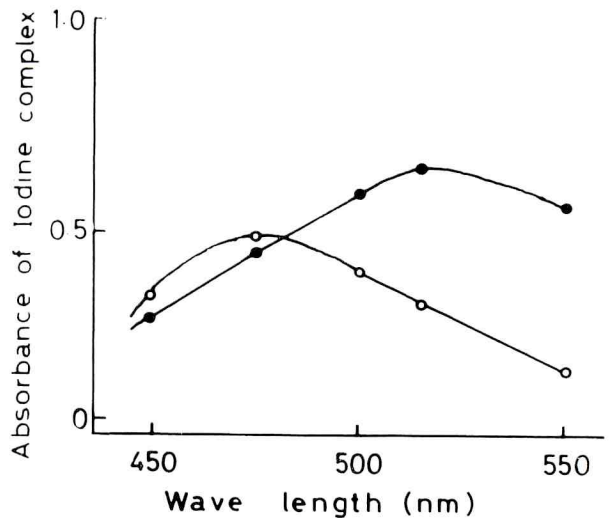


Fig. 4. Spectra of iodine complex with glycogen ϕ -LD and isoamylase treated ϕ -LD. Glycogen ϕ -LD (300 μ g) in 0.2 M acetate buffer (pH 6.0, 200 μ l) was incubated with isoamylase (25 μ g) at 30°C overnight. Then, 0.025% of iodine solution (200 μ l) was added to the reaction mixture. ○, untreated; ●, treated.

応によるグルコースの生成は、いずれの基質においても見られなかった。

次にグリコーゲンの外側の枝の長さの違によってイソアミラーゼの作用が異なるかどうかを調べるために、グリコーゲンの β -LD および ϕ -LD にイソアミラーゼを作用させたときに生成されるオリゴ糖を HPLC によって調べた。この方法⁽⁴⁾はグルコースの重合度 40 位までは検出できるが、反応の初期では ϕ -LD からはマルトテトラオースのみが、 β -LD からはマルトースとマルトトリオースが認められただけであった。この結果より、このイソアミラーゼは外側の分枝点を切断すると推定された。また β -LD に *Aerobacter aerogenes* 由来のプルランナーゼを作用させると等モルのマルトースとマルトトリオースを生成することから、外側の枝は等量のマルトースとマルトトリオースからなると考えられるが、ガンマ花粉のイソアミラーゼではマルトースよりもマルトトリオースを多く生成した (Fig. 5)。

Table 1. Substrate specificity of isoamylase

Substrate	Relative activity (%)
Amylopectin	
native	100
ϕ -limit dextrin	55
β -limit dextrin	76
Glycogen	
native	73
ϕ -limit dextrin	51
β -limit dextrin	46
Pullulan	18

Activity was assayed by the method of Somogyi-Nelson after incubating (at 30°C, for 3 hr) of each substrate (final concentration of 2.5 mg/ml and total volume of 200 μ l) in 0.1 M acetate buffer, pH 6.0, with isoamylase (18.8 μ g).

考 察

Debranching enzyme は作用機作から2つに大別されている。⁽⁵⁾ 一つはアミロペクチンやグリコーゲンの α -1,6結合の枝を直接加水分解して直鎖の maltodextrin を遊離する。これは植物、微生物に存在する酵素で起源により作用が若干異なっているが、いずれも amylopectin 6-glucanohydrolase に属するものである。他は枝の直鎖の一部 (マルトースまたは、マルトトリオース単位) を他に転移して (oligo-1,4 \rightarrow 1,4-glucantransferase), α -1,6結合としてグルコース残基のみを残し、これを amylo-1,6-glucosidase が加水分解してグルコースを遊離する。この酵素は哺乳動物、酵母に見出されている。

我々がガマ花粉より抽出して精製した Debranch-

ing enzyme は、前者の amylopectin 6-glucanohydrolase に属する。しかしプルランをあまり分解しないことからイソアミラーゼ (EC 3. 2. 1. 68) と考えられる。この酵素は、分子量約 10 万、作用至適 pH は 7.0 付近にあった。 ϕ -LD、 β -LD に対する作用から外側の α -1, 6 結合を加水分解すると考えられるが、鎖長の違いが反応の難易に関係があった。 β -LD に対しては明らかに外鎖のマルトトリオースの方がマルトースより遊離し易い (Fig. 5)。またこの ϕ -LD よりもグルコーゲンやアミロペクチンのように枝の長い方が分解し易いようである。この事実は高等植物に見出されているイソアミラーゼ⁽⁶⁾の性質と類似のものと考えられ、貝沼ら⁽⁷⁾の *Pseudomonas* のイソアミラーゼに関する報告とも一致している。ただ、作用の至適 pH が中性付近であることが、パレイショのイソ

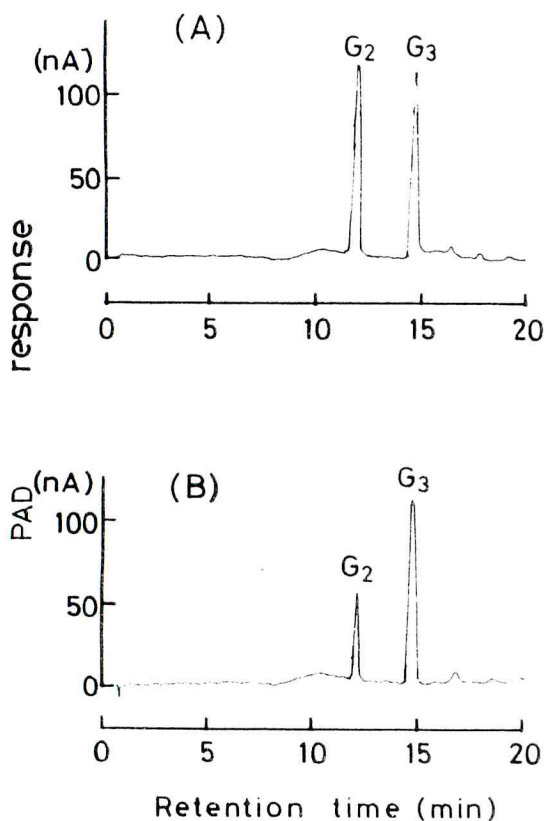


Fig. 5. Elution profiles of products from β -LD with pullulanase (*Aerobacter aerogenes*) (A) and with isoamylase (*Typha latifolia*) (B).

Glycogen β -LD (500 μ g) in 0.1 M acetate buffer (pH 6.0) was incubated at 30°C for 1 hr with pullulanase (10 μ g, final volume 100 μ l). The reaction was terminated by dipping in boiling water bath for 2 min. G₂ and G₃ on each peak indicate maltose and maltotriose. Chromatographic conditions: eluent, gradient was 100% of 150 mM NaOH at 0 time followed by a linear increase in 150 mM NaOH including 0.5 M sodium acetate (up to 100% at 30 min); flow rate, 1 ml/min.

アマミラーゼ (pH 5.5-6.0)⁽⁸⁾とは異なっていた。

ガンマ花粉の粗抽出液では Debranching enzyme の活性を測定できず、活性の測定法もヨード呈色の増大というあまり定量性のない方法を用いているので、精製の過程を正確に追うことが出来なかったが、QAE-TOYOPEARL の段階から約 100 倍精製されたものと思われる。そして 20 g の花粉 (タンパク量約 2.5 g) から出発して、ポリアクリルアミドゲル電気泳動的に均一なイソアマミラーゼ約 450 μ g が得られた。

ガンマ花粉にはホスホリラーゼが多く存在し、それが澱粉の α -1, 4 結合の切断に寄与していることから考えると、 ϕ -LD をこのイソアマミラーゼが分解するという事実から主として両者が相まって澱粉を低分子化するのであろう。

要 約

ガンマ花粉 (*Typha latifolia*) から Debranching enzyme の一つであるイソアマミラーゼをポリアクリルアミドゲル電気泳動的に単一にまで精製した。その分子量は Toyopearl HW-55S によるゲル濾過法でおよそ 10 万と推定された。この酵素はアミロペクチン、グリコーゲンや、それらから調製した ϕ -LD や β -LD の外側の枝のそれぞれに相当するオリゴ糖を遊離する作用をもっていた。しかし、枝の長さによって若干の差があり、長い方が作用し易かった。特に側鎖がマルトース残基である基質に対してはそれより鎖長の長いものに比べ分解し難かった。

文 献

- (1) Iwata, T., T. Funaguma and A. Hara: Purification and some properties of two phosphorylases from *Typha latifolia* pollen. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 407-412 (1988).
- (2) Nelson, N.: A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**, 375-380

- (1944).
- (3) Ornstein, L. : Disc electrophoresis- I Background and Theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 321-404 (1964).
- (4) Koizumi, K., Y. Kubota, T. Tanimoto and Y. Okada : High-performance anion-exchange chromatography of homogeneous D-gluco-oligosaccharides and polysaccharides (polymerization degree > 50) with pulsed amperometric detection. *J. Chromato.* **464**, 365-373 (1989).
- (5) Lee, E. Y. C. and Welan, W. J. : Glycogen and Starch Debranching Enzyme. The Enzyme Vol. 5, Academic Press, New York, pp. 192-234 (1971).
- (6) Ishizaki, Y., H. Taniguchi and Y. Maruyama : Debranching enzyme of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *J. Jpn. Starch Sci.* **30**, 19-29 (1983).
- (7) Kainuma, K., S. Kobayashi and T. Harada : Action of *Pseudomonas* isoamylase on various branched oligo and polysaccharide. *Carbohydr. Res.* **61**, 345-357 (1978).
- (8) Ishizaki, Y., H. Taniguchi, Y. Maruyama and N. Nakamura : Debranching enzyme of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Agric. Biol. Chem.* **47**, 771-779 (1983).
-

