

いんげんまめ (*Phaseolus vulgaris* L) の糖質分解酵素： ガラクタナーゼの精製および性質

荒木紀美・延永真実・竹内梓・室岡麻美・山下沙織・
角田佳織・松島東希・小林幹彦

食生活科学科 食品化学研究室

Carbohydrases of the kidney beans, *Phaseolus Vulgaris* L :
purification and characterization of galactanase

Motomi ARAKI, Mami NOBUNAGA, Azusa TAKEUCHI,
Asami MUROOKA, Saori YAMASHITA, Kaori TSUNODA,
Haruki MATSUSHIMA and Mikihiko KOBAYASHI

Department of Food and Health Sciences, Jissen Women's University

Galactanase activity in a homogenized preparation of the kidney beans, *Phaseolus vulgaris* L was examined together with the other carbohydrase activities. This enzyme was purified by the affinity column and gel-filtration column chromatography. SDS-PAGE showed the enzyme had molecular weight of 34kDa. The enzyme hydrolyzed the substrate galactan by endo-type of action and produced several galacto-oligosaccharides. Because the substrate galactan used in this experiment was isolated from the gum arabic, which contained β -1, 3-galactan as a major component, this enzyme would correspond to β -1, 3-galactanase.

Key words : *Phaseolus vulgaris* (いんげんまめ), galactanase (ガラクタナーゼ),
 β -1, 3-galactan (β -1, 3-ガラクトン), endo-type enzyme (エンド型酵素),
trehalase (トレハラーゼ)

1. 緒言

我々の食材の中で植物起源のものは、糖質が貯蔵エネルギー源や植物体組織の構築材料としての役割を果たしている。その代表的な単糖はグルコースであるが、まめ科植物の場合にはガラクトースからなる多糖の寄与が大きい。すなわち、ダイズではアラビノガラクトンプロテイン (AGP) と呼ばれる β -1, 4-ガラクトンとペクチン酸 (α -1, 4-ガラクトツロナン) の複合体がある¹⁾。いんげんまめでも AGP が存在し²⁾、この AGP の一部に β -1, 3-結合のガラクトース鎖が存在する³⁾。一方で、いんげんまめでは β -1, 3-ガラクトンの報告はないが、 β -ガラクトシダーゼが精製されている⁴⁾。

植物多糖の AGP や各種のガラクトンを含むガム質

系の多糖は食品加工の原料素材として重要であり、ガラクトンは極めて興味深い多糖である。この多糖の加水分解に関わる酵素ガラクタナーゼの存在、役割が注目されている。これまでのガラクタナーゼに関する研究の大半は微生物起源のもので、植物起源の酵素の報告は殆ど見あたらない。

我々は、これまでにエリンギの糖質とトレハラーゼについてその性質を明らかにしてきた^{5, 6)}が、これと並行していんげんまめの酵素についての研究も進め、アフィニティーカラムを用いていんげんまめのトレハラーゼとガラクタナーゼの分離精製を試みている⁷⁾。

本論文ではガラクタナーゼの諸性質について検討した結果、エンド- β -1, 3-ガラクタナーゼの存在を示唆する知見が得られたので報告する。

2. 実験方法

1) 酵素調製法

市販のいんげんまめ (500g) に 40mM 酢酸緩衝液 (pH5.2) を加えて磨砕し、遠心分離後の上清に 80% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加えた。4℃、24h 静置後の沈殿を遠心分離によって回収し、67%グリセロールに懸濁し、粗酵素として凍結保存した (以下、これを粗酵素と表示する)。また、以降の実験にはこの粗酵素を透析し、遠心分離後に得られた上清を酵素液として使用した (以下、酵素液と表示)。

2) 活性測定法

酵素活性は、30℃で一晩反応後に生じた還元力を Nelson-Somogyi 法⁸⁾ を用いて波長 500nm (以下、A500 と表示) で測定した。全糖量はフェノール硫酸法⁹⁾ を用いて波長 490nm (以下、A490 と表示) で測定した。

3) いんげんまめの自己消化の測定

まず、いんげんまめ中のトレハラーゼ、ガラクタナーゼ活性の存在確認として、いんげんまめの酵素液 0.5ml と、基質の 2% ガラクタン又は 1% トレハロース 1ml を混合し 30℃で 0、0.5、1、2、3、4、5、24 時間反応後に加熱失活した反応液について、Nelson-Somogyi 法 (A500) で活性を測定した。次に、いんげんまめ 100g からの磨砕抽出液を 4 等分し、30℃でそれぞれ 0、3、24、43.5 時間自己消化を行った。この反応物を吸引ろ過後にろ液を減圧濃縮し、薄層クロマトグラフィー (TLC) で分析した。

4) カラムによる酵素の精製

① トウモロコシデンブングル 5 g と 2 M 硫酸を含む酵素液 2 g を混合し、4℃で一晩振とうしたものをシリンジカラム (1.7cm × 8cm) に充填し、前半は 2 M 硫酸を含む酢酸緩衝液 (40mM、pH5.2) を用いて、後半は硫酸を含まない緩衝液を用いて 5 ml ずつ 12 本を分画した。

② Sephacryl S-200 (Pharmacia Biotech) をカラム (1.3cm × 30cm) に充填し、40 mM 酢酸緩衝液 (pH5.2) で平衡化したものに酵素液を供試し、同緩衝液で溶出、2 ml ずつ 50 本を分画した。

③ Toyopearl HW-55 (TOSO) をカラム (2.3cm ×

40cm) に充填し、40mM 酢酸緩衝液 (pH5.2) で平衡化したものに酵素液を供試し、同緩衝液で溶出、4 ml もしくは 2 ml ずつ 50 本を分画した。

5) 薄層クロマトグラフィー (TLC)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) および電気泳動による分析

TLC・HPLC による分析は前報⁵⁾ の通りに行った。SDS-PAGE は前報⁵⁾ に準じて、Laemmli 法により市販品のゲルを用いて行った。

6) 至適温度・pH および安定性

酵素液は粗酵素を透析後の遠心上清、基質は 2% ガラクタンおよび 2% トレハロースを用い、酵素活性は A500 で測定した。測定条件の詳細は前報⁵⁾ に準じた。

7) 基質特異性

ガラクタナーゼの基質特異性の測定には以下の基質を用いた。Galactan (ChromaDex)、Pectin・lemon、Pectin acid (ナカライテスク)、Pectin・apple、Guar gum、Carageenan、Alginic acid (和光純薬)、Agar (日本製薬)。これらの基質を 2% に調製し、酵素液はアフィニティーカラム、Toyopearl HW-55 カラムで分画後、回収した peak1、2 を用いた。活性は Nelson-Somogyi 法 (A500) で測定した。

8) Nordin plot 法

ガラクタナーゼによる基質の分解様式を以下の方法^{10、11)} で測定した。酵素濃度を変えて基質ガラクトンと反応させた後に、終濃度 90% のエタノールと 20% 塩化カルシウム 100 μl を加えて 4℃で一晩静置した。遠心分離後の上清の全糖量、還元糖量を、前記の方法で測定した。

9) 基質ガラクトンの分解物の調製

ガラクタナーゼの活性測定に用いた基質のガラクトンと、ガラクタナーゼ分解後のものを Sephacryl S-200 のカラムで分画し、A 280 と全糖量を測定した。又、各種基質をガラクタナーゼで分解したものを TLC、HPLC で分析し、生成糖の特徴を検討した。

3. 実験結果

1) いんげんまめの糖質分解酵素の測定

a) 酵素の調製と活性のスクリーニング

市販のいんげんまめから調製した粗酵素液を、pH5.2、6.5、7.8 の条件下で各種基質と反応させ、酵素活性を測定した (表 1)。最も活性が高かったのは sucrose の分解活性 (pH6.5) で、次いで trehalose、各種 pectin などに対する活性が高かった。別の実験から galactan の分解活性が高いことも分かり、トレハラーゼとガラクタナーゼに注目してこれ以降の実験を進めた。

b) いんげんまめの自己消化反応

いんげんまめの粗酵素液と基質 galactan、trehalose の反応の経時変化を測定した (図 1 a)。trehalose では反応開始から 5 時間まで急速に分解が起こり、それ以降は緩やかに分解が進んだ。galactan でも同様の傾向が見られたが、分解の強さは trehalose よりも小さかった。また、別にいんげんまめの磨砕物を 30℃ で自己消化処理し、経時的に採取した試料を TLC で分析した結果、#5 (0h) で標準糖の galactose よりやや低い位置に下に尾を引いたスポットが検出された。反応の進行につれてこのスポットの量が減少することが分かった (図 1 b)。この糖は標準糖 trehalose の Rf 値に相当することから trehalose と推定された。

2) いんげんまめのガラクタナーゼの精製

いんげんまめの酵素液をトウモロコシデンプンゲルによるアフィニティーカラムで精製した (図 2 a)。トレハラーゼ活性の大部分はゲルに吸着せず素通りしたが、ガラクタナーゼ活性は硫酸の存在下でゲルに吸着され、硫酸を含まない緩衝液で溶出されたことから、デンプンゲルがいんげんまめのガラクタナーゼの精製に有効であることが分かった。ここで得られた活性画分を Sephacryl S-200 カラムに供した。タンパク質、酵素活性を測定した結果、溶出の前半に大きな活性ピーク (peak1) が得られた (図 2 b)。これは、アフィニティーカラムにより夾雑タンパク質の多くが除去され、酵素が精製されたことを示唆している。溶出の後半の peak2 は、peak1 よりかなり低分子であることから peak1 の単量体である可能性も考えられる。

3) 酵素の諸性質

a) ガラクタナーゼの電気泳動分析

カラムクロマトグラフィーで精製した酵素を用いて電気泳動分析を行った (図 3)。Laemmli 法による SDS 系の電気泳動では約 34kDa の位置に主バンドが得られ、他の夾雑タンパク質のバンドは殆ど見えなかった。このことから、いんげんまめのガラクタナーゼは簡便なステップで精製されることが分かった。

表 1 いんげんまめ抽出液中の糖質加水分解酵素の活性

#	pH 5.2		pH 6.5		pH 7.8	
	Substrate	Activity*	Substrate	Activity*	Substrate	Activity*
1	Soluble starch	40.9	Sucrose	182.8	Soluble starch	50.8
2	Trehalose	30.2	Trehalose	143.2	Me-β-glucoside	42.2
3	Laminarin	28.7	Soluble starch	142.9	Xylan	36.0
4	Sucrose	27.8	Alginate acid	42.8	Glucomannan	32.8
5	Me-β-glucoside	27.3	Me-β-glucoside	36.9	Agar	31.9
6	Glucomannan	24.9	Pectin・lemon	34.3	Alginate acid	30.6
7	Xylan	24.0	Xylan	27.5	β-Glucan	28.3
8	Pectin・lemon	21.7	Dextran	26.9	Laminarin	27.6
9	Pectin・apple	18.9	Laminarin	25.2	CMC**	27.4
10	Pectic acid	17.9	Agar	23.4	Pectic acid	25.9

* Enzyme activities were represented by the amount of reducing sugar released as the μmole of glucose.

** CMC Carboxymethyl-cellulose

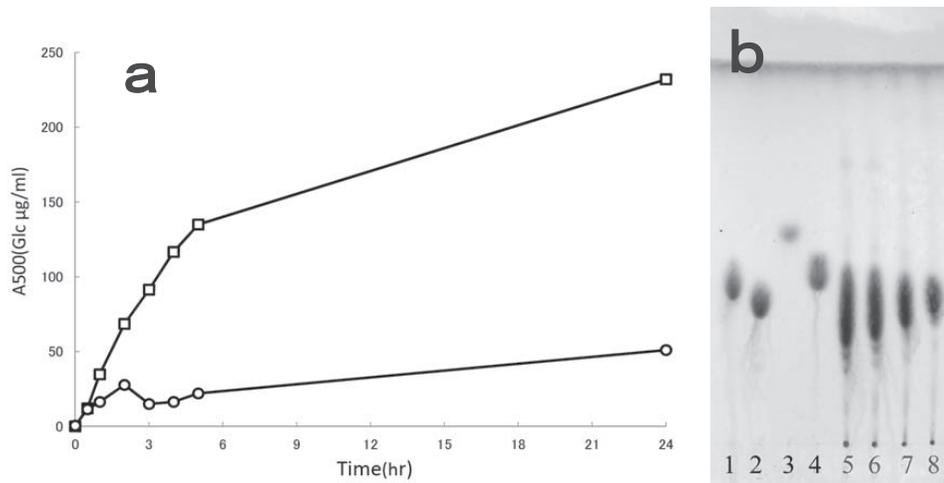


図1 いんげんまめの酵素液による分解と自己消化反応

- a、基質の加水分解の経時変化。いんげんまめの酵素液による基質 Galactan ○、Trehalose □からの生成還元糖量 (A500、グルコース量 $\mu\text{g/ml}$ で表示)。
- b、自己消化物の分析。いんげんまめの磨砕抽出物を用いて自己消化反応を行い、経時的に #5) 0h、#6) 3h、#7) 24h、#8) 43.5h で試料を採取して、分解物の糖組成を TLC で分析した。標準糖 #1) Glc、#2) Gal、#3) Xyl、#4) Ara。

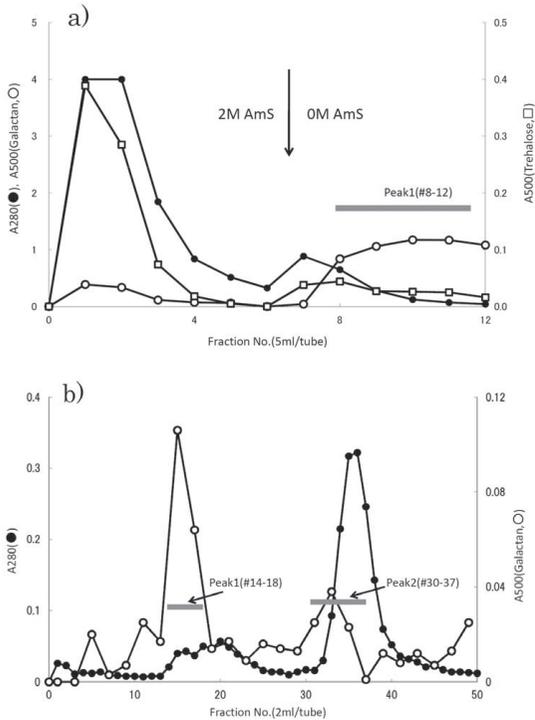


図2 いんげんまめのガラクターナーゼの精製

- a、アフィニティーカラムによる精製;タンパク質量(A280) ●; 酵素活性(A500) Galactan ○; Trehalose □。図中の矢印は溶媒の切り替え点を表わす。
- b、Sephacryl S-200 による peak1 のリクロマトグラフィー; タンパク質量(A280) ●; 酵素活性(A500) Galactan ○。

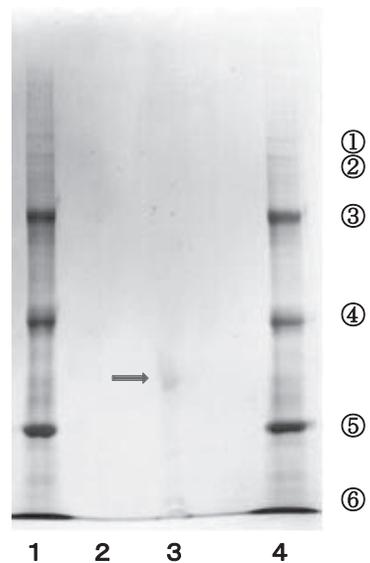


図3 ガラクターナーゼの SDS 電気泳動分析

レーン #1-4 は標準タンパク質で、①ミオシン 200kDa、② β -ガラクトシダーゼ 116kDa、③ウシ血清アルブミン 66kDa、④アルドラーゼ 42kDa、⑤カルボニックアンハイドラーゼ 30kDa、⑥ミオグロビン 17kDa。レーン #2 はアフィニティーカラムの活性ピークで、殆どバンドは見えなかった。レーン #3 は Sephacryl S-200 の peak1。図中の矢印はガラクターナーゼのバンドの位置を示す。

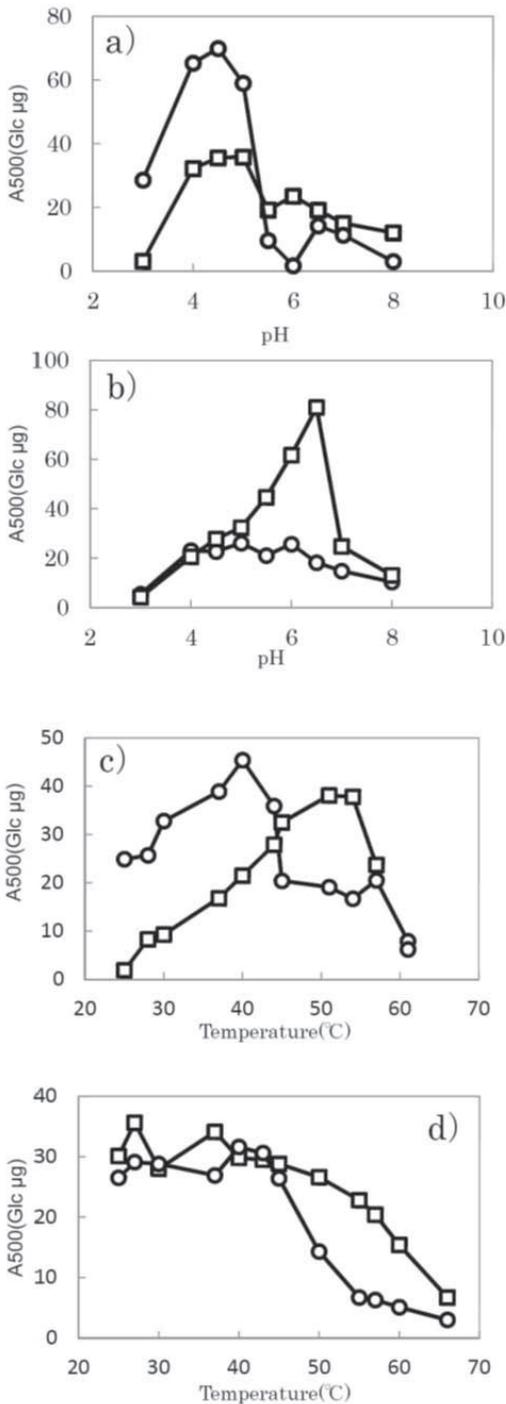


図4 いんげんまめのガラクターナーゼの至適温度・至適 pH・安定性

a、至適 pH; b、pH 安定性; c、至適温度; d、温度安定性。縦軸の酵素活性(A500)はグルコース量に換算した遊離還元糖量(μg/ml)で記載。Galactan ○; Trehalose □。

表 2 いんげんまめのガラクターナーゼの基質特異性

Substrate	Peak 1*	Peak 2*
Galactan	44.9	19.4
Pectin·apple	69.6	48.9
Pectin·lemon	45.9	41.3
Pectic acid	88.4	68.5
Guar gum	26.8	15.3
Carageenan	12.4	62.7
Alginic acid	2.7	3.5
Agar	22.8	8.9

* Enzyme activities were represented by the amount of reducing sugar released as the μmole of glucose.

b) 酵素の性質

いんげんまめの粗酵素を用いて、ガラクターナーゼ活性、トレハラーゼ活性の性質を測定した(図4 a ~ d)。両活性は pH4.5 付近で最大活性を示したが、pH 安定性はガラクターナーゼでは pH4.0 から pH6.5 付近までの範囲で安定であったのに対して、トレハラーゼは pH5.0 から 7.0 までが安定で、それ以上のアルカリ側では急激に失活した。ガラクターナーゼの至適温度は 35 ~ 40°C 付近にあり、トレハラーゼでは 50 ~ 55°C 付近であった。ガラクターナーゼ、トレハラーゼともに 40°C までは安定であり、それ以上の高温では徐々に失活が見られた。これらの結果からいんげんまめのガラクターナーゼとトレハラーゼは互いに異なった性質を有することが分かった。

4) 酵素の作用性

a) いんげんまめのガラクターナーゼの基質特異性

いんげんまめの酵素液を直接、Toyopearl HW-55 カラムで分画し、peak1 と peak2 に分けて、それぞれ基質特異性を検討した(表2)。その結果、大半の基質で peak1 の方が peak2 よりも活性が強く pectin や pectic acid にもよく作用した。又、peak2 は carageenan に特に高い作用を示したが、galactan への活性は小さかった。

b) ガラクターナーゼの作用形式の検討

いんげんまめのガラクターナーゼの作用形式を Nordin plot 法を用いて測定した(図5)。その結果、いんげんまめのガラクターナーゼは右下がりのパターンを与え、基質を内部から分解する endo-type の作用形式であることが分かった。exo-type の場合には

図に例として挿入した通り、x 軸に平行なパターンを与える。

c) ゲルろ過カラムによるガラクトタン分解物の検出

Sephacryl S-200 カラムを用いて基質ガラクトタンからの分解生成物の分析を行った。未処理の基質ガ

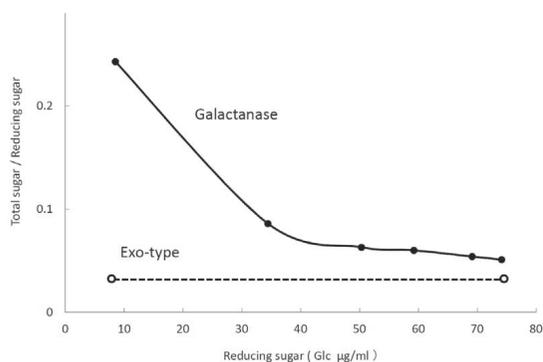


図5 Nordin plotによる作用形式の測定

横軸の酵素活性(A500)はグルコース量に換算した遊離還元糖量(μg/ml)で記載。縦軸は全糖量(A490)/還元糖量(A500)。Galactanase ●; Exo-type の例 ○。

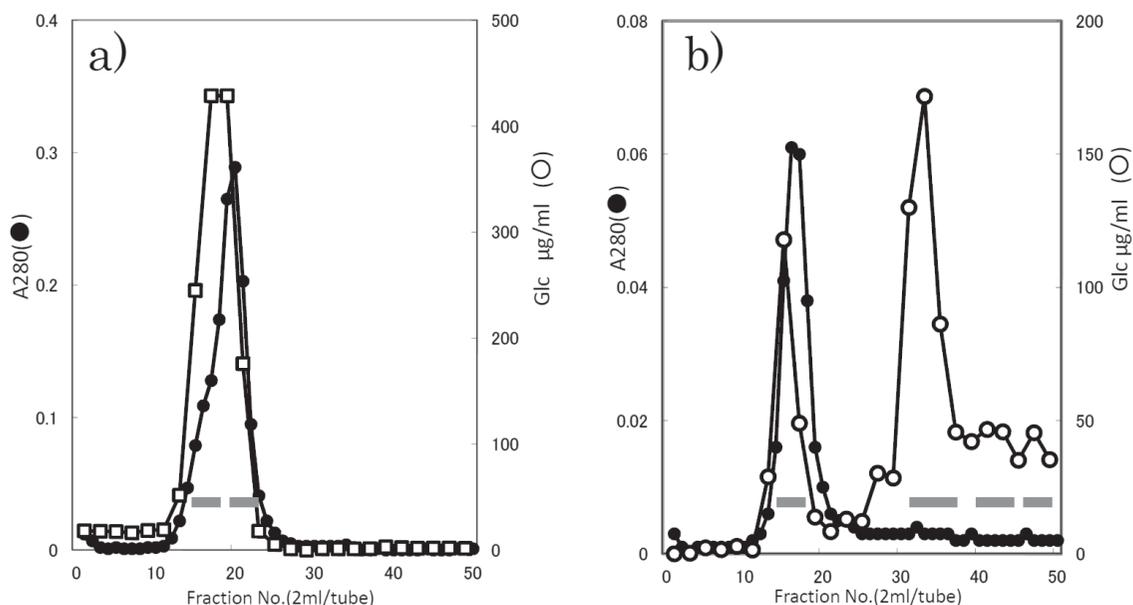


図6 ガラクトタンの分解生成物の分子量測定

- a, Sephacryl S-200 による基質ガラクトタンの分画パターン。
 b, ガラクトナーゼで分解したガラクトタンの溶出パターン。タンパク質量(A280) ●; 全糖量(A490)○。全糖量はグルコース量(μg/ml)に換算して記載。

ラクタンは図6aのようにカラムのV₀位に溶出された。ガラクトナーゼによる分解物はカラムの後半部分に溶出された(図6b)。ここでV₀位に溶出された糖はガラクトタンに混入している不純物の多糖と思われる。

d) 基質ガラクトタンの分解物の分析

Sephacryl S-200 カラムによる精製で得られた peak1 (図2b) を基質ガラクトタンと反応させてその分解物を再度、Sephacryl S-200 カラムにより分画して得られた分解物の Peak1、Peak2 について TLC、HPLC で分析した(図7a・b)。TLC ではガラクトースのほかにもオリゴ糖が生成していることが分かった。HPLC ではガラクトース、アラビノース、ラムノースと、未同定のオリゴ糖が検出された。このことから、活性測定の基質として用いたガラクトタンは、ガラクトースにアラビノースが結合したアラビノガラクトタンの構造を持つことが示唆された。

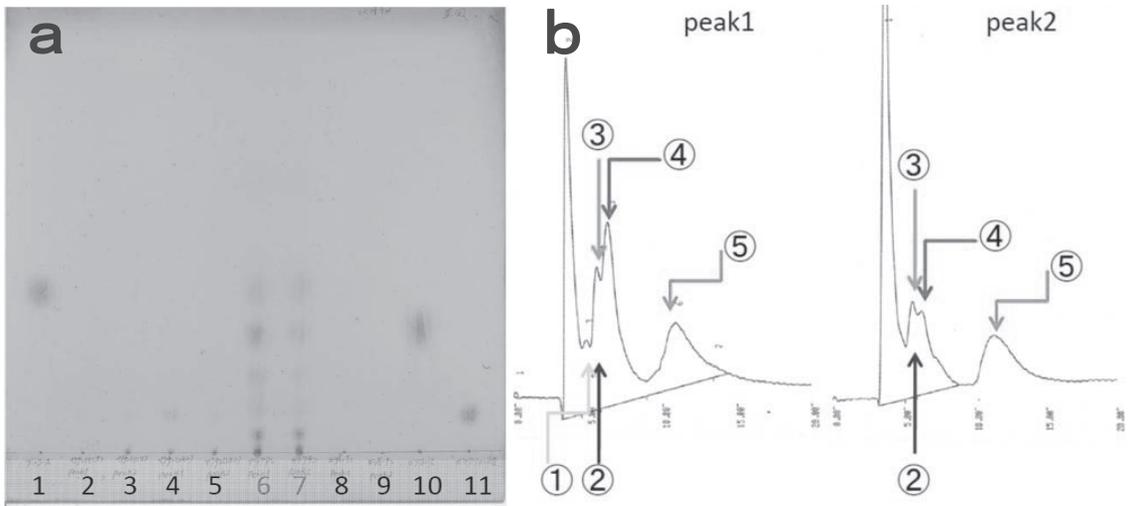


図7 ガラクタンの分解生成物の分析

- a、いんげんまめのガラクタナーゼをゲル濾過のカラムで分画し、得られた活性 peak1、2(図 2b に示すように分子量の違いで分画されたもの)を各種基質に作用させ、反応生成物を TLC で分析した。
 #1 Glc、#2 Pectin・lemon (peak1)、#3 Pectin・lemon (peak2)、#4 Pectin・apple (peak1)、
 #5 Pectin・apple (peak2)、#6 Galactan (peak1)、#7 Galactan (peak2)、#8 Carageenan (peak1)、
 #9 Carageenan (peak2)、#10 Galactose、#11 Galacturonic acid。
 b、上記 a で用いた酵素(活性 peak1、2)を基質ガラクトンに作用させ、反応生成物を HPLC で分析した。標準糖の溶出位置は① Rham、② Glc、③ Ara、④ Gal、⑤ Galacturonic acid。

4. 考察

いんげんまめの磨砕物中にはアミラーゼ、トレハラーゼ活性が高いことが分かった(表 1)。自己消化の経時変化および分解生成物の分析(図 1 a, b)で、TLC の結果から反応 0 分の試料でトレハロースに相当する⁵⁾ スポットが見られ、経時的に減少してグルコースが増えたことから、このトレハロースとトレハラーゼ活性に関しても更に検討の余地があると考えられる。

別の実験からガラクタナーゼの活性も高いことが分かったため、主としてこの酵素について精製および諸性質を調べた。この酵素はアフィニティーカラムで効率よく精製され(図 2 a)、Sephacryl S-200 カラムで得られた主成分(図 2 b)の酵素は SDS-PAGE で分子量が 34kDa と算定された(図 3)。ゲル濾過による酵素の分子量は 100kDa 以上と推定されることから、いんげんまめ中の酵素はオリゴマーとして存在している可能性が高い。

酵素の基質特異性の測定結果(表 2)から、本酵素は基質のガラクトンを加水分解し、その作用様式はエ

ンド型(図 5)であることが分かった。基質として用いたアラビアガムのガラクトンを加水分解して、経時的にガラクトオリゴ糖を精製した(図 6、7)。基質のガラクトンは β -1, 3-ガラクトンが主成分とされていることから、本酵素は β -1, 3-ガラクタナーゼである可能性が高い。最近、えのきたけの β -1, 3-ガラクタナーゼが精製された¹²⁾が、この酵素の活性測定においてもアラビアガムのガラクトンを基質として用いている。

表 2 に示した通り、この酵素はペクチン類に対する分解活性も高いことが認められたが、これは使用した基質中に共存する β -1, 4-および β -1, 6-ガラクトンに作用するガラクタナーゼによるものと推測される。えのきたけの β -1, 3-ガラクタナーゼは分子量が 30kDa であり、pH5.5、45℃前後で最大活性が得られた¹²⁾。本酵素でも類似した特徴が見られる(図 3、図 4)。

植物性の食材の中でダイズやいんげんまめのようなマメ科植物のものにはガラクトンが含まれている。ルピナス、ローカストビーンガム、タラガム、グアガム、

アラビアガムなどにもガラクトランの存在が知られている。前者ではAGPとして α -1,4-ガラクトン酸からなるペクチン酸の主鎖に、 β -1,4-ガラクトランが分岐側鎖を構成しており、後者では β -1,3-結合のガラクトランにアラビノース、ラムノースなどが結合して存在し、他にも β -1,6-や β -1,4-結合のガラクトランが共存している¹³⁾。AGPはトマトやぶどうなどでも報告^{14, 15)}があり、果実の熟成とこのペクチンの分解の相関性は *pectin engineering* として興味を持たれている¹⁶⁾。

上述の多糖ガラクトランには、 β -結合型の β -1,4-結合タイプ、 β -1,3-結合タイプおよび β -1,6-結合タイプのガラクトランの3種類があり、それぞれを加水分解するガラクタナーゼとしてエンド型とエキソ型の6種類の酵素が存在する。3種類のガラクトランを分解する酵素には数多くの報告があるがその殆どは微生物起源のものである。微生物の β -1,4-ガラクタナーゼではエキソ型酵素の報告がある¹⁷⁾が、活性測定にはじゃがいも、ほうちわまめ (*lupin*) の β -1,4-ガラクトランやペクチン性ガラクトランが使用されている。微生物のガラクタナーゼの報告は多いが、植物の酵素の報告は極めて少ない¹⁸⁾。本報告はいんげんまめ中に β -1,3-ガラクタナーゼが存在することを示唆するもので、新しい知見と思われる。今後の研究で更に詳細を明らかにすることが必要である。

文献

- 1) A. Nakamura *et. al.* : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 2249 ~ 2258 (2001).
- 2) M. R. Samson *et. al.* : *Planta.*, 159, 322-328 (1983).
- 3) S. W. Hinz *et. al.* : *Carbohydr. Res.*, 340, 2135 - 2143 (2005).
- 4) S. Biswas *et. al.* : *J. Plant Physiol.*, 160, 327 - 337 (2003).
- 5) 荒木紀美、竹内梓、小林唯、柳田彩乃、河野祥子、関澄恵、池和田恵、小林幹彦：実践女子大学生生活科学部紀要、48、19 ~ 25 (2011)。
- 6) 荒木紀美、中田陽子、菱田桂菜、池和田恵、谷亀久美子、小林幹彦：実践女子大学生生活科学部紀要、46、1 ~ 8 (2009)。
- 7) 荒木紀美、田中奈穂美、萩原歩美、波多野智子、小林幹彦：実践女子大学生生活科学部紀要、47、71 ~ 77 (2010)。
- 8) M. Somogyi : *J. Biol. Chem.*, 195, 19-23 (1952).
- 9) M. Dubois *et. al.* : *Anal. Chem.*, 28, 350-356 (1956).
- 10) K. K. Tung, J. H. Nordin : *Analyt. Biochem.*, 29, 84 - 90 (1969).
- 11) S. Takagi *et. al.* : *Carbohydr. Res.*, 129, 167-177 (1984).
- 12) T. Kotake *et. al.* : *J. Biol. Chem.*, 286, 27848 - 27854 (2011).
- 13) 國崎直道、佐野征男：食品多糖類—乳化・増粘・ゲル化の知識、幸書房 (2001)。
- 14) A. T. Carey *et. al.* : *Plant Physiol.*, 108, 1099-1107 (1995).
- 15) L. Saulnier *et. al.* : *Carbohydr. Res.*, 224, 219-235 (1992).
- 16) S. O. Sorensen *et. al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 7639 - 7644 (2000).
- 17) M. S. Buckeridge and J. S. Reid : *Planta*, 192, 502 - 511 (1994).
- 18) H. Yang *et. al.* : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 538-541 (2006).