

ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L.) 種子の  
 $\alpha$ -グルコシダーゼの精製とその性質

杉本 学・古井 聡・鈴木幸雄

Purification and Characterization of  $\alpha$ -Glucosidases  
from Spinach Seeds.

Manabu SUGIMOTO, Satoshi FURUI, and Yukio SUZUKI

Four molecular forms of  $\alpha$ -glucosidase were isolated from spinach seeds by several kinds of chromatography. The molecular masses of  $\alpha$ -glucosidases I, II, III, and IV were 78, 78, 82, and 82kDa by SDS-PAGE, and 62, 62, 190, and 70kDa by gel filtration, respectively.  $\alpha$ -Glucosidases I and II showed similar enzymatic properties. The  $K_m$  for soluble starch was about 10 times lower than that for maltose, and they had higher activity not only towards malto-oligosaccharides but also towards  $\alpha$ -glucans. The optimum pH was 4.5-5.5 and about 50% of the activity remained after incubation at 70°C for 20 min. On the other hand,  $\alpha$ -glucosidases III and IV showed similar enzymatic properties. The  $K_m$  for maltose was 3-4 times lower than that for soluble starch, and they had high activity toward malto-oligosaccharides but faint activity towards  $\alpha$ -glucans. The optimum pH was 4.5-5.0 and no activity was found after incubation at 70°C for 20 min. However, anti- $\alpha$ -glucosidase III serum precipitated specifically with  $\alpha$ -glucosidase III.

**Key words:**  $\alpha$ -Glucosidase, Spinach, Seed, *Spinacia oleracea* L.,  
Molecular form

緒 言

$\alpha$ -グルコシダーゼ [EC 3. 2. 1. 20] は、基質の非還元末端から  $\alpha$ -グルコースを遊離す

る $\alpha$ -グルコシル残基の開裂を触媒する酵素であり<sup>4,27)</sup>、微生物、植物、動物界に広く分布している<sup>6)</sup>。本酵素の基質特異性は、その起源により様々である。千葉<sup>5)</sup>は、 $\alpha$ -グルコシダーゼを次の3種類に分類することを提案した。(I)合成配糖体や、スクロースのような“heterogeneous”な基質を加水分解する酵素<sup>10)</sup>、(II)合成配糖体や、スクロースではない、マルトオリゴ糖のような“homogeneous”な基質を加水分解する酵素<sup>2,17,20,24)</sup>、および(III)マルトオリゴ糖だけでなく $\alpha$ -グルカンをも加水分解する酵素である<sup>3,9,11,14,19,21-23,25)</sup>。 $\alpha$ -グルコシダーゼの分子多型が異なる基質特異性を有することは、緑豆<sup>26)</sup>、テンサイ種子<sup>28)</sup>、イネ種子<sup>29)</sup>、ネギ葉<sup>15)</sup>、バナナ果肉組織<sup>7)</sup>、ミツバチ<sup>17)</sup>、およびブタ十二指腸<sup>16)</sup>において報告されている。同一の由来のものから単離されたこれらの酵素は、オリゴ糖や可溶性デンプンの代謝にどの様に関わっているのか、また、酵素反応の機構とタンパク質構造との相関関係を明らかにする上で良い研究材料となる。

我々は各種クロマトグラフィーによりホウレンソウ種子から4つの多型 $\alpha$ -グルコシダーゼを分離した。本研究では、これら $\alpha$ -グルコシダーゼの精製と、その性質について報告する。

## 材料および方法

### 1. 実験材料と試薬類

供試したホウレンソウ種子 (*Spinacia oleracea* L. cv. Dash) は、市販品 (大和農園株式会社) である。マルトース、アミロース、およびプルランは林原生物化学研究所、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、およびグリコーゲン<sup>3)</sup>はナカライテスク、可溶性デンプンはMerck、アミロペクチンは東京化成株式会社、およびデキストランは、和光純薬工業株式会社、のそれぞれ製品である。 $\beta$ -リミットデキストリンは、グルテン状のイネ種子デンプン (台中65号) をオオムギ $\beta$ -アミラーゼ (Boehringer Mannheim Co.) で消化して調製した標品である<sup>18)</sup>。また、DEAE-Toyopearl 650 M、Toyopearl HW-55S、TSK<sub>gel</sub> G3000SW<sub>XL</sub>およびUltracent-30は、東ソー株式会社の製品である。

### 2. 分析方法

**酵素活性の測定**：0.2 ml の0.5%基質、0.1 ml の酵素液および0.2 ml の50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.3) からなる反応液 (全量0.5 ml) を37°C でインキュベートした。反応後、反応液に1 ml の2 M Tris-HCl (pH 7.0) を添加することにより反応を停止した。遊離したグルコース量は、グルコース AR-II test (和光純薬工業株式会社) を用いたトリス-グルコースオキシダーゼ-パーオキシダーゼ法により測定した<sup>13)</sup>。これらの条件下において1分間に基質から1  $\mu$ mole のグルコースを遊離する酵素量を1ユニットとした。

**蛋白質量の測定**：タンパク質量は、牛血清アルブミンをスタンダードとするブラッドフォード法により求めた<sup>1)</sup>。

**分子量の測定**：精製した酵素の分子量は、SDS-PAGE とゲル濾過法によって決定した<sup>8)</sup>。SDS-PAGE は10%のアクリルアミド濃度とし、タンパク質はクマシーブリリアントブルー

R-250により染色した。ゲル濾過は、0.2 M の塩化ナトリウムを含む0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) によって平衡化した TSK<sub>gel</sub> G3000SW<sub>XL</sub> (0.78×30 cm) を用いた HPLC により行った。流速は0.5 ml/min とし、280 nm の吸光度をモニターした。

**最適 pH, pH 安定性及び熱安定性の測定**：最適 pH と pH 安定性は、pH 2.0 から 9.0 までを測定した。最適 pH 測定用の反応液は、0.2 ml の 0.5% マルトース、0.1 ml の酵素液 (5 mU)、0.2 ml の Britton-Robinson 緩衝液とした。pH 安定性は、0.02 ml の酵素液 (5 mU) と 0.08 ml の Britton-Robinson 緩衝液からなる反応液を、4°C で 24 時間保った後、0.2 ml の 0.5% マルトースと 0.2 ml の 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を添加し、37°C で 10 分間保温して測定した。熱安定性は、30 から 75°C までの温度内で測定した。0.1 ml の酵素液 (5 mU) と 0.2 ml の 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) からなる反応液を 20 分間保ち、氷冷後、0.2 ml の 0.5% マルトースを加えて 37°C、10 分間保温した。

**α-グルコシダーゼ III に対する抗血清の調製**：精製した α-グルコシダーゼ III を含む 0.5 ml の 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に、0.5 ml のフロイントの完全アジュバントを混合した乳化液をオスのウサギに皮下注射し、免疫した。2 週間後、0.2 mg の酵素を含む 1 ml の乳化液をウサギに注射した。全血液は、最終免疫後 1 週間目に採取した。血液は、37°C において 30 分間保温し、4°C で一夜放置した。その後、10,000×g で 30 分間遠心することにより血清と血餅を分離し、前者を 56°C で 30 分間保温した。粗 IgG は、40% 硫酸アンモニウム飽和により血清から分離し、0.15 M の塩化ナトリウムと 0.1% の窒化ナトリウムを含む 0.02 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) に対して透析した。

#### ホウレンソウ種子からの α-グルコシダーゼの調製

**粗酵素液の調製**：市販のホウレンソウ種子を、水道水で洗浄し、太陽光線下で乾燥後、種子 (50 g) をフードミル (フィリップスフードミル HL2053 型、フィリップス社製) を用いて 20 秒間粉砕した。粉砕した 1 kg の種子を、5 l の 0.05 M 塩化ナトリウムを含む 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) に懸濁した。懸濁液を 4°C にて 8 時間攪拌した後、4°C にてさらに一夜放置した。懸濁液をミキサー (ナショナル電気ミキサー、松下電器社製) で攪拌し、セライト No. 535 を加えて吸引濾過した。濾液に固形硫酸アンモニウムを 85% 飽和まで加えた。生じた沈殿物を遠心操作により集め、0.05 M の塩化ナトリウムを含む 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) に溶解し、同組成の緩衝液に対して 4°C、一夜透析した。生じた沈殿物を遠心分離により除き、その上清液を粗酵素抽出液とした。

**CM-セルロースカラムクロマトグラフィー**：酵素抽出液を、0.05 M の塩化ナトリウムを含む 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) により平衡化された CM-セルロースカラム (6×15 cm) に供した。カラムは、同組成の緩衝液にて洗浄後、吸着したタンパク質を塩化ナトリウム濃度 0.05 から 1 M の直線の濃度勾配により溶出した (Fig. 1)。酵素活性は、0.05 M の塩化ナトリウムを含む 0.05 M 酢酸緩衝液による溶出画分と 0.5 M の塩化ナトリウムを含む 0.05 M 酢酸緩衝液による溶出画分に認められた。2 つの酵素画分をそれぞれ集め、UK-50 メンブレン (アドバンテック東洋株式会社製) により濃縮し、0.025 M の トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析した。

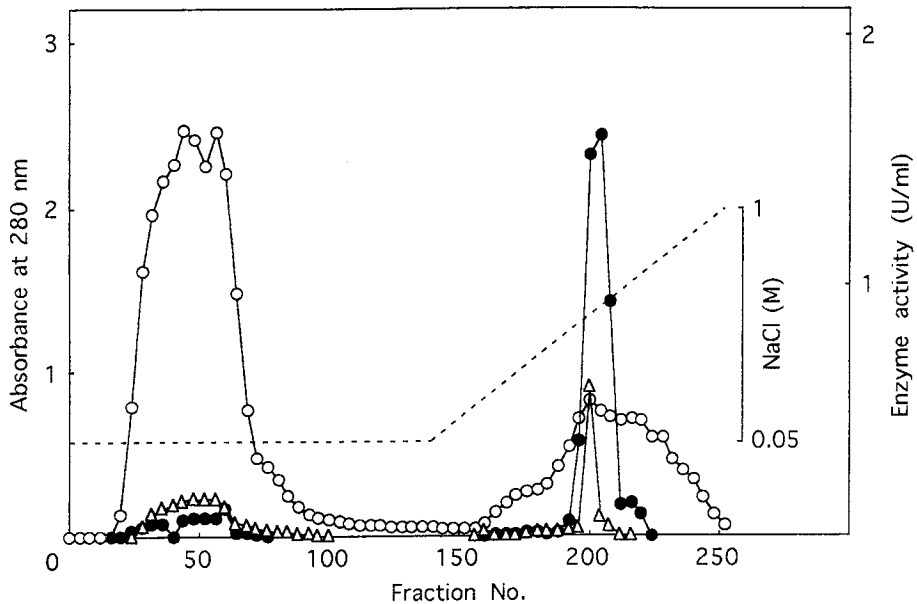


Fig. 1. CM-cellulose column chromatography of  $\alpha$ -glucosidase from spinach seeds. The enzyme extract was put on a CM-cellulose column equilibrated with 0.01 M acetate buffer (pH 5.3) containing 0.05 M NaCl. Elution was carried out with a linear gradient of NaCl in the same buffer. Fractions (20 ml) were collected at a flow rate of 30 ml/h.  $\circ$ , absorbance at 280 nm;  $\bullet$ , maltose-hydrolyzing activity;  $\triangle$ , soluble starch-hydrolyzing activity; ---, NaCl concentration.

**DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー**：CM-セルロースカラムを素通りした酵素液は、0.025 M のトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化された DEAE-セルロースカラム (3×10 cm) に供した。カラムを、0.1 M の塩化ナトリウムを含む 0.025 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄後、吸着したタンパク質は、0.1 から 1 M の塩化ナトリウムを含む同組成の緩衝液による直線の濃度勾配により溶出した。酵素活性は 0.2 M 塩化ナトリウムを含む溶出画分に認められた。酵素画分を集め、濃縮し、0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) に対して透析した。次に、CM-セルロースカラムに吸着、0.5 M 塩化ナトリウムを含む 0.01 M 酢酸緩衝液で溶出、濃縮、0.025 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析した酵素液を 0.025 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化された DEAE-セルロースカラムに供した。酵素活性は、0.1 M 塩化ナトリウムを含む 0.025 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) 溶出画分に認められた。酵素画分を集めて濃縮し、0.2 M 塩化ナトリウムを含む 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) に対して透析した。

**DEAE-トヨパール 650 M カラムクロマトグラフィー**：DEAE-セルロースカラムに吸着した酵素液は、0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) で平衡化された DEAE-トヨパール 650 M (3×7 cm) に供した。カラムを 0.1 M 塩化ナトリウムを含む同組成の緩衝液で洗浄後、吸着したタンパク質は、0 から 0.5 M の塩化ナトリウムを含む同組成の緩衝液による直線の濃度勾配により溶出した (Fig. 2)。酵素活性は、最初の緩衝液 ( $\alpha$ -グルコシダーゼ I) と 0.2 M の塩

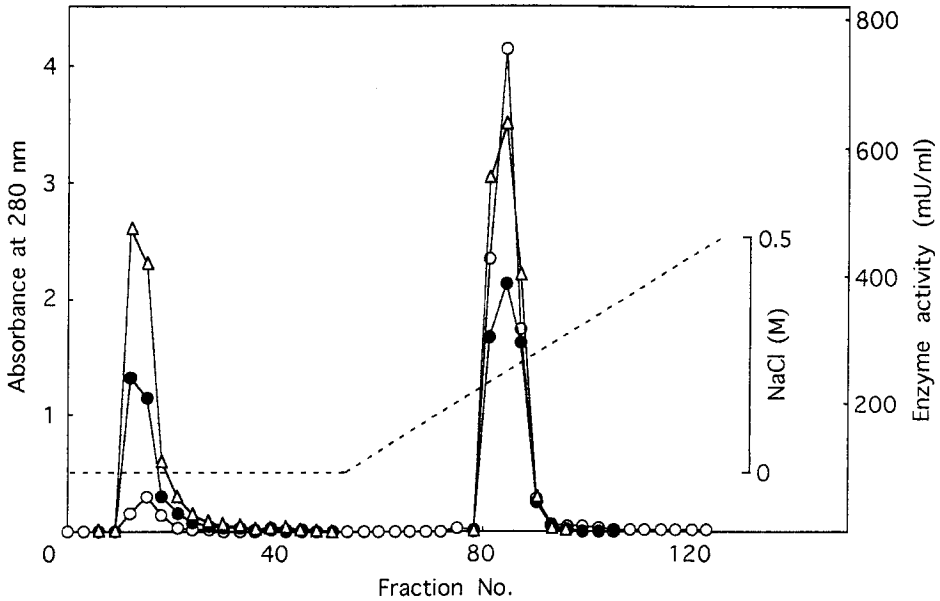


Fig. 2. DEAE-Toyopearl column chromatography of  $\alpha$ -glucosidase from spinach seeds. The enzyme solution passed through the CM-cellulose column was put on a DEAE-cellulose column equilibrated with 0.01 M acetate buffer (pH 5.3). Elution was carried out with a linear gradient of NaCl in the same buffer. Fractions (4 ml) were collected at a flow rate of 30 ml/h.  $\circ$ , absorbance at 280 nm;  $\bullet$ , maltose-hydrolyzing activity;  $\triangle$ , soluble starch-hydrolyzing activity; ---, NaCl concentration.

化ナトリウム ( $\alpha$ -グルコシダーゼIV) によって溶出される画分に認められた。2つの酵素液は、それぞれ回収し、限外濾過により濃縮した。

**TSK<sub>ge1</sub> G3000SW<sub>XL</sub>によるHPLC**：DEAE-セルロースカラムを素通りした酵素液は、0.2 Mの塩化ナトリウムを含む0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) で平衡化された TSK<sub>ge1</sub> G3000SW<sub>XL</sub> によるHPLCにおいて流速0.5 ml/minで分離した (Fig. 3)。酵素活性は、リテンションタイム16分 ( $\alpha$ -グルコシダーゼIII) と18分 ( $\alpha$ -グルコシダーゼIV) の画分で認められた。酵素画分は、別々に回収し、Ultracent 30によって濃縮した。

**$\alpha$ -グルコシダーゼIの精製**：DEAE-トヨパール650 Mを素通りした酵素液は、0.2 Mの塩化ナトリウムを含む0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) に対して透析し、透析した緩衝液によって平衡化した TSK<sub>ge1</sub> G3000SW<sub>XL</sub> によるHPLCにおいて流速0.5 ml/minで分離した。酵素活性はリテンションタイム18分で溶出される画分に認められた。酵素画分は、回収し、Ultracent 30によって濃縮し、これを精製するため2度目のクロマトを行った。

**$\alpha$ -グルコシダーゼIIの精製**：DEAE-トヨパール650 Mに吸着した酵素液は、0.05 Mの塩化ナトリウムを含む0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) によって平衡化した Toyopearl HW-55Sに供した。酵素画分は回収し、限外濾過を行い、0.2 Mの塩化ナトリウムを含む0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) に対して透析した。酵素液は、透析した緩衝液によって平衡化した TSK<sub>ge1</sub> G3000SW<sub>XL</sub> によるHPLCにおいて流速0.5 ml/minで分離した。酵素活性はリテンションタイム18分で溶出される画分に認められた。酵素画分は、回収し、Ultracent 30によって濃縮

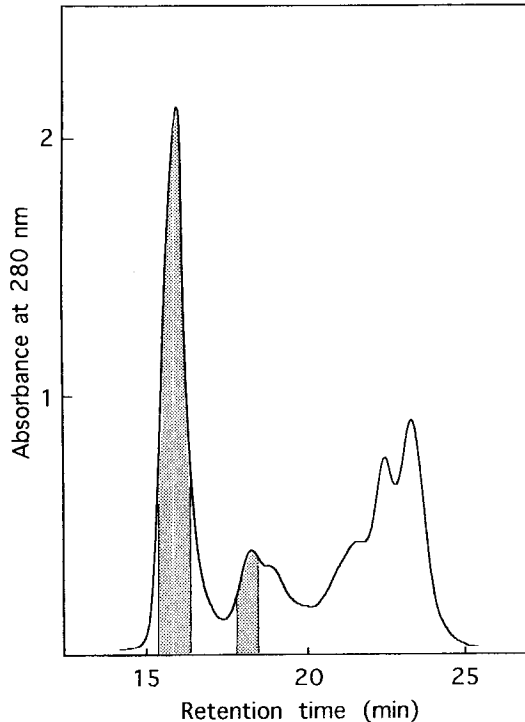


Fig. 3. HPLC on TSK<sub>gel</sub> G3000SW<sub>XL</sub> of  $\alpha$ -glucosidase from spinach seeds. The enzyme solution, which passed through the DEAE-cellulose column after bound to the CM-cellulose column, was subjected to HPLC on the TSK<sub>gel</sub> G3000SW<sub>XL</sub>. The column was equilibrated with 0.05 M acetate buffer (pH 5.3) containing 0.2 M NaCl at a flow rate of 0.5 ml/min. The elution was monitored by absorption at 280 nm. The shaded areas indicate the fractions that showed  $\alpha$ -glucosidase activity.

し、これを精製するため2度目のクロマトを行った。

$\alpha$ -グルコシダーゼIIIとIVの精製：TSK<sub>gel</sub> G3000SW<sub>XL</sub>による HPLC において分離した  $\alpha$ -グルコシダーゼIIIとIVは、同条件によりそれぞれ1度及び2度再クロマトグラムを行い、精製した。

## 結果および考察

### 酵素の精製

4種類の $\alpha$ -グルコシダーゼがホウレンソウ種子より精製された。CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにおいて2つの酵素画分が認められ、それらの一つはカラムに吸着しないものであり、他の一つは0.5 Mの塩化ナトリウムによって溶出されるものであった。CMセルロース非吸着画分は、DEAEトヨパールカラムクロマトグラフィーにおいて2つの活性画分( $\alpha$ -グルコシダーゼIとII)に分離され、後の画分は、TSK<sub>gel</sub> G3000SW<sub>XL</sub>によるHPLC

において2つの活性画分に分離された。精製過程を Table I に示す。α-グルコシダーゼ I, II, IIIおよびIVは, 19.3, 25.0, 386, 152倍までそれぞれ精製され, マルトース加水分解活性に対する可溶性デンプン加水分解活性の比はそれぞれ0.54, 0.50, 16.1, 17.8であった。精製した酵素は, SDS-PAGE により単一のバンドであることが認められた (Fig. 4)。

Table I. Purification of α-glucosidases from spinach seeds.

Step	Total protein (mg)	Maltose-hydrolyzing activity				Soluble starch-hydrolyzing activity				Ratio <sup>a</sup>
		Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purifi- cation (-fold)	Yield (%)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purifi- cation (-fold)	Yield (%)	
Ammonium sulfate	10,900 <sup>b</sup>	4,790	0.44	1	100	5,180	0.48	1	100	0.92
CM-cellulose										
α-Glucosidase I, II	2,840 <sup>b</sup>	386	0.14	0.32	8.1	500	0.18	0.38	9.7	0.77
III, IV	1,050 <sup>b</sup>	3,270	3.1	7.0	68.3	1,410	1.34	2.7	27.2	2.32
DEAE-cellulose										
α-Glucosidase I, II	48.0	64.5	1.3	3.0	1.3	59.8	1.2	2.5	1.2	1.1
III, IV	24.4	2,940	120	273	61.4	243	10.0	20.8	4.7	12.1
DEAE-Toyopearl 650 M										
α-Glucosidase I	3.2	5.6	1.8	4.1	0.12	10.5	3.3	6.9	0.20	0.53
II	37.0	12.8	0.35	0.80	0.27	22.2	0.60	1.3	0.43	0.58
Toyopearl HW-55S										
α-Glucosidase II	31.1	12.1	0.39	0.89	0.25	20.2	0.65	1.4	0.39	0.60
TSK <sub>gel</sub> G3000SW <sub>XL</sub>										
α-Glucosidase I	0.06 <sup>b</sup>	0.51	8.5	19.3	0.01	0.94	15.7	32.7	0.02	0.54
II	0.05 <sup>b</sup>	0.55	11.0	25.0	0.01	1.1	22.0	45.8	0.02	0.50
III	7.1	1,210	170	386	25.3	75.0	10.6	22.1	1.4	16.1
IV	1.2	80.3	66.9	152	1.7	4.5	3.8	7.9	0.09	17.8

<sup>a</sup> Maltose-hydrolyzing activity/Soluble starch-hydrolyzing activity.

<sup>b</sup> Calculated by the method of Warburg and Christian.

### 分子量の推定

SDS-PAGE によって求められた α-グルコシダーゼの推定分子量はそれぞれ I, IIが78 kDa で, III, IVは82 kDa であった (Fig. 4)。G3000SW<sub>XL</sub>によるゲル濾過によって求められた推定分子量はそれぞれ α-グルコシダーゼ I, IIが62 kDa で, IIIは190 kDa, IVは70 kDa であった (Fig. 5)。

SDS-PAGE とゲル濾過において α-グルコシダーゼIIIの推定分子量の違いが認められた。本酵素は SDS-PAGE において単一のバンドを示した。この結果は α-グルコシダーゼIIIはおそらくヘテロなサブユニットからなるものではないことを示唆するものである。

### pH と温度の影響

マルトース加水分解活性に対する pH の効果を調べた (Fig. 6)。最適 pH はそれぞれ, α-グルコシダーゼ I と IIが4.5-5.5で, α-グルコシダーゼIIIとIVが4.5-5.0であった。すべての酵素は pH 2.0から9.0まで安定であった。酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中で70°C, 20分処理した時, α-グルコシダーゼ I と IIは約50%の残存活性を示したが, α-グルコシダーゼIIIとIVは活性を失った (Fig. 7)。

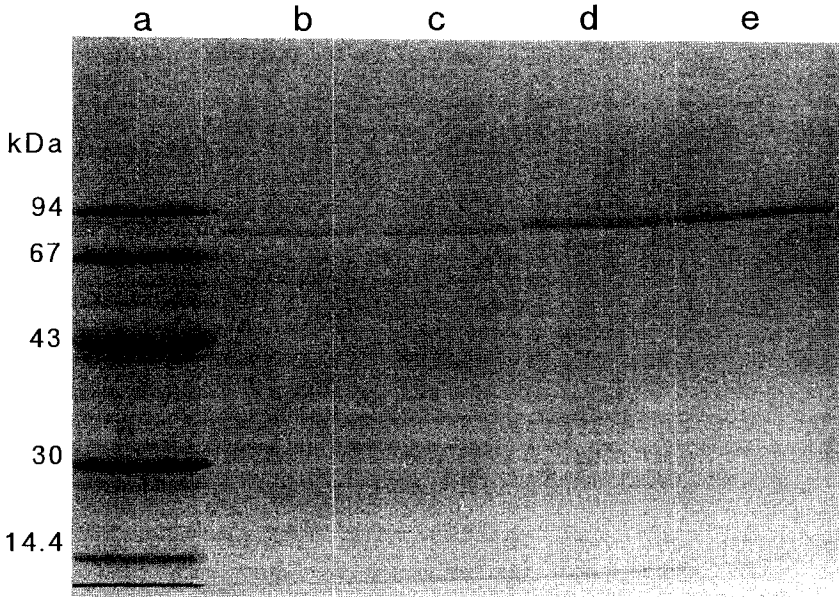


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel (10%) electrophoresis of the purified  $\alpha$ -glucosidases from spinach seeds. Protein was stained with Coomassie brilliant blue R-250. a, marker proteins (top to bottom, phosphorylase b, bovine serum albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor, and  $\alpha$ -lactalbumin); b,  $\alpha$ -glucosidase I (1.8  $\mu$ g); c,  $\alpha$ -glucosidase II (1.8  $\mu$ g); d,  $\alpha$ -glucosidase III (2.5  $\mu$ g); e,  $\alpha$ -glucosidase IV (2.5  $\mu$ g).

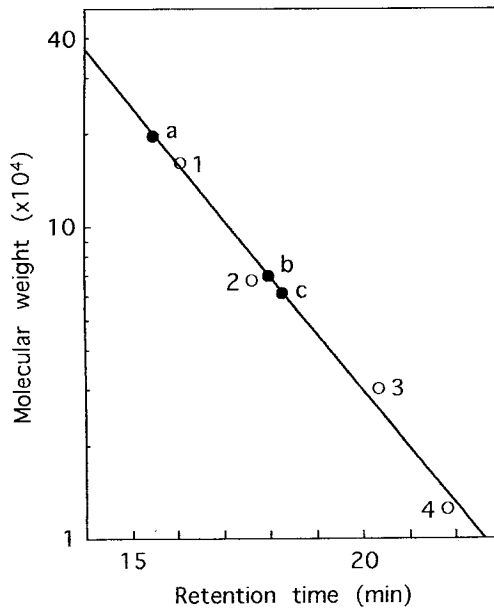


Fig. 5. Estimation of molecular mass of the purified  $\alpha$ -glucosidases from spinach seeds by HPLC on the TSK<sub>gel</sub> G3000SW<sub>XL</sub>. 1,  $\gamma$ -globulin (160 kDa); 2, bovine serum albumin (67 kDa); 3, carbonic anhydrase (30 kDa); 4, cytochrome C (12.3 kDa); a,  $\alpha$ -glucosidase III; b,  $\alpha$ -glucosidase IV; c,  $\alpha$ -glucosidase I and II.



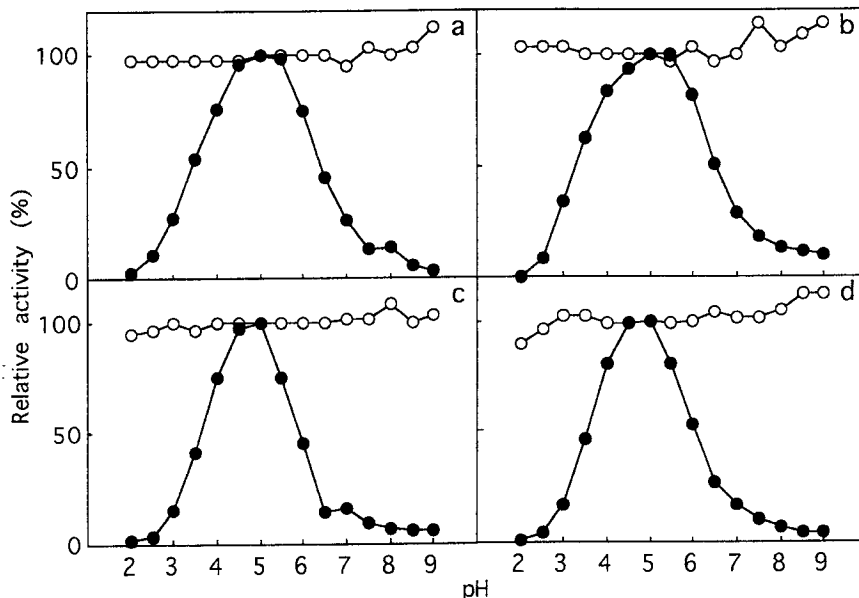


Fig. 6. pH-Activity (●) and pH-stability (○) curves of the purified  $\alpha$ -glucosidases from spinach seeds. Reaction mixture for pH-activity consisted of 0.2 ml in 0.5% maltose, 0.1 ml of enzyme solution (5 mU), and 0.2 ml of Britton-Robinson buffer. The mixture was incubated at 37°C and the liberated glucose was assayed. Reaction mixture for pH-stability consisted of 0.02 ml of enzyme solution (5 mU) and 0.08 ml of Britton-Robinson buffer. The mixture was kept at 4°C for 24 h. Then 0.2 ml of 0.5% maltose and 0.2 ml of 1 M acetate buffer (pH 5.0) were added. The mixture was incubated at 37°C and the liberated glucose was assayed. a,  $\alpha$ -glucosidase I; b,  $\alpha$ -glucosidase II; c,  $\alpha$ -glucosidase III; d,  $\alpha$ -glucosidase IV.

$\alpha$ -グルコシダーゼ I と II の可溶性デンプンに対する最適 pH と温度は、マルトースに対するものと違いは見られなかった (データは示さない)。

#### 基質特異性

様々な  $\alpha$ -グルコサイドに対する加水分解活性を調べ、マルトースと比較した (Table II).  $\alpha$ -グルコシダーゼ I と II はマルトトリオース, マルトテトラオース, マルトペンタオースに対する活性がマルトースよりも高い活性を示し, その中でマルトトリオースに対する活性がもっとも高いものであった.  $\alpha$ -グルコシダーゼ I と II は, イソマルトースや, フェニル  $\alpha$ -グルコサイドおよびスクロースにおける加水分解活性がマルトースの10%以下であった.  $\alpha$ -グルコシダーゼ III と IV は, マルトースに対する活性が他の基質よりもっとも高く, マルトトリオースからマルトペンタオースまでグルコースの重合度が増加するに従って活性は減少していた. 可溶性デンプン, イソマルトース, フェニル  $\alpha$ -グルコサイド, メチル  $\alpha$ -グルコサイドおよびスクロースに対する活性はマルトースの10%以下であった.

様々な  $\alpha$ -グルカンにおける加水分解活性も調べた (Table III). すべての酵素は可溶性デンプンに対して最も高い活性を示し,  $\beta$ -リミットデキストリンに対してわずかに活性を示し, また, デキストラン, プルランに対して活性を示さなかった.  $\alpha$ -グルコシダーゼ I と II はアミロース, アミロペクチン, およびプルランに対する活性が可溶性デンプンの29から44%

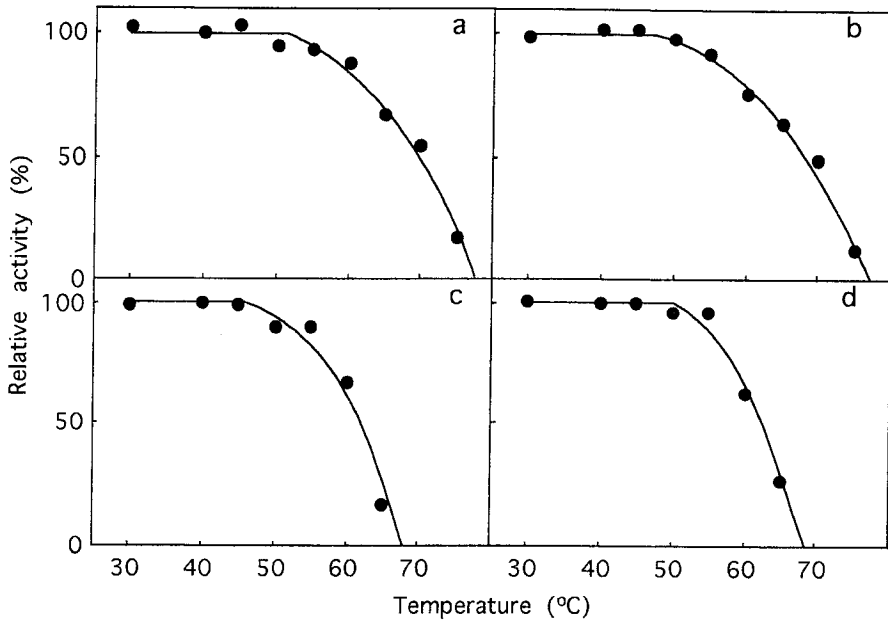


Fig. 7. Temperature stability curves of the purified  $\alpha$ -glucosidases from spinach seeds. An enzyme solution (5 mU) in 0.1 ml of 0.04 M acetate buffer (pH 5.0) was kept at various temperatures for 20 min. After addition of 0.2 ml of 0.5% maltose and 0.2 ml of 0.1 M acetate buffer (pH 5.0), the mixture was incubated at 37°C and the liberated glucose was assayed. a,  $\alpha$ -glucosidase I ; b,  $\alpha$ -glucosidase II ; c,  $\alpha$ -glucosidase III ; d,  $\alpha$ -glucosidase IV.

であった。しかしながら、グリコーゲンに対する $\alpha$ -グルコシダーゼIIIとIVの活性は、それぞれ可溶性デンプンの9%と13%であり、アミロペクチンに対する $\alpha$ -グルコシダーゼIVの活性は可溶性デンプンの61%であった。

マルトースと可溶性デンプンの加水分解率のパラメーターをラインウエーバー-バークプロットにより調べた。マルトースに対する $\alpha$ -グルコシダーゼI, II, IIIおよびIVの $K_m$ と $V_{max}$  (mM, mg glucose/min/mg enzyme) は、それぞれ (21, 1.55), (21, 1.36), (4.5, 8.19) そして (5.3, 3.01) であった。可溶性デンプンに対する $K_m$ と $V_{max}$ は、それぞれ (2.2, 3.48), (1.9, 3.18), (1.9, 9.81) および (17, 3.16) であり、可溶性デンプンに対する $\alpha$ -グルコシダーゼIとIIの $K_m$ は、マルトースの約10倍低い値を示した。それらは、マルトオリゴ糖だけでなくアミロース、アミロペクチン、グリコーゲン、および $\beta$ -リミットデキストリンのような $\alpha$ -グルカンをも加水分解する高い活性を持っていた。これらの結果は、 $\alpha$ -グルコシダーゼIとIIが緒言で紹介した千葉らの分類した $\alpha$ -グルコシダーゼグループIIIに属することを示唆している。一方、 $\alpha$ -グルコシダーゼIIIとIVのマルトースに対する $K_m$ は、可溶性デンプンよりも約3から4倍低かった。これらは、マルトオリゴ糖に対して高い活性を示すが、 $\alpha$ -グルカンや合成 $\alpha$ -グルコサイドに対してはごくわずかな活性しか示さない。これらの結果から、 $\alpha$ -グルコシダーゼIIIとIVは、グループIIIに属すると示唆される。

Table II. Substrate specificities of  $\alpha$ -glucosidases from spinach seeds for  $\alpha$ -glucosides. The reaction mixture (0.5 ml), which consisted of 0.2% substrate and enzyme (5 mU as maltose-hydrolyzing activity), was incubated 37°C for 10 min. Relative rates to maltose-hydrolyzing activity are shown.

Substrate	Relative activity (%)			
	I	II	III	IV
Maltose	100	100	100	100
Maltotriose	298	292	153	132
Maltotetraose	285	284	140	126
Maltopentaose	393	385	77	69
Soluble starch	204	214	5	4
Isomaltose	45	47	2	1
Phenyl- $\alpha$ -D-glucoside	21	22	7	5
Methyl- $\alpha$ -D-glucoside	6	6	1	1
Sucrose	2	6	2	1

I,  $\alpha$ -glucosidase I ; II,  $\alpha$ -glucosidase II ; III,  $\alpha$ -glucosidase III ; IV,  $\alpha$ -glucosidase IV.

Table III. Substrate specificities of  $\alpha$ -glucosidases from spinach seeds for  $\alpha$ -glucans. The reaction mixture (0.5 ml), which consisted of 0.2% substrate and enzyme (5 mU of  $\alpha$ -glucosidase I and II, and 180 mU of  $\alpha$ -glucosidase III and IV as maltose-hydrolyzing activity, respectively), was incubated at 37°C for 24 h. Relative rates to soluble starch-hydrolyzing activity are shown.

Substrate	Relative activity (%)			
	I	II	III	IV
Soluble starch	100	100	100	100
Amylose	36	35	37	34
Amylopectin	44	33	24	61
Glycogen	29	32	9	13
$\beta$ -Limit dextrin	2	3	3	7
Dextran	0	0	0	0
Pullulan	0	0	0	0

I,  $\alpha$ -glucosidase I ; II,  $\alpha$ -glucosidase II ; III,  $\alpha$ -glucosidase III ; IV,  $\alpha$ -glucosidase IV.

$\alpha$ -グルコシダーゼ I と II は、同じ分子量、最適 pH、pH 安定性、そして温度安定性をもつ。これらは、マルトースや可溶性デンプンによる  $K_m$  と  $V_{max}$  の値においても顕著な差が認められなかった。

#### 免疫学的特性

本酵素の免疫学的な比較は、オクタロニー-ダブルディフュージョン法により行った<sup>12)</sup>。抗  $\alpha$ -グルコシダーゼ III 血清は  $\alpha$ -グルコシダーゼ III に対して特異的に沈降線を形成した。(Fig. 8)。これらの結果は  $\alpha$ -グルコシダーゼ III と IV が同じ基質特異性 (アミロペクチンを除く)、

および同じ物理的特性（ゲル濾過による分子量の推定を除く）を持つが、それらの分子構造において違いがあることを示唆するものである。

4種類の $\alpha$ -グルコシダーゼのN末端のアミノ酸配列はブロックされていたため、比較できなかった。今後タンパク質構造や遺伝子の解析を行い、ホウレンソウ種子 $\alpha$ -グルコシダーゼの分子多型について解明することが必要である。

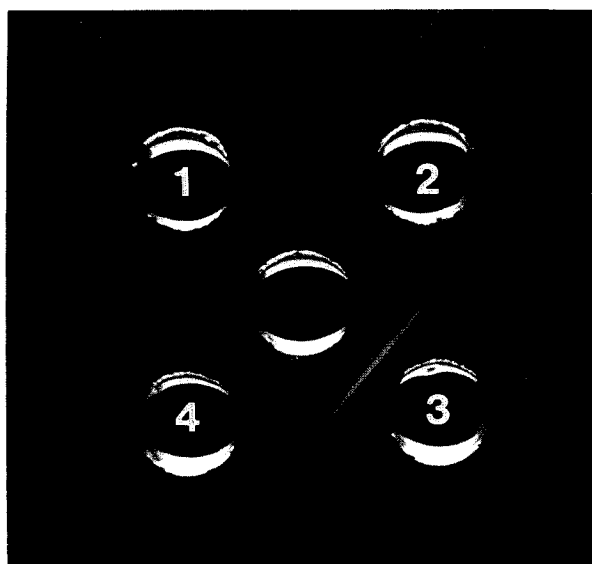


Fig. 8. Ouchterlony double diffusion of the purified  $\alpha$ -glucosidases from spinach seeds. The center well contained 30  $\mu$ l of anti- $\alpha$ -glucosidase III-serum. The surrounding wells 1, 2, 3 and 4 contained 3.6  $\mu$ g of  $\alpha$ -glucosidase I, II, III, and IV, respectively.

### 摘 要

$\alpha$ -グルコシダーゼの分子多型が各種クロマトグラフィーによりホウレンソウ種子から単離された。 $\alpha$ -グルコシダーゼ I, II, III, IVの分子量は、それぞれ SDS-PAGEにより 78, 78, 82, 82 kDa, ゲル濾過により 62, 62, 190, 70 kD であった。 $\alpha$ -グルコシダーゼ I と II は、可溶性デンプンを基質とした際の  $K_m$  値がマルトースよりも約10倍低く、さらに、 $\alpha$ -グルカンだけでなくマルトオリゴ糖に対しても高い活性を示すことから、同じような酵素的特性を持つことが示された。最適 pH は 4.5 から 5.5 を示し、温度安定性は 70°C, 20分処理で約50%の残存活性を示した。一方、 $\alpha$ -グルコシダーゼ III と IV は、マルトースを基質とした際の  $K_m$  値が可溶性デンプンよりも 3-4 倍低い値を示し、マルトオリゴ糖に対しては高い活性を示すが、 $\alpha$ -グルカンに対してはほとんど活性を示さないことから、同じような酵素的特性を有することが示された。最適 pH は 4.5-5.0, そして 70°C, 20分処理では活性が認められなかった。しかしながら、抗  $\alpha$ -グルコシダーゼ III 血清は、 $\alpha$ -グルコシダーゼ III に対してのみ特異的に沈降線を形成した。

キーワード： $\alpha$ -グルコシダーゼ，ハウレンソウ，種子，分子多型

引 用 文 献

- 1) Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- 2) Chiba, S., Saeki, T., and Shimomura, T. 1973. Substrate specificity of *Saccharomyces logos*  $\alpha$ -glucosidase. *Agric. Biol. Chem.* 37: 1831-1836.
- 3) Chiba, S., Inomata, S., Matsui, H. and Shimomura, T. 1978. Purification and properties of an  $\alpha$ -glucosidase (glucoamylase) in sugar beet seed. *Agric. Biol. Chem.* 42: 241-245.
- 4) Chiba, S., Hiromi, K., Minamiura, N., Ohnishi, M., Shimomura, T., Suga, K., Suganuma, T., Tanaka, A., Tomioka, S. and Yamamoto, T. 1979. Quantitative study on anomeric forms of glucose produced by  $\alpha$ -glucosidases. *J. Biochem.* 85: 1135-1141.
- 5) Chiba, S. 1980. Action and classification of  $\alpha$ -glucosidase. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 27: 84-90.
- 6) Chiba, S. 1988. In "Handbook of Amylases and Related Enzymes," The Amylase Research Society of Japan ed. 104-116. Pergaman Press, Oxford.
- 7) Konishi, Y., Kitazato, S. and Nakatani, N. 1992. Partial purification and characterization of acid and neutral  $\alpha$ -glucosidases from preclimacteric banana pulp tissues. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 2046-2051.
- 8) Leammli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227. 680-685.
- 9) Matsui, H., Yazawa, I. and Chiba, S. 1981. Purification and substrate specificity of sweet corn  $\alpha$ -glucosidase. *Agric. Biol. Chem.* 45: 887-894.
- 10) Matsusaka, K., Chiba, S. and Shimomura, T. 1977. Purification and substrate specificity of brewer's yeast  $\alpha$ -glucosidase. *Agric. Biol. Chem.* 41: 1917-1923.
- 11) Murata, S., Matsui, H., Chiba, S. and Shimomura, T. 1979. Substrate specificity of  $\alpha$ -glucosidase II in rice seed. *Agric. Biol. Chem.* 43: 2131-2135.
- 12) Ouchterlony, O. 1967. In "Handbook of Experimental Immunology," Weir, D. W. ed. 463-492. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 13) Sugimoto, M. and Suzuki, Y. 1993. Subsite affinities of  $\alpha$ -glucosidase from *Mucor javanicus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57. 1378-1379.
- 14) Sugimoto, M. and Suzuki, Y. 1994. Hydrolytic action on the mixture of maltose and soluble starch by  $\alpha$ -glucosidase from *Mucor javanicus* IFO 4570. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 1535-1536.
- 15) Suzuki, Y. and Uchida, K. 1984. Three forms of  $\alpha$ -glucosidase from welsh onion (*Allium fistulosum* L.). *Agric. Biol. Chem.* 48: 1343-1345.
- 16) Suzuki, Y. and Uchida, K. 1985. Multiple forms of  $\alpha$ -glucosidase from pig duodenum. *Agric. Biol. Chem.* 49: 1573-1581.
- 17) Takewaki, S., Chiba, S., Kimura, A., Matsui, H. and Koike, Y. 1980. Purification and properties of  $\alpha$ -glucosidases of the honey bee *Apis mellifera* L. *Agric. Biol. Chem.* 44: 731-740.

- 18) Whelan, W. J. 1964. In "Methods in Carbohydrate Chemistry", Vol. 4, Whistler, R. L., ed. 261-266. Academic Press, New York.
- 19) Yamasaki, Y., Miyake, T. and Suzuki, Y. 1973. Properties of crystalline  $\alpha$ -glucosidase from *Mucor javanicus*. Agric. Biol. Chem. 37 : 251-259.
- 20) Yamasaki, Y. and Suzuki, Y. 1974. Purification and properties of  $\alpha$ -glucosidase from *Bacillus cereus*. Agric. Biol. Chem. 38 : 443-454.
- 21) Yamasaki, Y. Suzuki, Y. and Ozawa, J. 1976. Purification and properties of  $\alpha$ -glucosidase from *Penicillium purpurogenum*. Agric. Biol. Chem. 40 : 669-676.
- 22) Yamasaki, Y., Suzuki, Y. and Ozawa, J. 1977. Purification and properties of  $\alpha$ -glucosidase from *Penicillium oxalicum*. Agric. Biol. Chem. 41 : 1451-1458.
- 23) Yamasaki, Y., Suzuki, Y. and Ozawa, J. 1977. Purification and properties of  $\alpha$ -glucosidase from *Mucor racemosus*. Agric. Biol. Chem. 41 : 1553-1558.
- 24) Yamasaki, Y., Suzuki, Y. and Ozawa, J. 1977. Three forms of  $\alpha$ -glucosidase and glucoamylase from *Aspergillus awamori*. Agric. Biol. Chem. 41 : 2149-2161.
- 25) Yamasaki, Y. and Suzuki, Y. 1978. Purification and properties of  $\alpha$ -glucosidase and glucoamylase from *Letinus edodes* (Berk.) Sing. Agric. Biol. Chem. 42 : 971-980.
- 26) Yamasaki, Y. and Suzuki, Y. 1979. Purification and properties of three forms of  $\alpha$ -glucosidase from germinated green gram (*Phaseolus vidissimus* Ten.). Agric. Biol. Chem. 43 : 481-489.
- 27) Yamasaki, Y. and Suzuki, Y. 1980.  $\alpha$ -Glucosidase and glucoamylase from molds. Jpn. Soc. Starch Sci. 27 : 74-78. 20)
- 28) Yamasaki, Y. and Suzuki, Y. 1980. Two forms of  $\alpha$ -glucosidase from sugar-beet seeds. Planta. 148 : 354-361.
- 29) Yamasaki, Y. and Suzuki, Y. 1980. Two forms of  $\alpha$ -glucosidase from rice seeds at the milky stage. Agric. Biol. Chem. 44 : 707-715.