サツマイモ β -アミラーゼの一次構造解析†

戸田 弘子*

Sequence Analysis of Sweet Potato β -Amylase

Hiroko TODA

Institute for Protein Research, Osaka University
(3-2, Yamadaoka, Suita 565, Japan)

β -Amylase [EC 3.2.1.2 α -1,4-glucan maltohydrolase] is an exo-acting amylase, cleaving α -1,4 linkages sequentially from the non-reducing end of starch, producing β -maltose and β -limit dextrins as the end products. β -Amylases are widely distributed in higher plants and some bacteria.

Sweet potato β -amylase was first crystallized by Balls *et al.* in 1948. Some physicochemical properties, substrate specificity, and action mechanism have been reported.

Sweet potato β -amylase is a homotetrameric enzyme with MW of 215,000, judging from the experimental results. The complete amino acid sequence was established by the strategy of protein chemistry. The subunit of the enzyme consisted of 496 amino acid residues giving Mr of 55,707.

The native enzyme was affinity labeled with 2,3-epoxypropyl- α -D-glucopyranoside (α -EPG). The α -EPG was incorporated stoichiometrically (one mol α -EPG/mol subunit) into the enzyme, resulting in the complete loss of the enzymatic activity. The Glu-187 affinity labeled with α -EPG was identified by isolating and sequencing the ^{14}C - α -EPG-peptide.

Sequence homology of sweet potato enzyme with those from soybean and barley was 64 and 53%, respectively. *B. polymyxa* and *B. circulans* enzymes were 80% homologous with each other. It is noteworthy that there are at least six highly conserved sequences throughout plants and bacterial β -amylases and that the active site Glu-187 in sweet potato enzyme is the invariant residue in one of these conserved regions. These results suggest that glutamate residue corresponding to the Glu-187 in sweet potato β -amylase is the active site of other β -amylases from different origins.

β -アミラーゼ [EC 3.2.1.2 α -1,4-glucan maltohydrolase] は植物および、ある種の細菌に見出される Exo 型アミラーゼで、澱粉やアミロースをその非還元末端からマルトース単位に逐次切断する。最終生成物は β -マルトースと β -限界デキストリンである。

サツマイモ β -アミラーゼは 1948 年に Balls ら¹⁾によって結晶化され、若干の物理化学的性質、基質特異性、作用機作、等が報告されている²⁻⁵⁾。本酵素の分子量は沈降平衡では 215,000⁶⁾、SDS-PAGE では 56,000 である⁷⁾。われわれは先年、サツマイモ β -アミラーゼは

native 状態では同一のサブユニットから 4 量体を形成していることを報告した⁸⁾。

筆者は、サツマイモ β -アミラーゼの構造-機能相関関係を解明する目的で本研究を行った。まず、本酵素の全一次構造を決定し、次に β -アミラーゼのアフィニティラベル試薬である 2,3-epoxypropyl α -D-glucopyranoside (α -EPG) を用いて修飾酵素を調製し、 ^{14}C - α -EPG が結合する活性部位 Glu-187 を同定した。また、植物ならびに細菌由来の β -アミラーゼの一次構造の比較と活性部位周辺のアミノ酸配列の検索を行い、二、三の知見を得たので報告する。

† "Proceedings of the Amylase Symposium, 1988"

* 大阪大学蛋白質研究所 (565 吹田市山田丘 3-2)

実験方法

1. 一次構造決定

1) サツマイモ β -アミラーゼの精製⁹⁾

サツマイモ搾汁を酸処理 (pH 3.6, 10 分) し, 遠沈で不溶物を除き, 上清を冷アセトン分画と硫酸分画で精製し, アセトン沈殿を少量の水に溶し, 氷室で結晶化した。結晶酵素をさらに DE-32 カラム (3.0×50 cm) を用いたイオン交換クロマトグラフィーで精製し, SDS-PAGE で均一な画分を集めて構造決定に供した。精製酵素を 6 M 塩酸グアニジン-0.5 M トリス緩衝液 (pH 8.5)-1 mM EDTA 中で, β -メルカプトエタノールで還元し, SH 基をモノヨード酢酸でカルボキシメチル化した RCM- β -アミラーゼを一次構造決定の出発材料とした。

2) プロテアーゼ消化

RCM- β -アミラーゼ (1.5 mg) を 7 M 尿素含有 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 9.5) 300 μ l に溶し, *Achromobacter* protease I (API) (和光純薬) を S/E=500:1 モル/モルになるように加え, 37°C, 7 時間消化した。一方, RCM- β -アミラーゼ (1.5 mg) を 2 M 尿素含有 0.1 M 重炭酸アンモニウム (pH 8.0) 300 μ l に溶し, *Staphylococcus aureus* V8 protease (Miles Labo.) を S/E=100:1 モル/モルで 10 時間ごとに 3 回添加し, 37°C で 50 時間消化した。

3) ブロムシアン分解

RCM- β -アミラーゼ (1.0 mg) を 70% ギ酸 200 μ l に溶し, メチオニン 1 残基当り 300 倍モル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。

4) ペプチドの再消化

大きなペプチド断片は, 0.1 M 重炭酸アンモニウム (pH 8.0) 中で, トリプシンあるいは V8 プロテアーゼで再消化した。S/E=100:1 モル/モルで 37°C, トリプシン消化は 6 時間, V8 プロテアーゼ消化は 24 時間行った。

5) ペプチドの単離, 精製

API 消化物および V8-プロテアーゼ消化物は Cosmosil 5C18P-300 (ナカライテスク, 京都) を用いた逆相 HPLC で分離した。溶出は 0.1% TFA 中, アセトニトリルの直線濃度勾配で行った。再クロマトは, 同じカラムを用い, 移動相に 10 mM ギ酸アンモニウム (pH 4.5)-アセトニトリルの系を使用した。ブロムシアンペプチドは, 最初に TSK-Gel G 2000 SW (東洋曹達) を

用いた分子排除 HPLC で分画し, 大きな断片を含む画分 II は 7 M 尿素中で Protein Pak G-SP (Waters) を用いたイオン交換 HPLC で精製し, 画分 III, IV および V は逆相 HPLC で精製した。

6) アミノ酸分析

アミノ酸分析は日立 835 S 型自動アミノ酸分析機を用いて行った。2 回蒸留 HCl (5.7 N)-1% フェノール中, 減圧封管内で 110°C, 24 時間加水分解した。蛋白質の場合は 24, 48, および 72 時間加水分解し, 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求めた。トリプトファンの値は 4 M メタンスルホン酸-0.2% トリプタミン水解物 (110°C, 24 時間) の分析値を用いた。

7) アミノ酸配列分析

蛋白質およびペプチドのアミノ酸配列分析は, Applied Biosystem 社製シーケンサー 470A 型, あるいは, 477A/120A オンライン型を用いた自動 Edman 法により行った。470A 型シーケンサーの場合は, PTH-アミノ酸は逆相 HPLC (Waters QA-1) で同定した¹⁰⁾。

8) C-末端残基の同定

RCM- β -アミラーゼの C-末端分析はヒドラジン分解¹¹⁾で行い, 遊離アミノ酸はアミノ酸分析機で定量した。native β -アミラーゼおよび, C-末端由来のペプチド (K28) は CPase Y 消化により遊離するアミノ酸をアミノ酸分析機で定量した。一方で C-末端ペプチド K28 (1 nmol) をマスマススペクトロメトリー¹²⁾で分析して, C-末端アミノ酸配列を確認した。

9) ペプチドの命名と番号

API-ペプチド, V8-ペプチドおよび CNBr-ペプチドは, それぞれ接頭語 K, E, および M で表わした。ペプチド番号は最終的に決定したサツマイモ β -アミラーゼの一次構造での N-末端からの順番で表わした。

2. 活性部位の同定

1) アフィニティラベルによる修飾酵素の調製

酵素 (6.17 mg) と ¹⁴C- α -EPG (11.4 mg) を 500 μ l の 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.8)-50 mM NaCl-2 mM β -メルカプトエタノール中, 25°C で 2 時間反応させた。反応液は Sephadex G-25 カラム (1×25 cm) で脱塩し, さらに membrane cone (Centriflo CF25) を用いた ultrafiltration で過剰の試薬を完全に除去した。

2) ¹⁴C- α -EPG-ペプチドの単離

¹⁴C- α -EPG-酵素を 6 M グアニジン塩酸-1 mM EDTA 中で, 25°C, 30 分変性させ, 0.2 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加えて pH 8.0 とし, モノヨード酢酸

Fig.1. Summary of strategy for sequence determination of sweet potato β -amylase.

API, *Achromobacter* protease I (Lys); V8, *S.aureus* V8 protease (Glu); CNBr, cyanogen bromide in 70% formic acid (Met).

(28.8 μ mol) を加え、室温、20 分間アルキル化した。反応液は ultrafiltration で 7 M 尿素含有 25 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に置換し、Molcut II (UFPI TIK) を用いて約 500 μ l に濃縮した。*Achromobacter* protease I (S/E=500:1) で、37°C、7 時間消化した。消化物は逆相 HPLC (Cosmosil 5C18P-300) で分離し、各ピークの一部を採って放射活性を測定し、 ^{14}C - α -EPG-ペプチドのピークを分取した。放射活性ペプチドは配列分析のために、*S.aureus* V8 プロテアーゼで再消化し、逆相 HPLC でペプチドを分取した。各ピークの一部をアミノ酸分析と放射活性測定に供し、残りをアミノ酸配列分析に用いた。

3) 放射活性の測定

^{14}C - α -EPG-酵素および ^{14}C - α -EPG-ペプチドの放射活性は Aloka 液体シンチレーションカウンタ (Model LSC 900) で測定した。

3. β -アミラーゼの一次構造の比較

一次構造の比較、ホモロジー検索には NBRF-PIR のデータベース (PSQ) およびプログラム DOTMATRIX, ALNED と SCAN を使用した。

結果と考察

1. 一次構造決定

サツマイモ β -アミラーゼの全一次構造決定の方法を Fig.1 に要約して示した。最初にサブユニット当り 6 残基存在する SH 基をカルボキシメチル化した RCM- β -

Table 1. Amino acid composition of sweet potato β -amylase.

	Gram amino acid per 100 g protein ^{a)}	Residues per mol of subunit ^{d)}
Lys	7.02	29.21 (29)
His	1.73	8.00 (8)
Trp ^{b)}	3.03	9.33 (11)
Arg	5.43	20.54 (20)
Asp	13.33	62.85 (65)
Thr	3.90	16.84 (17)
Ser	4.10	20.50 (21)
Glu	11.11	47.05 (47)
Pro	6.14	29.09 (29)
Gly	5.16	42.26 (42)
Ala	5.52	40.19 (40)
1/2Cys ^{c)}	1.80	6.12 (6)
Val	6.29	34.74 (38)
Met	3.41	16.41 (17)
Ile	4.60	21.72 (23)
Leu	8.56	37.42 (37)
Tyr	5.90	21.64 (22)
Phe	5.91	23.54 (24)
Total	102.94	(496)

^{a)} Average or extrapolated values of three determinations of 24, 48 and 72 hr hydrolyzates.

^{b)} Hydrolysis with 4 M methanesulfonic acid (110°C, 24 hr).

^{c)} Determined as S-carboxymethyl-cysteine.

^{d)} Figures in parentheses are from the established sequence.

Table 2. Amino acid compositions of

Amino acid	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6	K-7
Lys	1.02 (1)	1.88 (2)	(1)	1.06 (1)	(1)	0.91 (1)	(1)
His							
Trp ^{a)}				0.95 (2)		0.40 (1)	
Arg						1.05 (1)	
Cm-Cys				0.97 (1)			
Asp	5.00 (5)	1.00 (1)		2.30 (2)		1.08 (1)	
Thr							
Ser	1.13 (1)					1.05 (1)	
Glu		2.96 (3)	(1)	1.15 (1)		2.88 (3)	
Pro	4.57 (5)				(1)		
Gly	3.22 (3)			3.77 (4)	(1)		
Ala	2.06 (2)			2.00 (2)		1.21 (1)	
Val	4.82 (6)	0.98 (1)	(1)	2.58 (3)		1.00 (1)	
Met	1.71 (2)			0.74 (1)			
Ile	1.90 (2)			1.48 (2)			
Leu	3.01 (3)	0.97 (1)				1.89 (2)	
Tyr	2.02 (2)					1.72 (2)	
Phe	1.17 (1)					0.95 (1)	
Total	(33)	(8)	(3)	(19)	(3)	(15)	(1)
Yield (%)	55.2	26.3		50.9		55.3	82
Residue No.	1-33	34-41	42-44	45-63	64-66	67-81	

Amino acid	K-15	K-16	K-17	K-18	K-19	K-20	K-21
Lys	1.18 (1)	1.00 (1)	1.00 (1)	0.86 (1)	1.00 (1)	1.06 (1)	1.11 (1)
His					0.98 (1)		4.56 (5)
Trp				+	(1)		+
Arg		0.71 (1)				0.98 (1)	4.69 (5)
Cm-Cys							1.01 (1)
Asp	2.89 (3)	1.37 (1)	1.00 (1)	1.15 (1)	2.17 (2)	1.43 (1)	5.00 (5)
Thr	2.04 (2)	1.87 (2)	0.98 (1)	1.00 (1)			2.84 (3)
Ser				1.44 (1)			2.96 (3)
Glu		0.94 (1)			3.36 (3)		5.17 (5)
Pro	0.89 (1)	0.99 (1)					1.77 (2)
Gly	2.12 (2)	1.05 (1)	1.16 (1)		1.37 (1)	1.38 (1)	4.39 (4)
Ala	1.01 (1)				1.06 (1)	2.00 (2)	8.56 (9)
Val					1.01 (1)	2.54 (3)	2.68 (3)
Met			0.69 (1)				1.46 (2)
Ile					1.22 (2)	0.91 (1)	1.59 (2)
Leu				1.00 (1)	1.75 (2)	1.10 (1)	4.14 (4)
Tyr	1.00 (1)	1.11 (1)		0.97 (1)			2.61 (3)
Phe		1.60 (2)		2.07 (2)		0.93 (1)	2.01 (2)
Total	(11)	(11)	(5)	(9)	(14)	(12)	(61)
Yield (%)	27.3	47.2	37.2	14.2	29.6	21.6	33.4
Residue No.	236-246	247-257	258-262	263-271	272-285	286-297	298-358

^{a)} Low recovery is due to the HCl hydrolysis.

Peptides K-3, K-5, K-7 and K-26 were not isolated directly because they were eluted in void volume of C18 column. Their residue numbers were accounted based on the overlap sequences from V8-peptides.

Figures in parentheses are from the established sequence.

API peptides from RCM- β -amylase.

Amino acid	K-8	K-9	K-10	K-11	K-12	K-13	K-14
Lys	1.00 (1)	0.97 (1)	1.06 (1)	1.00 (1)	0.96 (1)	1.01 (1)	1.00 (1)
His		1.01 (1)					
Trp ^{a)}		+ (1)		+ (1)	+ (1)		+ (1)
Arg			5.24 (6)	0.98 (1)			
Cm-Cys	0.48 (1)	0.91 (1)		1.41 (2)			
Asp		3.00 (3)	9.77(11)	3.05 (3)	1.00 (1)		1.81 (2)
Thr			1.85 (2)	1.03 (1)			
Ser		1.18 (1)	2.29 (2)	1.12 (1)			
Glu		3.75 (4)	5.61 (6)	6.16 (6)		1.00 (1)	1.98 (2)
Pro		1.72 (2)	0.95 (1)	2.88 (3)			0.94 (1)
Gly	1.07 (1)	3.79 (4)	3.49 (3)	6.56 (7)			2.05 (2)
Ala		2.20 (2)	3.00 (3)	2.80 (3)	0.95 (1)	0.91 (1)	1.86 (2)
Val		1.84 (2)	1.03 (1)	2.79 (3)	0.96 (1)	0.89 (1)	
Met		0.65 (1)	2.51 (3)		0.81 (1)		0.76 (1)
Ile		5.22 (6)	1.09 (1)	2.64 (3)			
Leu	0.99 (1)	1.33 (1)	4.69 (5)	0.97 (1)			
Tyr			2.94 (3)	2.90 (3)	1.01 (1)		
Phe		1.77 (2)	4.53 (5)	1.86 (2)			
Total	(4)	(32)	(53)	(41)	(7)	(4)	(12)
Yield (%)	26.4	31.5	24.7	63.5	48.8	57.0	53.8
Residue No.	83-86	87-118	119-171	172-212	213-219	220-223	224-235
Amino acid	K-22	K-23	K-24	K-25	K-26	K-27	K-28
Lys	0.91 (1)	1.00 (1)	1.00 (1)	1.68 (2)	(1)	1.00 (1)	
His						1.02 (1)	
Trp	+ (1)						+ (1)
Arg		2.07 (2)	0.87 (1)			1.04 (1)	1.05 (1)
Cm-Cys							
Asp		7.51 (8)	3.62 (4)			5.02 (5)	4.68 (5)
Thr		0.99 (1)	1.66 (2)			1.93 (2)	0.93 (1)
Ser	2.72 (3)		1.74 (2)			3.82 (4)	1.74 (2)
Glu	4.14 (4)	3.32 (3)	1.89 (2)			3.07 (3)	
Pro	1.13 (1)	4.44 (4)				2.84 (3)	3.88 (4)
Gly	0.96 (1)	3.24 (3)	1.09 (1)				2.01 (2)
Ala	0.96 (1)	3.68 (4)				4.45 (5)	
Val	1.91 (2)	2.86 (3)		1.00 (1)		1.02 (1)	2.00 (2)
Met		0.76 (1)	0.65 (1)			1.50 (2)	0.81 (1)
Ile		0.95 (1)				2.70 (3)	
Leu	2.00 (2)	3.95 (4)	6.22 (6)			2.89 (3)	
Tyr		3.13 (3)	0.85 (1)				1.00 (1)
Phe			1.80 (2)	1.16 (1)			1.70 (2)
Total	(16)	(38)	(23)	(4)	(1)	(34)	(22)
Yield (%)	44.3	33.7	24.0	8.1		21.4	65.6
Residue No.	359-374	375-412	413-435	436-439	440	441-474	475-496

Fig.2. RP-HPLC separation of API-peptides derived from RCM- β -amylase.

Column, Cosmosil 5C18P-300 (4.6 $\times$ 150 mm); Solvent A, 0.1% TFA in H₂O; Solvent B, 0.1% TFA in CH₃CN; flow rate, 1.0 ml/min.

Fig.3. RP-HPLC separation of peptides generated from *S. aureus* V8 protease digestion of RCM- β -amylase.

Conditions were the same as described in Fig.2.

アミラーゼを調製し、蛋白質のアミノ酸組成、N-末端アミノ酸配列およびC-末端残基の同定を行った。断片化には、前述のように *Achromobacter* protease I お

よび *S. aureus* V8 protease による消化とブロムシアン分解の3種類の方法を用いた。API-ペプチドは全部単離し、アミノ酸分析と配列分析をした。V8-ペプチドの

Fig.4. HPLC separation of CNBr fragments derived from RCM- β -amylase.

(A) Size-exclusion HPLC. Column, TSK-gel G2000SW (7.5 $\times$ 600 mm); solvent, 0.1% TFA; flow rate, 0.5 ml/min. (B) Ion-exchange HPLC. Column, Protein Pak G-SP (8.2 $\times$ 75 mm); Buffer A, 20 mM HCOONa-1% HCOOH-7M urea; Buffer B, 1 M NaCl in buffer A; flow rate, 0.5 ml/min. (C) RP-HPLC. Column, Cosmosil 5C18P-300 (4.6 $\times$ 150 mm); Solvent A, 0.1% TFA in H₂O; Solvent B, 0.1% TFA in CH₃CN; flow rate, 1.0 ml/min.

Fig.5. Examples of sequence analysis of large fragments.

Prefixes K refers to API-peptides, T and V indicate peptides generated by subdigestion with trypsin and *S.aureus* V8 protease, respectively. Figures in parentheses are the residue numbers in the final alignment.

Fig. 6.

Fig. 7. Time course of inactivation of sweet potato β -amylase by α -EPG.

Enzyme concentration, 1.16×10^{-9} M in 20 mM acetate buffer, pH 4.8 at 25°C. 117 mM α -EPG (●); control (○).

うちでリシン含有ペプチドは、すべて配列分析を行った。次に、ブロムシアンペプチドは、V8-ペプチドのみでは overlap sequence の情報が不十分な箇所のペプチドを優先的に配列分析した。

1) サツマイモ β -アミラーゼの精製

結晶酵素をイオン交換クロマトグラフィー (DE 32) で精製し、SDS-PAGE で均一な画分を集めた。精製酵素は逆相 HPLC およびイオン交換 HPLC で均一であった。Table 1 に一次構造決定に用いた RCM- β -アミラーゼのアミノ酸組成を示した。

2) ペプチドの単離

RCM- β -アミラーゼの API 消化物は、逆相 HPLC で分離した。Fig. 2 で、C18 カラムに吸着されなかったペプチドは尿素が共存しているため、以下の実験には用いなかった。均一でないピークは逆相 HPLC で再クロマトを行い、すべてのペプチドを単離した。API-ペプチドのアミノ酸組成と収率を Table 2 に示した。Fig. 2 において、カラムに吸着されなかったペプチド、K-3、K-5、K-7 および K-26 の残基数は、overlap する

Fig. 8. RP-HPLC separation of ^{14}C - α -EPG-peptide.

(A) Separation of peptides derived from ^{14}C - α -EPG-enzyme by API digestion. Shaded peaks A, B and C were radioactive peptides. (B) Separation of subdigests of ^{14}C - α -EPG-peptides A, B and C with *S. aureus* V8 protease. Column, Cosmosil 5C18P-300 (4.6×150 mm); Solvent A, 0.1% TFA in H_2O ; Solvent B, 0.1% TFA in CH_3CN ; flow rate, 1.0 ml/min.

V8-ペプチドのアミノ酸配列からの値である。V8-ペプチドも逆相 HPLC で分離した。Fig. 3 の V8-ペプチドの逆相 HPLC の溶出図で、ピーク 26 および 27 は、不完全消化物の画分で以下の実験には使用しなかった。この場合も、均一でないピークは再クロマトで精製した。CNBr-ペプチドは、最初に分子排除 HPLC でペプチド

Fig. 6. Complete amino acid sequence of subunit of sweet potato β -amylase.

Prefixes K, E and M indicate the peptides generated by digestion with *Achromobacter* protease I and *S. aureus* V8 protease and CNBr cleavage of RCM- β -amylase, respectively. Peptides were numbered according to their final alignment in the sequence. Solid thin lines (—) indicate peptides whose amino acid compositions were determined. Long thick arrows (→) indicate residues identified by automated Edman degradation. Short arrows to the left (← and ←) indicate the residues identified by hydrazinolysis and CPaseY digestion, respectively.

Table. 3. Amino acid compositions of affinity labeled peptides.

	Residues/mol				
	¹⁴ C- α -EPG-A, B and C	E1	E2-3 (radioactive)	E4	E5
Lys	1.12 (1)				0.73 (1)
His					
Trp	+ (1)			+ (1)	
Arg	1.15 (1)		0.85 (1)		
Cm-Cys	1.24 (2)		0.75 (1)		0.53 (1)
Asp	2.98 (3)	2.09 (2)			0.92 (1)
Thr	1.02 (1)			0.82 (1)	
Ser	1.17 (1)		1.09 (1)		
Glu	6.55 (6)	1.25 (1)	2.13 (2)	2.00 (2)	1.00 (1)
Pro	2.73 (3)		1.70 (2)	0.78 (1)	
Gly	6.60 (7)	1.33 (1)	3.09 (3)	2.89 (3)	
Ala	3.00 (3)	1.00 (1)	2.00 (2)		0.19
Val	2.57 (3)	0.60 (1)	0.81 (1)	0.84 (1)	
Met					
Ile	1.83 (3)	1.58 (2)		0.82 (1)	
Leu	1.18 (1)		0.84 (1)		
Tyr	2.56 (3)		2.09 (2)		1.00 (1)
Phe	2.02 (2)			1.08 (1)	0.98 (1)
Total	(41)	(8)	(16)	(11)	(6)
Peptide (%)	81.26	24.77	41.59	25.50	31.17
dpm (%)	81.00		41.78		

Figures in parentheses are from the established sequence. Yields of peptides and radioactivity are given as overall yield based on the amounts of CM-¹⁴C- α -EPG-enzyme.

の大きさで分画した。Fig. 4 (A) の画分 I は未分解物を含み、画分 VI および VII はアミノ酸分析の結果、ペプチドは存在しなかった。画分 II はイオン交換 HPLC (Fig. 4 (B)) で、画分 III, IV および V は逆相 HPLC で精製した。Fig. 4 (C) に画分 III の逆相 HPLC による分離例を示した。

3) ペプチドのアミノ酸配列分析

API-ペプチドのうち、C18 カラムに非吸着のペプチド (K-3, K-5, K-7 および K-26) 以外は、すべてアミノ酸配列分析をした。大きな断片は、トリプシンあるいは V8-プロテアーゼで再消化後、各ペプチドを単離してアミノ酸分析と配列分析を行った。Fig. 5 に大きな断片の再消化とアミノ酸配列分析の例を示した。V8-ペプチドのうち、リシン含有ペプチドはすべて配列分析を行い、API-ペプチドの overlap sequence を決定した (Fig. 6)。CNBr-ペプチドは API-ペプチドおよび V8-ペプチドの overlap sequence のために必要なペプチドをお

もに配列分析した。各ペプチドのアミノ酸配列を同定した部分は、Fig. 6 において長い矢印で示してある。

4) API-ペプチドの結合順序の決定

Fig. 6 に示したように、RCM- β -アミラーゼを直接センサーで分析して、N-末端から 30 残基の配列を同定した。この情報に基づき、ペプチド K1 および E1 は、N-末端由来のペプチドと帰属が決まった。また、E1 のアミノ酸配列から K1-K2 の配列を証明できた。一方、CNBr-ペプチド M3 は、Leu-19 から Met-52 に相当し、M3 のアミノ酸配列からは K2-K3-K4、および E1-E2 のつながりを証明できた。E3 のアミノ酸配列からは、K4-K5-K6 の結合が明らかになった。同様に、V8-ペプチドおよび CNBr-ペプチドの配列分析の結果から、API-ペプチド K1 から K28 までのすべての overlap sequence を決定した。Fig. 6 に示したように、N-末端アラニンから C-末端アスパラギン酸に至る 496 残基から成る サツマイモ β -アミラーゼサブユニットの

Fig.9. Sequence analysis of affinity labeled peptides of sweet potato β -amylase.

Prefix E indicates peptides generated by subdigestion with *S.aureus* V8 protease. Asterisk shows the residue affinity labeled with ^{14}C - α -EPG. $\longrightarrow$, direct sequencing; $\longrightarrow$, Sequencing after alkaline treatment (0.01 M NaOH, 37°C, 3 hr).

Soybean	(177-198)	I E V G L G P A G E L R Y P S Y P Q S Q G W
Sweet potato	(178-199)	I E V G C G A A G E L R Y P S Y P E T Q G W
Barley	(175-196)	I E V G L G P A G E M R Y P S Y P Q S H G W
<i>B.polymyxa</i> 72	(189-210)	I Y L S G G P S G E L R Y P S Y Y P A A G W
<i>B.polymyxa</i> ATCC	(192-213)	I Y L S G G P S G E L R Y P S Y Y P A A G W
<i>B.circulans</i>	(190-211)	I Y L S G G P S G E L R Y P S Y Y P A A G W

Fig.10. Comparison of amino acid sequence around the affinity labeled Glu residue in β -amylases.

Asterisk indicates the Glu residue affinity labeled with ^{14}C - α -EPG in sweet potato and soybean β -amylases. Figures in parentheses are the residue numbers in mature enzymes from plants and precursors of bacterial enzymes, respectively.

Fig.11. Comparison of sequences of α - and β -amylases by DOTMATRIX.

全一次構造を決定した。

5) C-末端残基の同定

RCM- β -アミラーゼのヒドラジン分解 (100°C, 7時間) で Asp(0.57 モル/モル サブユニット) が検出され

た。CPase Y 消化では、遊離アミノ酸として intact β -アミラーゼからは 37°C, 5 時間で Asp (1.08 モル) と Phe (0.65 モル) が、C-末端ペプチド K28 からは, 37°C, 1 時間で Asp (0.48 モル) と Phe (0.30 モル) が

Fig. 12.

Fig.12. Comparison of amino acid sequences of plant and bacterial β -amylases.

In order to compare the sequences of mature enzymes the signal sequences of precursor of bacterial enzymes and C-terminal regions of *B. polymyxa* enzymes were omitted in the alignment. The conserved regions throughout plants and bacterial β -amylases were boxed.

定量された。さらに C-末端ペプチド K28 のマスマスペクトロメトリー分析の結果も K28 のアミノ酸配列 (Fig.6) と完全に一致した。以上の結果から、本酵素の C-末端アミノ酸配列は Phe・Asp と結論した。

2. アフィニティラベルによる活性部位の同定

1) α -EPG による修飾酵素の調製

本酵素は β -アミラーゼのアフィニティラベル試薬である 2,3-epoxypropyl α -D-glucopyranoside (α -EPG)¹³⁾ で特異的に失活する (Fig.7)。 ^{14}C - α -EPG を用いて、修飾酵素 ^{14}C - α -EPG- β -アミラーゼを調製した。アミノ酸分析と放射活性測定により、修飾酵素中の ^{14}C - α -EPG の結合量は 1 モル ^{14}C - α -EPG/モル サブユニットであった。

2) ^{14}C - α -EPG-ペプチドの単離とアミノ酸配列分析

^{14}C - α -EPG-酵素の API 消化物を逆相 HPLC で分離した。各ピークの一部を採って放射活性を測定し、 ^{14}C - α -EPG-ペプチド、A、B および C を分取した (Fig.

8(A))。これらの放射活性ペプチドはアミノ酸分析と配列分析の結果、同一のペプチドであった。ペプチド A、B および C を集め、*S. aureus* V8 protease で再消化して、逆相 HPLC で分離した (Fig.8(B))。各ペプチドのアミノ酸組成と収率を Table 3 に示した。 ^{14}C - α -EPG-ペプチドのアミノ酸配列分析の結果は Fig.9 に示した。 ^{14}C - α -EPG-ペプチド、A、B および C はサツマイモ β -アミラーゼの Ala-172 から Lys-212 に相当するペプチドであった。これらのペプチドは直接シーケンサーで配列分析すると、Fig.9 に示したように、16 サイクル目には PTH-アミノ酸は検出されなかった。V8-プロテアーゼ再消化によって得られた放射活性ペプチド E2-3 も、直接配列分析では 8 サイクル目には PTH-アミノ酸が検出されなかった。しかし、ペプチド E2-3 を 0.01 M NaOH, 37°C, 3 時間アルカリ処理後、シーケンサーで分析すると、8 サイクル目には PTH-Glu が定量的に回収された。この残基は本酵素の一次構造上、

Glu-187 に相当した。以上の結果から、 α -EPG は活性部位に存在する Glu-187 の側鎖カルボキシル基にエステル結合して、本酵素を失活させるものと結論した。

α -EPG でアフィニティラベルされる活性部位 Glu-187 残基周辺のアミノ酸配列をプログラム SCAN を用い、NBRF-PIR のデータベース (PSQ) で検索した結果を Fig.10 に示した。サツマイモ β -アミラーゼの Glu-187 周辺のアミノ酸配列は、植物および細菌由来の 6 種類の β -アミラーゼを通じてほとんど完全に保存されていた。しかし、SCAN で検索した限りでは、 α -アミラーゼやグルコアミラーゼでは該当する相同なアミノ酸配列は見出されなかった。

3. 種々の β -アミラーゼの一次構造の比較

β -アミラーゼは高等植物とある種の細菌に存在している。現在、その一次構造は大豆¹⁴⁾、大麦¹⁵⁾、*B. polymyxa*^{16,17)} および *B. circulans*¹⁸⁾ のものが報告されている。Fig.11 に、プログラム DOTMATRIX を用いて、サツマイモ、大豆、および *B. polymyxa* の β -アミラーゼとタカアミラーゼ A (*A. oryzae*, α -アミラーゼ) を比較した結果を示した。サツマイモと大豆 β -アミラーゼは非常に相同性が高く、*B. polymyxa* β -アミラーゼは、N-末端側はサツマイモ β -アミラーゼと相同性があり、C-末端側には、 α -アミラーゼとの相同性が存在した。最近の魚住らの報告¹⁹⁾によると、*B. polymyxa* β -アミラーゼの遺伝子上には、 β -アミラーゼにつづいて α -アミラーゼがコードされているとのことで、興味ある事実である。次に、サツマイモ β -アミラーゼと α -アミラーゼ (*A. oryzae*) を比較したが、有意義な相同性は見出されなかった。これら 6 種類の β -アミラーゼの一次構造を、プログラム ALNED を用いてアラインメントした (Fig.12)。植物および細菌由来の β -アミラーゼ 6 種類を通じて、アミノ酸配列がほぼ完全に保存されている領域が少なくとも 6 カ所見出された。Fig.10 に示した活性部位 Glu-187 周辺のアミノ酸配列も、これらの保存性の高い領域の一つに存在している。全体のアラインメントから求められた相同性は、サツマイモ β -アミラーゼは大豆および大麦の酵素に対し、それぞれ 64% および 53% のホモロジーがあり、*B. polymyxa* と *B. circulans* 間のホモロジーは 80% であった。植物と細菌の間では、約 24% のホモロジーが見出された。これらの相同性から考えると、Fig.12 に示した保存性の高い領域には、 β -アミラーゼの構造-機能相関上、重要な残基が存在するものと考えられる。事実、これらの領域中には、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、チ

ロシン、トリプトファン、ヒスチジンなど、一般に反応性に富むアミノ酸残基が存在している。前述のサツマイモ β -アミラーゼの活性部位 Glu-187 周辺のアミノ酸配列は、植物および細菌を通じてほとんど完全に保存されている。この事実は、他の起源の β -アミラーゼにおいても本酵素の Glu-187 に対応するグルタミン酸残基が活性部位である可能性を示唆している。また、サツマイモ β -アミラーゼでは、サブユニット 1 モル当り 1 モルの α -EPG が結合する事実から、本酵素では各サブユニットに活性部位が存在するものと考えられる。

文 献

- 1) A. K. BALLS, M. K. WALDEN and R. P. THOMPSON: *J. Biol. Chem.*, **173**, 9-19 (1948).
- 2) D. FRENCH: *The Enzymes*, 2nd ed., **4**, 345-368 (1960).
- 3) C. T. GREENWOOD and E. A. MILNE: *Adv. Carbohydr. Chem.*, **23**, 281-366 (1968).
- 4) J. A. THOMA, J. E. SPRADLIN and S. DYGER: *The Enzymes*, 3rd ed., **5**, 115-189 (1971).
- 5) 竹田靖史, 檜作 進: 蛋白質, 核酸, 酵素, **76**, 植物酵素蛋白質研究法, 共立出版, 東京, p. 438-443 (1976).
- 6) J. A. THOMA, D. E. KOSHLAND, Jr., J. RUSICA and R. BALDWIN: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **12**, 184-188 (1963).
- 7) Y. TAKEDA, S. HIZUKURI and T. MURAKAMI: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 778-780 (1971).
- 8) 戸田弘子, 垣内欣二, 崎山文夫, 沈 愚萬, 金 俊平: 日本農芸化学会講演要旨集, p. 366, 札幌 (1985).
- 9) Y. TAKEDA and S. HIZUKURI: *Biochim. Biophys. Acta*, **185**, 469-471 (1969).
- 10) T. TSUNASAWA, J. KONDO and F. SAKIYAMA: *J. Biochem.*, **97**, 701-704 (1985).
- 11) H. FRANKEL-CONRAT and C. M. TSUNG: *Methods Enzymol.*, **11**, 151-155 (1967).
- 12) Y. SHIMONISHI, Y.-M. HONG, T. TAKAO, S. AIMOTO, H. MATSUDA and Y. IZUMI: *Proc. Jpn. Acad.*, **57B**, 1631-1637 (1986).
- 13) Y. ISODA and Y. NITTA: *J. Biochem.*, **99**, 1631-1637 (1986).
- 14) 三上文三, 森田雄平, 深沢親房: 生化学, **60**, 211-216 (1988).
- 15) M. KREIS, M. WILLIAMSON, B. BUXTON, J. PYWELL, J. HEJGAARD and I. SVENDSEN: *Eur. J. Biochem.*, **169**, 517-525 (1987).
- 16) T. KAWAZU, Y. NAKANISHI, N. UOZUMI, T. SASAKI, H. YAMAGATA, N. TSUKAGOSHI and S. UDAKA: *J. Bacteriol.*, **169**, 1564-1570 (1987).
- 17) C. RHODES, J. STRASSER and F. FRIEDBERG: *Nucleic Acids Res.*, **15**, 3934 (1987).

- 18) K. W. SIGGENS : *Mol. Microbiol.*, **1**, 86-91 (1987).
19) 魚住信之, 桜井恭子, 佐々木卓治, 山形秀夫, 塚越規弘, 鶴高重三: 日本農芸化学会誌, 62, 講演要旨集, p. 506, 名古屋 (1988).

【質問】

京大食研 三上

1) α -EPG 修飾酵素の消化物の精製過程で, 同一のアミノ酸組成をもつペプチドが三つのピークに分かれる原因について.

2) β -アミラーゼとの相同性で, TAA 以外の α -アミラーゼはどうでしょうか.

【答】

1) 逆相 HPLC によるペプチドマッピングでは, トリプトファン, メチオニン, CM-システインが含まれていると, 同一ペプチドでも 2~3 個のピークに分かれることがよくあります. α -EPG-ペプチドの場合も, トリプトファン (1), CM-システイン (2) が含まれてい

るので, そのためではないかと思われます. α -EPG の結合残基は, Glu-187 のみでした.

2) 動物および *Bacillus subtilis* sp. の α -アミラーゼとも有意な相同性は見出されませんでした.

【質問】

農水省食総研 谷口

exo 型酵素として β -アミラーゼは糖鎖の非還元末端を認識していると考えられますが, どのアミノ酸残基がこの認識に関与しているのか, 何か data あるいはお考えはあるでしょうか.

【答】

β -アミラーゼの作用機作を考える上で, 大変重要な問題と思いますが, 目下, 実験データはありません. 今後, β -アミラーゼの立体構造が解明できれば新しい知見が得られるものと考えています.

(平成元年 2 月 8 日受付)