タカアミラーゼ A の光不活性化*

金 三 純 (九州大学農学部)

昭和 39 年 8 月 15 日 受 理

緒 言

蛋白質の変性や酵素の不活性化が、紫外線による直接照射や光増感色素分子共存下での可視線照射、すなわち間接照射によって惹起されることは古くから知られている。増感剤色素としてはエオシン^(1,2), メチレン青⁽³⁾, プロフラビン⁽⁴⁾等の蛍光性色素が多く用いられ、これらの励起色素分子による化学反応によって変性や不活性化が起る。たとえば色素分子の光増感反応による卵白アルブミン⁽⁵⁾, β -ラクトグロブリン⁽⁶⁾, リボヌクレアーゼ⁽⁷⁾, リゾチーム⁽⁸⁾などの蛋白質や酵素の光変性ないし光不活性化, トリプトファン, チロシン, ヒスチジン, メチオニン, グルタチオンなど種々のアミノ酸⁽⁹⁾の光酸化が, 光照射に伴う吸収スペクトルの変化, 酸素吸収などの面から研究がされている。しかし使用されている多くの増感色素はいずれも人工色素であるので, 生体物質に対する光反応の要素的過程を知るためにはよいけれども, 生体内には直接含まれないものが多く, 適当なものとはいえない。したがって, 生体内に普遍的に存在する色素を増感色素としてその光生物作用を研究することは, より好ましいと思われる。生体色素リボフラビンはいわゆる黄色酵素の成分として, Warburg らにより初めて発見された重要な生体色素であり, 動植物体に広く含まれ, 生体内ではフラビン-モノヌクレオチド (FMN), またはフラビン-アデニン-ジヌクレオチド (FAD) として蛋白質, 金属イオンとの協力の下に酸化還元反応を営んでいる。この色素は酵素アミラーゼ, ウレアーゼ, 抗体, バクテリオファージなどの光不活性化や, インドール酢酸, トリプトファンなどインドール核を持つものの光酸化に有効な増感色素である⁽¹⁰⁾。われわれはリボフラビンを光増感剤として, タカアミラーゼ A-リボフラビン光増感反応系を構成し, 光不活性化を追求すると共に酵素単独系における酸化試薬 N-ブロムコハク酸⁽¹¹⁾ による熱酸化

的不活性化との比較研究を行った。また酵素単独系における紫外線照射による不活性化反応およびその作用スペクトルの測定を行い, 直接照射による光不活性化に寄与するアミノ酸残基を求めた。これらの結果を光不活性化反応におけるリボフラビンおよびトリプトファン残基の蛍光強度変化の測定結果, ならびにトリプトファンの光酸化の定量結果と合せ, アミラーゼ酵素の光不活性化と特にトリプトファン残基との関係を求めた。

材料および実験方法

使用したタカアミラーゼ A は三共のタカジアスターゼから赤堀の方法⁽¹²⁾に従って分離し, さらに 3 回再結晶したのち使用した。濃度 0.5% のアミラーゼ溶液 (pH 5.6, 0.2 M 酢酸緩衝液) を原液とし, 暗所に冷蔵し使用に際しては pH 5.6 の酢酸緩衝液によって適宜稀釈して用いた。活性の測定は 40° の恒温槽中で行い, 基質として可溶性澱粉 (片山製薬) を用い, 青化法⁽¹³⁾に従った。ヨウ素-澱粉複合体の濃度は 700 m μ の吸光度をメジュアとして, 日立の分光光度計で測定した。反応開始 10 分後の 700 m μ における吸光度の値から求めた平均の吸光度の減少速度を活性度とした。

光不活性化を調べるための光照射の光源としては, 直接照射には高圧水銀ランプを用い, 色素増感による間接照射には 500 W プロジェクションランプを用いた。いずれの場合も光学フィルター系により分離された光でアミラーゼ, あるいはリボフラビン (450 m μ 吸収帯) を照射した。試料は 20° の恒温水槽中におき, $\pm 0.1^\circ$ 以内に定温に保たれた。蛍光強度測定には東芝クセノンランプ (300 W)-モノクロメーター系で得られた単色光で試料を励起し, アミラーゼおよびリボフラビンの蛍光は光学フィルターにより励起光から分離し, ホトマルチプライヤーで強度を測定した。アミラーゼの紫外線による光不活性化の作用スペクトルはクセノンランプよりの単色光を試料溶液に一定時間照射し, 各励起波長に対し活性を測定し, 光不活性化の量子収量の相対値から求めた。吸収スペクトルは日立の分光光度計によって測定した。

* Photoinactivation of Taka-Amylase A.

By Sam Soon KIM (Faculty of Agriculture, Kyushu University)

アミラーゼ中のトリプトファンの定量は、キサントヒドロール⁽¹⁴⁾を用い、試料-キサントヒドロール混合系を98°で5時間煮沸して500 mμにおける吸光度から、キサントヒドロール-トリプトファン複合体を定量することによって行われた。また可能な場合はアミラーゼの280 mμにおける吸光度からも定量した⁽¹⁵⁾。アミラーゼ中のトリプトファンの熱的酸化による不活性化と光不活性化とを比較するために、N-ブロムコハク酸を用い熱的酸化を行った⁽¹¹⁾。使用した増感剤色素リボフラビンはメルク分析用のものを用いた。

実験結果と考察

アミラーゼ-リボフラビン共存系(pH 5.6 酢酸緩衝液)でリボフラビンの450 mμの吸収の吸収帯を光照射するとアミラーゼの不活性化が起る。すなわち光増感不活性化が惹起される。

第1図(1)にはアミラーゼの活性の光照射時間による変化を示してある。アミラーゼの活性は照射時間、すなわち照射光量と共に照射光量=0の近傍を除き、指数函数的に減少を示すことが分る。

第2図(2)にはアミラーゼの光不活性化の相対量子収

第1図 タカアミラーゼAの紫外線照射およびリボフラビン共存系における可視光線照射による不活性化

[アミラーゼ]= 1.64×10^{-6} M, pH=5.6 (酢酸緩衝液)

[リボフラビン]= 7.8×10^{-6} M

A_0 , Aはそれぞれ光照射の前後における活性

(1) アミラーゼ-リボフラビン系 可視線照射

(2) アミラーゼ単独系 紫外線照射

第2図 タカアミラーゼAの光不活性化, トリプトファン残基の光酸化, トリプトファンの光酸化のリボフラビン濃度依存性ならびにリボフラビンの蛍光の濃度消光

[アミラーゼ]= 2.13×10^{-6} M, pH=5.6 (酢酸緩衝液)

[トリプトファン]= 1.94×10^{-4} M

(1) アミラーゼのトリプトファン残基(○), トリプトファン(×)のリボフラビンによる光増感酸化の相対量子収率

(2) アミラーゼのリボフラビンによる光増感不活性化の相対量子収率

(3) リボフラビンの蛍光の濃度消光 (アミラーゼの共存しない系)

率のリボフラビン濃度依存性を示す。リボフラビンの光増感不活性化の量子収率は高濃度域では減少する。これは色素の高濃度域では、リボフラビンの励起状態の濃度消光過程(自己消光過程)が介入し、光化学反応に有効な励起色素分子の生成確率が減少するためである。よく知られているように、このような消光過程は色素分子の多量体形成並びに励起色素分子と基底色素分子との衝突による。このことは、アミラーゼの共存しない水溶液系でのリボフラビンの蛍光収率のリボフラビン濃度依存性を示す第2図(3)からも知られる。アミラーゼの光不活性化の半減値濃度は 3×10^{-6} Mでリボフラビン単独系の蛍光の濃度消光の半減値 4.5×10^{-5} Mより遙か低濃度である。この理由は色素分子が蛋白質に吸着することによって局所濃度が増大し、濃度消光がより効果的に起るため、光反応に必要な励起色素分子種の生成確率が減少するからと考えられる。

第1図(2)にはアミラーゼ単独水溶液系での紫外線の直接照射による活性の照射時間による変化を示してある。一般に酵素分子中の1個所が“1 hit”で不活性化される場合には、強度 I の光照射を照射時間 t だけ受けたとき、活性を有する分子数(N)と光照射前の活性分子数(N_0)との比は

$$N/N_0 = e^{-(\phi a)(It)} = e^{-\sigma D}$$

で示される⁽¹⁶⁾。ただし ϕ は光不活性化の量子収率, a は吸収断面積で $\phi a = \sigma$, $It = D$ はそれぞれ光不活性化の断面積および入射光量である。

また酵素分子の同等な p 個所に各々 1 hit を受けて不活性化される場合には

$$N/N_0 = 1 - (1 - e^{-\sigma D})^p$$

となる⁽¹⁶⁾。この場合は $\log N/N_0 - D$ の曲線は $D=0$ では傾斜は 0 で, $D \gg 0$ では直線に近づく。直線部分を $D=0$ に外挿したときの $\log N/N_0$ の値は光不活性化過程の多重度を示す。紫外線照射によるアミラーゼの光不活性化の場合, $N/N_0 = A/A_0$ (A_0 , A はそれぞれ光照射前, 後における活性) と考えられるので, 第 1 図 (2) の直線部分の外挿値を求めると 1.8 を得る。このことはアミラーゼ分子中の 2 個所がそれぞれ 1 hit を受けて不活性化されることを意味する。しかし p 個の標的が同等でない場合には上記の式はそのまま用いられないが, 曲線 (2) の形から少なくともアミラーゼの紫外線による不活性化は 1 hit 型よりも 2 hit 型に近いものと考えられよう。色素増感不活性化の場合は厳密にはこの“hit 説”を適用できないが, かりに適用すると第 1 図 (1) から外挿値 1.2 を得る, すなわち 1 hit 的であることが分る。

光増感色素の共存下ではトリプトファン, チロシン, ヒスチジン, メチオニンなどのアミノ酸は遊離状態でも, 蛋白質の構成成分として存在するときでも色素の光増感によって酸化されることが知られている^(8,4)。第 2 図 (1) はリボフラビン共存下におけるアミノ酸トリプトファンとアミラーゼ中のトリプトファン残基の光酸化の相対量子収率のリボフラビン濃度依存性を示している。これらの酸化トリプトファンの定量はキサントヒドロールを用いて行なった⁽¹⁴⁾。すなわち光処理したトリプトファンおよびアミラーゼ試料にキサントヒドロールの 20 mg/20 ml 濃塩酸溶液を適量加え 98° でアミノ酸のときは 15 分間, アミラーゼでは 5 時間煮沸し干渉物質をベンゼンで 3 回除去した後, 酸化されていないトリプトファンを

(i) フリーのトリプトファンの場合, キサントヒドロール-トリプトファン複合体の吸収極大 510 m μ の吸光度と, あらかじめ得られた標準曲線 (第 3 図) とから求めた。

(ii) アミラーゼ中の非酸化トリプトファン量はキサントヒドロール-チロシン複合体による影響を除くため, 380 m μ と 500 m μ での吸光度 (A_{380} , A_{500}) を求め, ト

第 3 図 キサントヒドロール-トリプトファン複合体の 510 m μ における吸光度とトリプトファン量との関係

第 4 図 トリプトファン残基の酸化とタカアミラーゼ A の不活性化

- (1) N-ブロムコハク酸による酸化
- (2) リボフラビン光増感酸化
- (3) 紫外線直接照射による酸化

リプトファンおよびチロシンの濃度 10 γ における場合のそれぞれの吸光度 $a_{380}^{try} = 0.235$, $a_{500}^{try} = 0.0952$, $a_{380}^{tyr} = 0.136$, $a_{500}^{tyr} = 0.0101$ を用いて

$$C_{try} = \{a_{380}^{tyr} \times A_{500} - a_{500}^{tyr} \times A_{380}\} / \{a_{500}^{try} \times a_{380}^{tyr} - a_{380}^{try} \times a_{500}^{tyr}\}$$

よりトリプトファンの量 C_{try} を算出した。かくして求めたリボフラビン-アミラーゼ系での酸化トリプトファン量-光照射時間曲線とアミラーゼ活性-光照射時間曲線とから, 第 4 図 (2) の不活性化と酸化されたトリプトファン量との関係が得られる。

これによると約 50% のトリプトファンの酸化によって活性は完全に消失することになる (50%トリプトファ

ン残基はアミラーゼ 1 分子中におけるトリプトファン残基 5 個に相当する)。リボフラビン色素分子の光増感酸化反応機構は光励起により生じた励起 1 重項状態から非断熱無輻射遷移により 3 重項状態に移り, 溶存酸素 (基底状態が 3 重項) と複合体を形成し, この複合体は複合体の許容多重度から基底 1 重項状態の色素分子と 1 重項状態の酸素分子に解離するものと考えられる⁽¹⁷⁾。1 重項状態の酸素分子は反応性に富み酸化反応に介入するものと考えられる。この反応機構は次のように示される。

ただし $D(^1\Gamma)$, $D(^1\Gamma^*)$, $D(^3\Gamma)$ はリボフラビンの基底 1 重項状態, 励起 1 重項状態, 3 重項状態, $[D \cdots O_2] (^1\Gamma^*_{\text{complex}})$ は励起 1 重項複合体, $O_2(^1\Gamma)$ は 1 重項状態の酸素分子, P は蛋白質のアミノ酸残基である。

リボフラビンはトリプトファンと電荷移動複合体を形成するが⁽¹⁸⁾その生成確率は常温では小さいので, この複合体の酸化反応への寄与は余りないものと考えられる。紫外線直接照射におけるアミラーゼ不活性化と酸化トリプトファン残基の量との関係も同様に, 不活性化-照射時間曲線と酸化トリプトファン残基量-照射時間曲線から得られる。これを第 4 図 (3) に示す。約 20% のトリプトファン残基の酸化によって活性は完全に消失する。

N-ブロムコハク酸はインドール核を持ったトリプトファンなどを, オキシインドールの形にゆるやかに酸化する酸化剤であることが知られている⁽¹¹⁾。光不活性化反応の場合と比較するために N-ブロムコハク酸を用い, アミラーゼを熱的に酸化しそれによる不活性化を調べた。N-ブロムコハク酸は pH 4~3 の範囲では蛋白質中のトリプトファンの酸化が選択的であるので, チロシン, メチオニン, ヒスチジンなどのアミノ酸の酸化も考えられるが, 主としてトリプトファンの酸化が有効と考えられる。約 1×10^{-3} M の N-ブロムコハク酸の水溶液 (0.2 M の酢酸緩衝液 pH 4.0) を原液とし, 種々の濃度のものを 2×10^{-4} M のアミラーゼ水溶液 (pH 4.0 酢酸緩衝液) に等量ずつ混合し, 静かに攪拌して反応させる。アミラーゼ中の酸化トリプトファンの定量はスペクトル的に 280 mμ の光学的密度の減少を測定し⁽¹⁵⁾, これにエンピリカルな因子 1.31⁽¹⁹⁾ を乗じ, 酸化されたトリプトファン濃度を求めた。N-ブロムコハク酸により種々の程度に酸化させたアミラーゼ溶液は pH 5.6 で青化法

第 5 図 N-ブロムコハク酸によるタカアミラーゼ A の不活性化
[タカアミラーゼ A] = 3.5×10^{-5} M
pH 5.6 (酢酸緩衝液)

により活性を測定し, 得られたアミラーゼ活性-N-ブロムコハク酸濃度曲線 (第 5 図) と酸化トリプトファン量-N-ブロムコハク酸濃度曲線とから第 4 図 (1) のアミラーゼの不活性化と酸化されたトリプトファン量との関係を得た。

約 50% のアミラーゼ中のトリプトファン残基の酸化まではアミラーゼの不活性化とほとんど直線関係であるが, 50% を越すと曲線はしだいにねてくる。100% のトリプトファンの酸化によって完全に失活する。この結果によるとアミラーゼ中のトリプトファン残基の半数が酸化されることによって活性は 15% に減少する (アミラ

第 6 図 タカアミラーゼ A の紫外線照射による不活性化の作用スペクトル

- (1) 不活性化の作用スペクトル
 - (2) シスチンの吸収スペクトル
 - (3) トリプトファン残基によって吸収される光による不活性化への寄与
 - (4) シスチン残基によって吸収される光による不活性化への寄与
 - (5) アミラーゼの吸収スペクトル
- * 任意スケール

ーゼ 1 分子中にはトリプトファン残基 10 個を有する)。N-ブロムコハク酸によるトリプトファン残基の酸化とアミラーゼ不活性化との関係からアミラーゼの活性がトリプトファン残基と密接な関係を有するものと考えられる。

ヨード酢酸⁽²⁰⁾をアミラーゼに作用させたところ、活性はほとんど落ちないことからヒスチジン残基は直接にはアミラーゼ活性とは関係がないものと考えられる。

クセノンランプからの単色光をアミラーゼ溶液(濃度 0.005%, pH 5.6 酢酸緩衝液)に一定時間(1 時間)照射し、各励起波長に対し活性を測定して、光不活性の作用スペクトルを測定した。第 6 図の(1)の測定点がこれを示す。

ϕ_i を蛋白質を構成する各アミノ酸によるアミラーゼの光不活性化の量子収量とすると、波長 λ の単色光を照射した時の不活性化の作用スペクトル $S(\lambda)$ は

$$S(\lambda) = \sum_i a_i(\lambda) \phi_i$$

で近似することができる。ただし $a_i(\lambda)$ はアミノ酸 i の“補正された” absorption cross section (吸収断面積*)である。光酸化を受け易いアミラーゼ蛋白中のアミノ酸としてはトリプトファン、チロシン、シスチン、ヒスチジンがある。これらのアミノ酸の単独水溶液の吸収スペクトルから求めた分子吸光係数 $\epsilon_i(\lambda)$ と、アミラーゼ 1 分子中のこれらのアミノ酸の分子数 n_i から、アミラーゼの吸光係数 $\epsilon_0(\lambda)$ は次式によって合成しうる。

$$\epsilon_0(\lambda) = \sum_i n_i \epsilon_i(\lambda)$$

この吸収極大は天然のアミラーゼの吸収極大より 2.5 m μ だけ短波長にある。したがって合成吸収帯を 2.5 m μ 長波長にずらすことによって、天然のアミラーゼの吸収帯に一致させることができる。

この波長のズレを考慮して各アミノ酸の“補正された”吸収断面積 $a_i(\lambda)$ を求めた。 $S(\lambda)$ には第 6 図(1)の実測値(・)を用い、上式を種々の波長について解くことによって ϕ_i が求められる。得られた ϕ_i の計算値は第 1 表のとおりである。光不活性にはシスチン、トリプトファンによって吸収された光エネルギーが有効であって、その他のアミノ酸で吸収された光エネルギーはきわめて微小な効果しかない。

トリプトファン残基およびシスチン残基の光吸収によ

第 1 表

アミノ酸残基の種類	タカアミラーゼ A 分子中の数	光不活性化の相対量子収率
シ ス チ ン	4	99.2
トリプトファン	10	0.8
チ ロ シ ン	28	~0
フェニルアラニン	13	~0

るアミラーゼの光不活性化への寄与を第 6 図曲線(3), (4)に示す。(3), (4)の合成曲線は曲線(1)である。曲線(2), (5)はそれぞれシスチンおよびアミラーゼの吸収帯である。第 1 表でわかるように紫外線照射による光不活性化においてはシスチンとトリプトファンによって吸収された光が有効であり、かつシスチンによって吸収された光の方が圧倒的に不活性化の量子収率は大きであることが分る。

シスチンは励起状態で-S-S-のシスチン結合が開裂して-S $\cdot$ -S-のラジカル形成が起り、蛋白質の立体構造が破壊されることによる不活性効果が甚だ有効であることを示している。他のチロシン、ヒスチジン、フェニルアラニンなども励起状態で酸化をうけることは知られているが、得られた光不活性化の作用スペクトルの解析からはトリプトファンとシスチンに比べて無視できる程度の不活性効果しか持たないものと推定されうる。

Grossweiner⁽²¹⁾らはチロシン、フェノール、トリプトファン、インドール、オバルブミンを閃光照射するとき持続時間が 20 μ sec~80 μ sec の過度的な吸収スペクトルが 400~600 m μ に現われることを観測している。チロシンではこの吸収極大が 4120 Å, 持続時間 20 μ sec, トリプトファンでは 5300 Å, 50 μ sec である。これらは光照射による電子の放出によって生じたフェノール基やインドール基のラジカルによる吸収と考えられる。

オバルブミンではチロシン、トリプトファンのラジカルによる吸収が見られる。

したがってアミラーゼの場合の光照射による不活性化は一つはシスチン残基の-S-S-結合の開裂によって起るのと他はトリプトファン、チロシン残基が励起状態、おそらく 3 重項状態において電子放出⁽²²⁾を行うことによってカチオンラジカルを作るが、溶媒系に放出された電子は水を還元し溶存酸素と HO $_2$ を作り、これがトリプトファンを酸化することによって不活性化が惹起されるものと考えられる。チロシンの酸化も考えられるが、不活性化の作用スペクトルからはこれによる不活性化への

* 吸収断面積 $a = (1/nx) \ln I_0/I$

ただし n : 分子数/cm 3 , x : cm, I_0 : 入射光強度, I : 透過光強度である。

寄与は小さいものと考えられる。タカアミラーゼ A のチロシン 28⁽²³⁾ 個のうち 20 個は隠蔽されており、カルボキシル基と水素結合を作っている。このため HO_2 による酸化から保護されているものと考えられる。すなわちアミラーゼの紫外線照射による不活性化はシスチンの光吸収とトリプトファンの光吸収によって惹起され、これによって起る -S-S- 基の破壊、トリプトファンの酸化という 2 つのことがらが主要なる原因となって不活性化が起ると考えられる。

Setlow⁽²⁴⁾ はトリプシンの紫外線照射による不活性化においてシスチンによって吸収される光による不活性化の量子収量は ~ 0.07 、シスチン以外のアミノ酸によって吸収される光によるものは $\sim 10^{-8}$ であることを不活性化の作用スペクトルから述べているが、シスチン以外の構成アミノ酸によって吸収された光もすべて光不活性化に有効とは考えられない。

タカアミラーゼ A の補関分子族⁽²⁵⁾ は 8 個のマンノース、1 個のキシロース、2 個のヘキソサミンからなっているが、第 4 図における N-ブロムコハク酸によるトリプトファンの酸化とアミラーゼ活性との関係 [曲線 (1)] はトリプトファン残基がアミラーゼ活性に密接な関係を有することを示している。色素の光増感酸化反応によるアミラーゼ不活性化の場合は、トリプトファン残基の酸化の他にチロシン、ヒスチジン等の酸化も惹起され得るため、曲線 (2) に見られるように 50% のトリプトファン酸化によって失活を示す。紫外線照射の場合は不活性化の作用スペクトルからも知られたようにトリプトファンの酸化とシスチンの開裂という量子収率の大きな寄与

が存在するため、曲線 (3) のように失活に対する有効酸化トリプトファン量は 25% に減少することになる。

第 7 図にはトリプトファン水溶液 (pH 5.6) の紫外線照射による酸化と蛍光の照射時間による変化を示してある。いずれも指数函数的に減少するし一致しているが、途中折れ曲りを有する。

初めの直線部分ではトリプトファン 1 モルを酸化するのに 1 モルの溶存酸素が必要であるが、第 2 の直線部分ではトリプトファン 1 モルの酸化に溶存酸素 2 モルを必要とする。このために折れ曲りが生ずる。フリーのトリプトファンではトリプトファンの蛍光の減少と酸化とは全く一致した行動を示す。これは酸化トリプトファンは非蛍光性であるためである。アミラーゼの紫外線照射による不活性化と蛍光強度の照射時間との関係はそれぞれ第 8 図 (1), (2) のようである。

第 8 図 タカアミラーゼ A の活性および蛍光強度と紫外線照射時間との関係
[タカアミラーゼ A] = 1.92×10^{-5} M
pH = 5.6 (酢酸緩衝液)
(1) 活性 (2) 蛍光強度

蛍光強度は約 55% で定常値に達することは、アミラーゼ中のトリプトファンの酸化は紫外線照射ではある程度しか進行しないで、シスチンの開裂による蛋白構造の破壊がアミラーゼの不活性化に大きく寄与していることを示すものである。シスチンはアミラーゼには 1 分子中に 4 個存在し、ペプチド結合間に架橋して蛋白質の立体構造の維持に寄与しているものであり、これの開裂は蛋白質の立体構造の破壊に導くことになる。トリプトファンはアミラーゼの活性に密接に関係していると思われるが、酵素の活性は活性点ないし活性域などの直接的な個所のみならず、これらの背景となっている蛋白質全体としての構造も活性点ないし活性域との相互作用の上に立って活性を維持しているものである。この観点に立つ

第 7 図 トリプトファンの蛍光強度および非酸化トリプトファン量と紫外線照射時間との関係
[トリプトファン] = 1.96×10^{-4} M
pH = 5.6 (酢酸緩衝液)
○: 蛍光強度 ×: 非酸化トリプトファン量

以上不活性化にもたらず上記のシスチンの-S-S-の破壊効果は大きいものである。本研究においては照射光量は比較的小なる範囲で行なわれたので、アミラーゼ蛋白の光照射による低分子量のものへの開裂や凝集体形成は余り起っていない。したがってこのための不活性化におよぼす影響は小なるものと考えられる。

要 約

タカアミラーゼAは紫外線照射または生体色素リボフラビンの光増感作用によって有効な不活性化が惹起される。前者の場合には2hit的に、後者の場合は1hit的に不活性化が進行する。リボフラビンによる光増感不活性化反応は色素の3重項状態と基底3重項状態の溶存酸素との複合体の解離によって生じた1重項状態の反応性に富む酸素分子種によるアミラーゼの酸化反応によるものと考えられる。N-ブロムコハク酸の熱的酸化によるアミラーゼの不活性化反応におけるトリプトファン残基の酸化と、不活性化との関連性、光不活性反応におけるトリプトファンの酸化と活性との関連及びトリプトファン残基の蛍光収率の変化から、トリプトファン残基は酵素活性に重要な関係を持つものと考えられる。

アミラーゼ単独系における光不活性化の作用スペクトルから、紫外線直接照射による不活性化はシスチンによって吸収される光による不活性化の相対量子収率は99.2%で、トリプトファンによって吸収される光によるものは0.8%である。シスチンは励起状態で高能率で-S-S- $\longrightarrow$ -S $\cdot$ -S $\cdot$ の開裂反応が起り、またトリプトファン残基は量子収率は小さいが、励起状態で電子放出によりラジカルとなり、溶媒系に放出された電子は水を還元し溶存酸素とHO $_2$ を作り、これによりトリプトファンは酸化される。これらのために不活性化が起る。チロシン残基もトリプトファン残基と同様の酸化を受けうるが、作用スペクトルからはこのための不活性の量子収率は小さいものと考えられる。

終りに臨み終始御指導を賜った九大農学部富田先生に深謝する。

- (1) H. A. Schomer : "The effects of radiation on enzyme, in biological effects of radiation", (Duggar, B. M. ed.) MacGraw-Hill, N. Y., p. 1151.
- (2) G. Tomita et al. : *Symposia on Enzyme Chemistry*, XI, 30 (1956).
- (3) L. Weil, W. G. Gordon, A. R. Buchert :

- Arch. Biochem. Biophys.*, **33**, 90 (1951) ; L. Weil, A. R. Buchert : *ibid.*, **34**, 1 (1951) ; L. Weil, A. R. Buchert, J. Maher : *ibid.*, **40**, 245 (1952) ; L. Weil, T. S. Seibles : *ibid.*, **54**, 368 (1955) ; M. Nakatani : *J. Biochem.*, **48**, 640 (1960).
- (4) L. A. AE. Sluyterman : *Biochim. Biophys. Acta*, **60**, 557 (1962).
- (5) J. Clark : *Am. J. Physiol.*, **61**, 72 (1922).
- (6) L. Weil, A. R. Buchert : *Arch. Biochem. Biophys.*, **34**, 1 (1951).
- (7) L. and T. S. Seibles : *ibid.*, **54**, 368 (1955).
- (8) L. Weil, A. R. Buchert, J. Maher : *ibid.*, **40**, 245 (1952).
- (9) L. Weil, W. G. Gordon, A. R. Buchert : *ibid.*, **33**, 90 (1951).
- (10) A. W. Galston, R. S. Baker : *Science*, **109**, 485 (1949) ; 曾根清秀 : 本誌, **33**, 1119 (1959), 本誌, **36**, 7 (1962) ; A. W. Galston, M. E. Hand : *Am. J. Bot.*, **36**, 85 (1949) ; A. W. Galston : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **35**, 10 (1949) ; A. W. Galston, S. R. Baker : *Am. J. Bot.*, **36**, 773 (1949) ; A. W. Galston : *Science*, **111**, 619 (1950).
- (11) A. Patchornik, W. B. Lawson, B. Witkop : *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 4747 (1958) ; T. Viswanatha, W. B. Lawson, B. Witkop : *Biochim. Biophys. Acta*, **40**, 216 (1960) ; L. K. Ramachandran, B. Witkop : *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 4028 (1959).
- (12) S. Akabori, T. Ikenaka, B. Hagihara : *J. Biochem. (Japan)*, **41**, 577 (1954).
- (13) H. Fuwa : *J. Biochem. (Japan)*, **41**, 583 (1954).
- (14) S. R. Dickman, W. L. Westcott : *J. Biol. Chem.*, **210**, 481 (1954) ; S. R. Dickman, R. B. Kropf, C. M. Proctor : *ibid.*, **210**, 491 (1954) ; W. L. Westcott, S. R. Dickman : *ibid.*, **210**, 499 (1954) ; S. R. Dickman, A. L. Crockett : *ibid.*, **220**, 957 (1956).
- (15) T. W. Goodwin, R. A. Morton : *Biochem. J.*, **40**, 628 (1946).
- (16) R. B. Stelow, E. C. Pollard : "Molecular Biophysics", Addison-Wesley Publishing Company, Inc., Mass., U. S. A., p. 281, 298 (1962).
- (17) 竹山尚賢 : 化学の領域, **15**, 3, 172 (1961) ; G. O. Schenck : *Naturwiss.*, **40**, 205, 229 (1953) ; *Z. Elektrochem.*, **57**, 675 (1953).
- (18) B. Pullman, A. Pullman : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **44**, 1197 (1958) ; I. Isenberg, A. Szent-Györgyi : *ibid.*, **45**, 1229 (1959) ; *ibid.*, **44**, 857 (1958).
- (19) A. Patchornik, W. B. Lawson, B. Witkop : *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 4747 (1958).

- (20) H. G. Gundlach, W. H. Stein, S. Moore : *J. Biol. Chem.*, **234**, 1754 (1959) ; H. G. Gundlach, S. Moore, W. H. Stein : *ibid.*, **234**, 1761 (1959) ; M. H. Proctor : *Biochim. Biophys. Acta*, **59**, 713 (1962).
- (21) L. I. Grossweiner : *J. Chem. Phys.*, **24**, 1255 (1956) ; L. I. Grossweiner, W. A. Mulac : *Rad. Res.*, **10**, 515 (1959) ; L. I. Grossweiner, E. F. Zwickel : *J. Chem. Phys.*, **31**, 1141 (1959) ; *ibid*, **33**, 1411 (1961) ; *ibid* **39**, 2774, (1963) ; E. F. Zwickel, L. I. Grossweiner : *J. Phys. Chem.*, **67**, 549 (1963).
- (22) H. Linschitz, M. G. Berry, D. Schweitzer : *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 5833 (1954).
- (23) T. Takagi, T. Isemura : *J. Biochem. (Japan)*, **48**, 781 (1960).
- (24) R. Setlow : *Rad. Res.*, Supplement, **2**, 276 (1960).
- (25) A. Ehrenberg, H. Theorell : *Acta Chem. Scand.*, **9**, 1193 (1955).
-