

ヤツガシラ β -アミラーゼとダイズ β -アミラーゼの 酵素化学的性質の比較

大野 信子、伊集院 妙子

I. 緒 言

麦芽糖は甘味を比較すると砂糖の3～4割であると言われるが独特の甘味が好まれている。また熱に比較的強く着色しにくい、水に溶けやすく吸湿性が少ない、醗酵性が高いなどの特徴¹⁾を有し、水あめ、麦芽あめ、製パン、製菓、そして醸造などに広く利用されているものである。

でん粉質原料から麦芽糖を精製する β -アミラーゼの分布は、現在微生物起源のものも多く知られているが、以前は高等植物に限られるとされていただけに穀類、豆類、芋類および各種野菜類などに単独に、または α -アミラーゼなどと共存の形で見出されている²⁾。筆者らはサトイモ科 (Colocasia) の塊茎中に含有される β -アミラーゼについて分離精製し、その酵素化学的諸性質について比較検討してきた。サトイモ科には多数の品種が知られているが、各品種の β -アミラーゼの諸性質に果して差異があるかどうか実験を行ない、その結果についてすでに報告している^{3)~6)}。

今回は同科の中のヤツガシラ β -アミラーゼについて同様の実験を行ない、既報のものと比較検討すると共にダイズ β -アミラーゼとの性質の差異を追求したので報告する。

II. 実験材料および方法

1. 試 料

実験に供したヤツガシラは市川市内で購入した等級LL(1個600～700g)の千葉県産のものである。

2. 酵素標品の調整

1) 酵素の抽出

ヤツガシラを剥皮し適宜の大きさに刻み、2倍量の水を加えミキサーで1分間破碎し、室

温で40分放置したのち低温で6,000r.p.m. 10分間遠心処理をした。生じた沈澱物に少量の水を加えさらに遠心処理をくり返して洗浄した。この上清は最初の上清に加えた。混在する α -アミラーゼを不活性化するため、1N-HClを加えてpH3.6にして10分間放置したのち、直ちに3%アンモニア水を用いてpH4.8にもどし、再び低温で8,000r.p.m. 10分間遠心処理をした。上清をロータリーエバポレーターで40°C以下で約1/2量になるまで減圧濃縮した。この濃縮液に70%飽和硫酸アンモニウムを加え蛋白質の分画を行ない、12,000r.p.m.で20分間遠心処理し、生じた沈澱物を少量の0.01M-リン酸緩衝液 (pH7.45) に溶解してセロファンチューブに入れ、同緩衝液を用いて4°C12時間透析した。その後、不溶解物質除去のため遠心処理して得られた上清を粗酵素標品とした。(Fig. 1)

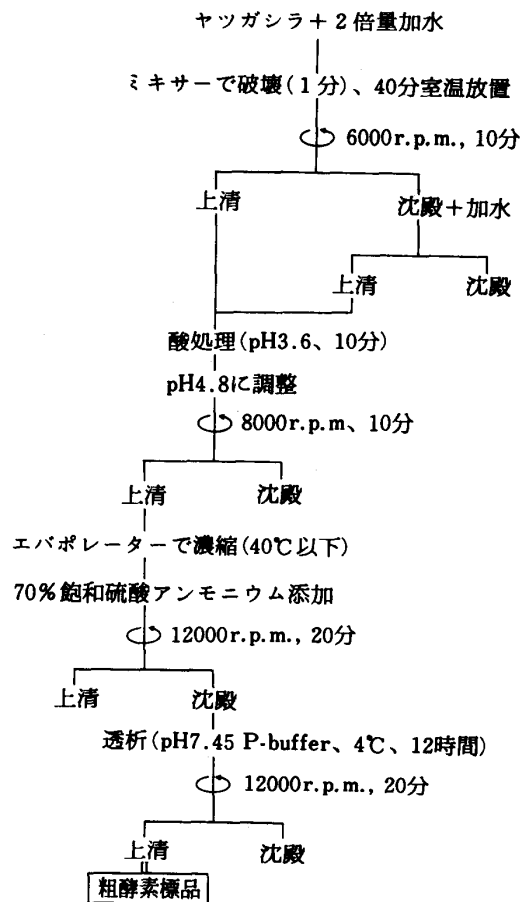


Fig. 1 Scheme for the isolation and preparation of crude enzyme

2) 酵素の精製法⁷⁾

①イオン交換カラムクロマトグラフィーおよびゲル濾過

十分活性化したDEAE-Celluloseは $\phi 2.7 \times 70$ cmのカラムに充填し0.01M-リン酸緩衝液で平衡化したのち、酵素標品を吸着させた。その後、0~0.7M-NaClを含む各250mlの緩衝液の混

合によるliner gradient elutionを行なった。流速は80ml/hr.で溶出液は各10mlずつ分取した。各フラクションについて280nmの吸光度および酵素活性を測定した。この時の活性箇所を集め濃縮透析を行なった。

Bio-Gel P-100は膨潤させた後、同緩衝液で充分平衡化し気泡を除去して $\phi 1.5 \times 90$ cmのカラムに充填し、DEAE-Celluloseにより部分的に精製した酵素をのせ、流速10ml/hr.で溶出を行ない各5mlずつ分取して、同時に吸光度および酵素活性を測定した。この時の活性箇所を集めて濃縮した酵素標品は、再度同一カラムを用いてゲル濾過を行なった。この結果、蛋白質ピークは β -アミラーゼ活性と同一点に溶出された。

3) Disc電気泳動法

永井の方法⁹⁾にしたがいポリアクリルアミドを支持体としてpH8.2用ゲルを用い4mA/カラムの定電流を与え一極から十極へ室温で約40分泳動させた。電極槽用緩衝液はpH8.3トリス・グリシン緩衝液を使用した。染色は1%アミドシュヴァルツ溶液、脱色は7%酢酸溶液を用いた。移動度は両緩衝液の境界に生じるブロムフェノールブルー (BPB) に対する相対値で示した。

4) ペーパークロマトグラフィーによる分解生成糖の検出⁹⁾

waxy starch (和光純薬工業) を基質として本酵素を40°Cで30分反応させ、その分解液を濃縮して、東洋濾紙No.50 (40×2cm) を用いペーパークロマトグラフィーにより生成糖の検出を試みた。溶媒はピリジン:n-ブタノール:水(4:6:3)、発色剤はアニリン水素フタル酸塩を使用した。

3) 酵素活性の測定法¹⁰⁾

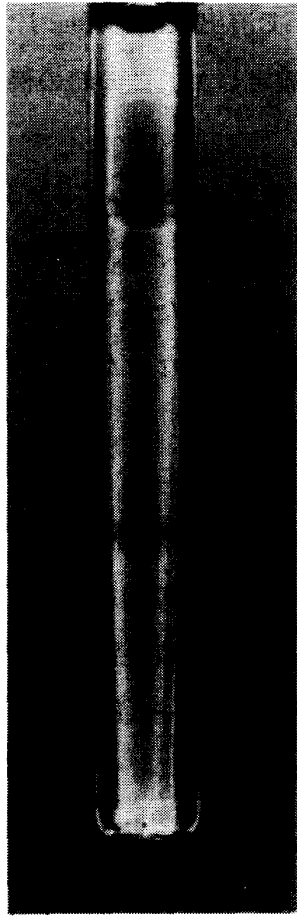
すべて2%可溶性でん粉を基質として、pH4.8の0.2M-酢酸緩衝液を用い30°Cで30分反応させた。その力価はマルトースで作成した標準曲線から反応液1ml中1分間に1 μ molのマルトースを遊離する量を1単位とした。

III. 実験結果および考察

1. 精製酵素と β -アミラーゼの確認

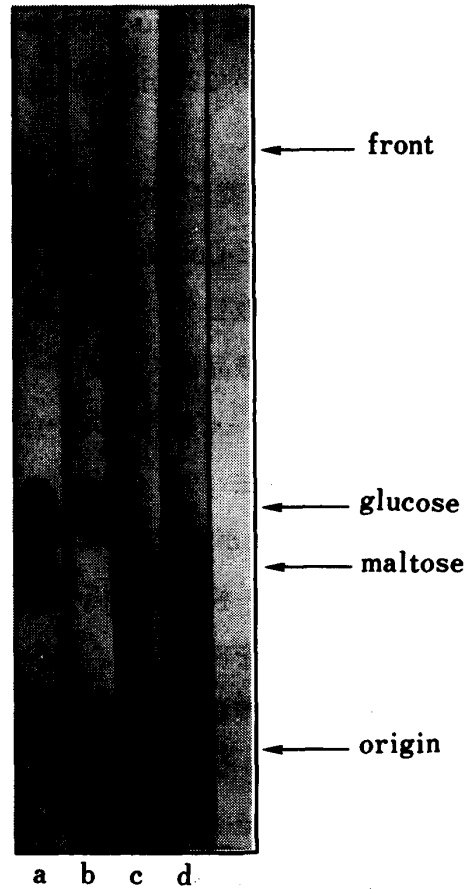
得られた酵素はDisc-電気泳動的に単一の蛋白質にまで精製された(Fig. 2)。この移動度は0.58と算出された。この酵素を用い、2%waxy starchを基質として反応させた結果、マルトースのみが検出され他のオリゴ糖やグルコースは検出されなかったことから、得られた標品は他の酵素の混在していない β -アミラーゼであると確認された(Fig. 3)。

次に、得られたヤツガシラの精製酵素とダイズ β -アミラーゼ(和光純薬工業)を用いて酵



Yatsugashira β -amylase

Fig. 2 Disc-electrophoresis of β -Amylase



① glucose+maltose ② glucose ③ maltose ④ yatsugashira β -amylase

Fig. 3 Paper chromatogram of the digests of waxy starch

素の蛋白化学的性質等の比較検討を行なった。

2. 温度条件と酵素活性

酵素活性におよぼす温度の影響について検討した結果をFig. 4に示した。本酵素は55°Cにおいて最高活性を示した (Fig. 4-A)。既報³⁾⁻⁶⁾のサトイモ、セレベスと同一値であった。タケノコイモは50°Cで5°C低い結果を示した。ダイズ β -アミラーゼは同条件下において60°Cで最高活性を示した。温度活性値についてはダイズ β -アミラーゼの方が高い結果を示している。

またFig. 4-Bは温度安定性を示したもので、各温度に30分放置した後の残存活性を測定した結果である。本酵素は50°Cまで安定であるが55°Cになると83%位まで低下した。ダイズ β -アミラーゼは65°Cまでは安定であるが70°Cで35%まで急低下した。 β -アミラーゼの温度安

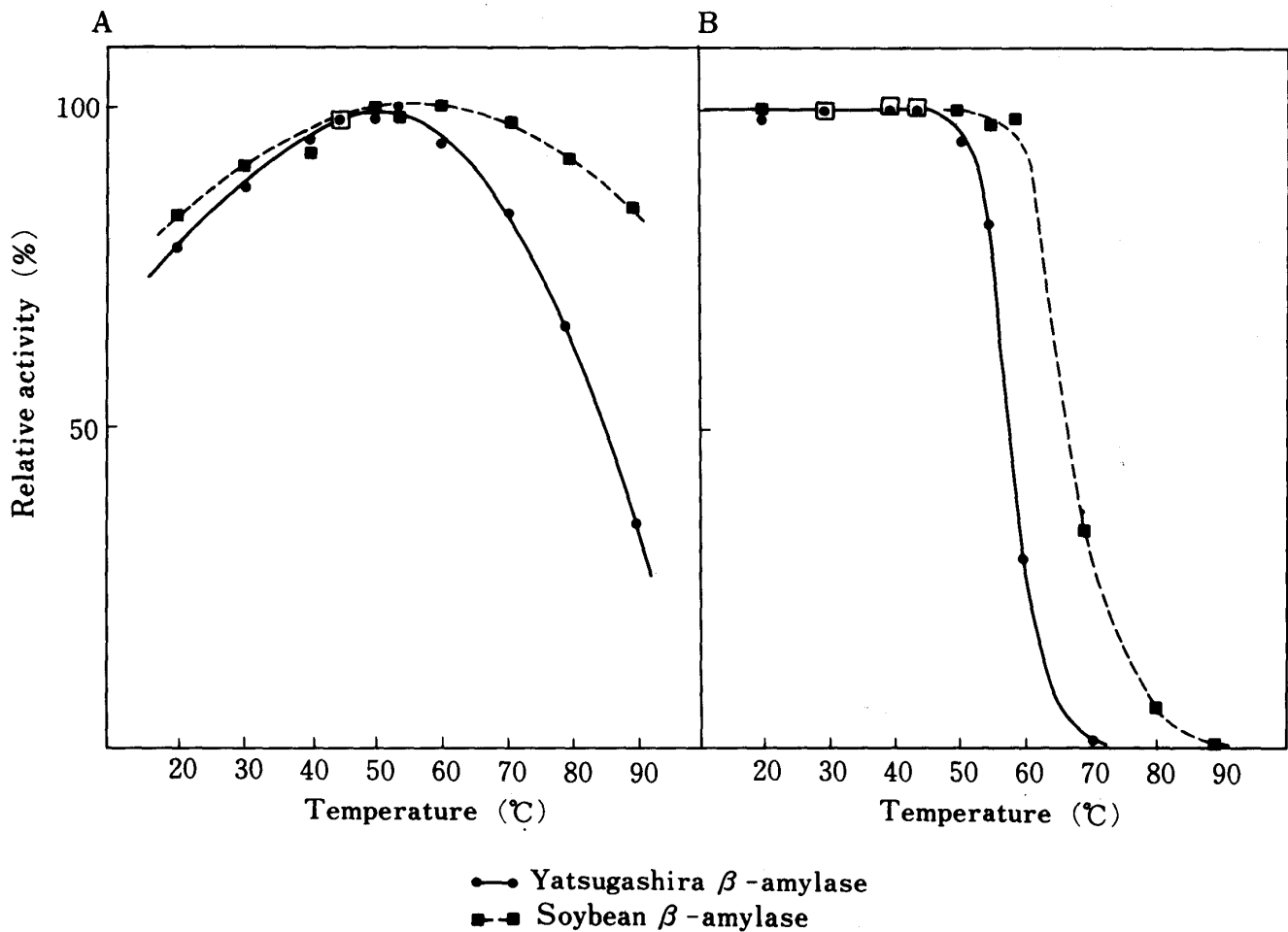


Fig. 4 Temperature-activity and stability curve

定性については、微生物あるいは高等植物起源のものでは50~60°Cが限界で耐熱性のものはさほど見出されていない²⁾が、ダイズにおいては酸性域で比較的安定で耐熱性も65°C¹¹⁾と他の酵素に比較して大きいことが知られている。

3. 水素イオン濃度と酵素活性

同じ水素イオン濃度においても緩衝液の種類により酵素活性に差の生ずることが知られているが、本実験ではpH 3、4、4.5、5、5.5は0.2M-酢酸緩衝液、pH 6、7、8は0.2M-リン酸緩衝液、pH 9、10、11は0.2M-重炭酸塩緩衝液を用いて酵素活性を測定した (Fig. 5)。その結果、Fig. 5-Aに示したように本酵素とダイズ β -アミラーゼとは同結果であり最適pH5.5の値を得た。しかし、サトイモではpH5.0、タケノコイモ、セレバスではpH6.0と多少の差異が見られた。

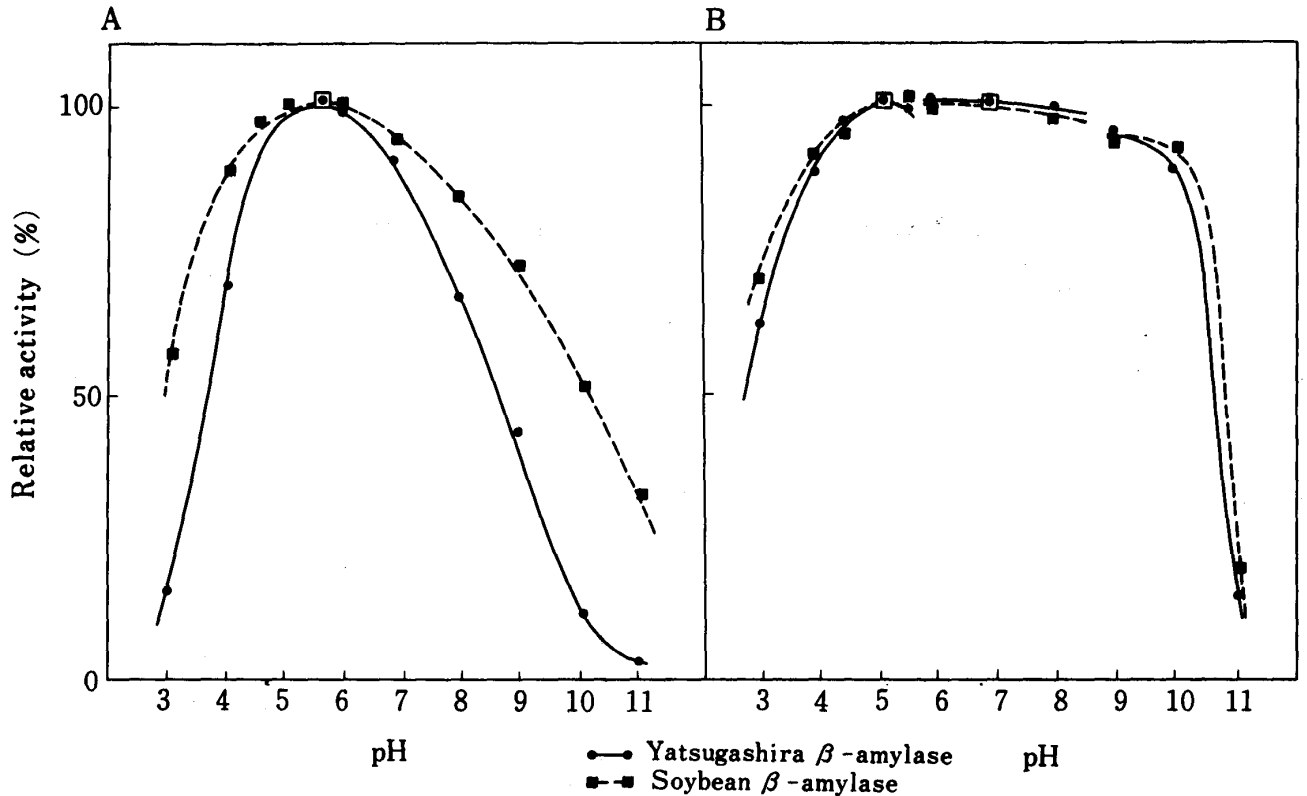


Fig. 5 pH-activity and stability curve

次に各pH緩衝液に30°C、1時間放置した後の水素イオン濃度に対する安定性を検討し、Fig. 5-B示す結果を得た。本酵素はpH5.0~8.0の範囲で安定であり、サトイモ、タケノコイモ、セレベスなどと大差ない結果であった。ダイズ β -アミラーゼもほぼ同一範囲において安定性を示した。ダイズ β -アミラーゼは酸性pH域で比較的安定であることが報告されている²⁾。

4. 酵素阻害剤の試験

酵素は重金属および有機水銀化合物などにより活性を失うため、Table 1に示したようにいくつかの試薬による反応を検討してみた。0.001M濃度の各試薬を用いて25°C、15分間放置させた後の残存活性を測定した結果、本酵素は FeCl_3 、 AgNO_3 、 HgCl_2 およびPCMBなどにより著しい阻害を受けた。しかし、 CaCl_2 、 CaCl_2 、 NiCl_2 、などでは影響を受ず、Cysteinの存在下では活性の増加を示した。これは自然酸化されたSH基がCysteinの添加によってその活性を回復したと考えられる。界面活性剤であるToriton \times 100やTween 80においても影響されなかった。またSH基還元剤であるDTTやアルキル化剤のNEMの影響も見られなかった。

ダイズ β -アミラーゼもまた同様に AgNO_3 、 HgCl_3 、PCMBなどの阻害を受け、本酵素との相違点はほとんど見られない結果を示した。

Table 1 Effects of various kinds of reagents on Yatsugashira β -amylase

Reagents	Relative activity	
	Yatsugashira	Soybean
<i>None</i>	100	100
<i>FeSO₄</i>	87	108
<i>FeCl₃</i>	0	18
<i>CuSO₄</i>	60	76
<i>CaCl₂</i>	99	98
<i>AgNO₃</i>	4	6
<i>CoCl₂</i>	99	101
<i>ZnCl₂</i>	33	21
<i>NEM</i>	100	98
<i>NiCl₂</i>	101	100
<i>Cystein</i>	102	105
<i>MgCl₂</i>	66	90
<i>IAA</i>	82	88
<i>Toriton</i> × 100	97	100
<i>DTT</i>	92	100
<i>Tween 80</i>	94	99
<i>HgCl₂</i>	0	0
<i>PCMB</i>	9	5

NEM = *N-ethylmaleimide*
IAA = *Iodoacetamide*
DTT = *Dithiothreitol*
PCMB = *p-chloromercuribenzoate*

このように β -アミラーゼはPCMBなどのようなSH試薬を用いた化学修飾で活性低下を起すことからいわゆるSH酵素といわれるが、このようなメルカプチド形成は過剰のチオールの存在下でその活性を回復することができる。

5. 酵素反応速度と基質濃度

可溶性でん粉を基質としてその濃度を変えて酵素反応を行ない、生じた還元糖を測定した。本酵素のミカエリス定数をLineweaver-Burkの逆数プロットより直線で導くとFig. 6に示すような結果を得た。これから本酵素のkm値を算出すると1.31%の値を得た。ダイズ β -アミラーゼのkm値とも一致した。

6. 分子量の測定

分子量の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.

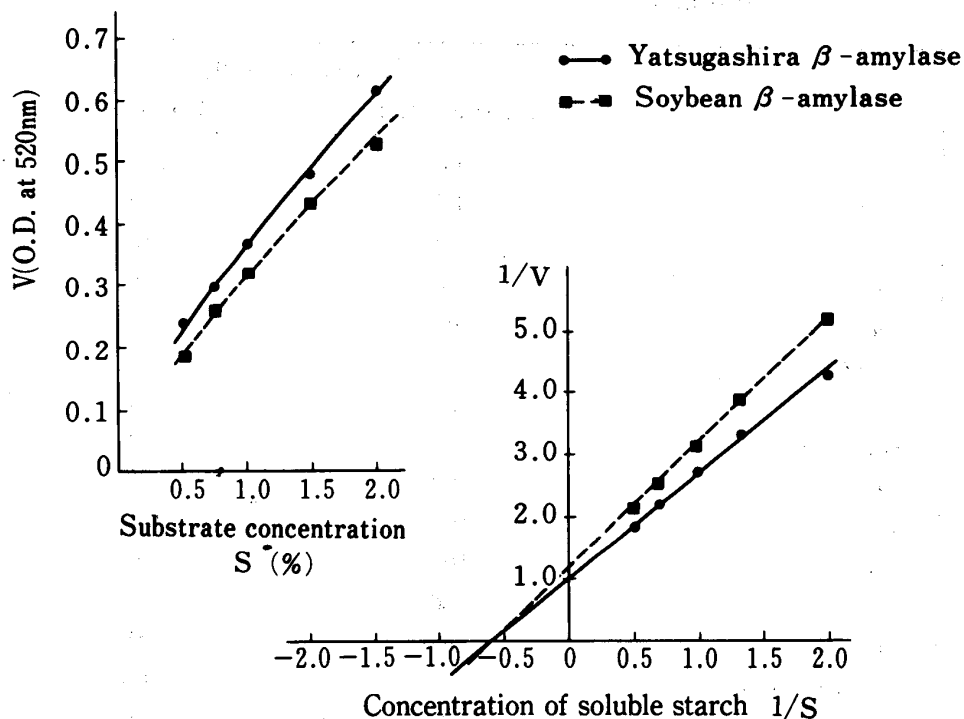


Fig. 6 Relationship of substrate concentration and enzyme activity

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 (Fig. 7)。

①ゲル濾過法による測定

Andrewの方法¹²⁾に準じBio-Gel P-150によるゲルクロマトグラフィーを行ない、蛋白質の検出を280nmにおける吸光度で測定し同時に酵素活性も定量した。既知分子量蛋白質は chymotrypsinogen, ovalbumin, albuminを用い、Fig. 7-Aに示すような結果を得た。これによると本酵素の分子量は67,000と算出された。

②SDSゲル電気泳動法による測定

林、大場らの方法¹³⁾に準じ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なった。ゲル染色は0.25%coomasie brilliant blue溶液を用い、その脱色には氷酢酸：メタノール：純水の混液を使用し、25V/カラムの電圧をかけて行なった。そして移動度 (M_{BPP}) を求めた。

Fig. 7-Bに示すようにあらかじめ標準蛋白質について縦軸に $\log M_{BPP}$ 、横軸に分子量をとったグラフを作成し、これから本酵素の分子量を概算すると67,000前後と推定された。

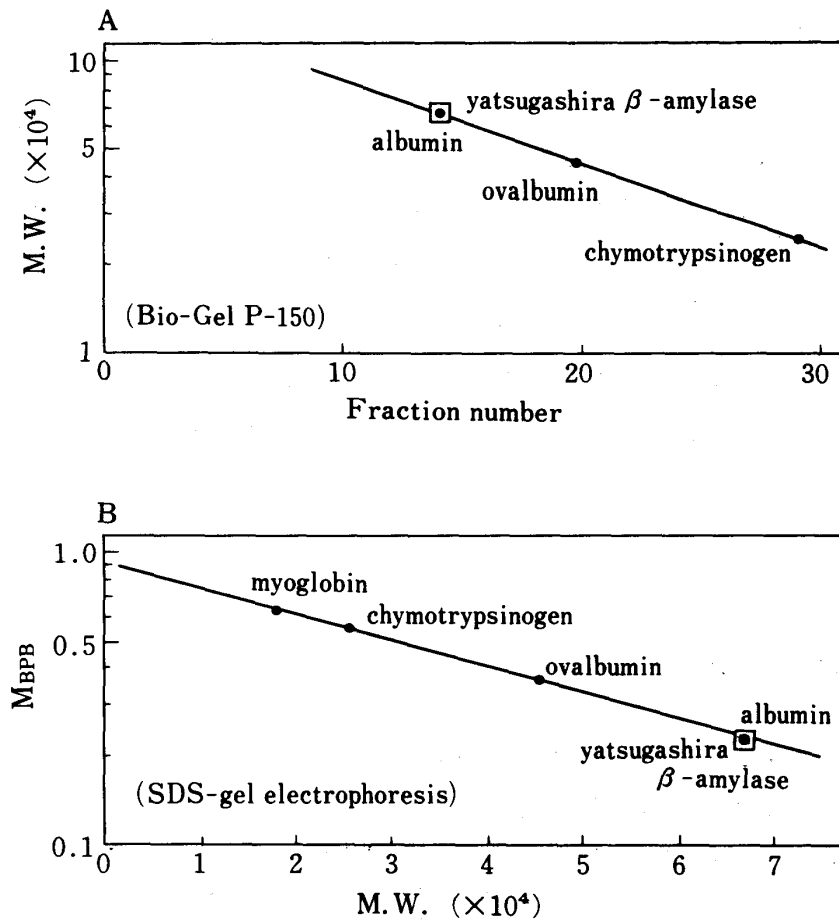


Fig. 7 Determination of molecular weight

以上、本酵素の分子量は2つの方法を用いて測定したところ67,000と同一の値を示した。ダイズ β -アミラーゼの分子量は61,700と報告されている²⁾ことと比較すると若干大きい値を得た。また先に報告したサトイモ、タケノコイモやセレベスなども60,000~55,000の分子量を示した⁴⁾⁻⁶⁾のに対し、本酵素は幾分大きい結果を示している。サツマイモ β -アミラーゼは4量体である¹⁴⁾とされているが、サトイモ、タケノコイモ、セレベスそしてヤツガシラ β -アミラーゼにおいてはこのような分子の会合はなくモノマーであると思われる。

IV. 要 約

1) ヤツガシラを加水して破碎して得た抽出液を酸処理法により α -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-100ゲル濾過により精製し、最終的には電気泳動的に単一のバンドが得られるまで純化した。これを β -アミラーゼの精製標品として以下の実験に供した。

- 3) 本酵素の最適温度は55°C、またダイズβ-アミラーゼは60°Cであり、5°Cの差を生じた。
- 4) 両酵素とも最適pH5.5、pH安定域5.0~8.0で同一値を得た。
- 5) 本酵素はFeCl₃、AgNO₃、HgCl₂およびPCMBなどの重金属や有機水銀化合物などにより活性を失う。この事はダイズβ-アミラーゼも同様であった。
- 6) waxy starchで測定した本酵素のkm値は1.31%であった。
- 7) 分子量は本酵素67,000、またダイズβ-アミラーゼ61,700であり若干の差を認めた。
- 8) 本酵素およびダイズβ-アミラーゼの諸性質はサトイモ科の他の品種と比較し検討した。

文 献

- 1) 高崎義幸：食品工業、19, 24 (1976)
- 2) 中村道徳監修：アミラーゼ、学会出版センター (1986)
- 3) 大野信子、横倉玲子：和洋女子大学紀要第24集、第2分冊 (1983)
- 4) 大野信子：家政学雑誌、35, 7 (1984)
- 5) 大野信子：和洋女子大学紀要、第26集、家政系編 (1986)
- 6) 大野信子、黒田智枝：和洋女子大学紀要第28集、家政系編 (1988)
- 7) 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 (1967)
- 8) 永井裕：別冊 蛋白質核酸酵素、物理化学的実験法(3)3 (1967)
- 9) 鈴木繁男、中村道徳編集：澱粉科学実験法、朝倉書店 (1979)
- 10) 二國二郎監修：澱粉科学ハンドブック、朝倉書店 (1977)
- 11) 大西正健、岡田巖太郎、谷口肇、坂野好幸：蛋白質核酸酵素、30, 5 (1985)
- 12) P. Andrews: Biochem. J., 91, 222 (1964)
- 13) 林健志、大場義樹：蛋白質核酸酵素、17, 304 (1972)
- 14) P.M. Coleman and B.M. Mathews: J. Mol. Biol., 60, 162 (1971)

大野信子 (本学助教授)

伊集院 妙子 (本学助手補)