

## 枯草菌 $\alpha$ -アミラーゼに対するKイオンの 不可逆的阻害とパルス電場による復活現象 (II)

### Irreversible Inhibitive Effect of Kalium Ion on the Activity of $\alpha$ -Amylase (from *Bacillus subtilis*) and the Restoration by Pulse Electricity (II)

井村 洋一

#### 第2篇 SIGMA社製 $\alpha$ -アミラーゼIII-A型をメタノールで精製した場合のK-Aceによる不可逆的阻害

才1篇に記載したように、K-Aceの濃度変化にもとづく、K<sup>+</sup>のアミラーゼに対する不可逆的阻害現象は、SIGMA社から以前に発売されていたIII-A型〔黄褐色粉末〕と、現在同社から販売されている同じIII-A型〔黒色粉末〕とでは大きな相異があるのが認められた。しかしながら、この〔黒色粉末〕もメタノールで2度沈降精製を行えば、〔黄褐色粉末〕よりも容易にK<sup>+</sup>によって阻害されるようになるので、本篇では、メタノールで精製した〔黒色粉末〕を試料として、再度K-Aceによる不可逆的阻害現象を検討した。

#### 1. はじめに

##### 1.1 アミラーゼ活性の測定方法と活性度

アミラーゼ活性の測定方法と活性度の表わし方は、前編に記した方法と全く同じである。

すなわち、試料溶液2mlをポリエチレン製小試験管にとり、30°Cの恒温槽中に7min放置したのち、2%デキストリン0.1mlをマイクロシリンジで添加する。分解時間4minののち、その1mlを0.1N-HCl10ml中に採取し、これに発色試薬として0.15% I<sub>2</sub>、1.5% KI水溶液1mlを添加して、未分解のデキストリンを定量する。

アミラーゼの活性度は、分解されたデキストリン量を添加量に対する百分率で表わした。

##### 1.2 メタノールによる試薬の精製

現在SIGMA社から発売されている、 $\alpha$ -AMYLASE

BACTERIAL CRUDE TYPE III-A (無添加物)〔黒色粉末〕を10%水溶液とし、(注. 溶解しにくい場合は、60°C以下の温度で数分間加熱する。)、この溶液10mlに同量のメタノールを添加して攪拌し、5°Cで約12hr静置したのち、遠心分離して上澄液を除去し、沈降したタンパク質部分を再び水で10mlとする。

以上の精製操作を2度繰返したものを、10%アミラーゼ水溶液として本実験の試料とした。

精製の結果、液のpHは初期の5.6から6.7に上昇するが、アミラーゼの力価の低下はほとんど認められなかった。

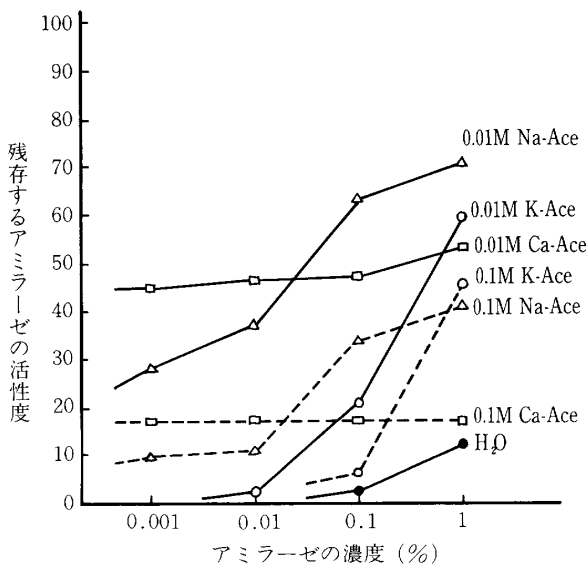
##### 1.3 予備実験(アミラーゼ溶液の濃度と耐熱性の関係)

一般にタンパク質の水溶液は、高濃度となるほど熱に対して安定となるが、これは各種の塩、糖質、脂質などが混入してくることと、タンパク質自身の荷電量によ

るイオン凝縮のためである。

したがって、予備実験として、アミラーゼの濃度と耐熱性の関係を検討するため、水および0.01Mまたは0.1M さく酸塩中でアミラーゼの濃度を変えて60°Cに30min保温したのち、同じ濃度のさく酸塩溶液で、アミラーゼが一律に0.001%になるように希釈し、残存するアミラーゼの活性度を測定した。

下の図は、メタノールで2度精製したアミラーゼについて、その濃度を0.001, 0.01, 0.1, 1%とした場合の実験結果をグラフにまとめたものである。



アミラーゼの濃度と耐熱性の関係  
温度60°C, 時間30min

以上の実験結果から、

1. 一般に、アミラーゼ溶液の濃度が高いほど熱に対して安定である。
2. 単純水溶液中よりも、金属塩が存在した方が安定である。
3. しかしながら、0.1Mさく酸塩中では0.01Mの場合より低い活性度を示す。
4. アミラーゼの低濃度側での耐熱性を考えると、Ca<sup>+</sup>はNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>と比較して最も大きい耐熱効果をあたえ、K<sup>+</sup>の耐熱効果は最も小さい。
5. したがって、アミラーゼの高濃度側で、Ca<sup>+</sup>は著しい阻害性を示していることになる。

などのことが解る。

## 2. 実験操作

10%試料溶液を60°Cの恒温槽中に保温しておき、時間の経過にしたがい、K, Na, Ca各さく酸塩の濃度変化に

よる阻害効果を、つぎに述べる操作によって実験した。

10mlの目盛についたA, B 2本の試験管と小試験管1本を用意し、

(a) さく酸塩を1.0~0.1Mの濃度範囲で変化させる場合は、

小試験管…… 1Mさく酸塩 2ml + 10%試料溶液0.2ml

B管……… 水10ml + 1M同さく酸塩 1ml + 10%試料溶液0.1ml

とし、よく攪拌したのち、両管を60°Cに30min保温する。

小試験管から1mlを採取してA管に移し、水で10mlに希釈し、A, B両管からそれぞれ2mlを採取して1.1の方法によりアミラーゼの活性度を測定する。

この場合、A, B両管のアミラーゼおよびさく酸塩の濃度誤差は許容範囲にとどまる。

(b)\* さく酸塩を0.1~0.01Mの濃度範囲で変化させる場合は、10%試料溶液は水で1%に希釈し、

小試験管…… 0.1Mさく酸塩 2ml + 1%試料溶液0.2ml

B管……… 水10ml + 0.1M同さく酸塩 1ml + 1%試料溶液0.1ml

として、以下(a)に準じる。

各さく酸塩は試薬特級を使用した。K-Ace水溶液は1M濃度1ℓに対し0.2N-KOH17mlを添加して、pHを7.1から7.8に調整したものをを用いた。

\* 前第1篇のIIの3.1実験操作において、0.1Mさく酸塩を使用する場合の試料溶液は10%ではなく、1%の誤りであるので訂正する。

## 3. 実験結果

精製された10%試料溶液を60°Cに保温しておき、時間の経過にしたがい、2の実験操作によって実験した結果を、順次、表によって示す。

各表の(a)は、さく酸塩の濃度変化を1.0~0.1Mの範囲に設定したものであり、(b)は0.1~0.01Mの範囲にしたものである。

### 3.1 60°Cに保温しない場合

60°Cに保温しない初期の10%試料溶液について、実験した結果を下の表1の(a)および表1の(b)に示す。

表中、(×10)とあるのは、A, B両管の溶液をそれと

枯草菌 $\alpha$ -アミラーゼに対するKイオンの不可逆的阻害とパルス電場による復活現象

同じ濃度のさく酸塩水溶液で10倍に希釈して測定を行なったものである。

表1の(a)

さく酸塩の種類	1.0M塩溶液のpH	A管の活性度	B管の活性度	AとBの差
K-Ace	7.8	76( $\times 10$ )	43( $\times 10$ )	+33( $\times 10$ )
Na-Ace	8.1	98( $\times 10$ )	98( $\times 10$ )	$\pm 0$
Ca-Ace	7.4	65( $\times 10$ )	80( $\times 10$ )	-15( $\times 10$ )

表1の(b)

さく酸塩の種類	1.0M塩溶液のpH	A管の活性度	B管の活性度	AとBの差
K-Ace	7.5	40	7	+33
Na-Ace	7.8	99	97	+2
Ca-Ace	7.6	57( $\times 10$ )	54( $\times 10$ )	+3( $\times 10$ )

3.2 60°C保温17hr

表2の(a)および(b)は、60°Cに17hr保温したものについての実験結果である。

精製された10%試料溶液は、60°Cに保温するとき次第に沈澱を生じてくるので、採取にあたっては遠心分離により沈澱を除去して使用した。なお表2以降では、塩溶液のpHの項は表1に同じであるから省略した。

表2の(a)

さく酸塩の種類	A管の活性度	B管の活性度	AとBの差
K-Ace	98	89	+9

表2の(b)

さく酸塩の種類	A管の活性度	B管の活性度	AとBの差
K-Ace	30	20	+10

3.3 60°C保温36hr

表3の(a)および(b)は、60°Cに36hr保温したものについての実験結果である。

表3の(a)

さく酸塩の種類	A管の活性度	B管の活性度	AとBの差
K-Ace	93	81	+12

表3の(b)

さく酸塩の種類	A管の活性度	B管の活性度	AとBの差
K-Ace	20	20	$\pm 0$

3.4 60°C保温52hr

表4の(a)および(b)は、60°Cに52hr保温したものについての実験結果である。

表4の(a)

さく酸塩の種類	A管の活性度	B管の活性度	AとBの差
K-Ace	74	90	-16
Na-Ace	42( $\times 10$ )	46( $\times 10$ )	-4( $\times 10$ )
Ca-Ace	17( $\times 10$ )	22( $\times 10$ )	-5( $\times 10$ )

表4の(b)

さく酸塩の種類	A管の活性度	B管の活性度	AとBの差
K-Ace	13	25	-12
Na-Ace	51	42	+9
Ca-Ace	49	49	$\pm 0$

表に見られるように、塩溶液の濃度範囲を1.0~0.1Mにとれば、K, Na, Ca各さく酸の総べての場合にA管とB管の差は負になるが、濃度範囲を0.1~0.01MにとればK-Aceだけが負の値を示す。

これは第1篇で〔黄褐色粉末〕について実験した結果と全く同じで、別に行なった実験によっても、60°Cにおよそ48hr程度保温した時点からこの現象が認められる。

3.5 Ca<sup>+</sup>に対する検討

予備実験において、Ca<sup>+</sup>はアミラーゼに対して最大の耐熱効果を示し、K<sup>+</sup>の耐熱効果は最小であった。したがって、K-Ace溶液中でのアミラーゼとCa<sup>+</sup>の関係について検討するため、つぎのような実験を行なった。

60°Cに49hr保温して表5に示す実験値に達した10%試料溶液を使用し、この5mlに対し0.1M Ca-Ace0.5mlを添加しておき、室温に約15min放置した場合と、24hr放置した場合について同じ実験を行なったところ、それぞれ表6と表7に示す実験結果を得た。

表5~表7におけるK-Aceの濃度変化は、いずれも1.0~0.1Mの範囲である。

表 5

さく酸塩の種	A管の活性度	B管の活性度	AとBの差
K-Ace	62	85	-23

表 6 Ca<sup>++</sup>添加15min後

さく酸塩の種	A管の活性度	B管の活性度	AとBの差
K-Ace	90	92	-2

表 7 Ca<sup>++</sup>添加24hr後

さく酸塩の種	A管の活性度	B管の活性度	AとBの差
K-Ace	88	84	+4

表 6 の Ca-Ace 添加後15min では A と B の差はまだ負を示すが、表 7 の 24hr 後には A と B の差は正に転じるのが認められた。

### 3.6 55°Cに164hr保温した場合（参考）

精製した10%試料溶液を55°Cに164hr保温したのについて、同じ55°Cで実験を行なった結果を表 8 の(a)および表 8 の(b)に示す。

表 8 の(a)

さく酸塩の種	A管の活性度	B管の活性度	AとBの差
K-Ace	74(×10)	62(×10)	+12(×10)

表 8 の(b)

さく酸塩の種	A管の活性度	B管の活性度	AとBの差
K-Ace	68	64	+4

55°C, 164hr で、試料溶液の pH は60°Cの場合と同じように初期の6.7から6.3に低下したが、55°Cの温度条件では A と B の差が負に転じるのは認められなかった。

附 メタノール精製を行わない試料について (3.1 の対照)

メタノールによって精製した試料を60°Cに保温しない場合の3.1の実験の対照として、精製しない試料についての実験結果を、表 9 の(a)および表 9 の(b)に示す。

表 9 の(a)

さく酸塩の種	A管の活性度	B管の活性度	AとBの差
K-Ace	49(×100)	46(×100)	+3(×100)
Na-Ace	49(×100)	47(×100)	+2(×100)
Ca-Ace	71(×10)	79(×10)	-8(×10)

表 9 の(b)

さく酸塩の種	A管の活性度	B管の活性度	AとBの差
K-Ace	47(×10)	18(×10)	+29(×10)
Na-Ace	64(×10)	59(×10)	+5(×10)
Ca-Ace	44(×10)	44(×10)	±0

メタノール精製を行わない場合、全般にわたって総べて高い活性度を示すのは当然であるが、この場合も表 9 の(a)において Ca-Ace だけが A と B の差が負を示した。

## 4. 考 察

### 4.1 メタノールによる沈降精製について

〔黒色粉末〕の10%溶液をメタノールで2度精製することは、種々の塩、糖質、脂質などタンパク質に対する保護的物質の除去のほか、液の誘電率の低下によるタンパク質のイオン凝縮の弛緩などが考えられる。

この結果、液の溶解度は低下し（注。室温に放置するだけで沈澱が生じてくるが、これは60°Cに温めれば溶解する）、表 1 と表 9 を対照すれば解るように、60°Cの保温をしなくても、Ca-Ace により大きく不可逆的障害を受けるようになる。

### 4.2 60°C保温に対する考察

表 1～表 4 に見られるように、10%試料溶液を60°Cに保温するとき、K-Ace における A と B の差は、時間とともに縮小する傾向を示し、52hr に至って負の値を示すが、これは、熱によって変性ないしゆらぎを生じたアミラーゼ分子の分率が、時間とともに増大してゆく結果を示すものと考えられる。

なお、60°C保温52hr 後の試料溶液は、初期の pH = 6.7 から6.3に低下し、単位当りのアミラーゼ活性も初期の約1/10に低下するが、これに Ca-Ace を添加しても活性度の上昇は認められないので、必須金属イオンとしての Ca<sup>++</sup>を失っているわけではない。

#### 4.3 アミラーゼと $\text{Ca}^{2+}$ の結合に対する考察

$\text{Ca}^{2+}$  はアミラーゼに対する必須金属イオンであるうえ、 $\text{Na}^{+}$  や  $\text{K}^{+}$  と比較して著しい耐熱効果および阻害効果をもっている。また枯草菌自身が  $60^{\circ}\text{C}$  前後で培養されるうえ、培養液に添加された  $\text{Ca}^{2+}$  は、製品として乾固粉末状にすると、高濃度となってアミラーゼに結合することが考えられる。

したがって、 $\text{K}-\text{Ace}$  の不可逆的阻害を検討する実験操作においては、小試験管およびB管中の  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$  および  $\text{Ace}^{-}$  の平衡について考える必要がある。

3.5の表6、表7に示す実験は、不十分ではあるが、以上の目的のために行なったもので、 $60^{\circ}\text{C}30\text{min}$  の保温は見かけの平衡になるものとして、 $\text{Ca}-\text{Ace}$  添加後15 minの実験結果ではAとBの差はまだ負を示すが、 $\text{Ca}^{2+}$  とアミラーゼの結合が進行したと考えられる24hr後に

は正に転じることは、アミラーゼに結合する  $\text{Ca}^{2+}$  は  $\text{K}-\text{Ace}$  溶液中で脱離しないと考えられる。

故に、 $\text{K}-\text{Ace}$  によりA管とB管の差が負を示す場合は、 $\text{Ca}^{2+}$  の脱離によるアミラーゼの熱変性ではなく、 $\text{K}^{+}$  とアミラーゼの不可逆的結合による阻害現象であると判断する。

## 5. 第2篇結語

アルコールで精製を行なった $\alpha$ -アミラーゼの10%溶液を $60^{\circ}\text{C}$ に長時間保温すれば、 $\text{K}-\text{Ace}$ による不可逆的阻害が容易に現われる。

このことは、生命現象において高濃度タンパク質溶液として存在する酵素の、熱やpHの低下による変性ないしゆらぎが、ヒステレシスとなって存在することを示唆するものとする。