



Title	酸性 α -Glucosidaseに関する酵素反応速度論的研究
Author(s)	松井, 博和
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第2730号
Issue Date	1984-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32769
Type	doctoral thesis
File Information	2730.pdf



酸性 α -Glucosidase に関する
酵素反応速度論的研究

松井 博和

目 次

第1章	序論	
第1節	Amylase とその分類	1
第2節	Glucoamylase と α -Glucosidase	6
第3節	α -Glucosidase について	9
第4節	本研究の目的および概要	13
第2章	テンカイ酸性 α -Glucosidase の精製と諸性質	
第1節	緒論	16
第2節	実験材料および方法	19
第3節	実験結果および考察	22
I	精製	22
II	物理化学的性質	24
III	基質特異性	26
第4節	要約	34
第3章	トラフメ酸性 α -Glucosidase の精製と諸性質	
第1節	緒論	36
第2節	実験材料および方法	38
第3節	実験結果および考察	39
I	精製	39
II	物理化学的性質	43
III	基質特異性	44
第4節	要約	49

第4章	フタ肝臓酸性 α -Glucosidase の精製と諸性質	
第1節	緒論	51
第2節	実験材料および方法	55
第3節	実験結果および考察	57
Ⅰ	精製	57
Ⅱ	物理化学的性質	61
Ⅲ	基質特異性	62
第4節	要約	68
第5章	ウサギ筋肉酸性 α -Glucosidase の精製と諸性質	
第1節	緒論	69
第2節	実験材料および方法	70
第3節	実験結果および考察	71
Ⅰ	精製	71
Ⅱ	物理化学的性質	75
Ⅲ	基質特異性	77
第4節	要約	84
第6章	酸性 α -Glucosidase の少糖類と多糖類加水分解 部位の共通性	
第1節	緒論	86
第2節	実験材料および方法	92
第3節	実験結果および考察	93
Ⅰ	テンカイ酸性 α -glucosidase の maltose と soluble starch 加水分解部位	93

II	トラフメ 酸性 α -glucosidase の maltose と soluble starch 加水分解部位	97
III	フタ肝臓 酸性 α -glucosidase の maltose と shellfish glycogen 加水分解部位	99
IV	ウサギ 筋肉 酸性 α -glucosidase の maltose と shellfish glycogen 加水分解部位	102
V	コメ 酸性 α -glucosidase II の maltose と soluble starch 加水分解部位	106
第4節	要約	110
第7章	酸性 α -Glucosidase の 活性解離基の推定	
第1節	緒論	112
第2節	実験材料および方法	114
第3節	実験結果および考察	116
I	テンカイ 酸性 α -glucosidase の 活性解離基	116
II	トラフメ 酸性 α -glucosidase の 活性解離基	123
III	フタ肝臓 酸性 α -glucosidase の 活性解離基	126
IV	ウサギ 筋肉 酸性 α -glucosidase の 活性解離基	128
V	コメ 酸性 α -glucosidase II の 活性解離基	130
VI	フタ肝臓 および フタ血清 中性 α -glucosidase の 活性解離基	135
VII	ビール酵母 中性 α -glucosidase II の 活性解離基	137
第4節	要約	144

第8章	酸性 α -glucosidase のサブサイト構造	
第1節	緒論	146
第2節	各種酵素の速度パラメーターとサブサイト親和力 A_i および 真の水解速度定数 k_{int} の評価法	151
第3節	実験結果および考察	155
I	テンサイ 酸性 α -glucosidase のサブサイト構造	155
II	トラフメ 酸性 α -glucosidase のサブサイト構造	160
III	ブタ肝臓 酸性 α -glucosidase のサブサイト構造	162
IV	ウサギ筋肉 酸性 α -glucosidase のサブサイト構造	165
V	その他の α -glucosidase のサブサイト構造	168
第4節	要約	171
第9章	総合的考察	173

謝辞

文献

第1章 序 論

第1節 Amylaseとその分類

生体はその生命活動の維持のために、外部よりエネルギーを獲得する必要がある。独立栄養生物の緑葉植物では、光エネルギーを獲得し、従属栄養生物の動物では、“摂取”によりエネルギーを獲得している。

緑葉植物における光合成の直接の結果として葉緑体内で合成・蓄積する同化澱粉(*assimilation starch*)は、夜になって光合成が停止すると分解され、主として、*sucrose* の形で他の組織に輸送され、そこでエネルギー源として呼吸に使われたり、蛋白質や核酸などの他の成分の素材となるが、その多くは種子や根塊茎などで貯蔵澱粉(*reserve starch*)として再合成され、蓄積される。¹⁾ 貯蔵澱粉は種子の発芽時におけるエネルギー源の重要な位置を占めることと明らかにされている。²⁾

一方、ヒトをはじめとする高等動物では、主たるエネルギー源として穀類の貯蔵澱粉を摂取し、これを消化・吸収することにより生活機能も営んでいる。小腸で吸収された *glucose* は肝臓で運ばれ、その 1/3 は *hexokinase* によりリン酸化を受け *glucose-6-phosphate* となり、*glucose-1-phosphate* を経由してグリコーゲンに合成され貯蔵される³⁾ が、残りは全身循環に入り、種々の器官および臓器の細胞でエネルギー源や他の生体構成成分の素材として使われる。また骨格筋においてもグリコーゲンとして貯えられることと知られている。⁴⁾

澱粉は *glucose* が α -1,4 の直鎖状に結合した *amylose* と α -1,6

結合による分枝をもつ amylopectin の二成分よりなり、^{5,6)} 主として、高等植物に存在するが、紅藻類にも見出されており (Floridean starch), また *Neisseria*, *Clostridium butyricum*, *Acetobacter pasteurianum* の細菌類, 原生動物の *Chilomonas* などにも澱粉様ケルカンの存在が知られている。

グリコーゲン は amylopectin よりもより密に枝分かれした glucose の重合体である。⁷⁾ 動物の肝臓や骨格筋をはじめ, 心筋, 脳などの脂肪組織を含むほとんどの動物細胞に見えられ, 横隔膜, 胎盤組織, 上皮細胞にも存在する。また昆虫, 魚類, 貝類 (*Mytilus edulis*), ある種の原生虫類 (*Tetrahymena*, *Trichomonas*), カビ類 (*Dichyostelium*, *Polyporus*) および多くの細菌類 (*Mycobacteria*, *Neisseria*, *Anthrobacter*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*) などに見つかっている。植物中には "Phytoglycogen" と呼ばれる グリコーゲン様ケルカンがある。

このように, 天然に存在する澱粉やグリコーゲンの分解に関与する酵素は自然界に広く分布することから知られており, その経路は大きく2つに大別されている。⁸⁾ すなわち, 1つは phosphorylase の関与する加水分解であり, 他の1つは数種の amylase が関与する加水分解系である。本論文ではその研究目的から後者のみを問題とする。さて, 胃液や唾液が食物を消化する能力をもつこと, 酵母の抽出液がブドウ汁を発酵させる能力をもつこと, 穀物の捏ね粉からパンが作れることなどの現象は古くから知られていたが, 最初の明瞭は amylase — 酵素 — の認識と云うものは, 1833年の Payen と Persoz⁹⁾ の研究によるものである。彼らは麦芽抽出液のアルコール沈澱物が澱粉を糖に変える熱に弱い物質を

含むことを発見し、これを "diastase" と呼んだ。これは今日の *amylase* である。近年の急速な酵素学の発達により、現在では動植物や微生物などの数多くの起源から *amylase* が分離・精製され、その諸性質が調べられている。本来、*amylase* とは澱粉を加水分解する作用を営む酵素に与えられた総称である。しかし、今日では澱粉のみならずグリコーゲンやこれらの多糖類の誘導体、例えば各種のリミットデキストリンやオリゴ糖などの加水分解を行う酵素をも含めて広く呼ばれる場合が多い。

酵素が多くの起源から見出され、その作用機作が一義的に解釈されるものでなければ、分類上大きな混乱を招くことになる。1922年、¹⁰⁾ Ohlson はそれまでの *amylase* を作用の面から液化型(糊精化型)と糖化型に、その後、^{11, 12)} Kuhn は分解生成物の旋光性から α -型と β -型に二分する方法を提示した(1925)。しかし、 β -型に属する麦芽の糖化型 *amylase* が *maltose* を産するのに対し、¹³⁾ *Rhizopus* や ¹⁴⁾ *Aspergillus* のカビから分解生成物として β -glucose を生ずる糖化型酵素(現在の *glucoamylase*)が見出されるにょよんで分類法に不備が生じるとともに、哺乳動物からリミットデキストリンの $\alpha, 1, 6$ 結合を切断する酵素(1951)¹⁵⁾、アミロペクチンの枝分かれ部位の $\alpha, 1, 6$ 結合を大きく切り払う酵素(1953)¹⁶⁾ が発見されるに至り、新たな分類法が必要となった。1954年、Schubert¹⁷⁾ は澱粉のいかなる結合に作用して、どのような生成物を生ずるかによって *amylase* を次の5つに分類することを試みた。すなわち、*amylase* (1.4) *dextrinase* (α -*amylase*)、*amylase* (1.4) *maltosidase* (β -*amylase*)、*amylase* (1.4) *glucosidase*、*amylase* (1.6) *dextrinase* および *amylase* (1.6) *glucosidase* である。

Schubert の分類提示から 30 年を経た現在では, さらに多種・多様の澱粉ないしその関連物質に作用する酵素が発見され, その数は 10 数種にのぼる。現在, 最も広く使われている酵素の分類は 国際生化学連合 (I.U.B.) 酵素委員会の手によるもので, 主として酵素の機能的な面から, 換言すれば, 触媒する反応に基づいて分類・命名がなされている。基準となる書 "Enzyme Nomenclature: Recommendations (1978) of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, Academic Press (1979)" によると, 大部分の amylase は大別 3 類の加水分解酵素に含まれ, *O*-glucosyl compounds に作用することから, 3.2.1. グループに分類されている。ここで, 澱粉やグリコゲンおよびその関連物質が α -1,4 および α -1,6 結合を持つことから,

Table 1. Enzymes Hydrolyzing α -1,4- or α -1,6-Glucosidic Linkages

Enzymes Hydrolyzing α -1,4-Glucosidic Linkages	
EC 3.2.1.1	α -Amylase
EC 3.2.1.2	β -Amylase
EC 3.2.1.3	Exo-1,4- α -D-glucosidase (Glucoamylase)
EC 3.2.1.20	α -D-Glucosidase (Maltase)
EC 3.2.1.54	Cyclomaltodextrinase
EC 3.2.1.57	Isopullulanase
EC 3.2.1.60	Exo-maltotetraohydrolase
EC 3.2.1.61	Mycodextranase
EC 3.2.1.98	Exo-maltohexaohydrolase
[EC 2.4.1.19]	Cyclomaltodextrin glucanotransferase (<i>Bacillus macerans</i> amylase)
Enzymes Hydrolyzing α -1,6-Glucosidic Linkages	
EC 3.2.1.10	Oligo-1,6-glucosidase (Isomaltase)
EC 3.2.1.11	Dextranase
EC 3.2.1.33	Amylo-1,6-glucosidase
EC 3.2.1.41	Pullulanase (R-enzyme, Debranching enzyme)
EC 3.2.1.68	Isomaltase (Debranching enzyme)
EC 3.2.1.70	Exo-1,6- α -D-glucosidase (Glucodextranase)
EC 3.2.1.94	Exo-isomaltohydrolase (Isomalto-dextranase)
EC 3.2.1.95	Exo-isomaltotriohydrolase

これら両グルコシド結合を加水分解し得る酵素を2つのグループに類別すると Table 1 のようになる。すなわち、 α -1,4 結合を水解する酵素として 9 種、 α -1,6 結合を水解する酵素として 8 種、計 17 種を列挙する。しかし、*Bacillus macerans* の amylase はその特色ある転移作用を触媒することから転移酵素 (EC 2.4.1.19) に分類されているが、別名に示されるように澱粉を水解する点では amylase に入れるべきであり、一方、isopullulanase (EC 3.2.1.57) や mycodextranase (EC 3.2.1.61) のように、澱粉には全く作用を示さない酵素を amylase から除外するならば、16 種の酵素が澱粉、グリコーゲン、リミットデキストリンおよびオリゴ糖に水解作用を示すことになる。

以上のような現行の分類・命名法に關し、最新の知見をもとに検討を加えるならば、幾つかの問題が提起され得る。例えば、EC 3.2.1.1 の α -amylase は "3 個以上の glucose が α -1,4 結合した多糖の水解 (Reaction の項)", "澱粉、グリコーゲンおよび関連多糖、オリゴ糖にランダムに作用 (Comments の項)" とあるが、¹⁸⁾ 岡田と溝上、^{19,20)} 坂野らにより α -1,6 結合を弱いながらも切断することから明らかにされ、また、マルトオリゴ糖のような低分子基質に対してはランダムと言うよりむしろ規則正しく作用することがわかってきた。^{21,22)} 個々の酵素と同時に、類似の作用を示す酵素間にも問題がある。glucoamylase (EC 3.2.1.3) と α -glucosidase (EC 3.2.1.20) のように、生成物 (glucose) のアノマー型が α か β かのいずれかを反応上区別されているにもかかわらず、実際にはこれを調べることなく、単に多糖とオリゴ糖の水解速度比のみで分類する酵素においては大きな混乱が生じている。同様なことは、amylpectinase などの α -1,6 結合を水解するが、pullulan の α -1,6 結合に対してはある条件

下で切断し得るか否かで pullulanase (EC 3.2.1.41) と isoamylase (EC 3.2.1.68) に区別されている場合にも言えよう。反応機構やこれに最も密接に関連していると考えられる生成物の旋光度の測定, 詳細なる基質特異性の検討を行うことなく安易に命名されている酵素の多いこと、分類法通用の, また結果として分類上の混乱を招いている大きな原因と考えられる。

第2節 Glucoamylase と α -Glucosidase

α -glucosidase の詳述は次節に譲り, 本節では主に glucoamylase について述べ, なぜこの酵素と α -glucosidase が分類上混乱するに至ったかについて考えたい。

古くより, 糸状菌の澱粉分解酵素は α - と β - の2種の amylase と maltase (現在の α -glucosidase) からなると考えられていた。しかし, 1948年になり Corman と Langlikke⁽²³⁾ は数株のカビ培養濾液について澱粉分解後期の発酵性糖分の生成能を比較検討し, 澱粉から直接 glucose を生成し得る糖化酵素系の存在を予想した。彼らによって "glucogenic enzyme system" と名付けられた酵素(系)の検索がこれを契機に盛んとなり, 翌年, 北原と久留島⁽²⁴⁾ は Aspergillus usamii からこの作用を行う酵素の精製に成功し, これを γ -amylase と呼んだ。また, Phillips と Caldwell⁽²⁵⁾ は Rhizopus delemar から精製し gluc amylase と命名した (1951)。さらに同様の酵素は Aspergillus niger から⁽²⁴⁾ amylo-glucosidase とし (1957), α -amylglucosidase と見出された (1954)⁽²⁵⁾。また, Aspergillus awamori からは saccharogenic amylase とし報告された (1957)⁽²⁶⁾。1958年, 辻原⁽²⁷⁾ は Rhizopus delemar と

Aspergillus niger の両酵素の結晶化に成功し、 α -1,4 結合のみならず α -1,6 結合をも水解することを明らかにした。これらはいずれも今日のいわゆる glucoamylase (EC 3.2.1.3) であり、現在では多くの微生物起源から分離精製され工業的に広く利用されている。

いずれの起源の glucoamylase にも共通することは生成 glucose が β 型であり、また、多糖とオリゴ糖に対する水解速度が多糖に対して大きいことである。これに対し、 α -glucosidase の上記二基質に対する水解速度は以上この酵素を maltase と呼ばれていたように、maltase などの比較的分子量オリゴ糖に対して大きいと考えられていた。従って、生成物の旋光度とは関係なしに、多糖とオリゴ糖に対する作用上の相異のみから区別される場合が多い。Table 2 に

Table 2. Classification and Nomenclature of Glucoamylase and α -Glucosidase

Number	Recommended name	Reaction	Other names	Basis for classification (Systematic name)	Comments
3.2.1.3	Exo-1,4- α -D-glucosidase	Hydrolysis of terminal 1,4-linked α -D-glucose residues successively from non-reducing ends of the chains with release of β -D-glucose	Glucoamylase, Amyloglucosidase, γ -Amylase, Lysosomal α -glucosidase, Acid maltase	1,4- α -D-Glucan glucohydrolase	Most forms of the enzyme are able also rapidly to hydrolyse 1,6- α -D-glucosidic bonds when the next bond in sequence is 1,4, and some preparations of this enzyme hydrolyse 1,6- and 1,3- α -D-glucosidic bonds in other polysaccharides. This entry covers all such enzymes acting on polysaccharides more rapidly than on oligosaccharides.
3.2.1.20	α -D-Glucosidase	Hydrolysis of terminal, non-reducing 1,4-linked α -D-glucose residues with release of α -glucose	Maltase, Glucoinvertase, Glucosidosucrase	α -D-Glucoside glucohydrolase	This single entry covers a group of enzymes whose specificity is directed mainly towards the exohydrolysis of 1,4- α -glucosidic linkages, and that hydrolyse oligosaccharides rapidly, relative to polysaccharides, which are hydrolysed relatively slowly, or not at all.

From "Enzyme Nomenclature (1978)".

示したように "Enzyme Nomenclature" では両者を区別している。すなわち、両者とも澱粉などの多糖やオリゴ糖の非還元末端に作用するが、glucoamylase は β -glucase を、 α -glucosidase は α -glucose を生ずると及此上区別している。同時に "Comments" 欄には glucoamylase はオリゴ糖よりも多糖に、 α -glucosidase はオリゴ糖に良く作用すると書かれている。ここで、生成物のアノマー型とオリゴ糖および多糖に対する水解速度比の両結果が完全に対応するならば、何ら問題は生じ得ないが、もしそれらが対応しない場合には誤った結論を引き出される危険性がある。特に、アノマー型を検討することなく、単に水解速度比のみで判断される場合である。例えば、オリゴ糖と多糖と言った調査する基質の種類やその濃度などの及ぶ諸条件によって必ずしも同一の結論を与えるとは限らず、場合によっては速度の大小関係が逆転する可能性が考えられるからである。

Fig. 1 のような基質濃度依存性を示す α -glucosidase では、濃度 a を境として maltose と soluble starch に対する速度が逆転する。1977年、著者ら²⁸⁾

がこの種の酵素を初めて単離し、従来行われてきた各基質の一定濃度における水解速度比のみに基づいて特異性を判断することの不適切さを指摘したことにより、この問題はあらためて認識されるようになった。

さらに他の問題は従来より指摘されてきたことであるが、EC 3.

2.1.3 酵素の別名として glucoamylase と同時に amyloglucosidase,

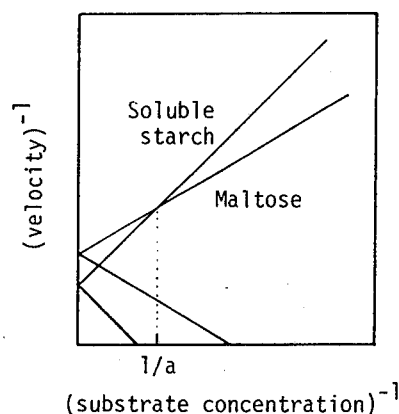


Fig. 1. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolyses of Maltose and Soluble Starch by α -Glucosidase.

α -amylase, lysosomal α -glucosidase および acid maltase が列記されている点にある。前二者は glucoamylase の歴史上の経緯から良いて、本来哺乳動物起源の α -glucosidase を指す lysosomal α -glucosidase と acid maltase の二別名は glucoamylase と α -glucosidase の両酵素間の分類上の混在を助長させるものと思われる。これらの別名が挙げられているのは、おそらく哺乳動物起源 α -glucosidase が maltase などのオリゴ糖のみならずグリコーゲンをも水解し、両者に対する作用活性部位が異なると報告されている^(29,31) ことによる。右から知られているように、 α -glucosidase は広い基質特異性を示すので、慎重に反応条件を設定し、詳細に作用の特異性を評価しなければならない。

前節で述べたように amylase に対する明確な分類は現在でも非常に困難である。幾つかの酵素で、あるいは酵素間の分類上混在が注されているのが現状であるが、少なくとも glucoamylase と α -glucosidase の両者を明瞭に区別できるよう、多くの起源の α -glucosidase の諸性質を調べることは学術上はもちろん、工業的応用の上でも大いに意義あるものと考えられる。

第3節 α -Glucosidase について

α -glucosidase は α -, β -amylase による澱粉分解物のオリゴ糖を加水分解することから澱粉の glucose への代謝系において重要な位置を占めるものといわれ、いわゆる amylase (総称) のカテゴリーに属する酵素として取扱われている。このような理由から、前二節では amylase およびその分類について概観し、glucoamylase との分類上の混在について述べてきた。本節では、 α -gluco-

sidase の紹介を目的として、これまでの研究について、特にその副産、特異性に着目して本酵素を概説する。

α -D-glucosidase (推奨名) はマルトオリゴ糖のような "holoside" の基質や, sucrose, alkyl および aryl α -glucoside のような "heteroside" の基質に作用して、その α -グリコシド結合を加水分解する酵素であり、通常 α -glucosidase と呼ばれている。また、本酵素は水解作用のみならず糖転移作用を示すことも知られている。³²⁻³⁵⁾

1847年、Dubrunfaut³⁶⁾ は麦芽を澱粉に作用させ、それまで未知であった糖を発見し "le glucose de malt" と名付けた。その後、この糖は O'Sullivan³⁷⁾ によって再確認され maltose と命名された (1872)、この呼称は現在にまで至っている。maltose の glucose への酵素的分解の最初の報告は 1880年の Brown と Heron³⁸⁾ によるものであった。彼らはブタ膵臓の抽出液およびブタの乾燥・断片小腸壁のいすれもから、澱粉の diastase 分解産物である maltose を分解して glucose にする作用をもつことを認め、また、彼らと全く独立に Mening³⁹⁾ も唾液と麦芽 diastase による maltose の分解するところを観察した (1881)。その後、*Aspergillus niger* (1883)⁴⁰⁾ や *Aspergillus oryzae* (1890)⁴¹⁾ とも同様な酵素の存在が報告された。1891年、Géduld⁴²⁾ は maltose 分解酵素の単離を初めて試み、多くの穀類からアルコール沈澱を繰返すことにより部分精製酵素標品を得、これを "glucose" と呼んだ。さらに、Fisher^{43, 44)} はビール酵母から同種の酵素を見出し、これを maltose だけでなく methyl α -glucoside にも作用するところを認め、酵母 invertase とは明らかにその作用が異なることから、これを "酵母 maltase" と呼ぶことにした (1895)⁴⁵⁾。ここに酵素の基質特

異性の概念が生まれたのである。細菌やカビ、酵母などの微生物のほか多くの動植物中からも単離・精製が試みられるようになった⁴⁶⁾が、これらの一部にはその後発見された glucoamylase を含めるものと思われる。

maltase のほか methyl α -glucoside, phenyl α -glucoside, methyl α -maltoside および phenyl α -maltoside とも水解する能力を有することから明らかに、酵素の起源により多種・多様の特異性を示すことから、1925年、Leibowitz⁴⁷⁾ は特異性に基つて類別法を提案した。これによると、 α -glucosidase は酵母と小腸の酵素のように、maltase と全々の α -glucoside を切断する "glucoside-maltase" と、カビや麦芽 maltase のように maltase おみも切断する "gluco-maltase" の2つのグループに区別されている。後者のように、研究の当初においては maltase に特異的に作用し、これを二分子の glucose に加水分解するいわゆる "真の maltase" が存在するものと考えられていた。しかし、1956~58年、Miller ら⁴⁸⁻⁵⁰⁾ はウシの血清から、Liberman と Eto⁵¹⁾ はウマの血清から α -glucosidase を精製し、グリコゲンなどの多糖をも水解することを確認した。次いで、Candida 属酵母⁵²⁾ や多くの植物種子⁵³⁻⁵⁵⁾ 起源酵素が同様に多糖水解能をも有することから明らかに、現在では maltase のみに作用する maltase の存在は否定されている。

1973年、千葉ら⁵⁶⁾ は α -glucosidase を次の3つのグループに類別することを提唱した。すなわち、

type-1) 真の α -glucosidase ; Saccharomyces, Micrococcus
起源の酵素、小腸酵素の一部で、maltase よりも phenyl
および p-nitrophenyl α -glucoside に高い水解作用を示す。

type-2) いわゆる maltase ; ある種のカビ起源酵素で maltase

(その他のマルトオリゴ糖をも含むと考えられる) によく作用し、
phenyl α -glucoside などに対する作用は弱い。

type-3) 多糖水解作用を示す α -glucosidase ; 哺乳動物組織、
植物種子、*Mucor* 属および *Candida* 属の酵素で、低分子
基質に対する水解能力は type-2 に類し、さらに澱粉
やグリコ-アマンなどの多糖にも水解作用を示す。

である。 α -glucosidase が多様であることはこれまで述べてきたように歴史
的にも明らかであり、古くから知られたことである⁵⁷⁾ ため、ここに一つの整理を
みた。辻原⁵⁸⁾ も α -glucosidase の類別を試みているため、内容的には
上記とほぼ同様であり、千葉らによる分類・整理の追証と見做すこ
とができる。

type-3 の酵素が多くの起源より見出されたことにより、glucoamylase
との区別が不明瞭になったことは事実である。⁵⁹⁾ 著者ら^{60,61)} がこれまで
type-3 の酵素をはじめ、多くの α -glucosidase について遊離する glucose の
アノマー型を調査したところ、全が α 型であった。glucoamylase に
よる β 型とは明確に異なることから、アノマー分析による両酵素の区別が
最も信頼性があり、また、"Enzyme Nomenclature" (Table 2 参照)
でもこれを第1のものとして区別するように定義されているものと考えられる。
しかし、第2節で論じたように、アノマー型とオリゴ糖・多糖の水解速度
比の結果が対応するかの如く書かれていること、さらに、 α -glucosidase
の特徴ある広い特異性を考慮するならば、多くのオリゴ糖や多糖に対
する作用を詳細に調べ、この点から両酵素を区別する方策を見出し、
基準となるものを考える必要がある。

第4節 本研究の目的および概要

多糖水解能を有す α -glucosidase かつ、その作用の面で glucoamylase と類似していること、³⁶⁾ 又、この哺乳動物起源酵素で、オリゴ糖と多糖が異なる部位で水解されることを報告されていることかつ、両酵素混同の原因となっている。しかし、従来のようなある条件下のみでの作用特異性の評価は既述したように、妥当性に欠く方法であり、また、活性部位に関する議論は部分精製酵素標品を用いたものもあり、そのまま受け入れられる結論とは言えない。本論文では、type-3 フループの動植物を起源とする酸性 α -glucosidase について、その基質特異性および速度論に基づき方法で数量的に評価し、maltose などのオリゴ糖と澱粉やグリコーゲンなどの多糖水解部位が同一であるのか、あるいは全く別個であるのかも真に精製された標品を用いて詳細に検討することを目的とした。

植物起源酵素としては、従来の α -glucosidase と比較して高い多糖水解作用を示すテンサイ酸性 α -glucosidase、比較的その作用が低いトラメ酸性 α -glucosidase を分離、精製した。活性部位の問題に関しては哺乳動物起源酵素のみならず植物の酸性 α -glucosidase についても検討が必要であろう。哺乳動物起源の酵素としては、材料入手の容易なマウ肝臓とウサギ筋肉より精製し、使用した。特に、後者の酸性 α -glucosidase は精製が困難とされ、これは部分精製標品でのみ活性部位の検討がなされていること³⁶⁾ かつ、本論文で研究材料とした大きな理由でもある。これら4種の酵素はいずれも pH4~5 で作用最適を示し、中性付近で高い活性を示す酵素(中性 α -glucosidase)との区別のため、酸性 α -glucosidase と呼ばれている。

目的とする酵素をある起源(材料)から取り出し、その性質や特異性を調べるに当ってはこれを単一に精製しなければならない。もし、僅かとも他の酵素が混在すると、間違った結論を導き出す危険性がある。近年の精巧な装置や精妙な技術により酵素精製は比較的容易にはなったが、しかし、現在でも酵素研究において最も労力と時間の要するところである。第2章から第5章までは4種の酸性 α -glucosidase の精製法、一般的物理化学的性質 および基質特異性について記述した。各酵素の分子量、作用至適 pH、pH および温度に対する安定性を調べ、また、いずれの酵素も マルトオリゴ糖や合成基質などの低分子基質のみならず、高分子の澱粉やグリコーゲンなどの多糖類にも作用し得ることを確認し、それらに対する作用を数量的に明らかにした。

第6章においてはオリゴ糖と多糖の加水分解部位について、混合基質系 (maltose と soluble starch, あるいは maltose と shellfish glycogen) を用いた速度論的方法による解析法、2種の基質水解作用におよぼす陽イオンおよび阻害剤の影響についての結果を示した。この章では上記4種の酵素のほかに、コメ酸性 α -glucosidase II についても検討を加えた。

いずれの酵素もオリゴ糖と多糖の水解部位は同一であると判断された。

第7章では酸性 α -glucosidase の触媒機構を解明する糸口として、また、酵素の作用機構からオリゴ糖と多糖の水解部位の同一性を確認することを目的として、各酵素の活性解離基の推定を行った。幾つかの速度論的方法 および化学修飾法により、テンカイ、トラマメ、アタ肝臓、ウサギ筋肉およびコメ(II)の全7の酸性 α -glucosidase でカルボキシル基(活性型 $-COO^-$ と $-COOH$) が必須解離基であることが判明

した。この結果は基質がオリゴ糖であっても、多糖であっても同じであることから、酵素の触媒機構から両基質も同一部位を水解することを確認された。酸性 α -glucosidase との比較のために、3種の中性 α -glucosidase についても同様な方法で活性解離基を同定したところ、ブタ肝臓、ブタ血清およびビール酵母(Ⅱ)のいずれの酵素もカルボキシル基 ($-\text{COO}^-$) と ヒスタジンのイミダゾール基 (Imidazole) が活性に必須であることが判かり、酸性 α -glucosidase と 中性 α -glucosidase の二者で差異が認められた。

第8章においては maltose からより高重合度の一連のマルトオリゴ糖、および多糖にまで水解作用を示す酸性 α -glucosidase の活性部位構造をサフサイト理論を用いて解析し、その結果を記述した。すなわち、テンサイ、トウモロコシ、ブタ肝臓およびウサギ筋肉の各酸性 α -glucosidase のマルトオリゴ糖に関する速度パラメーター (K_m , k_o および k_o/K_m) を用いて、各サフサイトの glucose 残基に対する親和力と水解の速度定数を算出した。これらを用いて得られる速度パラメーターの理論値は実験誤差範囲内で実測値と一致した。従って、いずれの酵素も活性部位はサフサイト構造をとるものと判断した。さらに、このような酸性 α -glucosidase のサフサイト親和力を、他の幾つかの α -glucosidase および glucoamylase のサフサイト親和力とヒストグラムで比較検討した。

以上の第8章までに得られた知見を総合的に考察し、これを終章(第9章)とした。

第2章 テンサイ酸性 α -Glucosidase の 精製と諸性質

第1節 緒論

α -glucosidase は動物、植物 および 微生物 にわたって広く存在することから知られている。このうち、植物起源 α -glucosidase に関しては、Mering⁶⁹⁾ が麦芽 diastase 標品に maltose を分解する作用のあることを観察して以来、1950年頃までは トウモロコシ^{67, 63)}、コムギ⁶³⁾、ライムギ⁶³⁾、オオムギ⁶³⁾、カラスムギ⁶³⁾、ソバ⁶³⁾、キビ⁶³⁾、タイズ⁶⁴⁾、エンドウ⁶⁴⁾、コメ⁶⁵⁾ および ウリ科の植物 (*Cucurbitaceae*)⁶⁴⁾ の各発芽種子や タマネギ⁶⁶⁾、西洋ネギ⁶⁶⁾、タデ科の多年草 キシキシ⁶⁶⁾、サトウキビ⁶⁷⁾、クロカラシ⁶⁸⁾、ジャガイモ⁶⁹⁾、タリヤ⁶⁹⁾、テンサイ⁶⁹⁾、ハンニシバタ⁶⁹⁾、タバコ⁷⁰⁾、ホップ⁷¹⁾ および シラカバ⁷²⁾ などの葉にその存在が知られたが、いずれも maltase の存在を認めたにすぎず、それ以上の言及はほとんどなされていない。

1958年、Duncan と Manners⁷³⁾ は海藻に maltose から マルトオリゴ糖を合成する酵素の存在を認め、また、1960年には Nigam と Gini⁷⁴⁾ が発芽ヨウトウを海砂とともに磨砕し、抽出液を透析後 エタノール分画で得られた粗酵素を maltase に作用させ、glucose 以外に maltotriose, maltotetraose などの糖転移産物から生じることを認め、ネズミ肝臓⁷⁵⁾ と同様の transglucosidase が植物にも存在することを示した。

B.B. Jørgensen と O.B. Jørgensen⁷⁶⁾ は1963年に isomaltose 分解酵素として、乾燥麦芽から pH 8.5 抽出、酸処理 (pH 5.5)、硫酸分画、酸処理 (pH 5.1) および セントライト吸着法により α -glucosidase

(isomaltase として) を抽出液より 5.9 倍に精製した。 後になり、 α -および β -amylase を含まないこの標品は, maltase や panase も水解すること⁷⁸⁾ が明らかにされた。 また, Manners ら⁷⁹⁻⁸¹⁾ はアルファルファ抽出液から maltase や nigerose, isomaltase, kojibiose などの種々のケルコニ糖類を水解すること, アルファルファ以外にトマト(果実), ニンジン(根)など11種。植物抽出液から高い nigerose 水解活性を示すことなどを明らかにし, 植物 α -glucosidase が広い基質特異性を示すこと⁸²⁾ が次第に認められるようになった。

植物起源 α -glucosidase として初めて高純度に精製されたのは, 高橋と下村⁵⁴⁾ によるソバの α -glucosidase である。 ソバ未発芽種子抽出液より CM-cellulose 処理, 硫酸分画, リン酸カルシウムゲル処理, リン酸カルシウムと CM-Sephadex の各クロマトグラフィーにより, 超遠心的に単一に精製した(1968)。 その後, 現在までに コメ(1971)⁵⁵⁾, フリントコーン(1975)⁸⁵⁾, リヨクトウモヤシ(1979)⁸³⁾, スウィートコーン(1981)⁸⁴⁾ から超遠心的にあるいはディスク電気泳動的に単一の酵素標品が得られている。 これら精製酵素の maltose 水解における作用至適 pH は ソバ(5.0), コメ(I, 4.0; II, 4.0), フリントコーン(3.6), リヨクトウモヤシ(I, 5.0; II-1, 5.0; II-2, 5.0), スウィートコーン(3.6)で, いずれも哺乳動物起源の酸性 α -glucosidase とほぼ同じ至適 pH を示す。 最近になり, glycosidase の1種 β -fructofuranosidase では pH 4.5 のほか, pH 8.0 に作用至適を示すものがテンサイ主根で見つかり⁸⁵⁾ また, วัリ科植物で至適 pH 5.5 の α -galactosidase が発見されたこと⁸⁶⁾ α -glucosidase でもテンサイ発芽種子中に中性付近に至適 pH を持つ酵素の存在の可能

性があること、⁸⁷⁾ などの理由から上記精製酵素のように、酸性側に作用至適を示すものは動物起源酵素と同様に、酸性 α -glucosidase と呼ぶことが望ましい。

精製酵素の特異性は maltose, kojibiose, nigerose, isomaltase などのグルコシ糖類, maltotriose や maltohexaose などの種々の重合度の マルトオリゴ糖, phenyl α -glucoside や phenyl α -maltoside などの合成基質, soluble starch や glycogen などの多糖を用いて調べられている。幾つかの精製酵素ではこれらの基質に対する速度パラメーター (K_m , V など) が算出されているが、ある一定の濃度における水解比のみで特異性を論じているものも少なくない。例えば、maltase に対する soluble starch の水解速度は コメ(I)で 20.6% (0.17% 基質濃度)、⁵⁵⁾ コメ(II)で 11.0% (0.17%)、⁵⁵⁾ リヨクトウモヤシ(I)で 16.4% (0.2%)、⁸³⁾ リヨクトウモヤシ(II-1)で 12.9% (0.2%)、⁸³⁾ リヨクトウモヤシ(II-2)で 15.2% (0.2%) と報告されている。このような表示は微生物や動物起源の多くの酵素についてもみられるが、基質に対する濃度依存性がそれぞれの基質や酵素で異なる (すなわち K_m , V が異なる) ことから、互いの基質濃度を変えると全く違う値を与え、場合によってはその大小関係が逆転する (Fig. 7 参照)。すなわち、多くの α -glucosidase のように Michaelis-Menten 型の反応⁸³⁾ に従う酵素においては、その初速度 v は次の式で決定される。

$$v = \frac{V \cdot A}{K_m + A} \quad (\text{式-1})$$

ここで V は最大速度を、 K_m は Michaelis 定数を、 A は基質濃度を表わす。従って、基質 A , B の初速度はそれぞれに関する K_m および V と $K_m A$,

K_{mB} , および V_A, V_B で表わすと, $v_A = V_A \cdot A / (K_{mA} + A)$, $v_B = V_B \cdot A / (K_{mB} + A)$ となり, 両者の基質濃度 A の速度比は,

$$v_A : v_B = V_A / (K_{mA} + A) : V_B / (K_{mB} + A) \quad (\text{式-2})$$

となる。基質濃度が両基質に対する K_m よりも十分高い場合, すなわち $A \gg K_{mA}, K_{mB}$ の条件を満足させる時には, その速度比は V だけの比に近似し, 一方, 基質濃度が両者に対する K_m よりも十分低い場合, すなわち $A \ll K_{mA}, K_{mB}$ の条件を満足させる時には, 速度比は V/K_m だけの比に近似する。これらの中間の濃度においては, V と V/K_m それぞれの比の間の値を示すことになる。このように, 一定濃度による実験結果から特異性を論じるのではなく, 各基質に対する K_m, V の速度パラメーターを用いて, 作用特異性を評価することから望ましいと考えられる。さらに, 分子量既知の酵素においては V から k_0 (分子活性 *molecular activity*) を導く ($V/e_0 = k_0$) ことにより, 分子1個当りの触媒し得る最大基質分子数を評価でき, 反応効率を他起源酵素と比較することが可能となる。

本章ではテンカイ未発種子より酸性 α -glucosidase を超遠心的およびディスク電気泳動的に単一に精製し, その一般的諸性質と基質特異性を調べることを目的とした。これまでに例のない, 高い多糖水解活性を持つ酵素であることを明らかにした。

第2節 実験材料および方法

1. 供試種子 テンカイ (*Beta vulgaris* L., c.v. Tenken No.1)
種子は北海道農業試験場より恵与された。使用時には低温

(7°C) で貯蔵した。

2. 試薬 *maltase*, *soluble starch*, *phenyl α -glucoside*, *turanose*, *shellfish glycogen*, *amylose*, *amylopectin*, トウモロコシおよびコムギ生澱粉(半井化学), *sucrose*, *methyl α -glucoside*, *p-nitrophenyl α -glucoside*, *phenyl α -maltoside*, Tris (和光純薬), *maltodextrin* G_3 および G_7 (一般に G_n は マルトオリゴ糖の glucose 重合度 n であることを示す), *pullulan* (林原生化学工業) は全々市販品である。不純物除去のため, *maltase* は再結晶を繰り返してから, *soluble starch* は十分水洗った後に使用した。 *panose* は帯広畜産大学菅原四郎教授より恵与された。 *Kojibiose* と *nigerose* は ソバ酸性 α -glucosidase の糖転移作用を利用して *maltose* より調製した。⁸⁹⁾ マルトオリゴ糖は麦芽 *amylase* の *amylose* 部分水解物より調製した。⁹⁰⁾ イソマルトオリゴ糖は *dextran* の 酸部分水解物より単離調製した。⁹¹⁾ β -1,6-デキストリンは Meyer らの方法⁹²⁾ に従い, 大麦 β -*amylase* を *corn* の *amylopectin* に作用させて調製した。

3. 酵素活性測定法 酵素活性は 0.5% *maltose* 0.8 ml, 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 0.8 ml, 酵素液 0.4 ml からなる混合液を 37°C で 10~30 分間反応せしめ, 遊離する glucose を市販の *Glucostat* (Worthington Biochemical) を用いた Tris-glucose oxidase-peroxidase 法^{93,94)} により, *maltose* のかわりに 0.5% *soluble starch* を基質とした場合には 小林と田淵⁹⁵⁾ による *Somogyi*⁹⁶⁾ の改良法により還元力の増加から測り定し求めた。 酵素 1 単位は 1 分間に 1 μ mol の *maltose* を加水分解する酵素量と定義した。

4. フェノールの定量 phenyl α -maltoside より遊離するフェノールは Robertson & Halvorson の 2,6-dibromoguinone-chloroimide 法⁹⁷⁾に準じて測定した。

5. 蛋白質の定量 精製酵素について得られた $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ at 280 nm = 13.6 の関係式を用いて、分光学的に測定した。

6. 超遠心分析 Spinco Model E 型超遠心分析機を用いて、0.1 M NaCl を含む 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 4.1) 中、58,100 rpm を行った。

7. ディスク電気泳動 ホリアクリルアミド電気泳動は Reisfeld らの方法⁹⁸⁾に準じて行った。7.5% ホリアクリルアミドを用い、 β -alanine-酢酸緩衝液系 (pH 4.5) で、カラム (0.5 x 7 cm) 1 本当り 3 mA の定電流、約 120 分を行った。蛋白質は 1% Amido Black 10B を染色後、7% 酢酸中で脱色、ゲルを保存した。

SDS-ホリアクリルアミドゲル電気泳動は Weber & Osborn の方法⁹⁹⁾に準拠した。0.1% SDS-7.5% ホリアクリルアミドを用い、0.1% SDS-0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) で、8 mA / tube (0.5 x 10 cm) の定電流、約 5 時間を行った。蛋白質は Coomassie Brilliant Blue R-250 を染色した。

8. 非還元末端残基の測定 檜作らの方法^{100, 101)}に従って Smith 分解¹⁰²⁾を行い、酸加水分解後、非還元末端に生ずる glycerol を測定して、末端残基のモル濃度を決定した。6 種の多糖各 1% (10 mg/ml) 濃度における非還元末端 glucose (M.W., 162 とする) の濃度は以下の通りであった。soluble starch (7.42 mM), amylopectin (2.13 mM), β -limit dextrin (7.35 mM), shellfish

glycogen (6.00 mm), oyster glycogen (5.61 mm), rabbit liver glycogen (6.05 mm)。非還元末端1残基当りの平均鎖長は soluble starch で 43.5, amylopectin で 29.0, β -limit dextrin で 8.4, shellfish glycogen で 10.3, oyster glycogen で 11.0, rabbit liver glycogen で 10.2 と算出された。

第3節 実験結果 および 考察

I. 精製

1. 抽出 粉碎テンサイ種子 2 Kg を 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 8L 中で、5時間、室温で攪拌した。Celite 535 を通して減圧濾過し、5.6L の濾液を得た (粗抽出液)。

2. 硫酸分画 固形硫酸 3.7 Kg を粗抽出液に添加し、90%飽和とした。生じた沈澱を遠心分離により集め、これを水で溶解し、0.01M 酢酸緩衝液 (pH 4.1) に対して一晩透析した。酸不溶物を遠心分離により除去し、上清は 0.05M NaCl を含む 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 5.4) に対して、24時間透析した。

3. CM-cellulose カラムクロマトグラフィー 上記透析物を同緩衝液で平衡した CM-cellulose カラム (5.2 × 50 cm) に通し、NaCl の濃度勾配法により吸着蛋白質を溶出した。Fig. 2 に示したように、大部分の蛋白質は非吸着部に認められ、目的とする酵素は NaCl 濃度勾配の初期に溶出した。活性画分 Fr. No. 165 ~ No. 179 をアミコンを用いて、8ml まで濃縮した。

4. Bio-Gel P-150 カラムクロマトグラフィー 濃縮酵素液を

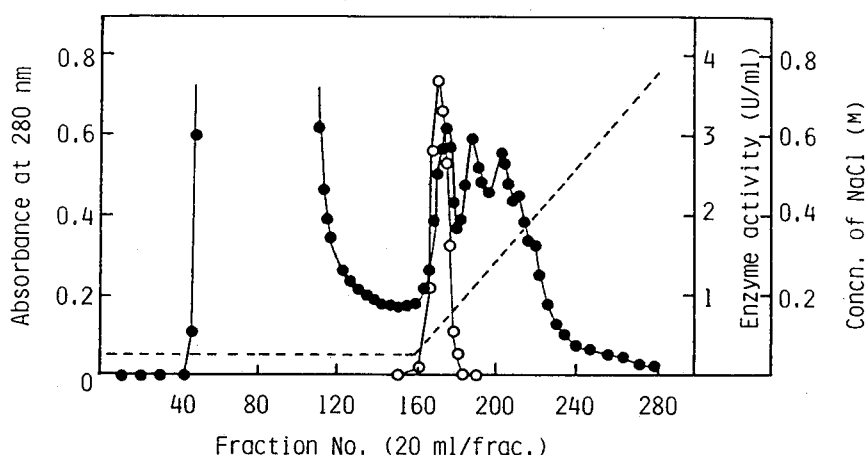


Fig. 2. Chromatography of Sugar Beet Acid α -Glucosidase on CM-cellulose Column. Enzyme soln., 700 ml; column size, 5.2 x 50 cm; equilibration and elution, with 0.01M sodium acetate buffer (pH 5.4) containing 0.05M NaCl and with the same buffer under a linear gradient of NaCl, respectively; flow rate, 150 ml/hr. —●—, absorbance at 280 nm; —○—, maltase activity; ----, concentration of NaCl.

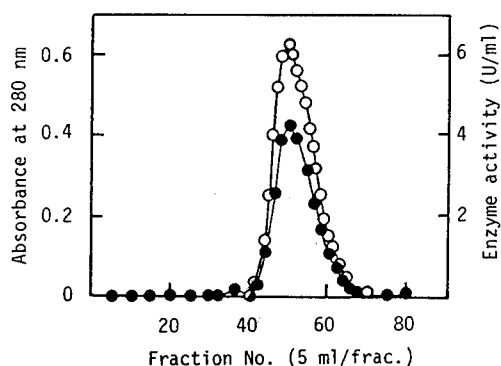


Fig. 3. Gel Filtration of Sugar Beet Acid α -Glucosidase on Bio-Gel P-150 Column (2nd). Enzyme soln., 5 ml; column size, 3.2 x 70 cm; equilibration and elution, with 0.05M sodium acetate buffer; flow rate, 30 ml/hr. —●—, absorbance at 280 nm; —○—, enzyme activity.

予め 0.05M 酢酸緩衝液 (pH 4.1) に平衡
化した Bio-Gel P-150 カラム (3.2 x 70 cm)
に通した。酵素の均一化には本
操作を又度必要とした。Fig. 3 に
又度目のゲル濾過の溶出パターンを
示した。活性画分の Fraction
No. 47 ~ No. 67 を最終精製標品とした。

Table 3. Summary of Purification Procedure for Sugar Beet Acid α -Glucosidase

Procedure	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (-fold)	Recovery (%)
Crude extract	108,000 ^{a)}	1,200	0.011	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ (90% satn.)	8,300 ^{a)}	740	0.089	8.1	61.7
CM-cellulose	101	620	6.1	555	51.7
Bio-Gel P-150 (1st)	25	410	16	1455	34.2
Bio-Gel P-150 (2nd)	18	360	20	1818	30.0

a) These values were calculated with the assumption that $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ at 280 nm was 10, and the others were calculated on the basis of the result that $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ at 280 nm was 13.6.

各精製段階
における全蛋
白量、全活性
および比活性
を Table 3 に
示した。
本酵素は

粗抽出液より 1818 倍に、30% の収率で精製された。

5. 精製酵素の純度

精製酵素を 0.1M NaCl - 0.05M 酢酸緩

衝液 (pH 4.1) に透析

した後、56,100 rpm

で超遠心分析したと

ころ、蛋白濃度 1.1,

0.87, 0.62, 0.47%

のいずれの試料も単

一ピークを示し、均一に精製されたことが明

らかとなった。Fig. 4 にその一例を示す。

各蛋白濃度でのピークの移動から、Schachman¹⁰³⁾

および Svedberg & Pederson¹⁰⁴⁾ の方法に基づ

き沈降定数 ($S_{20,w}$) を求めたところ 5.9S で

あった。

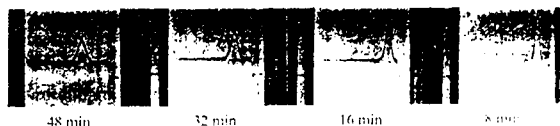


Fig. 4. Sedimentation Pattern of Sugar Beet Acid α -Glucosidase. Protein concentration was 0.87% in 0.05M sodium acetate buffer (pH 4.1) containing 0.1M NaCl. Photographs were taken at indicated time after reaching 56,100 rpm. Temperature was 20°C.

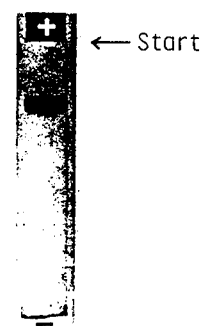


Fig. 5. Polyacrylamide Disc Gel Electrophoresis of Purified Sugar Beet Acid α -Glucosidase.

Fig. 5 に示したように、本酵素の均一性はディスク電気泳動法によっても認められた。さらに、SDS-電気泳動法でも単一であることが確認された。

II. 物理化学的性質

1. 分子量

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法⁹⁹⁾により測定し

た。標準蛋白値として γ -globulin (M.W., 160,000), bovine serum albumin (M.W., 68,000), ovalbumin (M.W., 47,000), chymotrypsinogen (M.W., 25,000) および cytochrome c (M.W., 12,000) の 5 種類を用いた。Fig. 6 から、

テンサイ 酸性 α -glucosidase
の分子量は 91,000 と算出さ
れた。 また, ゲル濾過法
における溶出位置との比較
から, 本酵素は常に単量体
で存在すると推定した。

2. 至適 pH および pH 安定性 maltase

および soluble starch の

加水分解におよぼす pH の影響を調べた。 Fig. 7 に示したように, いず
れも基質とした場合にも 至適 pH は 4.5 付近であった (α -glucosidase 酵
素の多糖水解活性を

通常 glucoamylase
活性と呼ぶ)。

酵素溶液を予め

各種の pH で, 7°C, 20

時間放置後, mal-

tose と soluble sta-

rch の水解における

残存活性を測定して,

pH に対する安定性を

調べた。 その結果, 本酵素は pH 3.0~8.0 の範囲で安定であることが認

められた。

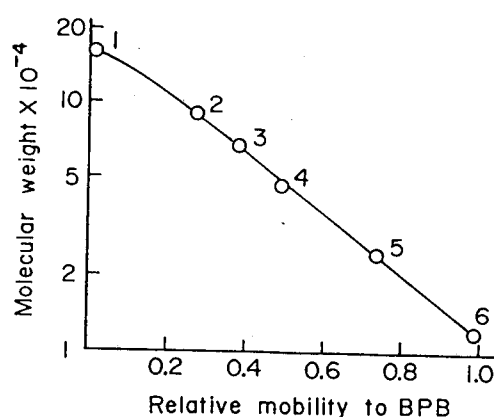


Fig. 6. Estimation of Molecular Weight of Sugar Beet Acid α -Glucosidase by SDS-Gel Electrophoresis. 1, γ -globulin (M.W., 16×10^4); 2, sugar beet acid α -glucosidase; 3, BSA (M.W., 6.8×10^4); 4, ovalbumin (M.W., 4.7×10^4); 5, chymotrypsinogen (M.W., 2.5×10^4); 6, cytochrome c (1.2×10^4).

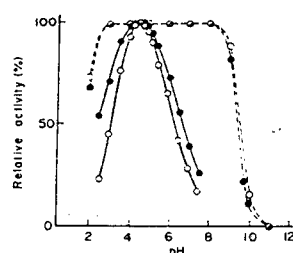


Fig. 7. pH-activity and -stability Curves of Sugar Beet α -Glucosidase.

pH-activity curve: reaction mixture of 0.8 ml of 0.5% substrate solution (maltose or soluble starch), 0.8 ml of 0.1 M McIlvaine buffer and 0.4 ml of enzyme solution (0.026 unit) was incubated at various pH for 10 min at 37°C.

pH-stability curve: after mixture of 0.1 ml of enzyme solution (0.022 unit) and 0.4 ml of Britton-Robinson buffer¹⁹⁾ at various pH consisting of phosphoric acid, acetic acid, boric acid and sodium hydroxide was kept at 7°C for 20 hr, 1 ml of 0.5% substrate solution and 1 ml of 0.5 M sodium acetate buffer (pH 4.5) were added, and the reaction mixture was incubated at 37°C for 10 min.

○—○, maltase activity; ●—●, glucoamylase activity.

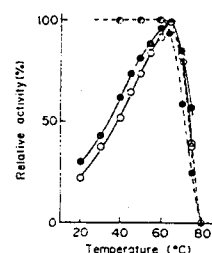


Fig. 8. Temperature-activity and -stability Curves of Sugar Beet α -Glucosidase.

Temperature activity curve: reaction mixture of 0.8 ml of 0.5% substrate solution (maltose or soluble starch), 0.8 ml of 0.1 M acetate buffer (pH 4.5) and 0.4 ml of enzyme solution (0.012 unit) was incubated at various temperature for 10 min. ○—○, maltase activity; ●—●, glucoamylase activity.

Temperature-stability curve: after mixture of 0.4 ml of enzyme solution (0.022 unit) and 0.8 ml of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.5) was kept at various degree of temperature for 10 min, 0.8 ml of 0.5% substrate solution was added and the reaction mixture was incubated at 37°C for 10 min.

○—○, maltase activity; ●—●, glucoamylase activity.

3. 最適温度および熱安定性 各種の温度で *maltose* および *soluble starch* に対する水解の初速度を調べたところ、両反応ともに 65°C で作用最大を示した。

酵素溶液を10分間、各種の温度を保持後、その *maltose* および *soluble starch* の水解における残存活性を測定した。Fig. 8 より理解されるように、 65°C までは安定であったが、それ以上の温度では急激な活性の損失が認められた。

III. 基質特異性

1. *maltose* と *soluble starch* に対する作用 前項から理解されるように、本酵素は *maltose* みならず多糖の *soluble starch* を加水分解する。そこで、両者に対する作用力を基質濃度一定の条件下で調べた。Fig. 9 は両基質水解における経時変化を示したものである。本条件においては、*soluble starch* 水解活性の方が反応初期(1時間以内)では高かった。

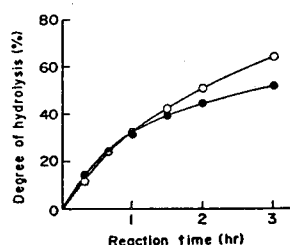


FIG. 9. Time Courses of Hydrolyses of Maltose and Soluble Starch by Sugar Beet α -Glucosidase.

Reaction mixtures containing 4.8 ml of 0.5% substrate solution, 4.8 ml of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.5) and 2.4 ml of enzyme solution (0.42 unit) were incubated at 37°C . Two ml of the reaction mixture was pipetted out for determining the degree of hydrolysis. $\bigcirc$ — $\bigcirc$, maltase activity; $\bullet$ — $\bullet$, glucoamylase activity.

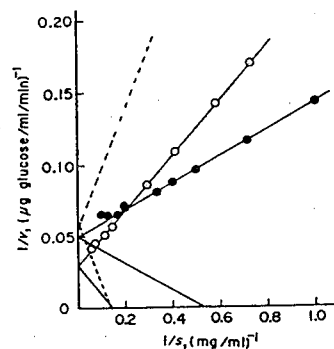


FIG. 10. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolyses of Maltose and Soluble Starch by Sugar Beet α -Glucosidase.

Reaction mixture consisting of 0.5 ml of substrate solution at various concentrations, 0.4 ml of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.5) and 0.1 ml of enzyme solution (0.019 unit) containing 0.05% Triton X-100 was incubated at 37°C .

$\bigcirc$ — $\bigcirc$, maltase activity; $\bullet$ — $\bullet$, glucoamylase activity.

Fig. 10は種々の基質濃度を初速を測定し、両者の逆数プロット (Lineweaver - Burk Plot) を示したものである。遊離 glucose 量は 5 mg/ml を境として、これより高濃度では maltose から多く、低基質濃度においては、soluble starch から多くなることわかる。このように、基質濃度に依存して、オリゴ糖と多糖の水解速度比に逆転が認められたのは本酵素が初めてである。²⁸⁾ ところで、従来より初速は Fig. 10のように、遊離する glucose 量で表示されていた。maltose などのケルコ二糖類では一度の作用で、2モルの glucose が遊離するのに対し、三糖以上のオリゴ糖や多糖類、あるいは合成基質からは、1モルの glucose しか遊離しない。α-glucosidase の作用部位は基質の非還元末端側の α-ケルコシド結合だからである。そこで、酵素の実質的な働き、すなわち、結合の切断を表わすものとして、非還元末端 glucose の遊離量の表示を使用すれば、直接的に各基質に対する作用力を評価することができる。

maltose などのケルコ二糖類においては、遊離 glucose 量の半分が非還元末端側の glucose 量と見做すことができる。このようにして得られた値は Fig. 10に破線を示した。このことにより、本酵素は基質濃度の如何にかかわらず、常に、maltose よりも soluble starch に良く作用する α-glucosidase であることが明確にされた。Fig. 10より、maltose および soluble starch に対する K_m 値はそれぞれ 6.8 mg/ml (20 mM) および 1.9 mg/ml (0.27 mM 非還元末端 glucose) であり、最大の触媒作用速度 V (maltose では破線より求めた。以下、これを単に最大速度と呼ぶ) の比は 100 (maltose) : 120 (soluble starch) であった。

2. マルトオリゴ糖に対する作用

maltose (42),

maltotriase (G₃), maltotetraose (G₄), maltopentaose (G₅), maltohexaose (G₆), maltoheptaose (G₇) および maltooctaose (G₈) の各オリゴ糖を基質として、加水分解の経時変化を観たものから Fig. 11 である。比較のために, soluble starch も基質とした。G₃以上のオリゴはいずれも maltose よりも速く水解され、24 時間反応では全てのマルトオリゴ糖が 100% 分解された。

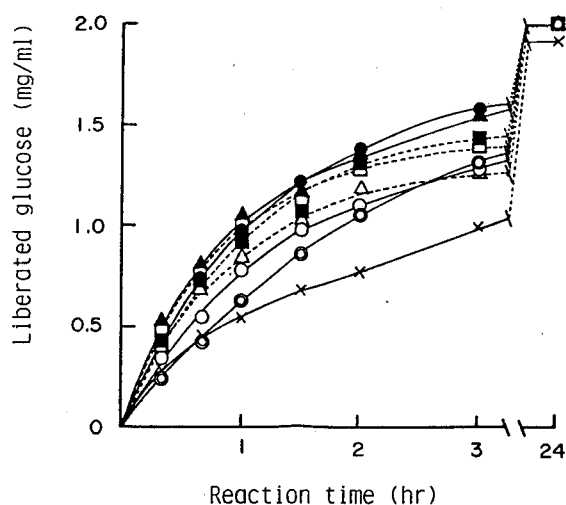


Fig. 11. Progresses of Hydrolytic Actions on Malto-oligosaccharides by Sugar Beet Acid α -Glucosidase. Reaction mixture containing 0.4 ml of 0.5% substrate, 0.4 ml of 0.1M sodium acetate buffer (pH 4.5) and 0.2 ml of enzyme (2 μ g) was incubated at 37°C. At the indicated time intervals, 0.1 ml of the reaction mixture was pipetted out for determining the liberated glucose.
—●—, G₂; —○—, G₃; —●—, G₄; —▲—, G₅; —△—, G₆; —□—, G₇; —■—, G₈; —×—, soluble starch.

Fig. 12 は平均重合度 13 および 17 のマルトデキストリン (G₁₃ および G₁₇) を含む、各種オリゴ糖に対する速度パラメーターを求めたものである。得られた K_m , V の各値は他の基質に於ける値とともに Table 4 に示した。V は重合度

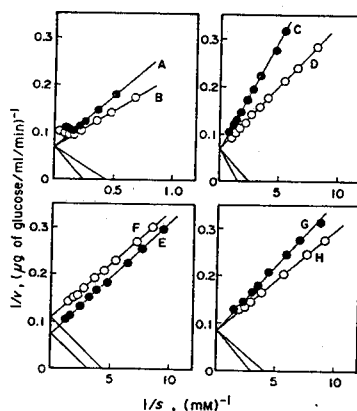


Fig. 12. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolysis of Malto-oligosaccharides. Reaction mixture containing 0.5 ml of substrate solution at various concentration, 0.4 ml of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.5) and 0.1 ml of enzyme (0.001 mg) solution was incubated at 37°C.
A, G₃; B, G₄; C, G₅; D, G₆; E, G₇; F, G₈; G, G₁₃; H, G₁₇.

に依存せずほぼ一定であるのに対し、 K_m は重合度の増加とともに減した。

このことは重合度の増加に従い、酵素との親和力が増加 ($1/K_m$ は親和性の指標) ことを意味している。従って、高基質濃度の場合には、いさゝかのマルトオリゴ糖もほぼ同程度水解される (V あるいは k_o の比較から) のに対し、非常に薄い基質の濃度においては、重合度の大きいもの程その非還元末端側の α -グルコシド結合が切断される (k_o/K_m の比較から) ことが理解できる。4つ以上のオリゴ糖では maltose の約50%速く水解される。

3. 多糖類に対する作用 *soluble starch, amylopectin, amylose, shellfish glycogen, β -limit dextrin, pullulan* および *dextran* に対する作用を調べた。Fig.13に、0.2%基質濃度における水解の経時変化を示した。soluble starchのほかに、数種の α -glucanにも作用し、本条件下での glucose 遊離の初速は *soluble starch* > *amylopectin* > *amylose* $\approx$ *glycogen* > *β -limit dextrin* > *pullulan* > *dextran* の順であった。本酵素が高い多糖水解作用を示すことから、生澱粉に対する作用力を検討したから、コムギおよび

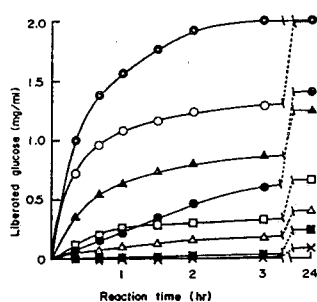


FIG. 13. Progresses of Hydrolytic Actions on Various α -Glucans by Sugar Beet α -Glucosidase.

Experiments were carried out under the same conditions as given in the legend for Fig.11, except that 0.2 ml of enzyme solution was 0.0175 mg of protein.
 ○—○, maltose; □—□, soluble starch; ▲—▲, amylopectin; ●—●, amylose; □—□, glycogen; △—△, β -limit dextrin; ■—■, pullulan; ×—×, dextran.

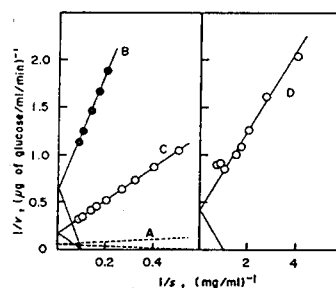


FIG. 14. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolysis of Some α -Glucans.

Experiments were carried out under the same conditions as shown in Fig.12.
 A, soluble starch; B, β -limit dextrin; C, glycogen; D, amylopectin.

トウモロコシ生澱粉には全くその作用が認められなかった。

Fig. 14に, 上記基質のうち β -limit dextrin, shellfish glycogen および amylopectin の水解に対する Lineweaver-Burk のプロットを soluble starch との比較を示した。各基質に関する K_m は 7.3 mM (非還元末端 glucose 濃度, 以下同, β -limit dextrin), 6.0 mM (shellfish glycogen), 0.21 mM (amylopectin) であり, また, V は maltose の 100 に対し 9.6 (β -limit dextrin), 36.2 (shellfish glycogen), 13.6 (amylopectin) であった。これは Table 4 に示した。

4. その他の α -グリコシド結合を有する基質に対する作用
 kojitiase, nigerose, isomaltase, sucrose, turanose, panose, phenyl α -glucoside, *p*-nitrophenyl α -glucoside, methyl α -glucoside および phenyl α -maltoside に対する作用を調べた。Fig. 15 から明らかなように, α -1,4 結合の maltose のみならず α -1,3 結合の nigerose, α -1,5 結合の kojitiase および α -1,6 結合の isomaltase などのグリコニ糖類をも速やかに水解した。さらに, panose (β - α -glucosyl-maltose), turanose (β - α -glucosyl- β -fructose) や phenyl α -maltoside, *p*-nitrophenyl α -glucoside, phenyl α -glucoside などの合成基質に対しても水解作用を示した。しかし, sucrose や methyl α -glucoside

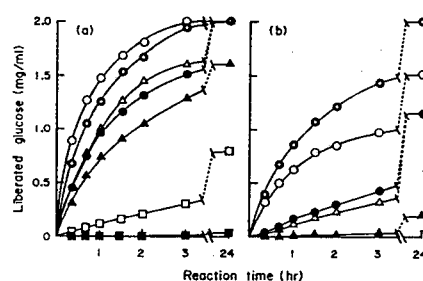


FIG. 15. Progresses of Hydrolytic Actions on Various Substrates by Sugar Beet α -Glucosidase.

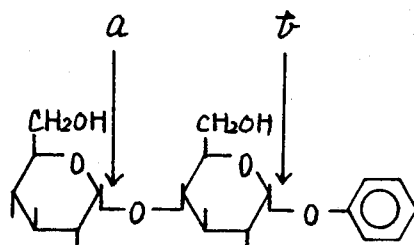
Reaction mixture containing 0.4 ml of 0.5% substrate solution, 0.4 ml of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.5) and 0.2 ml of enzyme (for (a), 0.01 mg; for (b), 0.004 mg) solution was incubated at 37°C. At the indicated time intervals, 0.1 ml of the reaction mixture was pipetted out for determining the liberated glucose.

(a): ○—○, nigerose; ○—○, maltose; △—△, panose; ●—●, kojibiose; ▲—▲, isomaltose; □—□, turanose; ■—■, sucrose.

(b): ○—○, maltose; ○—○, phenyl α -maltoside; ●—●, *p*-nitrophenyl α -glucoside; △—△, phenyl α -glucoside; ▲—▲, methyl α -glucoside.

にはほとんど作用しなかった。

Fig. 16は phenyl α -maltoside に対する作用様式を調べたものである。
本酵素が下記の a の位置を切るか、b の位置を切るかは、反応初期に



於て, glucose と phenol のいずれが優先的に遊離してくるかを
観察することにより推定できる。 Fig. 16 の図中の矢印は a のみでの
切断が完全に行われたと仮定した時の glucose 理論遊離量の
位置である。 結果は, 本酵素がまず a の位置で phenyl α -malto-

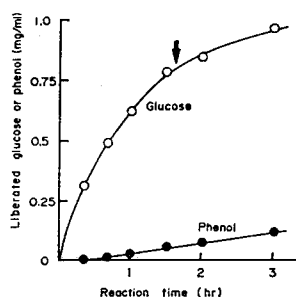


FIG. 16. Liberation of Glucose and Phenol from Phenyl- α -maltoside by Sugar Beet α -Glucosidase.
Reaction mixture containing 0.4 ml of 0.5% phenyl α -maltoside solution, 0.4 ml of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.5) and 0.2 ml of enzyme (0.004 mg) solution was incubated at 37°C.

side を切断し, 次に, 生じた phenyl α -glucoside を水解することを示唆して
いる。 同様のことはアマー分析におけるカスフロマトグラフィーによっても確認されて
いる。⁶⁰⁾ また, この方法により, 遊離
glucose が α 型であることも明らかにさ
れた。⁶⁰⁾ 従って, 本酵素は exo 型に
作用し, α -glucose を生ずる典型的な

α -glucosidase と言える。

基質特異性を数量的に明示するために, 本項で用いた各種の
基質に対する K_m および V を求めた。 Fig. 17 に両逆数プロットを, ま
た, 得られたそれぞれの各値は Table 4 に示した。 グルコ二糖類

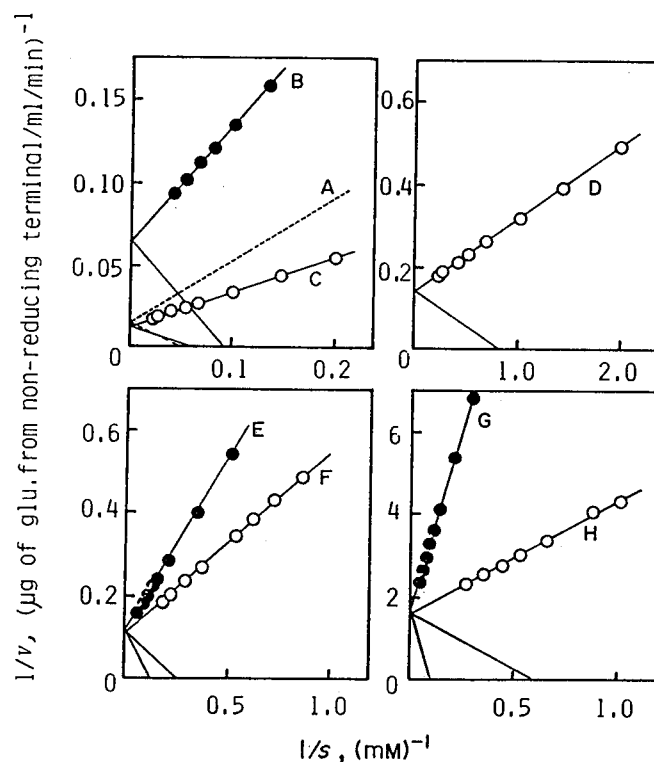


Fig. 17. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolyses of Various Substrates. Experimental conditions were the same as in Fig. 12. A, maltose; B, isomaltose; C, nigerose; D, kojibiose; E, panose; F, phenyl α -maltoside; G, turanose; H, phenyl α -glucoside.

に対する作用速度を考察すると、 V からは(表. 1から) *nigerose* (131) > *maltose* (100) > *isomaltose* (22.6) > *kojibiose* (10.7), 一方, k_0/K_m からは *kojibiose* (164) > *nigerose* (153) > *maltose* (100) > *isomaltose* (41.3) の順にあることが判った。アルコシ糖類の中では *iso-maltose* が他と比較して水解が難しいことは明らかであるが, *maltose* 水解の 22.6~41.3% の速度比は, これまで精製された植物起源 α -glucosidase の中では最も高い。例えば, ソバでは 2.0% (*maltose* の V と比較して) ~ 0.2% (*maltose* の V/K_m と比較して)¹⁰⁵⁾, スウィートコーンでは 10.7~11%⁸⁴⁾, フリントコーンでは 10~18%¹⁰⁶⁾, コメ(Ⅱ)では 2.6%

(0.17% 基質濃度での maltose との比較)⁵⁵⁾ 1) ヨウトウモヤシ I では 4.0%, II-7 では 3.5%, II-S では 4.3% (いずれも 0.2% 基質濃度での比較)⁸³⁾ である。このように, 他の起源 α -glucosidase と比較して, isomaltase に対して高い水解作用を示すことば, 本酵素の高い多糖水解能の一因かも知れない。

isomaltase に良く作用することから, isomaltotriose (IG3), isomaltotetraose (IG4), isomaltopentaose (IG5) および

Table 4. Kinetic Parameters of Sugar Beet Acid α -Glucosidase on Various Substrates

Substrate	K_m ^{a)}	v ^{b)}	k_0 ^{c)}	k_0/K_m ^{d)}
Maltose	20 (6.8)	17.7 (100)	149	7.5 (100)
Maltotriose	3.7	16.1 (91.0)	136	36.8 (491)
Maltotetraose	2.3	16.1 (91.0)	136	59.1 (788)
Maltopentaose	0.64	16.1 (91.0)	136	213 (2840)
Maltohexaose	0.42	16.1 (91.0)	136	324 (4320)
Maltoheptaose	0.32	14.2 (80.2)	120	375 (5000)
Maltooctaose	0.23	10.1 (57.1)	85.1	370 (4930)
Maltodextrin (G ₁₃)	0.36	13.3 (75.1)	112	311 (4150)
Maltodextrin (G ₁₇)	0.26	12.9 (72.9)	109	419 (5590)
Kojibiose	1.3	1.9 (10.7)	16.0	12.3 (164)
Nigerose	17	23.1 (131)	195	11.5 (153)
Isomaltose	11	4.0 (22.6)	33.7	3.1 (41.3)
Isomaltotriose	12	2.0 (11.3)	16.9	1.4 (18.7)
Isomaltotetraose	12	2.6 (14.5)	21.9	1.8 (24.0)
Isomaltopentaose	10	1.8 (10.2)	15.2	1.5 (20.0)
Isomaltohexaose	10	1.7 (9.6)	14.3	1.4 (18.7)
Turanose	10	0.61 (3.4)	5.1	0.5 (6.7)
Panose	8.0	9.7 (54.8)	81.7	10.2 (136)
Phenyl α -glucoside	1.7	0.64 (3.6)	5.4	3.2 (42.7)
Phenyl α -maltoside	4.1	9.9 (55.9)	83.4	20.3 (271)
Soluble starch	0.27 (1.9)	21.3 (120)	179	663 (8840)
Shellfish glycogen	6.0 (10)	6.4 (36.2)	53.9	9.0 (120)
Amylopectin	0.21 (1.0)	2.4 (13.6)	20.0	96.2 (1883)
β -Limit dextrin	7.3 (10)	1.7 (9.6)	14.3	2.0 (26.7)

a) mM and mg/ml in parentheses.

b) mg of glucose liberated from non-reducing terminal/mg of protein /min. The values in parentheses indicate the relative V .

c) sec^{-1} .

d) $\text{sec}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$. The relative values were indicated in parentheses.

isomaltohexaose (IG6) の各イソマルトオリゴ糖に対する作用を調べた。Fig. 18 および Fig. 19 に水解の経時変化と初速度の基質濃度依存性を示した。本酵素は IG3 以上のイソマルトオリゴ糖にも水解作用を示すことが認められた。これらの水解速度は *isomaltose* の約 50%, *maltose* の約 10~20% であった。それぞれの K_m および V は Table 4 に列記した。

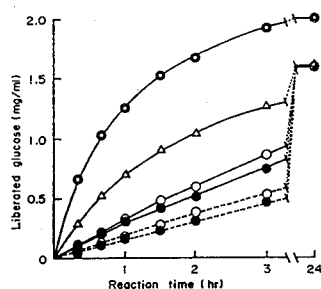


FIG. 18. Progresses of Hydrolytic Actions on Iso-malto-oligosaccharides by Sugar Beet α -Glucosidase. Experiments were carried out under the same conditions as given in the legend for Fig. 12.
 ○—○, G2; △—△, IG2; —, IG3; ●—●, IG4; —○—, IG5; ●—●, IG6.

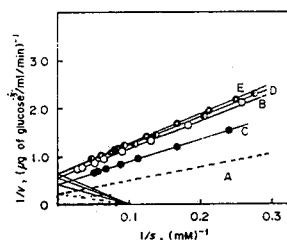


FIG. 19. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolysis of Iso-malto-oligosaccharides.

Experiments were carried out under the same conditions as shown in Fig. 12.

A, IG2; B, IG3; C, IG4; D, IG5; E, IG6.

* μ g of glucose from non-reducing terminal

第4節 要約

- I. テンサイ種子より硫酸分画, CM-cellulose および Bio-gel P-150 の各カラムクロマトグラフィーにより, 粗抽出液から 1818 倍に, 30% 収率で酸性 α -glucosidase を精製した。精製酵素標品は超遠心的およびデンスウェル電気泳動的に単一であることを確認した。
- II. SDS-電気泳動法により, 分子量は 91,000 と算出した。maltase および soluble starch の加水分解に於て, pH 4.5 付近で作用最大を示し, pH 3.0 ないし 8.0 の範囲を安定であることが判った。

温度に対しては、 45°C で作用最適を示し、 65°C まで安定であることを確認した。

- Ⅲ. 各種マルトオリゴ糖、多糖類、グルコニ糖類、合成基質およびイソマルトオリゴ糖に、幅広く作用することを明らかにした。特に、*soluble starch* などの多糖類に速やかに作用し、*soluble starch* の α -グルコシド結合切断速度は、高基質濃度では、*maltose* の約1.2倍、低濃度基質条件下では、約88倍であることを明らかにした。いずれの基質濃度に於ても、*maltose* よりも速やかに *soluble starch* に作用する α -glucosidase は本酵素が初めてである。*maltose* のほか *nigerose*, *koji-triose* および *isomaltose* などのグルコニ糖類にも良く作用し、従来に精製酵素と比較して、 α -1,6結合水解能の高い酵素であることを認めた。

第3章 トラマメ酸性 α -Glucosidase の 精製と諸性質

第1節 緒論

コメ¹⁰⁷⁾やオオムギ,^{108~111)}コムギ^{112~114)}などの穀実類 *amylase* に関する研究は多く、古くより、単離ならびに諸性質の検討がなされているが、マメ類に関するものは極く僅かである。コメでは未発芽種子中に低活性の β -*amylase* が存在し、発芽時に活性の高い型に転換され、^{107, 115~118)} また、 α -*amylase* が "de novo" 的に産生されることも知られている。^{119~121)} α -glucosidase に関する研究^{65, 122~126)} も多く、又種の酵素が未発芽(貯蔵)および発芽期を通して存在すること知られている。¹¹⁸⁾

1962年、春日井¹²⁷⁾はマメ類 *amylase* に関して、ダイズ、アズキ、リョクトウ、エンドウ、ソラマメおよびゴカツササゲの発芽時にあける活性の消長を検討し、ダイズ以外は未発芽種子中に活性は全く無く、発芽によって、初めて活性が発現することを認めた。後になり、¹²⁸⁾ リョクトウモヤシの子葉のみを酵素試料として、硫酸分画の α -*amylase* 画分が β -*amylase* の混在を認めないにも拘らず、soluble starch を70%以上も分解することの原因究明過程で α -glucosidase を見出し、これを高度に純化した。完全なる精製は、1979年、山崎と鈴木²³⁾によってなされた。彼らは、吸水5日目のリョクトウ発芽種子の抽出液より、硫酸分画(90%飽和画分)、polyethylene glycol 分画(20%沈殿画分)、DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーにより活性画分IとIIを得、Iは続く

SP-Sephadex カラムクロマトグラフィー および調製用電気泳動により、一方、IIは同様の操作・方法により II-1 および II-2 とし、それぞれディスク電気泳動的に単一に精製した。分子量は 14.5×10^4 (I), 10.5×10^4 (II-1), 6.5×10^4 (II-2), 至適 pH はいずれも 5.0, 0.2% 基質濃度における速度比は、各酵素の maltose に対する作用を 100 とすると, maltotriose を 42~62, isomaltose を 4, soluble starch を 13~16 と報告されている。

現在まで報告のある マメ起源の α -glucosidase は上記の 11 例のうちのみであることから、著者ら^{129, 130)}は多くの マメ種子について、maltose 加水分解活性の予備検索を行った。そのうち、マメ科インゲンマメ属 (*Phaseolus*) の代表的な一種、菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 17 品種について、発芽時の maltase 活性の消長を調査し、単位重量当りの活性から、発豆類の「発豆」品種、中長鶏類の「福粒中長」品種、手亡類の「姫手亡」品種に高いことを認めた。なお、未発芽種子ではいずれの品種でも活性は認められなかった。菜豆種子中には澱粉のほか、hemagglutinin, galactomannan, glucomannan などの多糖類が多く含まれる^{131~133)}ことから、1968 年、Bahl & Agrawal^{134, 135)}は発芽 6 日目のウスラマメより β -acetylglucosaminidase (EC 3.2.1.30), α -galactosidase (EC 3.2.1.22), β -galactosidase (EC 3.2.1.23), α -mannosidase (EC 3.2.1.24), β -glucosidase (EC 3.2.1.21) の glycosidase 類を分離し、至適 pH および若干の特異性を調べているが、 α -glucosidase に関しては全く触れられていない。

本章では、トラマメ発芽種子よりディスク電気泳動的に単一に酸性 α -glucosidase を分離・精製し、その一般的性質および基質特異性を

明らかにすることを目的とした。

第2節 実験材料および方法

1. 供試種子 および発芽条件 トラマメ (*Phaseolus*

vulgaris L., cv. Toramame) はホクレンより恵与された 北海道虻田町産である。発芽は種子を水道流水中に一晩浸漬し、十分に吸水膨油させた後、市販のプラスチック製水切り上に播種し、25°C, 暗所で行った。発芽種子が全長(子葉+茎+根)約30cmに達した時に(吸水後6~8日目)、その子葉のみを採取し、使用時まで、-20°Cで凍結保存した。

2. 試薬 maltopentaase, dextran (半井化学),

maltotriose (和光純薬), maltotetraose, maltohexaase, maltoheptaase, maltooctaase (盛進製薬), turanase (Sigma) は全々市販品である。その他の試薬類は第2章に記したものを用了。

3. 酵素活性測定法 酵素活性は 0.5% maltose 0.2ml,

0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.8) 0.2ml, 酵素液 0.1ml からなる混合液を、37°C で 5~30 分反応せしめ、遊離する glucose を市販の Glucose AR-Test (和光純薬) を用いた Tris-glucose oxidase-peroxidase 法^{93,94)} により測定し求めた。酵素1単位は 1分間に 1 μ mol の maltose を加水分解する量と定義した。

4. 蛋白質の定量 精製酵素に於て得られた E'_{1cm} at

280 nm = 14.7 の結果に基づき、分光学的方法で測定した。

5. ディスク電気泳動法 ホリアクリルアミド電気泳動は Reisfeld の方法⁹⁸⁾ に準じて行った。 7.5%ゲルを用い、 β -alanine-酢酸緩衝液 (pH 4.5) で、カラム (0.5×7cm) 1本当り 3mA の定電流、約 90分 行った。 蛋白の染色は Coomassie Brilliant Blue G-250 を用いて行った。

調製用ホリアクリルアミド電気泳動は 基本的には上記方法に従って行った。 分離ゲルを TEMED 無添加の泳動試薬 A 液 (pH 4.3) を用いて、カラム (1×10cm) 1本当り 10mA の定電流で、室温、120分 予備通電した後、濃縮用ゲルを重ねた。 泳動は、試料をカラム 1本当り 0.4ml (蛋白量 0.2~0.3mg) とし、 β -alanine-酢酸緩衝液系 (pH 4.5) で、150V 定電圧、4℃、4時間 行った。

分子量測定のための SDS-ホリアクリルアミド電気泳動は Weber と Osborn の方法⁹⁹⁾ に準拠した。 諸条件は第2章と同じである。 蛋白の染色には Coomassie Brilliant Blue G-250 を用いた。

6. 非還元末端残基の測定 第2章に記載した方法による。 soluble starch 10mg/ml 濃度の非還元末端 glucose 濃度は 1.42mM であった。

第3節 実験結果 および考察

I. 精製

1. 抽出 凍結保存トウモロコシ発芽種子の子葉 (未発芽種子 3.2Kg に相当分) を、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 15L 中、Polytron (Kinematica) を用いて破碎後、室温で 5時間 攪拌抽出した。

遠心分離 ($14,000 \times g$, 10分間) により得られた上清, 18.2l を粗抽出液とした。

2. 硫酸分画 固形硫酸5.3kgを添加し, 70%飽和とした。生じた沈澱を遠心分離により集め, 約18lの水で溶解後, 一晚, 水道水に対し透析した。遠心分離で水不溶性物質除去後, 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) に対し, 3日間透析した。

3. CM-cellulose カラムクロマトグラフィー 上記透析物を同緩衝液で平衡化した CM-cellulose カラム ($4.6 \times 69 \text{ cm}$) に充填し, 吸着蛋白質を NaCl 濃度勾配法により溶出した (Fig. 20)。活性画分 (Fr. No. 316 ~ No. 336) を濃縮し, 15ml とした。

4. Bio-Gel P-150 カラムクロマトグラフィー 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) で平衡化させた Bio-Gel P-150 カラム ($3.6 \times 80 \text{ cm}$) を用いて, 濃縮酵素のゲル濾過を行った。Fig. 21 に溶出パターンを示した。活性画分, fraction No. 33 ~ No. 42 (80ml) を回収した。

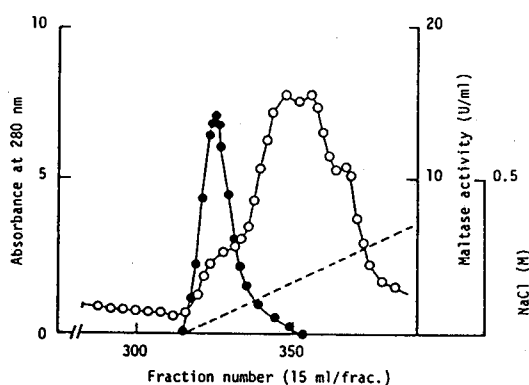


Fig. 20. Chromatography of Concord Pole Acid α -Glucosidase on CM-cellulose Column (1st). Enzyme solution, 3230 ml; column size, $4.6 \times 69 \text{ cm}$; equilibration and elution, 0.01M sodium acetate buffer (pH 5.6); flow rate, 100 ml/hr. —○—, absorbance at 280 nm; —●—, maltase activity; , concentration of NaCl.

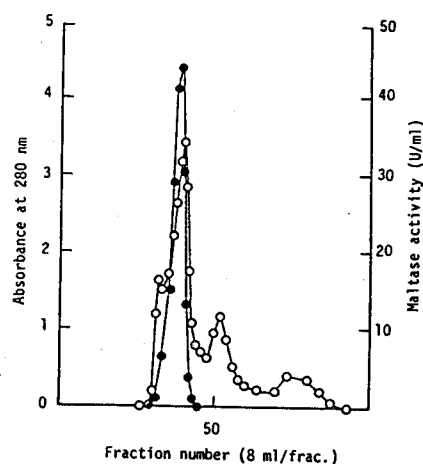


Fig. 21. Gel Filtration of Concord Pole Acid α -Glucosidase on Bio-Gel P-150 Column (1st). Enzyme solution, 15 ml; column size, $3.6 \times 80 \text{ cm}$; equilibration and elution, 0.01 M sodium acetate buffer (pH 5.6); flow rate, 20 ml/hr. —○—, absorbance at 280 nm; —●—, maltase activity.

5. CM-cellulose

カラムクロマトグラフィー

CM-cellulose を用いて、再度、イオン交換クロマトグラフィー

を行った。カラム (2.7 ×

34 cm) 吸着後は NaCl を用

いて溶出した (Fig. 22)。

得られた活性画分 115 ml

(fraction No. 90 ~ No. 112) をコロジオンバックを用いて、約 6 ml まで濃縮した。

6. 調製用ポリアクリルアミド電気泳動

カラム (1 × 10 cm)

1本当り、約 0.4 ml の濃縮試料 (約 20% ケリセリン含有) を充填、泳動し、終了後、cytochrome c に対する相対移動度 0.32 ($R_m = 0.32$) 部分のゲルを切り取り、細片後、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) に浸漬して酵素を回収した。

7. Bio-Gel P-150 カ

ラムクロマトグラフィー 抽

出酵素を濃縮後、混入した

アクリルアミド等を除去するため、

Bio-Gel P-150 を用いて、再

びゲル濾過を行った。

Fig. 23 にカラム (調製用電

気泳動用) 1本分相当の

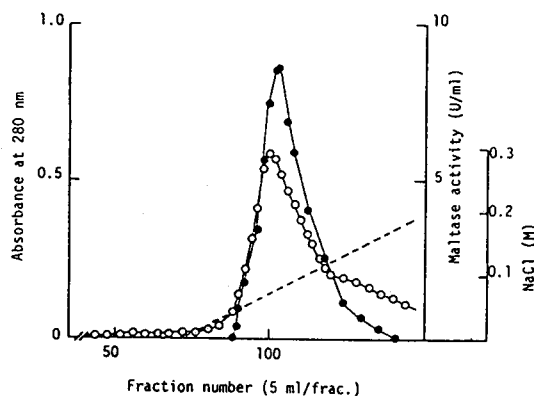


Fig. 22. Chromatography of Concord Pole Acid α -Glucosidase on CM-cellulose Column (2nd). Enzyme solution, 100 ml; column size, 2.7 × 34 cm; equilibration and elution, 0.01 M sodium acetate buffer (pH 5.6); flow rate, 50 ml/hr. —○—, absorbance at 280 nm; —●—, maltase activity; ----, concentration of NaCl.

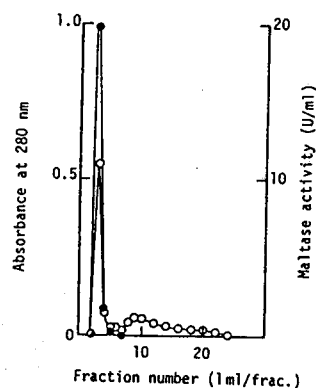


Fig. 23. Gel Filtration of Concord Pole Acid α -Glucosidase on Bio-Gel P-150 Column (2nd). Enzyme solution, 0.1 ml; column size, 0.8 × 12 cm; equilibration and elution, 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.6); flow rate, 6 ml/hr. —○—, absorbance at 280 nm; —●—, maltase activity.

Table 5. Summary of Purification Procedure for Concord Pole Acid α -Glucosidase

Procerure	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (-fold)	Recovery (%)
Crude extract	590,000 ^{a)}	4,150	0.007	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ (70% satn.)	435,000 ^{a)}	3,800	0.01	1.4	91.6
CM-cellulose (1st)	500	2,300	4.6	657	55.4
Bio-Gel P-150 (1st)	124	1,600	12.9	1843	38.6
CM-cellulose (2nd)	34	1,000	29.4	4200	24.1
Preparative disc gel electrophoresis	-	600	-	-	14.5
Bio-Gel P-150 (2nd)	10.4	570	54.8	7829	13.7

a) These values were calculated with the assumption that $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ at 280 nm was 10, and the others were calculated on the basis of the result that $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ at 280 nm was 14.7.

抽出酵素について得られた結果を示した。活性画分は精製酵素標品として、以後の実験に供した。

各精製段階における全蛋白量、全活性、比活性、精製度および収率を Table 5 に示した。本酵素は抽出液より約 7,800 倍に、13.7% の収率で精製された。

8. 精製酵素の純度

精製酵素標品の純度を、pH 4.0 に於けるポリアクリルアミド電気泳動法により検討した。Fig. 24 に示したように、単一のバンドのみしか認められず、本酵素の均一性が立証された。また、SDS-電気泳動法によっても、同様の結論が得られた。

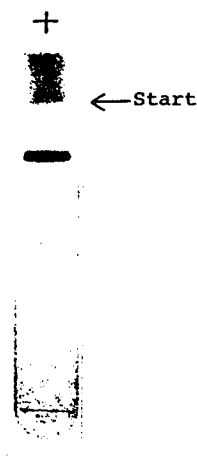


Fig. 24. Polyacrylamide Disc Gel Electrophoresis of Purified Concord Pole Acid α -Glucosidase.

II. 物理化学的性質

1. 分子量 SDS-

ポリアクリルアミド電気泳動法⁹⁹⁾により測定した。標準蛋白質として分子量既知の5種類を用いた。Fig. 25より、トウマヌ酸性 α -glucosidaseの分子量は88,000と算出された。ゲル濾過法に於ける溶出位置との比較から、本酵素は単量体であると推測した。

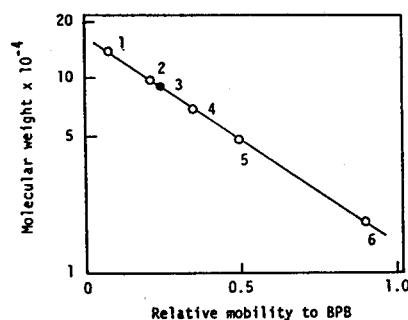


Fig. 25. Estimation of Molecular Weight of Concord Pole Acid α -Glucosidase. 1, bovine serum albumin dimer (M.W., 13.6×10^4); 2, phosphorylase b monomer (M.W., 9.6×10^4); 3, this enzyme (M.W., 8.8×10^4); 4, bovine serum albumin monomer (M.W., 6.8×10^4); 5, ovalbumin (M.W., 4.7×10^4); 6, myoglobin (M.W., 1.8×10^4).

2. 至適pHおよびpH安定性

各種pHのMcIlvaine緩衝

液中で本酵素を37°C, 5分間, maltoseに作用させた。Fig. 26に示したように, pH4.8を作用最大を示した。一方, 酵素液を各種pHのBritton-Robinson緩衝液中, 4°Cで20時間保持した後, pH4.8, 37°Cで5分間maltoseに作用させ, 残存活性を測定して安定性を調べた。Fig. 26より, 本酵素はpH3.5から9.0の範囲で安定であることが明らかになった。

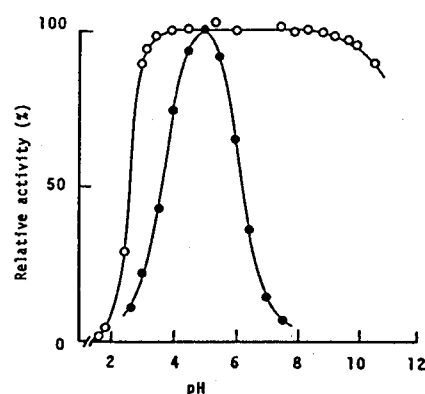


Fig. 26. pH-activity and -stability curves of Concord Pole Acid α -Glucosidase. pH-activity curve (—●—); reaction mixture containing 0.4 ml of 0.025% maltose, 0.5 ml of MacIlvaine buffer and 0.1 ml enzyme (0.2 μ g) was incubated at various pHs, 37°C for 5 min. pH-stability curve (---○---); after the mixture of 0.02 ml of enzyme (0.6 μ g) and 0.1 ml of Britton-Robinson buffer at various pHs had been kept at 4°C for 20 hr, 0.2 ml of 0.5% maltose and 0.18 ml of 0.4M sodium acetate buffer (pH 4.8) were added, and the reaction mixture was incubated at 37°C for 5 min.

3. 熱安定性

pH 4.8 の酢酸緩衝液中で、30 分間 90°C の各温度で、15 分間、酵素を処理した後、未処理の酵素液を対照に、37°C で 5 分間 maltose に作用させ、残存活性を測定した。Fig. 27 に示したように、60°C までは安定であり、90°C では完全に活性を失うことを認めた。

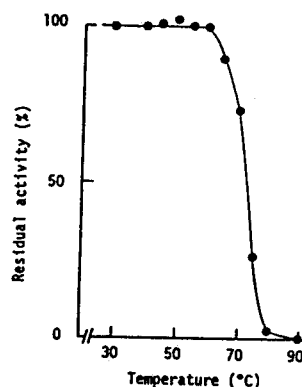


Fig. 27. Temperature-stability Curve of Concord Pole Acid α -Glucosidase. After the mixture of 0.1 ml of enzyme (0.3 μ g) and 0.2 ml of 0.4M sodium acetate buffer (pH 4.8) was kept at various temperatures for 15 min, 0.2 ml of 0.5% maltose was added, and the reaction mixture was incubated at 37°C for 5 min.

III. 基質特異性

1. マルトオリゴ糖に対する作用

G₂, G₃, G₄, G₅, G₆,

G₇, G₈ および G₉ の各種マルトオリゴ糖に対する作用を調べた。

他の研究報告と同様にして、まず、一定基質濃度(最終0.2%)

条件下で、水解の経時変化を

観たものが Fig. 28 である。

このような濃度条件に於いて

は、重合度の小さい基質ほど

速やかに水解される傾向が

認められた。しかし、たと

え濃度が一定であつても、こ

のように % あるいは mg/ml の

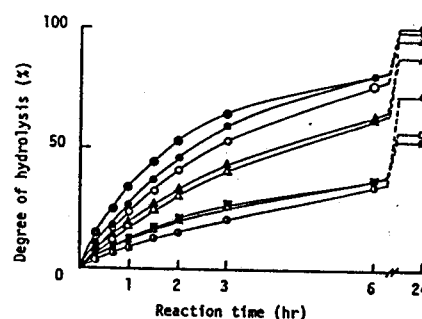


Fig. 28. Progresses of Hydrolytic Actions on Maltoligosaccharides by Concord Pole Acid α -Glucosidase. Reaction mixture containing 0.5 ml of 0.4% substrate; 0.4 ml of 0.4M sodium acetate buffer (pH 4.8) and 0.1 ml of enzyme (0.9 μ g) was incubated at 37°C. At the indicated time intervals, 0.1 ml of the reaction mixture was pipetted out for determining the liberated glucose. $\bullet$, G₂; $\circ$, G₃; Δ , G₄; $\square$, G₅; ∇ , G₆; $\times$, G₇; $\diamond$, G₈; $\circ$, G₉.

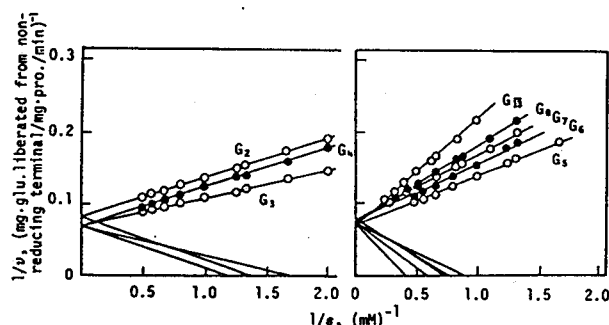


Fig. 29. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolyses of Maltooligosaccharides by Concord Pole Acid α -Glucosidase. Reaction mixture containing 0.5 ml of substrate at various concentrations, 0.4 ml of 0.4M sodium acetate buffer (pH 4.8) and 0.1 ml of enzyme (for G_2 and G_3 , 0.09 μ g; for the others, 0.19 μ g) was incubated at 37°C.

濃度表示の場合には、酵素が作用する部位の基質の分子数、換言すれば、非還元末端側の α -グルコシド結合の数と同じではないことから、直接比較することは妥当でない。酵素作用能力は速度パラメーターを用いて評価することが望ましい。

Fig. 29 に示した基質濃度と初速度の両逆数プロットから、各種オリゴ糖に対する速度パラメーターを算出した。 K_m は G_2 (0.72 mM), G_3 (0.60 mM), G_4 (0.83 mM), G_5 (1.12 mM), G_6 (1.28 mM), G_7 (1.33 mM), G_8 (1.67 mM) および G_9 (2.38 mM) であり、 maltotriose を最小とし、以降は微増の傾向を示した。一方、 V は maltose を 12.6 mg of glucose liberated from non-reducing terminal / mg of protein / min であり、この値を 100 とした各オリゴ糖の相対 V 値は G_3 (119), G_4 (119), G_5 (124), G_6 (119), G_7 (114), G_8 (120) および G_9 (127) であった。従って、高基質濃度での速度は maltose よりも G_3 以上のオリゴ糖を大きく、逆に、低濃度基質に於いては K_m/K_m の比較から理解されるように G_3 が最大となり、次いで G_4 , G_2 , G_5 , G_6 , G_7 , G_8 , G_9 の順に水解されることを示した。ここで得られた各速度パラメーター、すなわち、 K_m および V , V より分母量

88,000を用いて算出される分子活性 k_o , および k_o/K_m は, 他の基質に關する各値とともに Table 6 に記載した。

2. 多糖類に対する作用 *soluble starch, amylase, amylopectin, β -limit dextrin, shellfish glycogen, pullulan* および *dextran* の各種 α -glucan に対する特異性を調べた。基質濃度 2 mg/ml (0.2%), $\text{pH } 4.8$, 37°C の条件下で酵素を作用させた時の水解経時変化を Fig. 30 に示した。maltase は対照として用いた。

本条件においては, *soluble starch* が α -glucan の中では最も速く水解されたが, maltase

と比較するとその分解率は反応初期でリクであった。多糖類に対する単純な水解速度は

soluble starch > *amylose* > *β -limit dextrin* > *amylopectin* > *glycogen* の順であり, *pullulan* と *dextran* にはほとんど作用を示さなかった。

soluble starch の α -グルコシド結合切断速度を数量的に

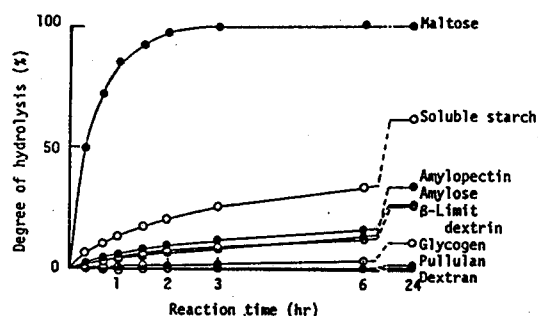


Fig. 30. Progresses of Hydrolytic Actions on Various α -Glucans by Concord Pole Acid α -Glucosidase. Experiments were carried out under the same conditions as shown in Fig. 28, except that 0.1 ml of enzyme contained 4.5 μg of protein.

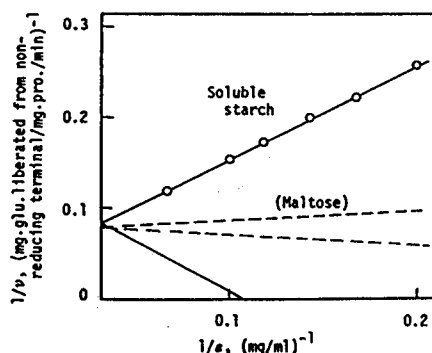


Fig. 31. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolysis of Soluble Starch by Concord Pole Acid α -Glucosidase. Experiments were carried out under the same conditions as shown in Fig. 29, except that 0.1 ml of enzyme was contained 0.09 μg of protein.

表わすために, K_m および V を求めた (Fig. 31)。その結果, K_m は 8.3 mg/ml で, 非還元末端 glucose 濃度を 1.18 mM であり, V は $12.1 \text{ mg of glucose liberated / mg of protein / min}$ で, maltose の最大速度の 96.0% であった。従って, 高基質濃度では, maltose とほぼ同程度 (96.0%) の速さで水解を受け, 低濃度の基質条件下では, maltose の 58.5% の速度で α -グルコシド結合が切断されることになった (Table 6)。この結果は 同分子数 (被切断部位のモル濃度が同じ) に於ける速度の比較であり, 酵素の真の作用能力比と見做し得る。Fig. 30 の経時変化の結果は soluble starch の水解が maltose のそれの $1/7$ であることを示した。しかし, この時の基質濃度は 0.2% ($=2 \text{ mg/ml}$) であり, maltose の 5.85 mM に対し, soluble starch の非還元末端 glucose は 0.28 mM であることから, 水解作用を受ける部位は maltose の方が約 21 倍多く存在する。従って, これまでの多くの報告のように, 基質濃度を重量で表示したものは, 水解速度の一つの目安とはなるが, 分子数が異なるため, 酵素の真の水解力を表わすものではないと言える。しかしながら, 実際の工業的応用面に於て, 右よりこの濃度表示が採用されているため, いずれを重視するかは研究者の立場によっても異なるであろう。本論文では, 酵素その自身の能力を評価することを目的としていたため, モル濃度表示を重視した。

3. その他の α -グルコシド結合を有する基質に対する作用

Kojitase, *nigerose*, *isomaltase* のグルコ二糖類, *phenyl α -glucoside*, *phenyl α -maltoside* の合成基質, および *panose*, *sucrose*, *turanose* に対する作用を観た (Fig. 32)。

nigerose, kojibiose, phenyl α -maltoside などは比較的水解が易く, panose, phenyl α -glucoside, isomaltose, turanose に対する作用は弱く, sucrose にはほとんど作用を示さなかった。

特異性を数量的に表わすために, これら基質に関する速度パラメーターを求めた。

Fig. 33 に Lineweaver-Burk のプロットを示した。それぞれの

K_m , V は Table 6 にまとめられた。アルコニ糖類に関しては, V (あるいは K_0) の比較からは nigerose (109) > maltose (100) > kojibiose (31.7) > isomaltose (3.2) の順に, また, K_0/K_m の比較からは maltose (100) > nigerose (62.7) > kojibiose (49.6) > isomaltose (0.6) の順に水解されることが明らかになった。panose は maltose の 6.7~27.0%, phenyl α -

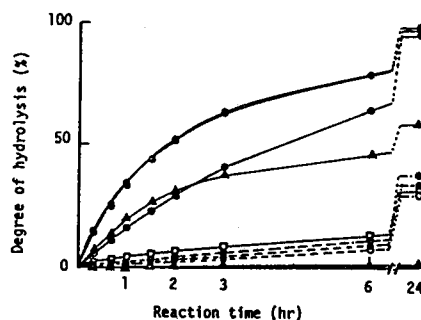


Fig. 32. Progresses of Hydrolytic Actions on Various Substrates by Concord Pole Acid α -Glucosidase. Experimental conditions were the same as in Fig. 28. —○—, maltose; —●—, nigerose; —▲—, phenyl α -maltoside; —◐—, kojibiose; —◑—, panose; —○—, phenyl α -glucoside; —◒—, isomaltose; —◓—, turanose; —△—, sucrose.

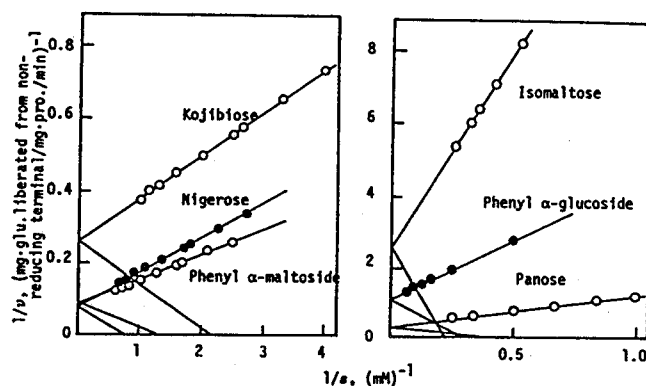


Fig. 33. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolyses of Various Substrates by Concord Pole Acid α -Glucosidase. Experiments were carried out under the same conditions as shown in Fig. 29, except that 0.1 ml of enzyme contained 0.19 μ g for kojibiose, phenyl α -maltoside and panose, 0.09 μ g for nigerose, 0.94 μ g for isomaltose, and 0.62 μ g for phenyl α -glucoside.

Table 6. Kinetic Parameters of Concord Pole Acid
 α -Glucosidase on Various Substrates

Substrate	$K_m^{a)}$	$v^{b)}$	$k_o^{c)}$	$k_o/K_m^{d)}$
Maltose	0.72(0.25)	12.6(100)	103	143 (100)
Maltotriose	0.60	15.0(119)	122	203 (142)
Maltotetraose	0.83	15.0(119)	122	147 (103)
Maltopentaose	1.12	15.6(124)	127	113 (79.0)
Maltohexaose	1.28	15.0(119)	122	95.3(66.6)
Maltoheptaose	1.33	14.3(114)	177	88.0(61.5)
Maltooctaose	1.67	15.1(120)	128	73.7(51.5)
Maltodextrin (G13)	2.38	16.0(127)	130	54.6(38.2)
Kojibiose	0.46	4.0(31.7)	32.6	70.9(49.6)
Nigerose	1.25	13.7(109)	112	89.6(62.7)
Isomaltose	4.26	0.4(3.2)	3.3	0.8(0.6)
Panose	2.90	3.4(27.0)	27.7	9.6(6.7)
Phenyl α -glucoside	3.13	1.0(7.9)	8.1	2.6(1.8)
Phenyl α -maltoside	0.76	11.9(94.4)	97.0	128 (89.5)
Soluble starch	1.18(8.3)	12.1(96.0)	98.6	83.6(58.5)

a) mM. (mg/ml).

b) mg of glucose liberated from non-reducing terminal/mg of protein/min. (Relative value).

c) sec^{-1} .

d) $\text{sec}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$. (Relative value).

glucoside は 1.8~7.9%, phenyl α -maltoside は 89.5~94.4% の範囲内で水解作用を受けることが判明した。

本画酵素の作用様式は, phenyl α -maltoside からの生成物を分析することにより推定できる。既報^{6a)}のカスクロマトグラフィー法により, 反応初期に於て, α -glucose と phenyl α -glucoside が等量遊離することを確認した。従って, exo 型に作用することを確認できる。同様なことは, maltotriose を基質とした場合にも確認された。

第4節 要約

I. トウモロコシ発芽種子(吸水後 6~8 日目種子)より硫酸分画, CM-

cellulose カラムクロマトグラフィー, Bio-Gel P-150 クロマトグラフィー, 再 CM-cellulose カラムクロマトグラフィー, 調製用ディスク電気泳動法, および Bio-Gel P-150 を用いた再ゲル濾過法により, 抽出液から 約 7800 倍に, 13.7% の収率で 酸性 α -glucosidase を精製した。精製酵素標品は ディスク電気泳動的に単一であった。

II. SDS-電気泳動法により, 分子量は 88,000 と算出された。pH に対して, 4.8 を作用至適を示し, 3.5~9.0 の範囲内で安定であった。温度に対しては 60°C を安定であることを確認した。

III. 各種 マルトオリゴ糖, 多糖類, ケルコ二糖類 および 合成基質などに, 幅広く作用した。マルトオリゴ糖に関しては, 基質濃度が高い場合には maltase と同程度か, むしろ速く他のオリゴ糖を水解し, 低基質濃度では G3, G4, G2, G5, G6, G7, G8, G9 の順に水解することを明らかにした。soluble starch は maltase の 58.5~96.0% の速度で α -ケルコシド結合が切断されるが, 他の多糖類に対する作用は弱く, 従来精製酵素と比較して, 多糖水解能の低い α -glucosidase であることが判明した。

ケルコ二糖類に関しては, maltase の水解速度に対して, nigerose が 62.7~109%, kojizucrose が 31.7~49.6%, isomaltose が 0.6~3.2% の速度で水解されることを数量的に明らかにした。

第4章 フタ肝臓酸性 α -glucosidase の 精製と諸性質

第1節 緒論

動物起源 α -glucosidase (maltase) の最初の報告は Brown と Heron³²⁾ によるものであった。1880年、彼らはフタの脾臓抽出液と、乾燥し細断した小腸壁から、maltose を glucose に分解することを観察した。その後、1950年頃までに同様の作用を示す酵素が、軟体動物、甲殻類、昆虫などの無脊椎動物、魚類、両生類、爬虫類、鳥類 および哺乳類などの脊椎動物でその存在が知られるようになった。⁴⁴⁾ ラット、ネコ、ウサギ およびフタの肝臓抽出液、¹³⁴⁾ ウサギ骨格筋¹³⁷⁾ およびフタ腎臓¹³⁸⁾ の数例を除いては、そのほとんどが消化管(小腸)や血清の酵素に属するものである。

我々人類にとって、maltase は栄養学的に重要な糖質で、たゞより、経口栄養源として知られ、¹³⁹⁾ また、澱粉は糖質の中最も主要なエネルギー源(昭和50年の国民栄養調査によれば、摂取される糖質の2/3 が澱粉である¹⁴⁰⁾) であることから、消化・吸収の観点より α -glucosidase を研究されてきたことは十分に理解できる。現在では、哺乳動物の小腸上皮細胞の微絨毛膜に maltase, sucrase, isomaltase, lactase および trehalase と呼ばれる5種類の二糖類水解酵素が phosphatase などとともに存在すること^{141)~143)} が知られ、 α -glucosidase (maltase) の生理的役割について明らかにされている。^{141), 144)} 小腸酵素の研究は、

特に, Dahlqvist が フタ小腸粘膜より *sucrase*, *maltase* の可溶化,¹⁴⁵⁾
maltase と *isomaltase* の可溶化^{146, 147)} に初めて成功して以来, 飛躍的
 に蛋白質化学的研究が進み, 今日に於ては, ラットからは *maltase*・
glucoamylase 複合体,^{148~150)} *sucrase*・*isomaltase* 複合体^{151, 152)} とし
 て分離され, また, 多糖水解能を有す *maltase*^{153, 154)} について報告がある。
 ウサギ小腸からは *glucoamylase*・*maltase* 複合体,^{155, 156)} *sucrase*・
isomaltase 複合体,^{157~160)} あるいは, *glucoamylase*¹⁶¹⁾ などから報告
 されている。フタ小腸起源のものとしては *maltase*・*glucoamylase*
 複合体,¹⁶²⁾ ヒト小腸起源のものとしては *sucrase*・*isomaltase* 複
 合体,^{163, 164)} や *glucoamylase*,¹⁶⁵⁾ ハムスター小腸起源のものとして
maltase と *lactase*,¹⁶⁶⁾ などからそれぞれ単離・精製され, 分
 子量などの諸性質, 特異性, 膜との結合部位等が調べられている。
 しかし, *sucrase*, *isomaltase*, *glucoamylase* などには厳密な特異性
 に基づく名称ではなく, いわゆる, " α -glucosidase" の範疇のもの (若干の
 特異性を要する isoenzyme) と思われる。

このように, *maltase* を水解する酵素としての α -glucosidase の研究は,
 当初より, 消化に関連するものが多い, 組織 (臓器) などの細胞内の
 酵素に関する研究は非常に遅れていた。事実, 本来の基質である
maltose は生体成分としては血漿中で血中 *glucose* の約 1/1000 程度¹⁶⁸⁾
 であり, 組織においては, これよりさらに微量しか存在してはいない。¹⁶⁹⁾
 また, *maltase* 生成系としての α -amylase は, 肝臓酵素^{170~172)} を除い
 ては細胞外分泌酵素 (例えば, 唾液や膵臓 *amylase*) であり,
 植物酵素の澱粉代謝系としての α -glucosidase¹⁷³⁾ (α -, β -*amylase*

の作用により生ずる maltose の分解酵素) のように, 動物体内のグリコーゲン分解との関連については, ほとんど論じられていなかった。

哺乳動物の組織中に存在する α -glucosidase の研究が急速に進展したのは, 1963 年の Hers の業績に負うところが大きい。すなわち, ヒト肝臓, 心臓, 骨格筋には グリコーゲンを分解して, 直接, glucose にする酸性 α -glucosidase が存在し, Pompe 病 (Pompe's disease) 患者ではこの酵素が欠損していることを初めて見出した。¹⁷⁴⁾ また, 共同研究者とともに, ラット肝臓にも同種酵素が存在し, 超遠心による細胞分画法により, この酵素が リソゾーム (Lysosome; 1955 年, Apelmans ら^{175, 176)} により存在が提唱され, 後に乃り, Novikoff ら^{177~180)} によりオルガネラとして確立) に存在することを明らかにした。¹⁸¹⁾ このことにより, 酸性 α -glucosidase の重要性が広く認められ, グリコーゲン代謝酵素の一つとして注目されるようになった。¹⁸²⁾ 本酵素欠損による疾患は, 1932 年, Pompe¹⁸³⁾ により グリコーゲン蓄積症 (glycogen storage disease) の一つとして, "cardiomegadia glycogenica" として報告されたものである。現在, 糖原病 II 型 (glycogenosis type II) として分類されている^{184~186)} この病気は, 常染色体性劣性遺伝病で, 全身にグリコーゲンが著しく蓄積し, 筋肉中では正常時の 10 倍以上になると言われている。多くは心肥大から心不全を来し, そのほとんどが乳児期に死亡する (II の乳児型) が, ときに筋力低下のみを主症状とする小児型 (II の小児型), 成人型 (II の成人型) があると言われている。

小腸で消化・吸収機能を営む α -glucosidase とは別種の機能をもち細胞内酸性 α -glucosidase (至適 pH 4~5) が見出されたが, これとは別な中性 α -glucosidase (至適 pH 6~7) の存在と知られた。

いる。この酵素は細胞内ミクロソーム中に局在することから知られている。¹⁸⁷⁾
 血清¹⁸⁷⁾や尿中¹⁸⁸⁾中性 α -glucosidase は蛋白化学的, 免疫化学的方法によ
 る結果から, 肝臓や腎臓の細胞内酵素由来のものと考えられている。
 従って, 哺乳動物起源の酵素は, 便宜上, 小腸 α -glucosidase,
 細胞内の酸性 α -glucosidase と中性 α -glucosidase の3種に大別
 して呼ぶことが可能である。

酸性 α -glucosidase の精製は Auricchio^{189, 190)} から, ラット肝
 臓およびヒト腎臓酵素の Sephadex G-700 クロマトグラフィーにおける
 溶出の遅延現象を見出し以来, この方法を用いて種々の起源よりな
 されている。現在までに完全に単一標品が得られているものは, ウシ
 脾臓 (1968)¹⁹¹⁾, ウシ肝臓 (1969)¹⁹²⁾, ラット肝臓 (1970)¹⁹³⁾, 1972,¹⁹⁴⁾
 1981¹⁹⁵⁾, ウサギ肝臓 (1971)¹⁹⁶⁾, ヒト胎盤 (1972)¹⁹⁴⁾, ヒト肝臓
 (1974,¹⁹⁷⁾ 1975,¹⁹⁸⁾ 1977¹⁹⁹⁾), ヒト腎臓 (1982)¹⁸⁸⁾ など酵素である。

いずれの酸性 α -glucosidase にも共通することは, 多糖の glycogen
 に作用し得ることであるが, 種々の基質に関する, 詳しい特異性の
 検討はなされていない。

本章では, 植物起源酵素との比較において, また, 干葉ら
 の分類⁵⁶⁾による type-3 α -glucosidase の glucoamylase との区別の上
 で, 哺乳動物酸性 α -glucosidase の作用特異性を明瞭にする
 ことは大いに意義あるものと考え, フタ肝臓より本酵素を単離・精
 製することとした。上記のように, 幾つかの起源から既に精製
 されているが, 本章を記述するように, 詳細にその特異性が調べ
 られたのはこれが初めてである。

第2節 実験材料 および方法

1. 供試材料 フタ肝臓は札幌畜産公社 (江別市角山) より購入した。屠殺後、直ちに摘出した肝臓は、使用時まで氷冷した。

2. 試薬 maltopentaase, dextran, ethylenediamine-tetraacetic acid- Na_2 (EDTA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) および polyethylene glycol (羊井化学), maltotriose (和光純薬), maltotetraase, maltohexaase および maltoheptaase (盛進製薬), 4-methylumbelliferyl α -glucoside (Sigma) は全て市販品である。その他の試薬類は第2章に記載と同じである。

3. 酵素活性測定法 酵素活性は 0.5% maltose (あるいは shellfish glycogen) 0.2ml, 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 5ml は 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.8) 0.2ml, 酵素液 0.1ml からなる混合液を, 37°C で 3~30 分間反応せしめ, 遊離する glucose を Glucose AR-Test (和光純薬) を用いた Tris-glucose oxidase - peroxidase 法^{93,94)} により測定し求めた。1分間に 1 μmol の maltose を加水分解する量を maltase 1 単位, 1分間に glycogen から 1 μmol の glucose を遊離する量を glucoamylase 活性の 1 単位と定義した。第1章で述べたように, glucoamylase は α -glucosidase とは別種の酵素であるが, α -glucosidase の澱粉やオリゴ糖などの多糖水解作用は, 通常, "glucoamylase 作用" と呼ばれ, その活性は "glucoamylase 活性" と称されている。

4. 蛋白質の定量 精製酵素について得られた関係式,

$E'_{1\text{cm}}^{\text{1\%}}$ at 280 nm = 14.9, を用いて分光学的に測定した。

5. ディスク電気泳動 ポリアクリルアミド電気泳動は Ornstein の方法²⁰⁰⁾ に準じた。 2.5% ポリアクリルアミドゲル (0.5×7cm カラム) を用い, Tris-glycine 緩衝液系 (pH 8.3) で, 3 mA/tube の定電流, 7°C で 約90分を行った。 蛋白質の染色は Coomassie Brilliant Blue G-250 を用いて行った。

調製用 ポリアクリルアミド電気泳動は基本的には Reisfeld らの方法⁹⁸⁾ に準じた。 2.5% ポリアクリルアミドゲルの カラム (1×8cm) 1本 当り, 約20% のグリセリンを含む試料 (0.8ml, 蛋白量約3mg) を 充填し, 著者考案の装置 (Large Scale Disc Gel Electrophoresis; 和科盛商会) を用いて, β -alanine - 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 中, 12 mA/tube の定電流, 7°C で3時間を行った。

分子量測定のための SDS-ポリアクリルアミド電気泳動は Weber と Osborn の方法⁹⁹⁾ に従った。 0.1% SDS - 2.5% ポリアクリルアミドゲルを用い, 0.1% SDS - 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 中, カラム (0.5×10cm) 当り 8mA の定電流で, 7°C, 5時間を行った。 蛋白バンドは Coomassie Brilliant Blue G-250 で染色した。

6. 非還元末端残基の測定 第2章で記述した方法により, soluble starch, shellfish glycogen, amylopectin および β -limit dextrin の各非還元末端 glucose 濃度を, 10mg/ml 重量濃度で 1.42 mM, 5.99 mM, 2.13 mM および 7.35 mM と決定した。

第3節 実験結果および考察

I. 精製

1. 抽出 フタ肝臓6Kgを細片し、2mM EDTA および 0.2mM PMSF を含む生理的食塩水で十分に血抜きした後、2mM EDTA と 0.2mM PMSF 含有 0.01M リン酸緩衝液 (pH 6.8) 15l 中、Polytron (Kinematica) を用いてホモナイズした。低温 (7°C) で一晩放置後、1N HCl で pH 4.1 とし、遠心分離 (13,500×g, 15分) により上清を得た。1N NaOH で pH 6.8 に調整し、粗抽出液として以後の実験に供した。

2. 硫酸分画 粗抽出液に固形硫酸を添加し、33~80% 飽和画分の沈澱を遠心分離により得た。0.05M NaCl を含む 0.02M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に溶解後、同緩衝液に対し、24時間透析した。生じた沈澱を遠心分離で除去後、polyethylene glycol を用いて濃縮した。濃縮試料を再度上記緩衝液に対し、2日間透析した。

3. DEAE-Sepharose カラムクロマトグラフィー 透析試料を同緩衝液で平衡化した DEAE-Sepharose のカラム (2.6 × 25 cm) に通した。同緩衝液で十分カラム洗浄後、吸着した蛋白質を NaCl 直線濃度勾配法により溶出した。そのパターンを Fig. 34 に示した。非吸着部には pH 4.5 で高い活性を示す maltase があり、吸着部には pH 6.8 で高活性を示す酵素の画分が認められた。一方、glucoamylase 活性 (glycogen を水解し、glucose を遊離する活性) は非吸着部に多く認められた。

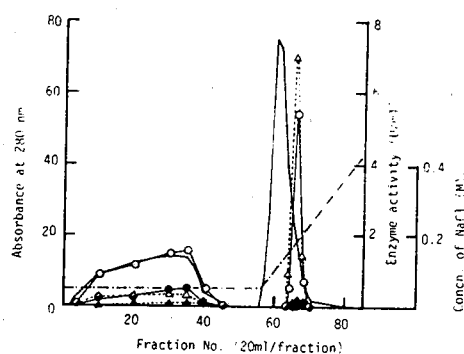


FIG.34. Chromatography of Pig Liver α -Glucosidases on a DEAE-Sepharose Column.

The enzyme solution (600 ml, 22.3 g of protein) was applied to a column (2.6 $\times$ 25 cm) of DEAE-Sepharose equilibrated with 0.02 M sodium phosphate buffer containing 0.05 M NaCl (pH 6.8). After removal of the non-adsorptive components, elution was carried out with a linear gradient of NaCl in the same buffer at a flow rate of 40 ml/hr.

—, absorbance at 280 nm; —○—, maltase activity (pH 4.5); —△—, maltase activity (pH 6.8); —●—, glucoamylase activity (pH 4.5); —▲—, glucoamylase activity (pH 6.8); ----, concn. of NaCl.

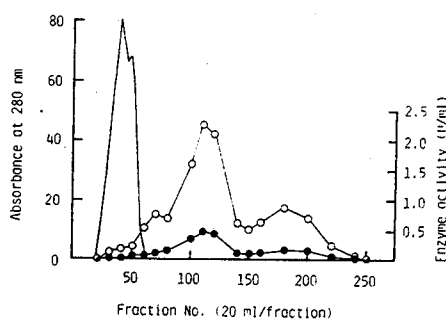


FIG.35. Gel Filtration of Pig Liver Acid α -Glucosidase on a Sephadex G-100 Column.

The enzyme solution (200 ml, 30.2 g of protein) was applied to a column (4.6 $\times$ 68 cm) of Sephadex G-100 equilibrated with 0.002 M sodium phosphate buffer (pH 6.8), and elution was carried out with the same buffer at a flow rate of 20 ml/hr.

—, absorbance at 280 nm; —○—, maltase activity (pH 4.5); —●—, glucoamylase activity (pH 4.5).

非吸着部を酸性 α -glucosidaseの画分, 吸着部を中性 α -glucosidase画分と判断した。

4. Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィー 酸性 α -glucosidase画分 (Fig. 34 の fraction No. 6 ~ No. 45) を 200 ml まで濃縮し, Sephadex G-100 のカラム (4.6 $\times$ 68 cm) を用いて, クロマトグラフィーを行った。溶出液には 0.002 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) を使用した。Fig. 35 に示したように, 目的の酵素蛋白質は他にかなり遅れて溶出された。完全な溶出には, カラム体積の約4倍容の

緩衝液を要した。動物起源の酸性 α -glucosidase を広く認めらるゝこの種の遅延現象^{189, 190)}は、デキストランと酵素との親和性によると思われる。活性画分 (fraction No. 90 ~ No. 220) は 20 ml に濃縮した。

5. 調製用電気泳動 glycerol と混合した試料を電気泳動後、ゲルに 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) を溶解した 4-methylumbelliferyl α -glucoside を塗布した。 α -glucosidase はこの基質に作用し、蛍光性の 4-methylumbelliferone を遊離することから、UV-ランプ (3650 Å) 照射によりその位置を確認することからできる。活性を示す部分のゲルを切り取り、細片後、0.005 M リン酸緩衝液 (pH 7.3) に浸漬し、酵素を抽出・回収した。

6. DEAE-Sepharose カラムクロマトグラフィー 抽出酵素を 0.005 M リン酸緩衝液 (pH 7.3) に対し透析後、同緩衝液で平衡化させた DEAE-Sepharose を用いて、再度、イオン交換クロマトグラフィーを行った。吸着酵素は 0 ~ 0.2 M NaCl を溶出した。maltase と glucoamylase の両活性は互いにパラレルであったが、僅かな不純物を含んでいた。

7. Bio-Gel P-150 カラムクロマトグラフィー 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) で平衡化させた Bio-Gel P-150 を用いてゲル濾過を行った。本操作は連続して 2 度行った。2 度目の典型的な溶出

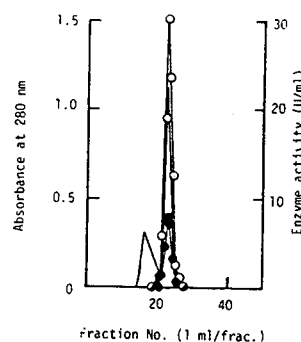


FIG. 36. Gel Filtration of Pig Liver Acid α -Glucosidase on a Bio-Gel P-150 Column (2nd).

The enzyme solution (1 ml, 4 mg of protein) was applied to a column (1 x 78 cm) of Bio-Gel P-150 equilibrated with 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 6.8), and elution was carried out with the same buffer at a flow rate of 2 ml/hr. —, absorbance at 280 nm; —○—, maltase activity (pH 4.5); —●—, glucoamylase activity (pH 4.5).

TABLE 7. SUMMARY OF PURIFICATION PROCEDURE FOR PIG LIVER ACID α -GLUCOSIDASE

Procedure	Total protein (mg)	Total activity (units)		Specific activity (units/mg)		Maltase/ Glucoamylase
		Maltase	Glucoamylase	Maltase	Glucoamylase	
Crude extract	89,000 ^a	4,400	1,190	0.05	0.01	3.7
Ammonium sulfate (33~80% satn.)	67,000 ^a	3,800	890	0.06	0.01	4.3
DEAE-Sepharose (1st)	30,200 ^a	2,600	520	0.09	0.02	5.0
Sephadex G-100	390 ^a	2,340	490	6.0	1.3	4.8
Preparative disc electrophoresis	115 ^b	1,740	440	15.2	3.8	4.0
DEAE-Sepharose (2nd)	59 ^b	1,250	320	21.2	5.4	3.9
Bio-Gel P-150 (1st)	38 ^b	956	245	25.2	6.4	3.9
Bio-Gel P-150 (2nd)	21.9 ^b	777	200	35.5	9.1	3.9

^a These values were calculated with the assumption that $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ at 280 nm was 10.

^b These values were calculated on the basis of the fact that $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ at 280 nm was 14.9.

パターンを Fig. 36 に示した。ここで得られた活性画分は精製標品として、以後の実験に使用した。

各精製過程における蛋白量、全活性、比活性 および maltose と glycogen 水解の活性比を Table 7 に示した。ブタ肝臓酸性 α -glucosidase は粗抽出液から 710 倍に、15.7% の収率 (いずれも maltase 活性から計算) で精製された。maltose 水解と glycogen 水解の両活性比は精製の途中段階より一定となることから、両基質水解作用は 1 種の酵素によると推定された。

8. 精製酵素の純度 精製酵素は Fig. 37 に示したように、ディスクゲル電気泳動的に、単一の酵素標品であることを確認された。同様の結果は、分子量測定用の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法によっても確認された。



FIG. 37 Polyacrylamide Disc Gel Electrophoresis of Purified Pig Liver Acid α -Glucosidase.

II. 物理化学的性質

1. 分子量 SDS-ホリブアクリ

ルアミド電気泳動法⁹⁹⁾によって測定した。標準蛋白質としては、分子量既知の7種類を使用した。Fig. 38の結果より、本酵素の分子量を100,000と決定した。Bio-Gel P-150を用いたゲル濾過法の溶出位置から、本酵素は単量体を存在するものと推定した。ここで得られた分子量はウシ肝臓の107,000¹⁹²⁾、ラット肝臓の114,000¹⁹³⁾、ヒト肝臓の98,000²⁰¹⁾、110,000²⁰²⁾、ヒト腎臓の97,000¹⁹²⁾に近い値であった。

2. 至適pHおよびpH安定性

本酵素のmaltoseとglycogenの加水分解におよぼすpHの影響を調べた。Fig. 39に記載した条件での両作用に対する至適pHは、いずれも4.5であった。一方、酵素を各種pHの緩衝液中で、50°C、20時間保持後、残存活性を測定して安定性を調べた。その結果、pH4.0ないし8.0の範囲で安定であることが明らかにになった。

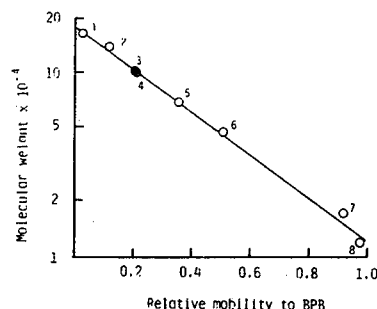


FIG. 38. Estimation of Molecular Weight of Pig Liver Acid α -Glucosidase by SDS-Electrophoresis.

1. γ -globulin (M.W., 16×10^4); 2. BSA dimer (M.W., 13.6×10^4); 3. pig liver acid α -glucosidase; 4. phosphorylase b (M.W., 9.6×10^4); 5. BSA monomer (M.W., 6.8×10^4); 6. ovalbumin (M.W., 4.7×10^4); 7. myoglobin (M.W., 1.76×10^4); 8. cytochrome c (M.W., 1.2×10^4).

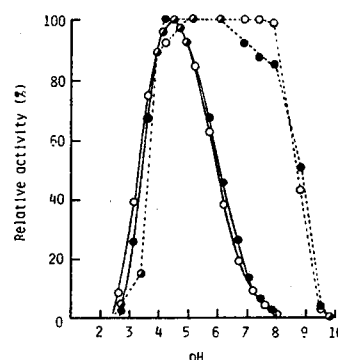


FIG. 39. pH-Activity and -Stability Curves of Pig Liver Acid α -Glucosidase.

pH-Activity curve: The reaction mixture containing 200 μ l of 0.5% maltose (or glycogen), 200 μ l of 0.1 M citrate-0.2 M sodium phosphate buffer and 100 μ l of enzyme (for maltase, 1.1×10^{-3} mg; for glucoamylase, 6.8×10^{-3} mg) solution was incubated at 37°C for 3 min.

pH-Stability curve: After the mixture containing 10 μ l of enzyme (1.1×10^{-3} mg) solution and 90 μ l of Britton-Robinson buffer had been kept at 5°C for 20 hr, 200 μ l of 0.5% maltose (or glycogen) and 200 μ l of 0.5 M sodium acetate buffer (pH 4.5) were added, and the reaction mixture was incubated at 37°C for 3 min (maltase) or 10 min (glucoamylase).

—○—, maltase activity; —●—, glucoamylase activity.

3. 熱安定性 pH 6.0

の Britton-Robinson 緩衝液中，
30 から 75°C の各温度で，15 分間酵
素を熱処理し，未処理酵素を対照
として残存活性を測定した。

Fig. 40 に示したように，両活性と
もに 50°C より安定性が保持され，
65°C よりほとんど活性を失っ
た。なお，maltose と glycogen
の水解作用に於て，差異は認め
られなかった。

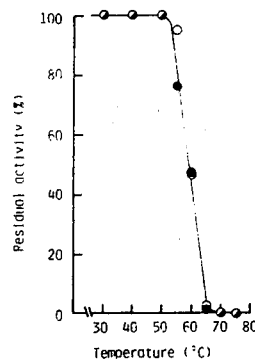


Fig. 40. Temperature-stability Curves of Pig Liver Acid α -Glucosidase.

After the mixture containing 10 μ l of enzyme (2.3×10^{-3} mg) solution and 90 μ l of Britton-Robinson buffer (pH 6.0) had been kept at various temperatures for 15 min, 200 μ l of 0.5% maltose (or glycogen) and 200 μ l of 0.5 M sodium acetate buffer (pH 4.5) were added, and the reaction mixture was incubated at 25°C for 3 min (mal-
tase) or 10 min (glucoamylase).

—○—, maltase activity; —●—, glucoamylase activity.

III. 基質特異性

1. maltose と

shellfish glycogen に対
する作用 前項から
理解されるように，本酵素
は maltose のみならず多糖
の glycogen をも加水分解
する。両者に対する作用

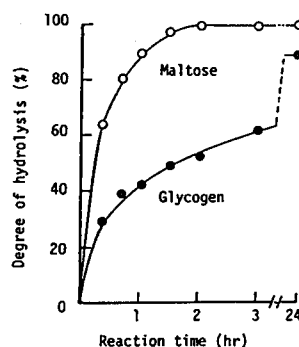


Fig. 41. Progresses of Hydrolytic Actions on Maltose and Shellfish Glycogen by Pig Liver Acid α -Glucosidase. The reaction mixture containing 0.4 ml of 0.5% substrate, 0.4 ml of 0.1M sodium acetate buffer (pH 4.5) and 0.2 ml of enzyme (0.023 mg) was incubated at 37°C. At the indicated times, 0.1 ml of the reaction mixture was pipetted out for determining the liberated glucose.

を，植物起源酵素の澱粉水解作用を調べた如く，まず，基質の
重量濃度一定条件下で調べた。Fig. 41 は両基質濃度を 2 mg/ml
とし，pH 4.5，37°C で酵素を作用させた場合の経時変化である。

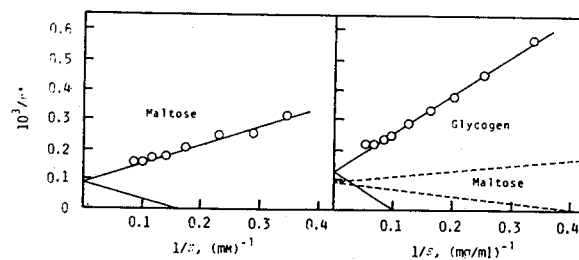


FIG. 42. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolyses of Maltose and Glycogen.

The reaction mixture containing 400 μ l of substrate at various concentrations, 50 μ l of 0.4 M sodium acetate buffer (pH 4.5) and 50 μ l of enzyme (0.4×10^{-3} mg) solution was incubated at 37 $^{\circ}$ C.

v^* : μ g of glucose from non-reducing terminal/mg of protein/min.

本条件では maltose は 5.85 mM, shellfish glycogen の非還元末端側 glucose は 1.2 mM で, 酵素が作用する部位の数では maltose の方が約 4.9 倍多い。このような条件で glycogen は maltose の約 1/2 の速度で水解され, 24 時間では約 90% の分解を観た。

両基質に対する酵素の加水分解能力を評価するために, Fig. 42 より K_m , V を測定した。maltose に対する K_m は 6.7 mM (2.3 mg/ml), shellfish glycogen に対しては 6.0 mM の非還元末端 glucose (10 mg/ml) であった。 V は maltose に関与して 12.2 mg of glucose from non-reducing terminal/mg of protein/min, shellfish glycogen に関与して 8.7 mg of glucose/mg of protein/min であり, その相対値は 100:71.3 であった。これらの各値は他の基質に関するものと同時に Table 8 にまとめ掲載した。 V より分子量 100,000 を用いて導かれる分子活性 k_o は 113 sec^{-1} (maltose) と 80.6 sec^{-1} (glycogen) となり, k_o/K_m は maltose で 16.9 $\text{sec}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$, shellfish glycogen で 13.4 $\text{sec}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ であることから, 高基質濃度 (V あるいは k_o の比較) に於ては, glycogen は maltose の 71.3% の速度で, 低濃度の基質条件下 (k_o/K_m の比較) では 79.3% の速度で, その他の基質濃度に於ては, 71.3~79.3% の範囲で水解

作用を受けることが明らかにになった。

2. マルトオリゴ糖に対する作用 種々のマルトオリゴ糖に
関して, Lineweaver-Burk のプロットから K_m , V を求め, それらに対する作用
を評価した。Fig. 43 より各オリゴ糖に対する K_m を算出したところ, G_2
(maltose) の 6.7 mM に対し, G_3 が 4.4 mM , G_4 が 5.9 mM , G_5 が
 11 mM , G_6 が 4.0 mM , G_7 が 5.6 mM , G_8 が 71 mM であった。一方,
 V については K_m は maltose の値を 100 とし, これに対する相対値を表わすと
 G_2 (100), G_3 (82.8), G_4 (86.9), G_5 (86.9), G_6 (90.2), G_7
(92.6) および G_8 (86.1) であった。従って, 各オリゴ糖により差異は
あるが, 全般的にみれば maltose とほぼ同程度 (V あるいは K_m の比と
 K_m/K_m の比の範囲内) に水解を受けることが明らかにになった。

3. 多糖類に対する作用 shellfish glycogen 以外の多
糖類に対してもその作用を調べた。基質として, amylopectin,
soluble starch, β -limit dextrin, amylose, dextran および
pullulan を用いた。maltose および glycogen を対照として,

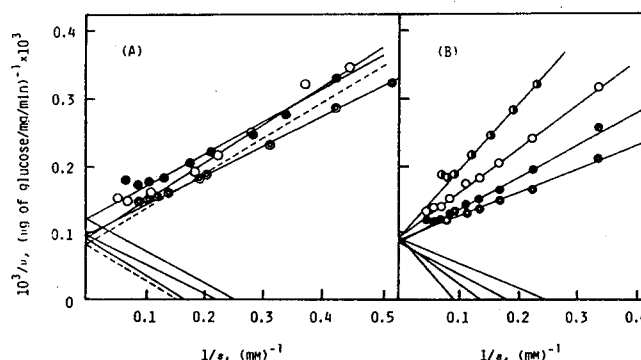


FIG. 43. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolyses of Maltooligosaccharides and Phenyl α -Maltoside.

A reaction mixture containing $400 \mu\text{l}$ of substrate at various concentrations, $50 \mu\text{l}$ of 0.4 M sodium acetate buffer ($\text{pH } 4.5$) and $50 \mu\text{l}$ of enzyme ($0.6 \times 10^{-3} \text{ mg}$) solution was incubated at 37°C .

(A): ---, G_2 ; —●—, phenyl α -maltoside; —○—, G_3 ; —○—, G_4 . (B): —○—, G_5 ; —○—, G_6 ; —○—, G_7 ; —○—, G_8 .

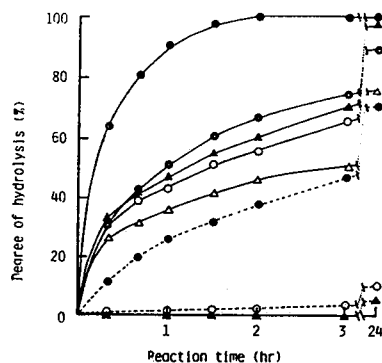


FIG. 44. Progress of Hydrolytic Actions on Maltose and Various α -Glucans of Pig Liver Acid α -Glucosidase.

The reaction mixture containing 0.4 ml of 0.5% substrate, 0.4 ml of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.5) and 0.2 ml of enzyme (0.023 mg) solution was incubated at 37°C. At the indicated times, 0.1 ml of the reaction mixture was pipetted out for determining the liberated glucose.

—●—, maltose; —▲—, soluble starch; —○—, amylopectin; —○—, glycogen; —△—, β -limit dextrin; —●—, amylose; —○—, dextran; —▲—, pullulan.

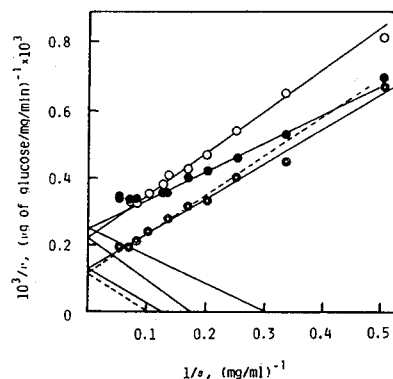


FIG. 45. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolyses of Soluble Starch, Amylopectin and β -Limit dextrin.

Experimental conditions were the same as those given in the legend to Fig. 43.

---, glycogen; —○—, soluble starch; —○—, amylopectin; —●—, β -limit dextrin.

水解の経時変化を観たのが Fig. 44 である。glycogen のみならず soluble starch, amylopectin, β -limit dextrin, amylase など多糖をも水解することから明らかになった。しかし、pullulan と dextran に対してはほとんど作用を示さなかった。

soluble starch, amylopectin, β -limit dextrin に対する水解速度を数量的に比較するため、Fig. 45 より速度パラメーターを求めた。

K_m は shellfish glycogen の 6.0 mM (非還元末端 glucose 濃度) に対し、soluble starch では 1.1 mM, amylopectin では 1.2 mM, β -limit dextrin では 2.4 mM であり、いずれも glycogen より小さい値を示した。一方、 V (あるいは k_0) は maltose の値を 100 とすると、glycogen の 71.3 に対し、soluble starch では 63.1, amylopectin では 36.9, β -limit dextrin では 32.8 であった。 V または k_0 の比較から高濃度基質条件下では maltose (100) > glycogen (71.3) > soluble starch (63.1) > amylopectin (36.9) > β -limit dextrin (32.8) の

順に, 低基質濃度では k_o/k_m の比較から, soluble starch (383) > amylopectin (206) > maltose (100) > β -limit dextrin (91.1) > glycogen (79.3) の順に水解されることを判明した。本酵素はこれより報告のある α -glucosidase と同様の多糖水解能を有することを確認された。

4. その他の α -グルコシド結合を有する基質に対する作用

ケルコニ糖類の kojibiose, nigerose, isomaltose, 合成基質の phenyl α -glucoside, phenyl α -maltoside および三糖類 panose に対する作用を調べた。特異性評価のための速度パラメーターは, ケルコニ糖類に関しては Fig. 46 より, phenyl α -maltoside に関しては Fig. 43 より, phenyl α -glucoside と panose に関しては Fig. 47 よりそれぞれ k_m , V を求め, 各値は Table 8 に掲載した。ブタ肝臓酸性 α -glucosidase はケルコニ糖類に関して, 基質濃度が高くなる時は maltose (100) > nigerose (75.4) > isomaltose (23.0) > kojibiose (18.0) の順に作用し, 一方, 低基質濃度に於ては

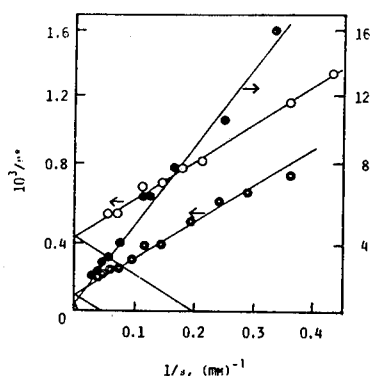


FIG. 46. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolyses of Kojibiose, Nigerose and Isomaltose. Experimental conditions were the same as those given in the legend to Fig. 43. —○—, kojibiose; —◐—, nigerose; —●—, isomaltose. r^* : μ g of glucose from non-reducing terminal/mg of protein/min.

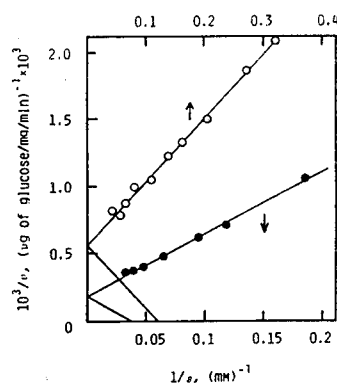


FIG. 47. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolyses of Phenyl α -Glucoside and Panose. Experimental conditions were the same as those given in the legend to Fig. 43. —○—, phenyl α -glucoside; —●—, panose.

maltase (100) > nigerase (25.4) > kojibiase (24.3) > isomaltase (1.8) の順で作用することから解った。panase に対しては maltase の 11.2~45.9% の範囲内で、phenyl α -glucoside および phenyl α -maltoside に対してはそれぞれ 11.2~14.8% および 67.2~112% の範囲内で作用することから明らかになった。

本酵素の作用様式および生成 glucose のアノマー型は既に文献⁶⁰で報告したように、maltotriase ならぬ phenyl α -maltase より α -glucose を生ずること、また、phenyl α -maltoside から初期産物から α -glucose と phenyl α -glucoside であることから、植物起源の酸性 α -glucosidase と同様に、exo型に作用し、 α -glucose を生ずる酵素であることを確認した。

Table 8. Kinetic Parameters of Pig Liver Acid α -Glucosidase on Various Substrates

Substrate	K_m ^{a)}	v ^{b)}	k_0 ^{c)}	k_0/K_m ^{d)}
Maltose	6.7 (2.3)	12.2 (100)	113	16.9 (100)
Maltotriose	4.4	10.1 (82.8)	93.5	21.3 (126)
Maltotetraose	5.9	10.6 (86.9)	98.1	16.6 (98.2)
Maltopentaose	11	10.6 (86.9)	98.1	8.9 (52.7)
Maltohexaose	4.0	11.0 (90.2)	102	25.5 (151)
Maltoheptaose	5.6	11.3 (92.6)	105	18.8 (111)
Maltodextrin (G ₁₅)	7.1	10.5 (86.1)	97.2	13.7 (81.1)
Kojibiose	5.0	2.2 (18.0)	20.4	4.1 (24.3)
Nigerose	20	9.2 (75.4)	85.2	4.3 (25.4)
Isomaltose	100	2.8 (23.0)	25.9	0.3 (1.8)
Panose	27	5.6 (45.9)	51.9	1.9 (11.2)
Phenyl α -glucoside	8.6	1.8 (14.8)	16.7	1.9 (11.2)
Phenyl α -maltoside	4.0	8.2 (67.2)	75.9	19.0 (112)
Soluble starch	1.1 (8.0)	7.7 (63.1)	71.3	64.8 (383)
Shellfish glycogen	6.0 (10)	8.7 (71.3)	80.6	13.4 (79.3)
Amylopectin	1.2 (5.7)	4.5 (36.9)	41.7	34.8 (206)
β -Limit dextrin	2.4 (3.3)	4.0 (32.8)	37.0	15.4 (91.1)

a) mM, (mg/ml).

b) mg of glucose liberated from non-reducing terminal/mg of protein/min. (Relative value).

c) sec⁻¹.

d) sec⁻¹·mM⁻¹. (Relative value).

第4節 要約

- I. フタ肝臓より硫酸分画, DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィーにより 酸性 α -glucosidase 画分と 中性 α -glucosidase 画分を得, 続く, Sephadex G-700 カラムクロマトグラフィー, 調製用ディスク電気泳動法, DEAE-Sephadex および Bio-Gel P-150 の各カラムクロマトグラフィーにより, 抽出液から 710 倍に, 177% の収率で 酸性 α -glucosidase を精製した。精製標品はディスク電気泳動法で, 単一の酵素であることを確認した。
- II. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法により分子量は 100,000 と算出した。pH に対して, 4.5 を作用最大を示し, 4.0 から 8.0 の範囲内で安定であることを認めた。温度に対しては 50℃ を安定であることを確認した。
- III. 種々の基質に対する速度パラメーターを求め, 特異性を数量的に明らかにした。maltotriose 以上のマルトオリゴ糖に対しては maltase とほぼ同程度作用し (maltase の 52.7~151% の範囲内), shellfish glycogen, soluble starch, amylopectin および β -limit dextrin に対しては maltase の 71.3~79.3%, 63.1~383%, 36.9~206% および 32.8~91.1% の速度で, ほぼ α -グルコシド結合を切断することからわかった。phenyl α -maltoside には maltase と同程度の速度 (67.2~112%) で, kojibiose, nigerose, isomaltase, panose, phenyl α -glucoside に対しては maltase の 18.0~24.3%, 25.4~75.4%, 1.8~23.0%, 11.2~45.9%, 11.2~14.8% の速度で作用することを明らかにした。

第5章 ウサギ筋肉酸性 α -glucosidaseの精製と諸性質

第1節 緒論

哺乳動物の細胞内 α -glucosidaseは作用至適pHから酸性 α -glucosidaseと中性 α -glucosidaseに二大別され、小腸膜の α -glucosidaseとは区別される。中性 α -glucosidaseはウシ脾臓²⁰³⁾、ウサギ筋肉²⁰⁴⁾、フタ肝臓^{187, 205)}、ラット腎臓²⁰⁶⁾、ヒト扁桃腺および胎盤²⁰⁷⁾、ヒト腎臓²⁰⁸⁾などからの酵素を性質から調べられ、glycogenなど、多糖水解作用が非常に弱いと一致している。藤盛¹⁸²⁾は動物酸性 α -glucosidaseに関する総説に於て、中性 α -glucosidaseの機能について言及しているが、いまだ明確な結論は得られていない。

これに対し、酸性 α -glucosidaseの研究は、はっきりとした目的意識に基づいてなされており、酵素の精製はほとんどがPompe病の解明と治療を主眼として行われている。従って、グリコーゲン貯蔵器官の一つである肝臓の酵素に関する研究^{189, 190, 192-199, 201, 202, 209-215)}が多いものと思われる。筋肉も肝臓と同様に、動物体内に於ける主たるグリコーゲン貯蔵組織であり、Pompe病によるグリコーゲンの異常蓄積は肝臓よりもむしろ筋肉であることが知られている。¹⁸⁶⁾ しかし、これまで筋肉からの酵素精製に成功した例はない。

1971年、Palmer²¹⁶⁾はウサギの筋肉から酸性 α -glucosidaseの単離を試みたが、途中でその精製を断念せざるを得なかった。すなわち、

ウサギ筋肉を十分に洗浄後，ホモゲナイズし，凍結・融解の後，遠心分離により抽出液を得，酸処理，硫酸分画 (30~60%) 後，Sephadex G-700 を用いてカラムクロマトグラフィーを行い，部分精製酵素標品を得たが，この段階での酵素が非常に不安定であること，また，引き続き Bio-Gel P-60 や DEAE-cellulose を用いたクロマトグラフィーに於ては，酵素がこれらの担体と吸着し，溶離されないことなどの理由から，それ以上の純化を諦めている。

本章では，哺乳動物の筋肉由来の酵素として，初めてウサギ酸性 α -glucosidase の精製に成功したので，その方法を記し，さらに，明らかとなった一般的諸性質，基質特異性について，その結果を記述する。

第2節 実験材料および方法

1. 供試材料 冷凍のウサギ筋肉は雪印食品株式会社より恵られた。室温で自然解凍後，実験に供した。

2. 試薬 maltopentaase, rabbit liver glycogen, oyster glycogen, EDTA, PMSF, polyethylene glycol (羊井化学), maltotriase および maltotriitol (林原生化学工業), maltotetraase, maltohexaase, maltoheptaase および maltooctaase (盛進製薬) は全て市販品である。その他の試薬類は第2章で記載と同じである。

3. 酵素活性測定法 酵素活性は 0.5% maltose 0.2 ml, 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) ないしは 0.1M リン酸緩衝液

(pH 6.8) 0.2 ml, 酵素液 0.1 ml からなる混合液を, 37°C で 3~15 分間反応せしめ, 遊離する glucose を Glucose AR-Test (和光純薬) を用いた, Triis-glucose oxidase - peroxidase 法^{93,94)} により測定し求めた。1 分間に 1 μ mol の maltose を加水分解する量を 1 単位と定義した。

4. 蛋白質の定量 精製酵素について得られた $E'_{1\%}^{1\text{cm}}$ at 280 nm = 11.3 の結果に基づいて, 分光学的方法で測定した。

5. ディスク電気泳動法 ホリアクリルアミド電気泳動は Reisfeld らの方法⁹⁵⁾ に準じて行った。7.5% ゲル (カラム 0.5 $\times$ 7 cm) を用い, β -alanine - 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 中, 3 mA/tube の定電流, 7°C で約 90 分を行った。泳動のマーカーとして cytochrome c を用いた。蛋白の染色は Coomassie Brilliant Blue G-250 を行った。

分子量測定は SDS-ホリアクリルアミド電気泳動は Weber と Osborn の方法⁹⁶⁾ に準拠した。泳動の諸条件は第 2 章に記してある。

6. 非還元末端残基の測定 第 2 章に示した方法により, 多糖類の非還元末端 glucose 濃度を 10 mg/ml の重量濃度に於て, 1.42 mM (soluble starch), 2.13 mM (amylpectin), 7.35 mM (β -limit dextrin), 5.99 mM (shellfish glycogen), 5.61 mM (oyster glycogen), 6.05 mM (rabbit liver glycogen) と決定した。

第 3 節 実験結果および考察

I. 精製

1. 抽出 ウナギ筋肉 10 kg を細片し, 1 mM EDTA およ

および 0.1 mM PMSF を含む生理食塩水で十分に洗浄し、血抜き後、 1 mM EDTA と 0.1 mM PMSF 含有 0.02 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) 20 L 中、Polytron (Kinematica) を用いてホモゲナイズした。 1 N HCl を pH 4.5 とし、一晩低温で放置後、遠心分離 ($13,500 \times g$, 15 分) により上清を得た。 1 N NaOH を pH 6.8 に調整したものを粗抽出液とした。

2. 硫酸分画 粗抽出液に固形硫酸を添加し、33~80% 飽和画分の沈澱を遠心分離により得た。沈澱を水で溶解後、水道水に対して2日間透析し、水不溶物を遠心分離で除去後、 0.002 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に対して3日間透析した。こびりついた沈澱を再び遠心分離で除去後、上清を polyethylene glycol を用いて濃縮し、再度、上記緩衝液に対して2日間透析した。

3. Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィー 透析試料を 0.002 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) で平衡化させ、Sephadex G-100 カラム ($3.6 \times 50\text{ cm}$) に通した。溶媒にはカラム体積の約3倍量の緩衝液を要した。Fig. 48 に示したように、pH 4.5 で高い活性を示す酸性 α -glucosidase は、デキストランゲル (Sephadex) との相互作用により他の蛋白質からかなり選別して溶出された。従って、pH 6.8 で高活性を示す中性

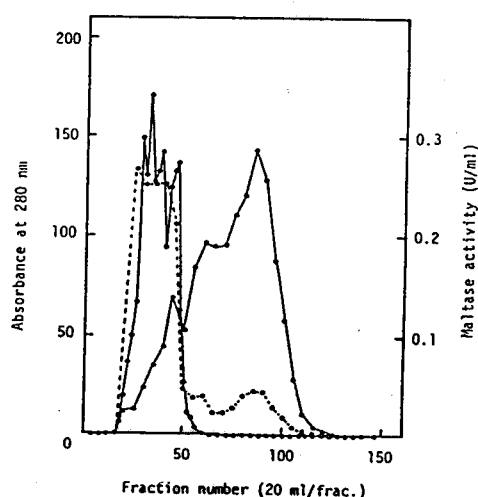


Fig. 48. Gel Filtration of Rabbit Muscle α -Glucosidases on a Sephadex G-100 Column. The enzyme solution (480 ml, 63 g of protein) was applied to a column ($3.6 \times 50\text{ cm}$) of Sephadex G-100 equilibrated with 0.002 M sodium phosphate buffer (pH 6.8), and proteins were eluted with the same buffer at a flow rate of 20 ml/hr . —○—, absorbance at 280 nm ; —●—, maltase activity at pH 4.5; ---, maltase activity at pH 6.8.

α -glucosidase とは完全に分離することができた。活性画分 820 ml (fraction No. 60 ~ No. 700) を濃縮し, 100 ml とした。

4. 硫酸画分 濃縮試料を再び硫酸で塩析した。35~50% 飽和画分の活性回収率は塩析前からみて約30%と低いが, 本操作により以後の各クロマトグラフィーでは分離不能な交雑蛋白質を分離・除去することができた。

5. CM-TOYOPEARL カラムクロマトグラフィー 0.01M 酢酸緩衝液

液 (pH 5.0) に対して透析した試料を, 同緩衝液に平衡化した CM-TOYOPEARL カラム (1.5 x 13.5 cm) を用いて, イオン交換クロマトグラフィーを行った

(Fig. 49)。吸着酵素は NaCl の直線濃度勾配法により溶出した。このステップ

は CM-TOYOPEARL を用いて酵素を高度に分離した初めての例であった。²¹⁾ 0.2~0.3 M NaCl 溶出画分 18 ml (Fr. No. 62 ~ No. 70) を濃縮し, 0.2 ml とした。

6. TOYOPEARL HW-55 カラムクロマトグラフィー

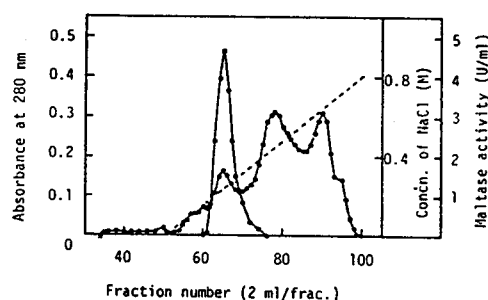


Fig. 49. Chromatography of Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase on a CM-TOYOPEARL Column. The enzyme solution (37 ml, 25 mg of protein) was applied to a column (1.5 x 13.5 cm) of CM-TOYOPEARL equilibrated with 0.01M sodium acetate buffer (pH 5.0). After removal of the non-adsorptive components, elution was carried out with a linear gradient of NaCl in the same buffer at a flow rate of 20 ml/hr. —○—, absorbance at 280 nm; —●—, maltase activity at pH 4.5; ----, concentration of NaCl.

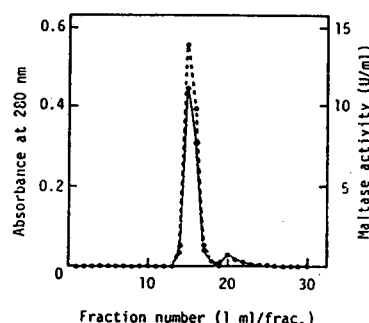


Fig. 50. Gel Filtration of Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase on a TOYOPEARL HW-55 Column. The enzyme solution (0.2 ml, 1.2 mg of protein) was applied to a column (1 x 38 cm) of TOYOPEARL HW-55 equilibrated with 0.02M sodium phosphate buffer (pH 6.8), and elution was carried out with the same buffer at a flow rate of 8 ml/hr. —○—, absorbance at 280 nm; ---●---, maltase activity at pH 4.5.

Table 9. Summary of Purification Procedure for Rabbit Muscle Acid
 α -Glucosidase

Procedure	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (U/mg)	Purification (-fold)	Recovery (%)
Crude extract	680,000 ^{a)}	330	0.0005	1	100
Ammonium sulfate (33-60% satn.)	93,000 ^{a)}	230	0.002	4	69.7
Sephadex G-100	291 ^{a)}	159	0.55	1,100	48.2
Ammonium sulfate (35-50% satn.)	25 ^{a)}	47.2	1.9	3,800	14.3
CM-TOYOPEARL	1.2	34.1	28.4	56,800	10.3
TOYOPEARL HW-55	0.7	25.1	35.9	71,800	7.6

a) These values were calculated with the assumption that $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ at 280 nm was 10, and the others were calculated on the basis of the fact that $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ at 280 nm was 11.3.

TOYOPEARL HW-55 カラム (1×38 cm) を用いてゲル濾過を行った。カラムの平衡化および溶出には 0.02M リン酸緩衝液 (pH 6.8) を用いた。溶出パターンを Fig. 5D に示した。ここで得られた活性画分 (fraction No. 14 ~ No. 17) を精製酵素標品として、以後の実験に供した。

各精製過程における全蛋白量、全活性、比活性、精製度および回収率を Table 9 に示した。本酵素は抽出液より 7.6% の収率で、71,800 後に精製された。Palmer の指摘^{21b)} のように、Bio-gel P-150, DEAE-Sephadex および -cellulose, CM-sephadex および -cellulose など担体とした場合、活性 (酵素) の回収率は 10% 以下であり、本酵素の精製には不適であった。近年開発された TOYOPEARL とその誘導体の使用で、本酵素の精製が成功したと言えよう。

7. 精製酵素の純度 精製酵素の均一性をホリアクリルアミドディスク電気泳動法で調べた。Fig. 5I の結果から、単一の標品であることを認めた。同様の結果は、SDS-電気泳動法

からと得られた。

II. 物理化学的性質

1. 分子量 SDS-

ホリアクリルアミド デリス電気泳動法⁹⁹⁾により測定した。

標準蛋白質として分子量既知のもの6種類を使用した。

Fig. 52より、ウサギ筋肉酸性 α -glucosidaseの分子量を102,000と算出した。前章で精製したブタ肝臓酵素の100,000、ウシ肝臓酵素の107,000¹⁹²⁾、ラット肝臓酵素の114,000¹⁹³⁾、ヒト肝臓酵素の98,000²⁰¹⁾と110,000²⁰²⁾、ヒト腎臓の97,000¹⁹⁰⁾に近似した分子量であった。

2. 至適pHおよびpH安定性 種々のpHの Britton-

Robinson 緩衝液中、37°Cで5分間、maltoseあるいはshellfish glycogenに作用させ、酵素作用の至適pHを求めた。Fig. 53に示したように、両基質の水解に於て、4.5で最大活性を示した。

精製酵素と Sephadex G-700 カラムクロマトグラフィー後の部分精製

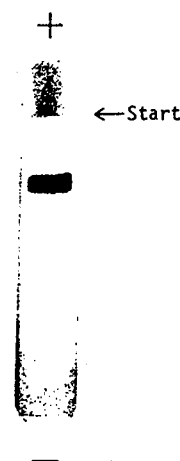


Fig. 51. Polyacrylamide Disc Gel Electrophoresis of Purified Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase.

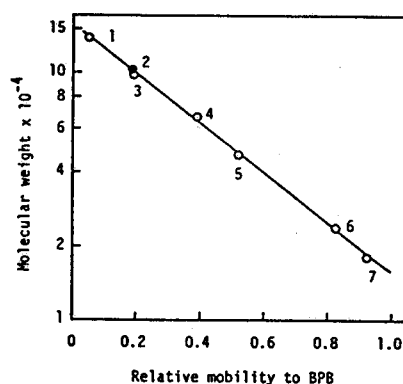


Fig. 52. Estimation of Molecular Weight of Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase by SDS-Electrophoresis. 1, bovine serum albumin dimer (M.W., 13.6×10^4); 2, acid α -glucosidase; 3, phosphorylase b (M.W., 9.6×10^4); 4, bovine serum albumin monomer (M.W., 6.8×10^4); 5, ovalbumin (M.W., 4.7×10^4); 6, trypsin (M.W., 2.3×10^4); 7, myoglobin (M.W., 1.76×10^4).

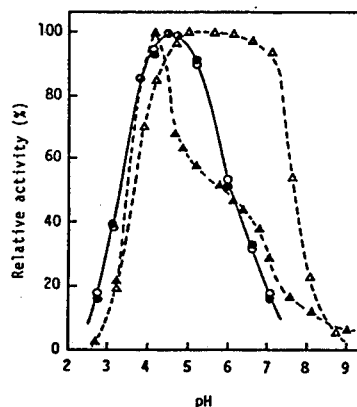


Fig. 53. pH-activity and -stability Curves of Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase. pH-activity curve: The reaction mixture containing 100 μ l of enzyme (0.32 μ g), 200 μ l of Britton-Robinson buffer and 200 μ l of 0.5% maltose (or glycogen) was incubated at 37°C for 5 min. —○—, maltose; —●—, glycogen. pH-stability curve: After the mixture containing 20 μ l of enzyme (0.32 μ g for purified enzyme, 25 μ g for partially purified enzyme) and 80 μ l of Britton-Robinson buffer had been kept at 5°C for 20 hr, 200 μ l of 0.5M sodium acetate buffer (pH 4.5) and 200 μ l of 0.5% maltose were added, and the reaction mixture was incubated at 37°C for 5 min. --△--, purified enzyme; --▲--, partially purified enzyme.

酵素の二者について、pH安定性を maltase 活性を指標として調査した (Fig. 53)。各種の pH で、5°C、20 時間の処理で、精製酵素は pH 4.5 ~ 7.0 の範囲で安定であることが確認された。一方、部分精製酵素は pH 4.0 で最大の残存活性を示し、他の pH 域では非常に不安定であった。精製酵素の安定性曲線と比べて、弱酸性および中性域で大きな安定性の落ち込みが認められ、これらの pH 域で作用する protease の混入が想起された。ここから得られた結果は、Palmer から Sephadex G-700 カラムクロマトグラフィー後に得た部分精製酵素について調べた安定性曲線の結果⁽²¹⁸⁾と非常に良く類似していた。彼はその標品が不安定であり、保存が困難であることを述べているが、その理由については言及していない。protease による α -glucosidase の分解により、見掛け上、活性が失われるものと思われる。

3. 熱安定性

20 から 80°C の各温度で 15 分間 酵素を熱処理後、未処理の酵素液を対照に、37°C で 5 分間、maltose あるいは shellfish glycogen に作用させ、その残存活性から酵素の安定性を調べた。Fig. 54 に示したように、両基質に対する作用は同じ挙動を示し、45°C 温度では徐々に活性を失い、

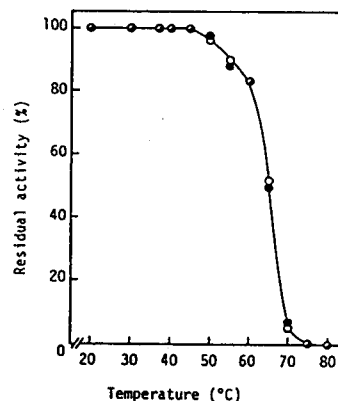


Fig. 54. Temperature-stability Curves of Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase. After the mixture containing 100 μ l of enzyme (0.32 μ g) and 200 μ l of 0.1M sodium acetate buffer (pH 4.5) had been kept at various temperature for 15 min, 200 μ l of 0.5% maltose (or glycogen) were added, and the reaction mixture was incubated at 37°C for 5 min. —○—, maltose; —●—, glycogen.

45°C までは安定であり、これ以上の 75°C では完全に失活することを認

III. 基質特異性

1. maltose と shellfish

glycogen に対する作用
本酵素の作用特異性を明確にする目的で、まず、maltose と多糖 shellfish glycogen に対する作用を調べた。

Fig. 55 は両基質濃度を 2mg/ml とし、pH 4.5, 37°C で加水分解の経時変化を観た

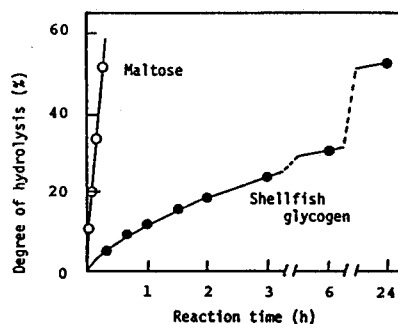


Fig. 55. Progresses of Hydrolytic Actions on Maltose and Shellfish Glycogen of Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase. The reaction mixture containing 0.4 ml of 0.5% substrate, 0.4 ml of 0.1M sodium acetate buffer (pH 4.5) and 0.2 ml of enzyme (0.01 mg) was incubated at 37°C. At the indicated times, 0.1 ml of the reaction mixture was pipetted out for determining the liberated glucose.

のである。本条件下、反応初期に於ては glycogen の加水分解率は maltose のその約10%であった。

このような一定基質濃度(重量比が一定)での速度比とは別に、両基質の真の α -グルコシド結合

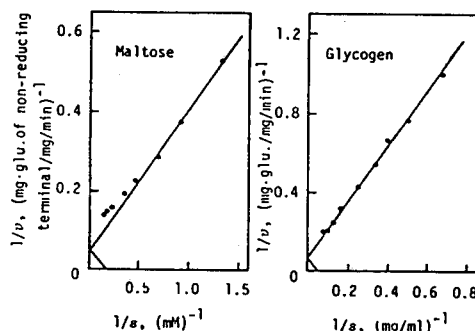


Fig. 56. Double Reciprocal Plots for Hydrolyses of Maltose and Shellfish Glycogen by Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase. The reaction mixture containing 100 μ l of enzyme (0.13 μ g), 100 μ l of 0.2M sodium acetate buffer (pH 4.5) and 300 μ l of substrate was incubated at 37°C.

水解力を比較するために、Fig. 56 に示した Lineweaver-Burk のプロット(両逆数プロット)より速度パラメーターを求めた。 K_m は maltose に対して 6.3 mM (2.2 mg/ml) であり、 β -肝臓酵素(第4章)の 6.7 mM と近似していた。一方、shellfish glycogen に対する K_m は 12 mM (20 mg/ml) で、 β -肝臓酸性 α -glucosidase の 2 倍入る値であった。最大速度 V は maltose に関して、19.0 mg of glucose from non-reducing terminal / mg of protein / min であり、glycogen では 12.7 mg of glucose / mg of protein / min で、その比は 100 (maltose) : 66.8 (shellfish glycogen) であった。 V より分子量 102,000 を用いて算出される分子活性 k_o 、また、 k_o/K_m の値とともに K_m , V 値を Table 10 に列記した。ここから容易に理解できるように、高濃度基質(V あるいは k_o の比較)では shellfish glycogen は maltose の 66.8% の速度で、一方、低基質濃度の条件下では k_o/K_m の比較から、maltose の 35.2% の速度で α -グルコシド結合が切断されることになった。

2. マルトオリゴ糖に対する作用 種々のマルトオリゴ糖に

関して, Lineweaver-Burk のプロットから K_m , V を求め, それらに対する作用を調べた。Fig. 57 より得られた各オリゴ糖に対する K_m は maltose の 6.3 mM に対し, G_3 (2.6 mM), G_4 (5.9 mM), G_5 (3.0 mM), G_6 (5.9 mM), G_7 (5.9 mM), G_8 (5.9 mM), G_{13} (7.7 mM) および G_{17} (5.6 mM) であった。一方, V あるいはこれより導かれる k_o は maltose のそれを 100 とし相対値を表わすと, G_3 (75.3), G_4 (189.5), G_5 (43.7), G_6 (43.7), G_7 (43.7), G_8 (43.7), G_{13} (45.3) および G_{17} (45.3) であった。maltotriose と maltotetraose の V については k_o は maltose の値と大きな差異はなかった, maltopentase 以上の重合度のオリゴ糖に関しては, maltose の値の半分以下であった。従って, 高基質濃における水解比は maltopentase 以上は maltose の約 1/2 であり, 逆に, 低基質濃度では k_o/K_m から G_3 (183) > G_2 (100) > G_4 (96.1) > G_5 (91.9) > $G_6 = G_7 = G_8$ (46.8) > G_{13} (37.0) > G_{17} (32.0) の順に水解されることを判明した。各速度パラメータは Table 70 に

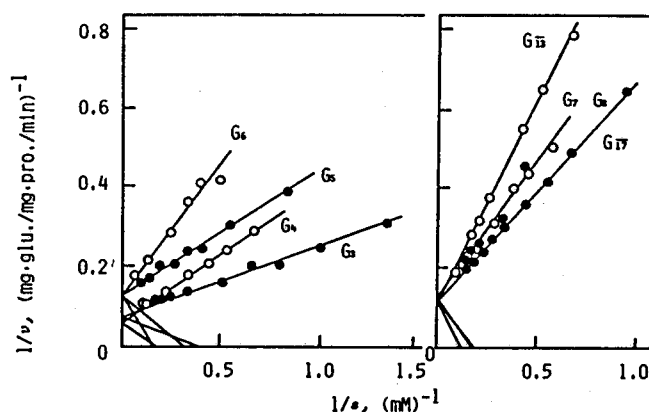


Fig. 57. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolyses of Maltooligosaccharides by Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase. The experimental conditions were the same as in Fig. 56.

まとめて記載した。

3. 多糖類に対する作用

shellfish glycogen 以外の多糖類に対する作用を調べた。

基質としては soluble starch, amylopectin, β -limit dextrin,

amylose, dextran および pullulan を使用した。

これまでの多くの研究者と同様に、一定基質濃度

(2mg/ml) に於ける水解の経時変化を調べた。

Fig. 58 は pH 4.5, 37°C

で混合液 1ml 当り 0.01

mg の酵素を作用させた

時の各基質より遊離する glucose を経時的に

観たものである。

maltose と shellfish glycogen は比較のため

に用いた。種々の多

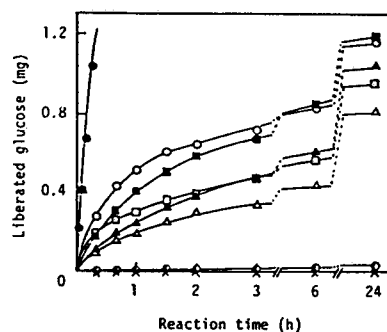


Fig. 58. Progresses of Hydrolytic Actions on Various α -Glucans by Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase. The experimental conditions were the same as in Fig. 55. —●—, maltose; —○—, soluble starch; —■—, amylopectin; —□—, β -limit dextrin; —▲—, shellfish glycogen; —△—, amylose; —◇—, dextran; —✕—, pullulan.

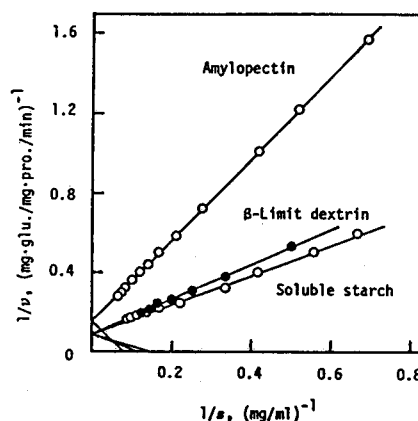


Fig. 59. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolyses of Soluble starch, Amylopectin and β -Limit dextrin by Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase. The experimental conditions were the same as in Fig. 56.

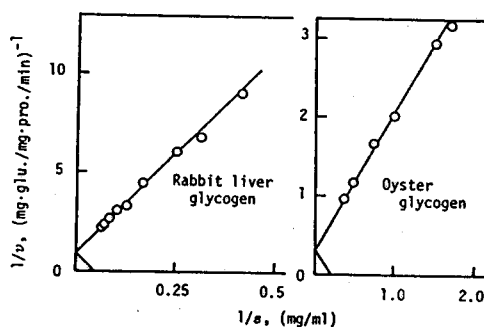


Fig. 60. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolyses of Rabbit liver and Oyster Glycogen by Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase. The experimental conditions were the same as in Fig. 56.

糖類にも水解作用を示し、本条件での α -glucan 水解の見掛けの速度は soluble starch > amylopectin > β -limit dextrin > shellfish glycogen > amylose の順であり、dextran や pullulan には作用しなかった。

soluble starch, amylopectin, β -limit dextrin のほか、起源を異にする 2 種の glycogen, すなわち, rabbit liver glycogen と oyster glycogen の計 5 種の多糖に対する速度パラメーターを求め (Fig. 59 および Fig. 60), 各基質の α -グルコシド結合水解の真の速度比を計算した。Km はそれぞれ非還元末端 glucose 濃度表示で shellfish glycogen の 12 mM に対し, soluble starch に関与しては 1.1 mM, amylopectin に関与しては 2.7 mM, β -limit dextrin に関与しては 6.7 mM, rabbit liver glycogen に関与しては 13 mM, oyster glycogen に関与しては 2.8 mM であった。また, 各多糖類の α -グルコシド結合水解の最大速度 V (あるいは k_0) は maltose の値を 100 とすると, shellfish glycogen : 66.8, soluble starch : 54.2, amylopectin : 31.6, β -limit dextrin : 54.2, rabbit liver glycogen : 5.3, oyster glycogen : 15.3 であった。従って, 基質の高濃度の場合には V あるいは k_0 から理解されるように, maltose (100) > shellfish glycogen (66.8) > soluble starch = β -limit dextrin (54.2) > amylopectin (31.6) > oyster glycogen (15.3) > rabbit liver glycogen (5.3) の順および速度比で, 低基質濃度に於ては, soluble starch (31.2) > maltose (100) > amylopectin (73.9) > β -limit dextrin (51.1) > shellfish glycogen (35.2) > oyster glycogen

(34.5) > rabbit liver glycogen
(2.5) の川尻および maltose との
速度比で, α -グルコシド結合が
切断されることから判った。

三者の glycogen に対する速度
パラメーターが異なるのは, それ
ぞれの微細構造の差異に起
因するものと考えられる。^{219, 220)}

4. その他の α -グルコシ
ド結合を有する基質に対する
作用 グルコニ糖類の
Kojitriase, nigerase, iso
maltose, 合成基質 α -phenyl
 α -glucoside, phenyl α -
malto-side, および panose
と maltotriitol に対する作
用を調べた。 それぞれに
対する K_m , V は Fig. 67 ~
Fig. 83 より求め, Table 70 に
列記した。 グルコニ糖類
に属して, V あるいは K_m より,
高濃度の基質では maltose
= nigerase (100) > koji-

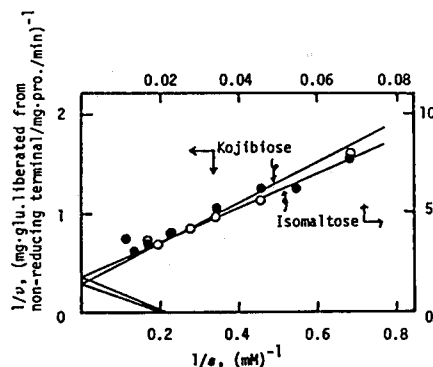


Fig. 61. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolyses of Kojibiose and Isomaltose by Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase. The experimental conditions were the same as in Fig. 56.

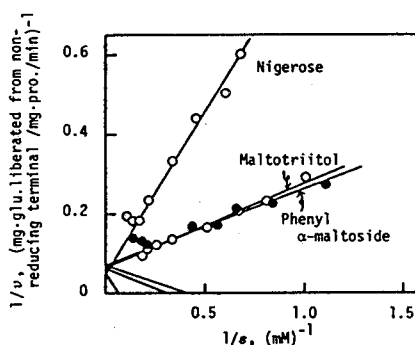


Fig. 62. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolyses of Nigerose, Phenyl α -maltoside and Maltotriitol by Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase. The experimental conditions were the same as in Fig. 56.

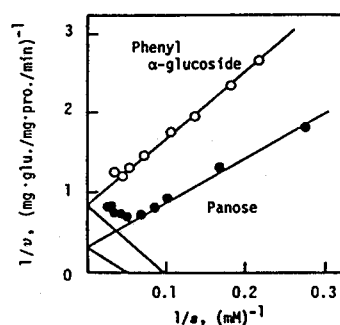


Fig. 63. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolyses of Phenyl α -glucoside and Panose by Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase. The experimental conditions were the same as in Fig. 56.

Table 10. Kinetic Parameters of Rabbit Muscle Acid
α-Glucosidase on Various Substrates

Substrate	$K_m^a)$	$V^b)$	$k_o^c)$	$k_o/K_m^d)$
Maltose	6.3 (2.2)	19.0 (100)	179	28.4 (100)
Maltotriose	2.6	14.3 (75.3)	135	51.9 (183)
Maltotetraose	5.9	17.0 (89.5)	161	27.3 (96.1)
Maltopentaose	3.0	8.3 (43.7)	78.4	26.1 (91.9)
Maltohexaose	5.9	8.3 (43.7)	78.4	13.3 (46.8)
Maltoheptaose	5.9	8.3 (43.7)	78.4	13.3 (46.8)
Maltooctaose	5.9	8.3 (43.7)	78.4	13.3 (46.8)
Maltodextrin (GII)	7.7	8.6 (45.3)	81.2	10.5 (37.0)
Maltodextrin (GI7)	5.6	8.6 (45.3)	81.2	9.1 (32.0)
Kojibiose	5.0	2.7 (14.2)	25.5	5.1 (18.0)
Nigerose	16	19.0 (100)	179	11.2 (39.4)
Isomaltose	48	0.5 (2.6)	4.7	0.1 (0.4)
Panose	20	3.2 (16.8)	30.2	1.5 (5.3)
Maltotriitol	3.3	14.3 (75.3)	135	40.9 (144)
Phenyl α-glucoside	11	1.1 (5.8)	10.4	0.9 (3.2)
Phenyl α-maltoside	2.5	12.8 (67.4)	121	48.4 (170)
Soluble starch	1.1 (7.7)	10.3 (54.2)	97.3	88.5 (312)
Shellfish glycogen	12 (20)	12.7 (66.8)	120	10.0 (35.2)
Rabbit liver glycogen	13 (21)	1.0 (5.3)	9.4	0.7 (2.5)
Oyster glycogen	2.8 (5.0)	2.9 (15.3)	27.4	9.8 (34.5)
Amylopectin	2.7 (13)	6.0 (31.6)	56.7	21.0 (73.9)
β-Limit dextrin	6.7 (9.1)	10.3 (54.2)		14.5 (51.1)

a) mM, (mg/ml).

b) mg of glucose liberated from non-reducing terminal/mg of protein/min. (Relative value).

c) sec^{-1} .

d) $\text{sec}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$. (Relative value).

triose (14.3) > isomaltose (2.6) の順および水解比で、低基質濃度では k_o/K_m の比較から、maltose (100) > nigerose (39.4) > kojibiose (18.0) > isomaltose (0.4) の順および水解速度の比が分解されることから明らかになった。他の基質に関しては、maltose に対して panose が 5.3~16.8%, maltotriitol が 78.3~144%, phenyl α-glucoside が 3.2~5.8%, phenyl α-maltoside が 67.4~170% の範囲で水解されることが判じた。

Table 10 に、以上のようにして得られた種々の基質に関する速度パラメータを

集約した。全体として、ウサギ筋肉酸性 α -glucosidaseの特異性は前章のブタ肝臓酵素のものに類似していた。しかし、筋肉酵素は isomaltase や panose に対する作用がブタ肝臓酵素に比べて弱く、 α -1,6 結合水解能は低いものと考えられる。

なお、本酵素の作用様式および生成物のアノマー型について、ガス chromatography 法⁶⁰⁾により、phenyl α -maltoside 水解の初期産物として、 α -glucose と phenyl α -glucoside を生ずることから、exo 型に作用し、 α 型 glucose を産する酵素であることを確認している。このことはこの章で本論文でも述べたように、全ての α -glucosidase に共通することであり、同じ exo 型の酵素でも β -glucose を生ずる glucoamylase^{60,61)} とは明確に区別される。

第4節 要約

- I. ウサギ筋肉より硫酸分画 (33~60% 飽和画分), Sephadex G-700 カラムクロマトグラフィー, 硫酸分画 (35~50% 飽和画分), CM-TDYOPEARL および TDYOPEARL HW-55 の各カラムクロマトグラフィーにより、抽出液から 71,800 倍に、76% の収率で酸性 α -glucosidase を精製した。精製酵素標品はディスク電気泳動的に単一であった。哺乳動物の筋肉酸性 α -glucosidase が均一に単離されたのは本酵素が初めてである。
- II. SDS-電気泳動法により分子量は 102,000 と算出された。pH に対して 4.5 を作用至適を示し、4.5 から 7.0 の範囲において安定であった。温度に対しては 45°C を安定であることを確認した。

Ⅲ. 各種マルトオリゴ糖, 多糖類, グルコニ糖類 および 合成基質等に対する特異性を明らかにした。 *malto-triose*, *malto-tetraose* は *maltose* とほぼ同程度水解し, *malto-pentaose* 以上の重合度からなる マルトオリゴ糖には *maltose* の 約 1/2 の速度で作用することを明らかにした。 *glycogen* に対してはその起源により異なる水解速度を示し, 最も作用を受け易い *shellfish glycogen* の α -グルコシド結合切断速度は *maltose* の 35.2 ~ 66.8% であることを判った。 特異性は全体的にみれば, マウス肝臓酸性 α -glucosidase に類似していたが, α -1,6 結合水解能はむしろ低い酵素であることを明らかにした。

第6章 酸性 α -glucosidase の少糖類と多糖類 加水分解部位の共通性

第1節 緒論

1894年, Fischer⁴³⁾は酵母 maltase についての研究成果を基にして, 酵素と基質に関する有名な "lock and key" 説を提唱した。すなわち, 基質を金錠に, 酵素を錠前にたとえ, 酵素はある特定の基質ないしは共通の分子構造を有する基質にのみ作用すると捉えたもので, この概念は現在でも広く受け入れられている。

第1章で述べたように, α -glucosidase は非常に多くの基質に対して水解作用を示し, その特異性は起源によって異なっている。植物や哺乳動物起源の酸性 α -glucosidase は, いずれも α -1,4 結合からなるマルトオリゴ糖, 結合を要するケルコニ糖類, phenyl α -glucoside や phenyl α -maltoside などの低分子基質のみならず、澱粉やケルコゲンなどの高分子多糖類にも水解作用を示す。exo 型酵素であることから, 基質の " α -glucosyl" 部位が共通の分子構造と見做すことが出来る。しかし, α -glucosidase は古くは "maltase" と呼ばれていたように, 多糖を水解しないものとして, 澱粉などの加水分解はいわゆる amylase のみによるものと考えられていた。従って, 動植物起源の酸性 α -glucosidase による多糖類の加水分解については, マルトースなどのオリゴ糖水解部位と同じ部位で行われるのか, あるいは全くこれとは独立した, 別の場所で行われるのか注目されていた。特に, 近年に於ける哺乳動物臓器の酸性 α -glucosidase の

研究から、グリコゲン代謝上重要な位置を占める酵素としての観点から行われてきた経緯より、この酵素の少糖類(オリゴ糖)と多糖類水解部位については研究の初期より関心を持たれていた。

Jeffrey^{29, 193)}はラット肝臓酵素によるマルトースとグリコゲンの水解反応に於て、それぞれの基質が互いに拮抗阻害を示すか、陽イオンおよび阻害剤 *turanose* 存在下での両基質水解に差異が認められること、また、水解反応の作用至適 pH が異なることなどから、複数の結合部位が存在する可能性があると論じている。これと同様のことを *Palmen*^{30, 314)} によりウサギ筋肉酸性 α -glucosidase に関してと推測されている。すなわち、マルトースとグリコゲンの水解に対する *trehalose*, *turanose*, *glucono- δ -lactone* などの阻害剤や Na^+ イオンの影響、至適 pH などの差異から、少糖類と多糖類を別々に結合する2個の部位が存在する可能性を述べ、また、マルトースとグリコゲンが互いに拮抗的阻害の作用を示すこと、両者間で糖転移が起ることから、2つの結合部位が非常に近接していると考察した。しかし、*Palmen* が使用した酵素は既述したように部分精製標品であり、この種の研究には不適当であると判断される。ウサギ肝臓酵素³²⁾では、3M 尿素処理により、マルトース分解活性とグリコゲン分解活性のそれぞれのみを示す二成分に解離することと、デスク電気泳動法を用いた結果から推察されているが、やはり、この酵素に関する標品の純度の問題がある。一方、1977年、千葉²²¹⁾はマルトースと澱粉よりなる混合系を用いた速度論的方法の解析結果から、ブタ血清由来の中性 α -glucosidase とソバ酸性 α -glucosidase では、両基質が共通の活性部位に作用を受けるとと考察している。

このように、千葉ら⁵²⁾の分類による type-3 α -glucosidase の少糖と多糖加水分解に関し、その部位について、現在のところ相及する二説がある。これらのいずれが真実であるのか、あるいは一般的事実であるのかを明確にすることは大いに意義があるものと考えられる。すなわち、もし、少糖と多糖が共通の部位で水解されることか一般的事実とするならば、type-3 酵素は低分子基質にのみ作用する type-2 酵素が示すマルトオリゴ糖に対する作用の“延長として多糖にも作用し得る” α -glucosidase と見做すことができよう。これに対し、もし、両者の水解部位が異なることか事実ならば、遊離する glucose のアノマー型は別として、その作用面のみからは type-2 α -glucosidase と glucoamylase の二者の複合体または融合体として捉えることも可能であり、その呼称には困難を伴うこととなる。

本章ではこれまでの各章で精製法および諸性質が明らかとなったテンカイ、トラマメ、フタ肝臓およびウサギ筋肉の各酸性 α -glucosidase と、コメ酸性 α -glucosidase II の 5 種類の酵素について、マルトースなどのオリゴ糖と澱粉やグリコーゲンなどの多糖の水解部位が同一であるか否かを明示することを目的とした。コメ酸性 α -glucosidase II は高橋と下村²²⁷⁾により、一方を“セラベル”基質を用いて、マルトースと澱粉が互いの水解に拮抗していることから、それぞれが別個の部位で水解されると推定されたが、この方法の不備が指摘された²²⁶⁾ことから、あらためて検討を加えるものである。活性中心解析の手段としては、少糖と多糖の混合基質系を用いた速度論的方法を中心としたので、以下、

$$\begin{aligned}
 v &= \frac{V_1 \cdot K_A [A] + V_2 \cdot K_B [B]}{1 + K_A [A] + K_B [B]} \\
 &= \frac{[V_1 \cdot K_A f + V_2 \cdot K_B (1-f)] \cdot A}{1 + [K_A f + K_B (1-f)] \cdot A} \quad (\text{式-4})
 \end{aligned}$$

式-4は Michaelis-Menten の速度式,

$$v = \frac{V \cdot A}{K_m + A} \quad (\text{再掲式-1})$$

と同型に導くことができる。

$$v = \frac{\frac{V_1 \cdot K_A \cdot f + V_2 \cdot K_B \cdot (1-f)}{K_A \cdot f + K_B \cdot (1-f)} \cdot A}{\frac{1}{K_A \cdot f + K_B \cdot (1-f)} + A} \quad (\text{式-5})$$

式-5 から 混合基質系の 酵素反応に於ける, $K_m(A, B)$ および $V(A, B)$ を求めると,

$$K_m(A, B) = \frac{1}{K_A \cdot f + K_B \cdot (1-f)} \quad (\text{式-6})$$

$$V(A, B) = \frac{V_1 \cdot K_A \cdot f + V_2 \cdot K_B \cdot (1-f)}{K_A \cdot f + K_B \cdot (1-f)} \quad (\text{式-7})$$

と得る。ここで,

$$K_A = \frac{k_{-1A}}{k_{-1A} + k_{1A}} \quad (A \text{ に対する Michaelis 定数の逆数})$$

$$K_B = \frac{k_{-1B}}{k_{-1B} + k_{1B}} \quad (B \text{ に対する Michaelis 定数の逆数})$$

Table 11. Kinetic Features of Single Center- and Two Center Mechanisms

Classification		Possibility of competition between substrates*	Linearity of $1/v$ vs $1/s$ ($s/v \sim v$) plot	Behavior of V with f
1) Single center		Yes	Yes	Continuously changes from V_1 to V_2 . No maximum between $f = 0$ and $f = 1$. Function of f .
2) Two center				
1-a Non-crossing independent		No	No	$V = V_1 + V_2$. Independent of f .
1-b Non-crossing interactive		Yes	No	V could be larger than any of V_1 and V_2 . Independent of f .
2-a Crossing independent		Yes	No	V could be larger than any of V_1 and V_2 . Could have a maximum between $f = 0$ and $f = 1$. Function of f .
2-b Crossing interactive		Yes	No	Same as in the case of 2-a.

* $v < v_1 + v_2$

$$V_1 = k_1[E] \quad (A \text{ に対する最大速度})$$

$$V_2 = k_2[E] \quad (B \text{ に対する最大速度})$$

$$X = [A] + [B] \quad (\text{基質の全濃度})$$

$$f = \frac{[A]}{[A] + [B]} \quad (A \text{ の濃度分率})$$

廣海^{223, 224)}は、その文献に於て、それぞれの速度式を示し、拮抗現象の有無、速度論的特徴を考察し、Table 11に示すようにそれぞれを要約した。従つて、2)の1-aを除いて拮抗現象が認められ、 X と v の両座数プロットは1)以外では直線とはならず、また、 f の変化に伴い V は2)1-a, 1-bを除きそれぞれ特徴的に変わる

ことなどから、これらの差異を調べることにより、反応機作がいずれであるかを識別できる。

第2節 実験材料 および方法

1. 酵素 テンカイ酸性 α -glucosidase, トラマノ 酸性 α -glucosidase, スタノ肝臓酸性 α -glucosidase, ウサギ筋肉酸性 α -glucosidase は第2章より第5章を記述した, ティスク電気泳動的に単一の精製酵素標品を用いた。コノ酸性 α -glucosidase II は高橋ら⁵⁵⁾ および著者ら¹²⁵⁾ による既報の方法で精製した, 電気泳動的に単一の標品を使用した。

2. 試薬 maltose, soluble starch, shellfish glycogen, turanose (半井化学), methyl α -glucoside, sucrose, Tris (和光純薬), glucono- δ -lactone, trehalose, NaF, NaCl, KCl, $MgCl_2$ (関東化学) および erythritol (東京化成) は全て市販品である。

3. 酵素活性測定法 酵素反応は各酵素の至適 pH の酢酸緩衝液中, 37°C で行った。反応組成は実験内容等により異なるので, 実験結果および考察の項の文中, ないしは図中に示した。各反応液中の遊離 glucose は Glucose AR-Test (和光純薬) を用いた Tris-glucose oxidase-peroxidase 法^{93,94)} により測定した。陽イオンによる影響の調査実験では, 緩衝液中の陽イオンの影響を抑制するために, 低濃度の緩衝液 5mM γ -イン酸 - 10mM Na_2HPO_4 系を使用した。このような緩衝液に

基質, 酵素および塩溶液を添加すると pH 値が変動するため, 反応温度 (37°C) に於ける混合液の pH を測定して行った。

4. 蛋白質の定量 各 α -glucosidase の精製酵素について得られた $E'_{1\text{cm}}^{1\%}$ at 280 nm の値を用いて, 分光学的に測定した。それぞれの酵素の値は以下に示す通りである。 テンカイ酸性 α -glucosidase : 13.6, トラムメ酸性 α -glucosidase : 14.7, フタ肝臓酸性 α -glucosidase : 14.9, ウサギ筋肉酸性 α -glucosidase : 11.3, コメ酸性 α -glucosidase II : 10.8。

第3節 実験結果および考察

I. テンカイ酸性 α -glucosidase の maltose と soluble starch の加水分解部位

1. maltose, soluble starch 混合基質系の解析 混合基質 0.4 ml, 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 0.4 ml, 酵素液 (0.47 μ g 蛋白量) 0.2 ml を 37°C で 5 分間反応させた。 maltose と soluble starch の重量比 (maltose / (maltose + soluble starch)), f , は 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 および 0 とした。 $f=1$ および $f=0$ はそれぞれの maltose および soluble starch 単独基質の反応系を表わす。 このような重量分率の混合基質総濃度, s , としたは 1, 1.4, 2, 3, 10 mg/ml を選んだ。 Fig. 64 に幾つかの混合比の濃度と初速度の両逆数プロットを示した。 いずれの混合比においても $1/s \sim 1/v$ プロットは明らかな直線性を示した。 また, 各初速度は常に各基質単独の初速度の和よりも小さく, 両基質間の拮抗現象が認められた。 この一例を示すと, $f=0.5$, 2 mg/ml の濃度では

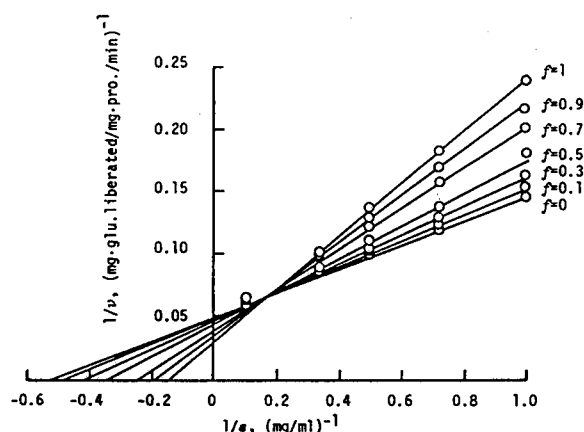


Fig. 64. Plots of $1/v$ versus $1/s$ for the Mixed Substrates by Sugar Beet Acid α -Glucosidase. The reaction mixture containing 0.4 ml of the mixed substrates, 0.4 ml of 0.1M sodium acetate buffer (pH 4.5) and 0.2 ml of enzyme (0.47 μ g) was incubated at 37°C for 5 min. f = maltose/(maltose + soluble starch).

maltose, soluble starch, 各 1 mg/ml 下あり, この濃度における maltose ($K_m = 6.8$ mg/ml, $V = 35.4$ mg of glucose liberated / mg of protein / min) と soluble starch ($K_m = 1.9$ mg/ml, $V = 21.3$ mg of glucose liberated / mg of protein / min) 単独基質の場合の速度はそれぞれ次のように求めらる。

$$\begin{aligned}
 v_{\text{maltose}} &= \frac{V \cdot A}{K_m + A} \\
 &= \frac{35.4 \times 1}{6.8 + 1} \\
 &= 4.5 \text{ (mg of glu. / mg of pro. / min)}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 v_{\text{soluble starch}} &= \frac{V \cdot A}{K_m + A} \\
 &= \frac{21.3 \times 1}{1.9 + 1} \\
 &= 7.3 \text{ (mg of glu. / mg of pro. / min)}
 \end{aligned}$$

一方, $f = 0.5$, 2 mg/ml の混合基質系における初速度, v_{mix} , の実験値

は 9.6 mg of glucose liberated / mg of protein / min であり, 両基質単独の初速度の和 11.8 (単位は同じ) の 81.4% であり, $V_{mix} < V_{maltose} + V_{soluble starch}$ の成立が理解される。さらに, 混合基質の最大速度 V は f の増加に伴い, 極大・極小をとることなく単調に増加した。これは全マ "single site" の速度論的特徴に合致した。

Fig. 65には重量分率 f と混合基質に関する見掛けの K_m および V の関係を示した。比較のために, 緒論で述べた "single center" の理論式, 式-6 および 式-7 を用いて得られ

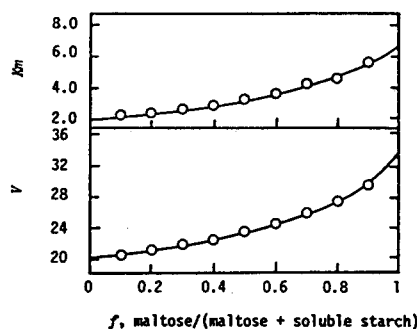


Fig. 65. Dependence of V and K_m on f for Sugar Beet Acid α -Glucosidase. V : mg of glucose liberated/mg of protein/min. K_m : mg/ml. —, theoretical curves; o, experimental values.

る K_m , V の理論値を実線を示した。両速度パラメーターの実験値は理論値によく適合していることが理解できる。これらの結果は maltose および soluble starch の加水分解が共通の活性部位で行われるという見解を支持するものである。

なお, 混合基質実験系に於ては基質濃度を重量で表示した (mg/ml あるいは %)。maltose はそのモル濃度で, soluble starch や後述の実験系を使用した shellfish glycogen については, 其の非還元末端 glucose のモル濃度を表示し, これらを用いたモル分率 f を採用して同じ結果が得られることを確認している。

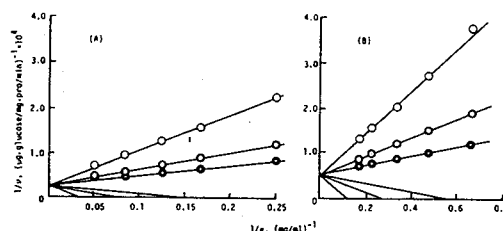


FIG. 66. Inhibition of Sugar Beet α -Glucosidase on Hydrolyses of Maltose (A) and Soluble Starch (B) by Tris. The reaction mixture containing 0.4 ml of substrate solution at various concentration, 0.4 ml of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.5), 0.1 ml of Tris solution and 0.1 ml of enzyme (4.7×10^{-4} mg) solution was incubated at 37°C for 5 min.
 ●, 0 mM Tris; ○, 2 mM Tris; ○, 8 mM Tris.

2. maltose および soluble starch の水解におよぼす阻害剤の影響 阻害剤として Tris, erythritol, methyl α -glucoside, glucono- δ -lactone, trehalose および NaF を使用した。

Fig. 66 は Tris の maltose および soluble starch の水解におよぼす影響を $1/v \sim 1/s$ プロットで示したものである。2 mM, 8 mM の Tris 存在下では明らかに水解速度が低下した。maltose の水解に於ても, soluble starch の水解に於ても Tris 存在下での最大速度は無添加 (0 mM Tris) の場合と同じであることから, 阻害型式は拮抗型と判定された。Tris の阻害物恒定数, K_i , は阻害剤濃度, i , における見掛けの Michaelis 定数, K_a , および無添加の場合の定数, K_m , との関係式,

$$K_a = K_m (1 + i/K_i) \quad (\text{式}-8)$$

から求めることができる。maltose 水解作用 (maltase 活性) に対しては 2.5 mM, soluble starch 水解作用 (glucoamylase 活性) に対しては 2.2 mM であった。

TABLE 12. TYPE OF INHIBITION AND K_i FOR MALTASE AND GLUCOAMYLASE ACTIVITIES OF SUGAR BEET α -GLUCOSIDASE

Inhibitor	Type of inhibition	K_i (mM)	
		Maltase activity	Glucosylase activity
Tris	competitive	2.5	2.2
Erythritol	competitive	10.2	8.0
Methyl α -glucoside	competitive	14.7	9.9
Glucono- δ -lactone	competitive	0.43	0.48

Trisと同様にして *erythritol*, *methyl α -glucoside*, *glucono- δ -lactone* に對しても阻害型式と両活性に對する K_i を求めた。これらの結果を Table 12 に示した。いずれも *maltose* および *soluble starch* の水解に拮抗型の阻害を示し、両活性に對してほぼ同じ阻害定数を示した。一方、*trehalose* と *NaF* は両活性に大きな阻害効果を示さなかった。以上の結果は両基質が同一の活性部位で水解を受けることを示唆するものである。

本項における二種の方法での活性部位の検討結果と、第7章で述べる本酵素の *maltose* および *soluble starch* 水解における活性解離基が同一であるとの結果に基づいて、テンカイ酸性 α -glucosidase の少糖類と多糖類の加水分解部位は同一であると判断した。

II. トラフメ酸性 α -glucosidase の *maltose* と *soluble starch* 加水分解部位

トラフメ酸性 α -glucosidase の少糖と多糖水解部位に對しては混合基質系による速度論的方法で解析した。混合基質 0.4 mL, 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.8) 0.5 mL および酵素液 (0.3 μ g 蛋白量) 0.1 mL を 37°C で 10 分間反応させた。 *maltose* と *soluble sta-*

右の重量混合比 f ,
 (maltose / maltose + soluble starch), は 1, 0.5,
 0.33, 0.2, 0.1, 0.07, 0
 とした。 $f=1$ は maltose
 の, $f=0$ は soluble sta-
 rch の各単独基質系を表わ
 す。

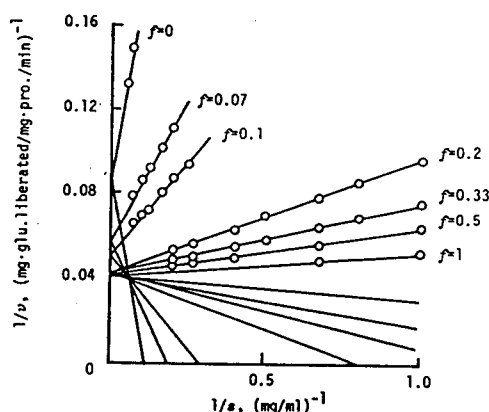


Fig. 67. Plots of $1/v$ versus $1/s$ for the Mixed Substrates by Concord Pole Acid α -Glucosidase. The reaction mixture containing 0.4 ml of the mixed substrates, 0.5 ml of 0.1M sodium acetate buffer (pH 4.8) and 0.1 ml of enzyme (0.3 μ g) was incubated at 37°C for 10 min. f = maltose/(maltose + soluble starch).

Fig. 67に混合基質の総濃度, s , と初速度, v , の両逆数プロットを示した。いずれの混合比においても, 各プロットは明らかな直線性を示した。また, 各初速度は常に両基質単独の初速度 α 和

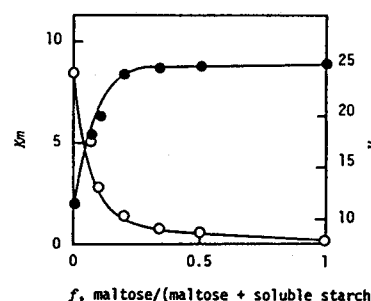


Fig. 68. Dependence of V and K_m on f for Concord Pole Acid α -Glucosidase. V (●): mg of glucose liberated/mg of protein/min. K_m (○): mg/ml. —, theoretical curves; ●, ○, experimental values.

よりも小さく, 二基質間の拮抗現象が認められた。さらに, 混合基質系の最大速度 V は f の増加に伴い, 極大・極小をとりながら単調に増加した。これはいずれも "single center" の速度論的特徴に一致した。

Fig. 68に f と見掛けの K_m および V の関係を示した。比較として, 式-6, 式-7より求める "single center" の場合の理論 K_m , V の値を実線を示した。両者はよく適合していることが理解できる。

これらの結果は maltose と soluble starch が共通の活性部位で作用を受けることを支持している。また, 次章を詳述するように, 両

基質水解に与かる活性解離基が同一である事実を考へ併せて、トランス酸性 α -glucosidase の少糖類と多糖類の加水分解部位は同一であると判断した。

III. フタ肝臓酸性 α -glucosidase の maltose と glycogen 加水分解部位

1. maltose, glycogen 混合基質系の解析 maltose と shellfish glycogen の混合比 (maltose / (maltose + shellfish glycogen)) は 1, 0.4, 0.2, 0.05, 0 とした。 $f=1$ および $f=0$ はそれぞれ maltose および glycogen の単独基質系を表わす。

種々の総濃度の混合基質 0.4 ml, 0.4M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 0.05 ml に酵素液 (0.4 μ g 蛋白量) 0.05 ml を添加し、37°C に反応を行った。

混合基質総濃度, S , と初速度, v , の両逆数プロットを Fig. 69 に示した。いすれの混合比においても, プロットは明らかな直線性を示した。また, 各初速度は常に両基質単独の初速度の和より小さく, 二基質間の拮抗現象が確認された。さらに, 混合基質

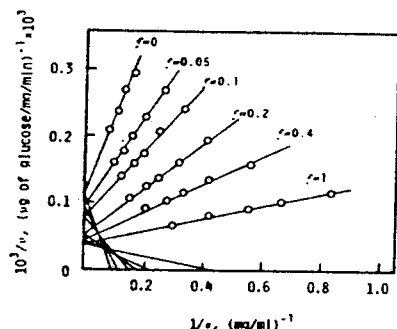


FIG. 69. Plots of $1/v$ versus $1/S$ for Maltose-Glycogen Mixed Substrates.

A reaction mixture containing 400 μ l of the mixed substrate at various concentrations, 50 μ l of 0.4M sodium acetate buffer (pH 4.5) and 50 μ l of enzyme (0.4×10^{-3} mg) solution was incubated at 37°C.

f = maltose/(maltose + glycogen), weight fraction.

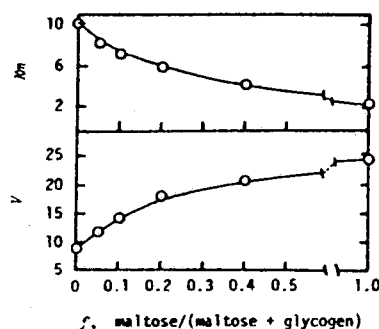


FIG. 70. Dependence of V and K_m on f for Pig Liver Acid α -Glucosidase.

V : mg of glucose liberated/mg of protein/min. K_m : mg/ml.

—, theoretical curve; O, experimental value.

の最大速度 V は f の増加に伴い、極大・極小を繰り返して単調に増加することと認められた。これはいずれも "single site" の速度論的特徴とよく一致した。

各混合基質系に関する K_m , V と f の関係を Fig. 70 に示した。比較として、前述の式-6 および式-7 から導かれる "single center" の理論値 K_m , V を実線を示した。実験値はこれによく適合していることが理解される。このことは maltose と shellfish glycogen が共通の活性部位を作用を受ける見解を支持するものである。

2. maltose および glycogen の水解におよぼす陽イオンの影響
50 mM の塩, NaCl, KCl および $MgCl_2$ 存在下で maltose あるいは shellfish glycogen に酵素を作用させた。反応は 5 mM クエン酸-10 mM Na_2HPO_4 緩衝液中, $37^\circ C$ を 3 分間行った。Fig. 71 に示すように, maltose および glycogen のいずれの加水分解反応においても, pH 4.5 より酸性側へ速度が増大した。その結果, 至適 pH は 4.5 から 4.0 付近に移行した。pH 4.0 における活性上昇の度合いは

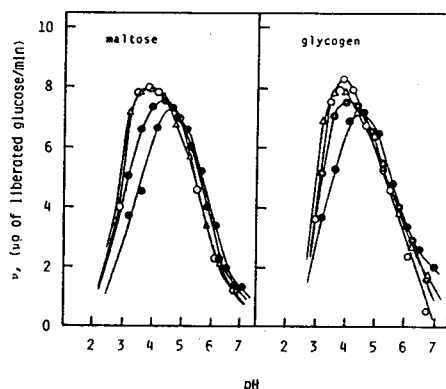


FIG. 71. Effects of Salts on Velocities of Hydrolyses of Maltose and Glycogen at Various pHs.

A reaction mixture containing 200 μ l of 0.5% maltose (or glycogen), 100 μ l of 5 mM citrate-10 mM Na_2HPO_4 buffer at various pHs, 100 μ l of enzyme (for maltase, 0.67×10^{-3} mg; for glucoamylase, 4×10^{-3} mg) solution and 100 μ l of various salts (final concn., 50 mM) was incubated at $37^\circ C$ for 3 min.

—●—, none; —○—, NaCl; —△—, KCl; —□—, $MgCl_2$.

両基質いすいの水解においても KCl , $MgCl_2$ を約 1.35 倍, $NaCl$ を約 1.2 倍であり, 二基質間で差は認められなかった。 KCl を KBr あるいは K_2SO_4 に置き換えても, KCl と同様に活性を上昇させることから, 陽イオンによる活性の増大と判断した。 このように, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} の陽イオン存在下で, maltase および glycogen の加水分解作用が同じ挙動を示すとは, 両者の加水分解部位が共通であることを示唆するものである。

3. maltase および glycogen の水解におよぼす阻害剤の影響
Tris, turanase および methyl α -glucoside を阻害剤として使用した。

Tris 添加系における maltase と shellfish glycogen 加水分解の $1/v$ プロットを Fig. 72 に示した。 Tris, 5, 10 および 20mM 添加した時の最大速度 V は無添加系の V と一致することから, 阻害型式は拮抗型であることを理解される。

式-8を用いて阻害物質定数, K_i , を求めると, maltase 活性に対しては 17.8 mM, glycogen 水解活性に対しては 18.1 mM と両者をほぼ同じ値であった。

同様にして, Turanase, methyl α -glucoside に関して得られた結果を併せて Table 13 に示した。 いずれも

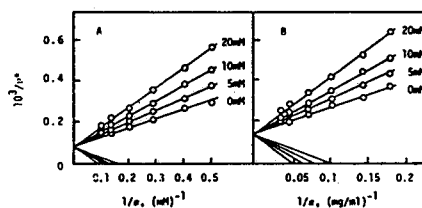


Fig. 72. Inhibition of Pig Liver Acid α -Glucosidase on Hydrolyses of Maltose (A) and Shellfish Glycogen (B) by Tris. The reaction mixture containing 0.2 ml of substrate, 0.1 ml of 0.2M sodium acetate buffer (pH 4.5), 0.1 ml of Tris and 0.1 ml of enzyme (0.6 μ g) was incubated at 37°C.

TABLE 13. TYPE OF INHIBITION AND K_i FOR MALTASE AND GLUCOAMYLASE ACTIVITIES

Inhibitor	Type of inhibition	K_i (mM)	
		Maltase activity	Glucosylase activity
Tris	Competitive	17.8	18.1
Turanose	Competitive	1.04	0.93
Methyl α -glucoside	Competitive	64.3	4.7

全て拮抗型の阻害剤であり、三者の中では turanose が最も強い阻害作用を示した。同一物質が maltose と拮抗し、また、glycogen と拮抗することから、両基質を同一部位で水解すると考えられる。

methyl α -glucoside の K_i が maltase 活性に対しては 64.3 mM であり、glycogen 水解活性に対しては 4.7 mM と二者を大きく異なるが、この差異は第8章で後述する本酵素活性部位のサブサイト構造を考慮すると、矛盾なく説明することからできる。すなわち、Fig. 73 に、dimer (maltose) と n -mer の一般的基質が酵素と結合する際の模式図を示したように、glycogen は maltose より広い範囲で酵素と接触するため、maltose が占有する場所以外 (例之は、sub-site 3, 4, ..., m) にも methyl α -glucoside が結合し、その結果、glycogen の水解作用がより強く抑制されると考えられる。

以上論述した混合基質系を用いた速度論的方法の解析、陽イオンおよび阻害剤の影響に関する結果、さらに、第7章で述べる両基質水解に与かる活性解離基の同一性の結果を総合して、マウス肝臓酸性 α -glucosidase は共通の活性部位で少糖類と多糖類の加水分解作用を触媒しているものと判断した。

IV. ウサギ筋肉酸性 α -glucosidase の maltose と glycogen 加水分解部位

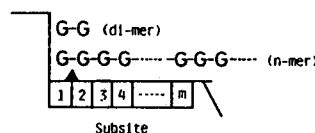


FIG. 73. Schematic Representation of Productive Binding Mode of Di-mer or n -Mer Saccharides.

The triangle shows the position of the catalytic site. The non-reducing terminal of the substrate is on the left, and the productive binding mode is the mode in which subsites 1 and 2 are necessarily occupied. G shows a glucose moiety, and G-G-..., an α -glucosidic linkage. n is the degree of polymerization, and m , the number of subsites.

1. maltose, glycogen 混合基質系の解析 混合基質

0.4 ml, 0.4M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 0.05 ml および 酵素液 (0.13 μ g 蛋白量) 0.05 ml を 37°C で 5 分間反応させた。maltose と shellfish glycogen の重量混合比 (maltose)/(maltose + shellfish glycogen) f は 1, 0.4, 0.2, 0.15, 0.1, 0.05, 0.02, 0 とした。 $f=1$ と $f=0$ はそれぞれ maltose, glycogen 単独の基質系を表す。

種々の混合比の各総基質濃度, s , と初速度, v , の両逆数プロットを Fig. 74 に示した。いずれの混合比においてもそれぞれのプロットは明らかな直線性を示した。また, 各初速度は常に両基質単独の初速度の和よりも小さく, 二基質間の拮抗が確認された。さらに, 混合基質の最大速度 V は f の増加に伴い, 極大・極小をとりながら単調に増加した。これらの速度論的特徴は "single center" のとくに良く合致した。

Fig. 75 に maltose の重量分率 f と混合基質に対する見掛けの K_m および V の関係を示した。比較のために, 緒論に記載した "single center" の理論式, 式-6 および式-7 から導かれる K_m , V の

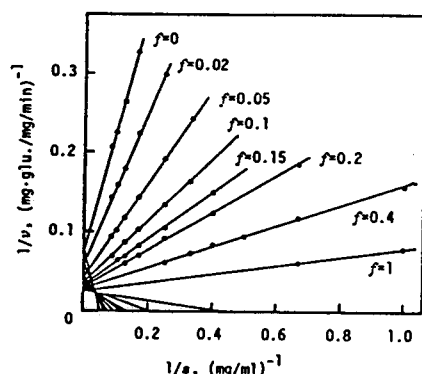


Fig. 74. Plots of $1/v$ versus $1/s$ for Maltose-Glycogen Mixed Substrates by Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase. The reaction mixture containing 0.4 ml of the mixed substrates, 0.05 ml of 0.4M sodium acetate buffer (pH 4.5) and 0.05 ml of enzyme (0.13 μ g) was incubated at 37°C for 5 min. f = maltose/(maltose + shellfish glycogen).

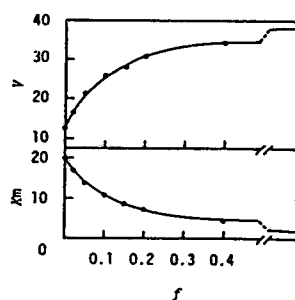


Fig. 75. Dependence of V and K_m on f for Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase. V : mg of glucose liberated/mg of protein/min. K_m : mg/ml. —, theoretical curves; •, experimental values.

理論値を実線で示した。これらと各実験値は実験誤差範囲内で一致することを確認された。このことは maltose と glycogen が共通の活性部位で加水分解されることを示唆するものである。

2. maltose および glycogen の水解における陽イオンの影響

50 mM NaCl, KCl

あるいは $MgCl_2$ 存在下での maltose および shellfish glycogen 水解活性を種々の pH 条件下で調査した。Fig. 76 に示したように, maltose と glycogen の両水解反応において, pH 5.5 付近より酸性側で活性の増大が認められた。

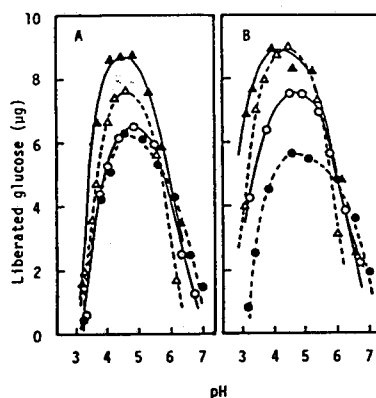


Fig. 76. Effects of Salts on Velocity of Hydrolyses of Maltose (A) and Shellfish Glycogen (B) at Various pH's. The reaction mixture containing 0.1 ml of enzyme (0.11 µg for maltose; 0.34 µg for glycogen), 0.1 ml of 5 mM citrate-10 mM Na_2HPO_4 buffer at various pH's, 0.2 ml of 0.5% substrate and 0.1 ml of various salts (final concn., 50 mM) was incubated at 37°C for 4 min. •, none; ○, NaCl; ▲, KCl; △, $MgCl_2$.

た。pH 4.5 では KCl により約 1.5 倍の上昇をみた。KCl を KBr に代えて K_2SO_4 で置換しても, 同等の活性上昇が認められることから, 速度の増加は陽イオンによると結論付けられた。同様に, pH 4.5 で, NaCl と $MgCl_2$ は maltose 水解作用を 1.04 倍と 1.2 倍に, glycogen 水解速度を 1.3 倍と 1.6 倍に増加させた。これら陽イオンによる両活性増大の差異は, glycogen が maltose よりも余分に接触する酵素の部位 (Fig. 73 のカサカサ 3 番以降) にも Na^+ や Mg^{2+} が影響を及ぼす結果と解釈された。すなわち, フア肝臓酸性 α -glucosidase に於ける methyl α -glucoside による阻害現象の理解と同じように考察がきよう。この点については第 9 章であらためて

考察する。

Palmer²¹⁶⁾は本酵素の部分精製標品を用いて NaCl の影響を調査し, maltose と glycogen の水解作用に対する活性上昇率の差から, 両基質が異なる部位で作用を受けることの大きな理由としており, 本項, 陽イオンの影響実験の結果の解釈をこれに対する反証としたい。

3. maltose および glycogen の水解における阻害剤の影響
阻害剤として Tris, turanose および erythritol を用いた。

turanose 存在下での maltose および shellfish glycogen の加水分解の $1/v \sim 1/s$ プロットを Fig. 77 に示した。高濃度の maltose では水解反応と同時に糖転移反応も起り, 正確な K_m , V を求めることが

できない。また, glycogen の高濃度溶液は調製が困難である。

従って, 11 ずれの基質を比較的低濃度で使用

した。turanose の 0.5, 1.0 および 2.0 mM 添加系

における最大速度は無添

加系の V に同じであること

から, 阻害は拮抗型で

あると理解される。阻

害物質定数 K_i を求めた

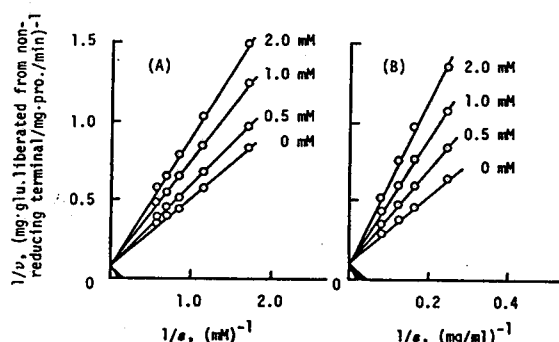


Fig. 77. Inhibition of Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase on Hydrolyses of Maltose (A) and Shellfish Glycogen (B) by Turanose. The reaction mixture containing 0.2 ml of substrate, 0.2 ml of 0.1M sodium acetate buffer (pH 4.5), 0.05 ml of turanose and 0.5 ml of enzyme (0.11 μ g) was incubated at 37°C.

Table 14. Type of Inhibition and K_i for Maltase and Glucoamylase Activities

Inhibitor	Type of inhibition	K_i (mM)	
		Maltase activity	Glucoamylase activity
Tris	Competitive	16.4	30.0
Turanose	Competitive	2.0	1.0
Erythritol	Competitive	45.0	85.0

より, maltose 水解においては 2.0 mM, glycogen の水解に対しては 1.0 mM であった。Table 14 に Tris および erythritol による阻害の型式, それぞれの maltose および glycogen 水解の両活性に対する K_i とともに結果を列記した。いずれの阻害剤も両基質と拮抗するところから, maltose と glycogen は共通の部位で水解されるものと推定できる。

以上, 本項で得られた全ての結果を考へ併せ, また, 次章の両基質水解に関与する活性解離基の同一性の結果をも含めた総合的判断から, ウサギ筋肉酸性 α -glucosidase においても, 少糖類と多糖類は共通の活性部位で水解されるものと結論付けた。

V. コレ酸性 α -glucosidase II の maltose と soluble starch の加水分解部位

1. maltose, soluble starch 混合基質系の解析
maltose と soluble starch の重量混合比 f , ($\text{maltose} / (\text{maltose} + \text{soluble starch})$), は 1, 0.5, 0.33, 0.2, 0.1, 0.07, 0 とした。 $f=1$ および $f=0$ はそれぞれ maltose および soluble starch のみの基質系を表わす。種々の総濃度の混合基質 0.5 ml, 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 0.4 ml に 0.1 ml の酵素液 (0.15 μg 蛋白量) を加え, 37°C で 5 分間反応させた。混合基質の総濃度, A , と初速度, v , の関係を Fig. 78 に両逆数プロットを示した。いずれの混合比においても, プロットは明らかな直線性を示した。また, 各初速度は常に両基質単独の初速度の和よりも小さく, 二基質間の拮抗現象が認められた。一例を以下に示す。 $f=0.5$, $A=5 \text{ mg/ml}$

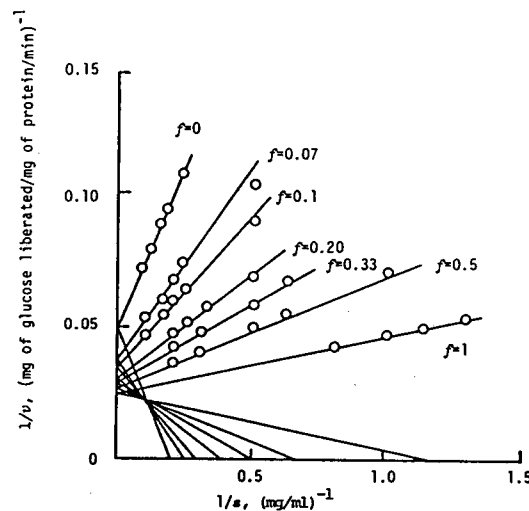


Fig. 78. Plots of $1/v$ versus $1/s$ for the Mixed Substrates by Rice Acid α -Glucosidase II. The reaction mixture containing 0.5 ml of the mixed substrates, 0.4 ml of 0.1M sodium acetate buffer (pH 4.0) and 0.1 ml of enzyme (0.15 μ g) was incubated at 37°C for 5min. f = maltose/(maltose + soluble starch).

これは maltose, soluble starch (それぞれ 2.5 mg/ml であり), この濃度では maltose ($K_m = 0.86$ mg/ml, $V = 35.4$ mg of glucose liberated / mg of protein / min) と soluble starch ($K_m = 5.0$ mg/ml, $V = 18.2$ mg of glucose / mg of protein / min), それぞれ単独基質の場合の初速度は次の通りである。

$$\begin{aligned}
 v_{\text{maltose}} &= \frac{V \cdot A}{K_m + A} \\
 &= \frac{35.4 \times 2.5}{0.86 + 2.5} \\
 &= 26.3 \text{ (mg of glu. / mg of pro. / min)}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 v_{\text{soluble starch}} &= \frac{V \cdot A}{K_m + A} \\
 &= \frac{18.2 \times 2.5}{5.0 + 2.5} \\
 &= 6.7 \text{ (mg of glu. / mg of pro. / min)}
 \end{aligned}$$

一方、混合基質系での実測初速度 v_{mix} は $25.8 \text{ mg of glu. / mg of pro. / min}$ であるので、 $v_{maltose}$ と $v_{soluble starch}$ の和、 32.4 (単位同) の 79.6% であり、 $v_{mix} < v_{maltose} + v_{soluble starch}$ の成立が理解される。さらに、混合基質系の最大速度 V は f の増加に伴い、極大・極小をとらずに単調に増加した。以上、3つの速度論的特徴はいずれも "single center" のものに合致した。

各混合基質系に関する K_m

それぞれの K_m , V を f の関係を示したのが Fig. 79 である。比較として、"single center" の理論式、式-6 および 式-7 より求まる理論値を実線で示した。

実験値は僅かの誤差範囲内で理論値と一致することを確認

した。この成績は maltose および soluble starch の加水分解が同一の活性部位で行われることを強く示唆するものである。

同様の検討は maltose と maltodextrin (平均重合度はおよそ 17 の 2 種) の混合系に關しても行われ、比較的短鎖のオリゴ糖と長鎖のオリゴ糖も同一の活性部位で水解されることを推察し、既に報告した。²²⁶⁾ 従って、maltose, maltodextrin および多糖類の soluble starch のいずれとも共通の部位で水解されることを考えられる。

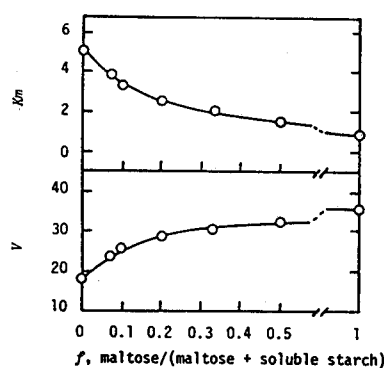


Fig. 79. Dependence of V and K_m on f for Rice Acid α -Glucosidase II. V : mg of glucose liberated/mg of protein/min. K_m : mg/ml. —, theoretical curves; o, experimental values.

2. maltose および soluble starch の水解における阻害剤の影響 阻害剤として Tris, erythritol, methyl α -glucoside, sucrose, glucono- δ -lactone を用いた。

glucono- δ -lactone 存在下での maltose および soluble starch の加水分解の $1/v \sim 1/S$ プロットを Fig. 80 に示した。いずれの基質の水解作用も拮抗型に阻害を受けることが解った。 K_i は maltose の水解においては 0.25 mM, soluble starch の水解に対しては 0.53 mM であった。

他の阻害剤に對しても glucono- δ -lactone と同様に拮抗型阻害型式および阻害物値定数を求めた。 Table 15 に示したように、いずれの物質も両水解活性を拮抗的に阻害した。これは maltose と soluble starch の共通の活性部位を水解するため、いずれの物質によっても

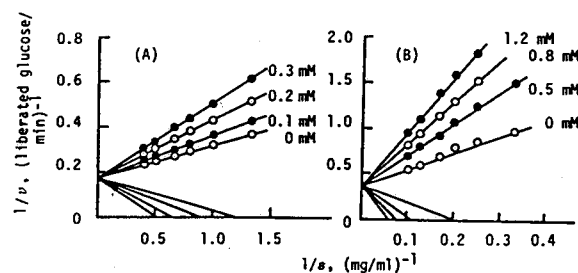


Fig. 80. Inhibition of Rice Acid α -Glucosidase II on Hydrolyses of Maltose(A) and Soluble Starch(B) by Glucono- δ -lactone. The reaction mixture containing 0.4 ml of substrate, 0.4 ml of 0.1M sodium acetate buffer(pH 4.0), 0.1 ml of inhibitor or distilled water and 0.1 ml of enzyme(0.15 μ g) was incubated at 37°C.

Table 15. Type of Inhibition and K_i for Maltase and Glucoamylase Activities of Rice Acid α -Glucosidase II

Inhibitor	Type of inhibition	K_i (mM)	
		Maltase activity	Glucoamylase activity
Tris	Competitive	5.0	2.9
Erythritol	Competitive	20	12
Methyl α -glucoside	Competitive	21	12
Sucrose	Competitive	66	38
Glucono- δ -lactone	Competitive	0.25	0.53

同型式の阻害を受けるものと解釈される。

高橋と下村²²⁷⁾は一方を¹⁴Cでラベルした maltose ないしは soluble starch を用いて、それぞれの水解に他方が阻害を示さないことから、二者が別個の部位で作用を受けるものと考察した。しかし、こゝで用いた基質濃度条件は、一方の分解に他方が十分なる阻害効果を与える程の濃度ではなく、その差異が生じても実験誤差範囲内であることを後に²²⁸⁾判明した。従つて、本項を述べたように、コメ酸性 α -glucosidase II もまた少糖類と多糖類を同一の部位で加水分解するものと考えられる。

第4節 要約

- I. テンカイ、トラマメおよびコメ(II)の酸性 α -glucosidase に関しては maltose と soluble starch の、フタ肝臓およびウサギ筋肉の酸性 α -glucosidase に関しては maltose と shellfish glycogen の各混合基質系を用いて速度論的特徴を解析したところ、いずれの酵素についても "single center" の特徴に合致することを認めた。さらに、種々の混合基質系における K_m , V の各実験値は同一活性部位の場合の理論値によく一致することを確認した。
- II. フタ肝臓酸性 α -glucosidase に関しては Na^+ , K^+ および Mg^{2+} , ウサギ筋肉酸性 α -glucosidase に関しては K^+ の陽イオンが maltose および glycogen の水解作用を同程度 (1.2 ~ 1.5 倍の範囲) 促進した。ウサギ筋肉酵素について、 Na^+ と Mg^{2+} が maltose, glycogen の水解作用の活性上昇に差異を示したから、

酵素のカササイト構造を想定すれば、共通の活性部位により両活性が発現するものとしてみ、この現象を説明し得ると考察した。

Ⅲ. テンサイ酵素では *Tris*, *erythritol*, *methyl α -glucoside*, *glucono- δ -lactone* により、フタ肝臓酵素では *Tris*, *turanose*, *methyl α -glucoside* により、ウサギ筋肉酵素では *Tris*, *turanose*, *erythritol* により、コメ(Ⅱ)酵素では *Tris*, *erythritol*, *methyl α -glucoside*, *sucrose* および *glucono- δ -lactone* により *maltose* と *soluble starch* および *shellfish glycogen* の水解作用が全々拮抗的に阻害された。阻害の尺度となる各物質の阻害定数, K_i , はそれぞれ少糖および多糖の水解作用に対しほぼ同じであった。フタ肝臓酸性 α -glucosidase の *maltose* と *glycogen* 水解作用に対し, *methyl α -glucoside* の K_i は大きな差異を示したため、この理由を活性部位のカササイト構造から説明した。

Ⅳ. 以上の結果を総合して、テンサイ酸性 α -glucosidase, トラム酸性 α -glucosidase, フタ肝臓酸性 α -glucosidase, ウサギ筋肉酸性 α -glucosidase および コメ酸性 α -glucosidase Ⅱ のいずれの酵素も少糖類と多糖類を共通の活性部位で水解するものと判断した。

第7章 酸性 α -Glucosidase の活性解離基の推定

第1節 緒論

酵素のもつ際立った特性はその特定の基質に対してのみ有効に発揮される触媒機能にある。この機能発現に直接関与するのは酵素蛋白質を構成する全アミノ酸残基ではなく、一部の特定の官能基であることが知られている。活性に関与するアミノ酸残基の同定と機能を解明することは、酵素の反応機構を究明する上で最も重要なことであり、作用機構からみた生理的意義の追求も可能となる。

現在までに多くの酵素が触媒活性の残基の同定や反応機構が推定されている。amylase や glycosidase 類についても、石くより種々の作用機構が提案されている^{228~233)}が、いずれも十分な説明には程遠く、官能基の同定は僅かα-酵素にのみなされているにすぎない。

例えば、カツマイト β -amylase では活性部位にカルボキシル基、イミダゾール基およびSH基の存在が推定されており、²³⁴⁾ タイズ β -amylase においてもSH基の活性発現への関与が報告されている。²³⁵⁾ amylase で X-線解析の結果、初めて立体構造の明らかにされた Taka-amylase A^{236, 237)} では pH-活性プロファイルと化学修飾法により、カルボキシル基とイミダゾール基が最も重要な必須解離基として同定されている。^{238, 239)} glucoamylase に関しては Rhizopus delemar 起源の酵素と知られており、速度パラメーターの pH 依存性の解析結果からそのカルボキシル基（活性型： $-\text{COO}^-$ と $-\text{COOH}$ ）が必須であると推測されている。^{223, 240)} しかるに、

α -glucosidase の活性解離基の同定に関する文献は見当たらない。

α -glucosidase についても必須解離基を推定することは、他の amylase との比較という観点からも重要であると考えられる。

酵素の必須解離基は速度パラメーターの pH 依存性 (pH-活性プロファイルを含む) を調べることによっても推定できる。すなわち、蛋白質構成アミノ酸の側鎖解離基、末端の α -アミノ酸および α -カルボキシル基はそれぞれ特定の pK 値 (非解離型と解離型間の数値となる pH 値) を有することから、これと酵素活性あるいは速度パラメーターの K_m , V (あるいは K_0) および V/K_m (あるいは K_0/K_m) におよぼす pH 効果の結果を対応させることにより、活性に深く関与する残基を推定することができ。さらに、 pK 値の温度依存性から解離熱 ΔH を求め、解離基が示す特定の ΔH と比較することにより、その推定はより確実なものとなる。Table 16 に蛋白質やペプチドの解離基の一般的な pK 値と ΔH 値を示した。^{24)~244)} この方法とは別に、化学修飾法とまた活性解離基の同定には有効である。特に近年になり、それぞれの残基に反応性の高い、種々の試薬が開発

Table 16. Characteristic Values of Ionization Constants and Heats of Ionization of Several Ionizable Groups Found in Proteins and Peptides

Ionizable group	pK (at 25°C)	ΔH (kcal/mol)
Carboxyl (α)	3.0 - 3.2	± 1.5
Carboxyl (β, γ)	3.0 - 4.7	± 1.5
Amino (α)	7.6 - 8.4	10-13
Amino (ϵ)	9.4 - 10.6	10-12
Sulfhydryl	7.5 - 10.3	6-7
Phenolic hydroxyl	9.8 - 10.4	6
Imidazolium	5.6 - 7.0	6.9-7.5
Guanidinium	11.6 - 12.6	12-13

され、蛋白質化学の広い分野で使用されている。しかし、カルボキシル基指向性の試薬は酸性 *protease* をいくつかの成功を納めている²⁴⁵⁻²⁴⁷⁾ものの、他の残基に特異性の高い試薬に比してその開発が非常に遅れている感がある。

本章は第2章から第5章に於て、精製法が確立されたテンカイ、トラマヌ、フタ肝臓、ウサギ筋肉の酸性 α -glucosidase と コヌ酸性 α -glucosidase II の5種の α -glucosidase について、活性発現に必須な解離基を推定することを目的とした。速度パラメーターの pH 依存性の検討に於ては、基質として *maltose* および *soluble starch* ならびに *shellfish glycogen* を用いた。もし、少糖と多糖の2種類の基質から得られる結果が同じであるならば、前章を検討した両基質水解の活性部位の同一性をさらに強調するものとより得る。また、酸性 α -glucosidase との対比を目的として、フタ肝臓、フタ血清 および ヒール酵母超濾の3種の中性 α -glucosidase に関して活性解離基の推定を行った。

第2節 実験材料 および方法

1. 酵素 テンカイ酸性 α -glucosidase, トラマヌ酸性 α -glucosidase, フタ肝臓酸性 α -glucosidase, ウサギ筋肉酸性 α -glucosidase は第2章より第5章で記述した方法により精製した、ディスク電気泳動的に単一の標品を用いた。 コヌ酸性 α -glucosidase II は高橋らの方法^{55, 245)}により、 フタ肝臓中性 α -glucosidase は著者らの既報の方法¹⁸⁷⁾により、 フタ血清中性 α -glucosidase は著者らの既報の方法¹⁸⁷⁾により、

cosidase は日比らの方法²⁴⁸⁾によりそれぞれ精製した。また、ヒール酵母中性 α -glucosidase II は千葉らの方法²⁴⁹⁾を改良した松坂らの方法²⁵⁰⁾に準じて精製した。いずれの中性 α -glucosidase もディスク電気泳動的に単一の酵素標品である。

2. 試薬 maltase, soluble starch, shellfish glycogen, phenyl α -glucoside, glycine ethyl ester hydrochloride, N-acetyl-imidazole, N-ethylmaleimide, iodoacetamide, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), Tris, 2,6-dibromoguinone chloroimide, p-toluene sulfonic acid, 3-(2-aminoethyl)-indole, tryptamine, 2-mercaptoethanol (幸井化学), 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride, sucrose, Koshland 試薬, diethylpyrrocarbonate, hydroxylamine (和光純薬), 平均重合度 13 の maltodextrin (林原生化学工業) および 2-methoxy-5-nitropropene (三菱) は全て市販品を使用した。

3. グルコースの定量 maltose, soluble starch, shellfish glycogen より遊離する glucose は Glucose AR-Test (和光純薬) を用いた, Tris-glucose oxidase - peroxidase 法^{93, 94)}により測定した。

4. フェノールの定量 ヒール酵母中性 α -glucosidase II により phenyl α -glucoside より遊離する phenol は 2,6-dibromoguinone chloroimide を用いた Robertson と Halvorson の方法⁹⁷⁾に準拠して測定した。

5. 蛋白質の定量 それぞれの精製酵素について得られた比吸光係数を用いて分光学的に測定した。すなわち、各酵素の

$E'_{1\text{cm}}^{1\%}$ at 280 nm は テンカイ 酸性 α -glucosidase : 13.6, トラマエ 酸性 α -glucosidase : 14.7, フタ肝臓 酸性 α -glucosidase : 14.9, ウサギ 筋肉 酸性 α -glucosidase : 11.3, コメ 酸性 α -glucosidase II : 10.8, フタ肝臓 中性 α -glucosidase : 10 (仮定), フタ血清 中性 α -glucosidase : 8.1, ヒール 酵母 中性 α -glucosidase II : 11.4 である。

6. アミノ酸分析 ヒール 酵母 中性 α -glucosidase II のアミノ酸分析は下記の方法を行った。未修飾酵素を 0.01M 塩炭酸アンモニウム溶液で平衡化させた Sephadex G-25 カラム ($1 \times 30\text{cm}$) でゲル濾過後, 試料 1.5mg を凍結・乾燥した。これを Liu と Chang の方法²⁵¹⁾に従い, 0.5ml の 3N *p*-toluene sulfonic acid (含 0.2% 3-(2-aminoethyl)-indole) 中, 110°C , 22 時間加水分解後, Hitachi KLA 3B analyzer を用いて分析した。

7. SH 基の定量 Ellman の方法²⁵²⁾に準拠し, 試料を 0.1M リン酸緩衝液 (1% SDS および 2mM EDTA を含む, $\text{pH } 8.0$) 中で 2 時間変性させた後, 0.1mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) を用いて定量した。

第3節 実験結果および考察

I. テンカイ酸性 α -glucosidase の活性解離基

1. K_m , V および V/K_m の pH 依存性 酵素を $\text{pH } 2.5$ ~ 7.5 の範囲の McIlvaine 緩衝液中, 37°C で 3 分間, maltose あるいは soluble starch に作用させ, 種々の基質濃度についての初速度を測定した。Fig. 8) は両逆数プロットより得られた K_m , V , V/K_m の

対数と pH との関係 (Dixon - Webb プロット)²⁵³⁾ を示したものである。

ここで, pK_m は $-\log K_m (= \log 1/K_m)$ を表わす。両基質に関する速度パラメーターは非常に類似した pH 依存性を示した。常法^{223, 240, 253, 254)}

に従い, 図中の破線を示したカイドラインから活性解離基の pK 値を求めると, 酸性側解離基 (解

離基 1 とする) では基質 α maltose の場合 $pK_{e1} = 3.9$, soluble starch 基質では $pK_{e1} = 3.7$ をあつた。 pK_e は遊離酵素の pK 値があるのに対し, pK_{e1} は酵素-基質複合体の pK 値である。解離基 1 の pK_{e1} 値は図より 2.5 以下と推定されるが, このような低い値を求めるべく実験では酵素の不可逆的失活が起るため, 値の算出は困難であった。一方, アルカリ側解離基 (解離基 2 とする) は $pK_{e2} = pK_{e12} = 6.35$ (maltose 基質) および 6.5 (soluble starch) をあつた。

pK_m (酵素と基質結合の指標) は主に解離基 1 の解離によつて, 一方, $\log V$ は主に解離基 2 の解離により強い影響を受けることから, 解離基 1 の解離型が主に基質との結合に関与し, 解離基 2 の非解離型が主に酵素-基質複合体の分解過程に必須であると推測される。

2. 解離熱の算出 pK_e 値より解離基 1 はカルボキシル基と容易に推定されるが, 解離基 2 はカルボキシル基, アミノ基ある

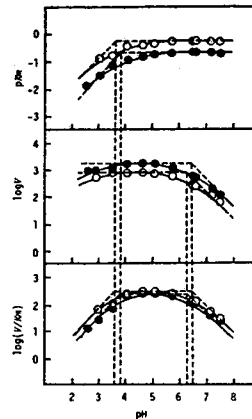


FIG. 81. Dependence of K_m , V and V/K_m on pH for Hydrolyses of Maltose and Soluble Starch by Sugar Beet α -Glucosidase.

V : μ g of glucose/0.047 mg-pro/min.

K_m : mg/ml.

●, maltose; ○, soluble starch.

いはヒスタジンのイミダゾール基の
いずれかであるかを推定し難い
(Table 16 参照)。そこで、解離
基スに関し、解離熱 ΔH を算
出し、同定の手掛りとした。

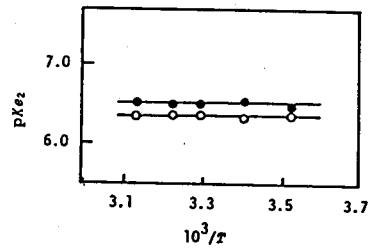


Fig. 82. Temperature Dependence of pK_{e2} . ○, maltose as a substrate; ●, soluble starch as a substrate.

前記 I-7 と同様な混合液
を 10, 20, 30, 37, 45°C の各温
度を 3 分間及ぶせしめ、各温度における K_m , V を用いて Dixon-Webb の
対数プロット²⁵³⁾を作成した。ここから得られるそれぞれの温度に於け
る pK_{e2} 値を Fig. 82 に示した。これより明らかなように、 pK_{e2} は
いずれの温度でも一定値を示した。Van't Hoff の式^{24), 254)}

$$\frac{d \ln K_e}{d(1/T)} = \frac{-\Delta H_e}{R}$$

$$\therefore \Delta H_e = 2.3 \cdot R \frac{d(pK_e)}{d(1/T)} \quad (\text{式-9})$$

(R : 気体定数, T : 絶対温度)

を用いて ΔH_e を算出すると、maltose, soluble starch のいずれを
基質とした場合にも 0 kcal/mol であった。従って、Table 16 の
対応から解離基スもカルボキシル基と推定した。

3. メタノール添加の影響 推定した解離基をより明
確にするために、メタノール存在下に於ける pH-速度曲線を求めた。
すなわち、カルボキシル基、アミノ基およびイミダゾール基は下記よう
に解離するため、カルボキシル基のように解離に際して新たに正電の

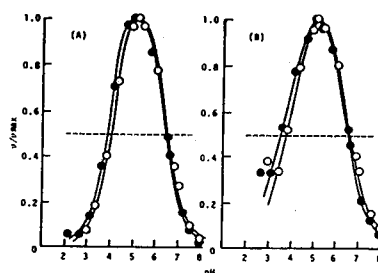


FIG. 83. Effect of Methanol for Hydrolyses of Maltose (A) and Soluble Starch (B) by Sugar Beet α -Glucosidase.

The reaction mixture containing 0.2 ml of 0.25% substrate solution, 0.4 ml of MacIlvaine buffer, 0.2 ml of methanol or water and 0.2 ml of enzyme (1.9×10^{-3} mg) solution was incubated at 37°C for 5 min.

●, methanol 0%; ○, methanol 20% (v/v).

イオンを生ずる型では、他の二者のように荷電の符号の変化のない型に比べ溶媒の誘導率の影響を受け易い。

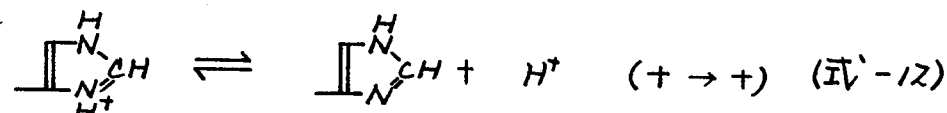
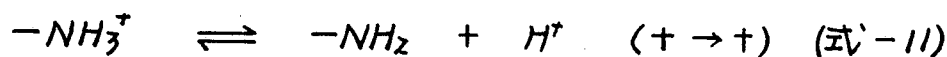
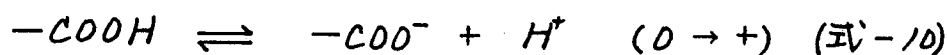


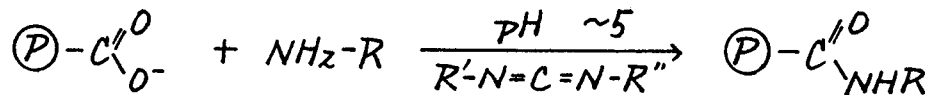
Fig. 83にメタノール添加系および無添加系のpH-速度曲線を示した。

基質の最終濃度は 0.5 mg/ml とした。これは通常、活性測定時の $1/4$ の濃度である。低基質濃度の条件下では pH-活性曲線は pH ~ V/K_m 曲線に近づくので、初速度がその最大値の $1/2$ を示す pH を近似値に pK_e 値と見做すことができる。図より、両基質の水解反応に於て pK_{e1} は 0.25 pH 単位、 pK_{e2} は 0.1 pH 単位、それぞれアルカリ側へ移行し、低い誘導率の反応系を解離が抑制される (pK_e が増加する) ことが確認された。この結果は両解離基がいずれもカルボキシル基であることを支持するところである。

4. カルボジイミドによる化学修飾

1-ethyl-3-(3-di-

methylaminopropyl) carbodiimide の水溶性カルボジイミド (WSC) による酵素の化学修飾を行った。蛋白質中のカルボキシル基は WSC とアミンを用いる二段階反応でアミドに変換させることとなる。^{255, 256}



本実験に於ては pH 4.2 以下で修飾反応を行った。

酵素液 (5 μg 蛋白量) 50 μl に各種 pH の 0.1M 酢酸緩衝液 100 μl 中、0.4M WSC (1.6M glycine ethyl ester を含む) 50 μl を添加して、37°C で 60 分間修飾反応を行った。残存活性は 0.4M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で溶解して maltose 200 μl を添加し、37°C で 5 分間酵素反応を行って測定した。なお、修飾反応液中の pH は pH-X-7 で測定して補正した。

これは WSC とアミン (glycine ethyl ester) と塩酸塩であるため、使用した緩衝液の pH を低下させるからである。

Fig. 84 にその結果を示した。

pH 4.0 以下で修飾による失活が認められ、残存活性は pH 3.9 で 81%, pH 3.8 で 24%, pH 3.6 で 3%

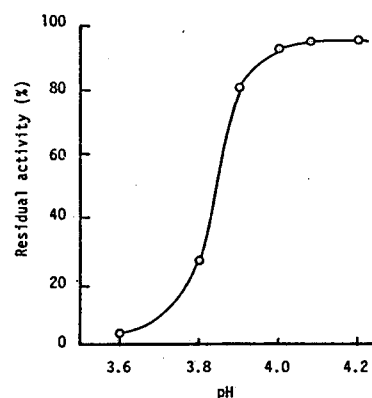


Fig. 84. Inactivation of Sugar Beet Acid α -Glucosidase by Water Soluble Carbodiimide. The enzyme (50 μ l, 5 μ g of protein) was incubated with 50 μ l of 0.4M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide containing 1.6M glycine ethyl ester in 100 μ l of 0.1M sodium acetate buffer at 37°C for 60 min. The residual activity was determined by adding 200 μ l of 0.4% maltose (in 0.4M sodium acetate buffer, pH 4.5).

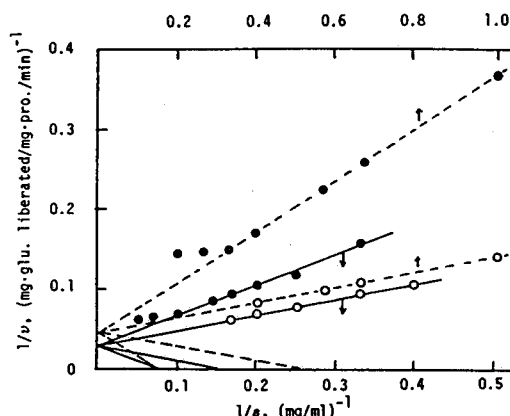


Fig. 85. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolyses of Maltose and Soluble Starch by Native and WSC-modified Sugar Beet Acid α -Glucosidase. The enzyme was modified at same conditions as in Fig. 84, except that pH was 3.85. The enzyme activity was determined by adding substrate of various concentration.
 ○: native enzyme, maltose as a substrate; ●: modified enzyme, maltose as a substrate; ○: native enzyme, soluble starch as a substrate; ●: modified enzyme, soluble starch as a substrate.

であった。

Fig. 85は pH 3.85で上記と同様に酵素を修飾し、部分活性を示す酵素の maltose と soluble starch に対する K_m , V を測定したものである。両基質の水解反応に於て、修飾酵素では K_m の増加、すなわち、基質との親和力の減少のみが認められることから、修飾を受けるカルボキシル基は解離性基と推測される。

酸性 protease の代表的なカルボキシル基修飾試薬、diazo-acetyl-DL-norleucine (Cu^{2+} 存在下)²⁴⁵⁾ や 1,2-epoxy-3-(p-nitro-phenoxy) propane²⁴⁶⁾ では本酵素の活性低下が認められることが、さらに、他の残基に特異性の高い試薬、diethylpyrocarbonate (主に His)²⁵⁷⁾, monoiodoacetic acid (主に -SH)²⁵⁸⁾, iodoacetamide (主に -SH)²⁵⁹⁾, p-chloromercuribenzoic acid (-SH)²⁶⁰⁾, Koshland 試薬 (Trp)²⁶¹⁾, phenylmethylsulfonyl fluoride (Ser)²⁶²⁾,

Table 17. Characterization of Essential Ionizable Groups of Sugar Beet Acid α -Glucosidase

Substrate	Ionizable group (1)			Ionizable group (2)		
	pK _{e1}	pK _{es1}	ΔH_1 (kcal/mol)	pK _{e2}	pK _{es2}	ΔH_2 (kcal/mol)
Maltose	3.9	-	-	6.35	6.35	0
Soluble starch	3.7	-	-	6.5	6.5	0
ΔpK_e (20% methanol)			+0.25			+0.1
Modification by WSC		Yes			-	
		-COO ⁻			-COOH	

tetranitro methane (主に Tyr)²⁶³⁾ ではほとんど失活しないことが確かめられた。

以上の I-1 ~ I-4 で得られた両活性解離基の特性を Table 17 に集約した。これらの結果を総合して、テンサイ酸性 α -glucosidase の活性解離基を酸性側では $-COO^-$ (活性型を示す。以下全て同じ)、アルカリ側では $-COOH$ と推定した。また, maltose と soluble starch の両水解反応において同じ解離基を必須とすることは, 両者が共通の活性部位を水解されることを示唆するものである。さらに, 本項 I-1 で示した速度パラメーターの pH 依存性から想起されるように, 至適 pH はこれを調べる際の反応基質濃度により異なる。すなわち, 高濃度の基質で調べると pH-活性曲線は pH-V 曲線に近似し, 非常に希薄な基質溶液を用いて調べると pH-V/K_m 曲線に類似する。ラット肝臓¹⁷³⁾ や部分精製のウサギ筋肉²¹⁶⁾ の酸性 α -glucosidase で異なる基質濃度の maltose と glycogen を用い, 両者に対する反応至適 pH に差異が認められることから, それぞれの水解反応が別個に行われることの判断材料としていえるが, 全く妥当性を欠くものである。

II. トラマニ酸酸性 α -glucosidase の活性解離基

1. K_m , V および V/K_m の pH 依存性 本酵素の活性解離基を推定するために, maltose および soluble starch に対する K_m , V を種々の pH (McIlvaine 緩衝液, pH 2.4~7.5) を求め, これら速度パラメーターの pH 依存性を調べた。Fig. 86 は常法により得られた K_m , V および V/K_m を Dixon-Webb の対数プロット²⁵³⁾ を示したものである。いずれを基質とした場合にも類似の pH 依存性を示した。 $pK_m (= \log 1/K_m)$ は酸性程低く, pH 4.5~5.0 で最大となり, それ以上の pH では一定の値を保持した。一方, $\log V$ はアルカリ側程低い値を示し, pH 5 付近より酸性側で一一定値を示した。 $\log (V/K_m)$ は pH 5.0 で最大を示し, これより酸性およびアルカリ側で減少した。

図中の破線を示したガイドラインから酸性側およびアルカリ側の各解離基の pK 値を求めたところ下記の通りであった。すなわち, maltose 基質の場合, $pK_{e1} = 3.85$, $pK_{e2} = pK_{e3} = 6.5$ であり, soluble starch を基質とすると, $pK_{e1} = 3.6$, $pK_{e2} = pK_{e3} = 6.4$ であ

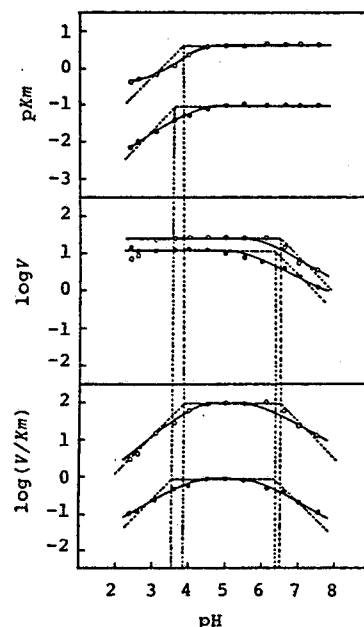


Fig. 86. Dependence of K_m , V and V/K_m on pH for Hydrolyses of Maltose and Soluble Starch by Concord Pole (*Phaseolus*) Acid α -Glucosidase. V : μ g of glucose/ 0.2 μ g of protein/min. K_m : mg/ml. $\circ$, maltose; $\bullet$, soluble starch

あった。 pK_{e1} は本実験に於ても求めることはできなかった。 pK 値に
関するこれらの結果より、酸性側の活性解離基はカルボキシル基と
推定した。 $-COO^-$ の型で主に基質との結合に関与しているものと推測
される。 アルカリ側の解離基は酵素-基質複合体の分解に直接与
かるものと考えられるが、ここで得られたデータのみからは残基の推
定は困難である。

2. 解離熱の算出

25~45°C の温度範囲で低濃度

基質 (maltose, 0.1 mg/ml ; soluble starch, 0.8 mg/ml) に酵素
を作用させ、種々の pH での初速度を求めた。最大の初速度の 1/2 を
示す速度の pH を pK 値と仮定した簡便法により pK_{e1} および pK_{e2} を推
定し、これらの温度依存

性を Fig. 87 に示した。

式-9 を用いて ΔH_e を算出

したところ、酸性側解
離基では $\Delta H_1 = -1.5 \text{ kcal}$

/mol (maltose), -1.7
kcal/mol (soluble sta

rch) であった。一方、

アルカリ側解離基では $\Delta H_2 = -1.2 \text{ kcal/mol}$ (maltose), -0.9
kcal/mol (soluble starch) であり、解離基はもまたカルボキシ
ル基であることが示唆された。

3. メタノール添加の影響

メタノール 20% (V/V) 添加

系で pH-速度曲線を求めた。 Fig. 88 に示したように、maltose,

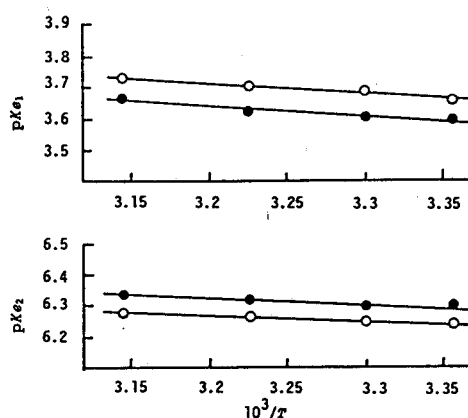


Fig. 87. Temperature Dependence of pK_{e1} and pK_{e2} . ○, maltose as a substrate; ●, soluble starch as a substrate.

soluble starch いずれを基質とした場合にもメタノールの添加により曲線がアルカリ側へ移行した。簡便的に得られる pK_{e1} および pK_{e2} は基質が *maltose* の場合、それぞれ 0.35 および

0.15 pH 単位、*soluble starch* を基質とすると、それぞれ 0.3 および 0.2 pH 単位入りの値を示した。従って、解離に際して新たに正負のイオンを生ずるカルボキシルが必須の官能基であることが判明した。

以上の結果を総合的に考察し、トランス酸性 α -glucosidase の活性解離基を酸性側が $-COO^-$ 、アルカリ側が $-COOH$ と推定した。これら両解離基の特性を Table 18 にまとめた。また、*maltose* と *soluble starch* の両基質に関して同じ結論が得られたことは、二基質の水解が共通の部位で行われることを示唆している。

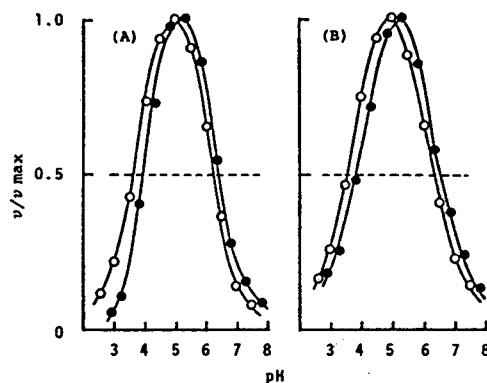


Fig. 88. Effect of Methanol for Hydrolyses of Maltose(A) and Soluble Starch(B) by Concord Pole Acid α -Glucosidase. The reaction mixture containing 0.2 ml of substrate(0.05% maltose or 0.4% soluble starch), 0.5 ml of McIlvaine buffer, 0.2 ml of methanol or water and 0.1 ml of enzyme(0.2 μ g for maltose or 1.0 μ g for soluble starch) was incubated at 37°C for 5 min. o, methanol 0%; •, methanol 20%(v/v).

Table 18. Characterization of Essential Ionizable Groups of Concord Pole Acid α -Glucosidase

Substrate	Ionizable group (1)			Ionizable group (2)		
	pK_{e1}	pK_{e2}	ΔH_1 (kcal/mol)	pK_{e2}	pK_{e2}	ΔH_2 (kcal/mol)
Maltose	3.85	-	-1.5	6.5	6.5	-1.2
Soluble starch	3.6	-	-1.7	6.4	6.4	-0.9
ΔpK_e (20% methanol)	+0.3~0.35			+0.15~0.2		
	-COO ⁻			-COOH		

Ⅲ. ブタ肝臓酸性 α -glucosidaseの活性解離基

1. 簡便法による pK_e 値の測定 種々のpHのMcIlvaine

緩衝液中, 37°C で低濃度の基質(最終濃度: maltose, 0.2 mg/ml ; shellfish glycogen, 1 mg/ml)に酵素を作用せしめ, pH-速度曲線を作成した。このような低濃度基質を用いた反応系での活性曲線より, 簡便的に pK_e 値(最大活性の1/2の速度を与えるpH値)を求めることが出来る。

Fig. 89に示したメタノール無添加系の結果より, 酸性側の活性解離基1は maltoseを基質の場合 $pK_{e1} = 3.2$, glycogenを基質の時には $pK_{e1} = 3.4$ であった。一方, アルカリ側の解離基2の pK_{e2} は 6.0 (maltose基質) および 6.2 (glycogen基質)であった。Table 16に示した蛋白質, ペプ4ドの解離基について得られている標準 pK 値との対比から, 解離基1はカルボキシル基と容易に推定された。解離基2に関してはカルボキシル基, アミノ基, イミダゾール基のいずれかと考えられた。

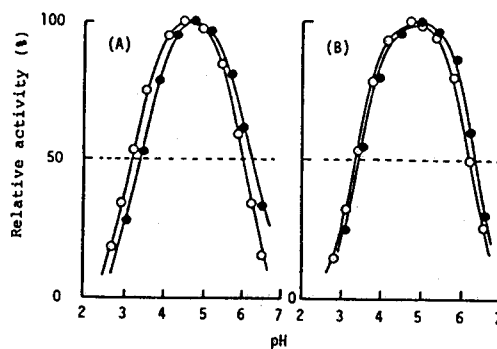


Fig. 89. Effect of Methanol for Hydrolyses of Maltose(A) and Shellfish Glycogen(B) by Pig Liver Acid α -Glucosidase. The reaction mixture containing 0.2 ml of substrate (maltose, 1 mg/ml ; shellfish glycogen, 5 mg/ml), 0.4 ml of McIlvaine buffer, 0.2 ml of methanol or water and 0.2 ml of enzyme ($1\text{ }\mu\text{g}$) was incubated at 37°C for 5 min .

2. 解離熱の算出

解離基としての判定材料として、 ΔH 値の算出を行った。Ⅲ-7 に於て簡便法により pK_e 値を求めたと同様の方法で、25, 30, 37, 40°C の各温度に於ける pK_e 値を測定した。maltose および shellfish

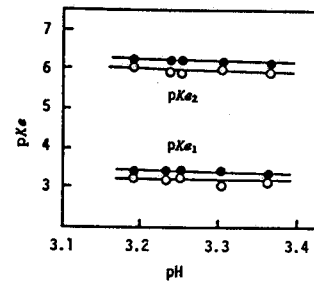


Fig. 90. Temperature Dependence of pK_e .
o, maltose as a substrate; ●, shellfish glycogen as a substrate.

glycogen を基質として得られた pK_{e1} および pK_{e2} の温度依存性を Fig. 90 に示した。Van't Hoff の式 (式-9) を用いて ΔH を算出したところ、maltose を基質の場合 $\Delta H_1 = 0 \text{ kcal/mol}$, $\Delta H_2 = -2.4 \text{ kcal/mol}$, shellfish glycogen 基質では $\Delta H_1 = -1.2 \text{ kcal/mol}$, $\Delta H_2 = -3.0 \text{ kcal/mol}$ であった。カルボキシル基の標準 ΔH は $\pm 15 \text{ kcal/mol}$ ^{241~244)}、アミノ基では $10 \sim 13 \text{ kcal/mol}$ ^{241~244)} またヒスチジンのイミダゾール基では $6.9 \sim 7.5 \text{ kcal/mol}$ ^{241~244)} と報告されていることから、本酵素の両必須解離基はいずれもカルボキシル基と考えられる。

3. メタノール添加の影響 Ⅲ-7 と同様にして、メタノール添加系での pK_e 値を測定した。Fig. 89 から理解されるように、maltose 基質で $pK_{e1} = 3.4 (\pm 0.2)$, $pK_{e2} = 6.2 (\pm 0.2)$, shellfish glycogen を基質とした場合には $pK_{e1} = 3.5 (\pm 0.1)$, $pK_{e2} = 6.4 (\pm 0.2)$ であり、メタノール無添加系と比べて、それぞれ括弧内に示した pH 単位の増大が確認された。誘電率の低下によるカルボキシル基の解離抑制と解釈される。

以上の結果を総合すると、前述の 2 種の植物起源酸性

Table 19. Characterization of Essential Ionizable Groups of Pig Liver Acid α -Glucosidase

Substrate	Ionizable group (1)		Ionizable group (2)	
	pK _{e1}	ΔH_1 (kcal/mol)	pK _{e2}	ΔH_2 (kcal/mol)
Maltose	3.2	0	6.0	-2.4
Shellfish glycogen	3.4	-1.2	6.2	-3.0
ΔpK_e (20% methanol)	+0.2		+0.1~0.2	
	-COO ⁻		-COOH	

α -glucosidase と同様に フタ肝臓 酸性 α -glucosidase に関して
解離基は 活性型で 1 個 $-COO^-$, 2 個 $-COOH$ であると判断
した。 以下両必須解離基の特性を Table 19 にまとめて示した。
また, maltose と shellfish glycogen の水解に於て, 同種の活性
解離基が関与する事実は, 前章で述べた両水解部位の共通性を
強く支持するものである。

IV. ウサギ筋肉酸性 α -glucosidase の活性解離基

1. 簡便法による pK_e 値の測定 maltose および she-
llfish glycogen の最終濃度をそれぞれ 0.16 mM (maltose に対
する K_m の 1/40) および 0.8 mg/ml (shellfish glycogen に対する K_m の
1/25) とし, 種々の pH の McIlvaine 緩衝液中, 37°C で 5 分間酵
素反応を行なった。 得られた pH-速度曲線を Fig. 9 に示した。
簡便的に求まる 活性解離基の pK_e 値は, 酸性側解離基で
pK_{e1} = 3.7 (maltose 基値) および 3.6 (shellfish glycogen 基値) であり,
アルカリ側解離基で pK_{e2} = 6.7 (maltose 基値) および 6.8 (shellfish
glycogen 基値) であった。 解離基 1 は カルボキシル基と推測される。

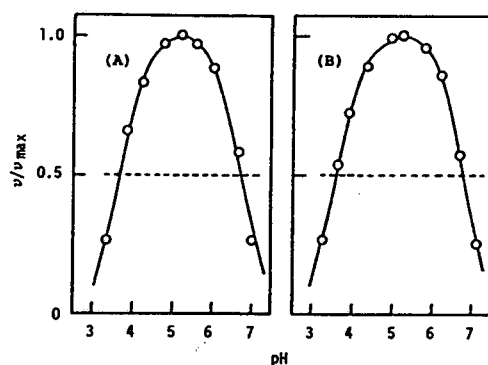


Fig. 91. pH-velocity Curves on Hydrolyses of Maltose (A) and Shellfish Glycogen (B) by Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase. The reaction mixture containing 0.4 ml of substrate (maltose, 0.4 mM; shellfish glycogen, 2.5mg/ml), 0.4 ml of McIlvaine buffer and 0.2 ml of enzyme (1.2 μ g) was incubated at 37°C for 5 min.

2. 解離熱の算出 活性解離基の推定をより確かなものとするために、解離熱 ΔH の算出を行った。TV-1 と同じ反応混合液を各種の温度に反応せしめ、pH-速度曲線より簡便的に求める pK_{e1} および pK_{e2} の温度依存性を Fig. 92 に示した。van't Hoff の式 (式-9) を用いて ΔH を算出したところ、 ΔH_1 は 0 kcal/mol (maltose 基質)、-0.6 kcal/mol (glycogen 基質) であり、一方、 ΔH_2 は 0 kcal/mol (maltose 基質)、-1.7 Kcal/mol (glycogen 基質) であった。Table 16 に示した蛋白質および 70°40' について得られている標準 ΔH との対比から、解離基 1 のみならず解離基 2 もまたカルボキシル基と推定された。この結論は以下に述べた酸性 α -glucosidase と同じである。

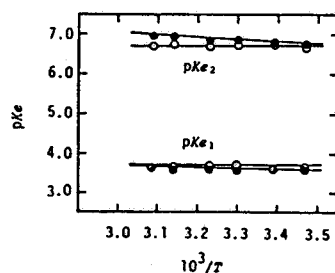


Fig. 92. Temperature Dependence of pK_e . $\circ$, maltose as a substrate; $\bullet$, shellfish glycogen as a substrate.

Table 20. Characterization of Essential Ionizable Groups of Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase

Substrate	Ionizable group (1)		Ionizable group (2)	
	pK _{e1}	ΔH_1 (kcal/mol)	pK _{e2}	ΔH_2 (kcal/mol)
Maltose	3.7	0	6.7	0
Shellfish glycogen	3.6	-0.6	6.8	-1.7
	-COO ⁻		-COOH	

以上のようにして、ウサギ筋肉酸性 α -glucosidaseの活性に必須の解離基を酸性側の1は $-\text{COO}^-$ 、アルカリ側の2は $-\text{COOH}$ と推定した。Table 20に両解離基の特性を集約した。また、maltoseとshellfish glycogenのいずれを基質としても同じ結果を与えることは、両者が共通の活性部位で水解作用を受けることの傍証でもある。

V. コレ酸性 α -glucosidaseの活性解離基

1. Km, V および V/KmのpH依存性 これは、maltoseとmaltodextrinの2を基質として得られた結果について述べる。酵素反応は37°C, pH 2.0~7.5域のMcIlvaine緩衝液中、5分間行なった。種々の基質濃度について初速度を測定し、常法により各pHでのKmおよびVを算出した。Fig. 93に $\log 1/Km (= pKm)$, $\log V$ および $\log V/Km$ のpH依存性を示した。pKmは両基質に關し、アルカリ側にわたるに従い徐々に増大し、酵素と基質の親和力が増加することを確認された。これとは逆に、 $\log V$ は酸性側で大きく、pH 5以上に於ては急激に減少した。図中に破線を示したカギ

ドラインを用いて pK 値を求めると maltose を基質とした場合: $pK_{e1} = 3.1$, $pK_{e2} = pK_{es2} = 6.10$, maltodextrin GII を基質とした場合: $pK_{e1} = 3.1$, $pK_{e2} = pK_{es2} = 6.15$ であった。 pK_{es1} は 2 以下であり、本酵素の不安定な pH 領域であるため求めることは困難であった。

ここから得られた結果から、解離基は 7 個のカルボキシル基, 2 個のカルボキシル基, アミノ基, イミダゾール基のいずれかであると推測した。

2. 解離熱の算出

ΔH 算出のため, 20.5, 45°C の各温度で pK_e を求めた。

Fig. 94 に pK_{e2} の温度依存性を示した。これらの値を van't Hoff の式 (式-9) に代入して, 解離熱 ΔH を算出した。その結果, maltose を基質で -1.7 kcal/mol , maltodextrin GII を基質とした場合には -0.9 kcal/mol であった。この成績は解離基としてカルボキシル基であることを強く示唆するものである。

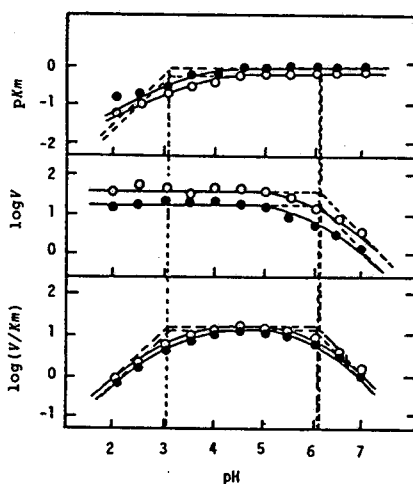


Fig. 93. Dependence of K_m , V and V/K_m on pH for Hydrolyses of Maltose and Maltodextrin GII by Rice Acid α -Glucosidase II. V : mg of glucose liberated/mg of protein/min. K_m : mM. O, maltose; ●, maltodextrin GII.

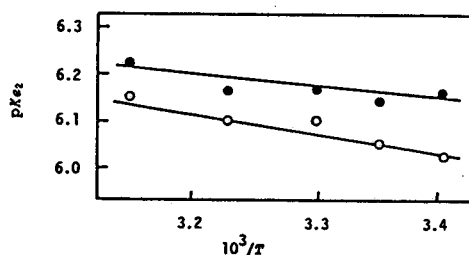


Fig. 94. Temperature Dependence of pK_{e2} . O, maltose as a substrate; ●, maltodextrin GII as a substrate.

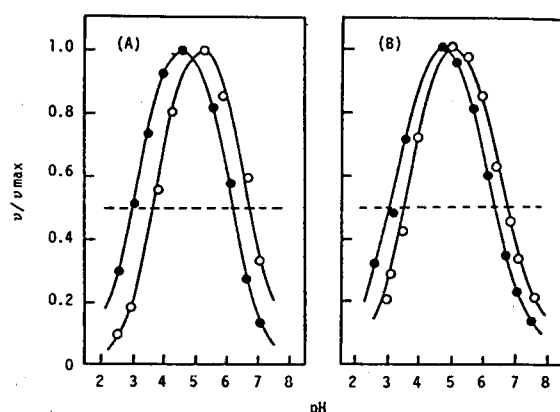


Fig. 95. Effect of Methanol for Hydrolyses of Maltose (A) and Maltodextrin G7 (B) by Rice Acid α -Glucosidase II. The reaction mixture containing 0.2 ml of 0.025% substrate, 0.2 ml of McIlvaine buffer, 0.05 ml of methanol or water and 0.05 ml of enzyme (0.5 μ g) was incubated at 37°C for 5 min. ●, methanol 0%; ○, methanol 20% (v/v).

3. メタノール添加の影響 メタノール 20% (v/v) 存在下、種々の pH の McIlvaine 緩衝液中、37°C で酵素反応を行った。maltose あるいは maltodextrin G7 の最終濃度は 0.1 mg/ml とした。メタノール無添加 (0%) の系を対照として得られた結果を Fig. 95 に示した。両基質の水解に於て、メタノール存在での pK_a 値は解離基 1 に対して 0.5 pH 単位、解離基 2 に対して約 0.4 pH 単位大きくなり、両必須解離基の解離が低誘電率下で抑制されていることが理解された。これは解離に際して新たに正負のイオンを生ずるカルボキシル基 (式-10参照) の解離状態を反映しているものと解釈される。従って、酸性側と同様にアルカリ側の解離基とカルボキシル基と判断される。

4. カルボジイミドによる化学修飾 水溶性カルボジイミド (WSC) の 7-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide を用いて本酵素の修飾を行い、maltase および soluble starch 水解

作用がいかなる影響を受けるかを調べた。Fig. 96は活性損失の経時変化を, Fig. 97は pHによる失活の依存性を示したものである。maltose および soluble starch のいずれの水解作用も低下し, 両活性失活の度合いはほぼ同じであった。

このような触媒能力の減少は、酵素と基質の親和力の低下 (K_m の増大) によるものか、酵素-基質複合体の解離速度の減少 (V の減少) によるものか、あるいはその両者であるのかを明確にするために、修飾酵素の両基質に対する K_m および V を測定した。酵素の修飾は酵素液 (0.03 mg 蛋白量) 0.4 ml, 30 mM WSC - 120 mM glycine ethyl ester 0.6 ml, 0.4 M 酢酸緩衝液 (pH 3.0) 1 ml を合計 2 ml とし, 37°C,

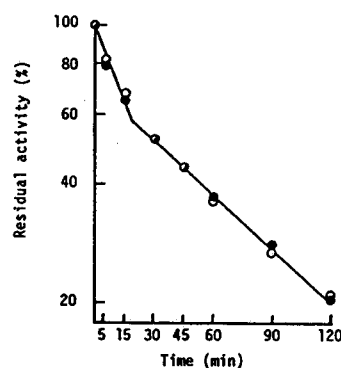


Fig. 96. Time Courses of Inactivation of Rice Acid α -Glucosidase II by Water Soluble Carbodiimide and Glycine Ethyl Ester. After 0.4 ml of enzyme (0.03 mg) had been inactivated by 0.6 ml of 66.7 mM carbodiimide and 270 mM glycine ethyl ester in 1.0 ml of 0.4M sodium acetate buffer (pH 3.0) at 25°C, 0.1 ml of the reaction mixture was pipetted out for determining the residual activity with maltose (o) or soluble starch (●) as a substrate.

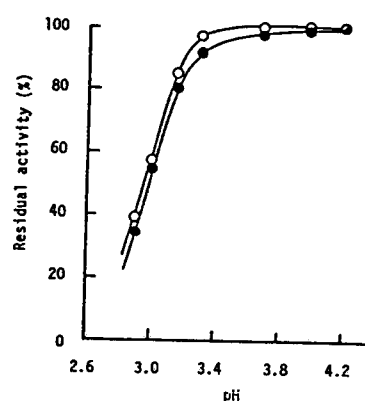


Fig. 97. Effect of pH on Inactivation of Rice Acid α -Glucosidase II. After 0.1 ml of enzyme (0.0075 mg) had been incubated with 0.15 ml of 33.3 mM carbodiimide and 133 mM glycine ethyl ester in 0.25 ml of 0.4M sodium acetate buffer at 25°C for 120 min, 0.1 ml of the reaction mixture was pipetted out for determining the residual activity with maltose (o) or soluble starch (●) as a substrate.

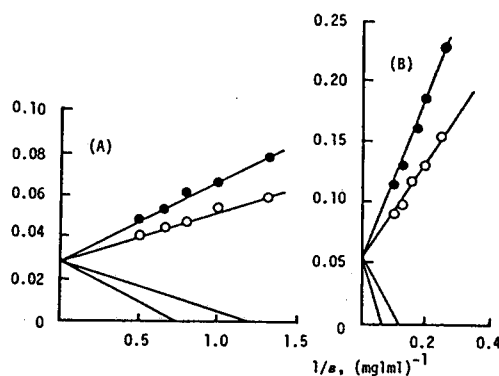


Fig. 98. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolyses of Maltose (A) and Soluble Starch (B) by Native and Modified Rice Acid α -Glucosidase II. The enzyme (0.4 ml, 0.03 mg) was modified by 0.6 ml of 30 mM carbodiimide and 120 mM glycine ethyl ester in 1 ml of 0.4M sodium acetate buffer (pH 3.0) at 37°C for 60 min. The enzyme reaction was carried out at 37°C, pH 4.0. $\circ$, native enzyme; $\bullet$, modified enzyme.

Table 21. Characterization of Essential Ionizable Groups of Rice Acid α -Glucosidase II

Substrate	Ionizable group (1)			Ionizable group (2)		
	pK_{e1}	pK_{es1}	ΔH_1 (kcal/mol)	pK_{e2}	pK_{es2}	ΔH_2 (kcal/mol)
Maltose	3.1	-	-	6.1	6.1	-1.7
Maltodextrin G ₃	3.1	-	-	6.15	6.15	-0.9
ΔpK_e (20% methanol)			+0.5			+0.4
Modification by WSC			Yes			-
			$-\text{COO}^-$			$-\text{COOH}$

60分反応させて行った。この条件下では maltose 水解の残存活性は約 70%であった。Fig. 98 に示したように、いすれを基質とした場合にも V の変動は認められず、 K_m のみが増大した。このことは修飾を受けるカルボキシル基が基質との結合に深く関与している解離基1であることを示唆している。

以上の V-1 より V-4 を得られた結果から、コメ酸性 α -glucosidase II の活性解離基は解離基1が $-\text{COO}^-$ であり、解離基2が $-\text{COOH}$ であると推定した。Table 21 にこれから両活性解

離基の特性をまとめ示した。

本項で明らかとなったように, *maltose* と *maltodextrin* の水解に於て, 同じ解離基が必須であること, 修飾による *maltose* と *soluble starch* の水解活性の減少がほぼ同じであること の理由から, 三者の基質は同じ活性部位を水解されるものと推測した。

VI. フタ肝臓およびフタ血清中性 α -glucosidase の活性 解離基

1. K_m , V および V/K_m の pH 依存性 本章 I-1, II-1

および V-1 を既述した方法に準拠して, フタの肝臓および血清由来中性 α -glucosidase の *maltose* に対する K_m , V を種々の pH で求めた。

Fig. 99 に各速度パラメーターの Dixon-Webb プロット²⁵³⁾ を示した。免疫学的方法を異種の酵素¹⁸⁷⁾ である両者は速度論的には類似の性質を示した。 V/K_m はいずれの

酵素とも pH 6.4 付近で最大となり, 酸性 α -glucosidase と比較して, 中性側で最大活性を示す酵素であることが理解される。図中のガイドラインを用いて pK 値を求めたところ, 両酵素ともに酸性側解離基は $pK_1 = 5.0$, $pK_{a1} = 3.8$, アルカリ側の解離基は $pK_2 = 7.7$, $pK_{a2} = 8.2$ であった。

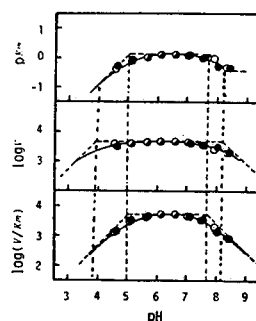


FIG. 99. Dependence of K_m , V and V/K_m on pH for Hydrolysis of Maltose by Pig's Liver and Serum α -Glucosidases.

K_m : mM.

V : μ g of glucose liberated from non-reducing side/mg-pro/min.

●, pig liver α -glucosidase; ○, pig serum α -glucosidase.

2. 解離熱の算出

簡便法で得られた pK_{e1} および pK_{e2} の温度依存性を Fig. 100 に示した。

式-9 を用いて 解離熱を算出したとこ

ろ, $\Delta H_1 = -1.7 \text{ kcal/mol}$, $\Delta H_2 =$

5.5 kcal/mol であった。 pK_{e1} と ΔH_1 の各値より, 解離基1はカルボキシル基 (活性型: $-\text{COO}^-$) と推定した。

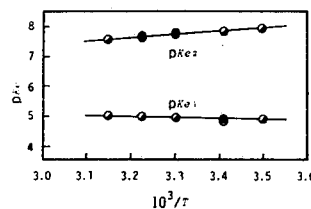
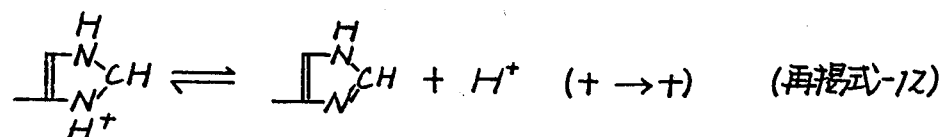
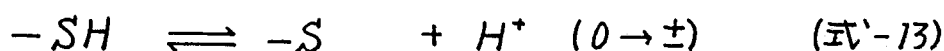


FIG. 100. Temperature Dependence of pK_{e1} and pK_{e2} .
●, pig liver α -glucosidase; ○, pig serum α -glucosidase.

3. メタノール添加の影響

解離基2は pK_{e2} と ΔH_2 から SH 基 であり ヒステジンのイミダズール基 と考えらる。両者は次式のように解離する。



すなわち, イミダズールでは解離に際して荷電の変化がなないが, SH 基では新たな正負のイオンを生じる。従って, 誘電率の低下に伴う解離抑制の有無を調べることで, 両者のいずれかであることを判別できる。

メタノール 20% (V/V) を含む反応系 および メタノール 無添加系における pH-速度曲線を Fig. 101 に示した。酸性側解離基1は誘電率低下の影響を受け解離が抑制されている ($\Delta pK_{e1} = +0.3 \sim 0.4$) ことから, カルボキシル基との推定が支持される。これに対し, アル

カリ側の解離基はメタノール添加の影響を全く受けていないことが理解される。もし、SH基があるならば解離基と同様にアルカリ側へ pK_{es} を移行するはずである。従って、解離基はヒステジンのイミダゾール基であると推定される。

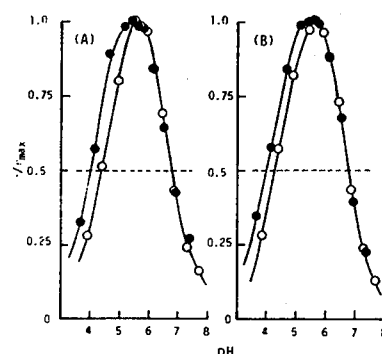


FIG. 101. Effect of Methanol for Hydrolysis of Maltose by Pig's Liver (A) and Serum (B) α -Glucosidases.

The reaction mixture containing 0.4 ml of maltose (final concn., 0.3 mM), 0.8 ml of McIlvaine buffer, 0.4 ml of methanol or water and 0.4 ml of enzyme solution was incubated at 37°C.

●, methanol 0%; ○, methanol 20% (v/v).

本項で明らかとなったブタ肝臓およびブタ血清の両中性 α -glucosidase の活性解離基の特性を Table 22 に集約した。

Table 22. Characterization of Essential Ionizable Groups of Pig Liver and Pig Serum Neutral α -Glucosidases

	Ionizable group (1)	Ionizable group (2)
pK_e	5.0	7.7
pK_{es}	3.8	8.2
ΔH (kcal/mol)	-1.7	5.5
ΔpK_e	+0.3 0.4	0
	$-\text{COO}^-$	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{N} \text{---} \text{CH} \\ \\ \text{N}^+ \text{H} \end{array}$

VII. ビール酵母中性 α -glucosidase II の活性解離基

pH 6.5 付近で作用最大を示すビール酵母中性 α -glucosidase II は pH 5.0 ~ 8.0 の範囲で安定であるが、この領域より酸性側およびアルカリ側では速かに活性を失う。²⁶⁴⁾ この点に述べた

速度論的方法は広域pH範囲で安定な酵素の活性解離基の同定法として適用されるが、本酵素のように、狭いpH領域でしか安定性を示さない酵素に対しては不適である。このように理由から、ビール酵母中性 α -glucosidase II に関しては、化学修飾法により必須解離基の推定を行った。

1. 各種修飾試薬による影響 種々の試薬を用いて酵素の化学修飾を行い、phenyl α -glucoside 水解活性におよぼす影響を調べた。Table 23 に示したように、本酵素はチロシン残基に特異性の高い N-acetylimidazole、トリプトファン残基に特異的な Koshland 試薬、アミノ基に特異性の高い 2-methoxy-5-nitro tropone、SH 基に特異性の高い N-ethylmaleimide、iodoacetamide および 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB と略) ではほとんど修飾による活性の低下が認められなかった。これに対し、光酸化化

Table 23. Effects of Various Reagents to Phenyl α -Glucosidase Activity of Brewer's Yeast α -Glucosidase II

Reagent	Molar excess of reagent / enzyme	pH	Reaction time (min)	Inhibition (%)
N-Acetylimidazole	200	6.8	30	0
Koshland's reagent	200	6.8	30	20
N-Ethylmaleimide	200	6.8	30	0
Iodoacetamide	200	6.8	30	0
2-Methoxy-5-nitro tropone	200	6.8	30	0
DTNB	200	6.8	30	8
Rose bengal (photooxidation)	2.7	6.8	20	80
Diethylpyrocarbonate	20	6.8	15	76
Water soluble carbodiimide	3.2×10^4	6.0	30	98

α -Glucosidase (5 μ M) was incubated with various reagents in 0.1M potassium phosphate buffer at 25°C. The enzyme assay was carried out with 0.1% phenyl α -glucoside in 0.05M potassium phosphate buffer, pH 6.5, at 25°C for 5 min.

法や diethylpyrocarbonate (DEPC と略) を用いた修飾により, また, 水溶性カルボジイミド (WSC, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, glycine ethyl ester をアミンとする) による修飾で著しい活性の損失が認められた。これは本酵素の活性発現に, カルボキシル基とヒスチジンのイミダゾール基が深く関与していることを示唆するものである。

2. Diethylpyrocarbonate による修飾 酵素の最終濃度を $5\mu\text{M}$ (分子量 $69,000$ を用いて計算²⁶⁴⁾) とし, 10, 20, 30 倍モル濃度の DEPC を用いて化学修飾を行った。Fig. 102 に失活の経時変化を示した。10 倍量の試薬では活性は約 60% に低下し, これ以上の活性の損失は認められなかった。一方, 20 および 30 倍過剰の DEPC では 15 分間の処理でそれぞれ約 30%, 約 18% に活性が減少した。DEPC は水溶液中で比較的不安定である²⁶⁵⁾ ことから, 10 倍過剰 DEPC 系では途中で修飾反応が停止したと思われる。従って, 修飾反応では酵素に対して 20 倍モル以上の DEPC を用いて行

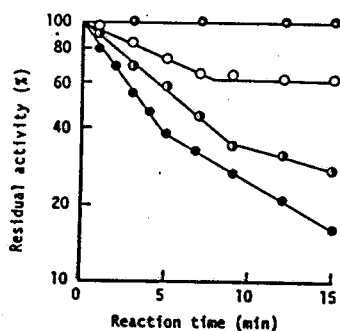


FIG. 102. Inactivation of Brewer's Yeast α -Glucosidase II by Diethylpyrocarbonate.

An α -glucosidase (0.2 ml; final concn., $5\mu\text{M}$) was treated with various concentrations of diethylpyrocarbonate (0.01 ml) at 25°C for 1–15 min: $\circ$, 0 μM ; $\square$, 30 μM ; $\triangle$, 100 μM ; $\bullet$, 150 μM .

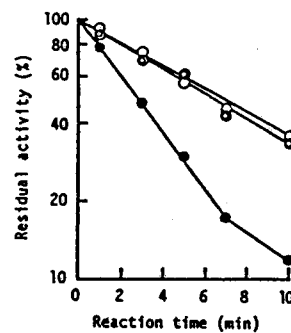


FIG. 103. Inactivation of Brewer's Yeast α -Glucosidase II in the Presence or Absence of Substrate by Diethylpyrocarbonate.

An α -glucosidase (0.1 ml; final concn., $5\mu\text{M}$) was treated with diethylpyrocarbonate (0.01 ml; final concn., $240\mu\text{M}$) in the presence of maltose ($\circ$) or sucrose ($\square$) (0.1 ml; final concn., 100 mM) and in the absence of substrate ($\bullet$) at 25°C for 1–10 min.

うのか望ましいと判断された。DEPCは蛋白質中のヒスチジン残基と次のように反応することから知られている。²⁶⁵⁾

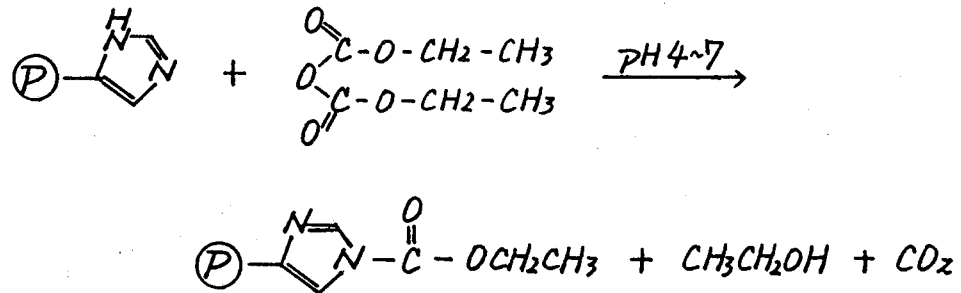


Fig. 103には本酵素の基質となり得る maltose あるいは sucrose の存在による酵素の DEPC による修飾結果を示した。100 mM の maltose あるいは sucrose の存在により失活の速度が減少した。このことから修飾を受ける残基は活性部位、ないはその近傍に位置することから推測される。

部分修飾酵素を用いて, phenyl α -glucoside の水解に関する K_m , V を測定したのが Fig. 104 である。残存活性 80, 56 および 47% を有するいずれの修飾酵素標品でも V のみの変動が認められ, K_m は常に一定 ($K_m = 0.37$ mM, at 25°C) であった。このことは DEPC の修飾による失活が "all or none type" ²⁶⁶⁾ であることを意味している。すなわち, 修飾により完全に活性を失い, 残存活性は非修飾酵素分子

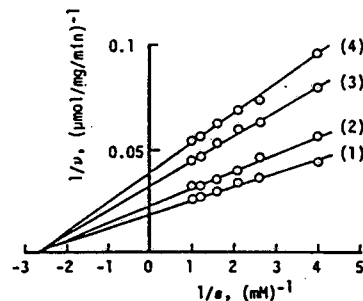


FIG. 104. Double Reciprocal Plots for Hydrolysis of Phenyl α -Glucoside by Native and Diethylpyrocarbonate-treated Brewer's Yeast α -Glucosidase II.

An α -glucosidase (0.2 ml; final concn., 5 μ M) was treated with diethylpyrocarbonate (0.01 ml; final concn., 150 μ M) at 25°C for 1, 3 or 4 min. The reaction mixture containing 0.2 ml of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8), 0.2 ml of phenyl α -glucoside at various concentrations, and 0.1 ml of enzyme was incubated at 25°C for 5 min.

(1), native enzyme; (2), (3), and (4), modified enzymes with 80, 56, and 47% residual activities, respectively.

によるものと解釈される。

3. Diethylpyrocarbonateによる修飾ヒスチジン残基数

蛋白質中のヒスチジン残基が DEPC によりカルベトキシル化されると紫外部の吸収スペクトルが変化する。^{267, 268)} 従って、これを利用して修飾を受けた残基数を算出することが出来る。Fig. 105 に未修飾酵素と DEPC 修飾酵素の紫外部吸収スペクトルを示した。240 nm 付近に N-カルベトキシルヒスチジン残基に起因する吸収増加²⁶⁹⁾ が認められた。280 nm の吸収に変動が認められないことは、チロシン残基の修飾が起きまいないことを意味する。Ovadi の方法²⁶⁷⁾ による 240 nm の吸収増加量 ($\epsilon = 3,200 \times \text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) から、修飾されたヒスチジン残基数を求め、残存活性との関係を調べた。結果を Fig. 106 に示した。反応速度の速い 1 個目のヒスチジンが修飾を受けることにより活性は 80% 以上失われ、さらに修飾が進むと 2 個目のヒスチジンも修飾されるようになり、活性は完全に失われることが確認

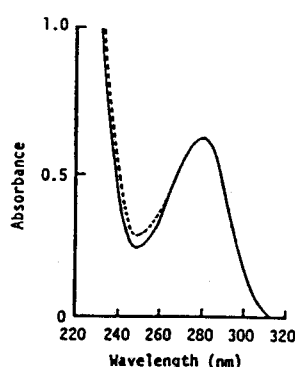


FIG. 105. Effect of Diethylpyrocarbonate on the Spectrum of Brewer's Yeast α -Glucosidase II.

An α -glucosidase (1 ml; final concn., $7.8 \mu\text{M}$) was treated with diethylpyrocarbonate (0.02 ml; final concn., $392 \mu\text{M}$) at 25°C for 20 min. The residual activity was 2% of the native enzyme activity. The spectrum of the enzyme solution with (—) or without (---) reagent was recorded.

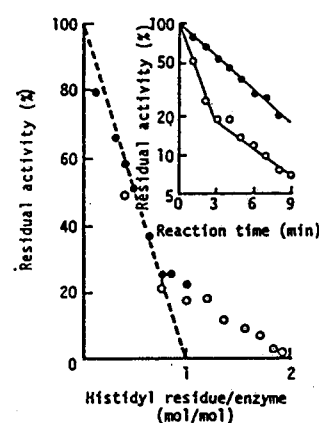


FIG. 106. Relationship between Enzyme Activity and Modified Histidyl Residues.

An α -glucosidase (1 ml; final concn., $7.8 \mu\text{M}$) was treated with diethylpyrocarbonate (0.02 ml; final concn., $392 \mu\text{M}$ (○) or $200 \mu\text{M}$ (●)) at 25°C for 1~9 min. The number of N-carbethoxylhistidyl residues was calculated by the method of Ovadi *et al.*¹²⁾ The inset shows the profiles of inactivation of α -glucosidase II.

された。1個目のヒスチジン残基が活性発現に大きく関わっているものと考えられる。

4. Diethylpyrocarbonate 修飾酵素のヒドロキシルアミンによる活性回復 DEPCにより修飾されるヒスチジン残基はヒドロキシルアミン処理により再生することが知られている。²⁵¹⁾ すなわち、下記の反応が起る、結果として、活性の回復が期待される。

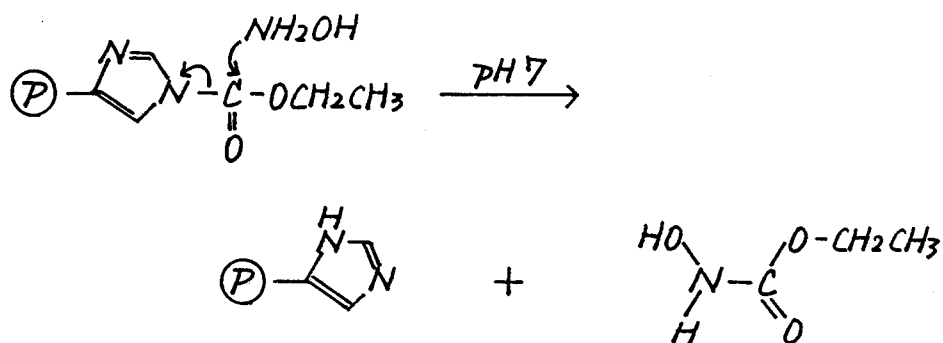


Fig. 107は残存活性40, 26 および 21%を示す修飾酵素を0.75M NH_2OH で処理した際の活性回復を観たものである。40 および 26%の修飾酵素では10分間の処理で完全に活性が回復した。より修飾の進んだ酵素(残存活性 21%酵素)では90%の回復しか認められず、不可逆的な反応と起きていると考えられる。SH基修飾の可能性に関しては、Table 24の結果から右

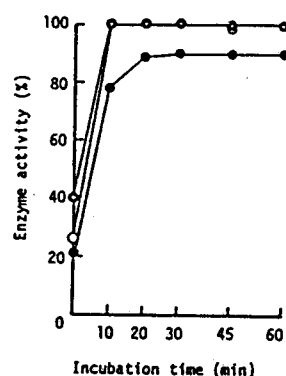


FIG. 107: Recovery of Activity of Diethylpyrocarbonate-modified α -Glucosidase II by Hydroxylamine.

Each modified α -glucosidase (0.1 ml; final concn., $9.8 \mu\text{M}$) having 40 (○), 26 (○), or 21% (●) of the original activity was incubated with hydroxylamine (0.3 ml; final concn., 0.75 M) in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.8, containing 1 mM 2-mercaptoethanol at 25°C for 10–60 min.

定された。すなわち、未処理の酵素でも、残存活性1%の修飾酵素でも1分子当り2個のSH基を含むことから、DEPCによつては修飾されていないことが確認された。しかも、活性発現には最低1個のヒスチジン残基(イミダゾール基)が関与していることが明らかであり、この残基は可逆的にDEPCの修飾を受けるものと結論される。

ローズベンガルを光増感剤とした光酸化法によつても活性が減少することは既に述べた。この方法によつて、蛋白質中のヒスチジン、チロシン、メチオニン、トリプトファン残基およびシステインのSH基が修飾されることが知られている。^{270~273)} 未処理酵素と修飾酵素に於いて、これらのアミノ酸の分析を行

TABLE 24. SULFHYDRYL CONTENTS OF NATIVE AND DIETHYLPYROCARBONATE-MODIFIED α -GLUCOSIDASE II

Enzyme	Enzyme (μ mol)	SH group* (μ mol)	SH group enzyme (mol/mol)	Average
Native	11.6	25.4	2.19	2.16
	11.6	24.6	2.12	
Modified*	9.4	20.4	2.17	2.17
	9.4	20.4	2.17	

- * Sulfhydryl content was determined in the presence of 1% sodium dodecyl sulfate in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 2 mM EDTA, at 25°C by the method of Ellman.
- * An α -glucosidase (16.9 μ M) was treated with 680 μ M diethylpyrocarbonate in a total volume of 2.05 ml for 15 min, and then passed through a Sephadex G-25 column (1 $\times$ 30 cm). The residual activity was 1% of the native enzyme activity.

TABLE 25. AMINO ACID COMPOSITIONS OF NATIVE AND PHOTOOXIDIZED BREWER'S YEAST α -GLUCOSIDASE II

Amino acid	Native enzyme	Photooxidized enzyme*
	mol/mol-enzyme	
Histidine ^b	13.8	12.0
Tyrosine ^b	26.0	26.5
Methionine ^b	7.9	7.6
Tryptophan ^b	16.8	17.3
Cysteine ^c	2.1	1.2

- * An α -glucosidase (17.7 μ M) was photooxidized in the presence of 65.2 μ M rose bengal in a total volume of 4.0 ml. The residual activity was 9% of the native enzyme activity.
- * These amino acids were determined by the method with *p*-toluene sulfonic acid containing tryptamine.¹¹⁾
- * This amino acid was determined with 5,5'-dithio bis(2-nitrobenzoic acid) in the presence of 1% sodium dodecyl sulfate by Ellman's method.

た結果、Table 25に示したように2個のヒスタジンと1個のシステイン残基の減少が認められた。詳細は既報の文献²⁷⁴⁾に譲るが、この方法からもヒスタジン残基が活性部位に存在することから推定されている。

ヒール酵母中性 α -glucosidase II の phenyl α -glucoside 水解に於ける pH-速度曲線²⁷⁴⁾から、 pK_{e1} は約5.3、 pK_{e2} は約7.5と推測され、このうち、 pK_{e2} を示す解離基は詳述したヒスタジンのイミダゾール、一方、解離基1は VII-7 に示したように、WSC をも本酵素が修飾され活性が減少することから、カルボキシル基 ($-COO^-$) と判断した。

本章を説明したように、pH 4~5 に作用至適をもつ5種の酸性 α -glucosidase では $-COO^-$ と $-COOH$ が触媒作用に中心的役割を果たしているのに対し、pH 6~7 に作用最大を示す3種の中性 α -glucosidase についてはいずれも $-COO^-$ と $\text{II} \begin{smallmatrix} \text{R} \\ \text{N} \\ \text{H} \end{smallmatrix} \text{CH}$ が必須解離基であった。 α -glucosidase に関するこの種の研究は初めてである。 α -glucosidase 全般の作用機作を推考する上で大いに意義あるものとなる。

第4節 要約

I. テンカイ酸性 α -glucosidase, トラマ酸性 α -glucosidase, スク肝臓酸性 α -glucosidase, ウサギ筋肉酸性 α -glucosidase および コメ酸性 α -glucosidase II の活性解離基に関し、速度論的方法により求めた pK 値 および 解離熱, 伝誘電率及

系系に於ける解離抑制の有無の解析, 水溶性カルボジイミドを用いた化学修飾法などにより, 全ての酸性 α -glucosidase の酸性側活性解離基はカルボキシル基 (活性型は $-\text{COO}^-$ のカルボキシレートイオン), アルカリ側活性解離基は非解離型のカルボキシル基 ($-\text{COOH}$) であると推定した。

II. テンカイ酸性 α -glucosidase, トラマ酸性 α -glucosidase, フタ肝臓酸性 α -glucosidase, ウサギ筋肉酸性 α -glucosidase および コメ酸性 α -glucosidase II の活性解離基は maltose および soluble starch あるいは shellfish glycogen などの多糖類, また maltodextrin などのいすれを基質とした場合にもほぼ同じ特性を示し, それぞれの加水分解に与かる解離基も同種であることから, これらの水解を営む活性部位は同一であると判断された。このことは前章の結論を支持するものである。

III. フタ肝臓中性 α -glucosidase および フタ血清中性 α -glucosidase の活性解離基を速度論的方法により求めた pK 値および解離熱, メタノール添加による低誘発率及系系における解離抑制の有無の解析により, また, ヒール酵母中性 α -glucosidase II の活性解離基を化学修飾法により, それぞれの酸性側活性解離基は解離型のカルボキシル基, $-\text{COO}^-$, アルカリ側活性解離基は非解離型のイミダゾール基, Imidazole , と推定した。 α -glucosidase に関するこの種の研究は初めてである。

第8章 酸性 α -Glucosidaseのサブサイト構造

第1節 緒論

前章までに明らかとなったように、酸性 α -glucosidaseは共通の活性部位で、同一の解離基を必須として、マルトースなどの少糖類や澱粉あるいはグリコーゲンなどの多糖類の加水分解反応を触媒する。その他の基質となり得る化合物、例えば、マルトースとは結合を要する α -グルコニ糖類や合成基質、またパノースなども同様に共通の活性部位で水解作用を受けるものと思われる。このように、種々の基質に作用を示す酸性 α -glucosidaseの活性部位の構造については、その活性との相関に於て大いに興味を保持される。

酵素蛋白質の構造を解明する最も有効で、かつ確実な手段はX線解析による方法である。1965年、lysozyme (分子量14,700の酵素²⁷⁵⁾)の立体構造のX線解析の結果が他の酵素に先んじて発表され、同時に基質との結合に関しても報告された。²⁷⁶⁾その後、1967年になり原子レベルでの酵素-基質複合体の構造が発表され、²⁷⁷⁾基質がどのように結合するか、また、どのようにして触媒作用が起るかについて詳細な検討がなされた。それによると Fig. 108に lysozyme と基質 (NAG)₆ (N-acetylglucosamine の 6 量体) との結合様式²⁷⁸⁾を示したように、基質 (NAG)₆ の 6 個の NAG 残基はそれぞれ溝にはまり、非還元末端から 4 番目の残基 D と 5 番目の残基 E との結合が、Asp 52 ($-\text{COO}^-$) と Glu 35 ($-\text{COOH}$) を中

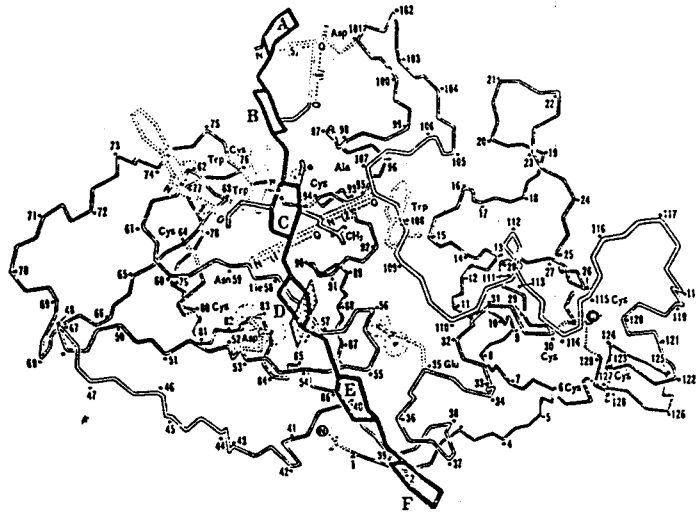


Fig. 108. Molecular Model of Interaction between Lysozyme and *N*-Acetylglucosamine Hexamer (NAG)₆.²⁷⁸⁾ —, main chain of lysozyme; ---, side chain of lysozyme; —, main chain of substrate; ---, side chain of substrate; ·····, hydrogen bond; —, S-S bond.

心とした作用により切断されるが、6個全マの各残基が水素結合や疎水的相互作用により酵素に固定され、これが補助的にD-E間の切断を促進していることが明らかにされた。酵素は巨大分子であり、直接触媒作用に関与する部分はその一部に限られ、この領域をいわゆる“活性部位”と呼んでいるが、この部分を限定することは厳密な意味では困難である。しかし、一般にLysozymeの場合には直接の被水解部位のCやD残基のみならず、AからFの6残基全マが入り込む溝全体を活性部位とし、各基質残基に対応する酵素のそのぞいをサブサイト(sub-site)と呼んでいる。

このように、X線解析により酵素の構造に関する多くの有益な情報が得られるが、この方法は2,3の例外を除き、lyso-

zyme のように酵素としては比較的分子量の小さい、かつ解析に充足な大きな結晶を与える酵素蛋白質にしか適用できない難点がある。

従って、X線解析の困難な酵素については原子レベルでの構造と活性との相関を論究することができない。しかし、このような酵素に関して、*lysozyme* で明らかにされたカフサイト構造を1つの基準として、カフサイトレベルでの構造と機能の関係を論及することが可能である。

このような観点から、*Schechter* と *Berger*^{279, 280)} は *papain* をアラニンのジペプチドからヘキサペプチドに至る40種類の立体異性基質に作用させ、特異性を支配しているのは切断されるペプチドのすぐ隣のアミノ酸残基だけでなく、ペプチド鎖に沿って広い範囲の残基構造であることを確認し、*papain* の活性中心は $25 \text{ \AA}$ にあふぶく7つのカフサイトからなることを明らかにした。*amylase* に関しても *Thoma* ら^{281~283)} や 廣海²⁸⁴⁾ により同様のカフサイトよりなることが想定されている。さらに、*Thoma* ら^{281, 282)} は *Bacillus subtilis* の液化型 *amylase* の種々の基質からの反応生成物を分離・定量することによって、この酵素のカフサイト親和力を評価している。一方、廣海ら^{284~286)} は *Rhizopus delemar* の *glucoamylase* の速度パラメーターの基質重合度依存性からカフサイト理論を展開し、これを α -*amylase* や β -*amylase* についても適用し、各カフサイト親和力の評価法を提唱した。

カフサイト理論による速度パラメーターの取扱いは Fig. 109 に示した酵素と基質の結合様式の多様性に基づいている。すなわち、

活性部位の触媒部位を跨いで結合し、水解生成物を得る結合を "productive"; 触媒部位を跨かずに、従って、生成物を与えない結合の仕方を "nonproductive" な結合と呼び、次の単純な2つの仮定に基づいてその

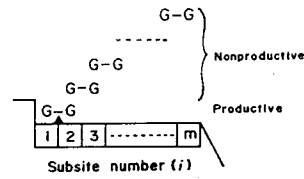


FIG. 109. A Schematic Model Showing the Active Site of Glucoamylase and α -Glucosidase of Bound Maltose. Triangle indicates the catalytic site.

理論が構築されている。第一に、基質が productive に結合したとき、グルコシド結合の正味の水解速度定数 (これを k_{int} と表わす) は基質の重合度に依存せず常に一定であること。第二に、ある基質 (重合度 n とする) の酵素に対する結合の強さ (結合定数 $K_{n,j}$) は、その結合様式 (j を表わす) に於て、基質のグルコシル残基が占有する各サブサイトの親和力 (A_i , i はサブサイト番号) の和で決まるものとするものである。

$$K_{n,j} = 0.018 \exp \left(\frac{\sum_i A_i}{RT} \right)_{n,j} \quad (\text{式-14})$$

ここで R は気体定数 ($1.98 \text{ cal/mol} \cdot \text{deg}$), T は絶対温度である。これは結合の仕方が productive であっても, nonproductive であっても成立するものとする。以上の仮定に基づいて速度パラメーターを解釈すると, Michaelis 定数 K_m は,

$$\begin{aligned} K_m &= \frac{1}{\text{すべての結合様式の結合定数の和}} \\ &= \frac{1}{\sum_j K_{n,j}} \end{aligned} \quad (\text{式-15})$$

となり、分子活性 k_o (1個の酵素が一定の条件で触媒し得る最大の

基質分子数, 単位は Δec^{-1} とする) は ケルコシド結合の真の水解速度定数 k_{int} に *productive* な結合の起る割合をかけたものになる。すなわち,

$$\begin{aligned} k_o &= k_{int} \times \frac{\text{productive な結合様式の結合定数の和}}{\text{すべての結合様式の結合定数の和}} \\ &= k_{int} \times \frac{\sum_p K_{n,p}}{\sum_j K_{n,j}} \\ &= k_{int} \times \frac{1}{1 + \frac{\sum_g K_{n,g}}{\sum_p K_{n,p}}} \quad (\text{式-16}) \end{aligned}$$

となる。ここで, すべての結合様式(添字 j を表わす)は *productive* な結合様式(添字 p を表わす)と *nonproductive* な結合様式(添字 g を表わす)の両者の和である。つまり,

$$\sum_j K_{n,j} = \sum_p K_{n,p} + \sum_g K_{n,g} \quad (\text{式-17})$$

である。また, k_o/K_m は 式-15 と 式-16 から,

$$\begin{aligned} k_o/K_m &= k_{int} \times (\text{productive な結合定数の和}) \\ &= k_{int} \times \sum_p K_{n,p} \quad (\text{式-18}) \end{aligned}$$

となり, *productive* な項のみを含むことになる。ここで得られた 式-16 ~ 式-18 は 式-14 で $K_{n,j}$ を サブサイト親和力 A_i を用いて表わしているのを, A_i と k_{int} のみで表わすことができる。すなわち, 式-14 を 式-16, 式-17 および 式-18 に代入することにより,

$$\begin{aligned} 1/K_m &= \sum_j K_{n,j} \\ &= 0.018 \sum_j \exp\left(\frac{\sum_i^{\text{cov}} A_i/RT}{n,j}\right) \end{aligned} \quad (\text{式}-19)$$

$$k_o = k_{int} \cdot \frac{\sum_p \exp\left(\frac{\sum_i^{\text{cov}} A_i/RT}{n,p}\right)}{\sum_j \exp\left(\frac{\sum_i^{\text{cov}} A_i/RT}{n,j}\right)} \quad (\text{式}-20)$$

$$k_o/K_m = 0.018 k_{int} \cdot \sum_p \exp\left(\frac{\sum_i^{\text{cov}} A_i/RT}{n,p}\right) \quad (\text{式}-21)$$

が得られる。これらの式により、すべてのサブサイト親和力 A_i と k_{int} が知られていれば、全ての基質の K_m と k_o が評価でき、逆に種々の重合度の基質に対する K_m と k_o の実験から、 A_i と k_{int} の両者を評価することが可能である。

本章は第2章より第5章に於て精製法が確立され、それらの基質特異性が明らかとなったテンサイ酸性 α -glucosidase, トラム酸性 α -glucosidase, フタ肝臓酸性 α -glucosidase およびラサキ筋肉酸性 α -glucosidase に関して、それらのサブサイト構造を究明することを目的し、サブサイト親和力 A_i と真の(正味の)水解速度定数 k_{int} の評価を行ったのである。さらに、これら酵素素との比較のために、幾つかの α -glucosidase と glucoamylase について同様の評価を行った。

第2節 各種酵素の速度パラメータとサブサイト親和力 A_i および真の水解速度定数 k_{int} の評価法

1. 各種酵素の α -1,4結合からなるマルトオリゴ糖に対する

速度パラメーター テンサイ, トラムメ, フタ肝臓 および ウサギ筋肉の
各酸性 α -glucosidase に関しては, 第2章乃至第5章の各第3節で得
られた速度パラメーター (Table 4, 6, 8 および 10) を用いた。これを Table
26 に集約した。 コメ酸性 α -glucosidase II,¹⁷⁵⁾ モクメ酸性 α -glu-
cosidase I,²⁸⁷⁾ ウズラマメ酸性 α -glucosidase,²⁸⁸⁾ *Paecilomyces*
variotti 酸性 α -glucosidase,²⁸⁹⁾ *Aspergillus niger* 酸性 α -glucosi-
dase,²⁹⁰⁾ *Aspergillus oryzae* 酸性 α -glucosidase I,²⁹¹⁾ および
ビール酵母中性 α -glucosidase II²⁵⁰⁾ の マルトオリゴ糖 に関する速度パ
ラメーターは 既報の値を用いた。

2. サブサイト親和力 A_i と 真の水解速度定数 k_{int} の評
価法 これら両者の求め方の詳細は文献 285, 286, 292 に
譲り, ここではその原理と方法の大概を述べるに留める。

まず, 触媒部位の両隣りのサブサイト親和力, すなわち, A_1 と A_2
(Fig. 109 参照) 以外のサブサイト親和力の評価法を述べる。 および
の productive な結合様式では基質の重合度に関係なく, 触媒部

Table 26. Kinetic Parameters of Various Acid α -Glucosidases on Maltooligosaccharides

	Sugar beet ^{a)}			Concord pole ^{b)}			Pig liver ^{c)}			Rabbit muscle ^{d)}		
	K_m	k_0	k_0/K_m	K_m	k_0	k_0/K_m	K_m	k_0	k_0/K_m	K_m	k_0	k_0/K_m
G ₂	20	149	7.5	0.72	103	143	6.7	113	16.9	6.3	179	28.4
G ₃	3.7	136	36.8	0.60	122	203	4.4	93.5	21.3	2.6	135	51.9
G ₄	2.3	136	59.1	0.80	122	147	5.9	98.1	16.6	5.9	161	27.3
G ₅	0.64	136	213	1.12	127	113	11.0	98.1	8.9	3.0	78.4	26.1
G ₆	0.42	136	324	1.28	122	95.3	4.0	102	25.5	5.9	78.4	13.3
G ₇	0.32	120	375	1.33	177	88.0	5.6	105	18.8	5.9	78.4	13.3
G ₈	0.23	85.1	370	1.67	123	73.7				5.9	78.4	13.3

a) M.W., 91,000; pH 4.5; 37°C. b) M.W., 88,000; pH 4.8; 37°C. c) M.W., 100,000; pH 4.5; 37°C. d) M.W., 102,000; pH 4.5; 37°C. K_m : mM. k_0 : sec⁻¹.

位の両側のサブサイト1およびサブサイト2は常に占有されており、従って、 $\sum_i^{\text{cov}} A_i$ の中で $(A_1 + A_2)$ は全ての基質に共通である。一方、 k_o/K_m は式-18あるいは式-21に示したように、productiveな項のみを含む。ここで、サブサイトの個数を m 、基質重合度を n とし、 $n < m$ とすると、 n -mer および $(n+1)$ -mer の基質がそれぞれ productive な様式をとるときには $(n+1)$ -mer では n -mer に比べて1個のサブサイトのみを余分に占有することになる。従って、両基質の $J_n(k_o/K_m)$ の差からそのサブサイトの A_i を直ちに求めることができる。 A_{n+1} を求める場合の一般式は次のように表わされる。

$$\begin{aligned} J_n(k_o/K_m)_{n+1} - J_n(k_o/K_m)_n \\ &= \left(\sum_i^{\text{cov}} A_i / RT \right)_{n+1,1} - \left(\sum_i^{\text{cov}} A_i / RT \right)_{n,1} \\ &= A_{n+1} / RT \\ \therefore A_{n+1} &= RT \times [J_n(k_o/K_m)_{n+1} - J_n(k_o/K_m)_n] \quad (\text{式-22}) \end{aligned}$$

次に、 A_1, A_2 および k_{int} の求め方について述べる。いま、 $n=2$ の maltose について考えてみると、 K_m の値から得られる分子結合親和力 B_2 は前述の方法で求めた $A_3, A_4, \dots, A_m$ よりも常に大きくなるので、maltose のすべての結合様式は式-14を用いて近似的に、

$$\begin{aligned} \sum_j K_{n,j} &= K_{n,1} + K_{n,2} + K_{n,3} + \dots + K_{n,m} \\ &\approx K_{n,1} + K_{n,2} \quad (\text{式-23}) \end{aligned}$$

と見做すことができる。すなわち、maltose の結合はサブサイト1, 2との結合と、サブサイト2, 3との結合がほとんどと考慮される。

前者は *productive* な結合であり、後者は *nonproductive* な結合である。これを式-20に代入すると

$$\begin{aligned} k_0 &= k_{int} \cdot K_{2,1} / (K_{2,1} + K_{2,2}) \\ &= k_{int} \cdot (1 + K_{2,2}/K_{2,1})^{-1} \end{aligned} \quad (\text{式-24})$$

となる。 *maltose* のみならず *n-mer* の基質に於ても、サブサイト2の A_2 が最大であるならば、サブサイト1およびそれ以降に結合した様式が *productive*、サブサイト2とそれ以降のサブサイトと同時に結合した様式が *nonproductive* のほとんどを占めると考えられることから、一般にも

$$(k_0)_n = k_{int} \cdot (1 + K_{n,2}/K_{n,1})^{-1} \quad (\text{式-25})$$

が成り立つ。ここで、式-14より

$$K_{n,1} = (0.018) \exp[(A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n)/RT] \quad (\text{式-26})$$

$$K_{n,2} = (0.018) \exp[(A_2 + A_3 + A_4 + \dots + A_{n+1})/RT] \quad (\text{式-27})$$

であることから、式-26 および式-27を式-25に代入して整理すると、

$$\exp(A_{n+1}/RT) = [k_{int}/(k_0)_n - 1] \cdot \exp(A_1/RT) \quad (\text{式-28})$$

が得られる。従って、前述の方法による $A_3, A_4, \dots$, および実験の k_0 を用いて、 $1/(k_0)_n$ に対して $\exp(A_{n+1}/RT)$ をプロットすれば直線となる、横軸切片が $1/k_{int}$ を、縦軸切片が $-\exp(A_1/RT)$ を与えることになる。各実験値の $1/K_m$ は式-23に示したように、

式-26と式-27の和を見做すことができる。

$$\begin{aligned}
 (1/K_m)_n &= K_{n,1} + K_{n,2} \\
 &= (0.018) \exp[(A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n)/RT] \\
 &\quad + (0.018) \exp[(A_2 + A_3 + A_4 + \dots + A_{n+1})/RT] \\
 &\hspace{15em} (\text{式-29})
 \end{aligned}$$

従って、この式に上記方法で得た $A_1, A_3, \dots, A_n$ を代入することにより A_2 を求めることができる (廣海らによるIの方法²⁸⁶⁾)。また、 k_o/K_m は *productive* な項のみを含むことから、次式、

$$\begin{aligned}
 (k_o/K_m)_n &= k_{int} \cdot K_{n,1} \\
 &= (0.018) k_{int} \cdot \exp[(A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n)/RT] \\
 &\hspace{15em} (\text{式-30})
 \end{aligned}$$

に得られた各値、 $A_1, A_3, A_4, \dots$ および k_{int} を代入し、実験値に最も合致する A_2 を求めることもできる (廣海らによるIIの方法²⁸⁶⁾)。

理論的には、両者の方法を用い結果を与える時、最も実験値に適合する値を与える A_2 となる。

第3節 実験結果および考察

I. テンサイ酸性 α -glucosidase のサブサイト構造

α -1,4結合のみからなる直鎖状マルトオリゴ糖に関する速度パラメーターの重合度依存性を Fig. 11D に示した。すなわち、重合度 n の増加に伴い K_m は減少する (親和力の指標 $1/K_m$ は増加する) のに対し、分子活性 k_o は n に依存せずほぼ一定であった。 k_o/K_m は $1/K_m$ と同様の n 依存性を示した。glucoamylase では K_m のみならず k_o も顕著な

n 依存性を示す²⁸⁶⁾が、これは両酵素間の大きな差異と考えられる。図中、 $\text{poly}(n)$ で示した soluble starch (正確には α -1,6 結合をも含むため真の poly ではない) は n の 8 付近に相当する速度パラメーターを示すことから、反応の初期に於ては、水解を受ける非還元末端側が直鎖状の maltotriose のように酵素の作用を受けるものと考えられる。

pK_m および $\log(k_o/K_m)$ の n 依存性から本酵素の活性部位が 8 個のサブサイトよりなるものと仮定し、

各サブサイトの親和力 A_i および真の水解速度定数 k_{int} を算出した。サブサイト 3 よりサブサイト 8 の各 A_i は式-22に示したように $RT[\ln(k_o/K_m)]$ の差より求め、 A_1 および k_{int} は Fig. 111 に示したプロットから求めた。 A_1 は 1.87 kcal/mol 、 k_{int} は 756 sec^{-1} と評価された。一方、 A_2 は式-29 および式-30 のいずれの方法からも 2.99 kcal/mol と算出された。これらの各値を Table 27 に、また、各サブサイト親和力を Fig. 112 に示した。サブサイト親和力は A_2 が最大であり、次いで A_1 、 A_3 の順であった。

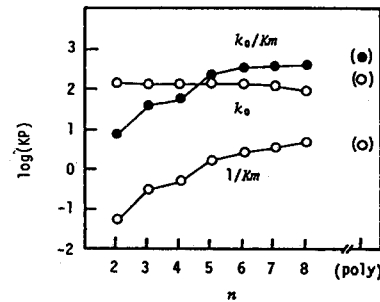


Fig. 110. Dependence of Kinetic Parameters (KP) of Sugar Beet Acid α -Glucosidase on Degree of Polymerization (n) of Maltooligosaccharides. K_m : mM. k_o : sec^{-1} . k_o/K_m : $\text{sec}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$. $\text{poly}(n)$: soluble starch.

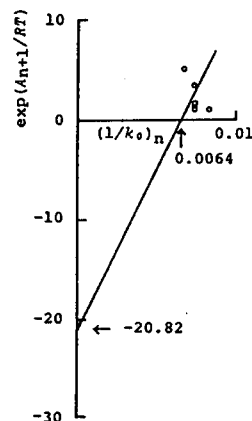


Fig. 111. Plot of $\exp(A_{n+1}/RT)$ versus $(1/k_o)_n$ for Sugar Beet Acid α -Glucosidase.

Table 27. The Values of Subsite Affinities and k_{int} for Sugar Beet Acid α -Glucosidase

Subsite number	1	2	3	4	5	6	7	8
Subsite affinity (A_i)	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	A_7	A_8
Value of A_i (kcal/mol)	1.87	2.99	0.98	0.29	0.79	0.26	0.09	-0.01
k_{int} (sec ⁻¹)	156							

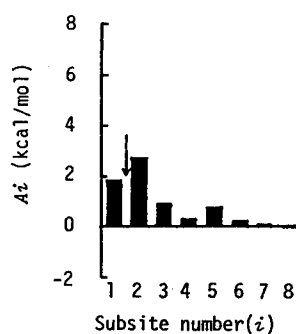


Fig. 112. Histogram Showing Subsite Affinities of Sugar Beet Acid α -Glucosidase. The arrow indicates the position of the catalytic site.

Table 28. A Comparison between Observed and Calculated Rate Parameters for Sugar Beet Acid α -Glucosidase

Substrate	n	K_m (mM)			k_0 (sec ⁻¹)			k_0/K_m (sec ⁻¹ ·mM ⁻¹)		
		Obsd.	Calcd.	O/C	Obsd.	Calcd.	O/C	Obsd.	Calcd.	O/C
Maltose	2	20	16.8	1.19	149	126	1.18	7.5	7.5	1.00
Maltotriose	3	3.7	3.94	0.94	136	145	0.94	36.8	36.8	1.00
Maltotetraose	4	2.3	2.26	1.01	136	133	1.02	59.1	58.9	1.00
Maltopentaose	5	0.64	0.68	0.94	136	145	0.94	213	213	1.00
Maltohexaose	6	0.42	0.46	0.92	136	148	0.92	324	324	1.00
Maltoheptaose	7	0.32	0.40	0.81	120	149	0.81	375	376	1.00

以上のようにして得られた各 A_i および k_{int} を用いて、カブサイト理論による各速度パラメーターの理論値を式-19, 式-20 および 式-21 より求めた。これらの結果を実験値との対比を Table 28 に示した。 maltooctaose

に於ては，式-27 ないしは式-29 より理解されるように，maltononase, 69, に於ける親和力（一般には， n に於ては $An+1$ のサブサイト親和力）が決定されていなければ理論値を算出できない。maltase から maltoheptaose までの速度パラメーターは実験誤差範囲内で，両者がほぼ一致した。従って，サブサイト理論を α -glucosidase に於ても適用し得ることを確認されたと同時に，本酵素のサブサイト構造の仮定が正当なるものと判断された。

Fig. 113 に テンカイ酸性性 α -glucosidase との比較のために，*Rhizopus delemar*,²⁸⁶⁾ *Rhizopus niveus*²⁹³⁾ および *Paecilomyces varioti*²⁹⁴⁾ 起源の glucoamylase のサブサイト構造を示した。

glucoamylase では A_2 が最も大きく，テンカイ酸性性 α -glucosidase と同様であるが， A_1 と A_3 の関係は $A_1 < A_3$ であり， A_1 はほとんど親和力が無いか，むしろ負の値を示すのが特徴と言える。このように， α -glucosidase と glucoamylase のサブサイト親和力に関して， A_2 が最大であることは共通するが， A_1 と A_3 の大小関係が

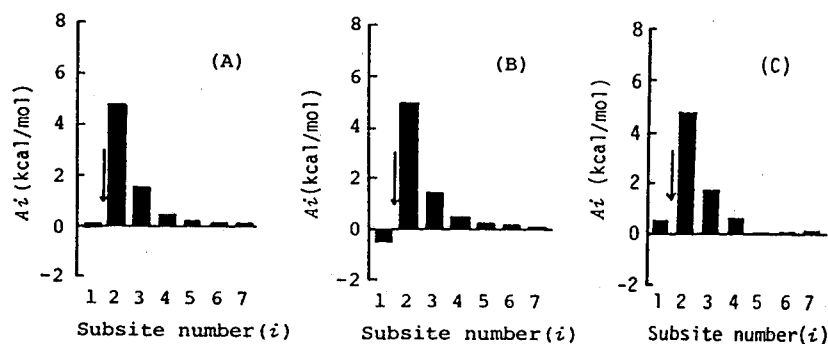


Fig. 113. Histograms Showing Subsite Affinities of *Rhizopus delemar* (A), *Rhizopus niveus* (B) and *Paecilomyces varioti* (C) Glucoamylases. The arrow indicates the position of the catalytic site.

逆であることは両酵素の基質特異性に大きな差異を生ずるはずである。すなわち、式-23から容易に理解されるように、

$$\sum_j K_{n,j} \text{ (すべての結合様式)}$$

$$= K_{n,1} \text{ (productiveな結合様式)}$$

$$+ K_{n,2} \text{ (nonproductiveな結合様式)}$$

(再掲式-23)

$A_1 < A_3$ の場合には、基質重合度が低い程、nonproductiveな結合の割合が増加することになる。例之は、maltose では サブサイト 1 と サブサイト 2 の親和力に依る $K_{2,1}$ の結合よりも、サブサイト 2 と サブサイト 3 の親和力に依存する $K_{2,2}$ の nonproductive な結合が多いが、maltopentaose, G_5 , では、サブサイト 1 ~ 5 の親和力と サブサイト 2 ~ 6 の親和力に依る両結合様式はあまり異ならない。結果として、すべての結合様式のうち、productive な結合様式を占める割合は G_2 の maltose よりもより長鎖の G_5 の方が大きくなる。従って、すべての結合様式のうち、productive な結合の割合を k_{int} に掛けた k_0 (式-16 参照) は 重合度の大きい基質程、大きい値を示す結果となる。これに対して、 $A_1 > A_3$ の場合には、重合度に依存せずすべての結合様式中の productive な結合はほぼ一定となる。従って、基質の重合度の異なる k_0 は大きな変動は示さないと考えられる。一方、すべての結合様式の結合定数の和の逆数である K_m (式-15 参照) は、 A_1 および A_3 の大小に関係せず、サブサイト 3 以降の親和力が正であるならば $\sum_j K_{n,j}$ は大きくなり、従って、 K_m は小さくなる。もし、

サブサイト m の親和力が負であるならば, $m-1$ の重合度の基質より m の重合度基質の K_m は大きくなる。いずれにしても, A_1 と A_3 の大小の差異は K_m には反映されず, k_0 に大きな影響をおよぼす。

Fig. 110 に示したように, テンサイ酸性 α -glucosidase の分子活性 k_0 は n に依存せずほぼ一定であった。一方, glucoamylase の k_0 は著しい重合度依存性を示すことが知られている。^{286, 293, 294}

このような相違は両酵素のサブサイト親和力の差異, すなわち, A_1 と A_3 の大小の差異に起因するものと捉えることができる。換言すれば, 両酵素のマルトオリゴ糖に対する特異性の差異を合理的に説明するものとして, A_1 と A_3 の相関を取り挙げることもできよう。

II. トラムメ酸性 α -glucosidase のサブサイト構造

トラムメ酸性 α -glucosidase の α -1,4 結合のみからなるオリゴ糖に関する速度パラメーターを Fig. 114 に示した。 k_0 は重合度 n に依存せずほぼ一定であった。 K_m は maltodiose ($n=3$) で最小 ($1/K_m$ 最大: 親和力最大) となるが, 以後 n

の増加とともに微増した。

poly(n) で表わした soluble starch (α -1,6 結合があるため, 正確には poly(n) ではない) の速度パラメーターは n の 5 あるいは 6 の値と近似してみれば, 非還元末端

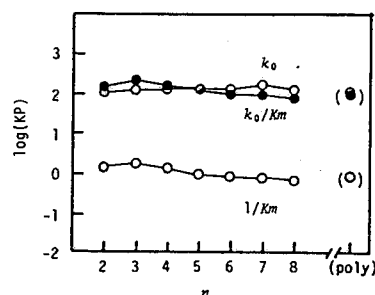


Fig. 114. Dependence of Kinetic Parameters (KP) of Concord Pole Acid α -Glucosidase on the Degree of Polymerization (n) of Maltooligosaccharides. K_m : mM. k_0 : sec^{-1} . k_0/K_m : $\text{sec}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$. poly(n): soluble starch.

Table 30. A Comparison between Observed and Calculated Rate Parameters for Concord Pole Acid α -Glucosidase.

Substrate	n	K_m (mM)			k_o (sec ⁻¹)			k_o/K_m (sec ⁻¹ ·mM ⁻¹)		
		Obsd.	Calcd.	O/C	Obsd.	Calcd.	O/C	Obsd.	Calcd.	O/C
Maltose	2	0.72	0.77	0.94	103	110	0.94	143	143	1.00
Maltotriose	3	0.60	0.60	1.00	122	122	1.00	203	203	1.00
Maltotetraose	4	0.83	0.82	1.01	122	121	1.01	147	148	0.99
Maltopentaose	5	1.12	1.05	1.07	127	120	1.06	113	114	0.99
Maltohexaose	6	1.28	1.24	1.03	122	118	1.03	95.3	95.2	1.00
Maltoheptaose	7	1.33	1.37	0.97	117	120	0.98	88.0	87.6	1.00

範囲内を一致するこ

とを確認された (

Table 30)。従って、

トランス酸性 α -glu-

cosidase の活性中

心とサブサイト構造

からなるものと判断さ

れた。しかし、この

構造を Fig. 116 にその親和性を示したように、基質の非還元末端

から 4 番目以降のグルコシル残基は酵素と結合すると言うより、む

しろ立体的な障害を受けるものと解釈される。本酵素は他

の α -glucosidase (少なくとも前記のテンサイ酸性 α -glucosidase)

に比べて、その活性部位は狭いものと推測される。

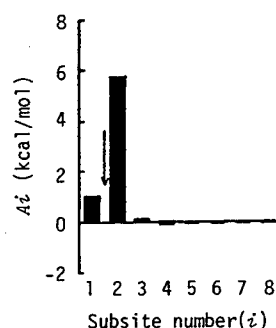


Fig. 116. Histogram showing Subsite Affinities of Concord Pole Acid α -Glucosidase.

The arrow indicates the position of the catalytic site.

Ⅲ. フタ肝臓酸性 α -glucosidase のサブサイト構造

フタ肝臓酸性 α -glucosidase の直鎖マルトオリゴ糖および

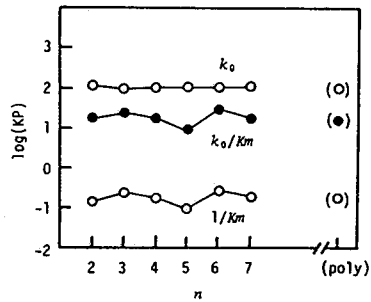


Fig. 117. Dependence of Kinetic Parameters (KP) of Pig Liver Acid α -Glucosidase on the Degree of Polymerization (n) of Maltooligosaccharides. K_m : mM. k_0 : sec^{-1} . k_0/K_m : $\text{sec}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$. poly (n): shellfish glycogen.

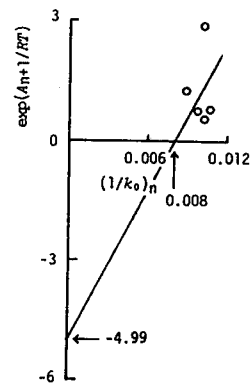


Fig. 118. Plot of $\exp(A_{n+1}/RT)$ versus $(1/k_0)_n$ for Pig Liver Acid α -Glucosidase.

Table 31. The Values of Subsite Affinities and k_{int} for Pig Liver Acid α -Glucosidase

Subsite number	1	2	3	4	5	6	7
Subsite affinity (A_i)	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	A_7
Value of A_i (kcal/mol)	0.99	4.51	0.14	-0.15	-0.38	0.65	-0.19
k_{int} (sec^{-1})	125						

shellfish glycogen (夏の poly(n) ではないが、理解を助けるためとしてこのように表現した) に関する速度パラメーターは、Fig. 117 に示した基質重合度依存性を示した。すなわち、重合度 n に関係なく、分子活性 k_0 はほぼ一定の値を示すのに対し、 $pK_m (= \log 1/K_m)$ は n が 2 よりも大きくなると、4.5 と減少するが、 n が 5 を再び増加した。このことより、サブサイト 1 およびサブサイト 2 のほかにサブサイト 6 も比較的大きな親和力を持つと予想される。shellfish glycogen の速度パラメーターは maltoheptaose ($n=7$) の値に近似していた。

各 A_i および k_{int} は常法により各速度パラメーターの実験値を用いて評価した (A_i および k_{int} は Fig. 118 の作図法による)。それらを Table 31 にまとめ示した。 A_1 , A_2 および A_3 に関しては、

本酵素につまも A_2 が最大 (4.51 kcal/mol) であり, A_1 (0.99 kcal/mol) $> A_3$ (0.14 kcal/mol) であつた。 *glucoamylase* ^{281, 293, 294)}

すは $A_1 < A_3$ であり, 両酵素間の明瞭な特徴的差である。

A_2 は 0.65 kcal/mol であり, A_2, A_1 に次いで大きな正の値であり, 速度パラメーターの n 依存性からの予想が裏付けられた。

サフサイト理論により得られる速度パラメーターの理論値と実測値を比較したのが Table 32 である。理論値の実測値からの最大偏差は A_5 で 25% であるが, 本理論が幾つかの単純な仮定に基づいていることを考慮すれば, 満足すべき結果と言えよう。

Fig. 119 に, フタ肝臓酸性 α -glucosidase のサフサイト構造を各親和力のヒストグラムを示した。shellfish glycogen のような多糖類はマルトリゴ糖の "延長として" 相互作用を示すものと推察される。

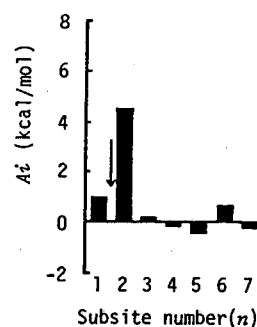


Fig. 119. Histogram Showing Subsite Affinities of Pig Liver Acid α -Glucosidase. The arrow indicates the position of the catalytic site.

Table 32. A Comparison between Observed and Calculated Rate Parameters for Pig Liver Acid α -Glucosidase

Substrate	n	Km (mM)			k_0 (sec ⁻¹)			k_0/K_m (sec ⁻¹ ·mM ⁻¹)		
		Obsd.	Calcd.	O/C	Obsd.	Calcd.	O/C	Obsd.	Calcd.	O/C
Maltose	2	6.7	5.88	1.14	113	99.9	1.13	16.9	17.0	0.99
Maltotriose	3	4.4	5.07	0.87	93.5	108	0.87	21.3	21.3	1.00
Maltotetraose	4	5.9	6.75	0.87	98.1	113	0.87	16.6	16.7	0.99
Maltopentaose	5	11	8.80	1.25	98.1	79.3	1.24	8.9	9.0	0.99
Maltohexaose	6	4.0	4.21	0.95	102	109	0.94	25.5	25.9	0.98

IV. ウサギ筋肉酸性 α -glucosidase のサブサイト構造

Fig. 120 にウサギ筋肉酸性 α -glucosidase の直鎖マルトオリゴ糖および shellfish glycogen (便宜上 poly(n) と表現した) に関する K_m , k_o および k_o/K_m の各速度パラメーターの基質重合度依存性を示した。 K_m は maltotriose で最小となり, n が 5 (3.0 mM) を除いて, 4 以上で一定値 (5.9 mM) を示した。分子活性 k_o は前記 3 種の酵素とは異なり, maltopentaose ($n=5$) 以上の重合度基質では maltose の k_o の約 44% であった。 maltoheptaose および maltooctaose の各速度パラメーターは maltohexaose の値に全て同じであった。従って, A_7

および A_8 は 0 kcal/mol であることが容易に理解され, サブサイト数は 6 個以下と考えられる。

maltose から maltohexaose までの各速度パラメーターの実験値を用いて, 常法により A_1 ないし A_6 までのサブサイト親和力および真の水解速度定数 k_{int} を算出した。 A_1 および k_{int} は Fig. 121 より求めた。得られた各値は Table 33 に集約した。サブサイト親

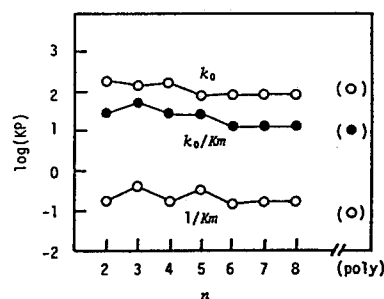


Fig. 120. Dependence of Kinetic Parameters (KP) of Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase on the Degree of Polymerization (n) of Maltooligosaccharides. K_m : mM. k_o : sec⁻¹. k_o/K_m : sec⁻¹·mM⁻¹. poly(n): shellfish glycogen.

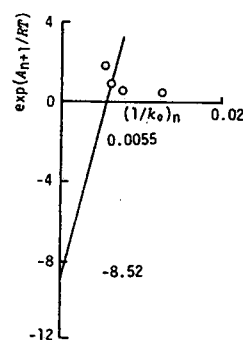


Fig. 121. Plot of $\exp(A_{n+1}/RT)$ versus $(1/k_o)_n$ for Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase.

Table 33. The Values of Subsite Affinities and k_{int} for Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase

Subsite number	1	2	3	4	5	6	(7)	(8)
Subsite affinity (A_i)	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	(A_7)	(A_8)
Value of A_i (kcal/mol)	1.32	4.28	0.37	-0.40	-0.03	-0.42	(0)	(0)
k_{int} (sec ⁻¹)	182							

Table 34. A Comparison between Observed and Calculated Rate Parameters for Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase

Substrate	n	K_m (mM)			k_o (sec ⁻¹)			k_o/K_m (sec ⁻¹ ·mM ⁻¹)		
		Obsd.	Calcd.	O/C	Obsd.	Calcd.	O/C	Obsd.	Calcd.	O/C
Maltose	2	6.3	5.24	1.20	179	152	1.17	28.4	29.1	0.98
Maltotriose	3	2.6	3.29	0.79	135	174	0.77	51.9	53.0	0.98
Maltotetraose	4	5.9	6.01	0.98	161	166	0.97	27.3	27.7	0.98
Maltopentaose	5	3.0	6.62	0.45	78.4	175	0.45	26.1	26.4	0.99
Maltohexaose	6	5.9	12.4	0.48	78.4	166	0.47	13.3	13.3	1.00

和力は A_2 が最大で 4.28 kcal/mol を示し、次いで、 A_1 (1.32 kcal/mol), A_3 (0.37 kcal/mol) の順であった。本酵素に關しても $A_1 > A_3$ の成立が認められた。

上述のようにして得られた各 A_i および k_{int} を用いて各速度パラメーターの理論値を算出し、実験値との対比を觀下の如く Table 34 である。maltose, maltotriose および maltotetraose の低重合度マルトオリゴ糖については両者は比較的良い (最大誤差 23%) 対比を示したが、 $n=5$ および 6 の基質では約 50% の相違が認められた。しかるに、 A_5 の -0.03 kcal/mol を +0.40 kcal/mol と仮定すると、それぞれの理論 K_m 値は $n=4$ まではよく一致するが、 $n=5$ では 3.29 mM (実験値 3.0 mM の 110%), $n=6$ では

6.17 mm (実験値 5.9 mm の 105%) となり, $n=2$ から $n=6$ までの K_m が理論値と実験値とを比較的良く一致するようになる。

しかしながら, このように A_5 の値を仮定しても n の 5 および 6 の値は大きく変動しない。何らかの要因により, maltopentaose あるいは maltohexaose の速度パラメーターに誤差が生じていると推測された。

酸性 α -glucosidase の特異性を最も大きく左右する A_1, A_2 および A_3 の各値は maltotriase などの低重合度オリゴ糖に関する実験値と理論値との対応から, 良く評価されていると判断できよう。ウサギ筋肉酸性 α -glucosidase のサブサイト構造をヒストグラムを Fig. 122 に示した。図中, A_5 の破線は上述の仮定値 ($A_5 = 0.40 \text{ kcal/mol}$) である。本酵素に関しても A_2 の最大と $A_1 > A_3$ の関係が確認された。

本酵素は種々の多糖類にも作用し, その活性部位は maltase などのオリゴ糖の水解部位と共通であることは既に詳述した。

Fig. 122 に示したような親和性を示すサブサイト構造からなる活性中心に, maltohexaose などと同様の結合様式で相互に作用し, カロル分解作用を受けることを推察される。このことは, Fig. 120 に示した shellfish glycogen の速度パラメ-

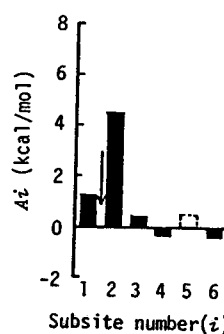


Fig. 122. Histogram Showing Subsite Affinities of Rabbit Muscle Acid α -Glucosidase. The arrow indicates the position of the catalytic site [] : proposed value.

ターの依存性から支持されるものである。

V. その他の α -glucosidase のサブサイト構造

上記 I~IV に於て論述したように, α -glucosidase に関しても α -, β -amylase, glucoamylase などと同様にサブサイト理論の適用が可能であり, 活性部位のサブサイト構造よりなるものとの判断は妥当であると考えられた。テンサイ, トウモロコシ, フタ肝臓およびウサギ筋肉の各種酸性 α -glucosidase について得られた $A_1 > A_3$ の関係は, glucoamylase に於ける $A_1 < A_3$ とは明瞭に区別されるものであった。本項では $A_1 > A_3$ の関係を他の多くの α -glucosidase に関しても成立するか否かを調査することを目的として, 幾つかの α -glucosidase についてのサブサイト親和力 A_i と其の水解速度定数 k_{int} の評価を行った。

Fig. 123 に常法により得られた各種起源 α -glucosidase のサブサイト親和力を, 既に評価がなされているソバ,¹⁰⁵⁾ スウィートコーン,²⁹⁵⁾ ミツバ4 (I)²⁹⁷⁾ の各酸性 α -glucosidase に関する値とともにヒストグラムを示した。一方, k_{int} はコメ酸性 α -glucosidase II: 220 sec^{-1} (M.W., 100,000; pH 4.0, 37°C),¹²⁵⁾ ソバ酸性 α -glucosidase: 167 sec^{-1} (M.W., 88,000; pH 4.5, 37°C),¹⁰⁵⁾ スウィートコーン酸性 α -glucosidase: 125 sec^{-1} (M.W., 96,000; pH 3.6, 37°C),^{84, 295)} モロコシ酸性 α -glucosidase I: 238 sec^{-1} (M.W., 93,000; pH 4.5, 37°C),²⁸⁷⁾ ウズラマメ酸性 α -glucosidase: 178 sec^{-1} (M.W., 87,000; pH 4.5, 37°C),²⁸⁸⁾

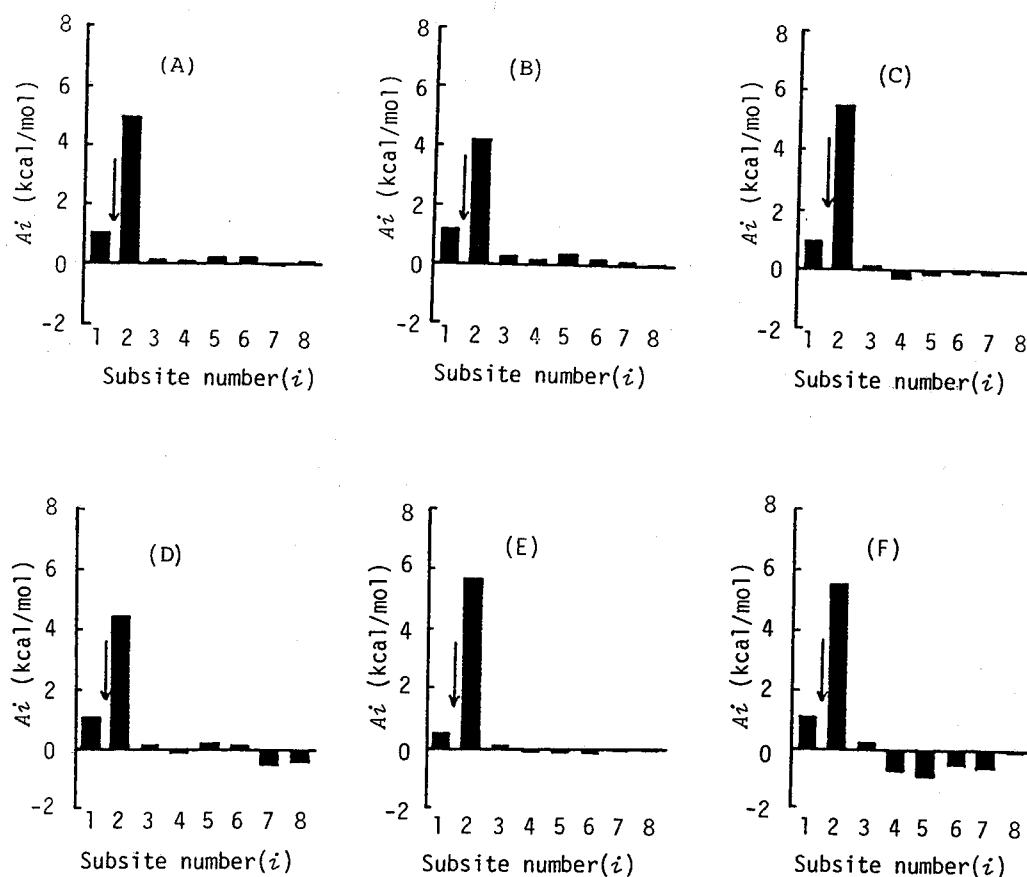


Fig. 123. Histograms Showing Subsite Affinities of Various α -Glucosidases. The arrow indicates the position of the catalytic site.

(A): rice acid α -glucosidase II. (B): buckwheat acid α -glucosidase. (C): sweet corn acid α -glucosidase. (D): waxy rice acid α -glucosidase I. (E): pinto bean acid α -glucosidase. (F): honey bee acid α -glucosidase I.

ミツバチ 酸性 α -glucosidase I : 53.0 sec^{-1} (M.W., 98,000 ; pH 5.0, 35°C), ^{296, 297)} *Paecilomyces varioti* 酸性 α -glucosidase : 160 sec^{-1} (M.W., 100,000 ; pH 4.5, 37°C), ²⁸⁹⁾ *Aspergillus niger* 酸性 α -glucosidase : 77.0 sec^{-1} (M.W., 58,000 ; pH 4.0, 37°C), ²⁹⁰⁾ *Aspergillus oryzae* 酸性 α -glucosidase I : 30.0 sec^{-1} (M.W.,

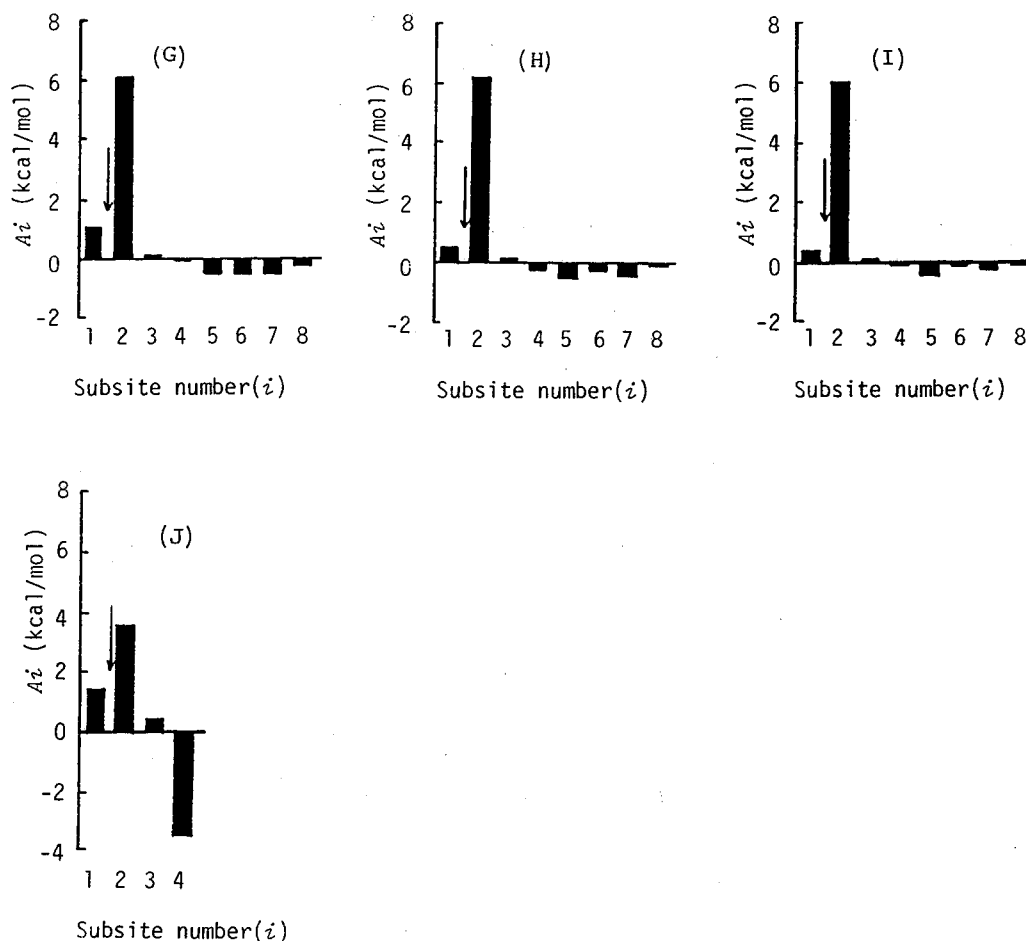


Fig. 123. (continued)

(G): *Paecilomyces varioti* acid α -glucosidase. (H): *Aspergillus niger* acid α -glucosidase. (I): *Aspergillus oryzae* acid α -glucosidase I. (J) brewer's yeast neutral α -glucosidase II.

62,000 ; pH 4.0, 37°C),²⁹⁾ ヒール酵母中性 α -glucosidase II :
38.5 sec⁻¹ (M.W., 69,000 ; pH 6.8, 33°C)²⁵⁾ であつた。

サブサイト親和力に関して, 全ての酸性および中性 α -glucosidase で A_2 が最大を示し, $A_1 > A_3$ の関係が認められた。従つて, これを α -glucosidase の特性と見做すことができる。
 A_4 以降のサブサイト親和力については, コメ(II) およびソバの酸

性 α -glucosidase のように比較的速やかに soluble starch など
の多糖類を水解する酵素では正の値を示した。 スウィートコーン
やウズラマメ, あるいは3種の微生物起源酸性 α -glucosidase
のように多糖類を水解はするがその作用の弱い酵素では, ほとんど
零かむしろ負の値を示した。 ムツバチ酸性 α -glucosidase I の
ように マルトオリゴ糖には作用するが, 澱粉などの多糖類には全
く作用を示さない酵素では, A_4 から A_7 までの値も -1.0 kcal/mol
に近い負の値を示した。 多糖類にはもちろん, A_4 以上のオリゴ糖
をほとんど水解できないヒール酵母中性 α -glucosidase II では A_4 から
大きい負の値であった。 これらの負の値は立体障害による力と考
えられ, 活性部位の空間的な大きさやオリゴ糖や特に多糖類の加水
分解能を決定するものと推測される。 従って, 負の値をも
含めた各サブサイト親和力により, 酵素の特異性を理解することか
できよう。

第4節 要約

I. テンサイ酸性 α -glucosidase, トラマメ酸性 α -glucosidase,
アタ肝臓酸性 α -glucosidase およびウサギ筋肉酸性 α -
glucosidase の活性部位構造を究明することを目的として,
サブサイト理論を適用し, 各サブサイト親和力 A_i および真
の水解速度定数 k_{int} を評価した。 各 A_i および k_{int} を用
いて得られる理論値と実験値は実験誤差範囲内で良
く一致をみることから, これらの酵素の活性部位がサブサ

スト構造よりなることを明らかにした。評価されたサブサイト親和力に関し、4種の酸性 α -glucosidase すべてについて A_2 が最大値を示し、 $A_1 > A_3$ の関係が成立することを認めた。

- II. 他の起源からの酸性 α -glucosidase および中性 α -glucosidase のサブサイト親和力を評価し、比較検討したところ、調査したすべての α -glucosidase について A_2 が最大であり、 $A_1 > A_3$ であることを確認した。 A_1 と A_3 の大小関係が α -glucosidase と glucoamylase の作用特異性の相違を合理的に説明するものとして捉えることが可能なることを考察した。

第9章 総合的考察

現在の *glucoamylase* (EC 3.2.1.3) と α -*glucosidase* (EC 3.2.1.20) との分類上の混乱は *amylase* 研究に於ける大きな問題の一つとなっている。 *glucoamylase* と一部の α -*glucosidase* はいずれも澱粉やグリコーゲンなどの多糖類にも作用し、*glucose* を産する点で極めて類似した酵素と言える。 現行の酵素分類法からは、両者は次の二基準を区別されている。 その一つは生成 *glucose* のアノマー型に依るものであり、他の一つは少糖類と多糖類に対する水解速度の相対値を基準としたものである。 両基準から二酵素間の分類に於て、完全に対応するものであればもちろん問題は生じ得ないはずである。 現在までのアノマー分析についての報告^{60,61)} (本論文の結果も含める) では、 α -*glucose* による *glucose* は全て α 型であり、*glucoamylase* では β -*glucose* を生じることが確認されており、その例外は認められていない (須賀ら²⁹⁸⁾ は数種の α -*glucosidase* で β -*glucose* を生成すると報告したことが、その後これを α -*glucose* に訂正した。⁶¹⁾ また、Barnett²⁹⁹⁾ は *Aspergillus* 属の α -*glucosidase* では β -*glucose* であると報告しているが、*glucoamylase* の論文記載上の誤りである)。 従って、アノマー型の差による分類は厳格なものと言える。 これに対して、後者の基準には少糖と多糖の加水分解速度を調査するに当って、何を基準とするか (同じ少糖であっても、*maltose* と *maltotetraose* あるいは *maltohexaose* とではその速度は大きく異なる)、また、その条件や検討方法

などについての一般的規約は明示されておらず不明瞭な基準
 と言える。すなわち、研究者により少糖と多糖の基質濃度が異
 なっていたり、両者の単純な分解率からその速度比を求めたものが
 少ない。また、基質濃度が一定であっても、その表示が重量
 比（%や mg/ml）であることが多く、従って、例えば低分子の mal-
 tase と高分子基質の多糖類とでは非還元末端残基数が異なるため
 に、酵素本来の水解能力比を表わすことにはならないのである。

このような理由から、上記二基準が必ずしも対応していないのが
 現状である。これらの酵素を扱う全々の研究者がア)マ-型の
 識別法によって分類すれば何ら問題は起きないはずであるが、
 実際には、単に作用面のみからの命名が多く、これが混乱の主
 因となってきたと考えられる。さらに、動物起源酸性 α -gluco-
 sidase に至っては、少糖と多糖の水解速度比はおろか、糖
 原病^{183~184)} 解明のためのグリコーゲン水解作用の研究の歴史上の
 経緯から安易に命名されている場合が少なくない。例えば、
 "t-amylase",^{196, 270)} "t-amylase (α -glucosidase)",³⁷⁾ "acid
 r-amylase (α -glucosidase)",²¹³⁾ "acid α -glucosidase (t-
 amylase)",²⁰⁷⁾ "acid α -glucosidase (EC 3.2.1.3)",³⁰⁰⁾ のよう
 に、元来 glucoamylase の別称として用いられていた "t-amylase",
 おりいは glucoamylase の酵素分類ナンバーを付記したものが散
 見される。

α -glucosidase と glucoamylase が分類上混乱に至った

此の原因として、哺乳動物の酸性 α -glucosidase の少糖類
 と多糖類の水解部位が別個であるとの報告^{29, 30, 193, 196, 216)} を
 挙げることもできる。上記の基質が別個の部位で加水分解さ
 れるのか、あるいは同一の部位で水解されるのかは、酵素の命名に
 関わる大きな問題である。このような観点から、本論文では
 α -glucosidase の少糖類と多糖類水解部位の異同を究明す
 ることを中心的課題とした。従って、maltose などの少糖類の
 みならず多糖類をも加水分解する α -glucosidase を単一の標品
 にして分離・精製し、一般的の物理化学的諸性質はとらえん
 のこと、基質特異性を明確にすることを研究の第一歩とした。
 基質特異性に関しては、前述のように慎重な条件を評価しなければ
 は誤った結論を導びく危険性があるため、細心の注意を払
 って調べることにした。すなわち、各基質の濃度が一定であっても、
 速度を比較する際に、他の報告を調査した基質濃度と異なれ
 ば特異性の評価が変わり、一義的に基質特異性を比較論
 じることができないことから、初速度を決定する因子としての速度
 パラメーター (K_m と V , あるいは k_0) を用いて評価することにした。
 また、多糖類については非還元末端 glucose 残基のモル濃度
 をこれらの基質濃度を表示することにした。このことにより、初め
 て酵素の各基質に対する真の触媒作用能力を比較することがで
 きる。このようにして得られたテンカイ(第2章)、トラフメ(第3章)、
 フタ肝臓(第4章)、ウサギ筋肉(第5章)およびコメ(II)、ソバ
 など既報の数種の酸性 α -glucosidase と 6 種 α glucoamy-

Table 35. Kinetic Parameters of α -Glucosidases and Glucoamylases on Maltose and Polysaccharide

Enzyme	Substrate	K_m (mM)	k_0 (sec ⁻¹) ^{a)}	k_0/K_m (sec ⁻¹ ·mM ⁻¹) ^{b)}
Sugar beet acid α -glucosidase ^{c)}	Maltose	20	149 (1)	7.5 (1)
	Soluble starch	0.27	179 (1.2)	663 (88.4)
Rice acid α -glucosidase ^{d)}	Maltose	2.4	164 (1)	68.3 (1)
	Soluble starch	0.71	169 (1.03)	238 (3.48)
Concord pole acid α -glucosidase ^{e)}	Maltose	0.72	103 (1)	143 (1)
	Soluble starch	1.18	98.6 (0.96)	83.6 (0.59)
Buckwheat acid α -glucosidase ^{f)}	Maltose	6.3	123 (1)	19.5 (1)
	Soluble starch	1.1	103 (0.84)	97.2 (4.98)
Sweet corn acid α -glucosidase ^{g)}	Maltose	1.5	108 (1)	72.0 (1)
	Soluble starch	7.4	137 (1.26)	18.5 (0.26)
Pig liver acid α -glucosidase ^{h)}	Maltose	6.7	113 (1)	16.9 (1)
	Shellfish glycogen	6.0	80.6 (0.71)	13.4 (0.79)
Rabbit muscle acid α -glucosidase ⁱ⁾	Maltose	6.3	179 (1)	28.4 (1)
	Shellfish glycogen	12	120 (0.67)	10.0 (0.35)
Rat liver acid α -glucosidase ^{j)}	Maltose	3.8	(1)	(1)
	Shellfish glycogen	1.1	(0.88)	(3.01)
<i>Paecilomyces varioti</i> glucoamylase ^{k)}	Maltose	1.2	7.2 (1)	6.0 (1)
	Soluble starch	0.0011	49.1 (6.86)	44600 (7400)
<i>Trichoderma viride</i> glucoamylase ^{l)}	Maltose	4.4	(1)	(1)
	Soluble starch	0.04 ^{o)}	(4.95)	(545)
<i>Cladosporium vesinae</i> glucoamylase ^{m)}	Maltose	2.2	(1)	(1)
	Soluble starch	0.001 ^{o)}	(3.82)	(8500)
<i>Cladosporium vesinae</i> glucoamylase ^{s^m)}	Maltose	1.8	(1)	(1)
	Soluble starch	0.001 ^{o)}	(10.0)	(18000)
<i>Aspergillus saitoi</i> glucoamylase M ₁ ⁿ⁾	Maltose	3.0	(1)	(1)
	Soluble starch	0.6 ^{o)}	(16.0)	(80)
<i>Aspergillus saitoi</i> glucoamylase M ₂ ⁿ⁾	Maltose	2.7	(1)	(1)
	Soluble starch	1.3 ^{o)}	(24.0)	(49.9)

a) the value in parenthesis indicates the relative k_0 . b) the value in parenthesis indicates the relative k_0/K_m .
c) pH 4.5, 37°C (this paper). d) pH 4.0, 37°C (this paper). e) pH 4.8, 37°C (this paper). f) pH 5.0, 37°C (reference 105). g) pH 3.8, 37°C (reference 84). h) pH 4.5, 37°C (this paper). i) pH 4.5, 37°C (this paper). j) pH 4.1 for maltose, pH 4.2 for glycogen, 37°C (reference 211). k) pH 4.5, 37°C (reference 294). l) pH 5.0, 30°C (reference 301). m) pH 4.3, 37°C (reference 302). n) pH 6.0, 37°C (reference 303). o) these values were calculated on the basis that 1 mg/ml was 0.14 mM of non-reducing terminal glucose described in this paper.

lase の maltose および 多糖類 (植物・微生物起源酵素は soluble starch, 哺乳動物起源酵素は shellfish glycogen) に関する速度パラメーターを Table 35 に示した。括弧内は各酵素の maltose に対する値を 1 とした時の相対値である。両基質濃度が非常に高い場合には k_0 で速度の比が評価され、両基質の濃度同様に低い場合には k_0/K_m の比に速度比は近似する。酸性 α -glucosidase では、高基質濃度に於ては両基質水解に差はないと認められないが、低基質濃度の場合にはテンカイの maltose : soluble starch が 1 : 88.4 から、スウィートコーンの 1 : 0.26 まで種々の比をとる。従って、テンカイ酸性 α -glucosidase は多糖を著しく分解する酵素、コメ(Ⅱ)、ソバおよびラット肝臓酵素は中程度に分解する α -glucosidase, トラムメヤスウィートコーンなどその他の酵素は比較的多糖水解能の低い酸性 α -glucosidase と言えよう。テンカイ酸性 α -glucosidase は *Clasporium vesinae* の glucoamylase $S^{(302)}$ (soluble starch に対する k_0/K_m は maltose の値の 18,000 倍) に比べて soluble starch 水解能は約 1/200 と低いが、glucoamylase と *Aspergillus saitoi* の 2 種の酵素⁽³⁰³⁾ のようにテンカイ α -glucosidase よりむしろ多糖水解能の低い酵素もあり、必ずしも glucoamylase の方が多糖類を良く水解するとは言えない。また、 α -glucosidase と glucoamylase の比較のみではなく、 α -glucosidase その自身、多糖の濃度単位の取り方と基質濃度の選び方で maltose よりも多糖水解速度の方が大きくなる酵素があることから、少糖類と多糖類の速度比のみから α -glucosi-

dase と glucoamylase を区別することはできないのである。さらに、酵素の水解力を触媒する絶対量をみると、 k_0 から理解できるように、*Paecilomyces varioti* glucoamylase は高濃度 soluble starch で 49.1 sec⁻¹ であるのに対し、全ての酸性 α -glucosidase はこれより低い値を示す。従って、少糖 (maltose) と多糖の相対速度のみならず、速度の絶対量 (k_0 を指標とした水解力) から α -glucosidase と glucoamylase を区別することはできない。

α -glucosidase と glucoamylase の両者は maltose 以外のマルトオリゴ糖や α 結合のグルコニ糖類にも作用することから、これから基質に対する作用特異性の面に、両酵素判別の指標を見出す可能性が残されている。マルトオリゴ糖に対する作用をみると、第2章より第5章および第8章で述べたように、全ての酸性 α -glucosidase はこれを加水分解し、 k_0 の重合度依存性はほとんど認められず、一定であった。これに対し、 K_m は maltotriose では全ての α -glucosidase で maltose よりも小さい値を示し、maltotetraose 以上の重合度オリゴ糖に関しては、さらに小さくなるもの (テンサイ, コメ(II)⁽¹⁰⁵⁾, ソバ⁽¹⁰⁵⁾ の酸性 α -glucosidase), ほぼ同じ値を示すもの (ブタ肝臓, ウサギ筋肉, モナシ(II)⁽²⁸⁷⁾ の酸性 α -glucosidase) および徐々に大きくなるもの (トラマ, スウィートコーン,⁽⁸⁴⁾ ウズラマ,⁽²⁸⁸⁾ ミツバ(II),⁽²⁹⁴⁾ 微生物起源^(250, 289~291) の酸性および中性 α -glucosidase) の三者の様式があり、一定の傾向は認められなかった。glucoamylase については、 k_0 と K_m のいずれとも高い重合度依存性を示すことが知られている。^(284, 293, 294)

従って、 k_0 の n 依存性から両酵素を区別する基準となり得ると考えられる。しかしながら、種々のマルトオリゴ糖に対して速度パラメーターを求め、それらの重合度依存性を検討することは時間的にも基質の入手の面からも容易なことではないであろう。酵素分類の基準は簡明で、全ての研究者に可能であることを前提としたものではない。

このような観点から、 α -glucosidase の中で多糖水解能の比較的高い動物および植物起源の酸性 α -glucosidase (哺乳動物中性 α -glucosidase や微生物起源の酸性および中性 α -glucosidase は多糖類を全く水解しないか、水解してもその能力は低いので glucoamylase とは紛れない) と glucoamylase のマルトオリゴ糖に関する k_0 を比較したものが Table 36 である。maltase に関する k_0 (これを $(k_0)_2$ とする) に対する maltotriase の k_0 (これを $(k_0)_3$ とする), $(k_0)_3/(k_0)_2$, および maltotriase より maltoheptaose までは ($n=3\sim7$) で最大および最小の値を与える $(k_0)_n/(k_0)_2$ を列記した。 $(k_0)_3/(k_0)_2$ は酸性 α -glucosidase に関与して 0.75~1.33 の範囲であり, glucoamylase は 3.01~5.95 に比して重合度 2 と 3 の差異による依存性の低いことと理解される。最大の $(k_0)_n/(k_0)_2$ を示すのはウスラマヤ酸性 α -glucosidase の 65 と 62 の k_0 比, 1.81 であるが, glucoamylase の最小値 (全ての酵素に関して $(k_0)_3/(k_0)_2$ が最小であり, その値は *Cladosporium resinae* の 3.01) よりも遙かに低い値である。従って、酸性 α -glucosidase に於ては、いずれのマルトオリゴ糖に

Table 36. k_0 Values of α -Glucosidases and Glucoamylases for Maltooligosaccharides ($n=2-7$)

Enzyme	$(k_0)_3/(k_0)_2$	maximal $(k_0)_n/(k_0)_2$	minimal $(k_0)_n/(k_0)_2$
Sugar beet acid α -glucosidase ^{a)}	0.91	0.91 (G_3-G_6)	0.80 (G_7)
Rice acid α -glucosidase II ^{a)}	1.13	1.13 (G_3, G_4)	1.06 (G_6)
Concord pole acid α -glucosidase ^{a)}	1.19	1.24 (G_5)	1.14 (G_7)
Buckweat acid α -glucosidase ^{b)}	1.10	1.31 (G_6)	1.06 (G_4)
Sweet corn acid α -glucosidase ^{c)}	1.04	1.07 (G_6)	0.86 (G_7)
Waxy rice acid α -glucosidase I ^{a)}	1.18	1.18 (G_3)	1.05 (G_6, G_7)
Waxy rice acid α -glucosidase II ^{a)}	1.21	1.63 (G_5)	1.21 (G_3)
Pinto bean acid α -glucosidase ^{a)}	1.33	1.81 (G_5)	1.31 (G_4)
Pig liver acid α -glucosidase ^{a)}	0.83	0.93 (G_7)	0.87 (G_4, G_5)
Rabbit muscle acid α -glucosidase ^{a)}	0.75	0.90 (G_4)	0.44 (G_5-G_7)
<i>Paecilomyces varioti</i> glucoamylase ^{d)}	3.80	6.06 (G_4)	3.80 (G_3)
<i>Rhizopus delemar</i> glucoamylase ^{e)}	5.00	7.17 (G_4)	5.00 (G_3)
<i>Cladosporium resinae</i> glucoamylase ^{f)}	3.01	3.80 (G_6)	3.01 (G_3)
<i>Cladosporium resinae</i> glucoamylase ^{f)}	4.70	10.0 (G_6)	4.70 (G_3)
<i>Aspergillus saitoi</i> glucoamylase M_1 ^{g)}	5.95	- ^{h)} (-)	- ^{h)} (-)
<i>Aspergillus saitoi</i> glucoamylase M_2 ^{g)}	5.95	- ^{h)} (-)	- ^{h)} (-)

a) this paper. b) reference 105. c) reference 84. d) reference 294).
e) reference 284. f) reference 302. g) reference 303. h) data were only obtained
on maltose and maltotriose.

関しても k_o は大きく見積つても maltose の 2 倍以下であり, そのうち maltotriose については 1.5 倍以下であることを判明した。これに対し glucoamylase では最小の比を与える maltotriose で 3 倍以上となる。また, Table 35 から明らかなように, マルトオリゴ糖の "延長として" 水解される多糖類では, maltose と k_o の比は α -glucosidase で 1.2 倍以下であり, glucoamylase では 3.82 倍以上であり, マルトオリゴ糖と同様の比の傾向を示す。従って, ことから k_o の比, 特に基質の均一性と入手のし易さから, maltose と maltotriose の最大速度 (V ならぬ k_o) を比較することにより, α -glucosidase か glucoamylase であるかを判別することが可能である。現在のところこの判別法による例外は認められず, 両酵素を作用の面から区別する優れた分類の基準であることを提唱したい。

各酸性 α -glucosidase に関して, 本論文で調査した上述の多糖類および マルトオリゴ糖以外の種々の基質に対する作用特異性をまとめたのが Fig. 124 である。maltose, maltotriose, soluble starch (動物起源酵素では shellfish glycogen とも) を対照として, kojibiose, nigerose, isomaltose, panose, phenyl α -glucoside および phenyl α -maltoside に対する k_o (sec⁻¹), k_o/K_m (sec⁻¹ $\cdot$ mM⁻¹) を表わした。参考として, コメ⁽¹²⁵⁾, ソバ⁽¹⁰⁵⁾ および スウィートコーン⁽⁸⁴⁾ の 酸性 α -glucosidase, *Paecilomyces varioti* の glucoamylase⁽²⁹⁴⁾ に関する値を示した。 k_o と k_o/K_m のような比較は両者の単位が異なるために直接比較は

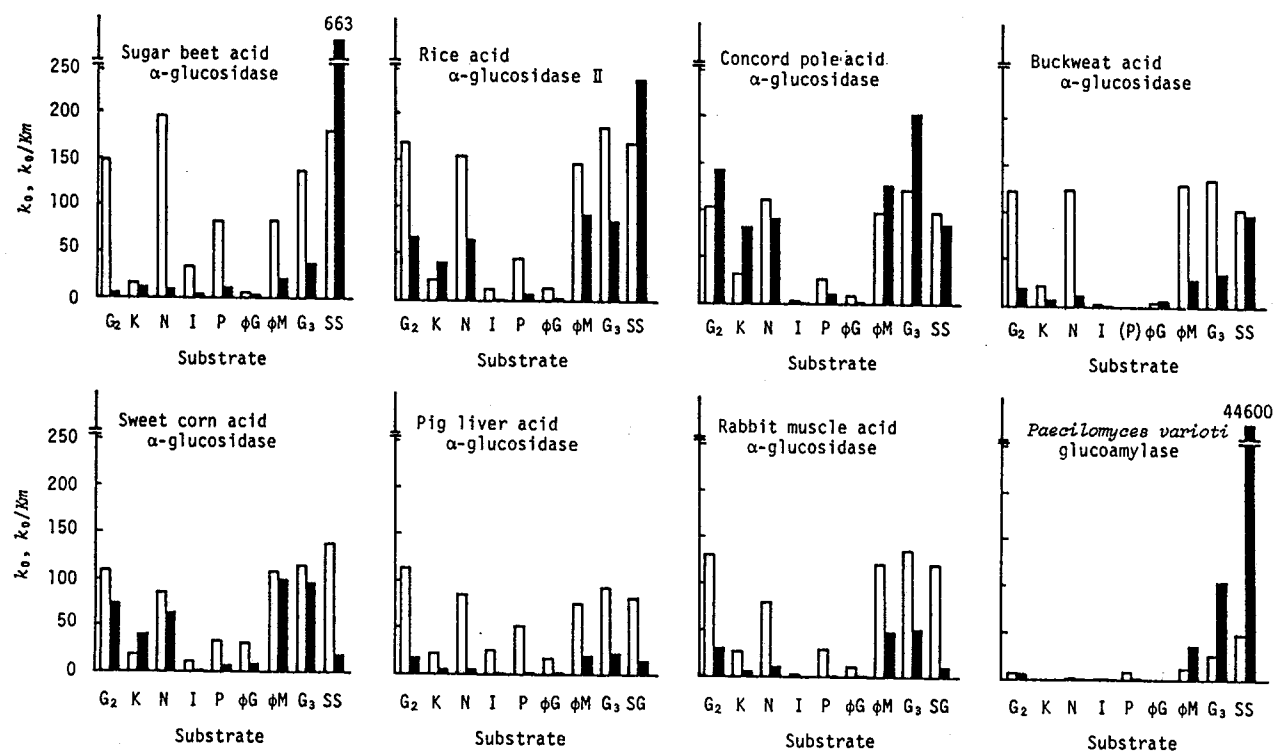


Fig. 124. k_0 and k_0/K_m Values of Some Acid α -Glucosidases and A Glucoamylase on Various Substrate. G₂: maltose (α -1,4) K: kojibiose (α -1,2), N: nigerose (α -1,3), I: isomaltose (α -1,6), P: panose (α -1,6, α -1,4) ϕ G: phenyl α -glucoside, ϕ M: phenyl α -maltoside, G₃: maltotriose, SS: soluble starch, SG: shellfish glycogen. $\square$, k_0 (sec⁻¹); $\blacksquare$, k_0/K_m (sec⁻¹·mM⁻¹).

できないが、各基質間の、あるいは各酵素間のこれらの値は直接比較
 することからでき、作用の大小関係は一目瞭然である。これを表
 述するために、基質の濃度（作用を受ける分子の濃度は非還元末
 端のモル濃度）から $1/K_m$ であるならば、高濃度の時には k_0/K_m に、
 低濃度に於ては k_0/K_m の比に作用力は近似する。その他の中間
 の濃度に於ては両者の比の間の値をとることになる。このような因
 り特異性を観ると、多糖以外の基質に対してはほとんど α -
glucosidase が *glucoamylase* よりもこれらの水解作用が優つて
 おり、酸性 α -*glucosidase* の触媒能力の高さと同時に、種々の
 基質に対する特異性の広さを窺わせる。 *Paecilomyces varioti*
glucoamylase では多糖に対する水解力が極めて高く、他の7種
 のいずれの α -*glucosidase* にも優るが、*glucoamylase* の中には
 テンサイ酸性 α -*glucosidase* の多糖水解力に劣る酵素が存する
 ことは既に述べた通りである。酸性 α -*glucosidase* はおもむね
 α -1,3 結合の *nigerose* に良く作用し、 α -1,2 結合の *kojibiose* にも比
 較的作用するが、*glucoamylase* のこれらの基質に対する作用は弱
 い。しかし、*glucoamylase* の *maltose* に対する作用は強く、従つて、
 ほとんど作用を受けないように観える *nigerase* とも、*maltose* との比
 をみると k_0 は 0.31 倍 (k_0/K_m は約 0.02 と低い) であり、ブタ肝臓
 酸性 α -*glucosidase* の 0.75 と極端には差異がない。同様の
 ことは、*isomaltase* や *phenyl* α -*glucoside* についても言える。
 これに対し、*Paecilomyces varioti* *glucoamylase* の *kojibiose*
 の加水分解能は *maltose* に比して極めて低く、例へば、通常の

基質濃度 (5.85 mm) では $1/200$ 以下である。酸性 α -glucosidase の中で、最小の K_0 ならは K_0/K_m を与えるものは テンサイ酵素の K_0/K_m [すなわち, $(K_0/K_m)_{\text{kojibiose}} / (K_0/K_m)_{\text{maltose}}$] の 0.11 であり、従って、11 以下の酸性 α -glucosidase と基質濃度にかかわらず maltose の約 $1/10$ 以上の kojibiose 水解能を示すことが理解され、maltose と kojibiose の水解速度比が両酵素判別の指標となり得ることを示唆している。しかし、ここでは glucoamylase の kojibiose 水解作用に関する報告は少なく、maltose との速度比が明らかにされていない現状では、今後の詳報を待たなければ明確に結論付けることができない。以上のように、種々の基質に対する各酸性 α -glucosidase の特異性の調査結果から、酸性 α -glucosidase の基質特異性を考察し、作用面から α -glucosidase と glucoamylase を明瞭に区別する方法として、maltose と maltotriose に対する最大速度の比による基準が最も確実であることを提示した。

第2章から第5章を精製法を確立した テンサイ酸性 α -glucosidase, トラマ酸性 α -glucosidase, フア肝臓酸性 α -glucosidase および ウサギ筋肉酸性 α -glucosidase の4種の酵素は基質特異性の調査結果から明らかのように、maltose などの少糖類のみならず soluble starch や shellfish glycogen などの多糖類をも加水分解する。このことに関して、2,3の哺乳動物酸性 α -glucosidase では、両基質の水解部位が異なることを推

定されている。ラット肝臓酸性 α -glucosidase^{29, 193)} と ウサギ筋肉酸性 α -glucosidase (部分精製標品)^{30, 216)} では, maltose と glycogen の水解に於て, 陽イオンや阻害剤による影響がそれぞれで相違すること, また, 両基質水解の至適 pH が異なること, などから活性部位が異なるものと推測されている。しかし, 両酵素ともに maltose と glycogen の二基質間で拮抗的阻害作用を示すことが観察されているが, これらの両結果から導き出される相異なる結論に対して, 矛盾のない説明はなされていない。第6章で論述したように, コメ酸性 α -glucosidase II を含めた5種類の酸性 α -glucosidase では, 混合基質を用いた速度論的方法の解析, 陽イオンや阻害剤による影響を検討した結果, 全ての酵素について少糖と多糖の加水分解部位が共通であるとの結論を得た。さらに, 第7章で説明されたように, maltose と soluble starch や shellfish glycogen の水解に於ては同種(もしくは共通)の活性解離基が関与していること, また, 至適 pH のみならず pH 安定性や温度安定性に於て, 両基質の水解作用が類似の挙動を示すことなどの結果は, 上記結論を強く支持する論証である。同じ結論は千葉ら²²⁾により, フタ血中中性 α -glucosidase と ソバ酸性 α -glucosidase を得られている。このように α -glucosidase の活性部位に关しては相及ぶ二説が存在することになるが, 活性部位が別個であるとの推考に対しては次のように反証することができる。

作用至適 pH の差異について論じると, 第7章に示した速度パラ

メーター (K_m , R_0 および R_0/K_m ; R_0 が V と同じ) の pH 依存性の項から理解されるように, 各 pH に於ける速度は基質濃度が高い場合には R_0 に近似し, 結果として, pH-速度曲線は pH- R_0 曲線に類似したものとなる。一方, 同様にして低基質濃度での結果は pH- R_0/K_m 曲線に近似したものとなる。Fig. 87, Fig. 86 および Fig. 99 に示したように, 酸性 α -glucosidase の pH- R_0 (ないしは pH- V) 曲線は pH 4.5 ~ 5.0 より酸性側ではほぼ一定の直線となるが, これは酵素失活を可能な限り抑制するために反応時間を短くした場合の結果であり, もし, 反応時間を長くすると pH 3.0 付近より酸性側では失活による反応の減退が目立つようになり, pH 3.0 ~ pH 4.5 ないし pH 5.0 の間で見掛け上の最大をとるようになる。従って, 高基質濃度条件下に於てもその pH 活性曲線は見掛け上ほぼ対称の金鐘形となることから, 基質濃度によって異なる至適 pH を与える結果となる。逆に, 實際上測定不可能な基質濃度希薄の極限に於ては, 至適 pH は R_0/K_m の最大値を示す pH と一致し, 通常測定される至適 pH よりもアルカリ側へずれることになる。実際に, 本論文で取り扱った酵素の至適 pH は 0.2% 基質濃度で調べたが, pH- R_0/K_m 曲線の最大値を与える pH と比較すると, テンサイ酸性 α -glucosidase の pH 4.5 (0.2% 基質より) は pH- R_0/K_m から pH 5.0, トラマノ酵素では pH 4.8 か pH 5.1, コメ (II) 酵素では pH 4.0 か pH 4.5 であった。すなわち, 基質濃度が高くなる程 R_0/K_m の最大値を与える pH からより酸性側の至適 pH を示すようになる。

Jeffrey¹⁹³⁾ はラット肝臓酸性 α -glucosidase の maltose

に対する作用は 50 mM で、37°C、30 分間反応させて、一方、glycogen
 に対しては 8 mM (非還元末端 glucose 濃度) で、37°C、20 分間反応
 させて種々の pH での初速度を測定している。その結果、maltose に対
 しては pH 3.7、glycogen に対しては pH 4.4 を作用至適としているが、こ
 の程度の差はこれらの諸条件から十分に推測されるものである。
 部分精製酵素標品のウサギ筋肉酸性 α -glucosidase^{21b)} に関し
 ては、5 mM maltose と 2% glycogen (著者の方法による約 12 mM
 非還元末端 glucose 濃度) で至適 pH を調べられ、それぞれ 4.5
 および 5.1 (いずれも 2 mM Na⁺ 存在下) で作用が最大になると報告さ
 れている。これは glycogen 濃度の方が高いことから、むしろ上述の
 予想とは逆の結果である。しかしながら、この酵素については測定
 時の基質濃度の差よりもむしろ使用した酵素の純度に原因が
 あると思われる。すなわち、Palmer のように反応時間を長くする (
 maltose 水解、30 分; glycogen 水解 180 分) と、pH 5.0 以下で不安定
 な酵素 (Fig. 53 参照) があるために、見掛けの至適 pH はアルカリ側へず
 れること、しかし、第 5 章で論じたように、このような部分精製標品中
 には中性ないし弱酸性で作用する protease が存在が考えられ (Fig. 53
 に示した Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィー後の pH-安定曲線参照)、
 pH 5.0 以上ではこのような混在する protease による攻撃があり酵素分
 子が減少し、全体の活性が低下すること、この際、基質の分種
 ないしはこれらの濃度により酵素の保護作用が異なること、などの理
 由から一義的にそれぞれの至適 pH がどのようなものになるかは予想す
 ることが困難である。結論として、このような至適 pH の差異が生

でも、これを活性部位が異なることの判断材料とするには問題がある。いずれにしても、このような研究に於ては高度に精製された酵素標品が使用されなければならぬ。

陽イオンや阻害剤が酸性 α -glucosidase の maltose と多糖類の加水分解に異なる影響を与えることは第6章で認められた。これらの酵素の活性部位が第8章で明らかにしたようにサブサイト構造からなることを考慮すると、その差異を容易に理解することができる。陽イオンによる活性上昇の現象と阻害による活性低下の現象は基本的には表裏一体をなす機構として捉えることができることから、先ず、阻害剤による速度減少の機構を詳述する。第6章で述べたように、全ての阻害剤は基質と競合する（拮抗阻害剤となる）ことから、Fig. 125 に示したように、maltose と多糖類が作用を受ける際に共通して占有するサブサイト1 ないしはサブサイト2 のいずれか一方、あるいはその両方に阻害剤が結合することは明らかである。例として、サブサイト2 の親和力が最大であることから、turranose や methyl α -glucoside などではサブサイト2 にグルコース残基が結合し、サブサイト2 とサブサイト3 を覆うものと推測される。これに対し、glucono- δ -lactone では glucoamylase の場合⁽³⁰⁴⁾と同様に、

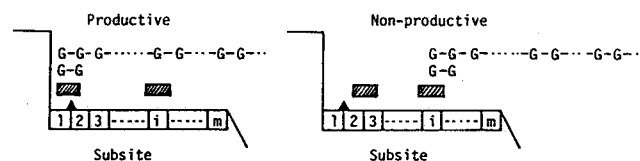


Fig. 125. Schematic Representation of Binding Mode of Inhibitor and Substrate. The triangle shows the position of the catalytic site. ■, inhibitor; G-G, maltose; G-G-G-...-G-G-G, polysaccharide.

基質水解時の中間体に類似することから、サブサイト1に結合するものと推測されている。いずれの場合に於ても、maltoseと多糖の水解に対しては程度を同じくする阻害を与え、従って、両水解作用に対する阻害物質定数、 K_i 、は同じ値となる。しかし、上述のような結合のほかにも他のサブサイト (Fig. 125 のサブサイト2) にも阻害剤が結合する場合も十分想定でき、このような場合には阻害の効果を次のように解釈することができる。すなわち、maltoseと多糖類も生成物を生じ得ない nonproductive な結合の割合が少なくなり、相対的に productive な結合が多くなるから、多糖は productive な結合に於ても maltose よりもより強く阻害剤の影響を受けることから、結果として、同じ濃度の阻害剤存在下では多糖水解速度の方がより減少することとなる。従って、多糖水解に対する方が maltose 水解作用に対するよりも K_i が小さくなる。Table 13に既載したマウス肝臓酸性 α -glucosidase に対する methyl α -glucoside (maltose 水解に対しては 64.3 mM, glycogen 水解に対しては 4.7 mM) はこの例と考えることができる。また、Table 12, Table 14 および Table 15 に於ても同様の傾向を示すものから認められることはこのような推論の妥当性を支持するものであろう。さらに、このような考え方の極例として、サブサイト2との結合がサブサイト1やサブサイト2に結合するものよりも圧倒的に優位である場合には、多糖類の水解作用には阻害を示すから、maltose の水解作用は nonproductive な結合が著しく減少することから、場合により速度が増大 (すなわち活性化) する可能性があることを付記したい。

このことは阻害剤がサブサイト2にのみしか結合しない場合を想定すると容易に理解される。

陽イオンによる速度増加については阻害剤による機構と同様に考えることができる。ただし、この場合に於ては結合した結果として与える影響は阻害剤の逆（すなわち、活性化）である。すなわち、活性化剤により複数のサブサイトが刺激され、親和力を増すという機構である。この場合にも、多糖加水分解作用の方がより強い影響を受けることになり、maltase 水解の速度よりも活性化率は高くなる。もし、活性化剤による影響が両基質が共通して占有するサブサイト1あるいはサブサイト2に限られるならば、当然、活性化の度合いは両基質の水解に対して等しくなる。ブタ肝臓酸性 α -glucosidase に於ては maltase と shellfish glycogen 水解作用に対して Na^+ , K^+ および Mg^{2+} が (Fig. 71), ウサギ筋肉酸性 α -glucosidase に於ては K^+ が (Fig. 76), 両作用を同程度活性化した。また、後者の酵素に於て Na^+ と Mg^{2+} は maltase よりも glycogen 水解に高い活性化率を示したから、上述の機構でその差を説明することができる。この機構の極端な例としては、多糖水解速度は増加するが、maltase の水解は全く変動しないかむしろ抑制されることを想像できる。ラット肝臓²⁹⁾や部分精製のウサギ筋肉酸性 α -glucosidase²¹⁸⁾ では陽イオンや阻害剤による影響を glycogen の水解作用の方がより大きく受けることから、maltase と glycogen 加水分解部位が異なることを推定されているが、妥当性に欠く推論であることはこのまですべて述べたことから明らかである。陽イオンや阻害剤による影響の差と至適 pH の差は少糖類と多糖類の加水分解

部位が別個であることの必要条件とはなり得るが、これだけで十分なる条件とはならない。これらの酵素に関して *maltase* と *glycogen* が競合することから観察されており、上記二点の差異を本論文のように解釈すれば、両報告と小糖と多糖水解部位がむしろ同一である可能性を提示しているものと推察される。

α -glucosidase の活性部位に関するこの種の研究例としては、ウサギ肝臓酸性 α -glucosidase に関する報告³¹⁾もある。 *maltase* と *glycogen* のそれぞれの加水分解に厳格な特異性を示す二成分をディスク電気泳動ゲル上で分離したとあるが、著者らの追試検討³⁶⁾によると Belenki と Rosenfeld の方法¹⁹⁾では単一に精製できなかったことを確認されており、彼らによって用いられた酵素標品に問題があるものと推測された。現在のところ高等動物に於ける *glucoamylase* の存在は否定的であり(小腸酵素で "*glucoamylase*" と呼称されているものは、例えば、ヒト小腸¹⁶⁵⁾、ウサギ小腸¹⁶¹⁾の特異性に関する報告から判かるように、明らかに type-3⁵⁸⁾の α -glucosidase である)、結論的には *glucoamylase* と *maltase* の二成分からなるという Belenki と Rosenfeld³¹⁾の結果は受け入れ難く、今後より慎重な研究が待たれるところである。

哺乳動物および植物起源の酸性 α -glucosidase に関して、小糖類と多糖類の水解部位が同一であると判断せざるを得ない現状に於ては、*glucoamylase* (EC 3.2.1.3) の別名として示されている "*Lysosomal α -glucosidase*" と "*Acid maltase*" (Table 2 参照)は排除すべきであろう。また、本論文でと便宜上使

用したが、多くの研究者は α -glucosidase の多糖水解作用活性を "glucoamylase activity" と呼称している。この表現も二酵素間の混同をかねて助長するものとなることから、今後の使用は控えることが望ましい。

酸性 α -glucosidase と中性 α -glucosidase の加水分解作用に關する活性解離基を固定することは、酸性 α -glucosidase の特性をより客觀的に位置付けるものとして重要な意義があると考えられる。酸性 α -glucosidase の至適 pH は 4~5 の範囲が多く、中性 α -glucosidase では 6~7 であることから、両者の必須解離基の相違は容易に想像される。実際に第 7 章で明らかになったように、テンサイ、トラフメ、フタ肝臓、ウサギ筋肉および コメ (II) の全 α -glucosidase に於ては 2 種のカルボキシル基 (活性型はカルボキシレートイオン $-COO^-$ とプロトン化カルボキシル基 $-COOH$) が推定され、フタ肝臓、フタ血清および ヒール酵母 (II) の各中性 α -glucosidase ではカルボキシル基 ($-COO^-$ が活性型) とヒスチジンのイミダゾール基 ($\begin{smallmatrix} \text{H} \\ \diagup \\ \text{N} \\ \diagdown \\ \text{H}^+ \end{smallmatrix} \text{CH}$) が必須解離基と推定された。アロカリ側の解離基 2 の $-COOH$ と $\begin{smallmatrix} \text{H} \\ \diagup \\ \text{N} \\ \diagdown \\ \text{H}^+ \end{smallmatrix} \text{CH}$ の役割は同じと推測される。酸性 α -glucosidase と同様の結果は glucoamylase,^{223, 240)} lysozyme,^{306, 307)} 酸性 protease³⁰⁸⁾ で得られているが、活性解離基が同種であってもそれらが触媒する反応は全く異なることに注目される。酸性 α -glucosidase の解離基 2 のカルボキシル基は 6.0~6.8 pK_e (pK_a は pK_e) を示し、一般の pK 値よりもその値はかなり高い。しかし、

Table 37. Some Highly Perturbed pK Values of Groups in Proteins

Enzyme	Residue	pK
Lysozyme	Glu-35	6.5
Lysozyme-glycolchitin complex	Glu-35	~8.2
α -Lytic protease	Asp	6.7
Acetoacetate decarboxylase	Lys (ϵ -NH ₂)	5.9
Chymotrypsin	Ile-16 (α -NH ₂)	10.0
α -Lactoglobulin	COOH	7.5

References, 309-316.

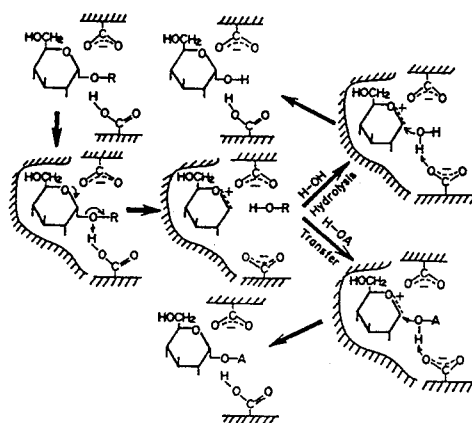


Fig. 126. A Probable Mechanism of Reaction of Acid α -Glucosidase. R; glycosyl residue(s) except non-reducing terminal, or aglycone. H-OA, acceptor.

この残基が負の環境に在るとすれば、このような結果は十分に考えられ、実際に Table 37 に示したような "異常な" 解離基を幾つかの酵素の必須解離基で知られている。^{309~316)}

このようにして明らかにされた α -glucosidase の反応必須解離基を用いて、酵素の作用機構を想定することができる。Fig. 126 にその模式図を示した。酸性 α -glucosidase では解離基 1 の $-\text{COO}^-$

がむしろ基質との結合に強く関与していること、解離基としての $-COOH$ が α -グルコシル結合の切断に深く関わっていること (第7章) から、 $-COO^-$ が非還元末端 *glucose* 残基を固定しつつ、環状のオキソカルボニウムイオン (あるいは C1 カルボニウムイオン) を促進し、 $-COOH$ のプロトンが直接 *glucosyl*-O 原子に与えられる様式が考えられた。生じた *glucosyl*-Enzyme 中間体が受容体に転移されて反応は完結するものと推考される。この際、受容体が水の場合には加水分解反応であり (加水分解は厳密には転移反応の一部であるが、水への転移率が非常に大きい場合には通常加水分解反応と呼んでいる)、その場合糖の場合には糖転移反応となる。*glucosyl*-Enzyme 中間体については本論文では言及しないが、 β -*glucosidase*³¹⁷⁾ でその存在が証明されていることから α -*glucosidase* とも同様の推測ができれば、中性 α -*glucosidase* に関しても同様の機構が考えられ、酸性 α -*glucosidase* の $-COOH$ の役割を $\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{H}-\text{C}-\text{O} \\ | \\ \text{H} \end{array}$ が担っていることと推定される。

酸性および中性のいずれの α -*glucosidase* でも切断部位のアノマー型は保持され、酸性 α -*glucosidase* と同種の解離基を有し、 α -グルコシル結合を切断する *glucoamylase* ではこれを逆転することは興味深い。 α 結合のアノマー型が保持されるか否かに関しては右より次の二説が提案されている。すなわち、基質が水解されて生成する糖の C1 に於ける立体配座の保持と反転は、 S_N2 反応によりその反転が偶数回か、奇数回の結果による説³¹⁸⁾ と、 S_N1 反応で基質が水解されて α 型と β 型が等量生ずるはずであるが、酵素の活性部位およびその近傍の立体構造により、水分子の攻撃方向

が規定されるため、アノマー型の一方のみを生ずる説^{319~321)}である。
 最近、末次ら^{322~324)}は細菌糖化型 α -amylase によるパラ位置換
 の種の phenyl α -maltoside から生成する maltose のアノマー型を調
 査した結果より、前者の矛盾を指摘し、後者の説の有望なることを
 論述している。³²⁵⁾ 酸性 α -glucosidase と glucoamylase の生成物の
 アノマー型の相違は本質的に反応の機構によるものではなく、両活性
 解離基 $-\text{COO}^-$ と $-\text{COOH}$ の空間的位置配列を含めた活性部位の
 立体構造の差異に依ると考えられる。

α -glucosidase の活性部位構造についてはサハサイト理論を適
 用して解析した。X線解析による方法とは異なり、この方法では
 酵素やその活性部位の三次元的構造の知見は得られない。しかし、
 重合度の異なる一連のマルトオリゴ糖やその“延長”としての多糖類を同
 一の部位で水解することから明らかになった今、glucoamylase との対比
 として、 α -glucosidase の活性部位をサハサイト理論を用いて解析す
 ることは意義ある研究と考えられる。第8章を詳述したように、全ての
 α -glucosidase で本理論の適用の妥当性が認められ、従って、glu-
 coamylase と同様に幾つかのサハサイトよりなる活性部位構造を推
 定することから推定された。一連の α -1,4 結合からなるマルトオリゴ糖に対
 し、サハサイト1よりサハサイト3は親和性(正の値)を示し、1つなくとも
 3個のサハサイトを有するものと判断した。テンサイ酸性 α -glucosidase
 ではサハサイト4以上降と正の値を示し(Table 27)、その大きさは
Rhizopus delemat glucoamylase の各値に準ずるものであった。

これはテンカイ酵素の多糖類水解能の高さを裏付けるものとして捉えることができる。また、多糖類を重カ植物起源 α -glucosidase の中ではテンカイ酵素に次いで比較的良く水解するコメ(II)やソバの酸性 α -glucosidase についても、サブサイト4以降の親和力はほとんど正の値であり (Fig. 123), 親和力の加算性と多糖水解能には相関が認められた。多糖水解能の低いトラメ (Table 29) やスウィートコーン、微生物起源の酸性 α -glucosidase (Fig. 123) では、サブサイト4以降は負の値を示した。maltotetraose 以上の重合度基質には作用し難い、ビール酵母中性 α -glucosidase II では、サブサイト4の親和力が非常に大きな負の値 (Fig. 123) であることから、これら負の値の意味は酵素のアミノ酸残基と基質のグルコース残基による水素結合、塩結合あるいは疎水結合などによる反発と言うよりも、活性部位の三次元的立体構造の狭窄による斥力を表わすものとして判断した。

α -glucosidase について得られたサブサイト1からサブサイト3までの各親和力 A_1, A_2 および A_3 の関係は $A_2 > A_1 > A_3$ であり, glucoamylase の $A_2 > A_3 > A_1$ とは区別される。両酵素の $A_1 > A_3$ (α -glucosidase) と $A_1 < A_3$ (glucoamylase) の差異は、マルトオリゴ糖に対する速度パラメーターの基質重合度依存性の差異を合理的に説明する要因となり得るものである。換言すれば、オリゴ糖に対する速度パラメーターの基質重合度依存性の差異は α -glucosidase と glucoamylase のサブサイト1とサブサイト3の親和力の大小の差異に基因するものであり、両酵素の本質的差異に基づいた maltase と maltotriase に対する最大速度の比率からの酵素分類法は厳格な方法であるこ

とを立証するものである。

α -glucosidase のサブサイト数は多いものを 7~8 個, 少ない酵素でも 3 個存在することは, 基質のグルコース残基と相互作用するアミノ酸残基が多数存在することを示唆している。このことは, 一般に, 反応機構を考えた " $-COO^-$ が主に基質との結合に関わる" ことと矛盾するようにも思われる。しかし, Table 38 に示したように, $-COO^-$ (Asp 52) と $-COOH$ (Glu 35) が必須解離基と固定されている lysozyme^{306, 307)} に於ては, X線解析の結果, 多数のアミノ酸残基が基質 (NAG)₆ と水素結合や疎水結合を相互に作用をしていることが明らかにされたにも拘らず, Asp 52 と Glu 35 が切断部位近傍に位置し, 両者が直接の触媒作用を行っているものと考えられている。従って, 基質の

Table 38. Interaction of Lysozyme and (NAG)₆ and Subsite Affinities

Subsite	Substrate	Enzyme	Interaction	Subsite affinity(kcal/mol)
A	NH	Asp 101 O	H	2.3
B	O ₆ H ring	Asp 101 O	H	2.7
		Try 62 ring	B	
		Try 62 NH	H	
		Try 63 NH	H	
C	Acetamide		H2+B	4.6
	NH	Ala 107 CO	H	
	CO	Ile 59 NH	H	
	CH ₃	(Try 108)	B	
D	O ₆	Gln 57 NH ₂	H	-2.9~-6.7
		or Glu 35 OH		
	O ₁	Glu 35 OH	H	
		(← Asp 52)		
E	O ₃	Gln 57 NH ₂	H	4.0
	Acetamide		H2+B	
	NH	Glu 35 CO	H	
	CO	Asn 44 NH ₂	H	
F	C ₆	Val 109 C ₁ and C ₂	B	1.7
	O ₆	Phe 34 CO	H	
	O ₆	Asn 37 NH ₂	H	
	O ₅	Arg 114 NH ₂	H	
	O ₁	Arg 114 NH ₂	H	

H: hydrogen bond; B: hydrophobic bond. (Reference 307).

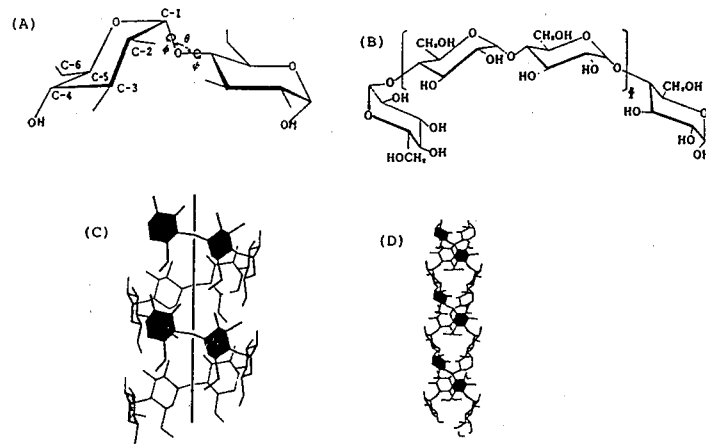


Fig. 127. Conformations of Maltose, Maltodextrin and Amylose. (A): maltose, (B): maltodextrin, (C): amylose (six residue helix), (D): native amylose.

結合を直接切断するものから決定されると思えば矛盾はない。

α -glucosidase についても多糖の残基が基質と相互作用しているものと推測される。

α -glucosidase の天然の基質である maltose, maltodextrin (厳密な定義はないが、おおよそ $n = 10 \sim 30$ 。それ以上の長鎖は amylose と呼ばれる) および amylose はそれぞれの重合度に応じた立体構造をとる。しかし、いずれもモノマー (glucose) の構造がこれらの構造に大きく反映するものと考えられている。澱粉中の α -D-glucose の構造としては、Fig. 127 に示した C1 配座が NMR 法、X 線解析法により確認されていることから、maltose は Fig. 127-(A) の構造をとるものと推定されている。⁷⁾ ϕ および ψ は回転角であり、 θ はグルコシド結合の結合角である。このような glucose あるいは maltose を基本としてオリゴ糖を描くことが出来る (Fig. 127-(B)),

ある程度長鎖になるとヘリックス構造をなすことが確認されている。
V-amylose (ヘリカルアミロースの結晶) はヘリックス-巻として *glucose* 残基と付近のものが多いと考えられている (Fig. 127-(c))³²⁶⁾。従って、 α -glucosidase には maltotetraose 以上の重合度基質に対する作用として、さらに水解能を増大するもの (親和力が増加する)、44 以上に達してはほとんど水解能が変動しないもの (親和力があまり変わらない)、除々に水解能が低下するもの (親和力が減り、すなわち K_m が増大) の3通りを認めたと、これらは基質であるオリゴ糖の空間的な広がりに対する酵素の許容度を反映するものと思われる。そのような意味で、テンカイ酸性 α -glucosidase はその活性部位が他起源酵素と比較して、最も空間的に広いものと想像される。

基質が澱粉やグリコーゲンになるとこれらの構造はさらに複雑となり、現在までこれに関する確証ある説明はなされていない。

澱粉は *amylose* をも含むが、そのほとんどは *amylopectin* であることからこの構造をみらみよう。また、グリコーゲンは *amylopectin* のより高度に分岐

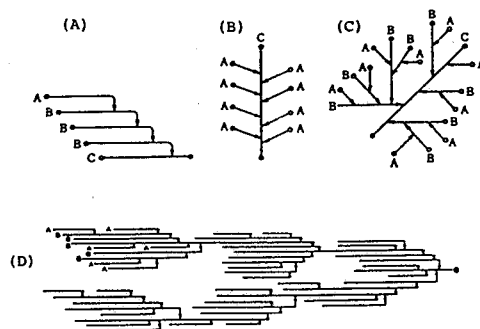


Fig. 128. Structure of Amylopectin. (A): Haworth's model, (B): Staudinger's model, (C): Meyer's model, (D): Manners and Matheson's cluster model.

(α -1,6 グリコシド結合)した構造と考えられている。Fig. 128は現在までに提出されている幾つかの amylopectin の構造を模式的に示したものである。Haworth,⁷⁾ Staudinger,⁷⁾ Meyer⁷⁾ および Manners と Matheson のクラスターモデル²²⁾ 中の A 鎖は他の鎖からの結合のないもの、B 鎖は他の鎖に結合すると同時に、他の鎖からも結合されているもの、C 鎖は還元末端を持つ鎖である。(A), (B) および (C) の単位構造のうち (C) の Meyer のモデルが現在最も広く受け入れられており、⁷⁾ 平均鎖長は約 27 glucose 残基である (グリコーゲンではその約半分の鎖長)。また、現在では (C) の単位が房状に集合したクラスターモデル (D) がより "真" に近いものと考えられている。このような構造の amylopectin において、 α -glucosidase や glucoamylase が作用する A 鎖や B 鎖の非還元末端部位やその近傍は amylose と同様に約 6 個の glucose 残基がヘリックスを作っているものと想像される。

以上のような maltose などの少糖類、澱粉 (amylose と amylopectin) や グリコーゲンなどの多糖類の立体構造を考慮すると、maltose や maltotriose を水解する α -glucosidase は本来的に少糖類のみならず多糖類の加水分解反応をも "触媒できる" 能力を有しており、ただその重合度の大きい基質の侵入を許容する能力があるか否か、またはその能力が高いか低いかの程度によって、いわゆる "水解作用" の有無が決定するものと考えられる。Fig. 129に模式図で示したように、千葉らの類別法⁵²⁾ による type-1 α -glucosidase (maltose, maltotriose, 合成基質に良く作用する) は maltotriose までの大きさの基質しか侵入を許さず、type-2

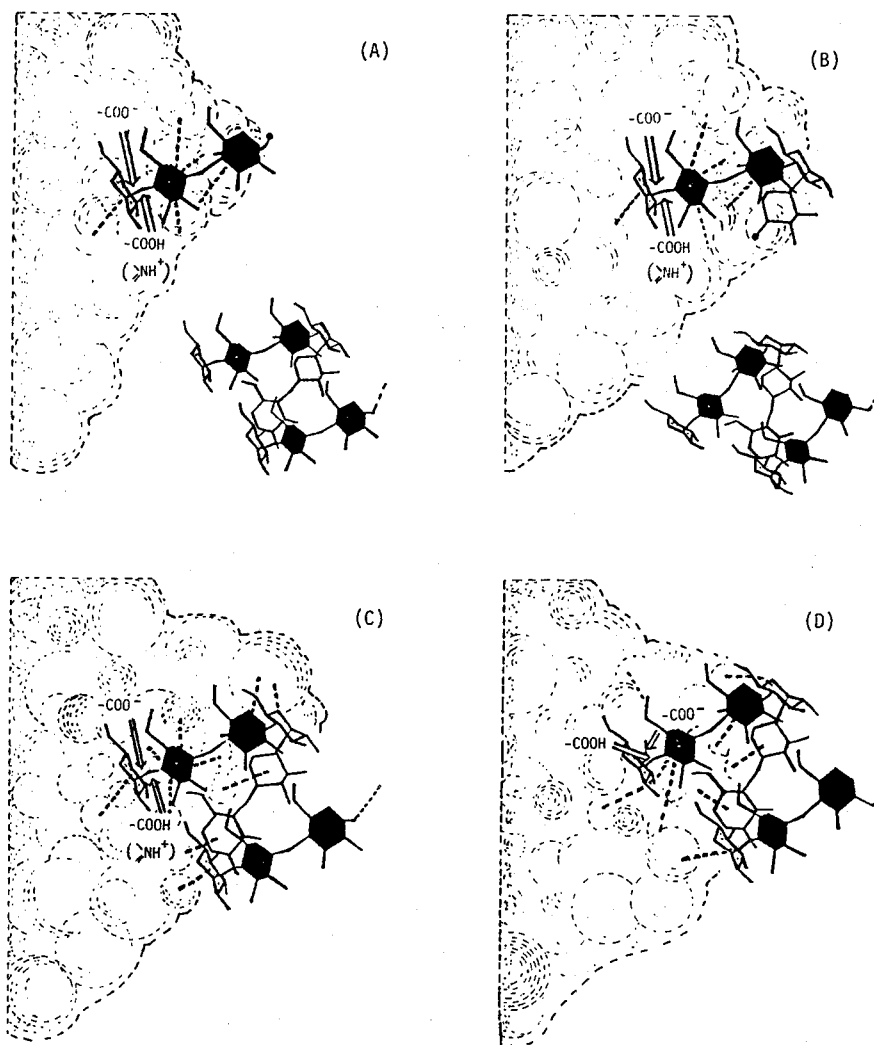


Fig. 129. Binding Models of α -Glucosidase or Glucoamylase and Maltooligosaccharide. (A): type-1 α -glucosidase, (B): type-2 α -glucosidase, (C): type-3 α -glucosidase, (D): glucoamylase.

α -glucosidase (多糖は水解しないが, maltopentaose 位までのマルトオリゴ糖を水解する) は, type-1 酵素よりもさらに 2~3 グルコース残基の多い基質を受け入れるが, 多糖は侵入できない。多糖をも水解する type-3 α -glucosidase は 約 6 残基で一巻の α -ヘリックス全体を受け入れる能力 (許容度) があると思われる。基質の立体構造は酵素の

活性部位構造を解明する上で相補的な知見を提供するものである。 α -glucosidase の立体構造に関する研究は酵素の特異性に大きく関わるものであり、これをより明確にすることは多様性を示す酵素としての α -glucosidase に於ては、今後に残された大きな課題と言えよう。

著者は本論文に於て、テンサイ、トラマメ、ブタ肝臓 およびウサギ筋肉からの酸性 α -glucosidase の精製法を確立した。これらの酵素の物理化学的諸性質を明らかにし、基質特異性を速度パラメーターを用いて評価した。いずれの酵素も少糖類のみならず多糖類をも加水分解し、コメ酸性 α -glucosidase II を含めた 5 種の酸性 α -glucosidase 全てが両基質を同一の活性部位で水解することを速度論的方法により明らかにした。一連のマルトオリゴ糖や多糖の重合度を異にする基質を水解する酸性 α -glucosidase は、その活性部位が幾つかのサブサイトからなることを明らかにした。これらの研究過程で、酸性 α -glucosidase の活性解離基は $-\text{COO}^-$ と $-\text{COOH}$ であり、中性 α -glucosidase は $-\text{COO}^-$ と $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH}$ であると推定した。また、中性 α -glucosidase を含む数種の α -glucosidase に関しても、活性部位がサブサイト構造よりなることを確認した。さらに、2,3 の酸性 α -glucosidase が少糖と多糖水解部位が異なることの論拠としていた実験事実も、サブサイト構造を考慮すれば、これらの部位が同一であると矛盾なく説明できることを考察

した。 サブサイト親和力は α -glucosidase だと glucoamylase だと A_2 が最大であるが、前者では $A_1 > A_3$ 、後者では $A_1 < A_3$ の関係が見い出され、このが基質特異性に反映されることから、maltose と maltotriose の最大速度の比より、 α -glucosidase [$(k_0)_3 / (k_0)_2 < 1.5$] と glucoamylase [$(k_0)_3 / (k_0)_2 > 3.0$] が区別できることを提唱した。

謝 辞

本研究の遂行ならびに論文のとりまとめに際し、終始一方ならぬ御指導と御鞭撻を賜りました北海道大学農学部千葉誠哉教授に心から厚く御礼を申し上げます。

本論文を御校閲下さい、種々の有益なる御助言を賜りました北海道大学低温科学研究所勾坂勝之助教授に深く感謝の意を表します。また、論文の御校閲、御助言をはじめ、有益な御教示、励ましの御言葉を下さいました北海道大学農学部本間守助教授に深く感謝致します。

また、研究中、有益な御教示、御指摘を賜りました北海道大学下村得治名誉教授、ならびに山川生化学工業株式会社故高橋存往博士に厚く御礼を申し上げます。

さらに、本研究の遂行にあたり、御支援、御協力を下さいました北海道大学農学部農芸化学科の諸先生をはじめ、同農芸化学科生物化学講座植松千代子事務官ならびに卒業生、在校生の皆様にもより感謝致します。

文 献

- 1) 中村道徳 : "澱粉科学ハンドブック", (中村道徳, 鈴木繁男編), 朝倉書店, 1977, p.3.
- 2) 中山 包 : "発芽生理学", 内田老鶴圃新社, 1976, p. 94.
- 3) 永井 克也 : 蛋白質 核酸 酵素, 24, 202 (1979).
- 4) 谷口直之, 入野秀樹 : 蛋白質 核酸 酵素, 24, 418 (1979).
- 5) 三崎 加 : "多糖生化学I", (鈴木旺, 松村剛, 山科郁男編), 共立出版, 1969, p. 211.
- 6) 中村道徳 : "澱粉科学ハンドブック", (中村道徳, 鈴木繁男編), 朝倉書店, 1977, p. 7.
- 7) 三崎 加 : "多糖生化学I", (鈴木旺, 松村剛, 山科郁男編), 共立出版, 1969, p. 236.
- 8) 上田 誠之助 : "澱粉科学ハンドブック", (中村道徳, 鈴木繁男編), 朝倉書店, 1977, p. 91.
- 9) A. Payen and J. F. Persoz, *Ann. Chim. Phys.*, 53, 73 (1833).
- 10) E. Ohlson, *Compt. Rend. Sec. Biol.*, 87, 118 (1922).
- 11) R. Kuhn, *Ber.*, 57, 1965 (1925).
- 12) R. Kuhn, *Ann.*, 44, 31 (1925).
- 13) L. L. Phillips and M. L. Caldwell, *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 3563 (1951).
- 14) 北原寛夫, 久留島通俊 : 澱工, 27, 1, 6, 213, 254 (1949).
- 15) G. T. Cori and J. Larner, *J. Biol. Chem.*, 188, 17 (1951).
- 16) 小林 恒夫 : 農化, 27, 180 (1953).
- 17) E. Schubert, *Melliand Textil Acta*, 8, 620 (1954).
- 18) 岡田茂孝, 溝上恭子 : 澱粉科学, 27, 127 (1980).
- 19) Y. Sakano, S. Hiraiwa, J. Fukushima and T. Kobayashi, *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1121 (1982).
- 20) J. Fukushima, Y. Sakano, H. Iwai, Y. Itoh, M. Murata and T. Kobayashi, *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1423 (1982).

- 21) T. Suganuma, T. Mizukami, K. Moori, M. Ohnishi and K. Hiromi, *J. Biochem.*, 88, 131 (1980).
- 22) 菅沼俊彦, 大西正健 : *化学*, 38, 169 (1983).
- 23) J. Corman and F. A. Langlikke, *Cereal Chem.*, 25, 191 (1948).
- 24) R. W. Kerr, F. C. Cleveland and W. J. Katzbeck, *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 3916 (1951).
- 25) C. W. Weil, R. J. Burch and J. W. Dyk, *Cereal Chem.*, 31, 150 (1954).
- 26) S. Hayashida, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 21, 386 (1957).
- 27) Y. Tsujisaka, J. Fukumoto and T. Yamamoto, *Nature*, 181, 770 (1958).
- 28) 松井博和, 千葉誠哉, 下村得治 : 日本薬化学会大会講演要旨集, 1977, p. 315.
- 29) P. L. Jeffrey, D. H. Brown and B. I. Brown, *Biochemistry*, 9, 1416 (1970).
- 30) T. N. Palmer, *Biochem. J.*, 124, 713 (1971).
- 31) D. M. Belenki and E. L. Rosenfeld, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46, 443 (1972).
- 32) S. C. Pan, L. W. Nicholson and P. Kolachov, *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 2547 (1951).
- 33) J. H. Pazur and D. Frence, *J. Biol. Chem.*, 196, 265 (1952).
- 34) S. Sugawara, Y. Nakamura and T. Shimomura, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 24, 281 (1960).
- 35) 千葉誠哉, 下村得治 : *澱粉科学*, 26, 59 (1979).
- 36) A. P. Dubrunfaut, *Ann. Chim. Phys.*, 21, 178 (1847).
- 37) C. O'Sullivan, *J. Chem. Soc.*, 25, 579 (1872).
- 38) H. J. Brown and J. Heron, *Ann.*, 204, 228 (1880).
- 39) J. Mering, *Z. Physiol. Chem.*, 5, 185 (1881).
- 40) E. Bourquelot, *Compt. Rend.*, 97, 1322 (1883).
- 41) O. Kellner, Y. Mori and M. Nagaoka, *Z. Physiol. Chem.*, 14, 297 (1890).
- 42) R. Geduld, *Koch's Jahresberichte Gärungs-Organismen*, 1891, p. 220, quoted by E. Fisher, *Ber.*, 27, 3479 (1894).

- 43) E. Fisher, *Ber.*, 27, 2985 (1894).
- 44) E. Fisher, *Ber.*, 27, 3479 (1894).
- 45) E. Fisher, *Ber.*, 28, 1429 (1895).
- 46) A. Gottschalk, "The Enzymes," Vol. 1, ed. by J. B. Sumner and K. Myrback, Academic Press, New York, 1950, p. 551.
- 47) J. Leibowitz, *Z. Physiol. Chem.*, 149, 184 (1925).
- 48) K. D. Miller and W. H. Copeland, *Biochim. Biophys. Acta*, 22, 193 (1956).
- 49) K. D. Miller, *J. Biol. Chem.*, 231, 987 (1958).
- 50) K. D. Miller and W. H. Copeland, *J. Biol. Chem.*, 231, 997 (1958).
- 51) I. Liberman and W. H. Eto, *J. Biol. Chem.*, 225, 899 (1957).
- 52) T. Sawai, *J. Biochem.*, 45, 49 (1958).
- 53) O. B. Jørgensen, *Acta Chem. Scand.*, 18, 1975 (1964).
- 54) M. Takahashi and T. Shimomura, *Agric. Biol. Chem.*, 32, 929 (1968).
- 55) N. Takahashi, T. Shimomura and S. Chiba, *Agric. Biol. Chem.*, 35, 2015 (1971).
- 56) S. Chiba, T. Saeki and T. Shimomura, *Agric. Biol. Chem.*, 37, 1831 (1973).
- 57) 千葉誠哉 : 化学と生物, 5, 469 (1967).
- 58) 辻阪好夫 : 澱粉科学, 25, 100 (1978).
- 59) 高橋美帆 : 化学と生物, 6, 466 (1968).
- 60) S. Chiba, A. Kimura and H. Matsui, *Agric. Biol. Chem.*, 47, 1741 (1983).
- 61) S. Chiba, K. Hiromi, N. Minamiura, M. Ohnishi, T. Shimomura, K. Suga, T. Suganuma, A. Tanaka, S. Tomioka and T. Yamamoto, *J. Biochem.*, 85, 1135 (1979).
- 62) W. M. Beverink, *Centr. Bakt. Parasitenk.*, I, 1, 221 (1896).
- 63) Z. Wierzychowski, *Biochem. Z.*, 57, 125 (1913).
- 64) Y. Jono, *Chem. Centr.*, 1932, I, 1103.
- 65) 山岸五平 : 農化, 18, 1082 (1942).
- 66) R. E. Chapman, *Biochem. J.*, 18, 1388 (1924).

- 67) C. E. Hartt, *Chem. Abstr.*, 32, 6690 (1938).
- 68) A. Astruc and M. Mousseron, *Compt. Rend.*, 184, 126 (1927).
- 69) A. J. Daish, *Biochem. J.*, 10, 49 (1916).
- 70) G. P. Volgunov, A. S. Komel and I. N. Pushkareva, *Biokhimiya*, 6, 67 (1941).
- 71) J. Janicki, W. V. Kotasthane, A. Parker and T. K. Walker, *J. Inst. Brewing*, 47, 24 (1941).
- 72) A. Sosa, *Ann. Chim.*, 14, 5 (1940).
- 73) W. A. M. Duncan and D. J. Manners, *Biochem. J.*, 69, 343 (1958).
- 74) V. N. Nigam and K. V. Giri, *J. Biol. Chem.*, 235, 947 (1960).
- 75) M. R. Stetten, *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 1437 (1959).
- 76) B. B. Jørgensen and O. B. Jørgensen, *Acta Chem. Scand.*, 17, 1765 (1963).
- 77) O. B. Jørgensen, *Acta Chem. Scand.*, 17, 2471 (1963).
- 78) O. B. Jørgensen, *Acta Chem. Scand.*, 18, 53 (1964).
- 79) D. H. Hutson and D. J. Manners, *Biochem. J.*, 89, 91P (1963).
- 80) D. H. Hutson and D. J. Manners, *Biochem. J.*, 94, 783 (1965).
- 81) D. J. Manners and K. L. Rowe, *Carbohydr. Res.*, 9, 441 (1969).
- 82) S. Chiba and T. Shimomura, *Agric. Biol. Chem.*, 39, 1033 (1975).
- 83) Y. Yamasaki and Y. Suzuki, *Agric. Biol. Chem.*, 43, 481 (1979).
- 84) H. Matsui, I. Yazawa and S. Chiba, *Agric. Biol. Chem.*, 45, 887 (1981).
- 85) J. E. Silvius and F. W. Snyder, *Plant Physiol.*, 64, 1070 (1979).
- 86) P. R. Gaudreault and J. A. Webb, *Plant Physiol.*, 71, 662 (1983).
- 87) 増田宏志 : 私信
- 88) L. Michaelis and M. L. Menten, *Biochem. Z.*, 49, 333 (1913).
- 89) M. Takahashi, T. Shimomura and S. Chiba, *Agric. Biol. Chem.*, 33, 1399 (1969).
- 90) 金谷憲一, 安部邦子, 千葉誠哉, 下村得治 : 澱粉科学, 24, 42 (1977).
- 91) J. R. Turvey and W. J. Whelan, *Biochem. J.*, 67, 49 (1957).

- 92) K. H. Meyer, P. Bernfeld, R. A. Boissonnas, P. Gürtler and G. Noelting, *J. Phys. Colloid Chem.*, 53, 319 (1949).
- 93) N. M. Papadopoulos and W. C. Hess, *Arch. Biochem. Biophys.*, 88, 167 (1960).
- 94) A. Dahlqvist, *Biochem. J.*, 80, 547 (1961).
- 95) 小林達吉, 田淵武士 : 養化, 28, 171 (1954).
- 96) M. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, 160, 61 (1945).
- 97) J. J. Robertson and H. O. Halvorson, *J. Bacteriol.*, 73, 186 (1957).
- 98) R. A. Reisfeld, U. J. Lewis and D. E. Williams, *Nature*, 195, 281 (1962).
- 99) K. Weber and M. Osborn, *J. Biol. Chem.*, 244, 4406 (1969).
- 100) S. Hizukuri and S. Osaki, *Carbohydr. Res.*, 63, 261 (1978).
- 101) S. Hizukuri, Y. Takeda and M. Yasuda, *Carbohydr. Res.*, 94, 205 (1981).
- 102) J. K. Hamilton and F. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 5907 (1956).
- 103) H. K. Schachman, "Method in Enzymology," Vol. 4, ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Academic Press, New York, 1957, p. 32.
- 104) T. Svedberg and D. K. Pederson, "The Ultracentrifuge," Clearedon Press, Oxford, 1940, p. 445.
- 105) S. Chiba, K. Kanaya, K. Hiromi and T. Shimomura, *Agric. Biol. Chem.*, 43, 237 (1979).
- 106) S. Chiba and T. Shimomura, *Agric. Biol. Chem.*, 39, 1041 (1975).
- 107) H. Matsui, S. Chiba and T. Shimomura, *Agric. Biol. Chem.*, 41, 841 (1977).
- 108) S. Schwimmer and A. K. Balls, *J. Biol. Chem.*, 179, 1063 (1949).
- 109) K. H. Meyer, E. H. Fischer and A. Piquet, *Helv. Chim. Acta*, 34, 316 (1951).
- 110) A. Piquet and E. H. Fischer, *Helv. Chim. Acta*, 35, 257 (1952).
- 111) M. Nummi, R. Vilhunen and T. M. Enari, *Acta Chem. Scand.*, 19, 1793 (1965).
- 112) K. H. Meyer, P. F. Spahr and E. H. Fischer, *Helv. Chim. Acta*, 36, 1924 (1953).

- 113) T. Tkachuk and K. H. Tipples, *Cereal Chem.*, 43, 62 (1966).
- 114) C. T. Greenwood and E. A. Milne, *Staerke*, 20, 139 (1968).
- 115) J. A. Thoma, J. E. Spradlin and S. Dygert, "The Enzyme," 3rd Ed., Vol. 5, ed. by P. D. Boyer, Academic Press, New York, 1971, p. 115.
- 116) 新家 龍, 麦林 檢太郎: 農化, 43, 802 (1969).
- 117) 新家 龍: 化学と生物, 10, 426 (1972).
- 118) H. Matsui, S. Chiba, T. Shimomura and N. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.*, 39, 2239 (1975).
- 119) J. E. Varner, *Plant Physiol.*, 39, 413 (1964).
- 120) M. J. Chrispeels and J. E. Varner, *Plant Physiol.*, 42, 398 (1967).
- 121) 赤沢 堯: "生化学実験講座10 糖質の代謝", (鈴木 旺, 山川 民夫, 山科 郁男編), 東京化学同人, 1975, p. 301.
- 122) 山岸 五平: 農化, 14, 1001 (1938).
- 123) 伊賀上 郁夫, 夏島 進, 倉沢 文夫: 農化, 34, 253 (1960).
- 124) 下村 得治, 秋元 史夫: 北海道大学農学部邦文紀要, 6, 325 (1968).
- 125) S. Murata, H. Matsui, S. Chiba and T. Shimomura, *Agric. Biol. Chem.*, 43, 2131 (1979).
- 126) 高橋 希往: 博士論文 (北海道大学) (1973).
- 127) 春日井 愛子: 農化, 36, 784 (1962).
- 128) 春日井 愛子: 日本農芸化学会大会 講演要旨集, 1966, p. 83.
- 129) 松井 博和, 河沼 稔, 千葉 誠哉: 未発表データ
- 130) 河沼 稔: 卒業論文 (北海道大学農学部) (1980).
- 131) E. Katchalski, *Arch. Biochem. Biophys.*, 117, 301 (1966).
- 132) A. Pusztai, *Biochem. J.*, 101, 379 (1966).
- 133) T. Takahashi, P. Ramachandramurthy and I. E. Liener, *Biochim. Biophys. Acta*, 133, 123 (1967).
- 134) O. P. Bahl and K. M. L. Agrawal, *J. Biol. Chem.*, 243, 98 (1968).
- 135) K. M. L. Agrawal and O. P. Bahl, *J. Biol. Chem.*, 243, 103 (1968).
- 136) G. E. Glock, *Biochem. J.*, 30, 2313 (1936).

- 137) A. N. Petrova, *Biokhimiya*, 12, 209 (1947).
- 138) E. Laborde, I. H. Fiszerman and D. F. Garber, *Chem. Abstr.*, 27, 3490 (1933).
- 139) 河村洋三郎: "食欲の科学", 医歯薬出版, 1972, p. 236.
- 140) 厚生省公衆衛生局: "昭和50年国民栄養調査について" (1976).
- 141) D. Miller and R. K. Crane, *Biochim. Biophys. Acta*, 52, 293 (1961).
- 142) A. M. Ugolev, N. N. Jesuitova and P. DeLaey, *Nature*, 203, 879 (1964).
- 143) 森内愛子, 山田和彦: 蛋白質 核酸 酵素, 24, 434 (1979).
- 144) A. Dahlqvist and B. Borgström, *Biochem. J.*, 81, 411 (1961).
- 145) A. Dahlqvist, *Acta Chem. Scand.*, 13, 1817 (1959).
- 146) A. Dahlqvist, *Acta Chem. Scand.*, 14, 1 (1960).
- 147) A. Dahlqvist, *Acta Chem. Scand.*, 14, 72 (1960).
- 148) P. R. Flanagan and G. G. Forstner, *Biochem. J.*, 175, 553 (1978).
- 149) P. R. Flanagan and G. G. Forstner, *Biochem. J.*, 177, 487 (1979).
- 150) L. M. Y. Lee, A. K. Salvatore, P. R. Flanagan and G. G. Forstner, *Biochem. J.*, 187, 437 (1980).
- 151) J. Kolínská and J. Kraml, *Biochim. Biophys. Acta*, 284, 235 (1972).
- 152) H. P. Hauri, H. Wacker, E. E. Rickli, B. B. Meier, A. Quaroni and G. Semenza, *J. Biol. Chem.*, 257, 4522 (1982).
- 153) A. Dahlqvist and D. L. Thomson, *Biochem. J.*, 89, 272 (1963).
- 154) D. H. Alpers and M. Solin, *Gastroenterology*, 58, 833 (1970).
- 155) S. Sivakami and A. N. Radhakrishnan, *Indian J. Biochem. Biophys.*, 10, 283 (1973).
- 156) K. Sankaran, S. Sivakami and A. N. Radhakrishnan, *Biochem. J.*, 213, 719 (1983).
- 157) J. Kolínská and G. Semenza, *Biochim. Biophys. Acta*, 146, 181 (1967).
- 158) A. Eichholz and R. K. Crane, *J. Cell Biol.*, 26, 687 (1965).
- 159) R. Gitzelmann, T. Bachi, H. Binz, J. Lindenmann and G. Semenza, *Biochim. Biophys. Acta*, 196, 20 (1970).

- 160) A. Cogoli, A. Eberle, H. Sigrist, C. Joss, R. Robinson, H. Mosimann and G. Semenza, *Eur. J. Biochem.*, 83, 40 (1973).
- 161) S. Sivakami and A. N. Radhakrishnan, *Biochem. J.*, 153, 321 (1976).
- 162) E. M. Danielsen, H. Sjöström and O. Noren, *Biochem. J.*, 210, 389 (1983).
- 163) D. L. Cummins, R. Gitzelmann, J. Lindenmann and G. Semenza, *Biochim Biophys. Acta*, 160, 396 (1968).
- 164) J. W. Heaton, *Gastroenterology*, 58, 1044 (1970).
- 165) J. J. Kelly and D. H. Alpers, *Biochim. Biophys. Acta*, 315, 113 (1973).
- 166) D. R. Critchley, K. E. Howell and A. Eichholz, *Biochim. Biophys. Acta*, 394, 361 (1975).
- 167) B. Seetharam, N. Swaminathan and A. N. Radhakrishnan, *Biochem. J.*, 117, 939 (1970).
- 168) H. Nakamura and Z. Tamura, *Chem. Pharm. Bull.*, 20, 1070 (1972).
- 169) W. H. Fishman and H. G. Sie, *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 121 (1958).
- 170) R. W. Brosemer and W. J. Rutter, *J. Biol. Chem.*, 236, 1253 (1961).
- 171) W. J. Rutter, M. Arnold, R. W. Brosemer and J. A. Miller, *J. Biol. Chem.*, 236, 1259 (1961).
- 172) J. M. Olavarria and H. N. Torres, *J. Biol. Chem.*, 237, 1746 (1962).
- 173) R. R. Swain and E. E. Dekker, *Biochim. Biophys. Acta*, 122, 87 (1966).
- 174) H. G. Hers, *Biochem. J.*, 88, 11 (1963).
- 175) F. Appelmans and C. de Duve, *Biochem. J.*, 59, 426 (1955).
- 176) F. Appelmans, R. Wattiaux and C. de Duve, *Biochem. J.*, 59, 438 (1955).
- 177) A. B. Novikoff, E. Podber, J. Ryan and E. Noe, *J. Histochem. Cytochem.*, 1, 27 (1953).
- 178) A. B. Novikoff, H. Beaufay and C. de Duve, *Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, Suppl., 179 (1959).
- 179) J. G. Hirsch and Z. A. Cohn, *J. Exptl. Med.*, 112, 1005 (1960).
- 180) J. G. Hirsch, *J. Exptl. Med.*, 116, 827 (1962).

- 181) N. Lejeune, D. T. Sempoux and H. G. Hers, *Biochem. J.*, 86, 16 (1963).
- 182) 藤盛 健: 蛋白質 核酸 酵素, 18, 1018 (1973).
- 183) J. C. Pompe, *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 76, 304 (1932).
- 184) 宇井理生: "生化学実験講座10 糖質の代謝," (鈴木旺, 山川氏夫, 山科郁男編), 東京化学同人, 1975, p. 379.
- 185) 垂井清一郎: 蛋白質 核酸 酵素, 24, 516 (1979).
- 186) 倉山 浩吉, 小野悦子: 代謝, 19, (10月臨時増刊号 先天性代謝病 免疫病ハンドブック), 450 (1982).
- 187) H. Matsui, T. Yamada, Y. Someya and S. Chiba, *Agric. Biol. Chem.*, 47, 1817 (1983).
- 188) N. Minamiura, K. Matoba, N. Nishinaka and T. Yamamoto, *J. Biochem.*, 91, 809 (1982).
- 189) F. Auricchio and C. B. Bruni, *Biochem. J.*, 105, 35 (1967).
- 190) F. Auricchio, C. B. Bruni and V. Sica, *Biochem. J.*, 108, 161 (1968).
- 191) K. Fujimori, S. Hizukuri and Z. Nikuni, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 32, 811 (1968).
- 192) C. B. Bruni, F. Auricchio and I. Covelli, *J. Biol. Chem.*, 244, 4735 (1969).
- 193) P. L. Jeffrey, D. H. Brown and B. I. Brown, *Biochemistry*, 9, 1403 (1970).
- 194) T. de Barsy, P. Jacquemin, P. Devos and H. G. Hers, *Eur. J. Biochem.*, 31, 156 (1972).
- 195) C. Dissous, J. F. Ansart, A. Cheron and J. Krembel, *Anal. Biochem.*, 116, 35 (1981).
- 196) D. M. Belenki and E. L. Rosenfeld, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 199, 708 (1971).
- 197) K. Tsujino, M. Yoshimura, K. Umeki, N. Minamiura and T. Yamamoto, *J. Biochem.*, 76, 1235 (1974).
- 198) D. M. Belen'ky, D. B. Tsukerman and E. L. Rosenfeld, *Biokhimiya*, 40, 927 (1975).
- 199) J. F. Koster and R. G. Slee, *Biochim. Biophys. Acta*, 482, 89 (1977).

- 200) L. Ornstein, *Ann. New York Acad. Sci.*, 121, 321 (1964).
- 201) D. M. Belen'ky, V. I. Mikhajlov and E. L. Rosenfeld, *Clin. Chim. Acta*, 93, 365 (1979).
- 202) A. K. Murray, B. L. Brown and D. H. Brown, *Arch. Biochem. Biophys.*, 185, 511 (1978).
- 203) K. Fujimori, T. Fukui and Z. Nikuni, *Agric. Biol. Chem.*, 30, 483 (1972).
- 204) J. Carter and E. E. Smith, *Arch. Biochem. Biophys.*, 115, 82 (1973).
- 205) K. Uchida and Y. Suzuki, *Agric. Biol. Chem.*, 38, 195 (1974).
- 206) U. Reiss and B. Sacktor, *Arch. Biochem. Biophys.*, 209, 342 (1981).
- 207) F. Martiniuk and R. Hirschhorn, *Biochim. Biophys. Acta*, 658, 248 (1981).
- 208) G. Burlet and P. Sudaka, *Biochimie*, 58, 621 (1976).
- 209) C. B. Bruni, V. Sica, F. Auricchio and I. Covelli, *Biochim. Biophys. Acta*, 212, 470 (1970).
- 210) D. M. Belenki and E. L. Rosenfeld, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 187, 201 (1969).
- 211) P. L. Jeffrey, D. H. Brown and B. I. Brown, *Biochemistry*, 9, 1416 (1970).
- 212) D. M. Belen'kii, V. I. Mikhailov and V. N. Shaptseva, *Biochemistry (USSR)*, 47, 954 (1982).
- 213) D. M. Belenky and E. L. Rosenfeld, *Clin. Chim. Acta*, 60, 397 (1975).
- 214) H. N. Torres and J. M. Olavarria, *J. Biol. Chem.*, 239, 2427 (1964).
- 215) J. F. Koster and R. G. Slee, *Biochim. Biophys. Acta*, 482, 89 (1977).
- 216) T. N. Palmer, *Biochem. J.*, 124, 701 (1971).
- 217) 東洋曹達工業(株): "TSK トヨハルイオン交換体 DEAE-TOPEARL 650 CM-TOYDPEARL 650", 1983, p. 19.
- 218) T. N. Palmer, *Biochem. J.*, 124, 713 (1971).
- 219) 秦敬子, 秦正弘, 秦満天, 松田和雄: 澱粉科学, 30, 88 (1983).
- 220) 秦敬子, 秦正弘, 秦満天, 松田和雄: 澱粉科学, 30, 95 (1983).

- 221) S. Chiba, N. Hibi, K. Kanaya and T. Shimomura, *Agric. Biol. Chem.*, 41, 1245 (1977).
- 222) R. T. Foster and C. Niemann, *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 1552 (1951).
- 223) 廣海啓太郎, 高橋克宏, 安満善一郎, 小野宗三郎: 酵素化学シンポジウム, 18, 102 (1962).
- 224) K. Hiromi, Z. Hamauzu, K. Takahashi and S. Ono, *J. Biochem.*, 59, 411 (1966).
- 225) G. E. Briggs and J. B. S. Haldane, *Biochem. J.*, 19, 338 (1925).
- 226) 松井博和, 村田進, 千葉誠哉, 下村得治: 日本農芸化学会春季北海道支部大会 (1978).
- 227) N. Takahashi and T. Shimomura, *Agric. Biol. Chem.*, 37, 67 (1973).
- 228) E. C. Mayer and J. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 188 (1959).
- 229) E. H. Fischer and E. A. Stein, "The Enzymes," Vol. 4, 2nd Ed., ed. by P.D. Boyer, H. Lardy and K. Myrback, Academic Press, New York, 1960, p. 313.
- 230) D. E. Koshland, Jr., "The Enzymes," Vol 1, 2nd Ed., ed. by P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrback, Academic Press, New York, 1959, p. 330.
- 231) K. Nishizawa and Y. Hashimoto, "The Carbohydrate," Vol 2A, 2nd Ed., ed. by W. Pigman and D. Horton, Academic Press, New York, 1970, p.241.
- 232) 中村正三郎: 酵素化学シンポジウム, 16, 1 (1962).
- 233) K. Wallenfels and O.P. Malhotra, "Advances in Carbohydrate Chemistry," Vol 16, ed. by M. L. Wolfrom and R. S. Tipson, Academic Press, 1961, p. 239.
- 234) J. A. Thoma and D. E. Koshland, Jr., *J. Mol. Biol.*, 2, 169 (1960).
- 235) Y. Morita, F. Yagi, F. Aibara and H. Yamashita, *J. Biochem.*, 79, 591 (1976).
- 236) Y. Matsuura, M Kusunoki, W. Date, S. Harada, S. Bando, N. Tanaka and M. Kakudo, *J. Biochem.*, 86, 1773 (1979).
- 237) 松浦良樹: 化学, 38, 105 (1983).

- 238) Y. Kita, S. Sakaguchi, Y. Nitta and T. Watanabe, *J. Biochem.*, 92, 1499 (1982).
- 239) 新田康則 : 化学, 38, 177 (1983).
- 240) K. Hiromi, K. Takahashi, Z. Hamauzu and S. Ono, *J. Biochem.*, 59, 469 (1966).
- 241) J. T. Edsall, "Proteins, Amino Acids and Peptides," ed. by E. J. Cohn and J. T. Edsall, Hafner Publishing Co., New York, 1965, p. 444.
- 242) M. Dixon and E. C. Webb, "Enzymes," Longman Group Limited, London, 1979, p. 271.
- 243) R. Cecil and J. R. McPhee, *Biochem. J.*, 60, 496 (1955).
- 244) R. E. Benesch and R. Benesch, *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 5877 (1955).
- 245) B. F. Erlanger, S. M. Vratsanos, N. Wassermann and A. G. Cooper, *J. Biol. Chem.*, 240, 3447 (1965).
- 246) J. Tang, *J. Biol. Chem.*, 246, 4510 (1971).
- 247) K. Takahashi, F. Mizobe and W. J. Chang, *J. Biochem.*, 71, 161 (1972).
- 248) N. Hibi, S. Chiba and T. Shimomura, *Agric. Biol. Chem.*, 40, 1805 (1976).
- 249) S. Chiba, S. Sugawara, T. Shimomura and Y. Nakamura, *Agric. Biol. Chem.*, 26, 787 (1962).
- 250) K. Matsusaka, S. Chiba and T. Shimomura, *Agric. Biol. Chem.*, 41, 1917 (1977).
- 251) T. Y. Liu and Y. H. Chang, *J. Biol. Chem.*, 246, 2842 (1971).
- 252) G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70 (1959).
- 253) M. Dixon and E. C. Webb, "Enzymes," Longman Group Limited, London, 1979, p. 47.
- 254) 廣海啓太郎 : "入門酵素反応速度論" (小野宗三郎編), 共立出版, 1975, p. 58.
- 255) シンズ, マーニ : "タンパク質の化学修飾法" (石井信一監訳), 広川書店, 1973, p. 157.
- 256) K. L. Carraway and D. E. Koshland, Jr., "Methods in Enzymology," Vol 25, ed. by C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff, Academic Press, New York, 1972, p. 616.

- 257) W. B. Melchior, Jr. and D. Fahrney, *Biochemistry*, 9, 251 (1970).
- 258) D. J. Parker and W. S. Allison, *J. Biol. Chem.*, 244, 180 (1969).
- 259) T. Imagami and H. Hatano, *J. Biol. Chem.*, 244, 1176 (1969).
- 260) S. Pontremoli, B. Luppis, S. Traniello, M. Rippa and B. L. Horecker, *Arch. Biochem. Biophys.*, 112, 7 (1965).
- 261) H. R. Horton and D. E. Koshland, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 1126 (1965).
- 262) K. E. Neet and D. E. Koshland, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 56, 1606 (1966).
- 263) M. Sokolovsky, J. F. Riordan and B. L. Ballee, *Biochemistry*, 5, 3582 (1966).
- 264) 松井 博和, 染谷好明, 千葉誠哉 : 未発表データ
- 265) シンズ, フーニ : "タンパク質の化学修飾法", (石井信一監訳), 広川書店, 1973, p. 91.
- 266) W. J. Ray and D. E. Koshland, Jr., *J. Biol. Chem.*, 236, 1973 (1961).
- 267) J. Ovadi, S. Libor and P. Elödi, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, 2, 455 (1967).
- 268) Y. Burstein, K. A. Walsh and H. Neurath, *Biochemistry*, 13, 205 (1974).
- 269) A. Muhlrad, G. Hegyi and G. Tóth, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, 2, 19 (1967).
- 270) L. Weil, W. G. Gordon and A. R. Buchert, *Arch. Biochem. Biophys.*, 33, 90 (1951).
- 271) L. Weil and A. R. Buchert, *Arch. Biochem. Biophys.*, 34, 1 (1951).
- 272) L. Weil and T. S. Seibles, *Arch. Biochem. Biophys.*, 54, 368 (1955).
- 273) L. Weil, *Arch. Biochem. Biophys.*, 110, 57 (1965).
- 274) Y. Someya, H. Matsui and S. Chiba, *Agric. Biol. Chem.*, 48, 873 (1984).
- 275) L. K. Steinrauf, *Acta Cryst.*, 12, 77 (1959).
- 276) L. N. Johnson and D. C. Phillips, *Nature*, 206, 761 (1965).
- 277) C. C. F. Blake, L. N. Johnson, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips and V. R. Sarma, *Proc. Roy. Soc.*, B167, 378 (1967).

- 278) L. N. Johnson, D. C. Phillips and J. A. Rupley, *Brookhaven Symp. Biol.*, 21, 120 (1968).
- 279) I. Schechter and A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27, 157 (1967).
- 280) I. Schechter and A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 32, 898 (1968).
- 281) J. A. Thoma, C. Brothers and J. E. Spradin, *Biochemistry*, 9, 1763 (1970).
- 282) J. A. Thoma, G. V. K. Rao, C. Brothers, J. E. Spradin and L. H. Li, *J. Biol. Chem.*, 246, 5621 (1971).
- 283) J. A. Thoma, J. E. Spradin and S. Dygert, "The Enzymes," Vol. 5, 3rd Ed., ed. by P. D. Boyer, Academic Press, New York, 1971, p. 115.
- 284) K. Hiromi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40, 1 (1970).
- 285) K. Hiromi, "Proteins: Structure and Function," Vol. 2, ed. by M. Funatsu, K. Hiromi, K. Imahori, T. Murachi and K. Narita, Kodansha, Tokyo, 1972, p. 1.
- 286) K. Hiromi, Y. Nitta, C. Numata and S. Ono, *Biochim. Biophys. Acta*, 302, 362 (1973).
- 287) 松井 博和, 中津智史, 伊藤浩之, 千葉誠哉 : 日本農芸化学会春季北海道支部会 (1984).
- 288) 松井 博和, 関 靖彦, 千葉誠哉 : 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 544 (1984).
- 289) 小熊 哲也, 松井博和, 谷田昌稔, 高尾彰一, 千葉誠哉 : 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 427 (1982).
- 290) 喜多昭彦, 松井博和, 千葉誠哉, 大矢隆一, 酒井敏秀 : 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 545 (1984).
- 291) 喜多昭彦, 坂本悦弘, 松井博和, 千葉誠哉 : 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 487 (1983).
- 292) 廣海啓太郎 : "酵素の反応機構," (殿村雄治, 山崎勇夫, 中村隆雄編), 朝倉書店, 1971, p. 9.
- 293) A. Tanaka, Y. Fukuchi, M. Ohnishi, K. Hiromi, S. Aibara and Y. Morita, *Agric. Biol. Chem.*, 47, 573, (1983).

- 294) 竹田 保之 : 修士論文 (北海道大学農学部), (1983).
- 295) 矢沢 到 : 修士論文 (北海道大学農学部), (1980).
- 296) S. Takewaki, S. Chiba, A. Kimura, H. Matsui and Y. Koike, *Agric. Biol. Chem.*, 44, 731 (1980).
- 297) 木村 淳夫 : 博士論文 (北海道大学農学部), (1984).
- 298) 須賀-継, 菅沼俊彦, 大西正健, 廣海啓太郎, 千葉誠哉, 下村得治, 上野-秋, 山本武彦 : 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 37 (1976).
- 299) J. E. G. Barnett, *Biochem. J.*, 123, 607 (1971).
- 300) A. L. Minakova and M. E. Preobrazhenskaya, *Biochemistry (USSR)*, 48, 36 (1983).
- 301) 岡田 敏太郎 : 澱粉科学, 24, 120 (1977).
- 302) B. V. McCleary and M. A. Anderson, *Carbohydr. Res.*, 86, 77 (1980).
- 303) N. Inokuchi, T. Takahashi and M. Irie, *J. Biochem.*, 90, 1055 (1981).
- 304) M. Ohnishi, H. Kogai and K. Hiromi, *J. Biochem.*, 77, 695 (1975).
- 305) 小野寺秀一, 松井勝和, 千葉誠哉 : 日本農芸化学会東北北海道合同支部大会 (1984).
- 306) T. Imoto, L. N. Johnson, A. C. T. North, D. C. Phillips and J. A. Rupley, "The Enzyme," Vol. 7, 3rd Ed., ed. by P. D. Boyer, Academic Press, New York, 1972, p. 665.
- 307) 林 勝哉, 井本泰治 : "リッヂ-ム," 南江堂, 1974, p. 103.
- 308) 高橋健治 : "蛋白質酵素と生体制御," (村地芳, 浅田敏雄, 藤井節郎編), 東京大学出版会, 1973, p. 287.
- 309) S. M. Parsons and M. A. Raftery, *Biochemistry*, 11, 1623 (1972).
- 310) S. M. Parsons and M. A. Raftery, *Biochemistry*, 11, 1630 (1972).
- 311) S. M. Parsons and M. A. Raftery, *Biochemistry*, 11, 1633 (1972).
- 312) M. W. Hunkapiller, S. H. Smallcombe, D. R. Whitaker and J. H. Richards, *Biochemistry*, 12, 4732 (1973).
- 313) D. E. Schmidt, Jr. and F. H. Westheimer, *Biochemistry*, 10, 1249 (1971).
- 314) A. R. Fersht, *J. Mol. Biol.*, 64, 497 (1972).

- 315) L. Pentz and E. R. Thornton, *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 6931 (1967).
- 316) H. Susi, T. Zell and S. N. Timasheff, *Arch. Biochem. Biophys.*, 85, 437 (1959).
- 317) A. L. Fink and N. F. Goog, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 58, 126 (1974).
- 318) D. E. Koshland, Jr., "A Symposium on the Mechanism of Enzyme Action," ed. by W. D. McElroy and B. Glass, Johns Hopkins Press, New York, 1954, p. 608.
- 319) F. C. Mayer and J. Larner, *Biochim. Biophys. Acta*, 29, 465 (1958).
- 320) F. C. Mayer and J. Larner, *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 188 (1959).
- 321) M. Halpern and J. Leibowitz, *Biochim. Biophys. Acta*, 36, 29 (1959).
- 322) T. Shibaoka, K. Ishikura, K. Hiromi and T. Watanabe, *J. Biochem.*, 77, 1215 (1975).
- 323) T. Shibaoka, N. Suetsugu, K. Hiromi and S. Ono, *FEBS Letters*, 16, 33 (1971).
- 324) N. Suetsugu, K. Hiromi and S. Ono, *J. Biochem.*, 70, 595 (1971).
- 325) 末次信行: "入門酵素反応速度論," (小野京三郎編), 共立出版, 1975, p. 82.
- 326) A. D. French, V. G. Murphy, 吳沼圭二: 澱粉科学, 25, 171 (1978).
- 327) D. J. Manners and N. K. Mathson, *Carbohydr. Res.*, 90, 99 (1981).