

# アカメイモ $\beta$ -アミラーゼの分離精製とその諸性質

## The Isolation and Purification of $\beta$ -amylase of *Colocasia antiquorum* SCHOTT var. *akameimo* and its Characteristics

大野 信子、黒田 智枝

### I 緒 言

筆者らは食用作物サトイモ科(*Colocasia*)の塊茎中に含まれる $\beta$ -アミラーゼについて、その分離精製法と、得られた純粋な標品の酵素化学的諸性質の研究を続けてきた。サトイモ科は15品種の多数に分類されるが、各品種の $\beta$ -アミラーゼの諸性質に果して差異があるかどうかについて実験データを求め、その結果についてすでに若干の報告を行なった<sup>1)2)3)4)</sup>。

$\beta$ -アミラーゼはたいていの場合でんぷんと共存している。でんぷん粒の形状および性質は植物の種類によって異なる<sup>5)</sup>が、これと共存する $\beta$ -アミラーゼの諸性質もまたでんぷん粒の異なるにつれ差があることも推察される。サトイモでんぷんは地下でんぷんの部類に属するが、アミロース含量はナガイモやジャガイモでんぷんの約 $\frac{1}{2}$ であり、また酵素により容易に分解される<sup>6)7)</sup>点などはむしろ地上でんぷんに酷似した性質をもっている。

先にサトイモ科の土垂群<sup>1)2)</sup>、筍芋群<sup>3)</sup>および八ツ頭群<sup>6)</sup>の代表的品種に含有される $\beta$ -アミラーゼについて、その酵素化学的性質等を報告したが、今回は赤芽芋群のセレベス(太吉)について実験結果を得、他の植物起源また微生物起源の $\beta$ -アミラーゼの性質と比較検討することができたのでここに報告する。

### II 実験材料および方法

#### 1. 試 料

実験に供したセレベスは千葉産のもので昨年10月東京都内で買求めたものである。これを水洗いした後、流水下でナイロンタワシでこすることにより容易に剥皮することができた。

#### 2. 実験方法

- 1) 酵素標品の分離と調整法
- 2) 酵素の精製およびその確認

- 3) ディスク電気泳動法
- 4)  $\beta$ -アミラーゼ活性測定法および還元糖の定量法
- 5) 分子量測定法

上記1)～5)の実験方法および諸条件については既報<sup>1)2)3)4)</sup>の通りである。

### III 実験結果および考察

#### 1. 酵素の分離と精製

##### 1) 粗酵素標品の調整

操作の概略をFig. 1に示したように剥皮後、水道水を加えミキサーで細砕し酵素抽出液を得た。これにIN-HClを加えpH3.6にして10分間酸処理を行うことにより混在する $\alpha$ -アミラーゼの不活性化を行った。その後遠心処理をして得られた上清を濃縮したが、これに粘質多糖物質が含まれているため35%冷アセトンを添加して形成された沈でん物を除去した。これから加えたアセトンをエバポレーターを用いて減圧下で取り除いた後、60%飽和硫酸アンモニウム加えて蛋白質の分画を行った。この時生じた沈でん物を集め、少量の0.01M-リン酸緩衝液(pH7.45)に溶解し、同緩衝液で12時間透折して粗酵素標品を得た。比活性(unit/mg protein)は抽出液0.06、粗酵素標品3.76であった。

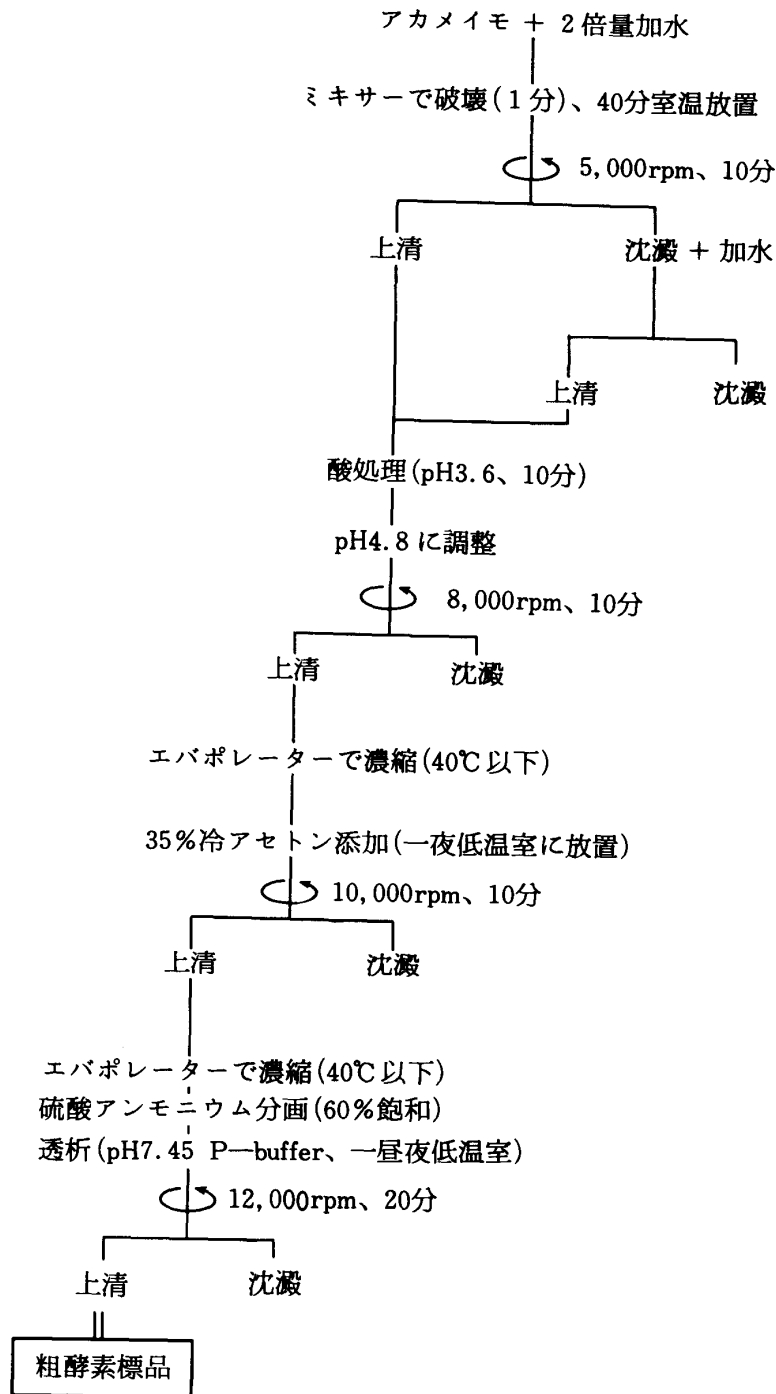
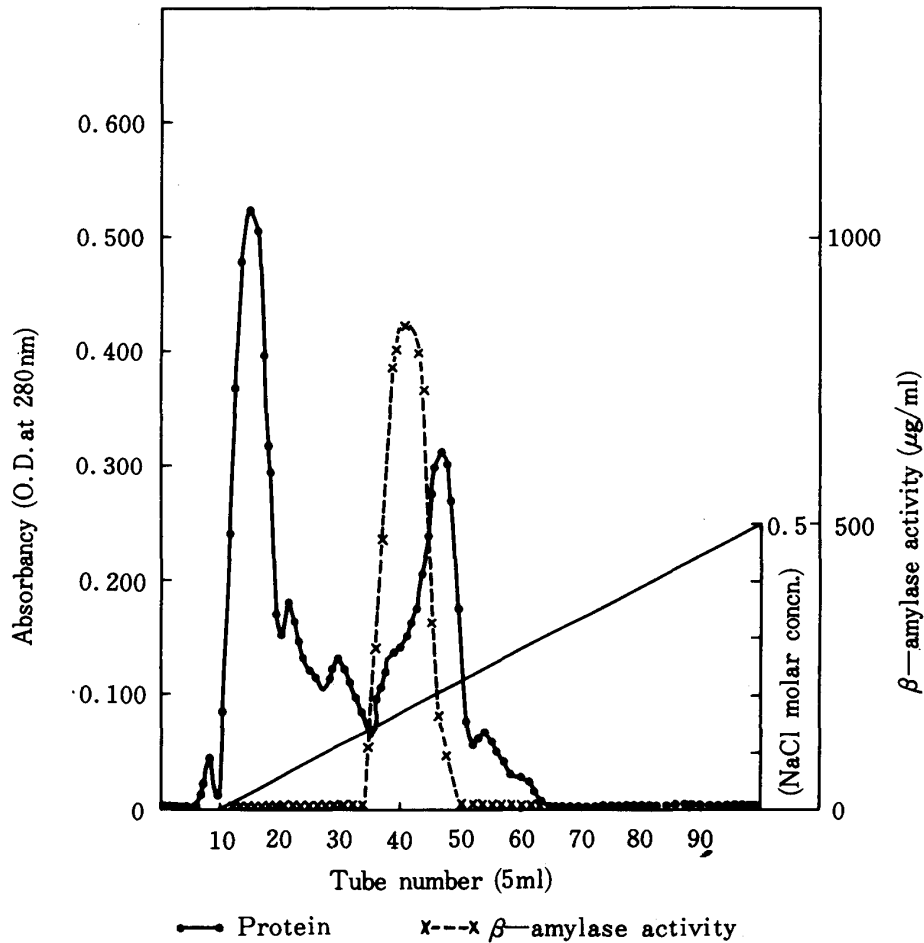


Fig. 1 Scheme for the isolation and preparation of crude enzyme

2) DEAE-Celluloseによるイオン交換クロマトグラフィー

DEAE-Celluloseは常法<sup>9)</sup>により活性化させた後、あらかじめ透析に用いた同じ緩衝液で平衡化し1.6 × 65cmのカラムに充填した。これに粗酵素標品を吸着させ0 ~ 0.5M NaClを含む各250mlの緩衝液の混合による直線濃度勾配法で溶出させた。流速は120ml/hr.で、溶出液は各5.0mlずつ分取し、各フラクションについて280nm吸光度および酵素活性の測定をした。



**Fig. 2 Elution pattern on DEAE—Cellulose column chromatography**

Fig. 2 に示すようにβ—アミラーゼ活性はNaCl濃度0.16M点で最高溶出量を示した。この時の酵素回収率は70~75%、比活性は30であった。

3) Bio—Gel P—150によるゲル濾過

緩衝液を用いて膨潤させ充分平衡化したBio—Gel P—150を1.5×65cmのカラムに充填した。これにイオン交換カラムより得られた活性画分を負荷して10ml/hr.の流速で溶出を行った。

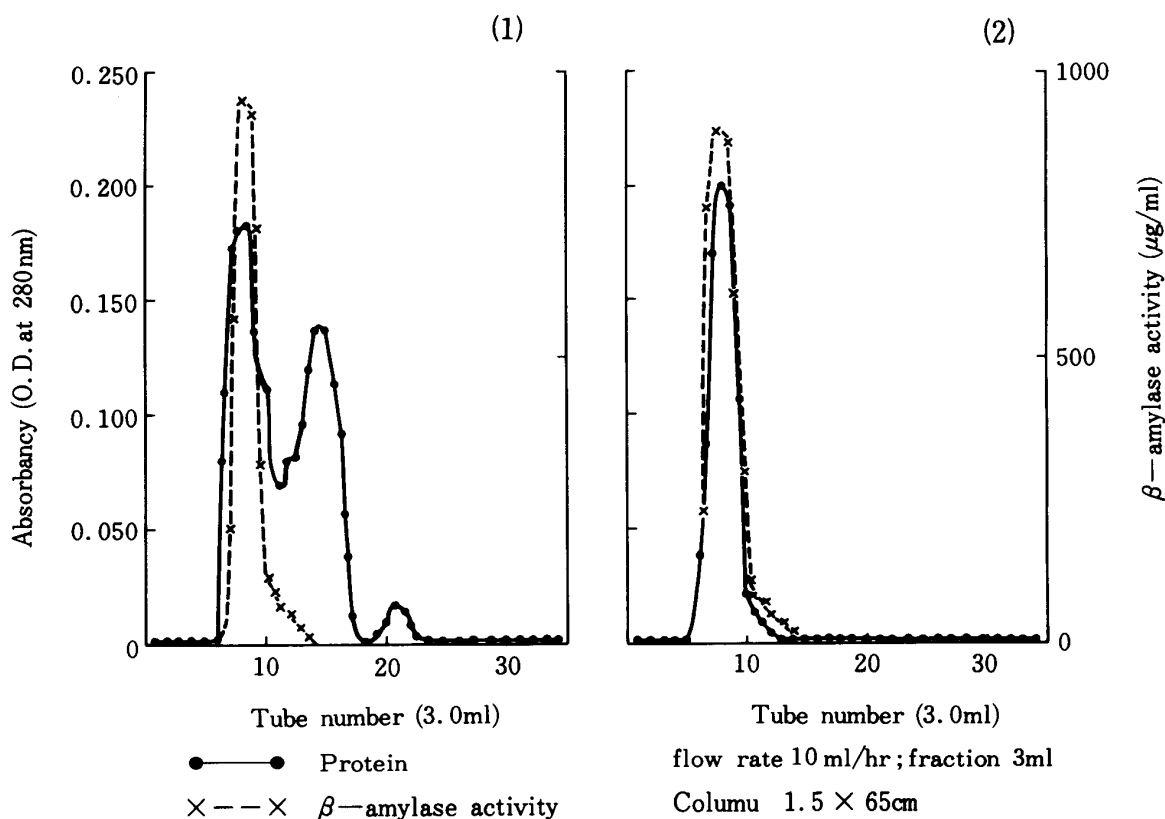


Fig. 3 Purification through gel filtration

Fig. 3 に示すように溶出液各3.0mlずつ分取した結果、アミラーゼ活性はFraction No 6 ~10の間に単一ピークとして得られた。しかしFig. 3-(1)では他の蛋白質の混在がまだ認められたことから酵素活性箇所を集め濃縮、透折して同カラムに再度通すことによりFig. 3-(2)に示したようなパターンを得ることができた。この時の酵素回収率は72~75%、比活性は40.5であった。

#### 4) ディスク電気泳動による酵素標品の純度と挙動

ポリアクリルアミドを支持体とするpH8.3用ゲルを用い精製酵素標品の純度の確認を行った。Fig. 4 に示した結果は順次精製ステップを追ったものであるが最終的に単一のバンドを得た。

移動度 ( $M_{BPP}$ ) はブロムフェノールブルー (BPB) の移動度を1とし、その相対値で示した。本酵素は $M_{BPP}0.50$ であった。

またゲル中の酵素活性を検出するために泳動後の非染色ゲルを直ちに0.2cmの幅に順次切

り出し、この切片を1.0mlの緩衝液に浸漬しアミラーゼの抽出を行った。この抽出液についてアミラーゼ作用を測定し前記同様に移動度を求めた結果、 $M_{BPB}0.51$ の値を得、染色したものの値とほぼ同一であった。

- (1) 粗酵素標品
- (2) DEAE-Celluloseカラム溶出物
- (3) Bio-Gel P-150カラム溶出物
- (4) disc電気泳動ゲル切抜抽出物

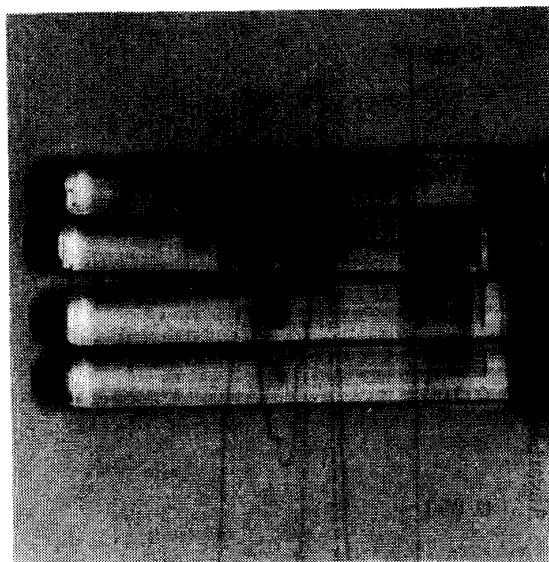


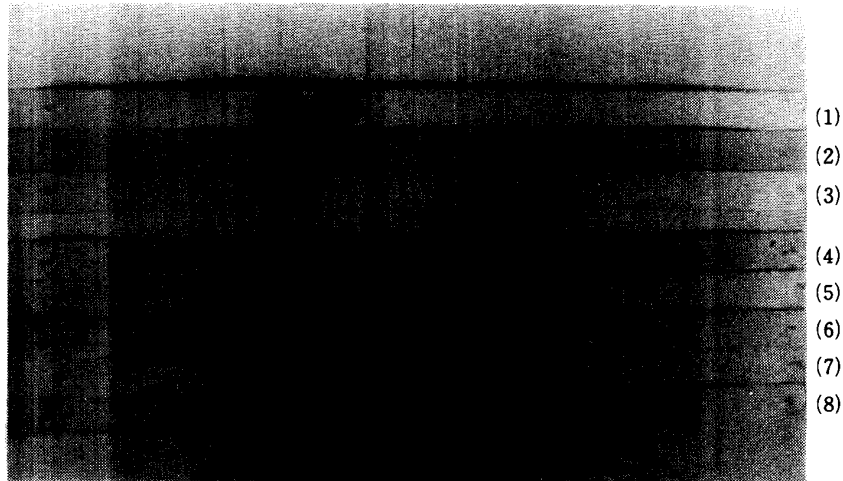
Fig. 4 Disc electrophoresis of  $\beta$ -amylase

## 2. $\beta$ -アミラーゼの確認

$\beta$ -アミラーゼを確認するために基質として0.6%濃度のバレイショでんぷん、コムギでんぷん、サツマイモでんぷん、トウモロコシでんぷんおよび2%可溶性でんぷんの5種類のでんぷんを用いて次の実験を行った。

### 1) ペーパークロマトグラフィーによる分解生産物の検出

各々の基質に本酵素を40°Cで20時間反応させてその分解液を濃縮し、東洋濾紙No50を用いペーパークロマトグラフィーにより生成糖類の検出を試みた。容媒はピリジン:n-ブタノール:水(4:6:3)、発色剤としてアニリン水素フタル酸塩を使用した。その結果Fig. 5に示すように各基質ともマルトースのみが検出され、他のオリゴ糖やグリコースは検出されなかったことから、得られた標品は他の酵素の混在しない純 $\beta$ -アミラーゼであることを確認した。



- |                 |                |
|-----------------|----------------|
| (1) グリコース+マルトース | (5) バレイショでんぷん  |
| (2) グルコース       | (6) コムギでんぷん    |
| (3) マルトース       | (7) サツマイモでんぷん  |
| (4) 可溶性でんぷん     | (8) トウモロコシでんぷん |

**Fig. 5 Paper chromatogram of the digests of various starch**

## 2) 各種基質に対する分解様相

起源の異なる4種類のでんぷんを用い、その基質濃度を0.6%に調整しpH4.8, 30°Cで本酵素を作用させFig. 6に示したように経時的にサンプリングして、その分解様相を探ってみた。その結果、バレイショ、サツマイモ、コムギでんぷんにおいてはほぼ同一の傾向の曲線を得ることができたが、これらに比してトウモロコシでんぷんの分解が若干低い値を示した。

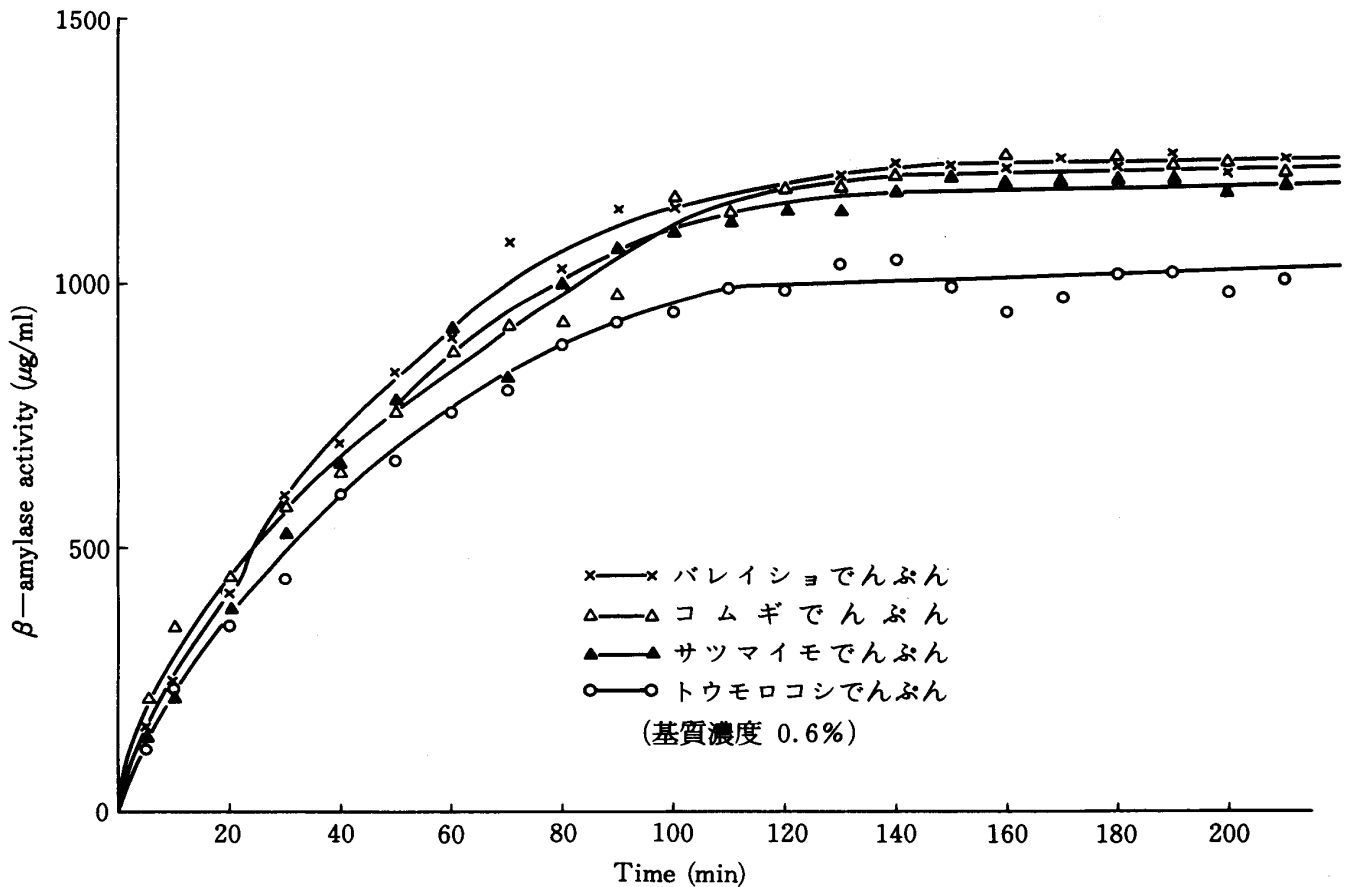


Fig. 6 Hidrolysis of various substrates by  $\beta$ -amylase

一般に地下茎でんぶん粒はアミラーゼ作用による消化性が地上でんぶん粒に比して劣ることが知られているが、本実験で用いた基質の範囲内ではその差がはっきり認められず、むしろ地上でんぶんであるトウモロコシにおいては分解率が悪かった。

フェノール硫酸法<sup>10)</sup>で全糖値を求め、これからそれぞれのでんぶん分解率を算出したところ、バレイショでんぶん、サツマイモでんぶん、コムギでんぶんが58~62%、トウモロコシでんぶん55%の値を得た。また2%モチトウモロコシでんぶん(waxy-maize starch東京化成工業株式会社)は50%であった。一般に $\beta$ -アミラーゼのアミロペクチン分解率は50~60%とされている<sup>11)</sup>ことと比較すると、本実験の結果はその範囲内であり、その作用挙動は $\beta$ -アミラーゼ特有の性質を示した。

### 3. 酵素の理化学的性質

#### 1) pHの酵素活性と安定性に及ぼす影響

異なる水素イオン濃度における酵素作用の変化を追及した。



酵素溶液と各pHのM/5緩衝液をを加え30°Cで1時間処理した後、これを10倍に希釈しながらpH4.8に調整して残存糖化力活性を調べた。使用した緩衝液はpH 3、4、5、5.5は酢酸緩衝液、pH 6、7、8はリン酸緩衝液、pH 9、10は重炭酸塩緩衝液を用いた。その結果、本酵素はpH5.0~7.0の範囲で95%以上の活性を保持した (Fig. 7-(1))。この値はサトイモ<sup>(2)</sup>、タケノコイモ<sup>(3)</sup>に含有される $\beta$ -アミラーゼとほぼ同一の値であり大差は認められなかった。植物起源 $\beta$ -アミラーゼではpH9.2のアルカリ性側で安定性を有するものにコムギ $\beta$ -アミラーゼが報告されている<sup>(12)</sup>が、これとは明らかに性質が異なっている。コムギ $\beta$ -アミラーゼは微生物起源、例えば*Bacillus cereus*, *Pseudomonas pseudomalles*, *Bacillus polymyxa*などpH9.0である<sup>(13)</sup>のに類似している。しかし、*Bacillus megaterium*の産生する $\beta$ -アミラーゼは特異的で植物起源のものに近くpH5.0~7.0で狭安定域を有している<sup>(13)</sup>。

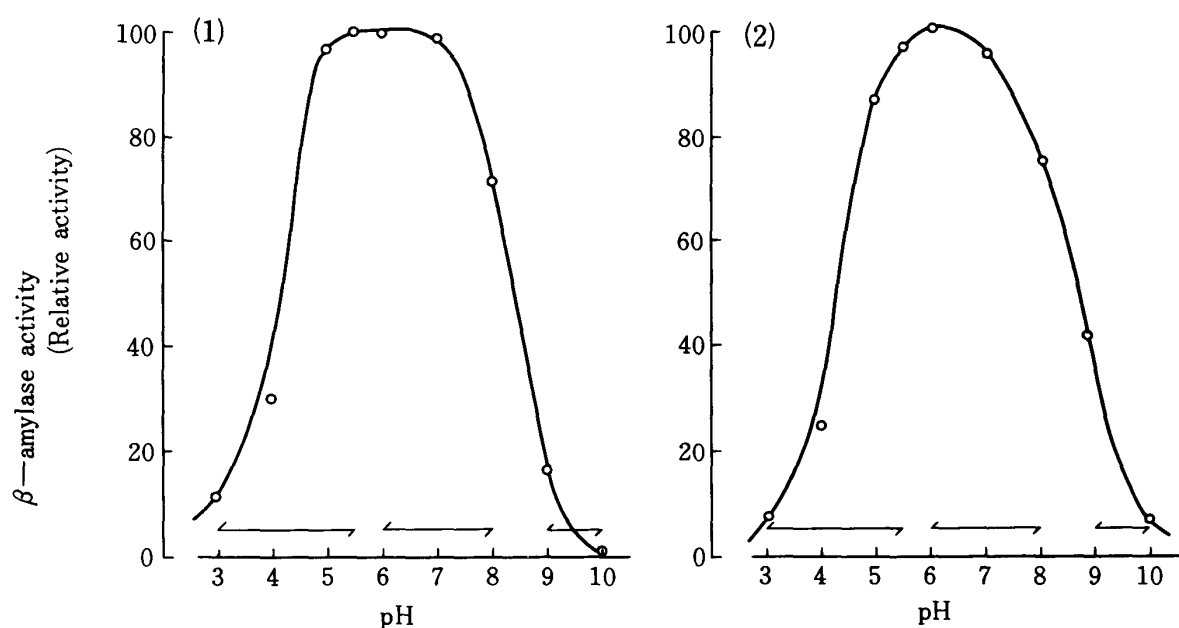


Fig. 7 pH effect on enzyme activity and stability

また本酵素の最適pHは6.0であった (Fig. 7-(2)) 最適pHにおいてはダイズ $\beta$ -アミラーゼ<sup>(12)</sup>やタケノコイモ $\beta$ -アミラーゼ<sup>(3)</sup>のpH6.0と同一値を得た。植物起源 $\beta$ -アミラーゼの最高活性域は多くのもので酸性側にありpH5.0~6.0であるが本酵素もこの範囲内にある。これに対し微生物起源ではpH6.0~7.0と微アルカリ性にあり、わずかではあるが両者間の差異が認められる。

## 2) 温度の酵素活性と安定性に及ぼす影響

M/5酢酸緩衝液を用いてpH4.8で20°Cから80°Cまで温度環境を変化させ酵素活性の動行

をみた。Fig. 8—(1)に示した結果は反応30分間の生成還元糖量を測定したものであるが、本酵素は55°Cで最大活性を示した。これはサトイモ $\beta$ -アミラーゼ<sup>2)</sup>と同一値を得たが、タケノコイモ<sup>3)</sup>の場合50°Cであり5°Cの差を生じた。

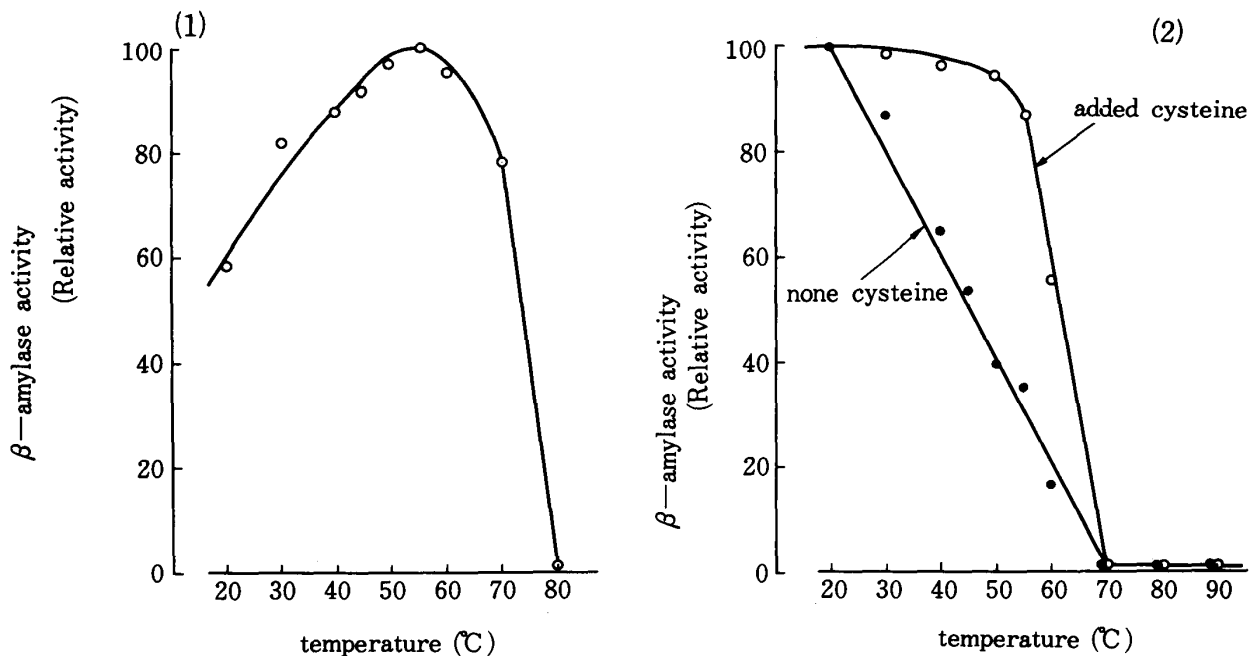


Fig. 8 Temperature effect enzyme activity and stability

次に酵素の安定性におよぼす温度の影響をみるためにpH4.8酢酸緩衝液と酵素液をFig. 8—(2)に示したような種々の温度で30分間処理した後、その残存糖化力活性を測定した。この時、同様に0.01M—システインを添加した場合についても検討した。システイン無添加の場合には処理温度が高くなるにつれてほぼ直線的に酵素活性の低下がみられ、50°Cでは40%の残存活性が認められたのに対し、システイン添加の場合は安定性が保たれ50°Cで95%位の活性を有している。

最高限界温度は、サツマイモ $\beta$ -アミラーゼ (pH6.0) で70°C、ダイズ $\beta$ -アミラーゼ (酸性域) で65°C<sup>4)</sup>と他のものに比しては比較的高温値を示している。

そこでシステインを添加したものと、無添加のものについて処理温度を60°Cと一定に保持

し、Fig. 9 に示すように5分から80分まで経時的に残存活性を追及した結果、60°C30分の処理ではシステイン無添加の場合、残存活性はわずか15%位であり85%もの失活に対し、システイン添加すると55%と半分以上の残存活性を認めた。本酵素は活性部位にSH基をもち、高温において $2\text{SH} \rightarrow \text{S-S}$ の反応が起って活性が減少すると考えれば、システイン添加による活性減少の防止現象を説明できるように思われる。

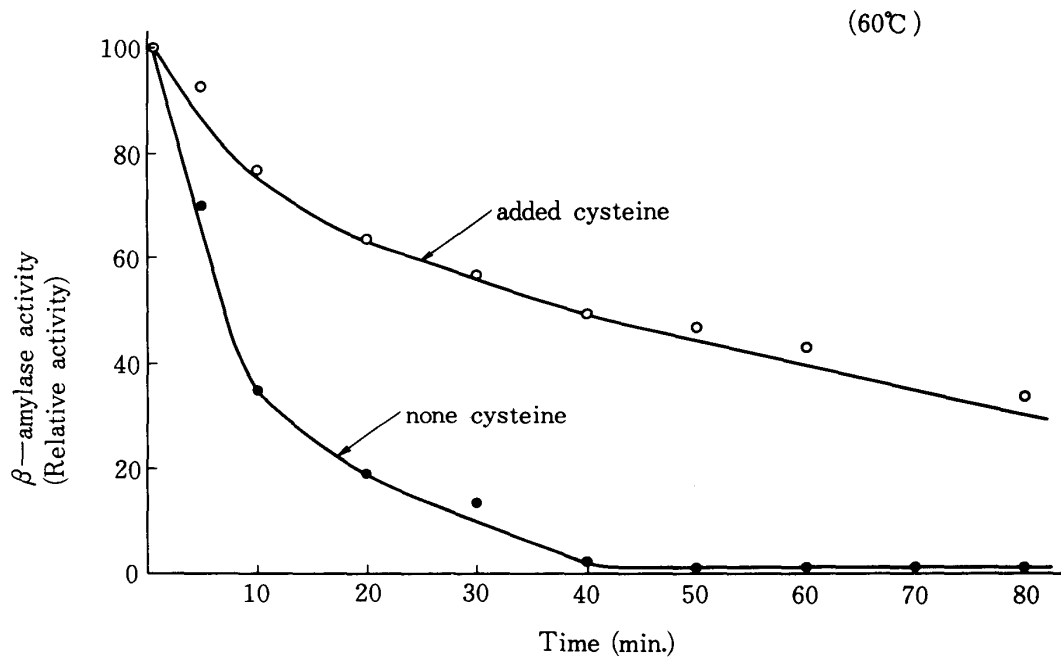


Fig. 9 Heat inactivation

### 3) 酵素活性に及ぼす金属イオン及び蛋白修飾剤の影響

酵素溶液、酢酸緩衝液 (pH4.8) 及び0.001M濃度の金属塩、あるいは蛋白修飾剤溶液の混液を25°C30分インキュベートして、その残存活性を糖化力により調べた。結果はTable 1に示すように、金属イオンでは $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$ などで著しく阻害された。

また SDS (sodium dodecyl sulfate), IAA (iodoacetamide), PCMB (p-chloromercurobenzoate)などの存在下でも酵素活性に極めて大きな影響を示した。しかし

DTT (dithiothreitol) Toriton X100, Tween80, NEM (N-ethylmaleimide) cysteinなどにおいては阻害反応は全く認められなかった。

**Table 1 Effects of various kinds of reagents on akameimo  $\beta$ -amylase**

Reagents	Relative activity	Reagents	Relative activity
None	100		
DTT	101	HgCl <sub>2</sub>	0
FeSO <sub>4</sub>	11	NiCl <sub>2</sub>	100
FeCl <sub>3</sub>	0	SOS	11
CuSO <sub>4</sub>	13	PCMB	35
CaCl <sub>2</sub>	100	Triton x100	109
AgNO <sub>3</sub>	21	Tween 80	106
CoCl <sub>2</sub>	97	NEM	108
ZnCl <sub>2</sub>	27	IAA	5
MgCl <sub>2</sub>	91	Cystein	105
SDS sodium dodecyl sulfate		IAA iodoacetamide	
PCMB p-chloromercuribenzoate		NEM N-ethylmaleimide	
DTT dithiothreitol			

以上述べたように本酵素はHg<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>, Ag<sup>+</sup>などで強く阻害された事実や、耐熱性実験においてシステインの有無が安全性保持に多少有効性を示している結果などから、その活性発現に対するSH基の関与が考えられる。そこで確認のため、SH試薬(PCMB)が酵素活性に及ぼす影響を検討しTable 2に示した結果を得た。0.001M-PCMBを30分間25°Cで酵素と反応させると64%、また60分間反応させると65%の失活を示した。

このPCMBによる阻害は0.01M-システインの添加により98%以上にまで回復した。これは過剰のチオールが存在下で再びその活性を回復させたと推察されることから、本酵素はSH基を分子中に含有しているものと推定された。他起源 $\beta$ -アミラーゼもまた活性発現のために1つないしそれ以上のSH基の存在が確認されている<sup>12)</sup>。

**Table 2 Inactivation by PCMB and reactivation by cystein**

Inhibitor	Time (min)	Relative activity	
		After inactivation	After reactivation
None		100	119
PCMB	30	36	119
PCMB	60	35	110

#### 4) 分子量

分子量測定のために酵素標品の他にマーカーとして分子量既知のmyoglobin (M.W.

17,800), chymotrypsinogen (M.W.25,000), ovalbumin (M.W.45,000), albumin (M.W.67,000) の4種類の標準蛋白質 (Mann Research Laboratories Inc., New York) を用い、未知試料の分子量を推定した。

(1) ゲル濾過法による測定

Andrewsの方法<sup>15)</sup>に準じ、Bio-Gel P-150によるゲルクロマトグラフィーを行った。Fig.10-1示したように蛋白質の検出は280nmにおける吸光度を測定し、同時に酵素活性も定量した。これによると本酵素の分子量55,000と概算された。

(2) SDSゲル電気泳動法による測定

Weber, Osbornらの方法<sup>16)</sup>に従いSodium dodecyl sulfate (SDS) を含むゲル電気泳動法による分子量の測定を行った。ゲル染色は0.25%, Coomassie brilliant blue溶液を用い、その脱色には氷酢酸メタノール純水の混液で25v/カラムの電圧をかけ脱色し前記同様移動度 ( $M_{BPB}$ ) を求めた。

Fig. 10-2)に示すようにあらかじめ標準蛋白質について実験を行ない縦軸に $\log M_{BPB}$ 、横軸に分子量をとったグラフを作成し、これから本酵素の $M_{BPB}$ から分子量を算出すると54,000と推定された。

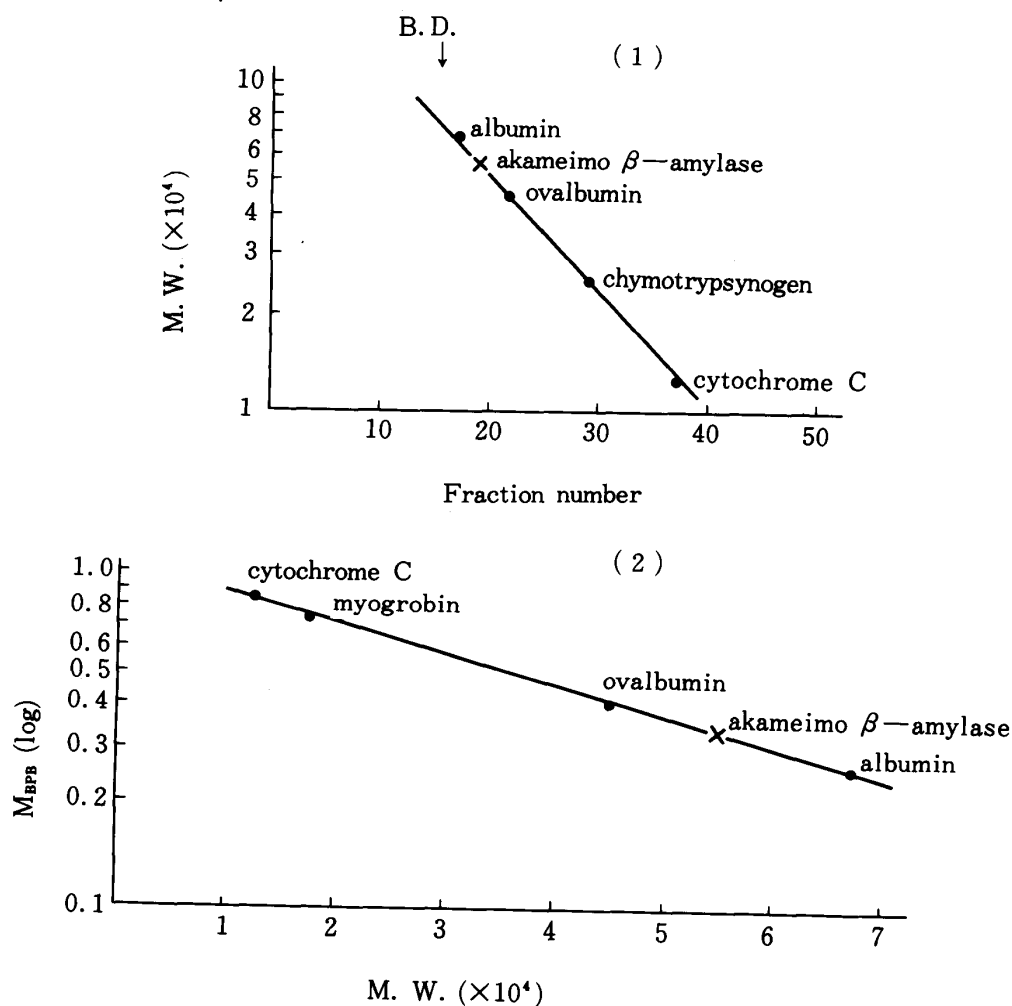


Fig. 10 Determination of molecular weight of  $\beta$ -amylase

(1) by Gel filtration

(2) by SDS-gel electrophoresis

以上2つの方法で得られた結果は54,000、55,000と極めて近似値を示した。この分子量は先に報告したサトイモ $\beta$ -アミラーゼの60,000<sup>2)</sup>、タケノコイモ $\beta$ -アミラーゼ57,000<sup>3)</sup>よりも多少小さい値であった。植物 $\beta$ -アミラーゼの分子量は50,000~60,000と報告されている<sup>12)</sup>がこの数値からみると本酵素はサブユニットを有しているとは考えにくく、単量体酵素であろうと推定される。

5) 酵素反応の速度と基質濃度

基質は可溶性でんぷんを用い、生じた還元糖の生成をNelson銅試薬を用いて比色定量して Fig. 11に示すような結果を得た。これから本酵素の $k_m$ 値を算出すると約0.95%の値を得た。

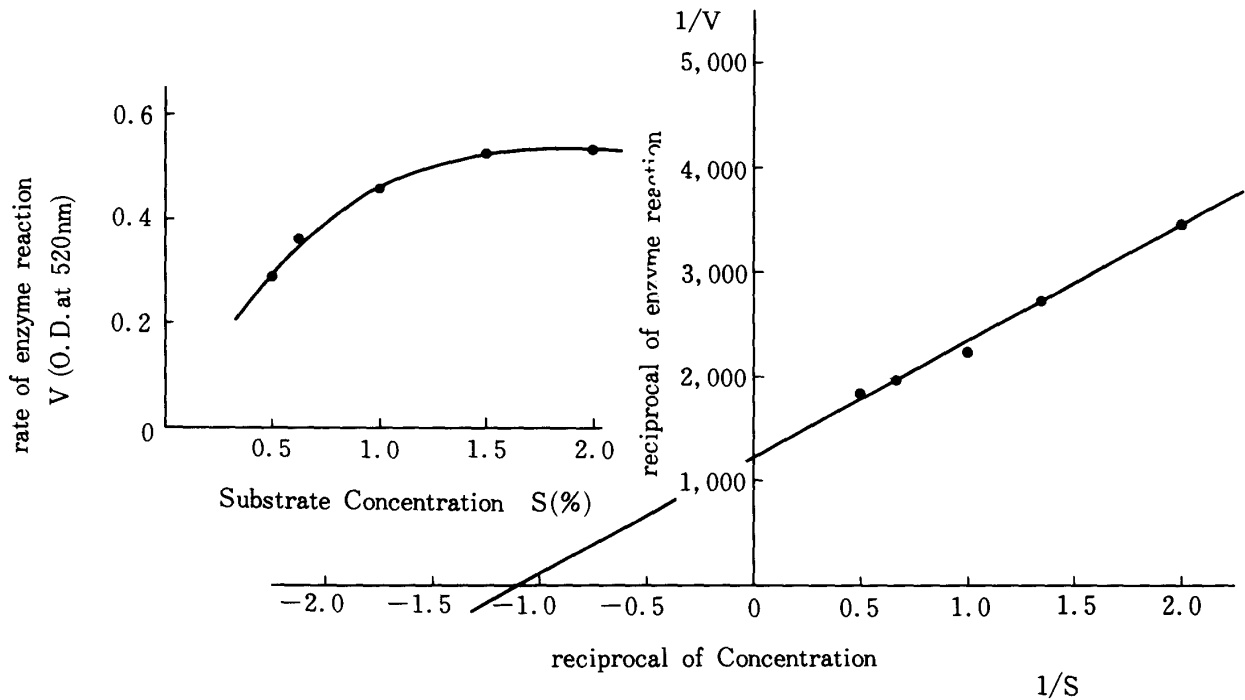


Fig. 11 Relationship of substrate concentration and enzyme activity

#### IV 要 約

① セレベスを加水して細挫して得た抽出液を酸処理法により $\alpha$ -アミラーゼを不活性化し、硫酸アンモニウムによる分画をして粗酵素標品を得た。

② DEAE-Celluloseによるイオン交換クロマトグラフィー、Bio-Gel P-150によるゲル濾過およびディスク電気泳動法により順次精製し、電気泳動法に単一の蛋白質とした純粋な $\beta$ -アミラーゼを得た。

③ 本酵素のでんぷん分解率は58~62%であった。また酵素反応生産物はペーパクロマトグラフィーでマルトースのみが検出された。

④ 本酵素の最適pHは6.0、安定域はpH5.0~7.0、最適温度は55°Cを示した。

⑤ 分子量はゲル濾過法、SDS-ゲル電気泳動法で測定した結果54,000~55,000の値を得た。

⑥ 可溶性でんぷんを基質としたときの $k_m$ 値は0.95%であった。

⑦ PCMB試薬に対する酵素活性の低下、これにシステイン添加による活性回復から本酵素のSH基存在が推定された。

⑧ 本酵素の諸性値をサトイモ科の他の品種および高等植物さらには微生物の $\beta$ -アミラーゼの値と比較し検討した。

(この報告の一部は日本家政学会第38回年次大会において口頭発表したものである。)

#### 文 献

- 1) 大野信子、横倉怜子：和洋女子大学紀要、(第2分冊) 24 (1983)。
- 2) 大野信子：家政学会誌 35、7 (1984)。
- 3) 大野信子：和洋女子大学紀要、(第2分冊) 26 (1985)。
- 4) 大野信子、黒田智枝：和洋女子大学紀要、(家政系編) 27 (1987)。
- 5) 二国二郎監修：澱粉科学ハンドブック、朝倉書店、130 (1977)。
- 6) 杉本温美、大西恵子、高谷友久、不破英次：澱粉科学、26、182 (1979)。
- 7) 杉本温美、西原公恵、不破英次：澱粉科学、33、169 (1986)。
- 8) 大野信子：未発表。
- 9) 安藤鋭郎、寺山宏、西沢一俊、山川民夫編集：生化学研究法II、朝倉書店、470 (1967)
- 10) 福井作蔵：生物化学実験法1、学会出版センター、45 (1982)
- 11) Yokobayashi, K., Misaki A, Harada T.: Biochim. Biophys. Acta, 212、458 (1970)。
- 12) 二国二郎監修：澱粉科学ハンドブック、朝倉書店、99 (1977)
- 13) 中村道徳監修：アミラーゼ、学会出版センター、86 (1986)
- 14) 大西正健、岡田巖太郎、谷口肇、板野好幸：蛋白質 核酸、酵素、30、5 (1985)。
- 15) P. Andrews : Biochem. J., 91、222 (1964)
- 16) K. Weber, M. Osborn : J. Biol. Chem., 224、4406 (1969)

大野 信子 (本学助教授)

黒田 智枝 (本学助手補)