タカアミラーゼ A の全一次構造

戸田弘子*・近藤 淑***・成田耕造*†

The Complete Amino Acid Sequence of Taka-Amylase A

Hiroko TODA, Kiyoshi KONDO and Kozo NARITA

Institute for Protein Research, Osaka University

(3-2, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan)

Taka-amylase A (TAA) [EC 3.2.1.1 α -1,4-glucan 4-glucanohydrolase, *Aspergillus oryzae*], which crystallized first by S. Akabori *et al.* in 1951, is a glycoprotein consisting of a single polypeptide chain of 478 amino acid residues with an amino-terminal alanine and a carboxyl-terminal serine.

Crystalline TAA was further purified by ion-exchange chromatography on a DEAE-cellulose column. The homogeneous enzyme judged by polyacrylamide gel electrophoresis was reduced and carboxymethylated. The cyanogen bromide cleavage at methionine residues of the reduced and carboxymethylated TAA (RCM-TAA) was performed in 70% formic acid for 24 hr at room temperature. TAA contains nine methionine residues and the following ten CNBr fragments were isolated; CN1(1-55), CN2(56-112), CN3(113-115), CN4(116-123), CN5(124-246), CN6(247-269), CN7(270-275), CN8(276-395), CN9(396-454) and CN10(455-478). Their amino acid sequences were determined by automated Edman degradation or by the manual Edman method.

Methionine-containing peptides were isolated from tryptic and chymotryptic digests of the maleylated RCM-TAA. The alignment of the CNBr fragments were performed based on the amino acid sequences of methionine-containing peptides and the entire amino acid sequence of TAA was established.

The N-terminal sequences of α -amylases from various origins were compared. No sequence similarity among TAA, bacterial and animal α -amylases was found in their N-terminal regions. When the amino acid sequence of TAA was compared with those of animal (mouse, rat and hog) α -amylases, sequence homologies between TAA and animal α -amylases and among mouse, rat and hog were about 24% and 77%, respectively. Furthermore, on the view point of the structure and function relationship, some possibilities of a few residues as active sites in α -amylase were discussed.

緒 言

Taka-amylase A (TAA) [EC 3.2.1.1 α -1,4-glucan 4-glucanohydrolase] は *Aspergillus oryzae* の産生する菌体外酵素で、1951年に赤堀らによって初めて結晶化された¹⁾。本酵素は澱粉やアミロースの α -1,4-グルコシド結合を at random に切断する endo 型の α -アミ

ラーゼで水解反応と糖の転位反応を触媒し、酵素活性には Ca^{2+} イオンが必須である。TAA は分子量 53,000 でアミノ (N)-末端アラニン²⁾、カルボキシル (C)-末端セリン^{3,4)} の一本鎖ポリペプチドに 5 mol のマンノースと 2 mol の N-アセチルグルコサミンから成る糖鎖が結合した糖タンパク質で 478 アミノ酸残基から成っている。N-末端および C-末端付近の部分構造^{5,6)}、糖鎖結合部位周辺のアミノ酸配列⁷⁾、糖鎖の構造^{8,9)} および最近では X 線結晶解析^{10,11)} が報告されている。

著者らは TAA の全一次構造を解明する目的で本研究

* 大阪大学蛋白質研究所(565 吹田市山田丘 3-2)

** 現在、大阪医科大学(569 高槻市大学町 2-7)

† 1981年2月21日歿

を行った。一次構造解析の初期にはトリプシン消化で得られるペプチドの単離とそのアミノ酸配列の決定が行われ、1975年にC-末端66残基のアミノ酸配列が報告された⁶⁾。これと並行してブロムシアン分解によるペプチドの単離とそのアミノ酸配列の決定が進められた。本論文ではブロムシアンペプチドのアミノ酸配列決定を中心にTAAの全一次構造解析について報告する^{12,13)}。

実験方法

1) Taka-amylase A の精製

タカジアスターゼ(三共)から赤堀らの方法¹⁴⁾に従い結晶TAAを調製し、さらにDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー¹⁵⁾で精製した。精製TAAの純度検定はポリアクリルアミドゲル電気泳動(10%ゲル, pH 8.0¹⁶⁾および0.1% SDS存在下, pH 8.3¹⁷⁾で行った。TAAのジスルフィド結合を6M塩酸グアニジン中, pH 8.6で還元し、遊離SH基をモノヨード酢酸でカルボキシメチル化した還元-カルボキシメチル化TAA(RCM-TAA)を調製し¹⁸⁾、一次構造解析の出発試料とした。

2) ブロムシアン分解¹⁹⁾

RCM-TAAを70%ギ酸に溶解し、メチオニン1残基当り100倍mol過剰のブロムシアンを加え、室温で24時間メチオニル結合の切断反応を行った。

3) マレイル化-トリプシン消化

RCM-TAAおよびブロムシアン分解で得られた大きな断片はpH 8.5で無水マレイン酸と反応させてリジンのε-アミノ基をマレイル化後、2%重炭酸アンモニウム(pH 8.0)中、37℃で7時間TPCK-トリプシン(S/E=50:1, mol/mol)で消化しアルギニル結合を切断した。

4) トリプシン消化

ブロムシアンペプチドあるいはマレイル化-トリプシンペプチドの脱マレイル化物は2%重炭酸アンモニウム(pH 8.0)中、37℃で6時間TPCK-トリプシン(S/E=50:1, mol/mol)で消化した。

5) *Staphylococcus aureus* V8 プロテアーゼ消化

ブロムシアンペプチド(CN5およびCN8)は2%重炭酸アンモニウム(pH 8.0)中、37℃で24時間*S. aureus* V8 プロテアーゼ(S/E=100:1, mol/mol)で消化した。

6) キモトリプシン消化

メチオニン含有ペプチドの再消化は2%重炭酸アンモニウム(pH 8.0)中、37℃で4時間、α-キモトリプシン(S/E=100:1, mol/mol)で行った。

7) ブロムシアンペプチドの単離、精製

ブロムシアンペプチドは4M塩酸グアニジン含有0.1M重炭酸アンモニウム(pH 7.8)に溶解し、同じ溶媒で平衡化したSephadex G-75カラム(3.0×200 cm)でゲル濾過によって、5画分に分けた。画分Iは未切断物を含むしていたので画分II以降をaffinity chromatography (Concanavalin-A-Sepharose), ion-exchange chromatography (SP-Sephadex C-25 あるいはAG 50W×2), ゲル濾過(Sephadex G-50)および高圧濾紙電気泳動(pH 3.5, 3000 V, 110 min)でさらに精製した。

8) メチオニン含有ペプチドの単離

マレイル化RCM-TAAのトリプシン消化物から、ゲル濾過, ion-exchange chromatographyを組み合わせて、マレイル化トリプシンペプチド(TM-ペプチド)を単離した。TM-ペプチド中、メチオニンを含有するペプチドは10%ギ酸中で脱マレイル化後、トリプシンあるいはキモトリプシンで再消化し、ゲル濾過(Sephadex G-50およびG-25), ion-exchange chromatography (AG50W×2), 高圧濾紙電気泳動あるいは逆相系的高速液体クロマトグラフィー(TSK LS-410 ODS SIL)を組み合わせて精製し、メチオニン含有ペプチドを単離した。

9) アミノ酸分析

アミノ酸分析は日立835S型自動アミノ酸分析機を用いて行った。加水分解は、2回ガラス蒸留HCl(5.7N)-1%フェノールで封管中、110℃で24, 48, 72時間行い、各アミノ酸の平均値を求めた。トレオニンとセリンの値は加水分解時間ゼロの外挿値を用いた。トリプトファンの定量値は4M methanesulfonic acid-0.2% tryptamine(110℃, 24時間)水解物を分析して求めた。

10) アミノ酸配列決定

ペプチドのアミノ酸配列は主としてシーケンサーを用いる自動Edman分解により決定した。自動Edman分解にはベックマン社製(Model 890C)液相シーケンサー²⁰⁾あるいはLKB(Model 4020)固相シーケンサー²¹⁾を用いた。液相シーケンサーの場合は100~200 nmolペプチドにキャリアーとしてPolybrene²²⁾(3 mg)を加え、0.1M Quadrol-programを用いて自動Edman分解を行った。固相シーケンサーの場合は50 nmolペプチドをホモセリンラクトン法²³⁾あるいはphenylenedithioisothiocyanate (DITC)法²⁴⁾で担体(2-アミノエチル-3-アミノプロピルガラス)に結合させて固定化後、自動Edman分解を行った。小さなペプチドは手動Edman分解²⁵⁾でアミノ酸配列を決定した。フェニルチオヒダントイン誘導体(PTH-アミノ酸)は高速液体クロマト

図 1. (a) 結晶 TAA の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー

結晶 TAA(4.9 g) を 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 6.5) で平衡化した DEAE-セルロースカラム (3.5×60 cm) にかへ、同じ緩衝液中で食塩濃度勾配 (0~0.3 M) で溶出した。溶出液は 13 ml ずつ分取した。アンダーラインで示した画分を集め透析後、凍結乾燥した。

図 1. (b) 精製 TAA のポリアクリルアミドゲル電気泳動

(a) のピークのアンダーライン部分の画分を使用。10%ゲル, pH 8.0 (右), 0.1% SDS 存在下, pH 8.3 (左)。

(DuPont Zorbax CN カラム)^{26,27)} および薄層クロマト (Merck 60 F₂₄₅ シリカゲルプレートまたは Cheng Chin ポリアミドシート)^{28,29)} で同定した。

結果と考察

1) Taka-amylase A の精製

結晶 TAA を DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで精製した結果を図 1 (a) および (b) に示した。この操作で結晶 TAA 中に含まれていた不純物およびアミラーゼ活性をもった微量成分を完全に除去した画分が得られた (収量: 35%)。この画分は図 1 (b) に示したようにゲル電気泳動で均一であり、本研究の構造解析に使用した。

2) ブロムシアンペプチドの単離

RCM-TAA のブロムシアン分解物は 4M 塩酸グアニジン含有 0.1M 重炭酸アンモニウム (pH 7.8) 中、Sephadex G-75 カラム (3.0×200 cm) を用いたゲル濾過で 5 個の画分 (I~V) に分けた (図 2)。画分 I はアミノ酸分析の結果、未分解物を含んでいた。画分 II は Concanavalin-A-Sepharose カラムを用いた affinity chromatography で CN5 と CN8 に分離した。画分 III は pH 4.8 (0.1M ピリジン-酢酸) で不溶性画分 (III P) と可溶性画分 (III S) に分けた。III P は 7M 尿素中の

図 2. RCM-TAA のブロムシアン分解物の Sephadex G-75 によるゲル濾過

カラム, Sephadex G-75 (3.0×200 cm); 溶媒, 4M 塩酸グアニジン-0.1M 重炭酸アンモニウム (pH 7.8)。溶出液は 10 ml ずつ分取し、アンダーラインで示した画分 (I~V) を集め、脱塩後に凍結乾燥した。各ピークの上の記号はそれぞれの画分から最終的に単離されたブロムシアンペプチドを示す。

ion-exchange chromatography (SP-Sephadex C-25) で CN 1 と CN 2 に分離し, III S からは Sephadex G-50 カラムを用いたゲル濾過で CN 9 を単離した. 画分 IV は高圧濾紙電気泳動で CN 6 と CN 10 に分離した. 画分 V からは AG 50 W×2 カラムを用いピリジン-酢酸緩衝液の linear gradient 溶出で CN 3, CN 4 および CN 7 を単離した. 以上の結果を図 3 に要約して示した. ここに TAA に含まれるメチオニン 9 残基から予想される 10 個のプロムシアンペプチド (CN 1~CN 10) をすべて単離することができた. 単離した CN-ペプチドのアミ

ノ酸組成を表 1 に示した. これら CN-ペプチドのアミノ酸組成の総和はもとの TAA のアミノ酸組成とよく一致した.

3) プロムシアンペプチドのアミノ酸配列

ここでは最も大きな断片である CN 5 のアミノ酸配列決定について述べる (図 4). CN 5 (残基 124~246) は 123 残基のアミノ酸から成り, 糖鎖を結合した糖ペプチドで, C-末端はホモセリン (Hse) 残基であった. 最初に CN 5 の C-末端 Hse 残基をホモセリンラクトン (HseL) に環化後, アミノエチルアミノプロピルガラス

図 3. プロムシアンペプチドの単離, 精製方法

表 1. RCM-TAA のプロムシアンペプチドのアミノ酸組成

	CN-1	CN-2	CN-3	CN-4	CN-5	CN-6	CN-7	CN-8	CN-9	CN-10	Total
Lys	1.80 (2)	0.80 (1)			5.74 (6)	1.00 (1)		5.66 (6)	1.82 (2)	1.59 (2)	20
His		1.08 (1)		0.80 (1)	2.00 (2)			1.97 (2)			6
Arg	2.70 (3)	1.00 (1)			1.11 (1)			3.09 (3)	0.91 (1)	0.86 (1)	10
Trp	1.63 (2)	1.42 (2)			3.59 (4)			1.12 (1)			9
HseL	0.64 (1)	0.50 (1)	0.86 (1)	0.78 (1)	0.34 (1)	0.73 (1)	0.66 (1)	0.50 (1)	0.75 (1)		9
Asp	7.00 (7)	6.70 (7)		2.07 (2)	21.01 (21)	3.09 (3)	3.14 (3)	20.72 (21)	5.00 (5)	1.01 (1)	70
Thr	7.61 (8)	6.10 (6)			6.00 (6)	1.09 (1)		10.30 (10)	7.70 (8)	0.93 (1)	40
Ser	2.93 (3)	3.00 (3)			8.80 (9)	2.83 (3)		7.40 (7)	6.80 (8)	3.59 (4)	37
Glu	4.40 (4)	5.07 (5)			9.95 (10)			6.79 (6)	3.96 (4)	0.81 (1)	30
Pro	0.91 (1)	1.67 (2)			6.04 (6)	2.22 (2)		5.75 (6)	2.22 (2)	1.78 (2)	21
Gly	5.12 (5)	5.00 (5)			9.95 (10)	2.14 (2)		8.01 (7)	8.73 (9)	2.63 (3)	41
Ala	5.49 (5)	6.62 (7)		1.00 (1)	4.28 (4)	1.17 (1)		14.00 (14)	3.00 (3)	1.66 (2)	37
Val		1.20 (1)		2.48 (3)	13.34 (13)	1.05 (1)		4.47 (4)	6.02 (6)	1.00 (1)	29
Ile	3.42 (4)	3.10 (3)			4.20 (4)	0.94 (1)		10.91 (11)	2.76 (3)	0.87 (1)	27
Leu	3.31 (3)	4.91 (5)	1.00 (1)		6.09 (6)	2.87 (3)	1.00 (1)	7.63 (8)	3.94 (4)	2.88 (3)	34
Tyr	3.24 (3)	4.76 (5)	0.94 (1)		9.58 (10)	2.76 (3)	0.99 (1)	8.11 (8)	2.01 (2)	1.40 (1)	34
Phe	1.93 (2)	1.24 (1)			5.88 (6)	1.04 (1)		4.00 (4)			14
Cys(Cm)	1.42 (2)	0.49 (1)			3.45 (4)			0.96 (1)	0.87 (1)	0.61 (1)	10
Total	55	57	3	8	123	23	6	120	59	24	478
Yield(%)	40.2	76.0	15.1	10.7	35.2	75.7	6.2	45.9	39.3	55.2	

() 内の数字はアミノ酸配列から求めた残基数.

HseL, ホモセリンラクトン; Cys(Cm), S-カルボキシメチルシステイン.

図 4. ブロムシアンペプチド CN5 の構造決定

T, CN5 のトリプシンペプチド; Tm, マレイル化 CN5 のトリプシンペプチド; V, CN5 の *Staphylococcus aureus* V8 プロテアーゼペプチド; CHO, 糖鎖。

—, 手動 Edman 分解で同定されたアミノ酸配列;
——, 液相シーケンサーで同定されたアミノ酸配列;
——>, 固相シーケンサーで同定されたアミノ酸配列。

アミノ酸残基の番号は CN5 の N-末端からの番号で示してある。

に結合させて固定化し、固相 Edman 法によって N-末端から 24 残基のアミノ酸配列を同定した。次に CN5 を 1) トリプシン消化、2) マレイル化後のトリプシン消化で、それぞれ T-ペプチドおよび Tm-ペプチドを単離した。ここでトリプシン中に混在していたキモトリプシン作用によると考えられる Phe-Ser (17~18) および Phe-Cys (Cm) (26~27) 結合の切断がみられた。比較的大きなペプチドは Polybrene 存在下に液相シーケンサーを用いてアミノ酸配列を決定し、小さなペプチドのアミノ酸配列は手動 Edman 法で決定した。T-1-2 および T-7 の場合は、最初に N-末端から直接アミノ酸配列を決定し、次に各ペプチドを *S. aureus* V8 プロテアーゼで消化後に、消化物を Lys 残基 (T-1-2 の場合) あるいは HseL 残基 (T-7 の場合) を介してアミノプロピルガラスに結合させて酵素消化物中の C-末端ペプチ

CN1 (1-55)	ATPADWRSQSIYFLLTDRFARTDGSSTTATC NTADQKYCGGTWQGIIOKLDYIQGM
CN2 (56-112)	GFTAIWITPVTALPQDCAYGDAYTGWQT DIYSLNENYGTADDL KALSSALHERGM
CN3 (113-115)	YLM
CN4 (116-123)	VDVVANHH
CN5 (124-246)	GYD GAG SSV DYS VF KPF SS QDY FHP FCF IQ NYEDQTQVEDCWLGDNTVSLPDLDTTKD VV KNEWYDWVGSLSVSNYSIDGLRIDTVKHVQK DFWPGYNKAAGVYCIGEVLDGDPAYTCPYQ NVM
CN6 (247-269)	DGVLNYPYIYPLLNAFKSTSGSM
CN7 (270-275)	DDL YNM
CN8 (276-395)	INTVKSDCPDSTLLGTFVENHNDNPRFASYT NDIALAKNVAAFIILNDGLPIIYAGQE QHY AGNDPANREATWLSGYPTDSELYKLIASA NAIRNYAISKDTGFVTKPNPYIKDDTTIAM
CN9 (396-454)	RKGT DGSQIVTILSNKGASGDSYTL SLSGA SYTAGQQLTEVIGCTTVTVGSDGNVPVPM
CN10 (455-478)	AGGLPRVLYPTEKLAGSKICS DSS

図 5. 構造決定された10個のブロムシアンペプチドのアミノ酸配列

* 糖鎖の結合位置を示す。

アミノ酸: A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; Y, Tyr.

ドのみ選択的に固定化した。非結合ペプチドを除去後、固相シーケンサーでそれぞれの C-末端ペプチドのアミノ酸配列を決定した。

CN5 のアミノ酸配列は各 T-ペプチドおよび Tm-ペプチドのアミノ酸配列情報に基づいて、それぞれの断片を並べ、必ずオーバーラップする断片のアミノ酸配列がおのおののペプチドの結合順序を証明するようにした。CN5 では T-1 (または T-1-2) と T-2, T-3 (または Tm-1) と T-4 の結合順序の証明として、CN5 を *S. aureus* V8 プロテアーゼで消化し、V-3 (残基 40~63) と V-4 (残基 64~107) のペプチドを単離し、そのアミノ酸配列から上記の結合順序を証明した。糖鎖は CN5 の Asn-74 の側鎖に結合していた。CN5 のアミノ酸配列決定の結果を図 4 に示した。

同様の手段によって、他の CN-ペプチドも各ペプチドの再断片化とペプチドの単離および Edman 分解によりそのアミノ酸配列を決定した。図 5 に単離された 10 個の CN-ペプチドのアミノ酸配列を示した。

4) メチオニン含有ペプチド

マレイル化 RCM-TAA をトリプシン消化し、TAA に含まれる 10 個のアルギニル結合を切断し、TM-ペプ

図6. メチオニン含有ペプチドのアミノ酸配列とCN-ペプチド相互の配列決定

上のバーは RCM-TAA を示し、そのなかの△印は Met 残基を表わす。斜線は RCM-TAA について N-末端アミノ酸配列を決定した部分を示す。

TM, マレイル化 RCM-TAA のトリプシンペプチド; T, 脱マレイル化 TM-ペプチドのトリプシンペプチド; C, 脱マレイル化 TM-ペプチドのキモトリプシンペプチド。

チドを単離した。これらの TM-ペプチドのうち、Met 残基を含有しているのは TM-4(残基 22~110), TM-5(111~204), TM-6(205~300), TM-9(370~396) および TM-10(397~460) であった。TM-4, TM-5 および TM-6 を脱マレイル化後、トリプシンまたはキモトリプシンで消化し、Met-含有ペプチドとして TM4-C4(52~61), TM5-T1(111~140), TM6-T4-C4(243~252) および TM6-T5(264~280) を単離した。各ペプチドのアミノ酸配列は CN-ペプチドの場合と同様の方法で決定した。これらの Met 含有ペプチドのアミノ酸配列を図6に示した。

5) CN-ペプチドの結合順序

前述の10個のCN-ペプチド相互の結合順序はMet含有ペプチドのアミノ酸配列に基づいて以下のように決定した(図6)。CN1のアミノ酸配列は先に報告したRCM-TAAのN-末端アミノ酸配列⁵⁾と一致したので、CN1はTAAのN-末端ペプチドと推定した。図6に示したように、TM4-C4はMet-55を含有するペプチドで、そのアミノ酸配列からCN1-CN2の結合順序を決定した。以下同様にして、TM5-T1, TM6-T4-C4, TM6-T5 および TM9 はそれぞれ、Met-112, 115 および 123, Met-246, Met-269 および 275, Met-395 を含有し、それぞれのアミノ酸配列から、CN2-CN3-CN4-CN5, CN5-CN6, CN6-CN7-CN8, および CN8-CN9 の結合順序を決定した。CN9のC-末端アミノ酸配列とそれに続くCN10のアミノ酸配列は、先に成田の報告したTAAのC-末端66残基のアミノ酸配列⁶⁾に対応していた。また、CN10のC-末端基はSer残基でTAAのC-末端残基⁴⁾と一致していた。以上の結果からCN9-

CN10の結合順序とCN10がTAAのC-末端ペプチドであることを推定した。図6にMet-含有ペプチドのアミノ酸配列とCN-ペプチド相互の結合順序決定の結果を示した。

以上の結果から、10個のCN-ペプチド相互の結合順序を決定し、図7に示すTAAの全一次構造を決定した。TAAの糖鎖はAsn-197の側鎖に結合しており、糖鎖結合部位周辺のアミノ酸配列は伊勢村と池中の結果⁷⁾と一致した。アミノ酸配列から求めたTAAの分子量は糖鎖を含めて53,662であった。この値は従来の物理化学的手法で測定された値^{30,31)}ともほぼ一致している。

6) 種々のα-アミラーゼのN-末端アミノ酸配列

微生物α-アミラーゼは*Bacillus subtilis amyloliquefaciens*³²⁾, *B. amyloliquefaciens*³³⁾, および Marburg strain YY 88³⁴⁾ のN-末端アミノ酸配列が報告されている。動物α-アミラーゼではマウス(膵臓と唾液腺)³⁵⁾とラット(膵臓)³⁶⁾ α-アミラーゼのmRNAが単離され、それぞれの塩基配列からアミノ酸配列が予測されている。ブタ膵臓α-アミラーゼ・アイソエンザイムIの一次構造はアイソエンザイムIのプロムシアンペプチドとアイソエンザイムIIのMet-含有トリプシンペプチドのアミノ酸配列から推定されている³⁷⁾。これらのα-アミラーゼのN-末端付近のアミノ酸配列を図8に比較して示した。

微生物起源のα-アミラーゼ間では、糖化型アミラーゼ(*B. amyloliquefaciens* および Marburg strain YY 88), 液化型アミラーゼ(*B. amyloliquefaciens*) およびこうじカビ(*Aspergillus oryzae*, TAA) アミラーゼ相互には、そのN-末端付近のアミノ酸配列に類似性はほとんどみられない。動物α-アミラーゼは、いずれもN-

図 7. タカアミラーゼ A の全一次構造

CHO は糖鎖を表わしている。

図8. 種々の α -アミラーゼの N-末端アミノ酸配列の比較

末端残基は前駆体が切断を受けて新たに N-末端残基となったグルタミン残基が環化したピログルタミン酸であることが特徴である^{37,38)}。また動物 α -アミラーゼは N-末端付近のみならず、全体のアミノ酸配列でも図9に示すように相互に非常にホモロジーが高い。このように α -アミラーゼは生物種によってかなりの分化がみられ、微生物間、あるいは微生物と哺乳類の隔たりは相当あるものと考えられる。

7) α -アミラーゼの一次構造の比較

TAA のアミノ酸配列と一次構造の報告されている動物 α -アミラーゼを比較した。図9では、それぞれのアミノ酸配列を相互に類似性が最も高くなるように、N-末端側のアミノ酸配列から検索して³⁹⁾、TAA に対して並列させてある。そのために、動物 α -アミラーゼは N-末端側で 21 残基ずらし、また両者のアミノ酸配列の数箇所にギャップを設けた。全体を通じて共通のアミノ酸残基が占める座位はブロック□で囲んである。このように並べると、動物 α -アミラーゼ相互間のホモロジーは約 77% であるが、TAA と動物 α -アミラーゼ間では約 24% のホモロジーがあった。

一般に起源の異なる同一機能をもった酵素分子のアミノ酸配列を比較すると、全体としての類似性が低い酵素タンパク質の間でも、活性中心や基質結合部位のような機能上重要な領域では一次構造上の保存性が高いことが知られている⁴⁰⁾。このような観点から図9のアミノ酸配列の比較を検討すると、TAA の Val-116~Ala-128, Gly-202~His-210 および Phe-292~Arg-300 の三つの領域で、それぞれ動物 α -アミラーゼの対応する部分ととくに高いホモロジーが見出される。これらの相同な領域に存在するアミノ酸残基のうち、TAA の His-122, His-210, His-296 および Asp-297 は X線結晶解析から TAA の活性中心クレフトや基質結合部位に存在して

いることが、角戸らによって示唆されている^{11,41)}。また TAA 中の His 残基の化学修飾からも His 残基のいくつかは TAA の酵素活性発現に関与していることが示唆されている⁴²⁾。これらの残基が一次構造上の相同性の高い領域に保存されていることを考慮すると、他の α -アミラーゼにおいてもこれらの残基は酵素活性発現に関与している可能性を示すものと考えられる。近い将来、種の起源の α -アミラーゼの一次構造と立体構造が解明されれば、 α -アミラーゼの構造と機能に関してもより詳しい分子レベルでの議論ができるものと期待される。

本研究を遂行するにあたり、終始助言と激励をしていただいた赤堀四郎博士にお礼申しあげます。また、タカジアスターゼ原末を提供していただいた三共株式会社、ならびにアミノ酸分析をしてくださった大阪大学蛋白質研究所八木芳子さんに感謝いたします。

文 献

- 1) S. AKABORI, B. HAGIHARA and T. IKENAKA: *Proc. Jpn. Acad.*, **27**, 350(1951).
- 2) S. AKABORI and T. IKENAKA: *J. Biochem.*, **42**, 603(1955).
- 3) T. IKENAKA: *J. Biochem.*, **43**, 255(1956).
- 4) K. NARITA, H. MURAKAMI and T. IKENAKA: *J. Biochem.*, **59**, 170(1966).
- 5) H. TODA, K. KONDO and K. NARITA: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1945(1980).
- 6) K. NARITA: *Proc. Jpn. Acad.*, **51**, 285(1975).
- 7) S. ISEMURA and T. IKENAKA: *J. Biochem.*, **74**, 1(1973).
- 8) H. YAMAGUCHI, T. IKENAKA and Y. MATSUSHIMA: *J. Biochem.*, **70**, 587(1971).
- 9) S. MINOBE, H. NAKAJIMA, N. ITOH, I. FUNAKOSHI and I. YAMASHINA: *J. Biochem.*, **86**, 1851(1979).
- 10) Y. MATSUURA, M. KUSUNOKI, W. HARADA, N.

- TANAKA, Y. IGA, N. YASUOKA, H. TODA, K. NARITA and M. KAKUDO: *J. Biochem.*, **87**, 1555 (1980).
- 11) 角戸正夫: 蛋白質・核酸・酵素, **27**, 1533(1982).
 - 12) 戸田弘子, 近藤 淑, 成田耕造: 第33回タンパク質構造討論会要旨集, p. 21(1982).
 - 13) H. TODA, K. KONDO and K. NARITA: *Proc. Jpn. Acad.*, **58B**, 208(1982).
 - 14) S. AKABORI, T. IKENAKA and B. HAGIHARA: *J. Biochem.*, **41**, 577(1954).
 - 15) H. TODA and S. AKABORI: *J. Biochem.*, **53**, 102 (1963).
 - 16) D. E. WILLIAMS and R. A. REISFELDI: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 373(1964).
 - 17) U. K. LAEMMLI: *Nature*, **228**, 527(1970).
 - 18) B. K. SEON, H. TODA and K. NARITA: *J. Biochem.*, **58**, 348(1965).
 - 19) E. GROSS and B. WITKOP: *J. Biol. Chem.*, **237**, 1856(1962).
 - 20) P. EDMAN and G. BEGG: *Eur. J. Biochem.*, **1**, 80 (1967).
 - 21) R. A. LAURSEN: *Eur. J. Biochem.*, **20**, 89(1971).
 - 22) D. G. KLAPPER, C. E. WILDE, III and J. D. CAPRA: *Anal. Biochem.*, **85**, 126(1978).
 - 23) M. J. HORN and R. A. LAURSEN: *FEBS Lett.*, **36**, 285(1973).
 - 24) R. A. LAURSEN, M. J. HORN and A. G. BONNER: *FEBS Lett.*, **21**, 67(1972).
 - 25) P. EDMAN and A. HENSCHEN: in *Protein Sequence Determination*, 2nd ed., S. B. NEEDLEMAN ed., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, p. 232(1975).
 - 26) N. D. JOHNSON, M. W. HUNKAPILLER and L. E. HOOD: *Anal. Biochem.*, **100**, 335(1979).
 - 27) 戸田弘子, 網沢 進, 崎山文夫, 成田耕造: 第25回液体クロマトグラフ研究会要旨集, p. 82 (1982).
 - 28) K. D. KLUBE: *Anal. Biochem.*, **59**, 564(1974).
 - 29) J. BRIDGEN, A. D. GRAFFEO, B. L. KARGER and M. D. WATERFIELD: in *Instrumentation in Amino Acid Sequence Analysis*, R. N. PERHAM, ed., Academic Press, London, New York and San Francisco, p. 111(1975).
 - 30) T. ISEMURA and S. FUJITA: *J. Biochem.*, **44**, 443 (1957).
 - 31) T. TAKAGI: *J. Biochem.*, **89**, 363(1981).
 - 32) H. CHUNG and F. FRIEDBERG: *Biochem. J.*, **185**, 387(1980).
 - 33) Y. NAGATA, S. SUGA, O. KADO and B. MARUO: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 215(1980).
 - 34) P. MÄNSTSÄLÄ and H. ZALKIN: *J. Biol. Chem.*, **254**, 8540(1979).
 - 35) O. HAGENBÜCHLE, R. BOVEY and R. A. YOUNG: *Cell*, **21**, 179(1980).
 - 36) R. J. MACDONALD, M. M. CRERAR, W. F. SWAIN, R. L. PICTET, G. THOMAS and W. J. RUTTER: *Nature*, **287**, 117(1980).
 - 37) I. KLUH: *FEBS Lett.*, **136**, 231(1981).
 - 38) R. C. KARN, T. E. PETERSEN, J. P. HJORTH, J. T. NIELES and P. ROEPSTORFF: *FEBS Lett.*, **126**, 292(1981).
 - 39) M. O. DAYHOFF: *Atlas of Protein Sequence and Structure*, **5**(Suppl. 3), 1(1978).
 - 40) M. O. DAYHOFF, W. C. BARKER and J. K. HARDMAN: *Atlas of Protein Sequence and Structure*, **5**, 53(1972).
 - 41) 松浦良樹, 楠木正巳, 田中信夫, 角戸正夫, 原田和嘉子: 第33回タンパク質構造討論会要旨集, p. 25 (1982).
 - 42) Y. KITA, S. SAKAGUCHI, Y. NITTA and T. WATANABE: *J. Biochem.*, **92**, 1499(1982).

【質問】

大阪市工研 岡田

TAA の精製するとき、前の区分を取られたが、後の区分には分子量等の異なる酵素は入っていますか。

【答】

詳しくは調べていませんが SDS-ゲル電気泳動のパターンから判断して、主成分の TAA と同じ分子量のアミラーゼが含まれていると思われます。後の画分はポリアクリルアミドゲル電気泳動で移動度の異なる微量成分を含み、いずれも同程度のアミラーゼ活性があります。

【質問】

大阪市大理 山本

B. amylosacchariticus の糖化型 α -アミラーゼ、動物の膵臓 α -アミラーゼは、N-末端付近のアミノ酸配列が互いによく似ているようです。両アミラーゼの特異性はよく似ていますので、これと一次構造との関連性がみつかりたいへん興味があります。

【答】

近い将来、糖化型アミラーゼの全一次構造が発表されたときには、液化型も含めて、動物アミラーゼとの一次構造を比較したいと考えております。

【質問】

阪大産研 福井

TAA と膵臓 α -アミラーゼの間に一次構造上のホモロジーがみられるというのは興味深いですが、比較の際に加えたギャップの数が少し多過ぎるように思うが、その点をどう考えるか？

【答】

α -アミラーゼは N-末端付近のアミノ酸配列の比較からでも生物種によりかなりの分化があるものと予想されます。今回は全一次構造のわかっている TAA と哺乳類の α -アミラーゼを比較し、全体の類似性を最も高くすることのみ留意して並べたものです。今後、種々のアミラーゼの一次構造が発表されたときに検討したいと考えています。