マルトトリオースおよびマルトースを生成する 2 種放線菌アミラーゼについて

若生 勝雄*・高橋 親法*・橋本 誠二*・金 枝 純*

Studies on Maltotriose- and Maltose-forming Amylases from *Streptomyces*

Katsuo WAKO, Chikanori TAKAHASHI, Seiji HASHIMOTO
and Jun KANAEDA

Nikken Chemical Co., Ltd. (1-346, Kitabukuro, Omiya, Saitama, Japan)

Two amylases produced by *Streptomyces* were purified, and some properties were studied.

The one, named NA-468 amylase, was produced by a strain of *Streptomyces griseus* and formed about 55% of maltotriose from starch. NA-468 amylase was purified to almost 100-fold of the culture broth, and showed its maximal activity at 45°C and pH 5.6~6.0. Amylose was hydrolyzed to almost 100%, but waxy starch β -limit dextrin was not acted. It was found that NA-468 amylase cleaved the third glucosidic bond from the end of the maltooligosaccharide.

The other one, named NA-273 amylase, was produced by a strain of *Streptomyces praecox*, and formed more than 80% of maltose from starch. NA-273 amylase was purified to about 170-fold, and showed its maximal activity at 47°C and pH 6.0. Acting on amylose, soluble starch and waxy starch β -limit dextrin, the amylase produced a large amount of α -maltose. The amylase also hydrolyzed maltotriose to form maltose without the formation of glucose. The action mechanism of it was considered that glucose formed by hydrolysis was transferred to the non-reducing end of other maltotriose, and that maltotetraose formed was again hydrolyzed to maltose.

澱粉に作用して特定のオリゴ糖を生成するアミラーゼは、すでに数多く報告されており、グルコアミラーゼ、 β -アミラーゼ、*Pseudomonas stutzeri* のマルトテトラオース生成アミラーゼ¹⁾ および *Aerobacter aerogenes* のマルトヘキサオース生成アミラーゼ²⁾ が知られている。また上記アミラーゼとは作用型式が異なり、 α -アミラーゼに分類されると考えられるマルトース生成アミラーゼ³⁾ も報告されている。しかしながら、こうしたアミラーゼの数に必ずしも比例していないのが生成されるオリゴ糖の種類であり、現在までに知られているものはグルコース、マルトース、マルトテトラオースの4種類にすぎない。この中で工業的な規模で生産され、利用されている糖はグルコース、マルトースだけである。こうした

点から、利用および製造条件をより満足させる新規なアミラーゼが望まれるわけである。

放線菌のアミラーゼは、従来抗生物質生産菌ということもあってほとんど話題にならなかったが、筆者らはこうした点に着目し、土壌より分離した約10,000株の放線菌について調べた結果、次に述べるような2種類のアミラーゼを見出すことができた。その一つは澱粉に作用してマルトトリオースを特異的に生成するアミラーゼ(以下 NA-468 アミラーゼと称する)であり、他の一つは澱粉、マルトトリオースに作用し、ほとんどグルコースを生成せずに、80%以上のマルトースを生成する特異なアミラーゼ(以下 NA-273 アミラーゼと称する)である。NA-468 アミラーゼは、その生成糖の点で従来全く知られていなかったアミラーゼであり、その水解様式は *exo* 型アミラーゼの特徴によく類似するものであった。ま

* 日研化学株式会社大宮研究所 (330 埼玉県大宮市北袋町 1-346)

た, NA-273 アミラーゼはマルトトリオースを水解してほとんどマルトースのみを生成し, 転移または縮合作用の想定なしには理解できない水解パターンを示した. そこで, これらのアミラーゼを精製し, 酵素的性質, 作用について調べ, 若干の知見を得ることができた.

なお NA-273 アミラーゼの特異な作用は京都大学廣海啓太郎教授のもとで解明され, ここではその結果を用意させていただいた.

1. NA-468 アミラーゼの精製と諸性質

i) アミラーゼ生産菌の同定

最もアミラーゼ生産能の高い1菌株についてその菌学的諸性状を調べた結果, 孢子表面が平滑であり, 孢子形成菌糸が直線ないし波型である点, 気菌糸が黄色系である点, およびグルコース, フラクトース, マンニト等を利用し, シュークロース, ラフィノース, イノシット等を利用しない等の点が特徴的であり, これらを International Journal of Systematic Bacteriology, および S.A. Waksman 著 The Actinomyces を参照し, 本菌を *Streptomyces griseus* NA-468 株と命名した.

ii) アミラーゼの精製

Culture filtrate	vol. 500 ml, 174 units/ml
Acetone ppt.	acetone 0~55%, 0~5°C, 15 hr
CM-Sephadex	column 3.5×50 cm, 0~0.3 M NaCl 10 mM acetate buffer (pH 5.8)
CM-Sephadex	column 2.5×50 cm, 0~0.2 M NaCl
Freeze dry	
Sephadex G-100	column 2.6×100 10 mM acetate buffer (pH 5.8)

Fig. 1. Purification procedure for NA-468 amylase.

デキストリン, 大豆粉を主成分とする培地を用いて 27°C, 5 日間培養を行い, その濾液を粗酵素液として用いた.

精製の方法を Fig. 1 に示した. NA-468 アミラーゼは CM-Sephadex の再クロマトグラフィーにより, 混入している微量の α -アミラーゼおよびプルラン分解活性が除去され, Sephadex G-100 を用いたゲル濾過によって不純蛋白から分離された. Table 1 には精製の結果をまとめて示した. 図表に示した活性値は, すべて 1 時間当たり 1mg のマルトトリオースに相当する還元力を生成する, 酵素液 1 ml の持つ活性を 1 単位として表示してある.

NA-468 アミラーゼは精製の結果, 粗酵素から約 100 倍比活性が上昇し, 測定温度 40°C のとき, その値は 5,450 u/mg protein であった. またディスク電気泳動的に単一であった.

iii) 酵素的性質

反応の最適温度, pH はそれぞれ 45°C, pH 5.6~6.0 であった (Fig. 2, Fig. 3, 左側の曲線). また pH 安定領域は 4.5~5.5 にあり, 3.5~6.5 (37°C, 12 時間処理の条件下で) の間では, 最高活性値の 80% 以上の活性が残存

Fig. 2. pH-activity curve (left) and pH-stability curve (right) for NA-468 amylase.

Table 1. Purification scheme for NA-468 amylase.

Procedure	Total activity (u/ml)	Protein (mg)	Specific activity (u/mg protein)	Recovery (%)
Culture filtrate	87,000	1,560	56	100
Acetone ppt. (0-0.55 vol.)	63,000	334	189	72.4
CM-Sephadex-1	39,400	20.1	1,960	45.3
CM-Sephadex-2	24,700	7.4	3,340	28.4
Sephadex G-100	18,000	3.3	5,450	20.7

Fig. 3. Optimum reaction temperature (left) and thermostability (right) for NA-468 amylase.

Table 2. Relative reaction rates of NA-468 amylase on various substrates.

Substrates	Relative reaction rates
Soluble starch	100
Amylose (DP=20)	114
Waxy β -LD	0
Waxy starch	91.6
Oyster glycogen	62.6
Phytoglycogen	40.2
Pullulan	0
β -Cyclodextrin	0

Waxy β -LD: waxy starch β -limit dextrin. A mixture of 1 ml of 1% substrate and 1 ml of enzyme (11 u/ml) was incubated at 40°C, pH 5.8 for 20 min.

した。温度安定領域は pH 5.8, 20分処理した場合, 45°C 付近から急激に失活し, 55°C で完全に失活した (Fig. 2, Fig. 3, 右側の曲線)。

金属塩化物を 2 mM 添加し, アミラーゼ活性への影響を見た実験からは, Hg^{2+} で 100%, Cu^{+} , Zn^{2+} の場合で 50% 以上の阻害を受け, また Li^{+} がやや活性化するという結果が得られた。

iv) 基質特異性および分解率

各基質に対する反応の初速度を測定した結果, NA-468 アミラーゼはアミロース (DP=20) で最も高く, 分岐の多い基質ほど水解速度が低下する傾向を示した (Table 2)。またプルラン, β -サイクロデキストリンおよびワキシスターチ, グリコーゲン β -リミットデキストリン等には全く作用しなかった。

各基質に対する分解限度を還元力変化から求めた図を

Fig. 4. Hydrolysis of various substrates with NA-468 amylase.

Am, amylose (DP=20); SS, soluble starch; WS, waxy starch; OS, oyster glycogen; PG, phytoglycogen.

A mixture of 1 ml of 1% substrate and 1 ml of enzyme (110 u/ml) was incubated at 40°C, pH 5.8.

Fig. 5. Paper chromatogram of the reaction products from soluble starch attacked by NA-468 amylase.

Fig. 4 に示したが, 短鎖アミロースはほぼ 100% 水解され, 可溶性澱粉, ワキシスターチで 55%, 51%, またグリコーゲンの場合では 40% 以下の低い水解率を示した。

v) NA-468 アミラーゼの作用機構

可溶性澱粉を基質にして pH 5.6, 40°C で反応を行い, 経時的にスポットしたペーパークロマトグラムを Fig. 5

に示した。これからわかるように反応を通じて見られる生成糖はマルトトリオースだけであり、同様の結果はアミロースやワキシスターチ、グリコーゲンでも得られた。

そこでマルトオリゴ糖に作用した場合、どのような水

Fig. 6. Two-dimensional paper chromatogram of the reaction products from maltooligosaccharides attacked by NA-468 amylase.

Culture filtrate	vol. 1,000ml, 8.7 u/ml
(NH ₄) ₂ SO ₄ ppt.	0.2~0.6 S, 0~5°C
DEAE-Cellulose	column 3.5×60, 0~0.5M NaCl 10 mM Tris-maleate (pH 8.6)
DEAE-Sephadex A-50	column 3.0×50, 0~0.3M NaCl 10 mM Tris-maleate (pH 8.6)
Sephadex G-100(1)	column 2.6×100 10mM Tris-maleate (pH 6.0)
Sephadex G-100(2)	
Freeze dry	

Fig. 7. Purification procedure for NA-273 amylase.

解様式を示すかを知るために2次元ペーパークロマトグラフィーを行った(Fig. 6). この結果, NA-468 アミラーゼの最小基質はマルトテトラオースであり, それ以上のマルトオリゴ糖に対しては, 次のように末端から規則的にマルトトリオースを遊離することがわかった。

しかしマルトトリオースが還元末端, 非還元末端のいずれから切断され, 遊離してくるのか, ¹⁴C でラベルした場合の実験を行っていないので不明である。現在のところでは, 可溶性澱粉を基質にした場合の水解過程, 上記2次元クロマトグラフィーの水解様式, および先に述べた各種基質の分解限度等が *exo* 型である β -アミラーゼの場合に非常によく似ていることから, NA-468 アミラーゼは *exo* 型アミラーゼに属するのではないかと考えている。

2. NA-273 アミラーゼの精製と諸性質

i) アミラーゼ生産菌の同定

気菌糸が黄色系である点, 孢子表面が平滑であり, 孢子形成菌糸が直線ないし波型であるほか, 部分的にループ状や開放型ラセンも見られる点, および炭素源の同化性を調べた結果から本菌を *Streptomyces praecox* NA-273 株と命名した。

ii) アミラーゼの精製

澱粉, 大豆粉を主成分とする培地を用いて27°C, 3日間培養を行い, その濾液を粗酵素液とした。Fig. 7 に示した方法で精製を行ったが, 混在するセルラーゼ様活性およびブルラン分解活性は, DEAE-Cellulose, DEAE-Sephadex カラムで分別除去された。Sephadex G-100 カラムから溶出したアミラーゼは粗酵素液から約170倍精製され, 40°Cで測定した比活性は1,176u/mg proteinであった (Table 3)。表中の活性値は1mlの酵素を用いたとき, 1時間当り1mgのマルトースに相当する還元力を生成する酵素量を1単位として示した。精製酵素

Table 3. Purification scheme for NA-273 amylase.

Procedure	Activity(u/ml)	Protein(mg/ml)	Specific activity	Purification factor
Culture filtrate	8.7	1.27	6.85	1.0
DEAE-Cellulose	274.5	2.15	127	18.6
DEAE-Sephadex A-50	56.8	0.32	186	27.3
Sephadex G-100(1)	48.5	0.086	563	82.7
Sephadex G-100(2)	15.3	0.013	1,176	171.8

(specific activity: u/mg protein)

Fig. 8. pH-activity curve (left) and pH-stability curve (right) for NA-273 amylase.

Fig. 9. Optimum reaction temperature (left) and thermostability (right) for NA-273 amylase.

Table 4. Relative reaction rates of NA-273 amylase on various substrates.

Substrates	Relative reaction rates
Soluble starch	100
Amylose (DP=20)	93.2
Waxy starch	110
Oyster glycogen	107
Phytoglycogen	107
Waxy β -LD	100
OG β -LD	90.3
Pullulan	0
β -Cyclodextrin	0

Waxy β -LD: waxy starch β -limit dextrin. OG β -LD: oyster glycogen β -limit dextrin. A mixture of 1 ml of 1% substrate 1 ml of enzyme (17 u) was incubated at 40°C, pH 6.0 for 20 min.

はディスク電気泳動的に単一であった。

iii) 酵素的性質

反応の最適条件は pH 6.0 付近, 温度 47°C であった

(Fig. 8, Fig. 9, 曲線左側). また pH 安定領域は 6.0~8.0 にあり, 温度安定性の面では 50°C で約90%に低下し, 60°C で完全に失活した (Fig. 8, Fig. 9, 曲線右側).

また金属イオンの活性におよぼす影響を調べた結果, Hg^{2+} , Cu^{2+} によって最も大きな阻害を受け, Ag^+ , Zn^{2+} がこれについだ. 活性化を示す金属イオンはとくに見当らなかった.

iv) 基質特異性

各種の基質に作用させ, 反応の初速度を測定した結果を Table 4 に示した. NA-273 アミラーゼはプルラン, β -サイクロデキストリンには全く作用しなかったが, 分岐を持つ基質に対しては, 短鎖アミロース (DP=20) 以上の初速度を示した. また NA-468 アミラーゼと異なり, ワキシスターチ, カキグリコーゲンの β -リミットデキストリンに作用し, その初速度は可溶性澱粉と同等, ないしは幾分低下する程度であった. 総じて分岐多糖に対してより強い親和性を示した. また β -リミットデキストリンに作用する点から, NA-273 アミラーゼは *exo* 型アミラーゼではないと考えられた.

v) NA-273 アミラーゼの水解様式

可溶性澱粉に作用させた場合のペーパークロマトグラムを Fig. 10 に示したが, これからわかるように, 初期はマルトテトラオースを中心とするオリゴ糖を生成し, 後期に至ってマルトースを多量に蓄積するパターンであった. グルコースは微量であるが, 少量のマルトトリオースとともに他の分岐多糖の場合と同様に, 重合度 5~7 に相当する分岐オリゴ糖がわずかながら残存した.

Fig. 10. Paper chromatogram of the reaction products from soluble starch attacked by NA-273 amylase.

Fig. 11. Variation of optical rotation by the formation of α -maltose.

○—○, reaction mixture; ●—●, reaction mixture added alkaline.

Fig. 12. Hydrolysis of maltotriose with NA-273 amylase.

上記の結果は β -リミットデキストリンへの作用と同様、 α -アミラーゼ様の作用を示すものであった。そこで反応による生成マルトースのアノマー型を調べ、NA-273 アミラーゼは α -マルトースを生成することがわかった (Fig. 11)。図中上側の曲線はマルトトリオースを基質とした反応液の旋光度を示し、この反応液にアルカリを添加し、平衡に達した旋光度を測定したものが下側の曲線である。

以上の諸結果から、NA-273 アミラーゼは α -アミラーゼに属すると思われた。

vi) マルトトリオースに対する作用

NA-273 アミラーゼは澱粉等の多糖に作用した場合も生成するグルコースは非常に少ないが、マルトトリオースをほぼ 100% マルトースに変換する特異な作用を持っている。そこでこうした点について調べてみた。

マルトトリオースの水解をガスクロマトグラフィーで追跡した結果が Fig. 12 である。クロマトグラム上で定量しうるグルコースのピークは認められず、図に見られるようにマルトトリオースはほぼ 100% 分解され、マルトースのみを生成した。通常的水解では等モルのグルコースおよびマルトースを生成するが、これと異なる NA-273 アミラーゼの作用機構については菅沼、廣海らによって解明されたので、以下にその結果を引用させていただいた。

結果を要約すると次のようであった。1) マルトトリオースの濃度を変えることによって、マルトースおよびグルコースの生成比が変わり、 G_2/G_1 比は非常に希薄な溶液 (約 10 μ moles/ml) では 1 を示し、通常的水解のみを行い、そのときの切断点は 94:6 の比で非還元末端側のグルコシド結合であることが示された。2) さらに、濃度が上昇すると、水解と同時に生成したグルコースが未反応のマルトトリオース非還元末端に結合し、新たな基質であるマルトテトラオースを生成する反応が圧倒的な確率で行われるようになる。このためにグルコースは生成せず、マルトースのみが分解生成物として認められるという結果であった。これらの作用を模式的に示すと次のようであった。

▲

▲

(▲印は切断点, * は還元末端を示す)

以上の結果から、NA-273 アミラーゼは水解によって生じたグルコースを基質の非還元末端に結合させ、新たに生成した基質も同時にマルトースに水解する作用を持つ α -アミラーゼであることがわかった。

なお、NA-273 アミラーゼは先の演者でもある日高ら³⁾によって見出された *Streptomyces hygroscopicus* SF-1084 アミラーゼに非常によく類似しており、その作用上の明確な差異点を挙げることは非常に困難であるが、あえて挙げるとすれば、各基質から生成するグルコース量が少ないのではないかと考えられる点である。酵素的な性質は耐熱性等の面でかなり異なっている。

なお、NA-468 アミラーゼの各種基質に対する作用限度に関する Fig. 4 は、シンポジウムの後、再度実験を行い、不備な測定条件を改めて測定した結果を示してあります。訂正してお詫びいたします。

最後に両アミラーゼの研究に関し、終始ご指導いただ

いた農林省食品総合研究所貝沼圭二博士に、また NA-273 アミラーゼの作用機構を明らかにされた京都大学廣海啓太郎博士、菅沼俊彦氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) J. F. ROBYT and R. H. ACKERMAN, *Arch. Biochem. Biophys.*, **145**, 17(1971).
- 2) K. KAINUMA, K. WAKO, S. KOBAYASHI, A. NOGAMI and S. SUZUKI: *Biochim. Biophys. Acta*, **410**, 333(1975).
- 3) 日高秀昌, 吉田健二, 丹羽富造, 宮道慎二, 庄村喬, 小嶋吉久: 農化大会要旨集, p.86(1972).

【質問】 大阪市大理 山本

maltotriose 生成酵素で maltotetraose より glucose が, maltopentaose より maltose がそれぞれ生成されることはベークロで判りますが, その際生成された maltotriose に対し, glucose, maltose がいかにも少ないと思います。その間の定量関係はどうでしょうか。

【答】

定量的な関係はまだ調べておりません。

【質問】 食品総研 小林

G₃ 生成酵素についてですが, ヨウ素-澱粉反応はどうなっているのでしょうか。

【答】

それについては全く行っておりません。

【質問】 大阪市工研 岡田

G₃ forming enzyme の作用は, 末端から G₃ 単位で切断すると考えると非常に説明しやすい。しかし可溶性

澱粉への作用の場合, 60%は, β -アミラーゼに比べ切れすぎているように思える。 β -アミラーゼとの並行実験を行い, 本酵素の方が高く出るようであれば作用様式は考え直す必要があるように思う。

【答】

改めて実験を行ってみたいと思います。

【質問】 京大農 廣海

1) G₃ 生成酵素による生成物のアノマー型はどうでしょうか。

2) 同じ酵素でマルトオリゴ糖からの生成物の量比が G₃ に対して少なすぎるように思われますが, 単なる exo 型ではなく, G₂ 生成酵素の場合と同じような転移などの複雑な過程が含まれているような気がします。

【答】

アノマー型については調べておりません。またオリゴ糖の生成比についてはこれから調べてみたいと思います。

【質問】 長瀬産業 小巻

G₂ 生成酵素について, G₃ を加水分解し, 生成した G₁ が G₃ に転移し, G₄ になるということから, G₂ のみで G₁ の生成が見られない点が非常に興味がありますが, 転移反応によって G₁ 生成が認められない基質濃度はどのくらいでしょうか。

【答】 京大農 菅沼

G₃ 1% (18 mM) では G₂/G₁ 比が約80倍ぐらになり, 100 μ M ぐらになると G₂/G₁ 比が2以下になり, 約10 μ M ではほぼ完全に1になります。したがってかなりうすい基質濃度(1 mM 以下)でも転移の影響を本酵素は与えます。