放線菌の生産するアミラーゼ阻害剤

村尾沢夫*・大山邦夫*・村井英継*
 後藤章*・松井良博*・福原健一*
 宮田茂一*・住田光夫*・荒井基夫*

Amylase Inhibitors from *Streptomyces* Species

Sawao MURAO, Kunio OHYAMA, Hidetsugu MURAI, Akira GOTOO,
 Yoshihiro MATSUI, Kenichi FUKUHARA, Shigekazu MIYATA,
 Mitsuo SUMIDA and Motoo ARAI

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,
 University of Osaka Prefecture (Sakai, Osaka 591, Japan)

Three kinds of amylase inhibitor (S-AI, S-GI and Haim) were obtained from the culture filtrate of *Streptomyces* sp. S-AI was produced by *St. diastaticus* subsp. *amylostaticus* and inhibited glucoamylase and various α -amylases. S-GI consisted of 6 moles of glucose and 1 mole of unknown substances. The structure of S-GI was discussed. S-GI was a specific inhibitor for exo-type glucanase and was produced by *St. lavendulae*. S-GI inhibited animal invertase, but did not inhibit microbial invertase. Haim was a proteineous inhibitor and produced by *St. griseosporus*. Haim inhibited specifically animal α -amylases.

近年、いろいろの酵素阻害剤の研究が活発となっている。これらの阻害剤は、酵素の活性部位の解明等の酵素化学への寄与、あるいは病気の診断、治療薬、不溶化による酵素精製等種々の応用も考えられ、興味ある研究対象である。著者らは微生物起源のアミラーゼ阻害剤を目的として研究を進めているが、その中で以下3種のアミラーゼ阻害剤の単離、諸性質について報告するとともに、他の研究者によって明らかにされている各種のアミラーゼ阻害剤群と対比してみたい。

1. S-AI

細菌液化型アミラーゼ (BLA) を阻害する物質を生産する菌株の検索を行い、目的にかなう一菌株を分離した。本菌の分類学的位置を検討した結果、本菌は *Streptomyces diastaticus* subsp. *amylostaticus* と同定された。本菌の生産する阻害剤を S-AI (*Streptomyces* Amylase Inhibitor の頭文字) と命名した。

1) S-AI の生産、精製

本菌を corn starch 4%, soy bean flake extract 2% に塩類を含む培地で 30°C, 3日間振盪培養すると、S-AI は最高に生産されその生産量は、培養液 1 l 当り 0.6~1.0 g に達する。この培地上液を用い、Fig. 1 に示す方法で S-AI の精製を行った。すなわち、培養上液に活性炭を加え、S-AI を吸着せしめた後、活性炭を集め、pH 10.5, 80°C にて充分洗浄する。ついで pH 3 で同様の加熱洗浄を行った後、60% エタノールで S-AI を溶出させる。エタノール溶液を蒸発乾固させ、S-AI を水に溶解し、Dowex 50W×2(H型) カラムにのせ、S-AI を吸着せしめる。S-AI を 0.5M ピリジン緩衝液で溶出させる。溶出液を蒸発乾固させ 0.2M ギ酸-NH₄ 緩衝液 (pH 3.1) に溶解し、同緩衝液で平衡化した Dowex 50W×2(NH₄ 型) にのせ同緩衝液でカラムを洗う。阻害活性はカラムを素通りする画分 (F₁) とカラムに吸着して、2M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.1) で溶出する画分 (F₂) に分れた。この F₁ を以下の精製に用いた (F₂ は F₁ と各種アミラーゼに対する阻害スペクトラム

* 大阪府立大学農学部(591 堺市百舌鳥梅町 4 丁 804)

Fig. 1. Purification procedure of S-AI.

Fig. 2. Gel filtration of EI-complex on Sephadex G-75 column.

S-AI was incubated with BLA at 37°C for 1 hr and then the incubation mixture was applied on a Sephadex G-75 column (5×100 cm), previously equilibrated with 50 mM acetate buffer, pH 5.5 and eluted with the same buffer. ○, S-AI activity; ●, total sugar; ◐, protein (O.D. at 280 nm).

が類似しており、わずかに、カラムに対する吸着性が異なっているのみである。現在、このものの単離を試みている。ついで F₁ を Sephadex G-25 のカラムでゲル濾過後、BLA を加え、EI 複合体を形成せしめ、Sephadex G-75 のカラムにて複合体を分離する。カラムの溶出パターンを Fig. 2 に示す。最初のピークは複合体であり、次のピークは複合体形成にあずからなかった S-AI および不純物である。本操作は S-AI がアミラーゼ阻害剤である特異性を利用した精製法であり、S-AI 精製過程での大きな特徴といえる。複合体画分を集め pH 1.8, 37°C, 15 時間処理して、BLA を失活させ、S-AI を遊離させる。pH を 5 にもどし、失活 BLA の沈殿を遠心除去し、S-AI 溶液を得た。これを先のごとく Dowex 50W×2 カラムに吸着させ、溶出させた後、Sephadex G-25 カラムでゲル濾過を行い、精製 S-AI を得た。収量は培養液 1 l 当り約 12mg であった。精製 S-AI は Silica gel を用いた TLC で単一と認められた (*R_f*, 0.065~0.095, ethyl acetate : acetic acid : water = 1.8 : 1.0 : 1.2; *R_f*, 0.28~0.34, *n*-butanol : dimethyl sulfoxide : water = 2 : 1 : 1; *R_f*, 0.39~0.43, ethyl acetate : methanol : water = 37 : 40 : 23)。

ロ) 精製 S-AI の性質

S-AI の各種 glucosidic hydrolase に対する作用を Table 1 に示す。S-AI は動植物起源、微生物起源のすべての α-アミラーゼとグルコアミラーゼにのみ特異的に作用しアミラーゼ以外の各種の glucoside hydrolase に対しては阻害作用を示さなかった。なお、β-アミラーゼは後で述べるが、S-AI によって阻害作用を受けず、逆に S-AI を分解する。S-AI の一般的性質を Table 2 にまとめて示す。S-AI の分子量は約 1,500 で熱、酸、アルカリに安定であり、たとえば pH 3.5~10 では 100°C, 30 分の処理でもまったく失活しない。S-AI は糖の呈色反応が陽性であることから、糖が構成成分として含まれることが明らかである。

ハ) S-AI の化学構造

S-AI を 2N トリフロロ酢酸で 100°C, 2 時間加水分解後、分解物を薄層クロマト (TLC) 分析したものが Fig. 3 である。二つのスポットが認められ、一つはグルコースであったが、もう一つは既知の中性糖、アミノ糖とは一致せず、新規物質と予想され、このものを S-AI-X と命名した。グルコース含量を各種の測定法で調べたところ、約 80% であった。S-AI の分子量が 1,500 であることを考慮すると、S-AI 1 モル中に約 6 モルのグルコースが存在すると予想される。また S-AI-X の分

Table 1. Effect of S-AI on various glucoside hydrolases.

A half ml of each enzyme solution was incubated with 0.5 ml of S-AI solution (100 μ g/ml) at 37°C for 10 min and then the residual activity was assayed.

Inhibitory ratings used were as follows: +, 80–100%; –, 0% inhibition of enzyme activity.

Enzyme (Origin)	pH	Inhibition
α -Amylase		
Bacterial liquefying	5.5	+
Bacterial saccharifying	5.5	+
Taka-amylase A	5.5	+
<i>Asp. niger</i> , acid-stable	5.5	+
<i>Asp. niger</i> , acid-unstable	5.5	+
Malt	5.5	+
Saliva	7.0	+
Hog pancreas	7.0	+
β -Amylase		
Wheat	5.5	–
Sweet potato	5.5	–
Glucoamylase		
<i>Rhizopus niveus</i>	5.5	+
Pullulanase		
<i>Aerobacter aerogenes</i>	5.5	–
α -Glucosidase		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7.0	–
Dextranase		
<i>Penicillium</i> sp.	5.5	–
Cellulase		
<i>Trichoderma</i> sp.	4.5	–
Laminarinase		
<i>Arthrobacter luteus</i>	7.0	–
β -Glucosidase		
Almond	5.5	–
Invertase		
Rabbit	6.0	–

子量は約 400 と予想される。S-AI を NaBH_4 で処理後、3% 塩酸メタノールでメタノリシスを行い、常法どおりトリメチルシリル化 (TMS) してガスクロマト (GLC) 分析を行うとグルシトールが検出され、S-AI の還元末端基はグルコースであることが明らかとなった。一方、S-AI を NaIO_4 で酸化し、 NaBH_4 で還元し、メタノリシス、TMS し、GLC 分析を行うとグリセロールとエリスリトールが検出され、その比は約 1:5 であった。このことは 1 $\rightarrow$ 4 glucoside 結合の存在を示している。

Table 2. Some properties of S-AI.

Elementary analysis: C = 42.26(%)

H = 6.13(%)

N = 0.98(%)

O = 45.36(%)

$[\alpha]_D^{20}$ (c=1.0, in water): +163–164°

UV: No maximum at 210–370 nm

IR spectrum: 755, 857, 938 cm^{-1}

Color reaction: Phenol sulfric acid (+)

Anthrone (+)

Somogyi-Nelson (+)

Ninhydrin (+)

Morgan-Elson (+)

Soluble in pyridine, acetic acid, dimethyl sulfoxide and water

Insoluble in ethyl ether, benzene, chloroform and *n*-butanol

Stable at 100°C for 30 min at pH between 3.0 and 10.5

Molecular weight: 1,500 (Sephadex G-15)

Fig. 3. Thin Layer chromatogram of the acid hydrolyzate of S-AI.

S-AI was hydrolyzed with 2N TFA at 100°C for 2 hr and the hydrolyzate was analyzed by TLC. Support, Silica gel plate (Kiesel Gel 60); Solvent system, ethyl acetate: acetic acid: water = 18:10:12; Detection, 50% sulfric acid; Standard substances, I; glucose, II; mannose, III; galactose, IV; glucosamine.

さらに S-AI を箱守法でメチル化し、メチル化物を H_2SO_4 で分解し、分解物を alditol acetate に変換し、GLC 分析を行うと 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-glucitol と 1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl glucitol が約 1:5 の割合で検出された。これらの事実は、S-AI 中のグルコース残基のすべてが 1→4 結合であることを示している。先にも述べたが、S-AI は β -アミラーゼで分解され、BLA に対する阻害活性を失う。 β -アミラーゼによる S-AI の分解過程を TLC 分析したものが、Fig. 4 である。すなわち、S-AI は最終的に FI と FII に分解される。FI はその R_f およびメチル化分析によりマルトースと同定された。一方、FII はグルコース 2 モルと S-AI-X 1 モルとから構成されていた。FII をメチル化分析を行うと 1 モルの 2,3,4,6-tetra-O-methyl-glucitol と 1 モルの 2,3,6-tri-O-methyl-glucitol が検出された。FII を S-AI と同様に末端分析を行うとグルシトールが検出された。以上の結果より FII は S-AI-X の両端にグルコースが 1 モルずつ結合した化合物であることを示している。

S-AI-X は 1 原子の窒素を含む化合物である。S-AI-

Fig. 4. Thin layer chromatogram of the hydrolyzate of S-AI by β -amylase.

S-AI was incubated with sweet potato β -amylase at 37°C in 50 mM acetate buffer, pH 5.0. The incubation mixture was withdrawn in indicated intervals and analyzed by means of TLC. Conditions for TLC were same to that in Fig. 3. Standard substance S: maltooligosaccharides (G_1 - G_8).

Fig. 5. Postulated structure of S-AI and postulated binding mechanism between S-AI and BLA.

Arrows indicate the attack points by β -amylase on S-AI.

X の分子量が約 400 であることから、その大きさは大約マルトースのそれに相当するものと思われる。

以上の結果をもとにして、S-AI の妥当な構造を考えてみると Fig. 5 に示すものが考えられる。すなわち、S-AI はグルコース 6 モルと S-AI-X 1 モルにより構成され還元、非還元末端ともグルコースである。非還元末端側のグルコースは β -アミラーゼにより分解を受け 2 モルのマルトースを放出する。

廣海らは、各種のアミラーゼによるマルトオリゴ糖の水解の測度論を展開し、アミラーゼの活性部位に関するサブサイト理論を提唱している¹⁾。彼らによって示された BLA のサブサイトと S-AI の構造を対比させたものが Fig. 5 である。BLA のサブサイトはグルコース 8 分子に相当し、水解部位はサブサイト 6 と 7 の間にあると考えられている。S-AI はこのサブサイトの大きさとよく一致し、S-AI-X は活性部位にうまく対応するものと思われる。図に示すような EI 複合体が形成されると BLA の切断部位は覆われることになり、このことが S-AI がインヒビターとしての役割を果すものと考えられる。このように S-AI の推定構造と BLA のサブサイト構造には矛盾点はなく、両者の妥当性が強く支持された。

二) S-AI-FII の α -アミラーゼに対する阻害作用

S-AI の β -アミラーゼ分解物である FII と S-AI の各種アミラーゼに対する阻害作用を調べたものが Table 3 である。S-AI は各種 α -アミラーゼを広く阻害することは先に述べたが、阻害の程度はアミラーゼによって異なり、細菌糖化型アミラーゼ (BSA) に対して最も強く作用し、ブタ膵臓アミラーゼ (HPA)、グルコアミラーゼ (GlucO)、BLA がこれに次ぐ。この傾向は、廣海らが提唱したアミラーゼのサブサイトの大きさによく対応するものと思われた。すなわち、BSA, HPA, GlucO, BLA のサブサイトはそれぞれ 4, 5, 7, 8 である¹⁾。一方、FII

Table 3. Effect of native S-AI and FII on various amylases.

Amylase	Inhibitory activity (%)			
	Native S-AI		FII	
	1:1*	1:50*	1:1*	1:50*
BSA	84	100	20	36
HPA	40	80	2	8
Gluco	14	80	17	50
BLA	9	62	0	1

* Enzyme, Inhibitor (Molar ratio).

は BLA に対してはもはやほとんど阻害を示さないが、その他の酵素に対しては、なお、かなりの活性を示している。これらのことは、S-AI-X が阻害に重要な働きを有していることを示していると同時に糖部分の長さも重要であることを示している。

ホ) S-AI の類縁物質について

S-AI の精製過程において、Dowex 50W×2(NH₄⁺) カラムを素通りする画分 F₁ を 70% *n*-プロパノールを

Fig. 6. Paper chromatogram of S-AI and F₁.

F₁ was the fraction which was not adsorbed on Dowex 50W×2(NH₄⁺), as shown in Fig. 1. The sample was spotted on Whatmann 3MM filter paper and was developed 4 times with the solvent system of 70% *n*-propanol at 50°C. Spots were detected by NaOH-Silver nitrate. A, malto-oligosaccharides; B, Purified S-AI; C, F₁.

展開溶媒としてペーパークロマトを行ったものが Fig. 6 である。マルトトリオース相当区分およびそれより高級マルトオリゴ糖に相当する種々の大きさの物質が認められる。これらはいずれも BSA に対して阻害作用を有しているが、BLA に対する阻害作用を有するものは G₆~G₇ 以上の大きさのものであった。これらの阻害剤群はいずれも窒素を含んでいる化合物であった。以上述べたごとく、*St. diastaticus* subsp. *amylostaticus* はここで述べた S-AI 以外に各種の S-AI 類縁物質を生産していることが明らかである。これらの詳しい点については別の機会に報告したい。

2. S-GI

グルコアミラーゼを阻害する物質を生産する菌株の探索を行い、目的にかなう 1 菌株を得た。本菌の分類学上の位置を検討した結果、本菌は *Streptomyces lavendulae* と同定された。本菌の生産する阻害剤を S-GI(Streptomyces Glucoamylase Inhibitor の頭文字) と命名した。

イ) S-GI の生産と精製

本菌を glucose 0.5%, 可溶性澱粉 0.5%, 肉エキス 1%, ペプトン 1%, K₂HPO₄ 0.2%, 食塩 0.3%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, pH 6.9 の培地で 48 時間振盪培養すると、S-GI の生産は最高に達する。この培養上液を用い、Fig. 7 に示す方法で S-GI を精製した。収量は培養液 1 l 当たり約 30mg であった。精製 S-GI は Silica gel を用いた TLC により単一と認められた (*R_f*, 0.74, *n*-propanol : pyridine : acetic acid : water = 15 : 10 : 3 : 6; *R_f*, 0.40, *n*-butanol : acetic acid : water = 3 : 1 : 2).

Culture filtrate

added ethanol (2 vol)

Supernatant

evaporated, dissolved in water

Column chromatography on active carbon

eluted with water

Column chromatography on Dowex 50W X 2(H⁺)

eluted with 0.5 M NH₄OH

Column chromatography on Dowex 1 X 2(OH⁻)

eluted with water

Column chromatography on aluminium oxide

eluted with 70% ethanol

Column chromatography on Sephadex G-10

eluted with 0.1 M acetic acid

Purified S-GI

Fig. 7. Purification procedure of S-GI.

ロ) S-GI の性質

精製 S-GI の性質を Table 4 にまとめて示す。S-GI の分子量は 163 であり、きわめて安定な物質で 6N HCl, 100°C, 72 時間の処理でも失活しない。S-GI はグルコアミラーゼのみに有効なものだけでなく、各種の β -グルコシダーゼ, *exo* 型のラミナリナーゼ等の多糖の非還元末端からグルコース単位に水解する各種 *exo* 型の *glucoside hydrolase* に有効なのが大きな特徴である。また、S-GI は動物起源のインペルターゼを強く阻害するが、微生物起源のものに対してはまったく活性がない。このことは動物と微生物のインペルターゼの間には大きな差があることを示している。S-GI の構造は目下検討中であるがデオキシノジリマイシンとよく類似しているらしい。このような安定な化合物が比較的大量に調製できた

Table 4. General properties of S-GI.

Elementary analysis: C = 43.45(%)	
H = 8.25(%)	
N = 8.24(%)	
[α] _D ²² (c=1.0, in water): +30°	
UV: No maximum at 230-330 nm	
Molecular weight: 163 (Mass spectrum)	
Melting point: 197-199°C	
<i>pK_a</i> : 6.2-6.5	
Stability: pH 1-13, 100°C, 30 min	
Color reaction:	Phenol sulfuric acid —
	Somogyi-Nelson —
	Elson-Morgan —
	Morgan-Elson —
	Rydon-Smith +
NaOH-Silver nitrate +	
Soluble in water, acetic acid and dimethyl sulfide	
Slightly soluble in methanol and ethanol	
Insoluble in ethyl ether, benzene, chloroform, acetone, <i>n</i> -propanol, ethyl acetate and <i>n</i> -butanol	
Inhibited glucoamylase, β -glucosidase (<i>Asp. aculeatus</i>), trehalase (<i>Chaetonium</i> sp.), α -glucosidase (Yeast), β -glucosidase (Almond), <i>exo</i> -laminarinase (<i>Penicillium</i> sp.) and invertase (Rabbit)	
Did not inhibit BLA, BSA, β -amylase (sweet potato), CMCase (<i>Asp. aculeatus</i>), pullulanase (<i>Aerobacter aerogenes</i>), invertase (Yeast) and phosphorylase (potato).	

ことは、今後のアミラーゼ化学の研究に大きく寄与できるものと期待される。

3. Haim

HPA を阻害する物質を生産する菌株の検索を行い目的にかなう一菌株を得た。本菌の分類学的位置を検討した結果、本菌は、*Streptomyces griseosporus* と同定された。本菌の生産する阻害剤は蛋白性のものであり、これを Haim と命名した (Hog pancreas amylase inhibitor of microbe の頭文字)。

イ) Haim の生産と精製

本菌をグルコース 1%, ペプトン 0.5%, 肉エキス 0.2%, 酵母エキス 0.1%, KH₂PO₄ 0.1%, Na₂HPO₄·12H₂O 0.4%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, pH 7.3 の培地で 30°C, 30 時間振盪培養することにより Haim の活性は最高に達する。この培養上液を用い Fig. 8 に示す方法で Haim の精製を行った。TEAE セルロースカラムクロマトの段階で Haim は 2 成分に分れ、以下同じ操作により Haim FI と Haim FII を得た。精製 Haim はディスク電気泳動的に均一であった。

```

Culture filtrate
| Added ammonium sulfate(0.8 satn.)
DEAE-cellulose column chromatography
| 5 mM phosphate buffer, pH 6
| (0 - 0.5 M NaCl)
TEAE-cellulose column chromatography
| 5 mM phosphate buffer, pH 6
| (0 - 0.3 M NaCl)
SP-Sephadex C-25 column chromatography
| 10 mM acetate buffer
| (pH 4 - pH 6, 0.1 M NaCl)
Sephadex G-50 column chromatography
| 10 mM phosphate buffer, pH 6
Rechromatography on Sephadex G-50 column
Isoelectric focusing
Purified Haim

```

Fig. 8. Purification procedure of Haim.

Table 5. Some properties of Haim.

Molecular weight: 12,000 (Sephadex G-50, FI and FII)
Isoelectric point: 4.0 (FI), 3.8 (FII)
Inhibited HPA and human saliva amylase
Did not inhibit Taka-amylase A, BSA, BLA, glucoamylase, malt amylase, sweet potato β -amylase

Fig. 9. Column chromatogram of EI-complex of Haim and HPA on Bio Gel P-100.

Haim was incubated with HPA at 37°C for 1 hr and then the mixture was applied on a Bio Gel P-100 column (2.5×40 cm), equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, and eluted with the same buffer. ○, Haim activity (The activities of Fr. No. 20-30 were assayed after the treatment at 100°C for 2 min); ●, protein (O. D. at 280 nm).

ロ) Haim の性質

精製 Haim の性質をまとめて Table 5 に示す。FI, FII と同電点の差を除けば、よく似た阻害剤である。Haim の大きな特徴は動物起源の α -アミラーゼのみを特異的に阻害する点であり、このことは、動物の α -アミラーゼと、微生物および植物の α -アミラーゼとの差を明確にする有力な武器となると思われる。Haim は HPA とモル/モルの複合体を形成してその作用を阻害する (Fig. 9)。

4. 微生物起源のアミラーゼ阻害剤(群)の比較

1970 年丹羽らにより放線菌の生産するノジリマイシンが α , β グルコンダーゼを阻害すると報告されて以来^{5,6)}、各種の阻害剤が微生物より得られている。それらの中で蛋白性およびオリゴ糖様のものをまとめたものが Table 6 である。蛋白性の阻害剤としては、Haim の他に 2 例があるが、これらのものはいずれも動物起源の α -アミラーゼにのみ特異的である点興味深い。一方、オリゴ糖を主構成成分とするものは基質アナログまたはそれに近いものと考えられる。この中で S-GI はノジリ

Table 6. Various amylase inhibitors from microbial origin.

Inhibitor	Microorganism	Inhibited Enzyme	Ref.
Protein			
B ₁ (Werner)	<i>Streptomyces</i> sp.	Animal α -amylase	2)
A (Amano)	<i>St. fradiae</i>	Animal α -amylase	3)
Haim	<i>St. griseosporus</i>	Animal α -amylase	4)
Oligosaccharide			
Nojirimycin	<i>St. nojiriensis</i>	α -, β -Glucosidase	5, 6)
	<i>St. roseochromogenes</i>	Glucoamylase	
	<i>St. lavendulae</i>	BSA	
S-AI	<i>St. diastaticus</i>	Animal-, Plant-,	7~9)
	subsp. <i>amylostaticus</i>	Microbial α -amylase	
		Glucoamylase	
No. 280 (S. Ueda)	<i>St. flavochromogenes</i>	Animal α -amylase	10~14)
		Glucoamylase, BSA	
G (K. Ueda)	<i>Streptomyces</i> sp.	Glucoamylase	15)
Ba-A (Bayer)	<i>Actinoplanaceae</i>	Animal α -amylase	16)
B-Pul	<i>Bacillus circulans</i>	Pullulanase	17)
Ba-B (Bayer)		Invertase (Maltase)	18)
Ta (Taisho)	<i>St. carvus</i>	Microbial α -amylase	19)
		Glucoamylase	
S-GI	<i>St. lavendulae</i>	Glucoamylase,	
		α -, β -Glucosidase	
		Animal invertase	

マイシンに比べきわめて安定な化合物であり、その有用性が期待される。一方、バイエルグループは広く放線菌類により阻害剤を求め、炭素数7個の6員環の炭水化合物に一種のメチルペントースが炭素原子を介して結合した新規な化合物にグルコースが1~7個結合したユニークな構造をもつ阻害剤を得ている^{16,18)}。この新規化合物とS-AI-Xとは窒素原子1個を含む点等でかなり類似性が考えられるが、現在までの知見では構造的に異なる。上田ら¹⁰⁻¹⁴⁾大正製薬¹⁹⁾のグループでも有効な阻害剤が得られているが、本シンポジウムで発表があるので省略する。

これらオリゴ糖を主体とする阻害剤には、いずれも窒素原子を含んでおり、この窒素原子を含む化合物がアミラーゼ阻害に重要な働きをしているものと予想できることを強調したい。

[追加討論]

S-AI-Xの構造について著者らとの協同研究を行っている大阪大・池中、長谷により、S-AI-Xの一つの可能な構造が示された。詳細については現在検討中である。

文 献

- 1) 廣海啓太郎:「入門酵素化学速度論」(小野宗三郎編), 共立出版, p.138(1975).
- 2) ウェルナフロナー: 日本特許, 特願, 昭46-105585(1971).
- 3) 犬飼忠彦, 後藤 寛, 横江正明: 農化大会講演要旨集, **50**, p.143(1975).
- 4) 大山邦夫, 松井良博, 村尾沢夫: 農化西日本大会要旨集, p.25(1977).
- 5) 丹羽富造, 鶴岡崇士, 井上重治, 仁井田太郎: アミラーゼシンポジウム, **7**, 91(1972).
- 6) T. NIWA, S. INOUE, T. TSURUOKA, Y. KOAZE and T. NIIDA: *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 966(1970).
- 7) S. MURAO and K. OHYAMA: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 2271(1975); **41**, 919(1977).
- 8) K. OHYAMA and S. MURAO: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2221(1977).
- 9) 村尾沢夫: 科学と工業, **51**, 1(1977).
- 10) S. UEDA and Y. Koba: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2025(1973).
- 11) 上田誠之助, 木場洋次郎, 加納 説, 南島 充: アミラーゼシンポジウム, **10**, 71(1975).
- 12) Y. Koba, M. NAJIMA and S. UEDA: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1167(1976).
- 13) 三浦芳助, 入江隆広, 藤尾雄策, 上田誠之助: 酵素工学, **56**, 136(1978).
- 14) S. UEDA, Y. Koba and H. CHAEN: *Carbohydr. Res.*, **61**, 253(1978).
- 15) 牛場 忍, 上田清基: 酵素工学会要旨集, **51**, p.184(1976).
- 16) ベルナーフロマー: 日本特許, 特開, 昭50-53593; 50-58099(1975).
- 17) 渡辺隆志, 梅田正樹, 村尾沢夫: 農化大会講演要旨集, **51**, p.184(1976).
- 18) ベルナーフロマー: ベルギー特許, 白52-853155(1977).
- 19) 並木信重郎, 神郡邦夫, 長手尊俊, 杉田和彦, 大村貞文, 田中一郎: 農化大会講演要旨集, **53**, p.299(1978).

[質問]

京大農 廣海

S-AI-Xはグルコアミラーゼを阻害するのでしょうか。またS-AIはグルコアミラーゼによって、その非還元末端からグルコース単位に切断されていくと思われ、この酵素を阻害するときは、かなり短く(ひょっとするとS-AI-X- ϕ まで)になっているのではないかと想像されまうがいかがでしょうか。

[答]

S-AI-Xについてはまだ測定しておりません(なお、その後の測定結果では強い阻害作用が認められました)。またグルコアミラーゼでS-AIが切断されるとのご指摘はたしかにあると思われます。今後、検討してみたいと思います。

[質問]

大正製薬 神郡

BLAへの吸着によりS-AIを精製しているが、非還元末端側のグルコースの近似するアミラーゼ・インヒビターを吸着している可能性はあるのではないのでしょうか。

[答]

crude F₁には種々の重合度の異なるS-AI類似物質があるのはFig.6で示したとおりです。この中でBLAとのcomplexを形成することによりグルコースが6モルのS-AI(BLAのsubsiteに相当する)を拾い出したと考えます。グルコース数が阻害に重要なことは先にのべたとおりです。

[質問]

日本ロシュ研 村瀬

S-AI-XとBayerの加水分解から得られたM.W.303のtricyclicな化合物の違いについて。

[答]

tricyclicな化合物はS-AIから得られていません。