[農化 第 40 卷, 第 11 号, p.387~393, 1966]

Taka-proteinase による taka-amylase A の分解

堀 津 浩 章, 友 枝 幹 夫 (岐阜大学農学部農芸化学科)

昭和 41 年 4 月 13 日 受 理

Degradation of Taka-Amylase A by Taka-Proteinase

By Hiroyuki HORITSU and Mikio TOMOEDA

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Gifu University

A study was made of the action of taka-proteinase on crystalline taka-amylase A. The proteinase was purified by Amberlite IRC-50 from "Taka-diastrase". Taka-amylase A was found to be degraded about 50 per cent by taka-proteinase in McIlvaine's buffer solution at pH 7.0, 37°C for 24 hours, without any denaturation. The modified taka-amylase A had a higher specific activity than the original taka-amylase A, and was homogeneous in electrophoretic and sedimentation analyses. Several physicochemical constants of it were less than those of the original taka-amylase A. By the action of the proteinase, various amino acids and peptides were found to be released from taka-amylase A.

(Received April 13, 1966)

緒 言

酵素化学の問題の 1 つとして酵素の化学構造と機能との関係がある。すなわち、酵素活性に必要な構造は自然のままの巨大な酵素蛋白分子全体が必要なのか、あるいは酵素分子中に活性部が存在し、この特定な小部分のみで充分であるかということは興味ある問題である。生理的活性を持った蛋白質やペプチド、たとえば酵素や種々のホルモンなどを部分分解して得られる、いわゆる active fragment を得るためには、できるだけ緩和な条件下で部分分解を行ない、ペプチド結合の開裂に伴う 2 次的高次構造の変化を最小に留めることが必要で、そのためには蛋白質分解酵素が広く使用されている。たとえば exopeptidase によるものとしては carboxypeptidase⁽¹⁾, あるいは leucine aminopeptidase⁽²⁾ による分解、また proteinase によるものとしては, chymotrypsin⁽³⁾, papain⁽⁴⁾, pepsin⁽⁵⁾, subtilisin⁽⁶⁾ や trypsin⁽⁷⁾ などが知られている。すなわち active fragment の例としては, pepsin が知られている。船津ら⁽⁸⁾は pepsin を自己消化させて分子の 4/5 を分解離脱させたものにも活性があり、このものは 72 個のアミノ酸からなる分子量 7,200

と推定した。また papain についても Hill⁽⁴⁾らの研究により, papain の 170 個のアミノ酸のうち N 末端から 120 個を脱離させたものも活性を有することが認められた。しかるに taka-amylase A (以下 TAA と略す) については, 奥貫ら⁽⁹⁾の研究で自然の状態では, 細菌 proteinase, 糸状菌 proteinase, trypsin および chymotrypsin の作用を受けず, 熱または尿素にて変性させる必要を述べている。最近戸田ら⁽⁹⁾は TAA を phenylazo-化合物に修飾させた後に *Streptomyces* 属の蛋白質分解酵素を作用させ, その部分分解物に酵素活性が存在することを報告している。さらに, 成田ら⁽¹⁰⁾は TAA を還元後遊離の SH 基をモノヨード酢酸でカルボキシメチル化したものに trypsin を作用させ, その分解物を gel 濾過し, 4 つのペプチドにわけた後, 混合することにより TAA 活性発現を報告している。他方赤堀ら⁽¹¹⁾は, TAA をペロナール緩衝液中に長時間放置するとアミノ酸が放出されることを報告している。これらのことを考え合わせると, TAA は必ずしも非常にけんごなものではなく, ある条件下では, 変性または修飾させずとも蛋白質分解酵素の作用を受けるものではないかと考え, 本研究を行

なった。本報では、特に変性または修飾させずに蛋白質分解酵素を作用させる緩和な条件を検討した。

実験方法

TAA の精製および結晶化

TAA の精製ならびに結晶化については、いくつかの方法があるが、特に簡便で高収量である赤堀ら⁽¹²⁾によるリバノール法で行なった。すなわち“Taka-diastrase”原末 30 g から水 150 ml にて抽出後、抽出液と同量の 0.25 M 酢酸カルシウム溶液を添加、不純物を除去、5 N-NaOH で pH 6.5~7.0 とし、Cellite 545 # にて濾過後、硫酸にて 3/4 飽和、透析後リバノールで TAA と複合物を形成させた後、酢酸緩衝液に溶解、カオリン添加、リバノール除去、濾過後、濾液にアセトン 55% 添加、沈澱を酢酸カルシウム溶液に溶解、アセトン添加により結晶を得た。ここで得られた粗結晶を遠心分離し、酢酸カルシウム溶液に溶解し、前と同様な方法で再結晶化した。“Taka-diastrase”原末 30 g より 0.5 g の結晶を得た。かくして得られた精製結晶 TAA を本実験に供した。

TAA の分解に使用した taka-proteinase の精製

まず“Taka-diastrase”原末 10 g を水 500 ml に溶解しそれを Amberlite IRC-50 にて TAA と taka-proteinase の分別溶出を行なった。すなわち Amberlite IRC-50 (100~200 mesh) を 1 N-NaOH 洗滌後、水洗、ついで 1 N-HCl 洗滌、水洗後 1/100 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.8) にて緩衝化したのち、1.8 cm×40 cm の column とし、それに上記“Taka-diastrase”水抽出液を滴下させた。その column を初め、上記の緩衝液 (pH 4.8) にて洗滌して TAA を溶出させた。約 1.5 l にて TAA は溶出されたので次に M/5 磷酸緩衝液 (pH 7.0) にて column を洗滌し taka-proteinase を溶出させた。ここに溶出させた taka-proteinase を Duolite A-2 で脱色後、ついで acetone を 75% 濃度に加えて生じる沈澱を水に溶解、透析したものを taka-proteinase として実験に供した。

Taka-proteinase による TAA の部分分解

Taka-proteinase による TAA の部分分解に当っては、前者の至適 pH 6.0~8.0 と後者の安定 pH 領域とを考慮合わせて、pH 7.0 の McIlvaine 緩衝液で 40° で作用させた。なお赤堀ら⁽¹¹⁾の報告にもあるように、TAA 溶液を放置するときにも自然崩壊がみとめられているので、blank として同様に TAA 溶液のみも同様に行なった。すなわち反応 A としては TAA 5.65 mgN を McIlvaine

緩衝液 (pH 7.0) 10 ml に溶かし、また反応 B としては、TAA 5.65 mgN と精製 taka-proteinase 0.14 mgN とを同じ McIlvaine 緩衝液 (pH 7.0) 10 ml に溶解し、24 時間インキュベートした。

TAA の活性測定

TAA の活性測定法としては、馬鈴薯澱粉を基質とし、Blue value 法⁽¹³⁾によって行なった。すなわち 1% 馬鈴薯澱粉 1 ml をとり、Walpole の緩衝液 (pH 5.2) 1 ml を加え、40° に 5 分予温後、酵素液 1 ml を加えて反応を開始し、30 分後 10 ml の 0.5 N 酢酸を加えて反応を停止せしめ、ついでこの液 1 ml をとり 10 ml の 0.005% ヨード液中に入れてから 700 mμ で水を対称として 1 cm のキューベットで Blank (D_0) および反応液 (D) の吸光係数 (O. D.) を測定した。活性度単位 $[DB]_{\text{mgs}}^{40^\circ, 30'}$ は 40°, 30 分間に Blue value (700 mμ O. D.) を 10% 低下せしめた澱粉の mg 数で表わされる。

$$[DB]_{\text{mgs}}^{40^\circ, 30'} = 10 \times \frac{D_0 - D}{D_0}$$

なお、比活性は酵素蛋白質 mg 数当りの活性単位で表わした。

Taka-proteinase の活性測定

Taka-proteinase の活性測定法としては、McIlvaine 緩衝液 (pH 7.0) 2 ml に酵素液 0.5 ml を加え、ついで 1% カゼイン 2 ml を添加し、40°, 60 分反応後、0.3 N トリクロル酢酸 (TCA) 2 ml を加え、非分解蛋白質を沈澱させた後、その上澄液より 1 ml をとり 0.5 M 炭酸ソーダ 3 ml を加え、Folin 試薬 0.1 ml を加え、30° に 30 分保った後、660 mμ で比色定量、相当する tyrosine の mg 数を活性単位として表わす。比活性は酵素蛋白質 mg 数当りの活性単位で表わした。

酵素蛋白質の測定

Folin-Ciocalteu 法⁽¹⁴⁾を用いて呈色法に基づき測定した。

Taka-proteinase による TAA の窒素分解率

Taka-proteinase による TAA の窒素分解率については、TAA に taka-proteinase を所定時間反応後、10% TCA にて非分解蛋白質を沈澱させた後、その沈澱についてマイクロケルダール法により窒素を定量し、分解前後の百分率で示した。

物理化学的測定

電気泳動：電気泳動は日立製ゼリウス HTD-I 型を使用した。泳動は酢酸緩衝液 pH 5.8, イオン強度

0.125 で、あらかじめ 48 時間緩衝液にて透析したもので行なった。泳動条件は 100 V, 5 mA, 5° で蛋白質濃度はいずれも 0.4% で行なった。

濾紙電気泳動：濾紙としては東洋濾紙 No. 50 を使用、電解液として M/10 酢酸緩衝液 (pH 8.0), イオン強度 0.288 で行なった。泳動条件は 400 V, 77.5 mA にて 9 時間行なった。発色剤としては bromophenol 0.05%, 氷酢酸 2% および昇汞 1% の混液を使用した。

超遠心分析：超遠心分析は Spinco E 型超遠心分析機を使用した。沈降は酢酸緩衝液 (pH 5.8), イオン強度 0.125, 蛋白質濃度 0.4% のものを使用した。沈降条件は回転数 59,780 r. p. m., 温度は 7° で行なった。

ペーパークロマトグラフィー

遊離アミノ酸およびペプチドのペーパークロマトグラフィーについては、展開剤として、酢酸, *n*-ブタノール, 水 (4:2:1) を使用、発色剤は 0.2% ニンヒドリン *n*-ブタノール水飽和溶液を用いた。なお東洋科学製デンストメーターにて定量した。

結果 および 考察

TAA の結晶

本実験に使用した TAA は立方板状晶で、後述することく、超遠心的ならびに電気泳動的に均一のものである。

Taka-proteinase の精製

Amberlite IRC-50 による taka-proteinase の溶出を第 1 図に示す。この精製の結果、粗酵素抽出液の約 90 倍に精製された。

Taka-proteinase の性質

TAA に作用させる taka-proteinase の条件を決定するために、まず分離精製された taka-proteinase の性質を調べた。pH-作用曲線を第 2 図に示す。測定 pH 5.2

第 1 図 Amberlite IRC-50 による taka-proteinase の精製
カラム 1.8×40 cm

から 8.0 までは McIlvaine 緩衝液を使用、pH 8.0 から pH 10.0 までは Atkins-Pantin 緩衝液を使用した。第 2 図よりわかるごとく、最適 pH は 7.0~8.0 の間に存在する。温度作用曲線についての結果を第 3 図に示す。第 3 図より最適温度は 50° とみとめられる。次に酵素の作用時間について調べた結果を第 4 図に示す。第 4 図からわかるごとく 6 時間以後は平衡に達し、24 時間後でも余り分解量の増加はみとめられない。基質濃度の影響については基質としてカゼインを使用、測定した結果を第 5 図に示す。第 5 図から 0.5% 前後が適当と考えられる。また阻害剤について調べたところ、EDTA では

第 2 図 Taka-proteinase の pH 作用曲線
基質カゼイン 1% 水溶液, M/5 McIlvaine 緩衝液, 作用時間 1 時間。

第 3 図 Taka-proteinase 作用の温度依存性
基質カゼイン 1% 水溶液, M/5 McIlvaine 緩衝液 pH 7.0, 作用時間 1 時間。

第4図 Taka-proteinase の作用時間と活性
基質カゼイン1% 溶液, M/5 McIlvaine 緩衝液 pH 7.0, 40°.

第5図 Taka-proteinase に対する基質濃度と活性
基質としてはカゼインを使用, M/5 McIlvaine 緩衝液
pH 7.0, 作用時間1時間, 40°.

阻害されず, また弗化ソーダ, 硫酸第2鉄, pCMB およびモノヨード酢酸でも余り顕著な阻害作用はみとめられなかった。

Taka-proteinase による TAA の部分分解

Taka-proteinase を TAA に 24 時間反応後, Visking tube に反応液を入れ, 倍量の蒸留水で 5 時間および 24 時間透析を行ない, その外液の一部を酵素液として α -amylase 活性を測定したが, 全く活性がみとめられなかったことより, taka-proteinase の作用によっては活性区分は透析されないものと考えられる。ここで得られた透析内液を修飾 TAA 溶液 (M-TAA) と略す。TAA および M-TAA について酵素活性, 分解率および窒素 mg 当りの比活性をまとめて第1表および第2表に示す。なお TAA に作用させた taka-proteinase の量比は 40 : 1

第1表 TAA の自然崩壊 (反応 A*)

作用時間 (時)	測定項目 N mg/ml ¹⁾	α -Amylase 活 性 ²⁾	比活性 ³⁾
0	0.565	3.33×10^6	5.89×10^6
24	0.484	3.66×10^6	7.56×10^6
0 時を 100 とした場合 の 24 時間作用後の比率			
	85.7%	110%	128%

* TAA 5.65 mgN を含む McIlvaine 緩衝液 pH 7.0, 10 ml.

1) 反応液の 10% TCA 沈澱物の ml 当りの N mg.

2) 反応液 0.5 ml をとり, 10^5 倍に希釈したものについて測定した値。

3) 計算から求めた反応液の 10% TCA 沈澱物の N mg 当りの α -amylase 活性。

第2表 TAA に taka-proteinase を作用させた
場合 (反応 B*)

作用時間 (時)	測定項目 N mg/ml ¹⁾	α -Amylase 活 性 ²⁾	比活性 ³⁾
0	0.565	3.33×10^6	5.89×10^6
24	0.287	2.27×10^6	7.91×10^6
0 時を 100 とした場合 の 24 時間作用後の比率			
	50.8%	68.2%	134%

* TAA 5.65 mgN と taka-proteinase 0.14 mgN を含む
McIlvaine 緩衝液 pH 7.0, 10 ml.

1) 反応液の 10% TCA 沈澱物の ml 当りの N mg.

2) 反応液 0.5 ml をとり, 10^5 倍に希釈したものについて測定した値。

3) 反応液の 10% TCA 沈澱物の N mg 当りの α -amylase 活性。

の割合である。第2表からもわかるごとく 24 時間作用させると蛋白態窒素は約 50% に低下する。また反応液の α -amylase 活性も taka-proteinase の作用により約 30% 低下したが, 10% TCA による沈澱部の窒素 mg 当りの比活性は第1表の自然崩壊の場合同様, 逆に 30% の増加をみた。そこでこの taka-proteinase の分解様式を考えてみると, もし "all or none" 型とすれば, 窒素 mg 当りの比活性は反応の前後で同じであるはずであるから, この型とは考えられない。反応液の同量当りの α -amylase 活性が 30% 低下したことは, TAA 分子が活性がなくなるまで分解されたのか, あるいは活性中心がある程度分解されたためとも考えられるが, 比活性が上昇したことは, やはり活性中心付近以外の小部分は活性に参与していないと思われる。次に TAA の自然崩壊現象については, 反応液の同量当りの活性が 10% 程度上がったが, このことについてはすでに赤堀ら⁽¹¹⁾が TAA のアミノ酸放出についての研究で, ベロナル緩衝液 (pH 7.5~8.5) では 37°, 72 時間後には 10~20% の活性増加をみている。しかし彼らの報告⁽¹¹⁾では, 燐酸緩衝液では結果がよくないといわれている点, 本実験の結果と異なる。

TAA と M-TAA との物理的性質

1. 紫外外部吸収スペクトル: TAA および M-TAA の両方について紫外外部吸収スペクトルを比較した結果を第 6 図に示す。第 6 図よりわかるごとく, M-TAA の紫外外部吸収は TAA に比し 30% 程度の低下がみとめられる。

第 6 図 TAA および M-TAA の紫外外部吸収スペクトル

2. Tiselius の電気泳動: TAA と M-TAA の両方について Tiselius の電気泳動を行なった結果をそれぞれ第 7 図および第 8 図に示す。なお, 易動度を算出した結果は, それぞれ次のとおりである。

$$\text{TAA} \quad -5.06 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec} \cdot \text{volt}$$

$$\text{M-TAA} \quad -3.51 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec} \cdot \text{volt}$$

電気泳動の結果より, M-TAA は均一な蛋白質であると考えられる。さらにこのことは TAA の分解様式は TAA が一様に分解を受けていると思われ, 分解されないものと部分分解されたものが共存していないと考えられ, いわゆる“Zipper”型であると考えられる。易動度の面から M-TAA は TAA より電気的に移動しにくいものに変化されたように考えられる。

3. 濾紙電気泳動: 濾紙電気泳動実験の結果を第 9 図に示す。第 9 図からわかるごとく, M-TAA の方が TAA に比し移動が小さい。

4. 超遠心分析: TAA および M-TAA について超遠心分析を行なった結果を第 10 図および第 11 図にそれぞれ示す。なお沈降図より算出した沈降定数はそれぞれ次のとおりである。

$$\text{TAA} \quad s = 3.17 \times 10^{-13}$$

$$\text{M-TAA} \quad s = 2.94 \times 10^{-13}$$

なお, それぞれの沈降定数についての標準偏差は 0.24

第 7 図 TAA の電気泳動図
泳動条件: 酢酸緩衝液 pH 5.8, イオン強度 0.125, 100 V, 5 mA, 5°, 蛋白濃度 0.40%, 泳動時間 100 分。

第 8 図 M-TAA の電気泳動図
泳動条件: 酢酸緩衝液 pH 5.8, イオン強度 0.125, 100 V, 5 mA, 5°, 蛋白濃度 0.40%, 泳動時間 100 分。

第 9 図 TAA および M-TAA の濾紙電気泳動図
0.1 M 磷酸緩衝液 pH 8.0, イオン強度 0.288, 9 時間。

および 0.28 である。沈降図からわかるごとく, 電気泳動図と同様, M-TAA は単一な蛋白質である。また沈降定数については, M-TAA はわずかに低い値を示す。

5. 遊離アミノ酸: TAA に taka-proteinase を 24 時間作用させた後, 10% TCA にて未分解蛋白質を除去した上澄液について, その遊離アミノ酸を検索した。な

第 3 表 Taka-proteinase による TAA の分解

反応液の 10% TCA 可溶部の ml 当りの チロシン相当量	
Taka-proteinase 無添加	0.22 mg
" 添加	0.57 mg

第10図 TAA の沈降図

沈降条件: 酢酸緩衝液 pH 5.8, イオン強度 0.125, 回転数 59,780 r.p.m., 温度 7°, 蛋白濃度 0.40%.

第11図 M-TAA の沈降図

沈降条件: 酢酸緩衝液 pH 5.8, イオン強度 0.125, 回転数 59,780 r.p.m., 温度 7°, 蛋白濃度 0.40%.

第12図 M-TAAの放出アミノ酸およびペプチド

測定条件: 東洋濾紙 No. 50 使用, 展開剤 酢酸: *n*-ブタノール: 水 (4:2:1), 発色剤ニンヒドリン, 東洋科学製デントメーター使用, 波長 570 mμ.

第13図 TAA のアミノ酸放出

測定条件: 第12図に示したと同じ.

お遊離アミノ酸を tyrosine の mg 相当で表わしたものを第 3 表に示す。つぎに 10% TCA 可溶部を濃縮したものについてペーパークロマトグラフィーを行なった結果を第 12 図に示す。その呈色域は広範囲に広がる。なお TAA の自然崩壊によるアミノ酸についても第 13 図に示す。両図からわかるごとく, taka-proteinase 作用をうけたものは R_F 値が 0.5 以下の peptide 区分も含まれる。このことは taka proteinase は TAA 分子中のアミノ酸を 1 個ずつのみ切らずに数個以上をも切断していくものと考えられる。遊離されたアミノ酸としては, その R_F 値からアスパラギン酸, グリシン, グルタミン酸, スレオニンおよびロイシンの存在が推定される。また自然崩壊については, グリシン, グルタミン酸, アラニン, トリプトファンおよびチロシンが推定される。

要 約

Taka proteinase による TAA の分解を行ない, 次の諸点を明らかにした。

(1) TAA は変性, 失活または化学的修飾されずとも proteinase の作用をうける。

(2) Proteinase の作用をうけた TAA を透析すると, 透析内液に α -amylase 活性がみとめられ, 外液にはみとめられない。

(3) Proteinase の作用をうけた M-TAA は, 電気泳動的, 超遠心的において単一であり, 易動度, 沈降定数ともに TAA に比し小さい。

(4) Proteinase の作用により, アミノ酸およびペプチドが遊離された。

本研究は 1962 年 11 月 17 日, 日本農芸化学会中部支部講演会において報告した。なお実験に際し超遠心分析について御便宜を賜った名古屋大学医学部古武弥人教授, 電気泳動について御便宜を賜った岐阜大学農学部家禽畜産学科棚橋保助教授, ならびに “Taka-diastrase” 原末を御恵みいただいた三共株式会社農業営業部小林寛治氏に厚く感謝の意を表する。

- (1) E. Kalnitsky, W. I. Rogers : *Biochim. Biophys. Acta*, **20**, 378 (1956).
- (2) R. C. Hill, E. L. Smith : *J. Biol. Chem.*, **231**, 117 (1958).
- (3) J. Gergely et al. : *J. Biol. Chem.*, **212**, 165 (1955).
- (4) R. C. Hill, E. L. Smith : *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 376 (1956).
- (5) 船津 勝 : 蛋白質 核酸 酵素, **7**, 487 (1962).
- (6) F. M. Richards, R. J. Vithayathil : *J. Biol. Chem.*, **234**, 1459 (1959).
- (7) E. Mihalyi, A. G. Szent-Györgyi : *J. Biol. Chem.*, **201**, 189 (1953).
- (8) 奥貫一男他 : 酵素化学シンポジウム, **9**, 1 (1954).
- (9) 戸田弘子他 : 酵素化学シンポジウム, **14**, 320 (1960).
- (10) 成田耕造他 : 酵素化学シンポジウム 17 回予講集, 1965, p. 89.
- (11) 赤堀四郎他 : 酵素化学シンポジウム, **12**, 13 (1957).
- (12) 赤堀四郎編 : 酵素研究法, **2**, 113 (1958).
- (13) 赤堀四郎編 : 酵素研究法, **2**, 108 (1958).
- (14) S. P. Colowick, N. O. Kaplan : *Methods in Enzymology*, **3**, 448 (1957).