等電点分画とゲルろ過による *Rhizopus* グルコアミラーゼの性質

半田 隆, 峯木 茂, 飯塚 廣

東京理科大学理学部応用化学科

Characterization of Glucoamylase from *Rhizopus* by Isoelectric Focusing and Gel Filtration

Takashi HANDA, Shigeru MINEKI and Hiroshi IIZUKA

Department of Applied Chemistry, Faculty of Science,
Science University of Tokyo, Shinjuku-ku, Tokyo

Glucoamylases (EC 3.2.1.3) (GA) from *Rhizopus* sp. strain Fukumoto could be separated into several forms by Ampholine isoelectric focusing (IEF) and by gel filtration on Sephadex G-50. Their isoelectric points separated by IEF were 6.7, 7.4, 7.9, 8.3 and 8.7, and they were designated as GA-6.7, GA-7.4, GA-7.9, GA-8.3 and GA-8.7, respectively. Among them, GA-7.9 and GA-8.3 were the main constituents of GA and each of them was separated further to two forms by gel filtration on Sephadex G-50, and they were designated as GA-7.9 I, GA-7.9 II, GA-8.3 I and GA-8.3 II, in the order eluted from the column. GA-7.9 II and GA-8.3 II digested raw starch from potato more rapidly than GA-7.9 I and GA-8.3 I, respectively. But the mobility of GA-7.9 I coincided with that of GA-7.9 II, and the mobility of GA-8.3 I did with that of GA-8.3 II in polyacrylamide gel electrophoresis at pH 4.0. Their molecular weights were all approximately 53,000 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

(Received May 20, 1976)

生澱粉分解に対するグルコアミラーゼ (GA) の多様性は種々報告されており、上田¹⁾は黒麹菌の糖化型アミラーゼにおいて、生澱粉に吸着しそれをよく分解する GA とその力の微弱なものを分離した。また、林田²⁾は黒麹菌の GA にその作用が中間型であるものが多数存在することを示した。さらに、上田ら^{3,4)}は *Rhizopus* の糖化型アミラーゼで生澱粉分解力の強いものと弱いものを玉蜀黍澱粉への吸着を利用して分離した。その他、*Mucor rouxianus*⁵⁾, *Aspergillus niger*⁶⁾, *Asp. cinnameus*⁷⁾ にも、2種の GA が存在することが示された。

一方、菌体抽出液のような粗酵素の等電点分画による等電点の多様性は、*Stereum sanguinolentum*⁸⁾, *Fomes annosus*⁹⁾, また *Chrysosporium lignorum*⁹⁾ のセルラーゼやキシラナーゼ、さらに、*Staphylococcus aureus*⁹⁾ のプロテアーゼなどについても報告されている。

今回、著者らは *Rhizopus* の GA の不均一性を研究する目的で粗酵素を等電点分画し、ついでセファデックス G-50 によるゲルろ過で精製したところ、GA 活性が数種に分かれることを認めたので報告する。

実験方法

1. 粗酵素

使用酵素は、大阪市大福本名誉教授から供与された *Rhizopus* sp. strain Fukumoto の GA 粗酵素で、これは麴糖培養物を水抽出後、硫酸塩析し、pH 4~5 でゼオライト A2 を通して酸性プロテアーゼを除いたものである。

2. アミラーゼ活性の測定

0.1% 可溶性澱粉 (純正化学) 2 ml に 1/10 M 酢酸緩衝液 (pH 4.7) 2 ml を加え、40°C に 10 分間保った後、酵素液 10 μ l を加えた。40°C で 30 分間反応させ、100°C に 10 分間保つことによって失活させた。

1) 液化力 上記反応液 2 ml に KI-I₂ 溶液 (KI: 0.5 g/l, I₂: 6.25 mg/l) 2 ml を加え、660 nm における吸光値 (D) を測定し、酵素フリーの対照値 (D_0) に対する退色度、 $(D_0 - D)/D_0$ で表わした。

2) 糖化力 上記反応液 4 ml 中にグルコース 10 μ g を生成する酵素量を 1 単位とした。グルコースの定量は、グルコースオキシダーゼ (purified, Sigma) を用いる方法¹⁰⁾ によった。なお、各精製段階における比活性は基質に 0.1% アミロース (試薬のポテトアミロースを

エタール-ジメチルスルホキシド系で沈殿分別, MW 124,000) を用い, 糖化力を酵素液量 (ml) および O.D.₂₈₀ で除した値 (unit/ml·O.D.₂₈₀) で表わした。

3) 生澱粉糖化力 ポテト澱粉 (和光純薬) 20 mg を 2 ml の蒸留水に懸濁し, 1/10 M 酢酸緩衝液 (pH 4.7) 1.9 ml を加え, 40°C に 10 分間保った後, 酵素液 0.1 ml を加えて攪拌し, 40°C で 5 時間反応させた。熱失活後, 上澄液のグルコースを前項と同様に測定し, 上澄 4 ml 中にグルコース 10 μg を生成する酵素量を 1 単位 とした。

3. 酵素の精製法

1) 等電点分画 容量 110 ml のカラム (LKB Produkter AB, Sweden) を用い, 粗酵素 20 mg を中ほどに添加して, 5°C のもとに Vesterberg, Svensson¹¹⁾ の方法に従って行なった。泳動後, 2 ml ずつ分取し, 直ちに pH メーター (日立-堀場 F-5 形) を用いて pH を測定した。さらに, 1/10 M 酢酸緩衝液 (pH 4.7) 2 ml を加えた後, 蛋白含量の指標として日立 EPS-3T 形分光光度計を用いて, O.D.₂₈₀ ならびに α-アミラーゼ活性を測定した。こうして得た活性画分のうち, 液量の多いものは, ダイアフィルター G-05T (分子量分画 5,000; バイオエンジニアリング K.K.) を使用して, 5°C のもとに限外ろ過で濃縮した。

2) セファデックス G-50 によるゲルろ過 等電点分画によって得た活性画分を 1/1,000 M 酢酸緩衝液 (pH 4.7) で緩衝化したセファデックス G-50 カラム (26×450 mm) に加え, 溶出は同緩衝液で 5°C のもとに 2 ml ずつ分取し, 12 ml/hr で行なった。

なお, ディスク電気泳動は pH 4.0 の酢酸-グリシン緩衝液を用いる Nagai ら¹²⁾ の方法によった。

4. 酵素の分子量測定

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により, 標準蛋白としてミオグロビン (Miles-Seravac, MW 17,200), トリプシン (Sigma, MW 23,300), 卵アルブミン (東京化成, MW 43,000) および牛血清アルブミン (N.B.C., MW 67,000) を用い, 林ら¹³⁾ の方法に準拠して行なった。また, 上記標準蛋白と GA 粗酵素を用いて, 1/10 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5, 5°C) でのセファデックス G-100 カラム (27×600 mm) によるゲルろ過の溶出液量からも推察した。溶出は 4 ml ずつ分取し, 12 ml/hr で行なった。

5. 酵素反応生成物の分析¹⁴⁾

酵素反応生成物は, 薄層クロマトグラフィー (TLC) で確認した。キーゼルグール G (Merck) を 0.3 mm の厚さにプレートし, 展開液には n-ブタノール:ピリジン:水 (6:3:1) を用い, 発色剤には 4% ジフェニルアミン・アセトン-4% アニリン・アセトン-リン酸

Fig. 1. Ampholine isoelectric focusing of partially purified glucoamylase.

Isoelectric focusing was carried out at 5°C for 44 hr under 500V, with carrier ampholyte with a pH range of 6 to 9. Bracketed fractions were pooled and used in the next step.

(D₀-D)/D₀: liquefying activity, SA: saccharogenic activity, A. GA-6.7, B. GA-7.4, C. GA-7.9, D. GA-8.3, E. GA-8.7.

—●— O.D.₂₈₀, —○— SA, —▲— pH, —△— (D₀-D)/D₀.

(5:5:1) を用いた。

実験結果および考察

1. 酵素の精製

Rhizopus GA 粗酵素をまず pH 3.5~10 の等電点分画にかけ, 蛋白分布と活性分布を調べた。その結果, 液化作用を示す α-アミラーゼの等電点は 4.7 で, 鋭い活性ピークを示したが, 糖化作用のみを示す GA の活性はなだらかで広範囲 (pH 6~9) にわたり, 不均一性が示唆された。そこで, この点を明確にすべく pH 6~9 の等電点分画を行なった。すなわち, まず試料を入れずに pH 3.5~10 の等電点分画を行ない pH 6~9 の画分を得, これを用いてアンフォライン (LKB Produkter AB, Sweden) の最終濃度が 1% (w/v) となるようにして本酵素の等電点分画を行なった。この結果 (Fig. 1), GA の糖化活性のピークが pH 6.7, 7.4, 7.9, 8.3 および 8.7 に認められた。等電点のちがいが, それぞれ GA-6.7, GA-7.4, GA-7.9, GA-8.3 および GA-8.7 とし, 図に示す部分を回収した。これらの O.D.₂₈₀, 酵素液量, 比活性ならびに全活性を Table 1 に示した。この表から, GA-7.9 および GA-8.3 が本 GA の主要をなしていることがわかる。この段階での活性回収率は, 36.4% であった。

等電点分画で得られた活性画分のうち, GA-6.7, GA-7.4 および GA-8.7 は直接, 一方, GA-7.9 および

Fig. 2. Gel filtration of glucoamylase separated by isoelectric focusing on a Sephadex G-50 column.

Column size: 2.6×45 cm, solvent: 0.001 M acetate buffer adjusted to pH 4.7, A. GA-6.7, B. GA-7.4, C. GA-7.9, D. GA-8.3, E. GA-8.7.

—●— O.D.₂₂₀, —○— saccharogenic activity, —▲— sucrose.

GA-8.3 は液量が多いため限外ろ過で濃縮後、セファデックス G-50 によるゲルろ過で精製した (Fig. 2)。蛋白指標は、蛋白濃度が低いため Fig. 2 では O.D.₂₂₀ で示した。なお、シヨ糖の検出にはフェノール硫酸法¹⁵⁾を用いた。この結果から、GA がシヨ糖およびアンフォライン (活性を示さない O.D.₂₂₀ のピーク) と分離されたと考えられる。GA-6.7 (Fig. 2A), GA-7.4 (Fig. 2B) および GA-8.7 (Fig. 2E) は1つの活性ピークを示し

Table 1. Saccharogenic activity of each glucoamylase obtained by isoelectric focusing.

	O.D. ₂₈₀	V (ml)	SA*	TA**
GA-6.7	0.144	7.6	5080	5600
GA-7.4	0.121	7.8	7570	7100
GA-7.9	0.133	11.2	7820	11600
GA-8.3	0.086	11.5	10560	10400
GA-8.7	0.251	7.7	4340	8400

* specific activity (unit/ml·O.D.₂₈₀),
original enzyme : 6, 130.

** total activity (unit),
original enzyme : 118, 700.

Table 2. Saccharogenic activity of each glucoamylase obtained by gel filtration on a Sephadex G-50.

	O.D. ₂₈₀	V (ml)	SA*	TA**
GA-6.7	0.017	11.3	1320	250
GA-7.4	0.027	10.9	1130	390
GA-7.9 I	0.020	15.5	3600	1120
GA-7.9 II	0.022	5.6	2910	360
GA-8.3 I	0.020	13.4	3060	820
GA-8.3 II	0.031	5.3	2810	460
GA-8.7	0.025	11.4	3650	1040

* specific activity (unit/ml·O.D.₂₈₀).

** total activity (unit).

たが、GA-7.9 (Fig. 2C) および GA-8.3 (Fig. 2D) は2個の活性ピークを生じ、これらを溶出順に GA-7.9 I, GA-7.9 II, また GA-8.3 I, GA-8.3 II とした。それぞれの活性区分を回収し、O.D.₂₈₀, 酵素液量, 比活性ならびに全活性を Table 2 に示した。この段階での活性回収率は、約 4% であった。永井¹⁶⁾ は、一般に低濃度の酵素を低イオン強度の状態におくと不安定になると述べているが、本実験における比活性の大幅な低下は、ゲルろ過の際、このような状態になり、かなり失活したためと思われる。従って、本酵素も同様な性質をもつものと推察される。

ゲルろ過で精製した各 GA をディスク電気泳動にかけたが、GA-6.7 以外はいずれも単一バンドを示した (Fig. 3a~f)。また、GA-7.9 の I と II をまぜたもの、および GA-8.3 の I と II を混合したもの、それぞれ単一バンドを示した (Fig. 3 g, h)。

Fig. 3. Disc electrophoresis of the purified glucoamylase.

To a polyacrylamide gel column (5×70 mm), 0.2 ml of each enzyme solution was applied and subjected to the electrophoresis at a current of 2.0 mA/gel for 120 (a, b, d, f, g) and 150 (c, e, h) min in acetic acid-glycin buffer, pH 4.0.

a. GA-7.4, b. GA-7.9 I, c. GA-7.9 II, d. GA-8.3 I, e. GA-8.3 II, f. GA-8.7, g. the mixture of GA-7.9 I and GA-7.9 II, h. the mixture of GA-8.3 I and GA-8.3 II.

2. 酵素の諸性質

1) 至適温度 30°C~65°C の 5°C 間隔の各温度で 30 分間反応させ、糖化力を測定した。その結果、いずれも 55°C が至適温度であった。

2) 至適 pH pH 3.0~8.0 の 1/20 M McIlvaine の緩衝液を用い、温度はすべて 40°C で行なった。その結果、至適 pH は GA-8.3 I と GA-8.3 II のみ 5.1 で、他は 5.5 であった。

3) 温度安定性 酵素を pH 4.7 で 35°C~65°C の 5°C 間隔の各温度に 30 分間保ち、急冷後 40°C で残存活性を測定した。その結果、いずれも 50°C 以下で安定であり、55°C では残存活性が約 60% であった。

4) pH 安定性 1/20 M ホウ酸緩衝液および 1/20 M McIlvaine 緩衝液を用い、30°C で酵素を種々の pH に 24 時間保った後、1/10 M 酢酸緩衝液で pH を調節し、残存活性を測定した。その結果、いずれも pH 3.5~7.5 で安定であった。

5) K_m 値 0.01%~0.1% の可溶性澱粉溶液を 0.01% または 0.02% 間隔で調整し、40°C で 20 分間反応させてグルコース生成量を求めた。 K_m 値は Lineweaver-Burk の式に準じて求めた。その結果、GA-7.9 II (0.015%) は GA-7.9 I (0.019%) に比べ、また GA-8.3 II (0.018%) は GA-8.3 I (0.021%) に比べて、やや低い値を示した。他は、0.022~0.023% であった。

6) 酵素反応生成物 4% 可溶性澱粉を基質として、各 GA の反応生成物を基質分解率 2.1~26.6% のものにつき TLC で確認した。この結果 (Fig. 4), GA-6.7 は DP 10 付近のオリゴ糖がわずかにみられたが、これは α -アミラーゼの混在のためと思われる。他は、すべてグルコースのみであった。

Fig. 4. Thin layer chromatogram of digests of soluble starch with purified glucoamylases.

Thin layer: Kieselgur G, solvent system: *n*-butanol-pyridine-water (6:3:1, by vol.), locator: 4% diphenylamine-acetone-4% aniline-acetone- H_3PO_4 (5:5:1, by vol.), abbreviations: G=glucose, M=maltose, Tr=maltotriose, Te=maltotetraose, P=maltopentaose.

a. GA-6.7, b. GA-7.4, c. GA-7.9 I, d. GA-7.9 II, e. GA-8.3 I, f. GA-8.3 II, g. GA-8.7.

Fig. 5. Estimation of molecular weight of the purified glucoamylase by SDS-polyacrylamide gel disc electrophoresis.

a. bovine serum albumin, b. purified glucoamylase, c. ovalbumin, d. trypsin, e. myoglobin.

7) 酵素の分子量 GA の分子量は、SDS 電気泳動で推定した (Fig. 5)。標準蛋白の分子量の対数と R_f 値の間には、ゆるやかな曲線関係があり、いずれの GA も分子量は約 53,000 であった。なお、セファデックス G-100 (1/10 M 酢酸緩衝液 pH 5.5) による GA 粗酵素のゲルろ過では、約 52,000 の値が得られた。従って、GA-7.9 II と GA-8.3 II は、低塩濃度 (1/1,000 M 酢酸緩衝液 pH 4.7) でのセファデックスにある程度吸着したものと思われる。

8) 基質に対する比活性 アミロース、アミロペクチン (東京化成)、可溶性澱粉およびポテト生澱粉を基質として、その基質特異性を検討した (Table 3)。生澱粉との反応は 5 時間であるが、表には 30 分に換算 (0.1 倍) して示した。他は、すべて 30 分の反応である。Table 3 において重要なのは、GA-7.9 I と GA-7.9 II のちがい、および GA-8.3 I と GA-8.3 II のちがいであ

Table 3. Specific activity of each glucoamylase for various substrates.

	Amylose	Amylo- pectin	Soluble starch	Raw starch
[S] (g/l)	1	1	10	10
GA-6.7	1320	1530	2490	133
GA-7.4	1130	1620	2100	117
GA-7.9 I	3600	5280	8440	256
GA-7.9 II	2910	3740	5600	307
GA-8.3 I	3060	3690	6440	156
GA-8.3 II	2810	3120	4930	210
GA-8.7	3650	4530	7580	149

unit/ml·O.D.₂₈₀, hydrolysis degree(%): amylose 1.1-2.3, amylopectin 1.7-3.8, soluble starch 0.2-0.5, raw starch 0.1-0.3.

る。すなわち、アミロース、アミロペクチンおよび可溶性澱粉では、GA-7.9, GA-8.3 とも I が II に比べて大きな値を示したが、ポテト生澱粉を基質としたときには、この関係が逆転した。

以上の結果、*Rhizopus* sp. strain Fukumoto の GA に関し、等電点の差およびセファデックス G-50 でのゲルろ過の溶出液量 (V_e) の差、さらに基質特異性によって GA 酵素の不均一性を確認した。

本実験で使用した *Rhizopus* sp. strain Fukumoto の GA は等電点的に 5 個の活性ピークが認められ、主要ピークを GA-7.9 と GA-8.3 に示したが、この 2 種の GA は至適 pH と K_m がわずかに異なっていた。これに比べ、他ピークの活性は GA-8.7 が多少低く、それ以外は大幅に低い。また、GA-7.9 と GA-8.3 における I と II の違いは、セファデックス G-50 での V_e 、さらには基質特異性において確然としていた。これらの事実は、I と II が酵素本来の不均一性に基づくものと考えてよいであろう。従って、本酵素には不均一性が存在し、最低 2 種の GA が存在することが明らかとなった。

その後の辻阪ら¹⁷⁾の報告によると、*Rhizopus* の GA は少なくとも 4 種 (Ga, Gb, Gc, Gd) 存在することが示された。等電点と分子量に関して、著者らの GA-7.9 と GA-8.3 が Gb に、GA-8.7 が Ga に似ている。

要 約

1) *Rhizopus* sp. strain Fukumoto の GA 粗酵素を等電点分画した結果、5 個の活性ピークが認められ、主要ピークを GA-7.9 および GA-8.3 とした。

2) GA-7.9 と GA-8.3 はゲルろ過により、さらに

2 活性区分に分離され、溶出順にそれぞれ GA-7.9 I, GA-7.9 II, また、GA-8.3 I, GA-8.3 II とした。

3) GA-6.7 を除く各 GA は、pH 4.0 のディスク電気泳動で単一バンドを示し、GA-7.9 I と GA-7.9 II の混合物、GA-8.3 I と GA-8.3 II の混合物もまた単一バンドを示した。

4) これらの GA の至適温度は 55°C であり、50°C 以下で安定であった。至適 pH は GA-8.3 の I と II のみ 5.1 で他は 5.5 であり、pH 3.5~7.5 で安定であった。可溶性澱粉に対する K_m は、GA-7.9, GA-8.3 とも I が II よりやや大きな値を示し、他はさらに大であった。また、分子量はほぼ同じで約 53,000 と推定された。

5) GA-7.9 と GA-8.3 の I と II は、アミロース、アミロペクチンおよび可溶性澱粉に対しては I が II に比べて強い活性を示したが、ポテト生澱粉を基質としたときには、逆に II が I より強い活性を示した。

終りにのぞみ、本研究中の等電点分画、電気泳動は、東京理大守屋寛教授のご厚意により、薬学部生理化学教室の装置を借用させていただきましたことを記し、ここに深謝の意を表します。また、ご便宜を計っていただいた同教室員の皆様に感謝いたします。

本報告は、昭和50年度の日本農芸化学会大会で発表した。

文 献

- 1) Ueda, S.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **21**, 379 (1957)
- 2) 林田晋策: 第14回酵素化学シンポジウム予講集, 16 (1962)
- 3) 上田誠之助, 加納 説: 農化関西西日本支部合同大会講演 (那覇) (1974)
- 4) 上田誠之助: 澱粉科学, **21**, 210 (1974)
- 5) Tsuboi, A., Yamasaki, Y. and Suzuki, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 543 (1974)
- 6) Pazur, J.H. and Ando, T.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 1966 (1959)
- 7) 久留島通俊, 佐藤淳司, 北原覚雄: 農化, **48**, 379 (1974)
- 8) Ahlgren, E. and Eriksson, K.-E.: *Acta Chem. Scand.*, **21**, 1193 (1967)
- 9) Vesterberg, O., Wadström, T., Vesterberg, K., Svensson, H. and Malmgren, B.: *Biochim. Biophys. Acta*, **133**, 435 (1967)
- 10) Papadopoulos, N.M. and Hess, W.C.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **88**, 167 (1960)
- 11) Vesterberg, O. and Svensson, H.: *Acta Chem. Scand.*, **20**, 820 (1966)
- 12) Nagai, Y., Gross, J. and Piez, K.A.: *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, Art. 2, 494 (1964)
- 13) 林 健志, 大場義樹: 蛋白質 核酸 酵素, **17**, 304 (1972)

- 14) 永井喜治：修士論文（東京理科大学理学部）（1970）
- 15) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: *Anal. Chem.*, 28, 350 (1956) ; *idem*: *Nature*, 168, 107 (1951)
- 16) 永井 裕：蛋白質 核酸 酵素, 18, 1170 (1973)
- 17) 辻阪好夫, 浜田信威, 竹西繁行：日農化大会講演要旨, 34 (1976)

（昭和51年 5 月20日受理）