



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	糸状菌糖化酵素の分別。Takadiastase より α -amylase, 糖化型 amylase 及び maltase の分別精製並に糖化型 amylase の多元性について
Author(s)	菅原, 四郎; SUGAWARA, Shiro; 中村, 幸彦 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 3(3), 96-107
Issue Date	1960-08-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11700
Type	departmental bulletin paper
File Information	3(3)_p96-107.pdf



糸状菌糖化酵素の分別。Takadiastase より α -amylase, 糖化型 amylase 及び maltase の分別精製並に糖化型 amylase の多元性について

菅原四郎*・中村幸彦*
下村得治*

A Fractionation Study of diastic Enzymes in Mold. Fractionation and purification of α -Amylase, saccharogenic Amylases and Maltase from Takadiastase, and Multiplicity of saccharogenic Amylases

By

Shiro SUGAWARA, Yukihiro NAKAMURA
and Tokuji SHIMOMURA

糸状菌の糖化酵素に関しては古くより多数の研究が報告され最近に於て結晶酵素として単離されるようになり、その性質、作用機作等が次第に解明されつつある。

α -amylase に関しては Underkofler and Roy¹⁾, Fischer and Mantmollin²⁾ 及び Takadiastase より赤堀・萩原及び池中³⁾ により結晶化されている。

糖化型 amylase は澱粉分子を glucose として分解する点で β -amylase と異なるものであるが、この酵素は amyloglucosidase⁴⁾⁵⁾, gluc-amylase⁶⁾⁷⁾, γ -amylase⁸⁾, Taka-amylase B⁹⁾, saccharogenic amylase 等の記載名で多数報告され、酵素起源も糸状菌一般に亘っている。福本等⁷⁾ 及び林田¹¹⁾ により結晶化されているが、糖化型 amylase は澱粉分解限度に著しい差があり、福本等によれば R. Delemar 型と Asp. niger 型に大別されるとし、上田¹⁰⁾ は Asp. awamori より debranching activity の低いものを得て糖化型 amylase を二つに分別した。

maltase については、糖化型 amylase が maltase 活性を有する点で糸状菌に於ける存在が問題であつたが

既に辻阪等¹²⁾ が Asp. niger より、著者等が白米麴¹³⁾ 及び Takadiastase¹⁴⁾ より maltase を結晶状に単離して amylase 作用のない maltase の存在を報告した。この maltase は糖転位作用を有し α -heteroglucoside より alcohol 或は糖へ glucosyl 基を転位し¹⁵⁾、又 maltose に作用して α -1, 6-結合を含む多数のオリゴ糖を合成¹²⁾¹⁶⁾ する点で糖化型 amylase の maltase 活性と異なるものである。

上述の如く糸状菌糖化酵素系は次第に明らかとなつてはいるがなお糖化型 amylase の二元性についても多くの問題があり、更に又著者等が白米麴や Takadiastase より α -glucosidase の分離に際して前記の maltase 以外の α -glucosidase の存在が予想されるようになった。そこでこれら糖化酵素系の解明にあたり特定酵素のみの分離を目的とせず、他の酵素を一方向的に失活もしくは除去せずに系統的に分別してゆく方法をとる必要を感じ、ここに α -amylase, 糖化型 amylase 及び maltase の分別を試みた。又同一材料から酵素乃至は蛋白質を系統的に分離してゆくことは酵素、蛋白質化学上有意義の事であると考えられる。

以上の観点から著者等は Takadiastase を材料としてこれら酵素の分別を試みた所、一応の成功を収め、

* 北海道大学農学部農芸化学教室

二、三の新しい事実を見出すに至つた。即ち Takadiastase 塩析物より α -amylase 及び maltase を赤堀等³⁾ 及び著者等¹⁴⁾ の方法で結晶として単離すると共に糖化型 amylase の一つ (糖化型 amylase I と呼称) を得た。又非塩析区分より岡崎⁹⁾ の方法により糖化型 amylase (II と呼称) を分離し、更に残存液より別の型の糖化型 amylase (III と呼称) を分離した。この糖化型 amylase III は Duolite A 処理により更に少くとも四ケの、作用機作上本質的に同じ酵素と考えられるものに分別され、且つ此等は amylase 作用と glucosidase 作用を併有し、澱粉に対する作用は糖化型 amylase I 又は II と異なるものであることが明らかとなつた。又 I と II は基質特異性は本質的に同じと考えられるが、粘紙電気泳動的には明らかな差異を示した。

本報告は Takadiastase より各種糖化酵素の分別精製法と糖化型 amylase の多元性について記述したものである。

実験材料及び方法

酵素材料は三共株式会社より恵与された Takadiastase 原粉末を用いた。なお本材料は糖化型 amylase と α -glucosidase の活性についてはかなりの変動が認められた。

可溶性澱粉、maltose は市販品を用い、 β -limitdextrin は甘藷 β -amylase と馬鈴薯澱粉より通常の方法により調製した。isomaltose、panose は著者等の方法により結晶 maltase と maltose による糖転位反応産物として得たものを用いた¹⁶⁾。

酵素活性の測定及び単位：酵素活性は還元力の測定による既報¹³⁾ の方法をとつた。糖化型 amylase 単位は 0.5 ml の酵素液が pH 4.8 (acetate 0.01 M), 45° 15 分に可溶性澱粉 100 mg より生成する glucose を全反応液 10 ml より 2 ml を以て定量し、生成 glucose 1 mg を 1 単位とした。maltase 活性は糖化型 amylase が maltose 分解能を有するため maltose を基質とすることが不適當であり、phenol- α -glucoside を用いたが反応速度が極めて低く、ために反応時間を 1 時間という長時間を採用した。このため活性の正確な比較は望めなかつた。即ち、maltase 単位は反応液 5 ml 中、酵素液 0.5 ml、基質 40 mg、pH 4.8 (acetate 0.01 M) とし、45°60 分後 2 ml をとり定量された glucose の mg 数を以て表はした。

実験結果

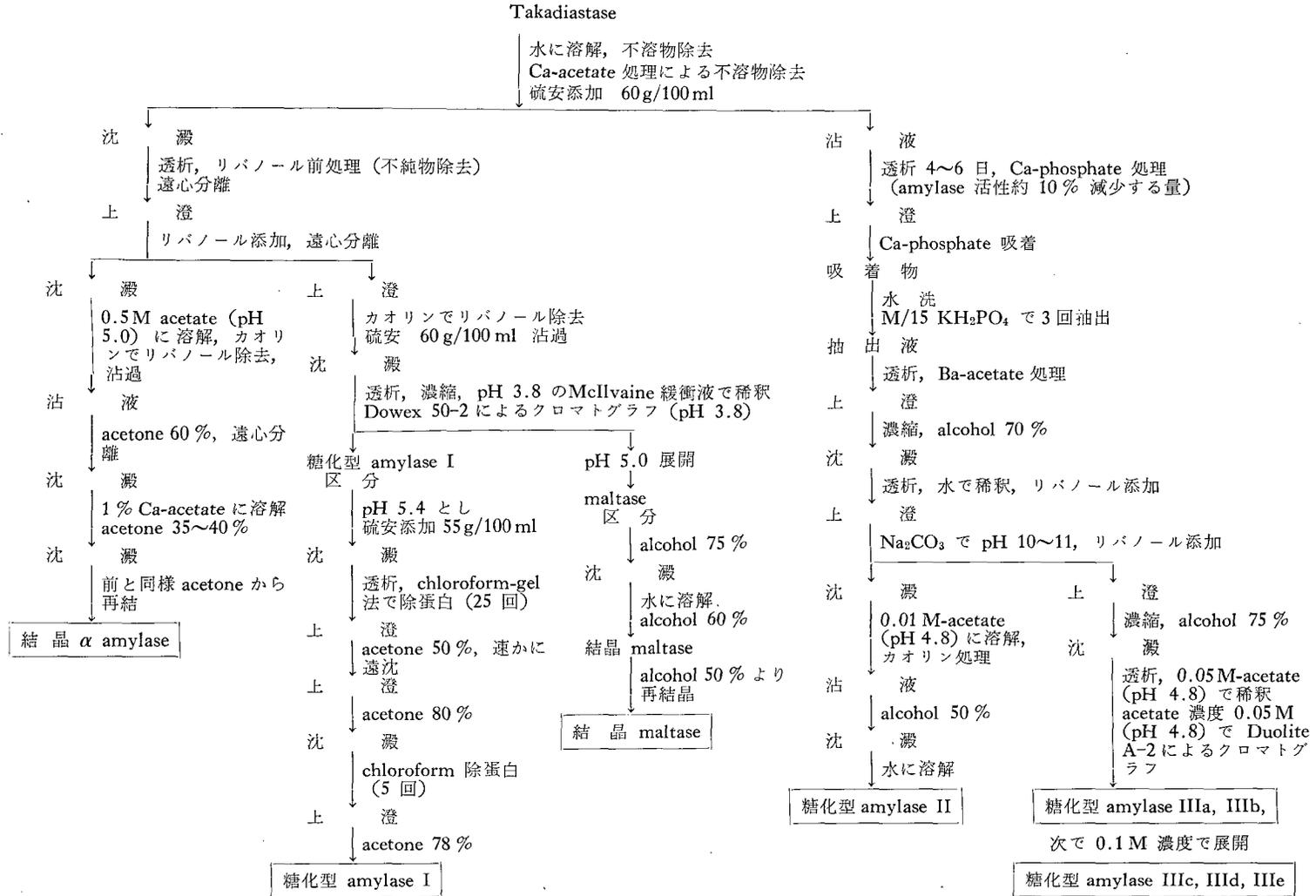
Takadiastase より各糖化酵素の分別精製は大要 (Diagram 1). の如き方法を用い以下順次詳述する。

Takadiastase 塩析物より α -amylase, 糖化型 amylase I. 及び maltase の分別及び精製：

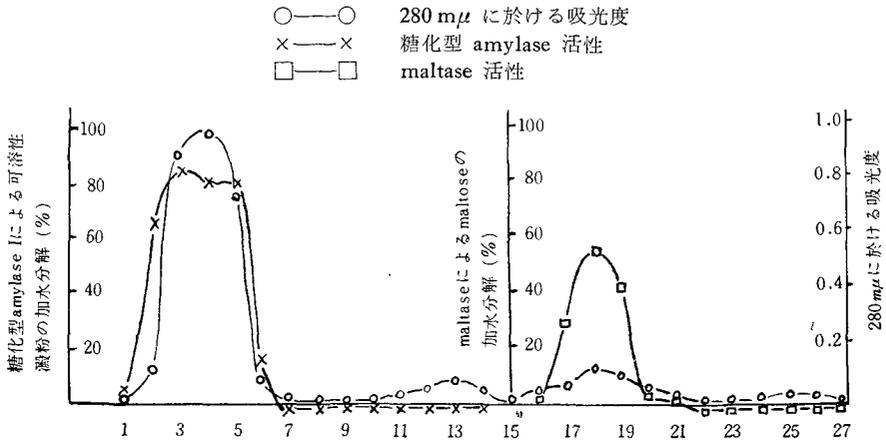
Takadiastase 300 g を水 2,000 ml に溶解、遠心分離し、不溶物を水洗して上澄及び洗滌液を集める (3,300 ml)。この抽出液に 10% Ca-acetate を加へ、終濃度 1% とし、生ずる沈澱を遠心分離で除去する。上澄 (3,500 ml) に硫酸を 1 l に対し 600 g の割合で加え、遠心分離管中に分注して一夜放置し、3,000 r. p.m. で 30 分間遠心分離する。この時上澄は透明には至らないが、これは濾過により速かに沈澱と分離し、濾液は完全に透明となる。沈澱を集め水に溶解し (1,150 ml) 流水に対し 4 日間透析し、セロファン膜は毎日交換した。透析液 (2,600 ml) に 4% rivanol 液を約 50 ml 加え (黄色の α -amylase-rivanol complex の沈澱が生成し初める量) 生ずる沈澱を遠心分離で除去する。上澄に更に 4% rivanol を沈澱の生成しなくなるまで加え (約 200 ml) 遠心分離して得られる沈澱は α -amylase の分離に用いる。上澄に caolin 約 150 g を加え 30 分攪拌し、過剰の rivanol を吸着除去せしめ、得られる微黄色の透明な濾液 (2,750 ml) に硫酸を 1,000 ml に対し 600 g の割合で加え 24 時間放置後濾過により沈澱を集め、流水に対し、3 日間透析し (セロファン膜は毎日交換)、透析液 (330 ml) を 30° で減圧濃縮し約 75 ml としてこれを等量の Me Ilvaïne 緩衝液 (pH 3.8) で稀釈し、Dowex 50-2 (3×20 cm) で糖化型 amylase と maltase に分別する。Dowex 50-2 は予め pH 3.8 の同じ緩衝液で平衡にしたものを用いる。

α -amylase の糖製結晶化—— α -amylase の精製結晶化は前述の rivanol 処理を含めて赤堀等³⁾ の方法によつた。即ち rivanol 沈澱物を 0.5 M acetate (pH 5.0) 300 ml に溶解、caolin 約 100 g づつ 2 回添加 10~20 分攪拌し rivanol を除去、得られる透明な濾液を氷冷し、これに冷 acetone を 1.5 倍量添加し生ずる沈澱を速かに遠心分離で集め 1% Ca-acetate 200 ml に溶解、不溶物を遠心分離で除去、冷却下に冷 acetone を白濁するまで添加、氷室に放置し、沈澱生成後、溶液が透明になつた時再び同様に acetone を追加して、終濃度約 35~40% とし、生成すを粗結晶を前と同様に処理して再結した。収量は 3 回再結後で針状結晶とし

Diagram 1. Takadiastase より α -amylase, maltase 及び糖化型 amylase I, II 及び IIIa~e の分別



第 1 図 Dowex 50-2 による糖化型 amylase I と maltase の分別



て約 2 g.

糖化型 amylase I の精製——前述の McIlvaine 緩衝液で希釈した溶液 (150 ml, pH 3.8) を Dowex 50-2 のカラムを通し同じ緩衝液で展開する。50 ml 毎に fraction を集め酵素活性を測定し乍らこれの消失する迄展開する (第 1 図)。活性の強い部分 (No. 2~No. 6) 250 ml を集め N-NaOH で pH 5.4 に調節し、硫酸を 100 ml に対し 15 g の割合で加え生ずる沈澱を遠心分離で除去 (12,000 r.p.m. 10 分) 上澄に更に硫酸を加えて 55 g/100 ml とし、前と同様遠心分離で沈澱を集め流水に対し、3 日間透析する。透析液 75 ml を水で 2 倍にうすめ 30 ml の chloroform と共に 15 分振盪することを 25 回繰り返す。かくして得られる酵素液 (110 ml) を冷却し、氷冷 acetone 110 ml を加え生ずる沈澱を速かに遠心分離で除去、上澄に acetone を追加して 70% 濃度として遠心分離し沈澱を水に溶解 (25 ml) 再び 1/5 量の chloroform と共に 15 分づつ 5 回振盪すれば chloroform 層に生ず

る沈澱は殆んど消失する。この chloroform 処理液 (37.5 ml) に 3 倍量の acetone を冷却下に加え沈澱を集め水 5 ml に溶解して再び前と同濃度の acetone から沈澱せしめ乾燥して保存する (第 1 表)。

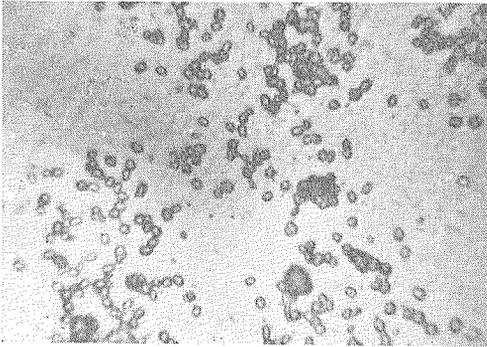
Maltase の精製及び結晶化——糖化型 amylase I の Dowex 50-2 より溶出終了後、緩衝液の pH を 5.0 とし、20 ml 毎の fraction をとり、活性の強い部分 (本実験では No. 2~No. 4) のみを集め、冷却下に alcohol を加えて 75% とし (時には alcohol 添加前に cellophane 膜中で濃縮した) 生ずる沈澱を遠心分離後流水に対して 3~4 日間透析、再び冷却下に alcohol (75%) より沈澱せしめる。沈澱を 10 ml の水に溶解し alcohol を少量づつ加えて 60% (冷却下) として氷室に放置すれば maltase の粗結晶を得る。これを alcohol 濃度 50% より再結すれば第 2 図の如き結晶を得る。

精製の各段階に於ける活性、収量等は方法の大要と共に既に報告した¹⁴⁾。

第 1 表 Takadiastase 塩析物より糖化型 amylase I の精製

精 製 段 階	液 量 ml	単位/0.5 ml	単位/mg 窒素	収 量 %
原 抽 出 液	3,500	9.7	2.6	100.0
第 1 回 塩 析 物	2,600	7.6	3.0	58.0
第 2 回 "	330	18.0	17.0	17.7
Dowex 50-2 処理	250	17.3	20.0	12.8
第 3 回 塩 析 物	150	16.5	25.0	9.9
第 1 回 chloroform 処理	110	13.9	38.0	4.6
acetone 70% 区分	25	30.0	61.0	2.2
第 2 回 chloroform 処理	37.5	14.4	67.0	1.6

第2図 結晶 Taka-maltase



Takadiastase 塩析濾液より糖化型 amylase II 及び III の分別精製:

Takadiastase の第1回塩析濾液 (3,800 ml) をセロファン膜に分注して流水に対して4~6日間透析する。この程度の透析で残存する硫酸濃度に於ては次のCa-phosphate-gelによる酵素の吸着を妨害しない。全透析液 (13,100 ml) を集め新しく調製したCa-phosphate-gel をpasteとして約220g添加し20分攪拌する。ここに加える吸着剤は不純物の除去を目的としたものでその量は予め溶液の一部につき、amylase 活性を5~10%程度減少せしめるように決めておく。攪拌後遠心分離し暗褐色に汚染した吸着物は捨てる。上澄に更にCa-phosphate-gel 約800gを添加し20分攪拌すれば amylase は殆ど吸着される。これを遠心分離し吸着物を二度水洗し M/15 (NH₄)₂HPO₄ 溶液 1.5 l づつ3回酵素を抽出する。抽出液 (4,500 ml) を40°以下で450 ml に濃縮し冷却し alcohol 900 ml を加えて生ずる沈澱を速かに遠心分離、水に溶解して不溶物を濾去し、流水に3日間透析した。然し透析による (NH₄)₂HPO₄ の除去は比較的困難であつたため、この透析液を M-Ba-acetate で処理し過剰の Ba⁺⁺ は硫酸で除き、中和後40°C以下濃縮し、再び alcohol 70% 濃度で沈澱せしめ前と同様3日間流水透析を行

う。透析液 (175 ml) は水で400 ml に稀釈して、α-amylase の残存を考慮して2% rivanol 8 ml を添加、生ずる僅少の沈澱を遠心分離で除去する。上澄は3% Na₂CO₃ で pH 10~11 とし、2% rivanol 20 ml を添加して暫時放置すると飽和の沈澱物を生ずる。かくて遠心分離により沈澱 (糖化型 amylase II 区分) と上澄 (糖化型 amylase III 区分) に分別する。

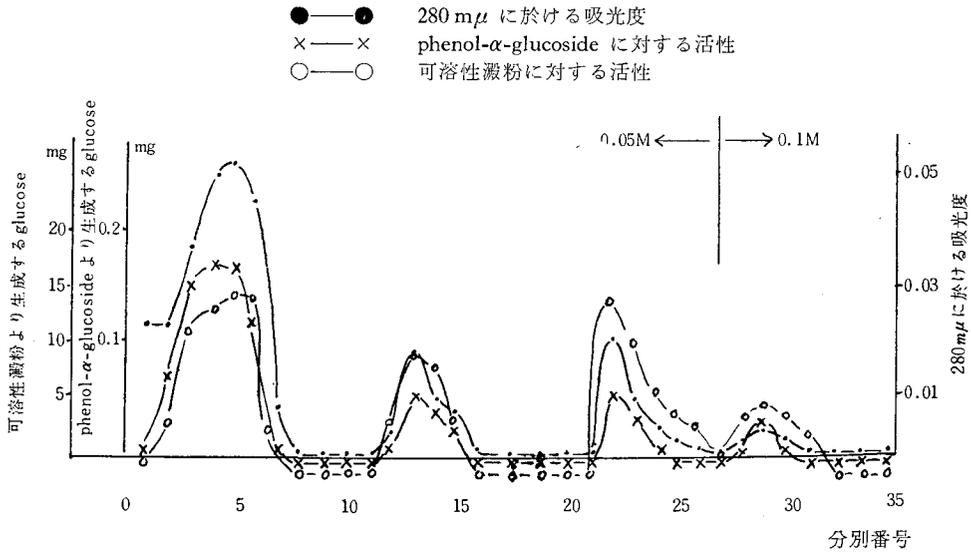
糖化型 amylase II の精製——上述の炭酸ソーダアルカリ性に於ける rivanol 沈澱物を0.1 M-acetate (pH 4.8) 100 ml に溶解し caolin 約20gを加えて攪拌し、スッチェで濾過すると黄色の酵素液を得る (90 ml)。この溶液を冷却しつつ alcohol 90 ml を添加、暫時放置後遠心分離で沈澱を集め水30 ml に溶解、酵素液とする。保存には更に alcohol より沈澱せしめ乾燥した。各精製段階に於ける収量及び比活性を第2表に示した。

糖化型 amylase III の Duolite による分別——炭酸ソーダアルカリ性で rivanol より沈澱しないこの区分 (440 ml) を N-CH₃COOH で pH 6.0 とし caolin 処理で rivanol を除去して得られる溶液 (400 ml) は糖化型 amylase 単位 15.1 で初めの塩析濾液中の全活性に対し8.8%である。又 glucosidase (maltase という意味に於て) 活性は正確な比較は出来なかつたが約60%がこの区分に残存し且つ rivanol 沈澱物中にはこの活性は存在しないから事実上この区分に集約されたと考えられる。そこで一応これら二つの酵素活性は別個のものから由来すると考え、次の様な種々の分別操作を試みた。これら予備的な実験から得られた結果は、(1) Takadiastase 塩析物中の両活性の分別に用いた Dowex 50-2 には何れも吸着されない。(2) 水溶液、33% alcohol 溶液又は硫酸半飽和溶液から corn starch に何れも吸着されない。(3) さきに著者等が白米麴に於て成功した Ca-phosphate 吸着物より酸性及び塩基性磷酸塩による分別溶出ではこの場合 M/15 KH₂PO₄ 溶液から両活性共完全に溶出される。

第2表 Takadiastase 塩析濾液より糖化型 amylase II の精製

精製段階	液量 ml	単位/0.5 ml	単位 mg 窒素	収量 %
塩析濾液	13,100	5.3	—	100
Ca-phosphate 前処理	12,500	4.8	—	88
(NH ₄) ₂ HPO ₄ 溶出	4,500	8.7	—	57
第2回透析液	275	18.8	19	7.5
rivanol 沈澱物	90	23.4	46	3
50% alcohol 区分	30	23.6	45	1

第3図 Duolite A-2 による糖化型 amylase III の分別 (I)



(4) Amberlite IRC-50, IR-4 B, IRA-400, diethyl-amino-ethylcellulose, carboxymethylcellulose 等は何れも分別効果がない。

これらの結果は α -glucosidase 活性に関する限り塩析物より得られる maltase とは異なる型の酵素と推論された。そこで更に検討を進めた結果 Duolite A-2 を用いると、この区分の糖化型 amylase 活性が更に幾つかの fraction に分別され且つ amylase 活性と glucosidase 活性が全 fraction に亘つて相伴つて出現することを見出し、この両活性が同一酵素に由来するものであるとの結論を導くに至つた。

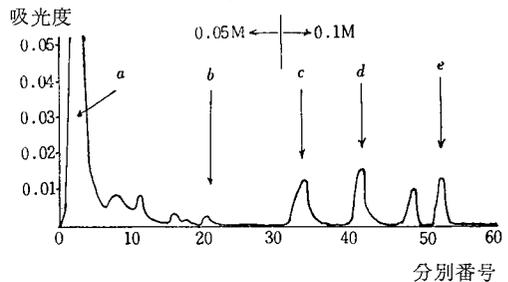
実験 1. — 酵素液 10 ml に 0.05 M-acetate (pH 4.8) 5 ml を加え、Duolite A-2 (13×140 mm, 予め 0.05 M-acetate (pH 4.8) で平衡にしたもの) に通して吸着せしめ、0.05 M 及び 0.1 M の acetate 濃度で展開し 2 ml 宛分別した。各溶出液につき amylase 及び glucosidase 活性と 280 m μ に於ける吸光度を測定した結果は第3図の如く4ヶの peak が得られ、各 fraction が何れも二つの酵素活性を併有している。

実験 2. — 実験 1. に於ける観察から、更に大量の酵素液を調製すべく実験を進めた結果、第4図に示した如く、更に新しく1ヶの両酵素活性を有する peak が出現し、合計 5 fraction に分別された。

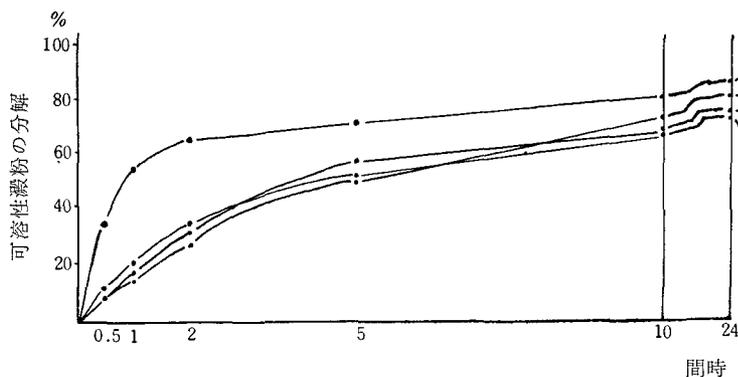
なお実験 1. に於て、0.05 M-acetate (pH 4.8) で展開したにも拘らず No. 1~No. 5 に於て測定された pH は 5.6~5.6 に上昇した。これは Duolite A-2

で交換される無機塩が残存していたものと考え、本実験に於ては若干の予備精製を行つた。即ち糖化型 amylase III fraction 250 ml を減圧下に 50 ml まで濃縮して 2.5 倍量 alcohol より沈澱し、速かに遠心分離し水に溶解して数日間透析を行い、0.05 M-acetate (pH 4.8) の等量で稀釈し不溶物を除去して酵素液 45 ml を得た。これを実験 1 と同様 Duolite A-2 に (3.5×23 cm) 吸着展開せしめ No. 1~No. 5 は各 50 ml, 以下 25 ml 宛に分別した (第4図)。回収率は 280 m μ に於ける吸光度より計算して約 89% であつた。

第4図 Doulite A-2 による糖化型 amylase III の分別 (II). a, b, c, d 及び e が酵素活性を示す区分



第4図に於て a, b, c, d 及び e が酵素活性を有する peak であるが、このうち b-fraction は活性が極めて微弱である。又実験 1 と異なる所は、acetate 濃度 0.05



第5図 糖化型 amylase IIIa, IIIc, IIId, IIIe の可溶性澱粉に対する作用
各 fraction 0.5 ml を使用した。

M に於ては前二者のみが、0.1 M に於て次の3ヶが得られた。各 fraction の糖化型 amylase 単位は a: 5.3, c: 0.9, d: 1.2, e: 0.9 であり活性比にすると a=100 として c: 18.7, d: 22.4, e: 18.7 となる。

これら各 fraction による可溶性澱粉の分解は、何れも 70~80% の分解限度を示す (第5図)。且つ作用経過も殆ど一致すること更に各 fraction とも phenol- α -glucoside に対する活性を有することから基質に対する作用方式は本質的に同じ酵素と考え、後述の各種基質に対する糖化型 amylase I, II 及び III の態度の比較実験にはすべて IIIa-fraction を用いた。

また amylase 活性及び α -glucosidase 活性が別個の酵素によるものであるか否かを更に確めるために IIIa-fraction を用い吸着剤に対する吸着速度及び吸着物よりの溶離の速度を比較した。即ち酵素液に対する Ca-phosphate-gel の添加量を変えて未吸着の酵素活性を測定すると amylase 活性/glucosidase 活性 (maltose 分解能) は一定の値を示し、又 Ca-phosphate-gel 吸着物より KH_2PO_4 溶液及び $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 溶液より順次溶出されて来る酵素活性の比も一定の値を示し、この数値は何れの場合も約 2 である (第3表及び第4表)。

糖化型 amylase I, II 及び IIIa の可溶性澱粉, β -limitdextrin, maltose, panose, isomaltose 及び phenol- α -glucoside に対する作用の比較:

これまで述べて来た如く Takadiastase より α -amylase, maltase 及び糖化型 amylase の分別に成功し、且つ糖化型 amylase は前述の方法による限りでは三つに大別され、IIIa-fraction は更に少くとも四つに分割し得るものであることを見出した。一方従来の報告では糸状菌のこの種の amylase はその酵素起源の違いにより、若しくは同じ起源からでも澱粉や β -

第3表 糖化型 amylase IIIa の Ca-phosphate-gel に対する態度

吸着剤 添加量 (ml)	基質の加水分解速度(%)		速度比
	可溶性澱粉	maltase	
無添加	42.7	20.6	2.1
0.3	41.2	22.5	1.8
0.5	36.0	18.7	1.9
1.0	24.5	11.2	2.2

酵素液 1.5 ml に Ca-phosphate-gel 懸濁液を加え、全量を 2.5 ml として攪拌後遠心分離、上澄の各 1 ml をとって酵素液とした。反応は 2% 基質 5 ml, 0.1 M-acetate (pH 4.8) 1 ml, H_2O 3 ml, 酵素液 1 ml を加え 40 $^\circ$ 30 分後定量した。

第4表 糖化型 amylase IIIa の Ca-phosphate-gel 吸着物より酸性及び塩基性磷酸塩による溶離速度

溶出剤	基質の加水分解速度 (%)		速度比
	可溶性澱粉	maltase	
M/100 KH_2PO_4	30.0	15.4	1.9
M/50 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	30.7	13.1	2.3
M/10 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	20.2	11.2	1.8

酵素液 5 ml に Ca-phosphate-gel 10 ml 添加し、攪拌して遠心分離し、水洗後、各溶出剤 5 ml 宛順次溶出したものを酵素液とした、定量法は第3表と同じである。

limitdextrin に対する作用限度の異なるものの存在が確認されているので、本実験に於て得られた糖化型 amylase 区分の各々について各種基質に対する態度を比較研究した。なお III-fraction は前述の理由から

IIIa-fraction をその典型的のものとして用いた。

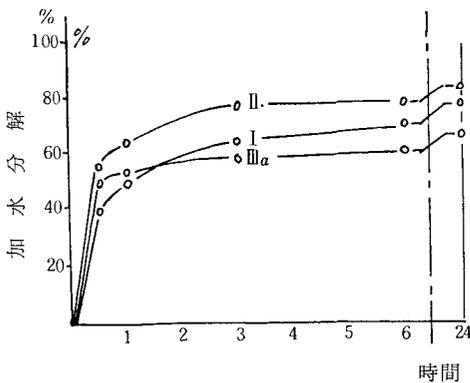
実験方法は糖化型 amylase I. と II は 0.1% 溶液とし, IIIa は前述の方法で得られた No. 2~No. 6 の部分 (第 4 図) をそのまま酵素液として用いた。即ち酵素液 1 ml, 0.1 M-acetate (pH 4.8) 1 ml, 1% 基質 (phenol- α -glucoside のみは 2%) 10 ml を 40° に於て反応せしめ時間毎に一定量を取り還元力を測定して加水分解率を求めた。又 panose よりの生成糖は glucose として定量した。

先づ可溶性澱粉に対しては (第 6 図) 分解限度は 70~80% で何れも大体一致するが反応の初速度と分解限度に到達する時間を見ると I 及び II は同じ傾向を有すると考えられ, IIIa は初速度は比較的大きく分解限度に到達する時間が早いという結果が得られた。

β -limitdextrin に対しては (第 7 図) I 及び II は可溶性澱粉に対すると同様であるが, 100% 加水分解を行う。一方 IIIa は反応速度も小であり 24 時間後でも約 70% の分解を示すに過ぎない。この事實は, IIIa が可溶性澱粉に対し反応初速度が比較的大きく分解限度到達の時間も早いことと併せて考えると明らかに I 及び II とは異なる型の amylase であると考へ得る。

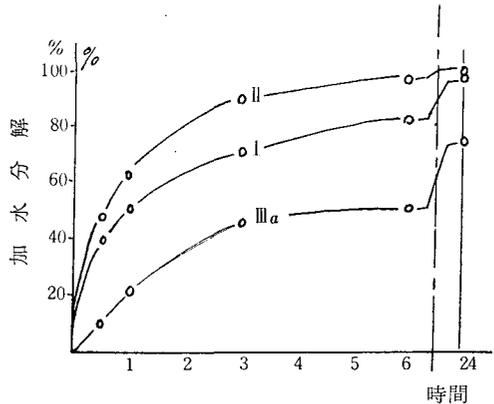
オリゴ糖に対しては, 先づ maltose は何れによつても完全に加水分解され (第 8 図) panose は速度は小さいが 24 時間後で 60~70% の分解を受ける (第 9 図)。一方 isomaltose は 24 時間後の観察では何れによつても微弱乍ら分解される結果を示した (第 10 図)。phenol- α -glucoside は I 及び II によつては全く加水分解されず IIIa のみが活性を示すが澱粉乃至は maltose に比し活性は非常に小さい (第 11 図)。

第 6 図 糖化型 amylase I, II 及び IIIa の可溶性澱粉に対する作用

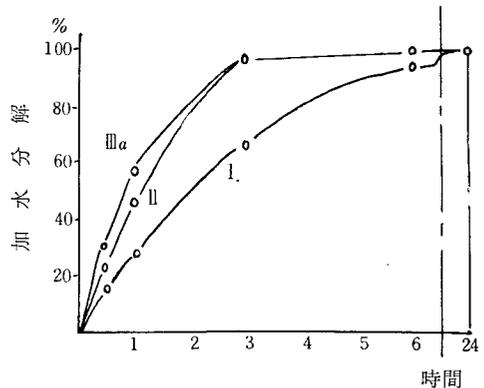


以上の結果は糖化型 amylase I と II は基質に対する態度は本質的に同じ酵素と考えることが出来る。糖

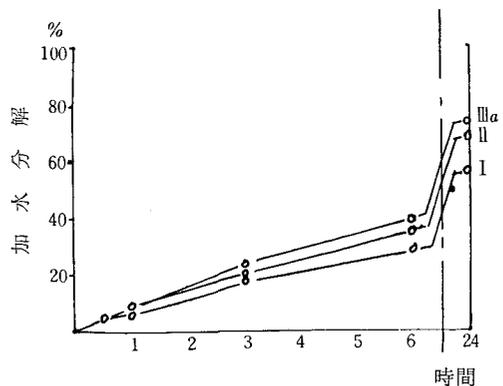
第 7 図 糖化型 amylase I, II 及び IIIa の β -limitdextrin に対する作用



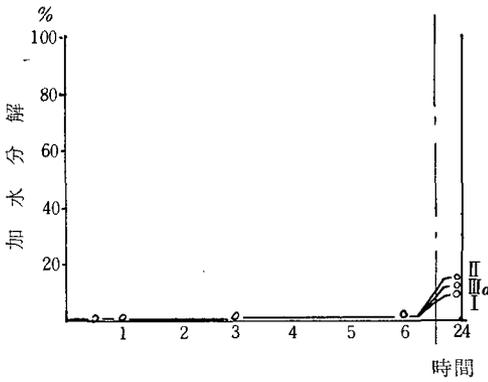
第 8 図 糖化型 amylase I, II 及び IIIa の maltose に対する作用



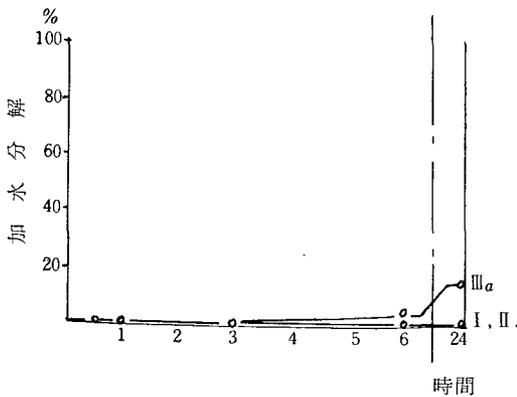
第 9 図 糖化型 amylase I, II 及び IIIa の panose に対する作用



第 10 図 糖化型 amylase I, II 及び IIIa の isomaltose に対する作用



第 11 図 糖化型 amylase I, II 及び IIIa の phenol- α -glucoside に対する作用



化型 amylase III は β -limitdextrin に対する態度の違いと且つ phenol- α -glucoside をも基質となし得る点で前二者とは明らかに別の酵素である。

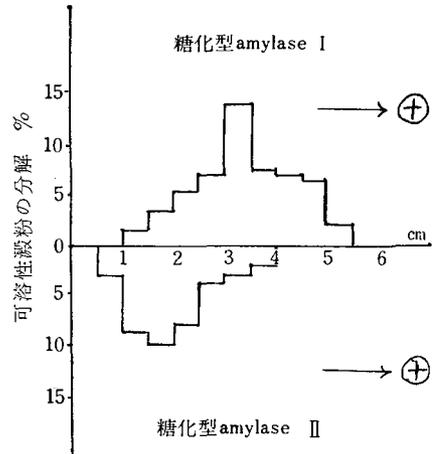
糖化型 amylase I 及び II の濾紙電気泳動による移動性の比較:

糖化型 amylase I と II は調製に際して塩析区分から由来したか非塩析区分から由来したかによつて分別されたものであるが塩析という操作が一蛋白質の分離に完全なものとは必ずしも云えない。そこで糖化型 amylase I の塩析による分離に於て、その材料或は塩析条件により一部が濾液に移行してこれが糖化型 amylase II として分離されたものではないかと予想し、次の濾紙電気泳動による実験を行つた。

酵素液 0.03 ml, 濾紙幅 2 cm, 0.1 M-veronal-HCl 緩衝液 pH 8.0, 300 V, 0.2 mA/cm なる条件で 5 時

間泳動させ風乾後 0.5 cm 毎に濾紙を切り、pH 4.8 の 0.1 M-acetate 3 ml で酵素を抽出し 2% 可溶性澱粉 2 ml を添加し 30° で 30 時間反応せしめ、反応液 2 ml を以て glucose を定量することにより、第 12 図の如き泳動図が得られた。

第 12 図 糖化型 amylase I 及び II の濾紙電気泳動図



即ち何れも陽極に向つて泳動するが、その速度は I の方が遙かに大である。

従つて糖化型 amylase I と II は作用方式という点では本質的に同じ酵素であるが濾紙電気泳動的には明らかに異なる蛋白質と考えられる。

考 察

この研究に於て Takadiastase より α -amylase, maltase 及び糖化型 amylase の分別精製乃至は結晶化に成功し、更に糖化型 amylase は少くとも 6~7 の区分に分別し得ることを見出した。

α -amylase 或は maltase (tranoglucosidase として記載されたものを含めて) は起源に拘らず性質は殆ど同じくすることは既に知られているから、本研究では分離されたこれら結晶酵素の性質は特にとりあげなかつた。

興味のあるのは糖化型 amylase の性質である。糖化型 amylase I と II は種々の基質に対する態度は殆ど同じであり、作用機作上同一酵素と考えられた。前者は塩析され易く後者は塩析され難いという点で分別し得るものであり、且つ濾紙電気泳動的に明らかな相異を示し糖化型 amylase I の方が移動性が大であ

る。従つてこれら両酵素は酵素材料からの分別の操作によつて単に別々に得られたものではなく、それぞれ別個の蛋白であると認められる。

然し糖化型 amylase II は Takadiastase を材料とする岡崎の方法⁹⁾により炭酸ソーダアルカリ性から rivanol により沈澱して得られたものであるが(但し HgCl_2 による不純蛋白の除去という操作はとらず、又前処理として Ca-phosphate-gel 吸着及び溶離を行つた)、その性質は異り特に β -limitdextrin は岡崎によると約 50% であるが、糖化型 amylase II は完全に加水分解を行う。そして rivanol によつて沈澱しない糖化型 amylase III 区が β -limitdextrin 及び澱粉に対する分解限度の低い型の酵素であつた。

何れにせよ、従来の報告で酵素起源により糖化型 amylase が二種類に大別され、更に上田¹⁰⁾が Aspawamori より debranching activity の異なる二種の糖化型 amylase の存在を指摘し、且つ塩析物及び塩析濾液よりそれぞれ分別しているが、Takadiastase にも同様にこれら二つの明らかに異なる型の酵素が存在することを証明し得たわけである。

糖化型 amylase III は α -glucosidase 活性を有する点に於ても I 及び II と明らかに区別されるものである。そしてこれら二つの酵素活性が Ca-phosphate-gel による吸着又は溶離に際し条件を変えても常に略々一定の活性比を示す。この事は両活性が単一の酵素に由来することを指示するものであり、従つて Takadiastase に存在する α -glucosidase 活性は maltase と共に糖化型 amylase III に由来するもので少くとも二つの型の存在が明らかとなつた。

このように糖化型 amylase III は澱粉より α -heteroglucoside に至る広い範囲に基質特異性を有する酵素である事が発見されたわけであるが、かかる酵素は動物に於て Lieberman and Eto により馬の血清 maltase に認められている。然しこの血清 maltase は amylase 活性/maltase 活性が約 0.015 であり、所謂 maltase に属すべき酵素である。一方糖化型 amylase III はこの比が約 2 であり amylase と考えるべきものである。

なお著者等が先に白米麴より結晶 maltase の分離を行つた際に、Ca-phosphate 吸着物より先づ酸性磷酸塩で糖化型 amylase を、次いで塩基性磷酸塩で maltase を溶出して分別に成功したのであるが、使用した麴材料により酸性磷酸塩溶出部に両酵素活性が同時に出現したことが屢々つた¹⁵⁾。これは糖化型 amylase

III が存在したためであろうと考えられ、又前述の実験結果が示した通りこの amylase は Ca-phosphate-gel 吸着物から 0.01 M KH_2PO_4 で溶出して来るものである。なお Takadiastase は材料により glucosidase 活性の変動が著しく時には phenol- α -glucoside 分解力の塩析濾液への移行が 30~60% に変動した。これらの事実はこの種の酵素が生成するに当り培養の僅かな条件の違いで、それぞれの生成比が大きく変つて来るものではないかと考えられる。

糖化型 amylase III は Duolite A-2 処理により少くとも四ヶの fraction に分割され各 fraction は総て amylase 活性と α -glucosidase 活性を併有している。糖化型 amylase I と II がそうであるように、III_a から III_e に至る各 fraction も作用の本質は同一のものであろうと考えている。糸状菌の糖化型 amylase は基質に対する態度から二種類に大別されるべき事は明らかな事実であるが、更にそれぞれの中に蛋白分子として modify されているものが存在し、従つて糖化型 amylase は蛋白形態として多元的なものと云い得る。酵素分子に modification が存在することは既に ribonuclease¹⁹⁾ や cytochrome C²⁰⁾, papain²¹⁾ に於て既に知見され、松島等²²⁾ は Taka-maltase についても報告している。

なおこの実験で分離された糖化型 amylase はすべて isomaltose に対し微弱ながら作用することが認められ従来の報告と異なるものであつた。この問題は各糖化型 amylase 間の作用上の微細な相異の問題と共に今後の研究を必要とするものである。

要 約

1) Takadiastase より α -amylase, 糖化型 amylase 及び maltase の分別及び精製法を記載した。

即ち塩析部より α -amylase 及び maltase を結晶化し糖化型 amylase I を得た。非塩析部より rivanol 処理により糖化型 amylase II と III に分別し、更に III を Duolite A-2 によるクロマトグラフィによつて四ヶに分別した。

3) 糖化型 amylase I と II は基質に対する態度は本質的に同じ酵素であるが濾紙電気泳動に於ける移動度を異にする。

糖化型 amylase III は α -glucosidase 活性をも有し、且つ β -limitdextrin に対する態度から糖化型 amylase I 及び II と異なるものであつた。

3) 以上の事実から糸状菌糖化型 amylase は作用

本質上からは二種類あることを再確認し、更にそれぞれに分子上の modification が存在することが認められるに至つた。

本研究に当り Takadiastase 原粉末を提供された三共株式会社に深謝する。又甘藷 β -amylase は北大農学部農産製造部の伊藤哲雄氏より恵与された。併せて感謝の意を表する。

文 献

- 1) L. A. Underkofler and D. K. Roy: Cereal Chem. 28, 18 (1951)
- 2) E.H. Fischer and R. de Montmollin: Helv. Chim. Acta 34, 1987 (1951)
- 3) 赤堀・萩原・池中: J. Biochem. 41, 577(1954)
- 4) C.E. Weil, R.J. Burch and J.W. Van Dyk: Cereal chem. 31, 150 (1954)
- 5) R. W. Kerr: J. Am. Chem. Soc. 37, 3916 (1951)
- 6) L. L. Phillips and M. L. Caldwell: J. Am. Chem. Soc. 73, 3559 (1951)
- 7) 福本・辻阪・南井: 酵素化学シンポジウム 9, 74 (1952)
- 8) 北原・久留島: 醸工 27, 213, 254 (1949); 30, 72 (1952)
- 9) 岡崎: 農化 28, 181 (1954); 29, 273, 277 (1955)
- 10) 上田: Bull. Agr. Chem. Soc. 21, 379 (1957)
- 11) 林田: Bull. Agr. Chem. Soc. 21, 386 (1957)
- 12) 辻阪・福本: 酵素化学シンポジウム 10, 84 (1958)
- 13) 菅原・中村・下村: Bull. Agr. Chem. Soc. 23, 156 (1959)
- 14) 菅原・中村・下村: Bull. Agr. Chem. Soc. 24, 112 (1960)
- 15) 菅原・中村・下村: Bull. Agr. Chem. Soc. 24, 278 (1960)
- 16) 菅原・中村・下村: Bull. Agr. Chem. Soc. 24, 281 (1960)
- 17) I. Lieberman and W.H. Eto: J. Biol. Chem. 225, 899 (1957)
- 18) 中村・菅原: 農化大会講演 (1958) 京都
- 19) C. H. Hirs, W. H. Stein and S. Moore: J. Am. Chem. Soc. 73, 1893 (1951)
- 20) B. Hagihara et al: Nature 178, 629 (1956)
- 21) B.F. Finkle and E.J. Smith: J. Biol. Chem. 230, 669 (1958)
- 22) 松島・赤堀: 生化学会大会講演 (1958) 札幌

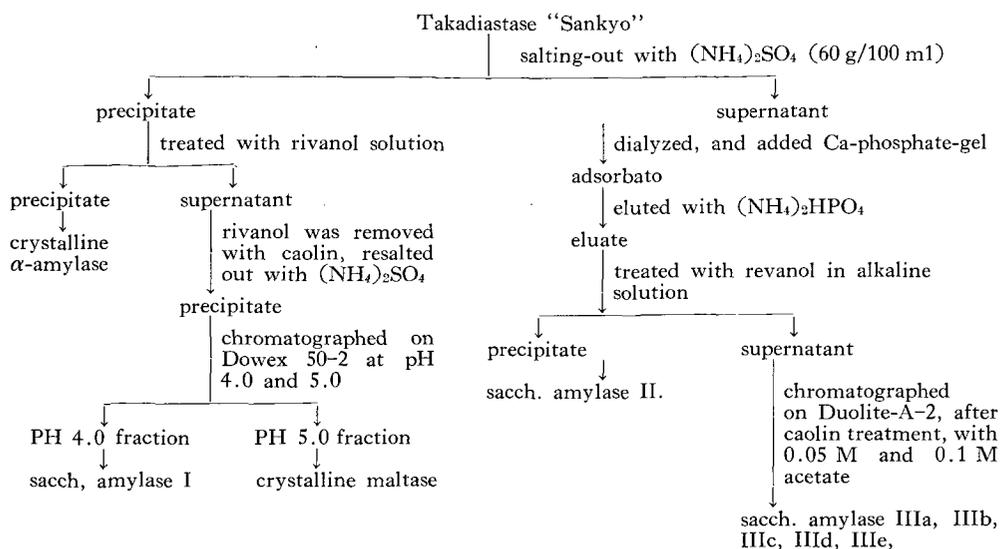
Summary

In studies on diastase system of mold, α -glucosidase has been principally investigated in this laboratory and the authors reported preparation and some properties of crystalline maltase. During the successive studies on α -glucosidase activities in mold it was found that there exists another type of α -glucosidase besides maltase, which has not only α -glucosidase activity but amylase activity. On the other hand it had been reported by many investigators that saccharogenic amylase also has maltose hydrolyzing activity and, from the difference of action on starch, at least two types of the enzyme may exist.

From such view it necessitated a fractionation study of these amylolytic enzymes as well as the comparative study of the substrate specificity of them.

The present paper describes a method of fractionation and purification of α -amylase, maltase and saccharogenic amylases, and a comparative study of saccharogenic amylase fractions.

1) Methods of fractionation and purification of α -amylase, maltase and saccharogenic amylase I, II and III were summarized in following diagram. (The names of sacch. amylase I, II and III were tentatively adopted in present study)



2) The mode of action of sacch. amylase I and II on each substrate used, soluble starch, β -limitdextrin, maltose, panose and isomaltose, was almost the same. No activity on α -phenol glucoside was observed in both enzymes. These results indicate that the both are essentially the same enzymes in the activity principle. However the mobility in paperelectrophoresis was different and sacch. amylase I. moved faster to cathode than type II.

3) Sacch. amylase III was suggested to be an another type of these groups of enzymes. The enzyme, compared with type I and II, has lower activity against β -limit dextrin and hydrolyzed α -phenol-glucoside. Toward soluble starch, panose and isomaltose this enzyme has the similar action with type I and II. As an

attempt to separate the amylase and glucosidase activities in [this fraction, chromatography on Duolite-A-2 was made and subsequently they could be fractionated in several (at least five) fractions possessing the enzyme activity. However both amylase and α -glucosidase activities accomanied in each fractions obtained. Furthermore, evidence that the activity of α -glucosidase is not due to contamination of maltase was obtained by comparing the rate of hydrolysis of starch and maltose after Ca-phosphate-gel treatment.

4) From these results of fractionation of sacch. amylase III as well as observation with type I and II it is supposed that modifications of enzyme molecule may exist among saccharogenic amylases in mold.