〔農化 第 37 卷, 第 3 号, p. 142~145, 1963〕

フラボノイド配糖体加水分解酵素に関する研究 (第 2 報)*

ナリンジナーゼ I 及びヘスペリジナーゼ I の特異性

岡田茂孝, 岸 清, 東原昌孝, 福本寿一郎 (大阪市立工業研究所)

昭和 37 年 9 月 3 日 受 理

著者等は前報⁽¹⁾において, フラバノン配糖体ナリンジン及びヘスペリジンを加水分解する酵素 (ナリンジナーゼ I 及びヘスペリジナーゼ I) をくろかび麴抽出液に見出し, 分離精製を行った結果, 両酵素はナリンジン, ヘスペリジンのラムノース-グルコース間の結合にそれぞれ作用するにもかかわらず全く別個の酵素であることが判明した. そこでこれら酵素の特異性を明かにするため, 構成糖としてラムノース-グルコース結合を有する各種フラボノイド配糖体, メチル誘導体, 二糖類に対する作用を検討し, あわせてこれら配糖体の糖の結合様式について考察した.

実 験 の 部

実験方法

(1) 供試酵素: 前報⁽¹⁾によって精製結晶化した酵素標品ヘスペリジナーゼ I, ナリンジナーゼ I および濾紙電気泳動によりヘスペリジナーゼ I およびナリンジナーゼ I を除いたヘスペリジナーゼ II の区分 (これにはナリンジナーゼ II 活性を含む) を供試した.

(2) 供試基質: 配糖体としてはヘスペリジン, ルチン (ともに武田薬品工業光工場崎浴氏より分与されたもの), ナリンジン (ざぼん果皮より Poore の方法により抽出したもの), リナリン, ポンシリン, ネオヘスペリジン (3 者とも静岡大学農学部中林氏より), ナルシシン (大阪市大理学部荒川氏より), さらにヘスペリジン-メチル誘導体として 3'-メチルヘスペリジンなど 3 種 (ともに崎浴氏より) を, 二糖類としてはルチノース (合成品, 荒川氏より), ゲンチオビオース (東北大学農学部柴崎氏より), セロビオース, ラクトース (ともに和光純薬工業製市販品) を供試した.

(3) 反応条件及び分解生成糖の検出: 基質 5 mg を 0.05 M McIlvaine 緩衝液 (pH 3.8) に希釈 (水に不溶の基質は 1 N-NaOH に溶解し, 0.1 M-McIlvaine 緩衝液を 2 倍量加え, さらに反応直前に 1 N-HCl にて中和) して 2 ml としたものに酵素液 1 ml (約 4 単位) を加えて 40°, 30 分間反応せしめ, 還元力を Somogyi 法 (High alkalinity 試薬) により測定した. また生成糖は反応液を濃縮してブタノール, ピリジン, 水 (6:4:3) を用いてペーパークロマトグラフィーにより 2 重展開を行い, アニリン-ハイドロジェン-フタレートによる呈色によって検出した.

実験結果 各基質に両結晶酵素をそれぞれ作用せしめ, 生成する糖を比較した結果は第 1, 2, 3 表に示すとおりである.

(1) フラボノイド配糖体に対する作用: 第 1 表に見られる如く, ヘスペリジナーゼ I はヘスペリジン, リナリンのラムノース-グルコース間の結合を切り, ラムノースを遊離するが, 他の配糖体のラムノース-グルコース結合は切断しない. ナリンジナーゼ I はナリンジン, ポンシリンまたはネオヘスペリジンを分解してラムノースを遊離するが, ヘスペリジン, リナリン, ルチン, ナルシシンには作用しない.

(2) 二糖類に対する作用: 数種の β -1,6- または β -1,4- 結合を有する二糖類に両酵素を作用せしめた結果, 第 2 表に示す如くヘスペリジナーゼ I はルチノースを分解するが, ゲンチオビオース, セロビオースおよびラクトースには作用しない. またナリンジナーゼ I はこれらいずれの糖にも作用しない.

(3) ヘスペリジン-メチル誘導体に対するヘスペリジナーゼの作用: ヘスペリジナーゼ I について, さらに数種のヘスペリジン-メチル誘導体に対する作用を検討した結果は第 3 表に示したとおりである. 構成糖がメチ

* Studies on Flavonoid-hydrolyzing Enzymes. Part II. Substrate Specificities of Naringinase I and Hesperidinase I.

By Shigetaka OKADA, Kiyoshi KISHI, Masataka HIGASHIHARA and Juichiro FUKUMOTO (Osaka Municipal Technical Research Institute)

第 1 表 ヘスペリジナーゼ I 及びナリンジナーゼ I の各種フラボノイド配糖体に対する作用

基	質	ラムノース, グルコース 間の糖の結 合様式	分 解 生 成 糖		
			粗酵素	ヘスペリジ ナーゼ I	ナリンジ ナーゼ I
ヘ ス ペ リ ジ ン		β -1, 6	R, G	R	—
リ ナ リ ン		β -1, 6 ⁽³⁾	R, G	R	—
ル チ ン		β -1, 6	R, G	—	—
ナ ル シ シ ン		β -1, 6 ⁽⁷⁾	R, G	—	—
ナ リ ン ジ ン		1, 4	R, G	—	R
ポ ン シ リ ン		1, 4 ⁽⁵⁾	R, G	—	R
ネ オ ヘ ス ペ リ ジ ン		1, 4 ⁽⁶⁾	R, G	—	R

R : ラムノース G : グルコース

R: ラムノース G: グルコース

ル化された場合は反応速度が約 1/10 に減少することを認めた。しかしアグリコン部分のメチル化またはカルボン化は酵素反応にはほとんど影響を及ぼさないことを知った。

考 察

さきに立田⁽²⁾はエムルシンによるフラボノイド配糖体の加水分解について研究し、アグリコンの変化は本質的に酵素反応に変化を与えないことを報じているが、著者らの実験においても、ヘスペリジナーゼ I はヘスペリジンのほか、アグリコン部が相違するリナリン⁽³⁾、ヘスペリジン-メチル誘導体⁽⁴⁾に対して作用し、さらにルチノースに対しても作用を示すことを知った。しかるに本酵素は、同じくラムノース、グルコースを構成糖とするナリンジン、ポンシリン⁽⁵⁾、ネオヘスペリジン⁽⁶⁾、ルチン、ナルシシン⁽⁷⁾に作用しない。このうち前 3 者は文献上ルチノース (6-O- β -L-rhamnosyl-D-glucose) 以外の糖を構成糖としていることが知られている。それ故、本酵素は β -1, 6-グルコラムノシッドのみを切断する酵素と考えることができる。しかしルチン、ナルシシンの構成糖はルチノースであり、これら両者がヘスペリジナーゼで作用を受けないのは、アグリコンへの結合位置の相違

第 2 表 両酵素の二糖類に対する作用

基	質	糖相互間の 結合様式	分解生成物		
			粗酵素	ヘスペリジ ナーゼ I	ナリンジ ナーゼ I
ルチノース		β -1, 6	R, G	R, G	—
ゲンチオビオース		β -1, 6	G	—	—
セロビオース		β -1, 4	G	—	—
ラクトース		β -1, 4	G, Gal	—	—

R: ラムノース G: グルコース Gal: ガラクトース

によるものと考えられるが、立体障害として説明し得るか否か今後の研究にまちたい。

またナリンジナーゼ I は、ナリンジン、ポンシリンを分解してラムノースを遊離することから、 β -1, 6 以外の特定結合にのみ作用するラムノシダーゼということができよう。一方ネオヘスペリジンの糖の結合様式については 1, 4-結合が証明されており⁽⁶⁾、おそらく本ナリンジナーゼは β -1, 4-グルコラムノシダーゼと称されるべきものと考えられる。

さらにこれら両酵素を用いて、ラムノシル-グルコシッド配糖体の構造を予測すれば、

ヘスペリジナーゼ I で分解されるもの: β -1, 6-結合 ヘスペリジン, リナリン

ナリンジナーゼ I で分解されるもの: おそらく β -1, 4-結合 ナリンジン, ポンシリン, ネオヘスペリジンに分別される。

要 約

ヘスペリジナーゼ I, ナリンジナーゼ I の両酵素の特異性を明かにするため、ラムノース、グルコースを糖構造に有する種々フラボノイド配糖体などに対する作用を検討した結果、

(1) ヘスペリジナーゼ I はヘスペリジン, リナリン, ヘスペリジン-メチル誘導体およびルチノースの β -1, 6-結合を分解することから、 β -1, 6-グルコラムノシダーゼに属するものと考えられるに至り、またそのアグリコン部分の相異はこの酵素の特異性にほとんど影響を与えないことを知った。しかし、ルチン、ナルシシンのルチノースがこの酵素で作用を受けないことは立体障害によると考えられる。

(2) ナリンジナーゼ I はナリンジン、ポンシリンのラムノース-グルコース結合を切ることから、 β -1, 6-結

第 3 表 両酵素のヘスペリジン-メチル誘導体に対する作用

	基	質	分 解 生 成 糖		
			粗酵素	ヘスペリジ ナーゼ I	ナリンジ ナーゼ I
3'-メチルヘスペリジン ⁽⁴⁾		R, G	R	—	
3,6'-ジメチル・ヘスペリジン ⁽⁴⁾ カルコン		R, G	R	—	
3'-メチル-7 (ラムノシル ⁽⁴⁾ 2-メチルグルコシル) ヘ スペレチン		R, G	(R)	—	
ヘスペレチン-7-グルコシッド		G	—	—	
R : ラムノース G : グルコース					

R: ラムノース G: グルコース

合以外のある特定結合, おそらく β -1,4-結合を切るグルコラムノシダーゼに属するものと想定される。

終りにあたり, 貴重な試料を分与してくださった武田薬品工業株式会社光工場崎谷幾雄氏, 静岡大学農学部中林敏郎氏, 東北大学農学部柴崎一雄氏, 大阪市立大学理学部荒川久雄氏に深謝する。

なお本報告の要旨は昭和 36 年 4 月, 日本農芸化学会大会において講演発表した。

(1) 岡田茂孝, 岸 清, 東原昌孝, 福本寿一郎 :
本誌, 37 , 84 (1963).	(5) 服部静夫, 長谷川正男, 下郡山正己 : 同上,
65 , 61 (1944).
(2) 立田晴雄 : 日化, 67 , 119 (1945).	(6) G. Zemplén, A. K. Tettamanti : <i>Ber.</i> ,
71 , 2511 (1938).
(3) W. Bateer, R. Hemming, W. D. Ollis :
<i>J. Chem. Soc.</i> , 1951 , 691.	(7) M. Kotake, H. Arakawa : <i>Bull. Chem. Soc.</i>
(Japan), 30 , 862 (1957).
(4) 崎谷幾雄 : 日化, 79 , 733 (1958).	