

# 綿増殖細胞からの $\alpha$ -mannosidaseの精製とその特性

山本 有子, 庭前 京子\*, 地田 千枝\*\*, 赤壁 節子,  
星野 一宏, 諸橋 昭一, 笹倉 寿介

## [英文抄録]

Alpha-mannosidase is widely distributed in plant seeds and microorganisms. The purification of the enzyme recently received increasing attention because the enzyme was used to determine the carbohydrate structures of oligo-mannoproteins, which has specific biological activities. An  $\alpha$ -mannosidase was purified over 100-fold from Wata callus by successive chromatography with overall yield of 8%. The purified enzyme had a molecular mass of 250 kDa. This enzyme had the same optimum pH at 4.5 and optimum temperature at 50°C as one from jack bean. This enzyme appeared to be a metal enzyme containing  $Zn^{2+}$ . The enzyme hydrolyzed *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -mannoside, methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside, benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside,  $\alpha$ (1→2)-mannobiose,  $\alpha$ (1→3)-mannobiose, and  $\alpha$ (1→6)-mannobiose, with  $K_m$  of 0.527mM, 0.182mM, 0.190mM, 1.06mM, 0.696mM, 5.10mM, respectively. The hydrolysis of various  $\alpha$ -linked mannobiose indicated that the enzyme hydrolyzes the  $\alpha$ -mannobiose in the order of  $\alpha$ (1→6) >  $\alpha$ (1→3) >  $\alpha$ (1→2), unlike the conventional  $\alpha$ -mannosidae.

Key Words : Plant tissue culture,  $\alpha$ -Mannosidase, Oligo-mannoprotein,  
Carbohydrate structures, *Gossypium indicum* Lam.

## 1. 緒 言

近年, 生体細胞の細胞表面あるいは酵素表面に結合した糖鎖が, 細胞の生理活性あるいは酵素活性に多大な影響を示すことが報告されている。例えば, maltoseを加水分解するヒトの腸間酵素は重量に対して30~40%の糖を含んでいるが, papainの加水分解に対して抵抗性を示す<sup>1)</sup>。一方, 酵母の細胞壁と結合したmannoseを多量に含む糖鎖は, 酵母の性的凝集反応を引き起こすことが知られている<sup>2)</sup>。特に, *Saccharomyces cerevisiae*における糖鎖の構造は古くから検討されており, 糖鎖の構造は, mannoseが $\alpha$ (1→6)結合で結合したoligo-mannose骨格に, 側鎖として2, 3個のmannoseが $\alpha$ (1→2), または,  $\alpha$ (1→3)結合したmannobioseとmannotrioseが結合されていると報告されている<sup>3, 4)</sup>。近年, この糖タンパクの生物学的役割を明らかにするため, oligo-mannose型糖鎖の構造を解明することが重要となってきた。そこで, この糖鎖の結合状態を決定するために, 特定の結合部位のみを加水分解することが可能な $\alpha$ -mannosidaseが必要とされている。現在まで, jack beanから精製した $\alpha$ -mannosidaseが安価で入手しやすいことから, oligo-mannoseの構造決定に使われてき

\* 一正蒲鉾株式会社

\*\* 富山工業高等専門学校物質工学科 助手

た。しかし、この酵素は加水分解速度が遅く、さらに、基質特異性として $\alpha(1 \rightarrow 2)$ 、 $\alpha(1 \rightarrow 3)$ 、 $\alpha(1 \rightarrow 6)$ 結合の順に切断するため、mannose含量を決定するために利用できるが、明確な構造決定に利用できなかった<sup>5)</sup>。また、近年、発見された微生物由来の $\alpha$ -mannosidaseは、主に $\alpha(1 \rightarrow 2)$ 、 $\alpha(1 \rightarrow 3)$ 結合を特異的に加水分解すると報告されている<sup>6, 7)</sup>。従って、oligo-mannose型糖質の構造決定を行うために新しい切断特性を有する $\alpha$ -mannosidaseの検索とその性質を決定することが急務となってきている。そこで、我々の研究室では、新しい起源から $\alpha$ -mannosidaseを生産回収することを目的として担子菌、植物などを用いて検索した結果、綿カサの細胞内に $\alpha$ -mannosidaseを高濃度に蓄積することを発見した<sup>8)</sup>。

本研究では、この綿カサから $\alpha$ -mannosidaseを高純度に精製することを検討した。さらに、精製した酵素の至適pH、反応速度パラメーター、基質特異性等の特性を、従来報告されている $\alpha$ -mannosidaseと比較検討した。

## 2. 実験材料および方法

### 2. 1 植物細胞と培地

本研究では、 $\alpha$ -mannosidaseの起源として綿 (*Gossypium indicum* Lam.) を使用した。綿増殖細胞は、3年前に幼苗の組織片からカサを誘導し、その後、一ヶ月毎に継代培養したものを使用した。培地は、植物の培養によく用いられるMurashige-Skoog寒天培地<sup>9)</sup>を使用した。炭素源としてショ糖を用い、培地に30 g/lとなるように添加した。さらに、植物ホルモンとして2,4-ジクロロフェノキシ酢酸とカイネチンを用い、それぞれ0.5  $\mu$ Mとなるように添加した。培地のpHは、滅菌前に0.1N NaOHを用いてpH 5.6 $\pm$ 0.1に調節した。培養器として植物用試験管(100mm $\times$  $\phi$ 40mm)を用い、培地の入った培養器の殺菌はオートクレーブにより121 $^{\circ}$ C、15分間の条件で行った。培養はバイオフィトチャンバー (Lx-3000, TAITEC Co., Tokyo) 内で、28 $^{\circ}$ C、6,000Luxの連続照射条件下で行った。

### 2. 2 綿の植物体からのカサの誘導

綿植物体からカサを誘導する方法を以下に示す。無菌状態のもとで、幼苗新芽内の成長点をメスで切り出し、それを1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で十分洗浄した後、滅菌水で2回濯いだ。その後、この細胞片を上記に示したMS寒天培地上に植え、暗所静置培養にて約1週間培養した。その後、カサ化した細胞をメスを用い1 mm程度に細分化し、新鮮なMS寒天培地に植え継いだ。その後1ヶ月ごとに固体培地で継代培養を行った。

### 2. 3 $\alpha$ -mannosidaseの精製

綿増殖細胞より $\alpha$ -mannosidaseを精製するための手順を以下に示す。本精製は酵素を失活させないためすべて4 $^{\circ}$ Cの条件下で行った。

**2. 3. 1 綿カサからの粗酵素の抽出** MS寒天培地上で3週間培養した綿カサ242g-wetを、0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.0) 200mlに懸濁させた後、この懸濁液をミキサー内に入れ、10分間破碎することによりカサを破碎した。その後、破碎液内の沈殿を除去するために濾紙 (No.131, ADVANTEC Co., Tokyo) を用いて吸引濾過を行った。濾液として437mlの粗酵素抽出液を得た。この抽出液は次の精製に使用するまで冷蔵庫内で保存した。

**2. 3. 2 硫酸沈殿** 酵素抽出液中に含まれる、低分子タンパク質、フラボノイド等を除去するために、抽出液に30%飽和となるように硫酸アンモニウム (硫酸) を添加した。24時間放置した後、遠心分離 (12,000rpm, 10min) を行い、 $\alpha$ -mannosidaseを含む上清を回収した。さらに、この上清

に80%飽和となるように硫酸を添加し遠心分離(12,000rpm, 10min)を行うことにより $\alpha$ -mannosidaseを含む沈殿を回収した。この沈殿を0.01 Mリン酸緩衝液(pH7.0)で再溶解させ、セルロースチューブ(Size 24, Viskase Sales Co., Ill, USA)を用いて、24時間透析した。その後、セルロースチューブ内の溶液を、限外濾過膜(分子量分画：20 kDa, ADVANTEC Co.)を用い濃縮した。最終的に2.80mlの粗酵素液を得た。

2. 3. 3 陰イオン交換クロマトグラフィー 弱陰イオン交換体であるDEAE-Toyopearl 650 M (Tosoh Co., Tokyo)を、カラム(250mm× $\phi$ 15mm)に詰めて、0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)を供給することによりカラムを平衡化した。限外濾過により濃縮した粗酵素液2.0ml (14.7mg-protein)をカラムに負荷し、樹脂に酵素を吸着させた後、供給緩衝液のNaCl濃度を0から0.5Nまで直線的に増加させることにより吸着していた酵素を溶出させた。キャリアー流速は、0.85ml/min, 分画体積は、3.00ml/tubeで行った。フラクションコレクター(SF-5250, ADVANTEC Co.)を用いて回収したサンプル内の $\alpha$ -mannosidase活性を測定し、活性のある分画を集め、上記に示した限外濾過により濃縮し、4.96mlの粗酵素液を得た。

2. 3. 4 疎水性クロマトグラフィー BUTYL-Toyopearl 650M (Tosoh Co.)を、カラム(250mm× $\phi$ 15mm)に詰めて、20%飽和となるように硫酸を加えた0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化させた。DEAE-Toyopearlにより精製した粗酵素液3.5ml (1.08mg-protein)に20%飽和となるように硫酸を加えた後、カラムに負荷した。供給する緩衝液の硫酸濃度を20%から0%まで直線的に濃度勾配をかけることにより吸着していた酵素を溶出させた。キャリアー流速は、0.85ml/min, 分画体積は3.00ml/tubeで行った。 $\alpha$ -mannosidase活性のある分画を集め、限外濾過により濃縮し最終酵素溶液(5.43ml)とした。

## 2・4 分析方法

2. 4. 1  $\alpha$ -mannosidaseの活性測定 カルス抽出液および各精製段階における粗酵素液内の $\alpha$ -mannosidaseの活性測定は、Ohtaniらの方法<sup>10)</sup>に従って

-nitrophenyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (以下 p-NPM, Sigma Co. MO, USA)を基質として測定した。活性測定の手順を以下に示す。試験管に0.1 M酢酸緩衝液(pH4.5) 1 mlと2 mM p-NPM 0.5 mlを入れた後、粗酵素液0.1 mlを加え、30℃で20分間反応させた。反応の停止は、0.55M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液1 mlを試験管内に加えることにより行った。 $\alpha$ -mannosidase活性は、420nmにおける吸収の増加を分光光度計で測定し、酵素反応により切断されたp-nitrophenolの量を、その分子吸光係数4,200Abs./M $\cdot$ cmを用いて算出した。 $\alpha$ -mannosidase活性1 Uは、1分間に1  $\mu$  molのp-nitrophenolを生産する酵素量と定義した。また、精製した $\alpha$ -mannosidaseの至適pHおよびpH安定性の測定には、緩衝液として0.1Mマックルバイン緩衝液(pH 2.5~8.0)を使用した。さらに、至適温度および温度安定性の測定では、0.01M酢酸緩衝液(pH4.5)中で反応温度を10℃から70℃に変えて行った。

2. 4. 2 その他の分析方法 精製した $\alpha$ -mannosidaseの糖鎖切断パターンを調べるために、methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (Aldrich Chemical Co., WI, USA), benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (Sigma Co.), 1- $\alpha$ -6-D-mannobiose (Funakoshi Co., Tokyo), 1- $\alpha$ -3-D-mannobiose (Funakoshi Co.), および2-o-( $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-D-mannopyranose (Funakoshi Co.)を基質として、p-NPMを用いた活性測定と同様条件で測定した。また、これら基質はp-nitrophenylを有していないため単位時間内に生成するmannose量から酵素活性を計算した。生成したmannoseの定量は、mannoseを標準としたSomogyi-Nelson法<sup>11)</sup>により行った。また、酵素精製段階における蛋白質量は、BSAを標準としたLowry法<sup>12)</sup>により定量した。

2. 4. 3 ポリアクリルアミドゲル電気泳動 精製した $\alpha$ -mannosidaseの分子量および酵素

の純度を調べるためにポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。分離ゲルとして10%ポリアクリルアミドゲル、標準蛋白質として分子量マーカーキットMW-ND-500 (Sigma Co.)を使用した。また、泳動後のタンパク質の染色は銀染色キット (Wako Pure Chemical Industries Ltd, Kyoto)を用いて行った。

### 3. 結果および考察

#### 3・1 $\alpha$ -mannosidaseの精製

我々は先の研究において、綿カルスをも所で培養した時、細胞内にglucosidase, galactosidase等の加水分解酵素を多量に蓄積することを報告した<sup>8)</sup>。特に、この $\alpha$ -mannosidaseの蓄積量は、多量に含むといわれているアーモンド、およびタチナタマメに匹敵した。そこで、この綿カルスが生産する $\alpha$ -mannosidaseの性質を検討するために、カルス破碎液から酵素を高純度に精製することを検討した。

まず、先の研究により培養21日目においてカルス内の $\alpha$ -mannosidase含量が最大となることより、カルスを21日間MS寒天培地上で静置培養を行った。その結果、得られた綿カルス242g-wetをミキサーを用いて破碎した。この時得られた全タンパク質量は、321mgであり、カルスのタンパク質含量は1.33 mg-protein/g-callusであることがわかった。また、この酵素抽出液中に含まれる $\alpha$ -mannosidaseの全活性は17.6Uであった。次に、得られた粗酵素溶液からタンパク質を回収するために硫酸沈殿による処理を行った後、弱陰イオン交換クロマトグラフィーにより $\alpha$ -mannosidaseを単離精製することを検討した。図1は、DEAE-Toyopearlを用いてイオン交換クロマトグラフィーを行った結果である。タンパク質は280nmの紫外吸収を測定することにより調べた。NaCl濃度0 Mの条件時(分画数2~8)

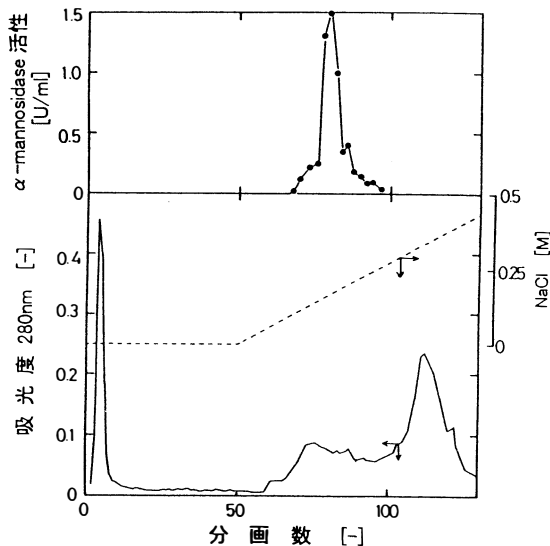


図1. DEAE-Toyopearlによる $\alpha$ -mannosidaseの分離。0.01 Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化させたDEAE-Toyopearlに、硫酸沈殿により濃縮した粗酵素液2.0ml(14.7mg-protein)を負荷し、0.5MのNaCl濃度勾配により溶出させた。280nmにおける蛋白質の吸収は実線で、NaClの濃度変化は点線で示した。また、 $\alpha$ -mannosidase活性は●で示した。

に樹脂に吸着しなかったタンパク質を多量に排出した。この分画には $\alpha$ -mannosidase活性が認められなかった。その後、塩濃度を徐々に増加させることにより吸着したタンパク質を樹脂から脱離させた。その結果、分画数68から97において $\alpha$ -mannosidaseの活性が認められたため、このフラクションを回収し濃縮した。得られた粗酵素溶液の比活性は1.23 U/mg-proteinであり、最初のカルスから調製した酵素抽出液の22.5倍に精製することができた。しかし、精製した酵素溶液の純度を調べるためにポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った結果、残念ながら複数のバンドが確認された。このため、さらに精製を行う必要があることがわかった。

図2は陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した酵素溶液をBUTYL-Toyopearl 650Mを用いた疎水性クロマトグラフィーに共した結果である。すべての分画に280nmの吸収が認められたが、 $\alpha$ -mannosidase活性は硫酸濃度が11%から8%の間、すなわち分画数59から73に存在することがわかった。ま

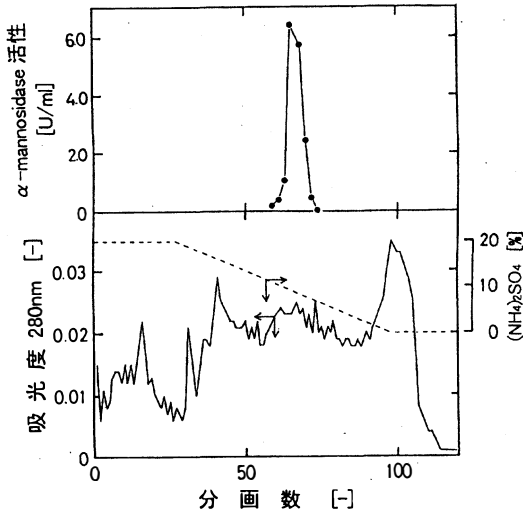


図2. Butyl-Toyopearlによる $\alpha$ -mannosidaseの分離

0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化させたButyl-Toyopearlに、DEAE-Toyopearlにより精製した粗酵素液3.5ml(1.08 mg-protein)を負荷し、20%飽和の硫酸濃度を0まで濃度勾配をかけることにより溶出させた。280 nmにおける蛋白質の吸収は実線で、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の濃度変化は点線で示した。また、 $\alpha$ -mannosidase活性は●で示した。

レーンIIは精製した $\alpha$ -mannosidaseを示す。この図から、 $\alpha$ -mannosidaseのバンドが単一であり、極めて高純度に精製できたことが確認できた。さらに、分子量マーカースとの比較により $\alpha$ -mannosidaseの分子量は約250kDaであることがわかった。この値は、先に報告されているjack bean (190kDa)<sup>5)</sup>, *Phaseolus vulgaris* (190kDa)<sup>13)</sup>, papaya seed (160kDa)<sup>10)</sup>, およびsoy bean (170-180kDa)<sup>14)</sup> 由来の $\alpha$ -mannosidaseより若干大きい分子量を有していることがわかった。したがって、綿カルスより精製した $\alpha$ -mannosidaseはそれら酵素とは異なる性質を有している可能性がある。また、綿カル

た、この硫酸濃度における紫外吸収量が小さいにもかかわらず高い活性が得られたことより、 $\alpha$ -mannosidaseを極めて高純度に精製できたと考えられる。

表1は $\alpha$ -mannosidaseを精製した各段階における全タンパク量、全 $\alpha$ -mannosidase活性、比活性、活性の収率、および、精製倍率を示す。この表より、 $\alpha$ -mannosidaseの活性収率は精製の段階を重ねることにより低下し、最終段階では8%にまで低下した。しかし、比活性は徐々に増加し、最終的に5.47 U/mg-proteinにまで向上した。この値は酵素抽出液の比活性の100倍に匹敵する。従って、イオン交換、および、疎水性の2段階のクロマトグラフィーを行うことにより極めて容易に $\alpha$ -mannosidaseを綿カルスから高純度に精製できることがわかった。

次に、最終的に得られた $\alpha$ -mannosidaseの純度および分子量を調べるために、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。図3は、高分子量を有するタンパク質を測定するための分子量マーカースと比較に用いた電気泳動の結果であり、図中のレーンIは分子量マーカースを、また、

表1  $\alpha$ -mannosidaseの精製

精製段階	タンパク量 (mg)	全活性 (U)	比活性 (U/mg)	収率 (%)	精製倍率 (-)
カルス破碎 <sup>a)</sup>	321	17.6	0.0547	100 <sup>b)</sup>	1 <sup>c)</sup>
硫酸アンモニウム	26.3	11.0	0.418	62.5	7.64
DEAE-Toyopearl	1.45	1.78	1.23	10.1	22.5
BUTYL-Toyopearl	0.258	1.41	5.47	8.01	100

a) カルス242g-wetを破碎した結果。

b) カルス破碎後を1とした全活性に対する収率。

c) カルス破碎後を100とした比活性に対する相対値。

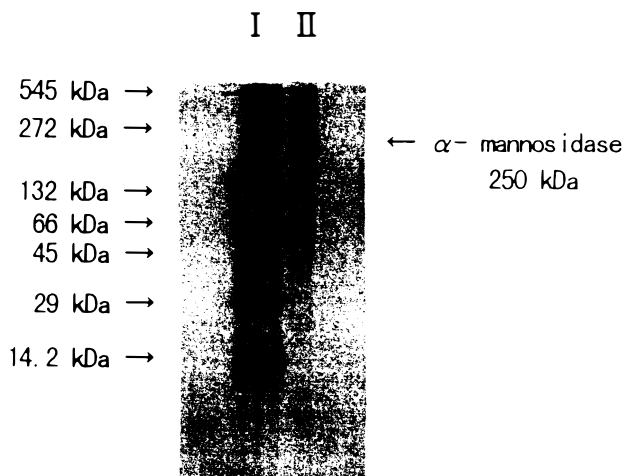


図3. ポリアクリルアミドゲル電気泳動  
 精製した $\alpha$ -mannosidaseは、10%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルは銀染色により染色した。Iは分子量マーカー、IIは精製した $\alpha$ -mannosidaseを示す。分子量マーカーの各バンドは、 $\alpha$ -Lactalbumin from Bovine Milk (14.2 kDa), Caru-bonic Anhydorase from Bovine Erythrocytes (29 kDa), Albumin from Chicken Egg (45 kDa), Albumin from Bovine Serum (66 kDa monomer, 132 kDa dimer), およびUrease from Jack Bean (272 kDa trimer, 545 kDa hexamer)である。

ス由来の $\alpha$ -mannosidaseのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った結果、10kDa以下のバンドが2本現れたことより本 $\alpha$ -mannosidaseの構造は分子量の異なるタンパク質のサブユニット構造であると考えられる。今後、この点を詳細に検討する必要があると考えられる。

3・2  $\alpha$ -mannosidaseの性質  
 3. 2. 1  $\alpha$ -mannosidaseの至適pHと至適温度

図4は、精製した $\alpha$ -mannosidaseの至適pHをp-NPMを用いて調べた結果である。この図より、至適pHは4.5であることがわかる。他の起源の $\alpha$ -mannosidaseの至適pHと比較すると、jack beanはpH 4.5<sup>5)</sup>であり、豆科の種子中に含まれる $\alpha$ -mannosidaseと同じであることがわかった。図5は、精製した $\alpha$ -mannosidaseの至適温度を調べた結果である。これより、至適

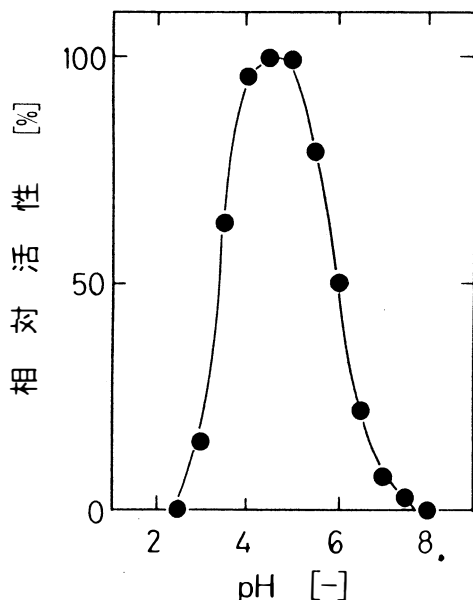


図4.  $\alpha$ -mannosidaseの至適pH  
 酵素反応は、p-NPMを用いて30℃で行った。使用した緩衝液はマックルバイン緩衝液を使用した。

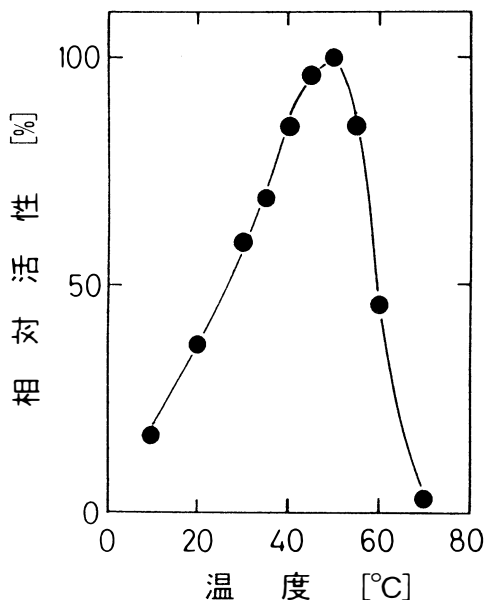


図5.  $\alpha$ -mannosidaseの至適温度  
 酵素反応は、p-NPMを用いて0.01M酢酸緩衝液 (pH 4.5)内で行った。

温度は50℃であった。また、この時の比活性は10.7U/mg-proteinであり、30℃で酵素反応を行った場合の1.7倍であった。至適pHと同様に他の起源と比較すると、carica papaya<sup>10)</sup>は60℃、*Cellulomonas* sp.<sup>15)</sup>は50℃であり、温度安定性においても他の起源と類似していることがわかった。さらに、ここではデータは掲載しなかったが、本酵素は、pH 4.5から7.0緩衝液中に1時間放置しても活性は失われず、極めて安定であった。このpH安定性の範囲はjack bean由来の $\alpha$ -mannosidaseの性質に近いことがわかった。しかし、本酵素の温度安定性は30℃以下であり、50℃以下で安定であるjack beanや微生物由来の $\alpha$ -mannosidaseよりかなり低く、温度に対して不安定な酵素であることがわかった。これは、綿カルスの最適増殖条件が28℃であることに関係しているものと考えられる。

3. 2. 2  $\alpha$ -mannosidase活性に対する各試薬の影響 一般に、 $\alpha$ -mannosidaseは金属タンパク質であると報告されている。そのうち、jack bean<sup>5)</sup>、carica papaya<sup>10)</sup>、*Phaseolus vulgaris*<sup>13)</sup>、とkaya seed<sup>16)</sup>由来の酵素はZn<sup>2+</sup>を含有、また、Japanese quail oviduct 由来の酵素<sup>17)</sup>はCo<sup>2+</sup>を含有していると報告されている。そこで、本研究で精製した $\alpha$ -mannosidaseが金属含有酵素であるか、および酵素活性を阻害する物質を調べるために、活性の測定時にそれぞれの試薬を反応溶液に1 mMとなるように添加して酵素活性を測定した。表2は、各種試薬を添加し酵素活性を測定した結果である。試薬を添加しないときの酵素活性を100としてそれぞれの酵素活性を相対値で示した。各種塩を添加した結果、MgSO<sub>4</sub>、CoSO<sub>4</sub>、MnCl<sub>2</sub>において酵素活性の向上が認められた。特に、Zn<sup>2+</sup>の添加により酵素活性を14%も向上させることができたことからZn<sup>2+</sup>含有酵素であると推察された。

表2. 酵素活性に対する各試薬の影響

試薬 (1mM)	相対比活性 (%)
None	100
ZnCl <sub>2</sub>	114
CoSO <sub>4</sub>	108
MnCl <sub>2</sub>	104
MgSO <sub>4</sub>	101
BaCl <sub>2</sub>	100
KCl <sub>2</sub>	100
PbCl <sub>2</sub>	100
CaCl <sub>2</sub>	97
Sr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	96
HgCl <sub>2</sub>	92
CuSO <sub>4</sub>	90
FeCl <sub>3</sub>	80
BaCl <sub>2</sub>	17
Glutathion	109
Toriton X-100	107
NaN <sub>3</sub>	104
Urea	102
Iodoacetic acid	97
2-Mercoptethanol	97
N-Ethylmaleimide	94
L-Cystein	92
EDTA	91
SDS	65
p-Chlormercribenzoic acid	33

測定は、pH4.5、30℃の条件で行った。

また、Co<sup>2+</sup>を含有している可能性も考えられるが、現在の時点では不明である。この点を今後検討しなければならないと考えられる。また、Hg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、およびBa<sup>2+</sup>を反応液に添加した時、酵素活性が92以下に低下したことから、これら金属イオンは本酵素の金属阻害剤であることがわかった。さらに、チオール物質、界面活性剤、電子伝達抑制物質、および金属キレート剤の添加を検討したが、SDSとp-chloromercribenzoic acidを除いて活性の低下は認められなかった。以上の結果より、本酵素はZn<sup>2+</sup>含有酵素であり、先に示した試薬以外活性を阻害することができない、極めて安定な酵素であることがわかった。

### 3. 2. 3 $\alpha$ -mannosidaseの基質特異性

表3は、精製した $\alpha$ -mannosidaseの基質特異性を各種基質を用いて酵素活性を測定し、Lineweaver-Burk plotによりミカエリス定数K<sub>m</sub>と最大反応速度V<sub>max</sub>を調べた結果である。mannoseが $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)結合しているp-NPM、methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside、およびbenzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosideを基質とした時、K<sub>m</sub>値は、それぞれ0.53、0.18、および、0.19 mMとなり、同様の実験を行ったjack beanの $\alpha$ -mannosidaseのK<sub>m</sub>値<sup>5)</sup>、それぞれ、2.5、31、および12 mMよりも小さいことがわかった。これは、本酵素の基質への吸着性が高いことを示し

表3.  $\alpha$ -mannosidaseの反応速度定数

基 質	糖の結合タイプ	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (U/mg-pro.)
<i>p</i> -nitrophenyl $\alpha$ -D-mannopyranoside	$\alpha(1\rightarrow4)$	0.527	10.8
$\alpha$ -methyl-D-mannopyranoside	$\alpha(1\rightarrow4)$	0.182	1.84
$\alpha$ -benzyl-D-mannopyranoside	$\alpha(1\rightarrow4)$	0.190	0.117
1- $\alpha$ -6-D-mannobiose	$\alpha(1\rightarrow6)$	1.06	44.9
1- $\alpha$ -3-D-mannobiose	$\alpha(1\rightarrow3)$	0.696	22.0
2- <i>o</i> -( $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-D-mannopyranose	$\alpha(1\rightarrow2)$	5.10	6.21

速度定数の測定は、pH4.5、30°Cの条件で行った。

ている。また、各種の $\alpha$ 結合を有するmannobioseを基質に用いた場合、 $K_m$ 値は $\alpha(1\rightarrow3)$ 、 $\alpha(1\rightarrow6)$ 、 $\alpha(1\rightarrow2)$ 結合の順に大きくなり、 $V_{max}$ 値は $\alpha(1\rightarrow2)$ 、 $\alpha(1\rightarrow3)$ 、 $\alpha(1\rightarrow6)$ 結合の順に大きくなるのがわかった。以上の結果より、本酵素はいずれの基質に対しても吸着性が高く、 $\alpha(1\rightarrow6)$ 結合と $\alpha(1\rightarrow3)$ 結合しているmannoseを特異的に加水分解する酵素であることが判明した。現在報告されている $\alpha$ -mannosidaseの基質特異性は、jack beanの場合、 $\alpha(1\rightarrow4)$ 結合をほとんど切断せず、 $\alpha(1\rightarrow2)$ 、 $\alpha(1\rightarrow3)$ 、 $\alpha(1\rightarrow6)$ の順で加水分解し、また、微生物の場合<sup>6,7)</sup>、 $\alpha(1\rightarrow2)$ 、 $\alpha(1\rightarrow3)$ を特異的に切断することが知られている。本研究で精製した綿カルス由来の $\alpha$ -mannosidaseは、今まで報告されていない $\alpha(1\rightarrow6)$ 結合を特異的に加水分解できる酵素である。oligo-mannose型糖質の構造決定に際して、この酵素を利用することにより、厳密な分析が達成できると期待される。

#### 4. 結 言

綿カルスの細胞破碎液から、DEAE-ToyopearlおよびBUTYL-Toyopearlを用いたカラムクロマトグラフィーにより $\alpha$ -mannosidaseを100倍に精製した。精製した $\alpha$ -mannosidaseの分子量は、約250 kDaであった。また、本酵素の至適pHは4.5、至適温度は50°Cであり、 $Zn^{2+}$ 含有酵素であることから、jack bean由来の $\alpha$ -mannosidaseに極めて近い性質を有していることがわかった。しかし、本酵素のとり切断様式はjack bean由来の酵素と異なり、 $\alpha(1\rightarrow6)$ と $\alpha(1\rightarrow3)$ 結合しているmannoseを特異的に加水分解する新規 $\alpha$ -mannosidaseであることがわかった。

#### 参考文献

- 1) J. J. Kelly and D. H. Alpers, *J. Biol. Chem.*, **248**, 1973, p.8216-8221.
- 2) P. H. Yen and C. E. Ballou, *Biochemistry*, **13**, 1974, p.2428-2437.
- 3) G. H. Joes and C. E. Ballou, *J. Biol. Chem.*, **424**, 1969, p.1043-1051.
- 4) K. Ogawa, J. Nishikori, T. Ino, and K. Matsuda, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1994, p.560-562. Y.T. Li, *J. Biol. Chem.*, **242**, 1967, p.5474-5480.
- 5) E. Ichishima, M. Arai, Y. Shigemastu, H. Kumagai, and R. Sumida-Tanaka, *Biochimica et Biophysica. Acta.*, **658**, 1981, p.45-53.
- 7) S. Yamamoto, and S. Nagasaki, *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 1975, p.1981-1989.



- 8) 庭前京子, 平成6年度 富山大学工学部化学生物工学科 卒業研究論文, 1995.
- 9) T. Murashige and F. Skoog, *Physiol.Plant.*, **15**, 1962, p.473-497.
- 10) K. Ohtani and A. Misaki, *Agric.Biol.Chem.*, **47**, 1983, p.2441-2451.
- 11) N. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, **195**, 1952, p.19-23.
- 12) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J., Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 1951, p. 265-276.
- 13) E. Paus and T. B. Christensen, *Eur. J. Biochem.*, **25**, 1972, p.308-314.
- 14) M. Saita, T. Ikenaka, and Y. Matsushima, *J. Biochem.*, **70**, 1971, p.827-833.
- 15) K. Takegawa, S. Miki, T. Jikibara, and S. Iwahara, *Biochemica et Biophysica Acta.*, **991**, 1989, p.431-437.
- 16) T. Shiroo, K. Ohtani, K. Fuchigami, M. Nakatani, I. Yuasa, and A. Misaki, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1996, p.687-688.
- 17) H. Oku, S. Hase, and T. Ikenaka, *J. Biochem.*, **110**, 1991, p.29-34.