放線菌 No. 280 株の生産するアミラーゼ・ インヒビターについて

上田誠之助*・木場洋次郎*・茶 圓 博 人*

Amylase Inhibitor Produced by *Streptomyces* sp. No. 280

Seinosuke UEDA, Yojiro Koba and Hiroto CHAEN

Department of Food Science and Technology, Faculty of
Agriculture, Kyushu University (Fukuoka 812, Japan)

We found that the new amylase inhibitor produced by *Streptomyces* sp. No. 280 strongly inhibited animal α -amylase, bacterial saccharogenic α -amylase, and fungal glucoamylase, but not pullulanase, nor plant β -amylase.

This amylase inhibitor can be separated by chromatography into four fractions (inhibitor A, B, B' and C) that were homogeneous by paper chromatography and paper electrophoresis.

These inhibitors acted not only on glucoamylase and α -amylase, but also on α -glucosidase, cycloamylose glucanotransferase, and phosphorylase. The amylase inhibitors A and B slightly activated yeast α -glucosidase.

These inhibitors contained both carbohydrates (mainly D-glucose) and amino acids; their molecular weights ranged from 1,000 to 3,000.

緒 言

天然のアミラーゼ・インヒビターとしては、従来、植物のもの¹⁾がよく知られており、大別するとタンパク質様と非タンパク質様(たとえば、タンニン酸様物質等)の二群になる。一般的には、タンパク質様のアミラーゼ・インヒビターは、 α -アミラーゼに対して特異的に作用し、非タンパク質様のインヒビターは、 α -アミラーゼのみならず種々の加水分解酵素に対しても阻害作用を示すようである。しかし、これらのインヒビターは、 α -アミラーゼの起源によって阻害作用が異なり、一般に動物性 α -アミラーゼに対し阻害作用を示し、植物および微生物の α -アミラーゼに対しては阻害作用は微弱か皆無である。

また近年、小麦のインヒビターについては、タンパク質化学的に性質の異なる2種のインヒビターの存在が報告²⁻⁴⁾され、その多様性がうかがわれる。

一方、微生物の生産するエンザイム・インヒビターとしては、プロテアーゼ・インヒビターがよく知られてお

り、数多くの報告がある。しかしながら、微生物起源のアミラーゼ・インヒビターに関しては余り知られていなかった。ところが、1970年に放線菌の生産する抗生物質“ノジリマイシン”⁵⁾が、アミラーゼ活性を阻害することがわかり、その後微生物起源のインヒビターについての報告⁶⁻¹¹⁾が相次いでいる。著者らは、土壌より分離した *Streptomyces flavochromogenes* に近似の放線菌 No. 280 株の生産するアミラーゼ・インヒビターが、これより前に知られていた上述の“ノジリマイシン”とは異なる新しいアミラーゼ・インヒビターであることを見出した¹²⁾。

本インヒビターは、イオン交換樹脂などを用いた精製により4種類のインヒビターに分離することができた。いずれのインヒビターも分子量 1,000~3,000 程度のグリコペプチドで、グルコースを還元末端としたアミノ糖を含むグルコース主体の糖部分と Lys, Asp, Gly, Glu, Ala, Thr などのアミノ酸から成るペプチド部分から成っているものと思われる。

ところで、今回は主として、本インヒビターの多様性とアミラーゼ以外の酵素に対する阻害作用¹³⁾などに関す

* 九州大学農学部(812 福岡市東区箱崎 6-10-1)

る知見を報告する。

実験方法

1) 培養方法

本アミラーゼ・インヒビターの生産菌である放線菌 No. 280 株は、*Streptomyces flavochromogenes* に近似の菌¹⁴⁾であり、可溶性澱粉 2%, NaNO_3 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3%, CaCO_3 0.8%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, 脱脂ダイズ 0.3% (pH 7.5) の培地を用い、ジャーファーメンターで培養すると、40°C では 20~25 時間でインヒビター活性は最高となり、その後も活性の低下はあまりみられない。

2) アミラーゼ・インヒビター活性の測定法

インヒビター溶液 0.2 ml (培養液等の場合は、前もって沸騰水中で 3 分間熱処理し、pH を 5.5 に調整したものを用いる) と、0.1 ml のグルコアミラーゼ溶液 (*Rhizopus* 属系、天野製薬製) と、0.7 ml の脱イオン水から成る混液を 40°C で 10 分間 インキュベートした後、その残存アミラーゼ活性を測定した。アミラーゼ活性は、2.5 ml の 1% 可溶性澱粉溶液と 0.5 ml の 0.2M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) および 0.5 ml の上記インヒビター添加アミラーゼ溶液から成る混液を 40°C で インキュベートし、15 分後にその混液から 1 ml を採り、マイクロベルトラン法¹⁵⁾で遊離してきた還元糖をグルコースとして定量した。この条件下で、反応液 1 ml、1 分間当り 0.1mg のグルコースを遊離しうるアミラーゼ活性を 1A. U. (Amylase Unit) とし、この 1A. U. を減少しうるインヒビター活性を 1I. U. (Inhibitory Unit) とした。

3) 酵素の調製法

ホスホリラーゼ [(1→4)- α -D-glucan: orthophosphate α -D-glucosyltransferase, EC 2.4.1.1] は、ポテトからの調製品 (大阪大学福井俊郎教授より分与)、カビの α -グルコシダーゼ [α -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.20] は、*Mucor javanicus* からの調製品 (岡山大学鈴木幸雄教授より分与)、うさぎ筋肉のホスホリラーゼ a および酵母の α -グルコシダーゼは、市販品 (Boehringer Mannheim 社および Sigma Chemical 社製)、Q-エンザイム [(1→4)- α -D-glucan: (1→4)- α -D-glucan 6- α [(1→4)- α -glucano] transferase, EC 2.4.1.18] はポテトから Bourne と Peat の方法¹⁶⁾による調製品、デキストラン・スクラーゼ [sucrose: (1→6)- α -D-glucan 6- α -glucosyltransferase, EC 2.4.1.5] は土屋らの方法^{17,18)}に従って *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 から精製した。また、シクロアミロース-グルカノ

トランスフェラーゼ [(1→4)- α -D-glucan 4- α [(1→4)- α -glucano]transferase(cycling), EC 2.4.1.19] の部分精製品は日本食品化工株式会社の中村信之氏より分与されたものである。

4) 酵素活性の測定法

ホスホリラーゼ活性は、可溶性澱粉より生成した α -D-グルコース-1-リン酸を中村らの方法¹⁹⁾により測定して求めた。 α -グルコシダーゼ活性は、マルトースより遊離してくるグルコースをグルコース・オキシダーゼ法²⁰⁾で定量して求めた。Q-エンザイムは、伊賀上らの方法²¹⁾に準じ、アミロース-ヨウ素複合体の形成を吸光度により測定した。デキストラン・スクラーゼの活性は、小林と松田の方法²²⁾に従い、スクロースから遊離してくるフラクトースを Somogyi-Nelson 法^{23,24)}で定量して求めた。またシクロアミロース-グルカノトランスフェラーゼの活性は、中村と堀越の方法²⁵⁾に準じ、糊精化法で測定した。

なお、各酵素の活性単位は、ホスホリラーゼ、 α -グルコシダーゼおよびデキストラン・スクラーゼについては、各条件下で 1 分間に $1\mu\text{mol}$ の生成物を生成できうる酵素量を 1 単位とした。

また Q-エンザイムとシクロアミロース-グルカノトランスフェラーゼは、アミロース-ヨウ素複合体の青色を前者については 1 分間に 1% の吸光度を減少しうる酵素量を、また後者については 10% 減少しうる酵素量をそれぞれ 1 単位とした。

5) インヒビターの物理的、化学的性質の検討

部分精製インヒビター (インヒビター B, B' および C を含む) につき、メタノール、エタノール、ブタノール、エーテルおよびアセトンに対する溶解性と、ニンヒドリン反応²⁶⁾による遊離アミノ基、Lowry 反応²⁷⁾によるタンパク質、カルバゾール硫酸反応²⁸⁾によるウロン酸、チオバルビツール酸反応²⁹⁾によるシアル酸、フェノール-硫酸反応³⁰⁾による全糖および Morgan-Elson 反応³¹⁾による N-アセチルアミノ糖の各反応を調べた。

その他、比旋光度は 1% 水溶液について、また赤外吸収スペクトルは KBr 錠剤法により測定した。

6) 中性糖のガスクロマトグラフィー

精製インヒビターの中、I-C につき常法どおり酸水分解後、イオン交換樹脂で処理した中性糖画分につき、岡らの方法³²⁾による糖の ANA (アルドニトリルアセート) 化を行い、日本電子製ガスクロマトグラフ GC-KFT 20 型により分析した。

結 果

1) インヒビターの分離

放線菌 No. 280 株の培養濾液を pH 7.5~8.0 に調整して、粉末活性炭を 5% (w/v) 加え、室温で約 2 時間攪拌した後、5°C に一夜静置した。吸引濾過により活性炭をブッフナー・ロート上に集め、充分に水洗後、60% エタノール (pH 3 に調整) を用いてインヒビターを溶離した。このエタノール溶液をエバポレーターにより減圧下、40°C で蒸発乾固した。これを脱イオン水で溶出し、インヒビター溶液とした。

2) Dowex 50W によるカラムクロマトグラフィー

上記のインヒビター溶液を Dowex 50W-X2 (100~200 メッシュ) の H⁺ 型カラムに供し、始めは脱イオン水、続いて 0.4M ピリジン-酢酸緩衝液 (pH 4.6) で展開した。その結果を図 1 に示した。インヒビターの検出は、フェノール-硫酸法により全糖の定量を行うことによった。この結果、インヒビターは完全に樹脂に吸着され、インヒビター活性のない非吸着性の糖類が除かれた。

上記の H⁺ 型樹脂から溶離されたインヒビター溶液は、エバポレーターによって減圧乾固し、これを 0.01M の塩酸に溶解してから、同じ Dowex 50W-X2 (200~400 メッシュ) のピリジン型カラム (0.02M ピリジン-酢酸緩衝液, pH 3.4 で平衡化) に供し、始めは上記緩衝液で、続いて上記緩衝液と 0.2M ピリジン-酢酸緩衝液 (pH 5.0) による直線型グラディエント溶出を行った。

図 2 はその結果であり、吸着しない画分 (インヒビター A, 以下 I-A と略称) と二つの吸着画分 (インヒビター B および C, 以下 I-B, I-C と略称) に分離された。I-B および I-C については、同様の操作で再クロマトグラフィーを行った。

3) Sephadex G-15 によるゲル濾過

Dowex 50W のピリジン型で分画された I-A, I-B および I-C をそれぞれ 0.1M の酢酸で平衡化した Sephadex G-15 のカラムに供した。図 3、図 4 および図 5 に I-A, I-B および I-C のカラムクロマトグラフィーの結果を示した。いずれもインヒビター活性と全糖のピークとに良好な一致がみられた。I-B はこのゲル濾過によって、さらに二つのピークに分れたので、溶出順にインヒビター B (I-B) およびインヒビター B' (I-B') とした。

4) ペーパークロマトグラフィーによる精製

Sephadex G-15 で分画された 4 種のインヒビターは、まだ単一とは認められないので、さらにペーパークロマ

Fig. 1. Column chromatography of crude inhibitor on Dowex 50W-X2(H⁺) resin.

—○—, inhibitory activity; —●—, total sugar; * 0.4M pyridine-acetic acid (pH 4.6).

Fig. 2. Column chromatography on Dowex 50W-X2 (pyridinium) resin.

- 1) 0.02M pyridine-acetic acid buffer (pH 3.4)
- 2) gradient from 0.02M (pH 3.4) to 0.2M (pH 5.0) of pyridine-acetic acid buffer

The symbols of I-A, I-B and I-C designate inhibitor A, inhibitor B and inhibitor C, respectively.

Fig. 3. Gel filtration of inhibitor A on Sephadex G-15 column.

Table 1. Purification procedures of amylase inhibitors.

Table 2. Purification of amylase inhibitors.

Step	Volume (ml)	Total activity (I. U.)	Specific activity ¹⁾	Recovery (%)
		$\times 10^3$	$\times 10^2$	
Active carbon	250 ²⁾	785	0.30	100
Dowex 50W (H ⁺)	300	760	6.0	97
Dowex 50W (pyridinium)				
Inhibitor A	30	167	7.4	21
" B	70	259	19.4	33
" C	70	184	21.9	23
Rechromatography				
Inhibitor B	90	145	20.4	19
" C	120	129	24.7	16
Sephadex G-15				
Inhibitor A	11	58.0	11.2	7.4
" B	11	43.4	14.0	5.5
" B'	8.0	64.0	24.6	8.2
" C	11	102	32.0	13
Paper chromatography				
Inhibitor A	1.0 ²⁾	32.6	13.9	4.2
" B	1.0 ²⁾	30.7	13.7	3.9
" B'	1.0 ²⁾	45.6	25.3	5.8
" C	1.2 ²⁾	66.8	32.7	8.5
Dowex 50W (H ⁺)				
Inhibitor A	8.0	30.9	14.4	3.9
" B	6.0	29.5	14.8	3.8
" B'	4.0	39.8	26.0	5.1
" C	4.0	58.4	33.0	7.4

¹⁾ I. U./mg total sugar ²⁾ Volume after concentration with evaporator

Fig. 4. Gel filtration of inhibitor B on Sephadex G-15 column.

The first peak was designated inhibitor B and the second one inhibitor B'.

Fig. 5. Gel filtration of inhibitor C on Sephadex G-15 column.

トグラフィーによる精製を行った。東洋濾紙 No. 50 にインヒビターを塗付し、ブタノール：ピリジン：水(12:8:5)の展開溶媒を用い、上昇法で2~3回展開した。インヒビター活性の存在する部分を切り取って脱イオン水で溶出した。これを再びDowex 50WのH⁺型カラムに供し、0.5Mピリジンで溶出した。エバポレーターで蒸発乾固後、脱イオン水に溶解したものを精製インヒビターとした。

以上の精製法の概略を表1に示した。また、各精製過程でのインヒビターの比活性、収率などを表2にまとめた。比活性はI-Cが一番高く、I-B', I-B, I-Aの順に低くなっている。

5) 精製インヒビターの純度

4種のインヒビターを前述のペーパークロマトグラフィーに準じて上昇法で3回展開し、風乾後、硝酸銀試薬改良法³³⁾によってインヒビターの検出を行った。図6にその結果を示した。I-Bは少し広がりを持っているが、他の3種のインヒビターは、ほぼ単一のスポットを与え

ている。

また、80%ギ酸：酢酸：水(5:15:80, pH 1.9)の緩衝液で約12 V/cm、4時間の濾紙電気泳動を行い、ペーパークロマトグラフィーと同様に硝酸銀でインヒビターの検出を行ったのが、図7である。4種のインヒビターはいずれも負極(-)側に移動しており、ほぼ単一のスポ

Fig. 6. Paper chromatography of inhibitors.

The symbols of G₁, G₂-G₆ designate D-glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose and maltohexaose, respectively.

Fig. 7. Paper electrophoresis of inhibitors.

Glc-NH₂, 2-amino-2-deoxy-D-glucose (standard).

Table 3. Some properties of amylase inhibitor.

Solubility; Soluble in methyl alcohol and water.
Insoluble in *n*-butyl alcohol, ethyl alcohol, ethyl ether, acetone, benzene and chloroform.

Color reaction; Ninhydrin (+)

Lowry (+)

Carbazol- H_2SO_4 (-)

Thiobarbituric acid (-)

Phenol- H_2SO_4 (+)

Morgan-Elson (-)

$[\alpha]_D^{22}$ ($c=1.0$ in H_2O); $+60^\circ$

Fig. 8. Infrared absorption spectrum of amylase inhibitor (KBr Tablet).

ットを与えている。なお、0.2% ニンヒドリンによる浸せき法³⁴⁾を行うと、硝酸銀で呈色するスポットにニンヒドリンの発色がみられ、インヒビター活性のスポットと一致した。

6) インヒビターの諸性質

インヒビターの各種溶媒に対する溶解性は表 3 に示したように、メタノールには易溶であるが、その他の溶媒にはほとんど溶解しない。

インヒビターの各種呈色反応の結果を同じく表 3 に示した。ニンヒドリン反応および Lowry 反応、またフェノール硫酸反応も陽性なことから、本インヒビターはアミノ酸と糖の両方を構成成分としていることが示唆された。またムコ多糖中に一般的に見出されるウロン酸、シアル酸あるいは N-アセチルヘキサミンは含まれていないようである。さらに 200~340nm の紫外部には特徴的な吸収はみられず、芳香族アミノ酸は含まれていないものと思われる。

図 8 には赤外吸収スペクトラムを示した。750, 840, 930 cm^{-1} の三つのピークは、糖質の α -1, 4-グルコシド

結合に起因する吸収と思われる。また、1,010 cm^{-1} のピークはカルボキシル基の C=O に、1540, 1630, 3400 cm^{-1} のピークはペプチド結合の C=O および N-H に起因する吸収と思われる。

7) 中性糖の分析

図 9 に I-C の中性糖の分析例を示した。この結果から I-C の中性糖としてはグルコースのみであることがわかった。また、他の 3 種のインヒビター (I-A, I-B, I-B') についても同様の結果を得た。さらに糖鎖の還元末端糖を水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) で還元後、水解物をペーパークロマトグラフィーで検討した結果、還元末端の糖もグルコースであることが判明した。

なお、アミノ糖およびアミノ酸組成についての詳細は

Fig. 9. Gas-liquid chromatogram of sugar components (aldonitrile acetate derivatives).

A; Standard sugars, 1) rhamnose 2) ribose 3) arabinose 4) xylose 5) mannose 6) glucose 7) galactose

B; Sugar in hydrolyzate of inhibitor C

Analytical condition: 10% LAC-4R-886 on chromosorb W/AW (100-120 mesh) packed in a glass column (1.6 mm $\times$ 50 cm), temperature 130-190°C (column) and 250°C (injection part and FID detector), carrier gas N_2 (1.0 kg/cm^2).

Table 4. Action of crude amylase inhibitor on some kinds of carbohydrate-hydrolase and two kinds of phosphorylase.

Enzyme	Substrate	pH	Inhibition*
Muscle phosphorylase a	Starch	6.8	+
Potato phosphorylase	Starch	6.8	+
<i>Mucor</i> α -glucosidase	Starch	5.3	+
	Maltose	5.3	+
Yeast α -glucosidase	Maltose	6.8	+
Q-enzyme	Amylose	7.0	-
Dextranucrase	Sucrose	5.8	-
Cycloamylose glucano-transferase	Amylose	7.0	+

* Each enzyme solution (0.5 ml, 10 units) was incubated with 0.5 ml of amylase inhibitor (1,500 I.U.) for 10 min at 30°C and the residual enzyme activity was assayed. Inhibitory ratings used were as follows: - (0 inhibition) or + (80-100% inhibition).

現在検討中である。

8) アミラーゼ以外の酵素に対する阻害作用

表4に示したように、用いた酵素はいずれも澱粉およびその関連物質に関係する酵素であり、ポテトおよび筋肉のホスホリラーゼ a, 酵母およびカビの α -グルコシダーゼ, および シクロアミロース-グルカノトランスフェラーゼの3種の酵素を阻害することがわかった。そこで、精製された4種のインヒビターについて、各々の阻害作用を検討した。

9) ホスホリラーゼ a, α -グルコシダーゼおよびシクロアミロース-グルカノトランスフェラーゼに対する阻害作用

筋肉のホスホリラーゼ a に対しては、1 ml の 2.5% 可溶性澱粉、0.5 ml のインヒビター溶液、0.5 ml の 1M リン酸緩衝液 (pH 6.8) および 1 ml のホスホリラーゼ溶液 (7.05 単位) から成る反応組成で阻害作用を検討した。図10にその結果を示した。I-A および I-B がホスホリラーゼ a を強く阻害するのに比べて、I-B' および I-C はきわめて阻害の弱いことがわかる。

酵母の α -グルコシダーゼに対しては、1 ml の 2.5% マルトース溶液、0.5 ml のインヒビター溶液、0.5 ml の 0.2M リン酸緩衝液 (pH 6.8) および 1 ml の α -グルコシダーゼ溶液の反応組成で阻害作用をみた。図11および図12がその結果であり、I-A と I-B は α -グルコシダーゼに対しては、阻害作用ではなく、逆に賦活作用を示した。また、I-B' と I-C の場合は、明らかに阻

Fig. 10. Inhibition of muscle phosphorylase a by amylase inhibitors.

The reaction mixture contained 2.5% soluble starch (1.0 ml), amylase inhibitor (0.5 ml), 1.0M phosphate buffer (pH 6.8, 0.5 ml) and phosphorylase a (1.0 ml, 7.05 units).

The symbols of I-A, I-B, I-B' and I-C designate inhibitor A, inhibitor B, inhibitor B' and inhibitor C, respectively.

Fig. 11. Inhibition of α -glucosidase of yeast by inhibitor A or inhibitor B.

The reaction mixture contained 2.5% maltose (1.0 ml), amylase inhibitor (0.5 ml), 0.2M phosphate buffer (pH 6.8, 0.5 ml) and α -glucosidase (1.0 ml, 0.5 units).

害作用を示していることがわかる。

シクロアミロース-グルカノトランスフェラーゼに対しては、0.3 ml の 0.05% アミロース-リン酸緩衝液 (pH 7.0), 0.1 ml のインヒビター溶液および 0.1 ml のシクロアミロース-グルカノトランスフェラーゼ溶液 (4.7 単位) の反応組成で阻害作用を検討したところ、図13のような結果を得た。4種のインヒビターは、い

Fig. 12. Inhibition of α -glucosidase of yeast by inhibitor B' of inhibitor C.

The conditions of this reaction were the same as described in the Fig. 11, except the activity of α -glucosidase was 1.5 units.

Fig. 13. Inhibition of cycloamylose glucanotransferase by amylase inhibitors.

The reaction mixture contained 0.05% amylose dissolved in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0, 0.3 ml), amylase inhibitor (0.1 ml) and cycloamylose glucanotransferase (0.1 ml, 4.7 units).

いずれも強くシクロアミロース-グルカノトランスフェラーゼの活性を阻害した。

11) インヒビターの阻害型式

本インヒビターで阻害を受ける酵素の中でグルコアミラーゼ、膵臓の α -アミラーゼおよびホスホリラーゼ a に対する 4 種のインヒビターの阻害型式を調べ、それらの作用機作の相違を比較検討した。

グルコアミラーゼに対しては、1 ml のグルコアミラーゼ溶液、1 ml の 0.05M クエン酸-0.1M リン酸第 2 ナトリウム緩衝液、1 ml のインヒビター溶液 および 5 ml の可溶性澱粉溶液から成る混液を 40°C で反応させ

Fig. 14. Effect of amylase inhibitors on the hydrolysis of soluble starch by glucoamylase.

S, concn. of soluble starch (mg/ml); V, concn. of liberated glucose (mg/ml, min); I-A, inhibitor A; I-B, inhibitor B; I-B', inhibitor B'; I-C, inhibitor C.

た。Lineweaver-Burk プロットにより阻害型式をみたのが図 14 である。I-A, I-B および I-C は非拮抗型 (non-competitive type) であるのに対し、I-B' のみは不拮抗型 (un-competitive type) であることがわかる。

膵臓の α -アミラーゼに対しては、0.5 ml の α -アミラーゼ溶液、0.5 ml の 1/15M リン酸緩衝液 (pH 6.8, 80mM の塩化ナトリウムを含む)、1 ml のインヒビター溶液および 2 ml の可溶性澱粉から成る混液を 40°C で反応させた。その結果を図 15 に示した。I-A, I-B' および I-C は非拮抗型であり、I-B のみが不拮抗型であった。

Fig. 15. Effect of amylase inhibitors on the hydrolysis of soluble starch by hog pancreas α -amylase.

S, concn. of soluble starch (mg/ml); V, concn. of liberated glucose (mg/ml, min); I-A, inhibitor A; I-B, inhibitor B; I-B', inhibitor B'; I-C, inhibitor C.

Fig. 16. Effect of amylase inhibitors on the degradation of soluble starch by muscle phosphorylase a.

S, concn. of starch (mg/ml); V, concn. of liberated G-1-P ($\mu\text{mol/ml, min}$).

Fig. 17. Effect of amylase inhibitors on the degradation of soluble starch by muscle phosphorylase a.

S, concn. of starch (mg/ml); V, concn. of liberated G-1-P ($\mu\text{mol/ml, min}$).

Table 5. Kinetic constants for glucoamylase, hog pancreas α -amylase and muscle phosphorylase a.

Inhibitor	K_i (mg as glucose/ml)*		
	Glucoamylase	α -Amylase	Phosphorylase a
A	1.43×10^{-3}	1.10×10^{-3}	2.10×10^{-2}
B	2.00×10^{-3}	4.07×10^{-3}	2.76×10^{-3}
B'	5.02×10^{-4}	1.01×10^{-2}	—
C	5.00×10^{-4}	3.18×10^{-3}	—

* The concentrations of all inhibitors were expressed conveniently as that of glucose measured by phenolsulfuric acid's method.

また、ホスホリラーゼ a に対しては、1 ml の酵素液、0.5 ml の 1M リン酸緩衝液 (pH 6.8) 0.5 ml のインヒビター溶液および 1 ml の可溶性澱粉から成る混液を 30°C で反応させた。その結果を図 16 および図 17 に示した。I-A と I-B は不拮抗型であることがわかる。I-B' と I-C は阻害作用が弱くはっきりしないが、同様に不拮抗型の阻害と思われる。

表 5 には、上記のグラフから算出した阻害定数 K_i の値をまとめた。

考 察

放線菌 No. 280 株の生産するアミラーゼ・インヒビターは、強酸性陽イオン交換樹脂である Dowex 50W の H^+ 型には完全に吸着されるが、同じ樹脂のピリジン型には I-A は吸着されない。I-B, I-B' および I-C はピリジン型にも吸着され、I-B, I-B', I-C の順に溶出されることから、I-C が 4 種のインヒビター中では一番塩基性の高い物質と思われる。またゲル濾過の結果から、I-A および I-B が分子量約 3,000、I-C が約 2,000、I-B' が I-C よりわずかに大と思われる。

緒言にも述べたように、小麦のアミラーゼ・インヒビターには多様性が知られており、電気泳動的には移動度が異なるが、分子量や阻害作用はほぼ等しい少なくとも 2 種類のインヒビターが存在する²⁻⁴⁾。

一方、微生物のインヒビターについてはまだ見聞も少なく、このようなインヒビターの多様性に関する報告はこれが初めてであろう。

またアミラーゼ・インヒビターの構造に関しては、植物のインヒビターではタンニン様物質^{35,36)}、タンパク質様物質³⁷⁻⁴¹⁾などの報告があるが、これらの詳細についてはまだ不明なものが多い。わずかに小麦のタンパク質様

インヒビターについてのアミノ酸組成⁴²⁾が知られている程度である。

微生物のアミラーゼ・インヒビターについて構造の明らかになっているのは、丹羽らの報告⁵⁾による 5-アミノ-5-デオキシ-D-グルコピラノースと Frommer ら¹⁰⁾の報告によるアミノ糖誘導体の 2 例のみである。著者らのインヒビターは、ペプチドを含む点上記二つのインヒビターとは異なっている。しかしながら、近年報告の相次いでいる放線菌起源のアミラーゼ・インヒビターをみると、牛腸⁷⁾のインヒビターはグルコアミラーゼによく作用するオリゴ糖、村尾ら^{39,43)}のインヒビターは動植物、微生物の α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼに作用するアミノ糖様物質を含むグルコース主体のオリゴ糖、犬飼⁸⁾は、動物の α -アミラーゼのみを阻害するペプチド、大村¹¹⁾は動物、微生物の α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼに作用するアミノ糖様物質を含むオリゴ糖と報告されており、ペプチド様インヒビターを別にすれば、それらの阻害作用や構造に共通したものが多くに思われる。著者らのインヒビターも、糖部分については、アミノ糖様物質を含むグルコース主体のオリゴ糖とみられ、上記のインヒビター類と類似している。

アミラーゼ・インヒビターの多機能性については、植物では前述のタンニン様インヒビター³⁶⁾が動植物および微生物の α -アミラーゼ以外にも ペクチンメチルエステラーゼなどを阻害すると報告されている³⁶⁾。

一方、微生物の場合はこれも前述の“ノジリマイシン”⁵⁾が、 α -アミラーゼのみならずグルコシダーゼをも阻害することが知られている。著者らのインヒビターについてもこのような多機能性がみられ、ホスホリラーゼ、 α -グルコシダーゼ、シクロアミロース-グルカノトランスフェラーゼをも阻害することがわかった。しかも、分離された 4 種類のインヒビター (I-A, I-B, I-B', I-C) が、これらの酵素に対して異なった作用を示している。つまり、I-A および I-B はホスホリラーゼ a を強く阻害するが、 α -グルコシダーゼは逆に賦活化している。一方、I-B' および I-C はホスホリラーゼ a に対する阻害は弱い、 α -グルコシダーゼに対しては明らかに阻害している。なお、アミラーゼ・インヒビターによる α -グルコシダーゼの賦活作用については、他には未だ報告をみないようである。

上述のように、I-A と I-B, I-B' と I-C は種々のアミラーゼに対して同じような作用を示すが、I-A と I-B は膵臓の α -アミラーゼに対する阻害型式が異なり、(I-A は非拮抗型、I-B は拮抗型)、I-B' と I-C はグ

ルコアミラーゼに対して I-B' は拮抗型、I-C は非拮抗型と異なっている。このように 4 種類のインヒビターが相互に異なる物質であることは、阻害定数 (K_i) が互いに異なることからわかる。

微生物起源のインヒビターのアミラーゼに対する阻害作用は、前述のようにいずれも放線菌起源であり、その多くがアミノ糖を含むグルコース主体のオリゴ糖を主成分としていることから考えると、著者らのインヒビターも、アミラーゼに対する阻害作用は糖部分に負うところが大きいと思われる。しかしながら、本インヒビターは、アミラーゼ以外の酵素にも阻害作用を示すなどの他の放線菌のインヒビターにはみられない特異的な性質を有しており、おそらくインヒビターのペプチド部分がこの特性に関与しているのであろうと思われる。

ホスホリラーゼ、 α -グルコシダーゼおよびシクロアミロース-グルカノトランスフェラーゼを分与していただきました大阪大学福井俊郎教授、岡山大学鈴木幸雄教授、および日本食品化工株式会社中村信之氏に深謝いたします。また、ガスクロマトグラフィーによる糖の分析をしていただきました広島大学岡智教授に深謝いたします。

文 献

- 1) J. J. MARSHALL: *A. C. S. Symp. Ser.*, **15**, 244 (1975).
- 2) R. SHANKIN and Y. BIRK: *Biochim. Biophys. Acta*, **221**, 502 (1970).
- 3) G. SODINI, V. SILANO, M. De AGAZIO, F. POCCHIARI, L. TENTORI and G. VIVALDI: *Phytochemistry*, **9**, 1167 (1970).
- 4) R. M. SAUNDERS and J. A. LANG: *ibid.*, **12**, 1237 (1973).
- 5) T. NIWA, S. INOUE, T. TSURUOKA, Y. KOAZE and T. NIIDA: *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 966 (1970).
- 6) S. UEDA and Y. KOBAYASHI: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2025 (1973).
- 7) 牛腸 忠, 上田清基: 醸工大会講演要旨集, **49**, 116 (1974).
- 8) 犬飼忠彦, 後藤 寛, 横江正明: 日農化大会講演要旨集, **50**, 143 (1975).
- 9) S. MURAO and K. OHYAMA: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 2271 (1975).
- 10) D. SCHMIDT, W. FROMMER, B. JUNGE, L. MÜLLER, W. WINGENDER and E. TRUSCHKE: *Naturwissenschaften*, **64**, 535 (1977).
- 11) 並木信重郎, 神郡邦男, 長手尊俊, 杉田和彦, 大村貞文, 田中一郎: 日農化大会講演要旨集, **53**, 299 (1978).

- 12) 上田誠之助, 木場洋次郎: アミラーゼ・シンポジウム, **7**, 37(1972).
 - 13) S. UEDA, Y. KOBAYASHI and H. CHAEN: *Carbohydr. Res.*, **61**, 253(1978).
 - 14) M. YAGISAWA, K. KATO, Y. KOBAYASHI and S. UEDA: *J. Ferment. Technol.*, **50**, 572(1972).
 - 15) 大幸勇吉他: 「化学実験学第2部」(天然物取扱法Ⅲ), 河出書房, p. 177(1942).
 - 16) E. J. BOURNE and S. PEAT: *J. Chem. Soc.*, **1945**, 877.
 - 17) H. M. TSUCHIYA, H. J. KOEPEL, J. CORMAN, G. BRYANT, V. H. FEGER and R. W. JACKSON: *J. Bacteriol.*, **64**, 52(1952).
 - 18) H. J. KOEPEL, H. M. TSUCHIYA, N. N. HELLMAN, A. KAZENKO, C. A. HOFFMAN, E. S. SHARPE and R. W. JACKSON: *J. Biol. Chem.*, **200**, 793(1950).
 - 19) 中村道徳, 山崎鏡次, 丸尾文治: 農化, **24**, 197(1950).
 - 20) N. M. PAPADOPOULOS and W. C. HESS: *Arch. Biochem. Biophys.*, **88**, 167(1960).
 - 21) I. IGAE: *Agric. Biol. Chem.*, **26**, 424(1963).
 - 22) M. KOBAYASHI and K. MATSUDA: *Biochim. Biophys. Acta*, **370**, 441(1974).
 - 23) N. NELSON: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375(1944).
 - 24) M. SOMOGYI: *ibid.*, **160**, 69(1945).
 - 25) N. NAKAMURA and K. HORIKOSHI: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 753(1976).
 - 26) E. W. YEMM and E. C. COCKING: *Analyst (London)*, **80**, 209(1955).
 - 27) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951).
 - 28) T. BITTER and H. MUIR: *Anal. Biochem.*, **4**, 330(1962).
 - 29) L. WARREN: *J. Biol. Chem.*, **234**, 1971(1959).
 - 30) M. DUBOIS, K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. REBERS and F. SMITH: *Anal. Chem.*, **28**, 350(1956).
 - 31) J. L. REISSIG, J. L. STROMINGER and L. F. LELOIR: *J. Biol. Chem.*, **217**, 959(1955).
 - 32) 岡智, 佐藤信: 農化, **50**, 455(1976).
 - 33) W. E. TREVELYAN, D. P. PROCTER and J. S. HARRISON: *Nature*, **166**, 444(1950).
 - 34) 蛋白質・核酸・酵素編集部: 「タンパク質実験法(2)」, 共立出版, p. 84(1968).
 - 35) B. S. MILLER and E. KNEEN: *Arch. Biochem.*, **15**, 251(1947).
 - 36) D. H. STRUMEYER and M. J. MALIN: *Biochim. Biophys. Acta*, **184**, 643(1969).
 - 37) E. KNEEN and R. M. SANDSTEDT: *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 1247(1943).
 - 38) R. SHAINKIN and Y. BIRK: *Biochim. Biophys. Acta*, **221**, 502(1970).
 - 39) V. SILANO, F. POCCHIARI and D. D. KASARDA: *Biochim. Biophys. Acta*, **317**, 139(1973).
 - 40) R. M. SAUNDERS and J. A. LANG: *Phytochemistry*, **12**, 1237(1973).
 - 41) D. H. STRUMEYER: *Nutr. Rep. Int.*, **5**, 45(1972).
 - 42) V. BUONOCORE, T. PETRUCCI and V. SILANO: *Phytochemistry*, **16**, 811(1976).
 - 43) S. MURAO and K. OHYAMA: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 919(1977).
- 【質問】** Howard Haghess Med. Inst.
J. J. Marshall
- I am interested in knowing whether both the carbohydrate moiety and the peptide in your inhibitors are necessary for inhibitory activity. For example, if the peptide is degraded enzymically is inhibitory activity lost?
- 【答】**
- We think that both the carbohydrate moiety and the peptide are necessary for inhibitory activity. It seems reasonable to conclude that the carbohydrate is mainly necessary for their inhibitory activity, and the peptide may determine the properties in their activity toward different carbohydrate hydrolases.
- 【質問】** 食品総研 小林
- 1) cyclodextrin glucanotransferase の origin は何でしょうか(*B. macerans* ですか)。
 - 2) この酵素は各種の作用を示すわけですが, assay はどのようにしておられますか (もしかしたら, ある種の作用のみを阻害しているとも考えられますが)。
- 【答】**
- 1) この酵素は, *Bacillus macerans* 起源のものと思います。
 - 2) α -アミラーゼ活性のフリーな標品ですので, 中村と堀越の方法(文献の25)に従って糊精化法で測定しました。
- 【質問】** 東大農 中村
- 糖部分とペプチド部分の結合様式はお調べでしょうか。すなわち, N-グリコシドでしょうか。O-グリコシドでしょうか。これに関連してペプチド部分のスレオニン, セリン, アスパラギンの含量はどうでしょうか。
- 【答】**
- スレオニン, セリンについては, いずれのインヒビターにも1モルずつ含まれておりますので, これらが糖と

の結合に関与しているのではないかと推察しております。

【質問】 阪大理 池中

菌体内でこのようなインヒビターが合成されているのですか。あるいは菌体外にアミノ糖を放出したのち、この菌の α -amylase で transfer されてできるのでしょうか。

もし菌体内で大部分のこのようなインヒビターが生成されるのでしたら澱粉様 glucose(1-4) の多糖を合成していることになりますが？

【答】

今のところは、菌体内にもインヒビターが若干検出されますので、菌体内で合成されるのではないかと考えておりますが、今後検討したいと思います。

【質問】 神大医、臨検技師学校 高橋

- 1) この物質の M. W. はどのくらいでしょうか？
- 2) muscle の phosphorylase a の阻害機構に phosphatase 作用が考えられないでしょうか？
- 3) この菌における inhibitor を合成、分泌する生理的意義について先生のお考えをきかせてください。

【答】

- 1) インヒビター A と B は、ほぼ等しい分子量で約 3,000, B' と C もほぼ等しく約 2,000 と考えております。
- 2) その点につきましては、今後検討したいと思います。
- 3) よくはわかりませんが、何らかのアミラーゼに関連した制御作用に関係があるのかもしれないと思っております。