ノート

〔Nippon Nôgeikagaku Kaishi
Vol. 59, No. 11, pp. 1157~1159, 1985〕

つくし (*Equisetum arvense*) の孢子穂
における
 β -N-アセチルグルコサミニダーゼの存在

中 英幸, 岡 廉司*, 岩本 徹*, 稲岡 恵*
(今治明德短期大学, *愛媛大学農学部農芸化学科)

昭和 60 年 5 月 30 日 受 理

β -N-Acetylglucosaminidase in Strobilus
of Horsetail, *Equisetum arvense*

Hideyuki NAKA, Yasushi OKA*,
Tooru IWAMOTO* and Megumu INAOKA*
Imabari Meitoku Junior College,
Yata, Imabari 749

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty
of Agriculture, Ehime University, Tarumi
3-5-7, Matsuyama 790

β -N-Acetylglucosaminidase activity was detected in horsetails, especially in aerial stems of *Equisetum arvense*. The activity was determined by histochemical and quantitative procedures during plant growth. The enzyme activity of the strobilus was weak at the early growth stages, when it was composed of an axis bearing sporangioophores with sporangio, but the activity increased after losing most of the spores. The strobilus of horsetails at the late stages of growth was found to contain β -N-acetylgalactosaminidase, α -mannosidase and β -galactosidase activities, as well as β -N-acetylglucosaminidase activity.

(Received May 30, 1985)

つくしはシダ類トクサ科のスギナ孢子茎であり、春に栄養茎のまだ伸びない以前に現れる。つくしの先端には楕円状の孢子穂があり、これははじめ亀甲状の細かい面で包まれ緑色であるが、成熟すれば面と面の間にすきまができて、亀甲状の面は独立した孢子葉となる。各孢子葉の裏面には孢子嚢があり、緑色の孢子を無数に生じ

るが、時間の経過とともにこの孢子は飛散し淡褐色の穂が残る、その後これはしぼんでいく⁽¹⁾。著者らはこのつくしの孢子穂に β -N-アセチルグルコサミニダーゼが存在することを見出したので報告する。

β -N-アセチルグルコサミニダーゼは動植物の組織や微生物にその存在が知られ、多くのものが分離精製されその性質が明らかにされている。植物起源の本酵素はとくに緑豆⁽²⁾、インゲン豆⁽³⁾、ジャック豆^(4,5)、コロハ豆⁽⁶⁾のような豆類から分離されているがそれ以外の報告は少なく、つくしについての報告はない。

先に、著者らは *Streptomyces* の一菌株の菌糸における本酵素の局在を組織化学的に調べ報告した⁽⁷⁾。そこで、この方法をつくしにも応用してこの酵素の局在を調べ、さらにその他のグリコンダーゼの存在も調べた。

実験方法

つくしは本年の4月上旬の同じ時期に同一の野原において採集し、その孢子穂の色と性状から文献(1)の記載を参考にして生育段階を5段階に大別した。酵素の染色は前報⁽⁷⁾に従い、0.5 mM ナフトール AS-BI β -N-アセチルグルコサミニド 3.6 mM パラロザニン混合液につくしを浸漬し 40°C に 30 分間放置したのち 30% エタノールで洗った。酵素が存在すれば赤く染色する。酵素活性は孢子穂全体、あるいは孢子穂を乳パチで粉碎したのち 0.4 mm のふるいで篩別したものの 10.0 mg を、1 mM の *p*-ニトロフェニル β -N-アセチルグルコサミニド溶液 (0.05 M, pH 6.0 リン酸緩衝液で調製) 2.0 ml に加え 40°C で 15 分間反応させ測定した。生成した *p*-ニトロフェノールを前報⁽⁸⁾のように定量し、この条件下で 1 分間に 1 n モルの *p*-ニトロフェノールを遊離したとき 1 単位とした。その他のグリコンダーゼ活性も同様に孢子穂を試料として対応する基質を用いて測定した。

実験結果と考察

若いものから古いものの各生育段階に大別したつくしの孢子穂における酵素の存在を調べた。Fig. 1 に染色前のつくしを示した。1, 2 の孢子穂はかたく孢子も現れないが、3 になると無数の孢子を生じ 4, 5 の孢子穂は成熟して孢子を放出していることを示している。Fig. 2 に染色処理を行った試料を示した。1 と 2 のつくしの孢子穂はまったく染色されず、3 の孢子穂はわずかに赤くなり、4 と 5 の孢子穂が強く染色された。酵素染色法で得

Fig.1. Photograph of Strobile of Horsetails at Various Growth Stages.

Fig.2. Growth Stages and β -N-Acetylglucosaminidase Activity of Strobile. Strobile shown in Fig.1 were soaked in the mixture containing naphthol AS-BI β -N-acetylglucosaminide and hexazonium pararosaniline and incubated at 40°C for 30 min for detection of the enzyme.

られた結果が本酵素の存在を反映しているかどうかをさらに酵素活性を測定して調べた。Fig.1 に示した各時期のつくしの胞子穂のみをとり重量を測定したのち、これを *p*-ニトロフェニル β -N-アセチルグルコサミニド溶液に加え反応させた。Table I に示したように、胞子穂は古くなるにつれて重量が減少し、酵素活性は高くなった。したがって、1 mg 当りの酵素活性は古くなるにつれて著しく高くなる。この結果からも若い胞子穂よりも古い胞子穂のほうが表層部位の酵素活性が高いことが示された。

Fig.1 および Table I に示したように、本酵素は胞子穂の表層部位では若いつくしから古いつくしになるにつれて増加し、胞子をほとんど有していない開いた胞子穂

Table I. Change in β -N-Acetylglucosaminidase Activity of Strobile during Growth of Horsetail

Stage	Weight (mg)	Enzyme activity (units)
1	574.5	9.5
2	541.6	10.9
3	498.2	13.1
4	391.2	24.9
5	236.8	25.5

Weights and enzyme activities of strobile obtained at various stages shown in Fig.1 were determined and shown in terms of average value. A mixture containing a strobilus and 1 mM *p*-nitrophenyl β -N-acetylglucosaminide in 0.05 M phosphate buffer, pH 6.5, was incubated at 40°C for 15 min. One unit of the enzyme is defined as the activity that releases 1 nmol of *p*-nitrophenol per min under the conditions.

Table II. Distribution of Glycosidases in a Strobilus of Horsetail

Glycosidase	Activity (units/mg)	Relative activity (%)
β -N-Acetylglucosaminidase	4.00	100.0
β -N-Acetylgalactosaminidase	0.91	22.8
α -Galactosidase	0.30	7.5
β -Galactosidase	0.66	16.5
α -Glucosidase	0.32	8.0
β -Glucosidase	0	0
α -Mannosidase	0.60	15.1
β -Xylosidase	0.14	3.5

A strobilus, which was selected at a late growth stage and lost most spores, was ground and sifted by a sieve (0.4 mm). Ten mg of the powder was suspended in 2.0 ml of 0.05 M phosphate buffer, pH 6.5, containing 1 mM each *p*-nitrophenyl glycoside solution and incubated at 40°C for 15 min. A unit of enzyme is the same as Table I. Enzyme activity is expressed in units per mg of the powder of a strobilus.

が強い活性を持っていることがわかったが、この活性発現が酵素の *de novo* 合成か、あるいは酵素の活性化かは不明である。

先に著者らは *Streptomyces* の菌糸における本酵素の分布を調べ、この酵素が若い菌糸には存在しないので古い菌糸に多く存在するので菌糸の溶解に関係しているのではないかと推察した⁽⁷⁾。これに対し、つくしにおける本酵素の生理作用については現段階では不明であるが、こ

の酵素染色を行った試料を実体顕微鏡で観察するとさらに詳細な酵素の局在部位を明らかにすることができるので、本実験はこの酵素の生理作用を解明する手がかりとなる。

古い孢子穂に β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性が認められたので比較のためにその他のグリコンダーゼ活性を調べた。完全に開いた孢子穂 (Fig. 1 の 5) の粉末を試料として、各グリコンダーゼ活性を定量した。

Table II にそれぞれの酵素活性と β -N-アセチルグルコサミニダーゼに対するパーセントを示した。

この試料には β -N-アセチルグルコサミニダーゼのほかに 10 から 20 数%の β -N-アセチルガラクトサミニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼおよび α -マンノシダーゼ活性が認められた。ほとんどの起源の β -N-アセチルグルコサミニダーゼは β -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性をあわせて持ち、しかも両活性が同一のタンパク質に由来することが報告されている^(5,6,8-12)。そこで、つくしの β -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性も β -N-アセチルグルコサミニダーゼによって発現されている可能性も考えられる。一方、報告されている豆類から抽出された β -N-アセチルグルコサミニダーゼと β -N-アセチルガラクトサミニダーゼ以外の主なグリコンダーゼは、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、および α -マンノシダーゼでありその含有量も高い。たとえば緑豆ではそれぞれ 19%, 39%, 71% と記載され⁽²⁾、インゲン豆では α -マンノシダーゼが約 40%、 α -ガラクトシダーゼと β -ガラクトシダーゼが β -N-アセチルグルコサミニダーゼと同程度含まれている⁽³⁾。

さらにジャック豆では α -マンノシダーゼが β -N-アセチルグルコサミニダーゼよりも 4 倍以上も多く含まれていると報告されている⁽⁴⁾。これに対して、本実験の測定法で調べたつくしの孢子穂のこれらのグリコンダーゼ活性はいずれも低く、とくに α -マンノシダーゼが豆類と比べて非常に低いのが特徴である。なお、つくしのみならず、すぎなの栄養基にも本酵素は存在しているがこれについては別に報告する。

- (1) 下中邦彦編：世界百科大事典，16，平凡社，1973，p. 487.
- (2) 大宝 明，トランテイキムガン：農化，52，589 (1978).
- (3) K. M. L. Agrawal and O. P. Bahl: *J. Biol. Chem.*, **243**, 103 (1968).
- (4) Y. T. Li and S. C. Li: *J. Biol. Chem.*, **243**, 3994 (1968).
- (5) S. C. Li and Y. T. Li: *J. Biol. Chem.*, **245**, 5153 (1970).
- (6) S. Bouquelet and G. Spik: *FEBS Lett.*, **63**, 95 (1976).
- (7) 岩本 徹，楠香谷隆規，稲岡 恵，中 英幸：農化，57，1035 (1983).
- (8) T. Iwamoto, M. Inaoka and H. Naka: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1913 (1983).
- (9) T. Mega, T. Ikenaka and Y. Matsushima: *J. Biochem.*, **68**, 109 (1970).
- (10) L. A. Eriquez and M. A. Pisano: *J. Bacteriol.*, **137**, 620 (1976).
- (11) A. Ohtakara, M. Yoshida, M. Murakami and T. Izumi: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 239 (1981).
- (12) S. Kimura: *Biochim. Biophys. Acta*, **446**, 399 (1976).