

ガマ花粉の β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ

船隈 透・沖 論・原 彰

名城大学農学部生物化学教室

〒468 名古屋市天白区塩釜口一丁目501

(1995年9月30日 受付, 1995年11月2日 受理)

 β -*N*-Acetylhexosaminidase from *Typha* Pollen

Toru FUNAGUMA, Satoshi OKI and Akira HARA

Laboratory of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Meijo University,
Shiogamaguchi 1-501, Tempaku-ku, Nagoya 468, Japan

β -*N*-Acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52) was detected in the crude extract from *Typha* pollen. The activity decreased little by little during the cultivation of the pollen on an agar medium. The enzyme was purified about 20,000-fold with a yield of about 23%. The purified enzyme was homogeneous on polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The molecular weight was estimated to be about 120kDa by gel filtration and about 56kDa by SDS-PAGE. The enzyme showed high activities toward *p*-nitrophenyl- β -*N*-acetyl-D-glucosaminide (optimum pH 6.0; *K*_m 0.68mM) and *p*-nitrophenyl- β -*N*-acetyl-D-galactosaminide (optimum pH 4.5-5.0; *K*_m 0.83mM). The enzyme possessed weak ability to hydrolyze *N*-acetyl chitooligosaccharides.

Key words: β -*N*-Acetylhexosaminidase, Glycosidase, *Typha* pollen.

緒 言

N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) あるいは *N*-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc) は糖タンパク質、複合糖質およびスフィンゴ糖脂質など、生体において重要な機能を果たしている生体成分の主要な構成成分である。

β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ (β -HexoNAcase, EC 3.2.1.52) は β -*N*-アセチル-D-グルコサミニダーゼ (β -GlcNAcase) 活性と β -*N*-アセチル-D-ガラクトサミニダーゼ (β -GalNAcase) 活性を合わせ持っており、種々の生物に存在している。

植物では精製が試みられて性質も明らかにされている⁽¹⁻¹⁰⁾が、その生理的役割は未だに不明な点が残されている。

植物の雄性配偶体である花粉は、一般に柱頭や寒天培地に置くと吸水して直ちに発芽し、花粉管を短時間のうちに伸長させていく。その過程ではタンパク質の合成と輸送、および壁多糖の合成などが行われていると思われるが、花粉における GlcNAc と GalNAc、および β -HexoNAcase に関する知見はほとんどない。

著者は最近、ガマ花粉に β -HexoNAcase の活性を見出した。

本報告では本酵素の精製と性質について述べる。

実験材料および方法

1. 花粉

ガマ (*Typha latifolia*) の成熟花粉は 1993 年および 1994 年の 6 月に愛知県日進市および豊田市の休耕田において採取し、室温で 4 日間風乾後、使用時まで -20°C で保存した。

2. 試薬類

p-ニトロフェニル- β -*N*-アセチル-D-グルコサミニド (pNP- β -GlcNAc), *p*-ニトロフェニル- β -*N*-アセチル-D-ガラクトサミニド (pNP- β -GalNAc), 4-メチルウンベリフェリル- β -*N*-アセチル-D-グルコサミニド (MeUmb- β -GlcNAc) および 4-メチルウンベリフェリル- β -*N*-アセチル-D-ガラクトサミニド (MeUmb- β -GalNAc) は Sigma 社から購入した。他の *p*-ニトロフェニル配糖体、銀染色用キット (Sil-Best stain, タンパク質用) およびキチンはナカライテス社から購入した。また、*N*-アセチルキトオリゴ糖 (β -1,4-結合した GlcNAc のオリゴマー, β -GlcNAc_{2, 4-6}) は生化学工業社から購入した。DEAE Bio-Gel Agarose は Bio-Rad Laboratory 社から、Con A Sepharose, Epoxy-activated Sepharose 6B および HiLoad 26/60 Superdex 200pg は Pharmacia Biotech 社から、TSK gel Phenyl-TOYOPEARL 650M, TSK gel DEAE 2SW および TSK gel Amide-80 は東ソー社から購入した。また、Ultra Thimble UH 100/10 は Schleicher & Schuell 社から購入した。

3. 花粉の培養および酵素液の調製

花粉を回収する時間数に対応した枚数の直径 20cm のシャーレを用意し、1.5% 寒天のみの培地を 200ml ずつ調製後、それぞれに花粉 500mg を一様にまき、 30°C で培養した。経時的に花粉を 10mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5, 以下 A 緩衝液とする) 10ml に取り出し、氷冷下にテフロン-ガラスホモジナイザーで破碎 (3,000rpm, 10min) した。各ホモジネートを A 緩衝液に対して透析後、遠心分離 (20,000 \times g, 10 min) を行い、得られた各上清を培養に伴う β -HexoNAcase の活性変動を調べるための酵素液とした。

4. β -HexoNAcase 活性測定

5mM pNP- β -GlcNAc (または pNP- β -

GalNAc) 0.4ml および 40mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 0.5ml を 37°C に 5 分間保温した後、適当に希釈した酵素液 0.1ml を加えて反応を開始させた。その 10 分後、0.1M NaOH 1ml を加えて反応を停止させ、反応で遊離した *p*-ニトロフェノールを 400nm の吸光度で測定した。酵素の 1 単位は、上記条件下で 1 分間に 1 μ mol の *p*-ニトロフェノールを遊離するのに必要な酵素量として定義した。また、 β -GlcNAc₂ 分解活性は反応で遊離した GlcNAc を Morgan-Elson 法⁽¹¹⁾ で定量することによって測定した。キチン分解活性もこの方法によったが、基質には コロイダルキチン (Shimahara らの方法⁽¹²⁾ に準じてキチンから調製) を用いた。

5. タンパク質の測定

タンパク質量は牛血清のアルブミンを標準タンパク質として使用し、Lowry 変法⁽¹³⁾ によって測定した。また、クロマトグラムでは 280nm における吸光度で示した。

6. ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

Native-PAGE は 7.5% のポリアクリルアミドスラブゲル (10 \times 13.5cm) を用い、8.3mM トリス-ジエチルバルビツール酸緩衝液 (pH 7.0) 中で 10mA の定電流で行った。電気泳動後、ゲル中のタンパク質は銀染色した。また、ゲル上での活性の検出はゲルを 0.1mM MeUmb- β -GlcNAc (または MeUmb- β -GalNAc) を含む 40mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に 37°C で 15 分間浸した後、紫外線を照射することによって行った。

また、SDS-PAGE は Laemmli の方法⁽¹⁴⁾ に準じた。0.1% SDS を含む 7.5% ゲル (10 \times 13.5cm) を用い、0.1% SDS を含む 50mM トリス-グリシン緩衝液 (pH 8.3) 中で 15mA の通電を行った。電気泳動後はゲル中のタンパク質の検出を行った。なお、酵素は 2% SDS と 20mM β -メルカプトエタノールを含む 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) 中で 100°C , 5 分間処理した後、泳動に供した。

7. pNP- β -GlcNAc 結合 Sepharose ゲルの調製

6g の Epoxy-activated Sepharose 6B を 0.1M 炭酸ナトリウムに膨潤させた。これを、pNP- β -GlcNAc 0.1g を溶かした同液 50ml に懸濁し、 30°C で 16 時間穏やかに攪拌した。ゲルをガラスフィルター上で 0.1M 炭酸ナトリウム、水、0.1M 炭酸水素ナト

リウムおよび0.1M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) で洗浄した後、ゲル中の遊離オキシラン基を1Mモノエタノールアミンでブロックした。このゲルを水で洗浄後、カラムに充填して使用した。

8. β -HexoNAcase の精製

ガマ花粉60gをA緩衝液600mlに懸濁し、10mlずつ氷冷下にテフロンーガラスホモジナイザーで破碎した。ホモジネートをA緩衝液に対して透析後、遠心分離(20,000×g, 10min)した。得られた粗抽出液に0.1容量の1%硫酸プロタミンを滴下しながら加え、30分間静置後、遠心分離(20,000×g, 10min)した。上清をA緩衝液に対して透析後、A緩衝液で平衡化したDEAE Bio-Gel Agaroseカラム(2.5×30cm)に添加した。A緩衝液500mlでカラムを洗浄した後、A緩衝液300mlと0.5M NaClを含むA緩衝液300mlで構成されるNaClの直線的濃度勾配法でタンパク質の溶出を行った。その結果、本酵素の活性はNaCl濃度0.18M付近で溶出された。活性画分を集め、0.5M NaClを含むA緩衝液(以下B緩衝液とする)に対して透析後、B緩衝液で平衡化したCon A Sepharoseカラム(1.2×7.5cm)に添加した。B緩衝液100mlでカラムを洗浄した後、0.1Mグルコースを含むB緩衝液100mlでタンパク質の溶出を行った。その結果、本酵素の活性はグルコースを含む液を添加後、すぐに溶出された。活性画分を集め、1.2M硫酸アンモニウム(硫安)を含むA緩衝液に対して透析後、1M硫安を含むA緩衝液(以下C緩衝液とする)で平衡化したPhenyl-TOYOPEARL 650Mカラム(1.3×30cm)に添加した。C緩衝液50mlでカラムを洗浄した後、C緩衝液50mlとA緩衝液50mlで構成される硫安の直線的濃度勾配法でタンパク質の溶出を行った。その結果、酵素の活性は硫安濃度0.6M付近で溶出された。活性画分を集め、0.1M NaClを含むA緩衝液(以下D緩衝液とする)に対して透析後、D緩衝液で平衡化したDEAE 2SWカラム(0.46×25cm)に添加した。D緩衝液50mlでカラムを洗浄した後、D緩衝液60mlと0.5M NaClを含むA緩衝液60mlで構成されるNaClの直線的濃度勾配法でタンパク質の溶出を行った。その結果、酵素の活性はNaCl濃度0.2M付近で溶出された。活性画分を集め、40mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0, E緩衝液とする)に対して透析後、E緩衝液で平衡化したpNP- β -GlcNAc結合Sepharoseカラム(1.2×7.5cm)に添加した。E緩衝液50ml

でカラムを洗浄した後、E緩衝液50mlと0.2M NaClを含むE緩衝液50mlで構成されるNaClの直線的濃度勾配法でタンパク質の溶出を行った。その結果、酵素の活性はNaCl濃度60mM付近で溶出された。活性画分を集め、D緩衝液に対して透析後、Ultra Thimble UH100/10膜を用いて減圧下に約1mlに濃縮した。それをD緩衝液で平衡化したHiLoad 26/60 Superdex 200pgカラム(2.6×60cm)に添加し、ゲル濾過を行った。

9. キトオリゴ糖の酵素分解物の分析

1%*N*-アセチルキトオリゴ糖(β -GlcNAc₄, β -GlcNAc₅または β -GlcNAc₆)10 μ lに酵素30 μ l(0.1unit)と0.2M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)10 μ lを加え、37°Cで反応させた。2, 4, 8時間後に反応液10 μ lを分取してモルカットUFP1TGC24膜を用いて加圧濾過し、酵素を除去した。濾液をアセトニトリル-水(75:25,v/v)で10倍に希釈し、その10 μ lを同溶媒で平衡化したTSK gel Amide-80カラム(0.46×25cm)にアプライし、TRIOTAR-Vを用いて60°C, 1ml/minの流速で高速液体クロマトグラフィ(HPLC)を行った。溶出液中の糖はUVIDEC 100Vを用いて210nmでの紫外吸収で測定し、標準物質との保持時間の比較から同定した。

実験結果

1. 培養に伴う β -HexoNAcaseの活性変動

ガマ花粉を培養して経時的に採取後、酵素液を調製し、 β -HexoNAcaseの活性を調べた。Fig.1に示すように、pNP- β -GlcNAc分解活性、すなわち β -GlcNAcase活性は培養していない成熟花粉で最も高かった。そして花粉が発芽して花粉管を伸長させはじめた培養1時間後には約6%減少し、培養4時間と8時間後にはさらに減少してそれぞれ成熟花粉の約75%と約50%になった。pNP- β -GalNAc分解活性、すなわち β -GalNAcase活性もほぼ同様にすこしずつ減少した。また、A緩衝液で抽出されなかった画分(不溶性画分)では両活性とも、成熟花粉では可溶性 β -GlcNAcaseの活性の約12%しかなく、その値は培養を通じてほぼ一定であった。

2. β -HexoNAcaseの精製

β -HexoNAcaseは、ガマの成熟花粉からA緩衝液で抽出してプロタミン処理後、DEAE Bio-Gel

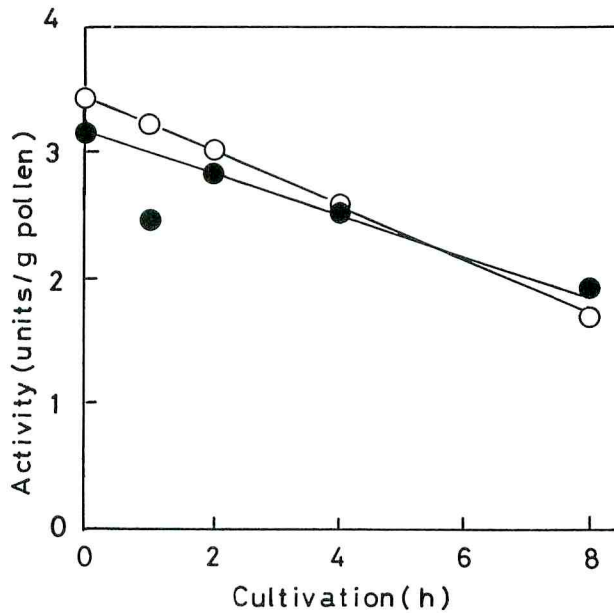


Fig. 1. Changes in β -HexoNacase activity during cultivation of *Typha* pollen on an agar medium. Five hundred mg of *Typha* pollen grains was cultured on a 1.5% agar medium without any nutrients at 30°C for the indicated time, harvested in 10ml of 10mM tris-HCl buffer (pH 7.5) and disintegrated for 10min with a teflon-glass homogenizer. The homogenate was dialyzed against the same buffer and centrifuged at 20,000 \times g for 10min. Activity in the supernatant was measured. Each activity was expressed as units per whole cells cultured. (○), β -GlcNAcase activity; (●), β -GalNAcase activity.

Agarose, Con A Sepharose, Phenyl-TOYOPEARL 650M, DEAE 2SW, pNP- β -GlcNAc 結合 Sepharose および Superdex 200pg の各カラムクロマトグラフィを順次行って精製した。本酵素は各クロマトグラフィにおいて1つのピークとして溶出された。精製の最終ステップの結果を Fig. 2 に示す。活性は1つのシャープなピークとして溶出され、その位置および溶出パターンはタンパク質のものとよく一致した。精製の概略を Table 1 に示す。本酵素は高度(約20,000倍)に精製され、収率は約23%であった。

最終精製標品を用いて Native-PAGE を行った結果、Fig. 3 に示すように、タンパク質と活性 (β -GlcNAcase および β -GalNAcase) はいずれも同じ位置に単一のバンドを与えた。

3. 本酵素の分子量

本酵素の分子量は、Fig. 4 (A) に示すように、

Superdex 200pg によるゲル濾過法から約 120kDa と見積もられた。また、SDS-PAGE では、Fig. 4 (B) に示すように、約 56kDa と算出された。

4. 本酵素の一般的性質

最適 pH は、Fig. 5 (A) に示すように、 β -GlcNAcase 活性については 6.0 であるのに対して β -GalNAcase 活性では 4.5-5.0 であり、両者で異なっていた。

pH 安定性は、Fig. 5 (B) に示すように、両活性とも pH 5.5-pH 8.0 で認められたが、pH 4.5 と pH 9.0 では活性が約 40% 低下した。

また、酵素を 45°C - 60°C で 10 分間加熱した後、活性を測定したところ、両活性とも 50°C までは 80% 以上、55°C では 70% 残存していたが、60°C では 75% 失活した。

金属イオンでは、1mM の Ca^{2+} 、 Mg^{2+} および

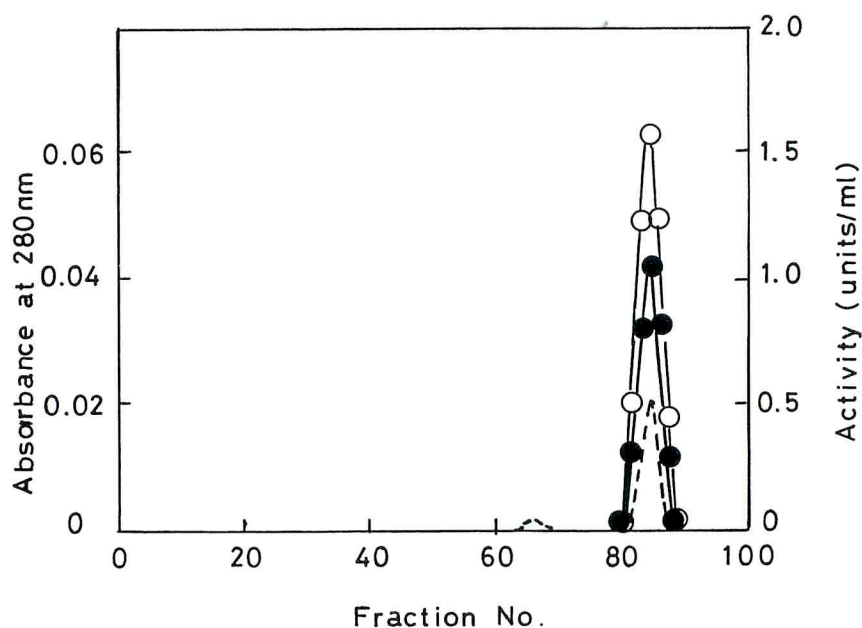


Fig. 2. Gel-filtration of β -HexoNAcase fraction through a column of Superdex 200pg. β -HexoNAcase obtained from the affinity chromatography on a pNP- β -GlcNAc-Sepharose column was filtered through a column of a Superdex 200pg. Fractions of 2ml were collected. (○), β -GlcNAcase; (●), β -GalNAcase; (---), absorbance at 280nm.

Table 1. Summary of purification of enzyme from *Typha* pollen

Step	Protein (mg)	β -GlcNAcase			The ratio of β -GlcNAcase activity to β -GalNAcase activity *
		Activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	
Crude extract	3880	60.1	0.015	100	1.1
Protamine treatment	2210	65.4	0.030	109	1.2
DEAE Bio-Gel Agarose	122	62.9	0.516	105	1.7
Con A Sepharose	7.06	36.6	5.18	60.9	1.4
Phenyl-TOYOPEARL 650M	0.37	25.4	68.6	42.3	1.7
DEAE 2SW	0.21	23.3	111	38.8	1.4
pNP- β -GlcNAc-Sepharose	0.080	15.7	196	26.1	1.5
Superdex 200pg	0.044	13.5	307	22.5	1.4

* Both activities were measured at pH 6.0.

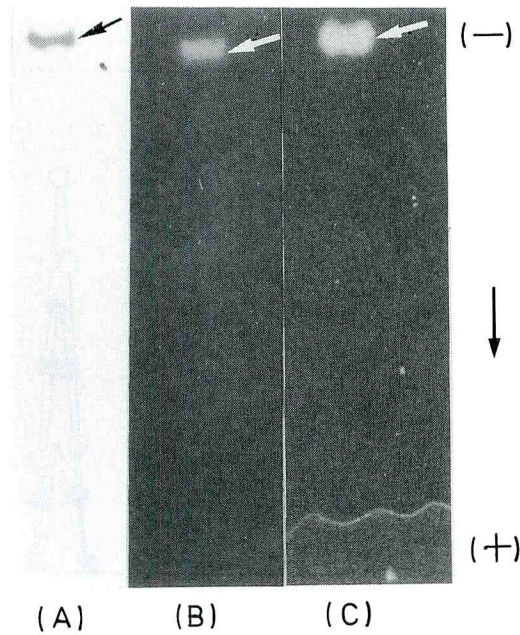


Fig. 3. Native-PAGE of the purified enzyme. The purified enzyme was run on a 7.5% native-polyacrylamide gel at a current of 10mA in 8.3mM tris-diethylbarbituric acid buffer (pH 7.0). After electrophoresis, protein was stained with Sil-Best stain, β -GlcNAcase (or β -GalNAcase) activity was detected by UV irradiation after incubating the gel with 0.1mM MeUmb- β -GlcNAc (or MeUmb- β -GalNAc) in 40mM sodium acetate buffer (pH 6.0) for 15min. (A), protein; (B), β -GlcNAcase activity; (C), β -GalNAcase activity. Arrows indicate the position of the enzyme.

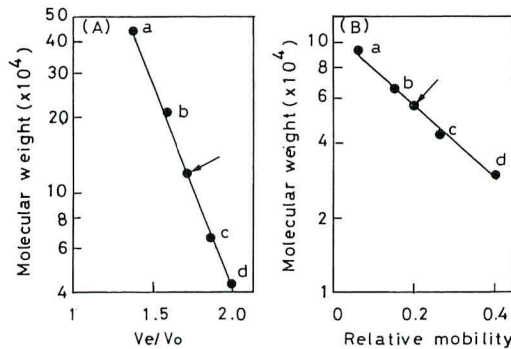


Fig. 4. Estimation of molecular weight of the purified enzyme. (A), The molecular weight of the enzyme was estimated by the gel filtration method using a Superdex 200pg column. Standard proteins:a,ferritin (440kDa);b,catalase (210kDa);c,bovine serum albumin (67kDa);d,ovalbumin (43kDa). (B), That of denatured enzyme was estimated by SDS-PAGE. Standard proteins:a, phosphorylase b (94kDa);b,bovine serum albumin (67kDa);c,ovalbumin (43kDa);d,carbonic anhydrase (30kDa). Arrows indicate the position of the enzyme.

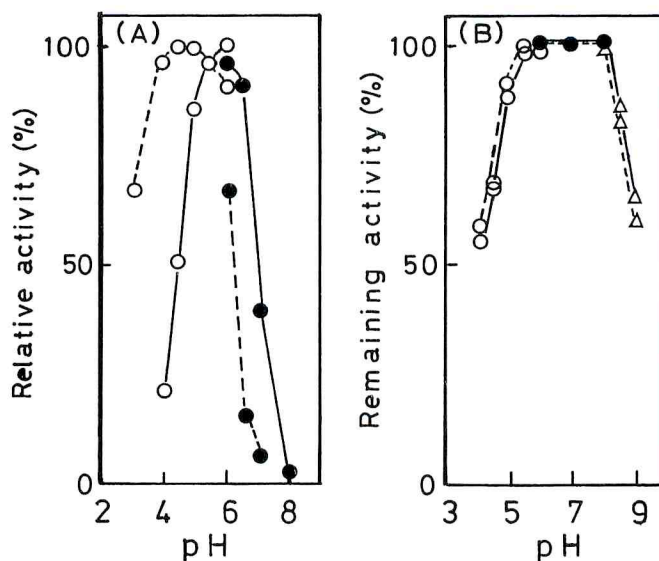


Fig. 5. Effect of pH on the activity and stability of the enzyme. (A), Activity was measured under the standard assay conditions except for the use of 40mM buffers at indicated pHs. (B), The enzyme was kept in 10mM buffers at indicated pHs at 4°C for 24hours and remaining activity was measured under the standard assay conditions. Buffers used;(○), sodium acetate buffer (pH 3.0-6.0);(●), potassium phosphate buffer(pH 6.0-8.0);(△),tris-HCl buffer (pH 8.0-9.0).(-), β-GlcNAcase activity; (---), β-GalNAcase activity.

Table 2. Substrate specificities of the purified enzyme

Substrate (2mM)	Relative activity (%)
pNP-β-GlcNAc	100
pNP-β-GalNAc	71
pNP-α-GlcNAc	0.21
pNP-β-Glucopyranoside	0
pNP-β-Galactopyranoside	0.11
pNP-α-Mannopyranoside	0.83
pNP-β-Mannopyranoside	0.40
pNP-β-Xylopyranoside	0.17
pNP-β-D-Fucopyranoside	0.64
pNP-α-L-Fucopyranoside	0.67
β-GlcNAc ₂	0.1

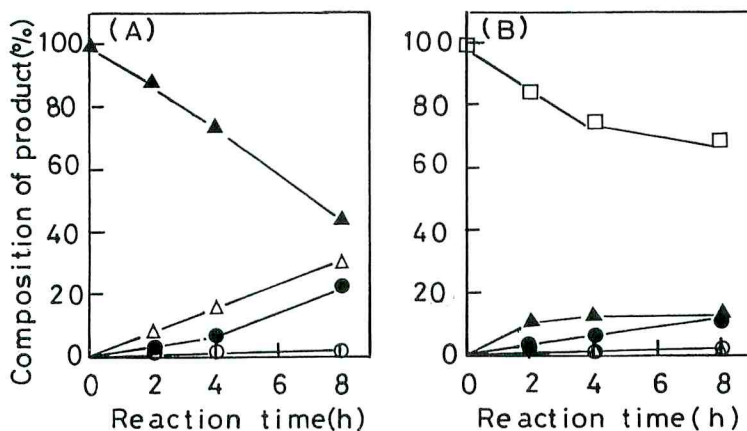


Fig. 6. Time-courses of degradation of *N*-acetylchitooligosaccharides by the enzyme. The enzyme was incubated with 0.2% β -GlcNAc₄ (or β -GlcNAc₅) in 40 mM sodium acetate buffer (pH 6.0) at 37°C. The reaction mixture of 10 μ l was removed at the indicated times and filtered through a membrane (cut-off molecular weight, 10,000; UFP1 TGC24, Millipore). The filtrate was diluted 10-fold with acetonitrile-water (75:25, v/v) and the sugar products were separated by a TSK gel Amide-80 column (0.45 \times 25cm) at a flow rate of 1.0ml/min. The elution was monitored at 210nm. (A), degradation of β -GlcNAc₄; (B), that of β -GlcNAc₅. (●), β -GlcNAc; (○), β -GlcNAc₂; (△), β -GlcNAc₃; (▲), β -GlcNAc₄; (□), β -GlcNAc₅.

Co²⁺ は両活性に対して影響はあまりみられなかったが、1mM の Cu²⁺、Cr³⁺ および Fe³⁺ は両活性を 50–70% 阻害した。

5. 本酵素の基質特異性と *km* 値

本酵素の基質特異性について調べた。Table 2 に示すように、本酵素は *p*-ニトロフェニル配糖体では、pNP- β -GlcNAc と pNP- β -GalNAc に対して極めてよく作用し、測定した pH (6.0) での両活性の比は約 100:70 であった。その他に、いくつかの配糖体に作用したが、活性は弱かった。また、天然物質の β -GlcNAc₂ に対して本酵素を作用させたところ、極めて弱い活性が認められた。

pNP- β -GlcNAc、pNP- β -GalNAc および β -GlcNAc₂ に対する本酵素の *km* 値は Lineweaver-Burk プロットから、それぞれ 0.68mM、0.83mM および 1.26mM と算出された。

6. 本酵素の *N*-アセチルキトリゴ糖に対する作用

N-アセチルキトリゴ糖に本酵素を作用させ、その分解物を HPLC で分析した。Fig.6 の (A) と (B) に示すように、基質の β -GlcNAc₄ と β -GlcNAc₅ は反応とともに次第に減少した。かわって経時的に増加したのは、 β -GlcNAc₄ からは β -GlcNAc と β -GlcNAc₃ であり、 β -GlcNAc₅ からは β -GlcNAc と β -GlcNAc₄ であった。 β -GlcNAc₂ は、この条件下ではほとんど生産されなかった。また β -GlcNAc₆ から経時的に増加したのは β -GlcNAc だけであった。このように β -GlcNAc が経時的に増加するという事実は本酵素がこれらの基質に対してエキソ的に作用することを示唆している。しかし、コロイダルキチンには作用しなかった。

考 察

ガマ花粉に見出した β -HexoNAcase は、花粉の

発芽および花粉管の伸長に伴い、減少する傾向にあったことから、主として花粉発芽の初期に機能している可能性がある。この酵素はガン花粉から抽出後、各種クロマトグラフィを行い、約 20,000 倍に精製された。今までに報告されている植物起源の酵素が 30-3000 倍程度に精製されている⁽¹⁻¹⁰⁾のに比べると、本酵素の精製度合いはかなり高いといえる。得られた酵素は Native-PAGE で 1 本のタンパク質バンドを与え、それと同じ位置に β -GlcNAcase と β -GalNAcase の活性が検出されたので電気泳動的に均一であると判断した。 β -GlcNAcase と β -GalNAcase の活性の比は、各クロマトグラフィを通じてほぼ一定 (1.4-1.7) であり、精製標品も約 1.4 (測定 pH 6.0) であった。この値はコムギ葉の酵素の 1.1⁽¹⁾と似ていた。それに対して、ナタマメ種子の酵素では約 2.2⁽²⁾、エンドウ種子とルピナス種子のアイソザイムはそれぞれ 4.0-12.9⁽³⁾と 1.9-4.8⁽⁴⁾の値を示す。このように β -HexoNAcase は 2 つの活性を有しているが、コムギ葉の酵素では 2 つの活性の触媒部位が同一であると報告されている⁽¹⁾。また、 β -HexoNAcase と似た酵素に β -GlcNAcase (EC 3.2.1.30) があるが、この酵素には β -GalNAcase 活性を有するものもあることが知られており、牛精液の酵素では両活性の比は約 3.3 の値を示すと報告されている⁽¹⁵⁾。

分子量についてはガン花粉の酵素はゲル濾過法では 120kDa、SDS-PAGE では 56kDa と算出された。このことから、本酵素はホモ二量体であると考えられる。この結果はウズラマメの酵素 (分子量が 53kDa のサブユニットの二量体)⁽⁵⁾とよく似ているが、62kDa と 64kDa の異なるサブユニットからなるエンドウ種子のアイソザイムの 1 つ (β -HexoNAcase-II) とは違う⁽³⁾。また、ナタマメ種子⁽²⁾、ヒマの実⁽⁶⁾および綿⁽⁷⁾の酵素 (分子量 100-125kDa) とも似ているが、これらのサブユニット構造については不明である。

ガン花粉の酵素は pH 安定性や温度安定性に関しては両活性で同一の挙動を示したが、最適 pH については β -GlcNAcase 活性が pH 6.0 であるのに対して、 β -GalNAcase 活性が pH 4.5-5.0 と異なっていた。他の植物の酵素でも、同様に、 β -GlcNAcase 活性の最適 pH の方が高いことが報告されている⁽¹⁻⁹⁾。なぜ同一酵素でありながら、2 つの活性の最適 pH が異なるかは明確でないが、生体内では水素イオン濃度に依存した機能の分担があるのかもしれない。

ガン花粉の酵素は pNP- β -GlcNAc と pNP- β -

GalNAc に対して強い活性を示した。その他、pNP- α -マンノピラノシドや数種の配糖体に対して弱い活性を示したが、これらの弱い活性が、本酵素の作用によるものかどうかは更に検討を要する。また、本酵素は天然物質の β -GlcNAc_{2,4-6} に対しても弱いながらも作用することがわかった。このような *N*-アセチルキトオリゴ糖に対する弱い活性は、コムギ葉⁽¹⁾やコロハの発芽種子⁽¹⁰⁾の酵素でも観察されている。ガン花粉の酵素が生理的条件下で *N*-アセチルキトオリゴ糖を分解できるかは不明であるが、コムギ葉の酵素は葉のカビに対する自己防御機構に関係しているらしい⁽¹⁾。一方、ナタマメ種子の酵素は、*N*-アセチルキトオリゴ糖を分解できない⁽¹⁶⁾が糖タンパク質の糖鎖を分解することができ⁽²⁾、糖鎖の構造研究にも利用されている。このような糖鎖分解作用をもつ酵素はこの他にも知られている^(17, 18)。糖タンパク質の糖鎖などには一般に α -マンノースも含まれているが、ガン花粉には β -HexoNAcase より強い α -マンノシダーゼ活性が含まれている (未発表データ) ことから、ガン花粉ではこれらの酵素が連係して β -GlcNAc や β -GalNAc を含む糖質の代謝に関わっている可能性が考えられる。

要 約

ガン (*Typha latifolia*) 花粉に β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼを見出した。本酵素活性は、寒天培地上での花粉の発芽および花粉管伸長に伴って徐々に減少した。本酵素は高度 (約 20,000 倍) に精製され、標品は Native-PAGE で均一であった。本酵素の分子量はゲル濾過法で 120kDa、SDS-PAGE で 56kDa と見積もられた。本酵素は *p*-ニトロフェニル- β -*N*-アセチル-D-グルコサミニドと *p*-ニトロフェニル- β -*N*-アセチル-D-ガラクトサミニドに対して最もよく作用し、前者に対する最適 pH は 6.0、*km* 値は 0.68mM であったが、後者に対する最適 pH は 4.5-5.0、*km* 値は 0.83mM であった。本酵素は、また、*N*-アセチルキトオリゴ糖に対しても弱いながらも作用した。

本研究の一部は名城大学の学術研究助成費によって行われた。

引用文献

(1) Barber, M.S. and J.P. Ride : Purification

- and properties of a wheat leaf *N*-acetyl- β -D-hexosaminidase. *Plant Sci.* **60**, 163-172 (1989).
- (2) Li S-C and Y-T Li: Studies on the glycosidases of jack bean meal. III. Crystallization and properties of β -*N*-acetylhexosaminidase. *J. Biol. Chem.* **245**, 5153-5160 (1970).
- (3) Suzanne, M.H. and L. Beevers: Isozymes of β -*N*-acetylhexosaminidase from pea seeds (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* **85**, 1118-1122 (1987).
- (4) McFarlane, E. F., D. R. McFarlane and I.R. Kennedy: Isolation of β -*N*-acetyl-D-hexosaminidases from lupin seed. *Phytochemistry* **23**, 2431-2433 (1984).
- (5) Agrawal, K.M.L. and O.P. Bahl: α -Galactosidase, β -galactosidase, β -glucosidase, β -*N*-acetylhexosaminidase, and α -mannosidase from pinto beans (*Phaseolus vulgaris*). *Methods Enzymol.* **28**, 720-728 (1972).
- (6) Harley, S.M. and H. Beevers: Characterization and partial purification of three glycosidases from castor bean endosperm. *Phytochemistry* **24**, 1459-1464 (1985).
- (7) Yi, C.K.: Increase in β -*N*-acetylhexosaminidase activity during germination of cotton seeds. *Plant Physiol.* **67**, 68-73 (1981).
- (8) Nakagawa, H., N. Emoto, M. Asakawa and Y. Uda: Purification and characterization of α -mannosidase and β -*N*-acetylhexosaminidase from watermelon fruit. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 2223-2230 (1988).
- (9) Poulton, J.E., M.A. Thomas, K.K. Ottwell and S.J. McCormick: Partial purification and characterization of a β -*N*-acetylhexosaminidase from black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) seeds. *Plant Sci.* **42**, 107-114 (1985).
- (10) Bouquelet, S. and G. Spik: Properties of four molecular forms of *N*-acetyl- β -D-hexosaminidase isolated from germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Eur. J. Biochem.* **84**, 551-559 (1978).
- (11) Reissig, J.L., J.L. Strominger and L.F. Leloir: A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetyl amino sugars. *J. Biol. Chem.* **217**, 959-966 (1955).
- (12) Shimahara, K., Y. Takiguchi, K. Ohkouchi, K. Kitamura and O. Okada: Chemical composition and some properties of crustacean chitin prepared by use of proteolytic activity of *Pseudomonas maltophilia* LC102, in "Chitin, chitosan and related enzymes" (ed. J.P. Zikakis), Academic Press, Orlando, Florida, pp. 239-255 (1984).
- (13) Hartree, E.F.: Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**, 422-427 (1972).
- (14) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- (15) Khar, A. and S.R. Anand: Studies on the glycosidases of semen. Purification and properties of β -*N*-acetylglucosaminidase from bull sperm. *Biochim. Biophys. Acta* **483**, 141-151 (1977).
- (16) Iwamoto, T., A. Sonobe, A. Somsit and S. Nagasaki: Jack bean β -*N*-acetylhexosaminidase does not hydrolyze *N*-acetylchitooligosaccharides. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 841-842 (1993).
- (17) DE Klerk G.J.: Glycosylation and deglycosylation of storage proteins in developing *Agrostemma githago* L. seeds. *J. Plant Physiol.* **119**, 109-122 (1985).
- (18) Vitale, A. and M.J. Chrispeels: Transient *N*-acetylglucosamine in the biosynthesis of phytohemagglutinin: Attachment in the Golgi apparatus and removal in protein bodies. *J. Cell. Biol.* **99**, 133-140 (1984).