高等植物由来キチナーゼの抽出とキチン分解活性†

近藤和生・原田公朝・柴田雅美・前田良輔

同志社大学工学部 物質化学工学科††

緒 言

キチンはN-アセチル-D-グルコサミンを単糖とする多糖であり、自然界に豊富に存在し、その潜在的な機能は計り知れない。主な所在はカニやエビ、そして昆虫の外骨格である。つまり、食品としてのカニやエビからでる廃棄物の有効利用という観点から、キチンに関する研究は最近の20年間に著しい発展を遂げてきている。今後ともキチンの新しい機能がさらに開発されていくであろう。

キチンそのものに関する研究とほとんど並行して、キチン分解酵素及びキチン合成酵素に関する研究も盛んに行われてきた(Chang *et al.*, 1992; Molano *et al.*, 1979; Ride and Barber, 1990; Tsukamoto *et al.*, 1984; Yamamoto *et al.*, 1995)。これらの酵素は完全変態する昆虫の幼虫や蛹、またキチン質をその構築成分としない高等植物にも病害防除のために、広く分布している。特に、キチン分解酵素であるキチナーゼの精製とその特性評価に関する研究は多い。キチナーゼはその加水分解特性の重要性に加えて、キチンの分解生成物であるキチンオリゴ糖が様々な生理活性を有するために、その方面での応用が期待されている(Usui *et al.*, 1987)。

本研究では、キチナーゼによる高生理活性キチンオリゴ糖の選択的生成システムの開発を最終目標としている。本報では、その第一段階として粗キチナーゼのスクリーニングを目的として、比較的容易に入手できる数種の高等植物、すなわち大根種子、ヒマワリ種子、スイカ種子、ミカンの表皮、柿の表皮および笹の葉から粗酵素を抽出した。粗酵素によるコロイダルキチンの加水分解のpH依存性を検討し、さらに、反応性の比較的大きかった大根種子と笹の葉由来の粗酵素について、その酵素反応動力学パラメータを求めた。

1. 実 験

1.1 粗酵素の調製

酵素源である大根(*Raphanus sativus* L. var. *acanthiformis* Makino) 種子、ヒマワリ(*Helianthus annuus*

L.) 種子、スイカ(*Citrullus vulgaris* Schrad.) 種子はタキイ種苗より入手し、ミカン(*Citrus unshiu* Marc.)の表皮、柿(*Diospyros kaki* Thunb.)の表皮は市販のものをを用いた。また、笹(*Pleioblastus fortunei*)の葉は京都市京都御苑に自生しているものを採取した。

粗酵素の調製は、各高等植物試料について概して以下の通りである。各試料を5 mmほどに細かくした後、0.05 mol/dm³ クエン酸-リン酸水素二ナトリウム緩衝液(pH 4.0)中でホモジナイザーによって粉碎した。得られた懸濁液を汙紙を用いて汙過し、上述の緩衝液を外部溶液として、この汙液を4°Cに調節された冷蔵庫中で一晚透析(三共純薬株式会社製 seamless cellulose tubing, 分画分子量12,000~14,000)した。透析後の溶液を遠心分離し、その上澄み液を粗酵素抽出液とした。

1.2 粗酵素抽出液の加水分解pH依存性実験

様々なpHに調整された緩衝液(0.05 mol/dm³ クエン酸-リン酸水素二ナトリウム)5~7 mlに、基質としてカニの殻由来のキチンから調製したコロイダルキチン(濃塩酸で処理し、乾燥微粉末にしたもの)0.03 gと各粗酵素抽出液1 mlを、310 Kに調整した恒温槽中で24時間反応させた。除タンパク剤として10 wt% タングステン酸ナトリウム水溶液100 mlと0.33 mol/dm³ 硫酸100 mlを混合したもの1 mlを反応液に添加することで、反応を停止させた。Schales 変法(Imoto and Yagishita, 1971)を用いて、生成した還元糖量を定量することにより酵素活性を測定した。

1.3 加水分解反応の基質濃度依存性実験

基質濃度依存性実験は、後述するように、反応性が比較的高い大根種子と笹の葉由来の粗酵素抽出液について検討した。各酵素の至適pHに調整したクエン酸-リン酸水素二ナトリウム緩衝液9 mlと0.03 gのコロイダルキチンの混合物に、各粗酵素抽出液1 mlを添加して反応を開始した。反応の停止および酵素活性の測定は1.2に示した通りである。大根種子由来の粗酵素系については60分まで、笹の葉由来の粗酵素系については200分までの反応の経時変化をとり、酵素反応動力学を検討した。

† 1997年2月3日受理

†† 〒610-03 京都府京田辺市多々羅郡谷1-3

Fig. 1 pH dependence of activities of crude enzymes from various chitinase sources. Reaction temperature; 310 K, Reaction time; 24h

Table 1 Chitinase activities of crude enzymes from various higher plants

Sources	Chitinase activity [unit/g-fresh mass]
Radish seeds	0.496
Bamboo leaves	0.105
Sunflower seeds	0.0467
Orange skin	0.0283
Watermelon seeds	0.0146
Persimmon skin	0.00175

2. 結果と考察

2.1 pH依存性

Fig. 1に、6種類の高等植物由来の粗酵素抽出液によるコロイドグルキチンの加水分解pH依存性を示す。縦軸の相対活性とは、各粗酵素について最大活性を有するpHでの活性を100%とし、これを基準とした他のpHの相対活性である。いずれの粗酵素抽出液も、至適pHが3.5から6.0の間にあることがわかる。これらの至適pHは、これまで報告されている精製キチナーゼの至適pHにはほぼ一致している(わさび細胞由来;pH 5.0 (Yamamoto *et al.*, 1995), 小麦の葉由来;pH 3.0-3.5 (Ride and Barber, 1990), 小麦胚芽由来;pH 6.0 (Molano *et al.*, 1979), ヤマイモ由来;pH 3.5 (Tsu-kamoto *et al.*, 1984), キャベツ由来;pH 5.0 (Chang *et al.*, 1992))。

Table 1にはここで使用した高等植物から得られた粗酵素抽出液について、そのキチナーゼ活性をまとめた。これらから、大根種子(Radish seeds)および笹の葉(Bamboo leaves)由来の粗酵素が比較的大きなキチナーゼ活性をもっていることがわかる。ここで、キチナーゼ活性とは新鮮組織1gあたりのキチナーゼ活性であり、

Fig. 2 Relationship between initial rate of hydrolysis reaction and initial concentration of substrate. Reaction temperature; 310 K

Fig. 3 Lineweaver-Burk plot

1 unitとは37°Cにおいて、各至適pHで1分間に1 μ molのN-アセチル-D-グルコサミンに相当する還元糖量を遊離する酵素量と定義した。

2.2 基質濃度依存性

比較的酵素活性の大きな大根種子および笹の葉由来粗酵素について、加水分解初速度と基質濃度との関係をFig. 2に示した。大根種子由来の粗酵素は笹の葉のそれに比べ、大きな反応速度を与えることがわかった。Michaelis-Menten型の酵素反応動力学を仮定し、Eq. (1)に基づいたLineweaver-Burkプロットを、Fig. 3に示した。

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (1)$$

いずれの粗酵素についても直線性を示しており、これらの酵素反応がMichaelis-Menten式に従うことが明らかとなった。Fig. 3より、最大速度 $V_{\max}$ とMichaelis定数 K_m を算出し、Table 2にその値を示した。 $V_{\max}$ 値はほとんど同じであるが、 K_m 値の比較から、大根種子由来粗酵

Table 2 Values of $V_{\max}$ and K_m of crude enzymes

Sources	$V_{\max}$ [kg/(m ³ ·s)]	K_m [kg/m ³]
Radish Seeds	4.98×10^{-5}	4.86
Bamboo leaves	3.08×10^{-5}	15.2

素は笹の葉のそれよりも約3倍の基質親和性があることが分かる。なお、Fig. 2 中の実線は Table 2 のパラメーターを用いた計算結果である。

[謝 辞] 本研究の遂行に当たり、有益な助言を頂いた本学工学部松本道明助教授に謝意を表すると共に、実験の一部を担当された吉岡大輔君、上刺春樹君に感謝いたします。

Literature cited

- Chang, Chen-Tien, Hui-Fen, Lo, Chi-Jung, Wu, and Hsien-Yi, Sung; "Purification and Properties of Chitinase from Cabbage," *Biochem. Intern.*, **28**, 707-715 (1992)
- Imoto, T. and K. Yagishita; "A Simple Activity Measurement of Lysozyme," *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1154-1156 (1971)
- Molano, J., I. Polacheck, A. Duran and E. Cabib; "An Endochitinase from Wheat Germ," *The Journal of Biological Chem.*, **254**, 4901-4907 (1979)
- Ride, J. P. and M. S. Barber; "Purification and Characterization of Multiple Forms of Endochitinase from Wheat Leaves," *Plant Sci.*, **71**, 185-197 (1990)
- Tsukamoto, T., D. Koga, A. Ide, T. Ishibashi, M. Horino-Matsushige, K. Yagishita and T. Imoto; "Purification and Some Properties of Chitinases from Yam, *Discorea opposita* THUMB," *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 931-939 (1984)
- Usui, T., Y. Hayashi, F. Nanjo, K. Sasaki, and Y. Ishido; "Transglycosylation Reaction of a Chitinase Purified from *Nocardia orientalis*," *Biochim. Biophys. Acta*, **923**, 302-309 (1987)
- Yamamoto, Y., Y. Fukunaga, H. Aoyama, and H. Tanaka; "Purification and Characteristics of Chitinase Secreted by Cultured *Wasabia japonica* Cells," *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 148-152 (1995)

Extraction of Crude Chitinase from Higher Plants and their Chitin-Hydrolysis Activities

Kazuo Kondo, Kimitomo Harada, Masayoshi Shibata and Ryosuke Maeda

Department of Chemical Engineering and Materials Science, Doshisha University, Kyoto 610-03

Key Words: Enzymatic Reaction, Chitin, Chitinase, Higher Plant, Kinetics

To prepare a purified chitinase from higher plants, firstly, crude enzymes were extracted from six higher plants, namely, radish seeds, sunflower seeds, watermelon seeds, bamboo leaves, orange skin, and persimmon skin. Using these crude enzymes, pH dependencies of hydrolysis reaction of colloidal chitin are investigated. For radish seeds and bamboo leaves, which have relatively high activities, the kinetics of enzymatic reaction are studied. It is clear that these reactions obey Michaelis-Menten kinetics.