

カボチャ種子糖質関連酵素の活性に及ぼす発芽処理の影響

高崎 瑞穂¹, 田中 友加里¹, 原田 カレン¹, 小林 秀行¹

¹ 鯉淵学園農業栄養専門学校 食品栄養科

(受付: 2022年12月6日/受理: 2022年12月26日)

摘要: 西洋カボチャ種子の各種グリコシダーゼにおける発芽前後の活性変化について検討した。休眠種子には β -D-galactosidase 活性, α -D-galactosidase 活性が検出された。一方, 発芽処理により β -D-galactosidase の活性は約2倍に増大したが, β -D-fucosidase と β -D-glucosidase 活性は20倍以上に増大した。また, 粗酵素液のイオン交換クロマトグラフィーの結果, β -D-fucosidase 活性と β -D-glucosidase 活性, β -D-galactosidase 活性のピークが一致し, その画分の SDS-PAGE の結果からこの画分は66 kDaの大きさを持つ単一のタンパク質であることが示唆された。このことから, タイロースウッド種子の β -D-fucosidase/ β -D-glucosidase と類似の酵素がカボチャ種子の発芽処理により活性化されたと考えられる。

キーワード: β -D-glucosidase, 糖質関連酵素, カボチャ種子, 発芽

I 緒言

カボチャは緑黄色野菜であり, 可食部100g当たり水分76.2g, 炭水化物20.6g, タンパク質1.9g, 脂質0.3g, カリウム450mg, ビタミンC43mg, β -カロテン4mg程度などを含んでおり, 野菜の中でも丈夫で栽培しやすい。収穫後は, サツマイモや栗などと同様に貯蔵あるいはゆっくり加熱することによって甘みが増す。

一方, カボチャ種子には可食部100g当たり水分4.5g, 脂質51.8g, タンパク質26.5g, 炭水化物12g(食物繊維7.3g), ビタミンB₂0.19mg, カルシウム44mg, マグネシウム530mgを含んでいる。また, ポリフェノールの1種であるリグナンが含まれており, 抗酸化作用や炎症を抑える作用があると言われている。リグナン類には頻尿などの排尿障害を軽減する効果が期待できる他, 女性ホルモンのバランスを整える作用があり, 骨粗鬆症の予防にも効果的と言われている¹⁾。

発芽とは, 低水分含量のために休眠状態であった胚の各器官での細胞の原形質が水和により再活性化する過程であるとされ, 種子形成時に合成・蓄積方

向にあった器官の代謝機能が, 発芽時には分解の方向に転換することであり, 貯蔵物質の分解と利用に関わる酵素群が活性化される²⁾。

β -D-glucosidase (β -D-glucopyranoside glucohydrolase) は, 配糖体やオリゴ糖から非還元末端のグルコース残基を遊離する酵素であり, 生物全般に存在し, いろいろな機能を示す。微生物によるバイオマス変換, 動物における糖脂質の分解, 植物における細胞壁オリゴ糖の代謝, 防御などである³⁾。

種子の β -D-glucosidase については, タイロースウッドの種子⁴⁾ やカボチャ種子⁵⁾ に β -D-glucosidase 活性が存在し, 精製酵素の性質について報告されている。

本研究では, カボチャ種子の β -D-glucosidase を含む種々の糖質関連酵素群の発芽処理前後における活性の質的・量的変化について検討を加えた。

II 材料と方法

1. 種子及び発芽処理

本校の作物園芸農場で生産された西洋カボチャ(栗カボチャ)を用いた。種子を採取し水洗いし, 乾燥させた。発芽処理は, シャーレに脱脂綿を敷いて水を加え, 暗所で27℃, 5日間行った。

¹ 〒319-0323 茨城県水戸市鯉淵町 5965

2. 粗酵素液の調製

発芽処理前後で種子から殻を取り除き、種子重量に対して6倍量の0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を加え、氷冷下ホモジナイズし、4 °C で 10,000 rpm, 10 min 遠心分離し、得られた上澄み液を 0.05 M の酢酸緩衝液 (pH 5.0) に対して透析し、粗酵素液とした。

3. グリコシダーゼ活性測定

活性測定のための各種基質 pNP-グリコシド (p-nitrophenylglycoside) は、Sigma 社製を用いた。各種 pNP-グリコシドを基質とし、以下のようにグリコシダーゼ活性を測定した。

10 mM の各種 pNP-グリコシド溶液 100 μ L に、800 μ L の 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH5.0) と粗酵素液 100 μ L を加え、25 °C で 30 min 反応させ、0.2 M Na₂CO₃ を 1 mL 加えて反応を停止した。408 nm の吸光度を測定し、上記条件で 408 nm の吸光度を 1 上昇させる酵素量を 1 unit とした。

4. 酵素の精製

イオン交換クロマトグラフィーは SE-cellulose カラム (1.5x10 cm) を 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で平衡化し、同緩衝液に対して透析した粗酵素液 (30 mL) をアプライした。同緩衝液で洗浄後、0.5 M NaCl を含む同緩衝液で酵素を溶出した。タンパク質濃度は、280 nm での吸光度 1 をタンパク質 1 mg/mL とした。

5. SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemli の方法⁶⁾ に従い、アクリルアミド濃度 10 % を用いた。タンパク質は CBB R-250 染色で検出した。分子量マーカーは Amersham Biosciences の LMW calibration Kit [Phosphorylase b (97 kDa), Albumin (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carbonic anhydrase (30 kDa), Trypsin inhibitor (20 kDa), α -Lactalbumin (14 kDa)] を用いた。

III 結果と考察

1. 発芽処理による酵素活性の変化

Table 1 に示すように、カボチャの休眠種子には強力な β -D-galactopyranoside 分解活性 (0.705 unit/mL) が存在し、加えて α -D-galactopyranoside 分解活性 (0.137 unit/mL) と若干の β -D-fucopyranoside 分解活性 (0.059 unit/mL), β -D-glucopyranoside 分解活性 (0.058 unit/mL) が存在した。

一方、発芽処理によって β -D-galactopyranoside 分解活性は 2 倍に (1.340 unit/mL), α -D-galactopyranoside 分解活性も 2 倍 (0.330 unit/mL) に増加したが、 β -D-fucopyranoside 分解活性と β -D-glucopyranoside 分解活性は 20 倍以上 (1.360 unit/mL と 1.340 unit/mL) に上昇した。また、 α -L-arabinopyranoside 分解活性は 20 倍以上 (0.193 unit/mL) に、 β -D-cellobioside 分解活性は 10 倍以上 (0.200 unit/mL) に上昇した。一方、他の基質 (pNP- α -L-arabinofuranoside, pNP- α -L-fucopyranoside, pNP-N-acetyl- β -D-galactosaminide, pNP- α -D-glucopyranoside, pNP-N-acetyl- α -D-glucosaminide,

Table 1. カボチャ種子の発芽前後のグリコシダーゼ活性の変化

Substrate	Activity of resting seed (unit/mL, A)	Activity of germinated seed (unit/mL, B)	B-A (unit/mL)	B/A (fold)
pNP- α -L-arabinopyranoside	0.008	0.193	0.185	24.1
pNP- β -L-arabinopyranoside	0.015	0.075	0.060	5.0
pNP- β -D-cellobioside	0.021	0.200	0.179	9.52
pNP- β -D-fucopyranoside	0.059	1.360	1.301	23.1
pNP- α -D-galactopyranoside	0.137	0.330	0.193	2.41
pNP- β -D-galactopyranoside	0.705	1.340	0.635	1.90
pNP- β -D-galacturonide	0.016	0.091	0.075	5.69
pNP- β -D-glucopyranoside	0.058	1.340	1.282	23.1
pNP- β -D-mannopyranoside	0.035	0.029	-0.006	0.83

pNP- α -L-arabinofuranoside, pNP- α -L-fucopyranoside, pNP-N-acetyl- β -D-galactosaminide, pNP- α -D-glucopyranoside, pNP-N-acetyl- α -D-glucosaminide, pNP-N-acetyl- β -D-glucosaminide, pNP- β -D-glucuronide, pNP- β -D-lactopyranoside に関しては殆ど活性が見られなかった。

pNP-N-acetyl- β -D-glucosaminide, pNP- β -D-glucuronide, pNP- β -D-lactopyranoside) については、発芽前・後ともにそれらの分解活性は殆ど検出されなかった。

発芽時の β -D-fucopyranoside 分解活性と β -D-glucopyranoside 分解活性の活性比率は、1.360 unit/1.340 unit であり、ほぼ 1.0 であった。 β -D-glucopyranosidase は、細胞壁を構成するセルロースを含む β -グルカンに対して作用し発芽時のエネルギーを得ていると考えられるが、 β -D-fucopyranosidase の活性に相当すると考えられる基質は報告されていない。

α -L-arabinopyranosidase 活性についても、発芽前後で 20 倍以上の活性の上昇が見られるが (Table 1), β -D-glucosidase が α -L-arabinopyranosidase 活性を示すことは、知られていることであり⁷⁾、タイロースウッドの酵素の場合、 α -L-arabinosidase/ β -D-glucosidase 活性比は 0.05 であり、カボチャの酵素の 0.14 という値と似た傾向にあると考えられる。

2. 酵素の精製

発芽後の種子のホモジナイズを SE-cellulose カラムを用いてイオン交換クロマトグラフィーを行った (Fig. 1)。0.05 M の酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0), に対して透析したホモジナイズを、同緩衝液で平衡化した SE-cellulose カラムにアプライし、0.5 M NaCl を含む同緩衝液で溶出した。溶出画分には、 β -D-glucosidase 活性, β -D-fucosidase 活性, β -D-galactosidase

活性が検出された。 β -D-glucosidase 活性と β -D-fucosidase 活性はほぼ同レベルであり、 β -D-galactosidase 活性は 1/3 程度であった。いくつかの β -D-glucosidase が、 β -D-fucosidase 活性, β -D-galactosidase 活性を示すことは知られている⁷⁾。

精製酵素は SDS-PAGE (Fig. 2) に示したように、2 種類の酵素活性がほぼ等量存在すると考えられる画分が 1 つのタンパク質バンドを示し、そのサイズは 66 kDa であった。もし違う酵素だとすれば 2 本のバンドが検出される可能性が高く、ゲル中の唯一のタンパク質バンドの分子量 (66 kDa) はタイロースウッド種子の酵素 (β -D-fucosidase/ β -D-glucosidase) とほぼ同一であることから、タイロースウッドの酵素と類似の酵素の存在が示唆される⁸⁾。

一方、カボチャ休眠種子の精製 β -D-glucosidase については、ゲル濾過による分子量が 48 kDa, SDS-PAGE の結果 2 量体構造をとっており、S-S 結合を持たない 28.0 kDa と 20.1 kDa の 2 つのサブユニットからなっており⁵⁾、本研究における発芽処理によって生成する β -D-glucosidase とは別のものと思われる。

精製酵素が β -D-glucosidase 活性 (8.30 unit/mL), β -D-fucosidase 活性 (9.40 unit/mL), β -D-galactosidase 活性 (2.70 unit/mL) を示したことから、カボチャ種子の β -D-fucosidase/ β -D-glucosidase 活性比は 1.13, β -D-galactosidase/ β -D-glucosidase 比は 0.33 となり、タイロースウッド種子の β -D-fucosidase/ β -D-glucosi-

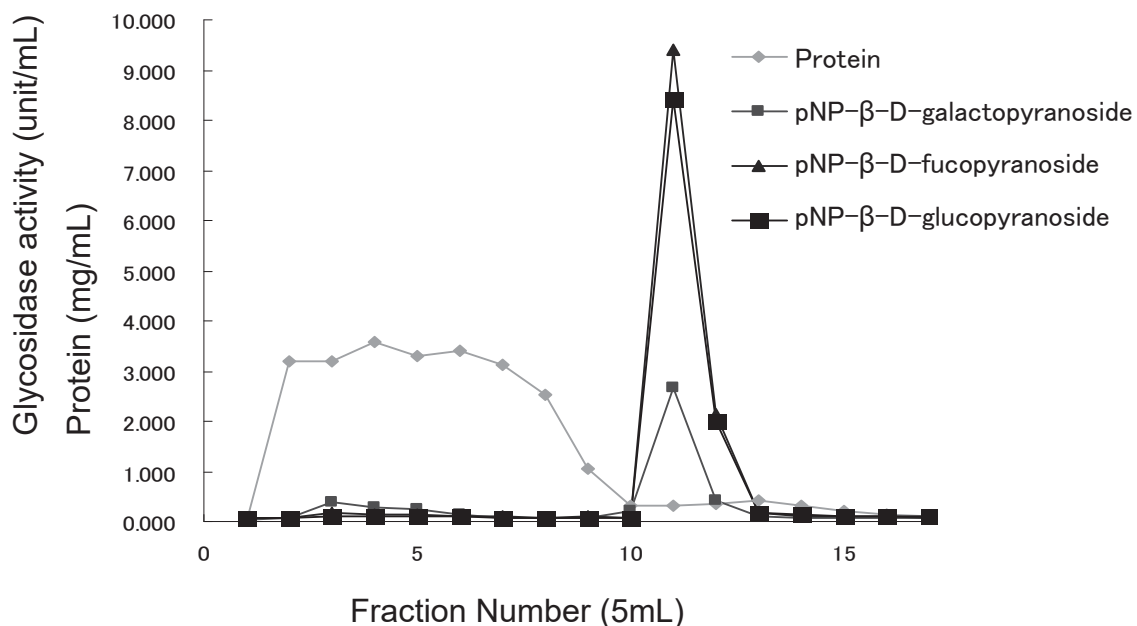


Fig. 1. 粗酵素液のカチオン交換クロマトグラフィー

IV 引用文献

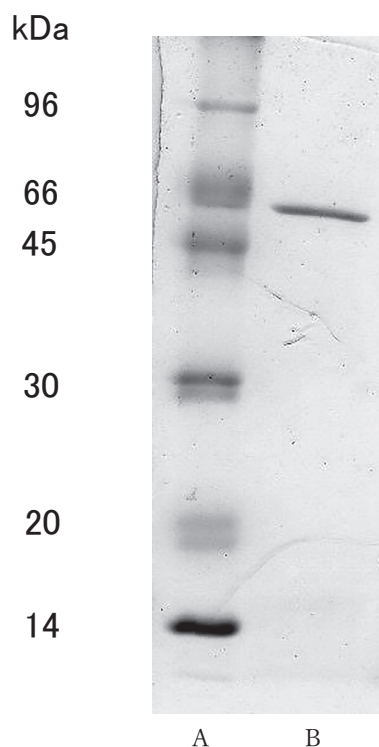


Fig. 2. 精製酵素の SDS-PAGE

A: 分子量マーカー, B: 精製酵素 (画分 11, Fig.1)

dase 活性比の 1.24, β -D-galactosidase/ β -D-glucosidase 比の 0.09 とは差はある⁸⁾が, 似た傾向を示していると考えられる。

また, タイロズウッドの種子には, イソフラボンの仲間である Dalcochinin glucoside が 3% 以上含まれており, β -D-fucosidase/ β -D-glucosidase の天然の基質であるとの報告がある^{4, 9)}。

β -D-glucosidase は多糖やオリゴ糖, 配糖体などから β -D-glucose を遊離するが, カボチャ種子ではフェノール配糖体 (ククルビトシド) が報告されている¹⁰⁾。しかし, 種子の発芽との関係で議論されている研究はなく, これらが β -D-glucosidase の基質となり得るかどうか興味を持たれる。

- 1) 久野憲康, 土屋欣也, 中島成生 (1999), 新しい抗老化化粧品原料—ゴマ発芽中のリグナン配糖体—。 *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, **33** (3): 245-253.
- 2) 南川隆雄 (1984), 種子発芽の生化学。 *化学と生物*, **22** (2): 84-92.
- 3) Ketudat Cairns J. R., Esen A. (2010) β -Glucosidases. *Cell.Mol.Life Sci.*, **67**: 3389-3405.
- 4) Srisomsap C., Svasti J., Surarit R., Champattanachai V., Sawangareetrakul P., Boonpuan K., Subhasitanont P., and Chokchaichamnankit D. (1996) Isolation and Characterization of an Enzyme with β -Glucosidase and β -fucosidase Activities from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. *J. Biochem.*, **119** (3): 585-590.
- 5) Kim E.Y., Kwon C.W., Chang P.-S. (2021) Purification and characterization of a novel acid-tolerant and heterodimeric β -glucosidase from pumpkin (*Cucurbita moschata*) seed. *J.Biosci.Bioeng.*, **132** (2): 125-131.
- 6) Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- 7) β -Glucosidase EC 3.2.1.21, <https://www.brenda-enzymes.org/> (参照 2022-10-29).
- 8) Svasti M.R.J., Srisomsap C., Surarit R., Techasakul S., and Ketudat-Cairns J. (1997) Characterization of a Novel Rotenoid- β -Glucosidase Enzyme and its Natural Substrate from Thai Rosewood. International Conference on Biodiversity and Bioresources: Conservation and Utilization, 23-27 Novemver 1997, Phuket, Thailand. URL:<http://www.iupac.org/symposia/proceedings/phuket97/svasti.html> (参照 2022-10-29).
- 9) Cairns J.R.K., Champattanachai V., Srisomsap C., Wittman-Liebold B., Thiede B., Svasti J. (2000) Sequence and Expression of Thai Rosewood β -Glucosidase/ β -Fucosidase, a Family 1 glycosyl Hydrolase glycoprotein. *J. Biochem.*, **128**: 999-1008.
- 10) Koide K., Li W., Liu L., Hata E., and Nikaido T. (2005) New Phenolic glycosides from the Seeds of *Cucurbita moschata*. *Chem. Pham. Bull.*, **53** (2): 225-228.