ドデシル硫酸ナトリウムによる甘藷 β -アミラーゼ の構造変化について

竹田靖史, 檜作 進, 島田順子*
(鹿児島大学農学部農芸化学科)

昭和 47 年 3 月 17 日 受理

Structural Change of Sweet Potato β -Amylase by Sodium Dodecyl Sulfate

By Yasuhito TAKEDA, Susumu HIZUKURI and Junko SHIMADA*

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kagoshima University

Structure and behaviors of sweet potato β -amylase (α -1, 4-glucan maltohydrolase, EC 3. 2. 1. 2) upon the denaturation by sodium dodecyl sulfate (SDS) were investigated.

The decrease in activity and the increase in the number of titrable sulfhydryl groups of the enzyme occurred simultaneously at the same rate on incubation with SDS. Several bands appeared in a disc gel electrophoresis pattern of the denatured enzyme. The results obtained from Sepharose 6B gel filtration and SDS polyacrylamide gel electrophoresis of the denatured enzyme suggested that these bands corresponded to the monomer and its polymerized forms. SDS gel electrophoresis in the presence of mercaptoethanol showed that the polymerized forms were dissociated into monomer. The SDS denatured enzyme, however, did not restore the activity in the presence of mercaptoethanol after dialysis and gel filtration.

(Received March 17, 1972)

* Present address : Chiba Public Health Laboratories

緒 言

われわれは、すでに甘藷 β -アミラーゼ (α -1, 4-glucan maltohydrolase, EC 3. 2. 1. 2) について、その単量体の分子量を、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、およびジニトロフェニール化による N-末端アミノ酸分析法で測定した結果から、また本酵素がアラニンを含む唯一の N-末端アミノ酸とすることから、同じ単量体からなるサブユニット構造を示唆した⁽¹⁾。また、本酵素を高度に希釈すると、一部分不活性化し、限界ミセル濃度のトリトン X-100 (非イオン系界面活性剤) を添加することにより、可逆的に活性が回復すること、またこの添加は希釈による不活性化を防ぎ、活性の安定化に有効であること、さらにこの不活性化は、酵素分子が空間的に広がったためか、あるいはサブユニット構造の解離によるものであらうと報告した⁽²⁾。

* 現在、千葉県衛生研究所。

本実験では、甘藷 β -アミラーゼの構造と性質をさらに明らかにするために、ドデシル硫酸ナトリウムによる本酵素の構造変化を、ゲル濾過法と、ディスク電気泳動法により調べ、若干の知見を得たので報告する。

実験材料および方法

1. 材料 β -アミラーゼは、既報⁽³⁾の方法により精製し、水溶液から結晶化し、0°C に保存したものを用いた。ドデシル硫酸ナトリウム (以下 SDS と省略する) は、和光純薬製のものをアルコール溶液から再結晶化⁽⁴⁾して用いた。可溶性でんぷんは純正化学製特級、牛血清アルブミンは Sigma 社製、Sepharose 6B は Pharmacia Fine Chemicals 製のもの、他の試薬は和光純薬製の特級のものを使用した。

2. 方法 β -アミラーゼ活性の測定は、次のように行なった。2.0% 可溶性でんぷんを含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.8) 0.1 ml に、0.04% トリトン X-100 を含

む上記緩衝液で適度に希釈した酵素液 0.1 ml を加え、37°C で、10 分間反応させ Somogyi 試薬⁽⁶⁾ (使用前に水で2倍に希釈) を 2 ml 加えて反応を停止し、10 分間沸騰水中に保った後、流水で冷却し、Nelson 試薬⁽⁶⁾ 1 ml を加え攪拌後、約 10 分間放置し、水で全量を 10 ml にしたものを用いてクレット光電比色計 #54 のフィルターで、マルトースを標準にして測定した。ここで、緩衝液に加えたトリトン X-100 は、酵素の安定化をはかるためである⁽²⁾。

たん白質の測定は、日立分光光度計 139 型を用いて 280 m μ の吸光度を測定することにより行なった。 β -アミラーゼのたん白質は、 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (280 m μ) = 17.7 に基づいて測定した⁽³⁾。

Sephacrose 6 B によるゲル濾過は、長さ 90 cm, 直径 1.5 cm のカラム (ミツミ製) に 85 cm の高さまでゲルを詰め、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で飽和し、落差 75 cm, 流速毎時 6.7 ml で、2 ml ずつ分取し、室温で行なった。

SH 基の定量は 5 mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (以下 DTNB と省略する) を用い、Ellman の方法に準じて行なった⁽⁶⁾。

ディスク電気泳動は、Ornstein と Davis の方法⁽⁷⁾ に準じ、7.5% アクリルアミドゲル (pH 9.4 用ゲル) を用いて行なった。ただし、試料用ゲルの代りに、試料 100 μ l にグリセロール 10 μ l を加え、その 50 μ l を使用した。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、Weber らの方法で行なった⁽⁸⁾。

実験結果

1. SDS 変性時の活性と SH 基の挙動

前報⁽²⁾で、本酵素の SH 基は酵素分子の表面には存在せず、分子内部に包み込まれた状態で、単量体 (分子量 57,200) 当り 6 モルの SH 基が存在することを報告した。そこで、SDS による本酵素の構造変化を知る目的で、まず変性時の活性と SH 基の挙動を調べた。

Fig. 1 は DTNB の存在下で本酵素を SDS で変性し、残存活性と残存する SH 基とを経時的に示したもので、酵素の失活は、終始 1 次反応で進み、また同じ速度で SH 基が DTNB により修飾されることが認められた。

2. SDS 変性 β -アミラーゼの電気泳動

次に SDS の濃度を変えて、それに伴う活性の変化と、構造の変化をポリアクリルアミドディスク電気泳動法に

Fig. 1. Denaturation of β -Amylase by SDS.

β -Amylase (final conc., 0.60 mg/ml) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) was incubated with 5 mM SDS and 0.5 mM DTNB at 25°C in a microcuvette. The progress of the reaction of SH groups and DTNB (Δ) was followed by measuring the increase in optical density at 412 m μ . While, the activity loss ($\circ$) was followed by the assay procedure indicated in the text except incubating at 30°C for 5 min, after 1000 fold dilution of the incubation mixture with ice-cold 50 mM acetate buffer, pH 4.8, containing 0.04% Triton X-100.

Fig. 2. SDS Concentration Dependent Inactivation of β -Amylase.

β -Amylase (final conc., 7 mg/ml) in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0, was incubated with SDS at 37°C for 2.5 hr.

より調べた。Fig. 2 に示すように、SDS 濃度が約 0.1% 位から活性の減少が始まり、0.3% では約半分が、1.0% 以上では全活性が失われている。各々の SDS 濃度で変性した標品を、水で 71 倍に希釈し、電気泳動を行なったところ、SDS で処理しない標品では、ゲルの陰極端に近い部分に 1 本の明瞭なバンドが認められ、SDS 濃度が増加するに従い、そのバンドは徐々に細くなるが鮮明に残っており、と同時に、より速い移動度を持つ 3 本の不

Fig. 3. Disc Gel Electrophoresis Patterns of SDS-Denatured β -Amylase (see Fig. 2).

明瞭なバンドが現われた (Fig. 3). Fig. 2 と Fig. 3 を対比すると, 活性の残存する範囲では, 未変性の標品と同じ位置に明瞭なバンドの存在が認められる。

われわれは, すでに本酵素が同じ単量体からなるサブユニット構造であることを示唆した⁽¹⁾. 従って, ここに得られた 3 本の不明瞭なバンドは, SDS の作用により変性解離した単量体が, なんらかの要因で, いくつか再会合したものと考えられる. バンドがやや不明瞭なのは, たん白質に結合した SDS の分子数の相違によるものと思われる。

3. SDS 変性 β -アミラーゼのゲル濾過

Fig. 3 に示された 3 本の不明瞭なバンドが, 単量体の重合度の相違によることをさらに明らかにするため, SDS 変性標品を Sepharose 6B でゲル濾過を行ない検討した。

本酵素 (最終濃度, 7mg/ml) を 2% SDS-1% メルカプトエタノールを含む 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で 37°C, 2.5 時間処理した後, 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して 1 夜透析し, Sepharose 6B でゲル濾過を行ない, たん白質と活性を測定した (透析液およびゲル濾過の溶出液にメルカプトエタノールを加えても, 結果に相違はなかった). Fig. 4 に示すように, 活性は全く認められず, 未変性の標品と同位置に一つのたん白質のピークがみられた. 従って変性した β -アミラーゼも, ゲル濾過的に一見均一であると判断されるが, 未変性の標

Fig. 4. Sepharose 6B Gel Filtration Patterns of Native and SDS Denatured β -Amylase. --- native β -amylase, — denatured β -amylase, × activity of denatured β -amylase, BSA : bovine serum albumin.

Fig. 5. Disc Gel Electrophoresis Patterns of SDS Denatured β -Amylase Eluted from Sepharose 6B Column (see Fig. 4).

品に比べ, かなり広がった溶出曲線を示すこと, Fig. 3 で示すように変性標品が不均一であることから, ピークとその前後の区分について, ディスク電気泳動を行ない検討した。

Fig. 5 に示すように, いずれも異なった電気泳動図が得られた. すなわち, ゲル濾過でピークの前に溶出する区分では, 電気泳動で移動度の遅いものが多く, ピークでは速いものから遅いもの, ピークの後に溶出する区分では, 速いものも多く認められた. このことは, ゲル濾過の溶出曲線が, 分子量的に不均一なものからなってい

Fig. 6. SDS-Polyacrylamide Disc Gel Electrophoresis Patterns of SDS-Denatured β -Amylase Eluted from Sepharose 6B Column (see Fig. 4).

A : without mercaptoethanol,
B : with mercaptoethanol.

ること, また電気泳動で移動度の遅いものは, 分子量が大きく, 速いものは分子量が小さいことを示している。そこで, 電気泳動で移動度の最も速いものが単量体であるか否かを, SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法⁽⁸⁾により検討した。Fig. 5 と同じゲル濾過の溶出区分について, メルカプトエタノールを除き行なったところ, Fig. 6 A に示すように, ゲル濾過の溶出順に, 移動度の速い濃いバンドが認められた。これと Fig. 5 の結果から Fig. 5 の移動度の最も速いものは, Fig. 6 A の移動度の速いものと同一であると判断される。また, その移動度から分子量は 56,200 となり, 既報⁽¹⁾の値と一致した。従って, Fig. 5 の移動度の最も速いものが, 単量体であると断定された。そこで, Fig. 5 の電気泳動図から, それぞれのバンドの移動度を(リーディングイオンに対する)求め, 移動度の一番速いものが単量体であることから, より遅いものの順に, 2, 3, 4, 5 量体と仮定し, 移動度を分子量の対数に対しプロットすると, その間に直線関係が得られた (Fig. 7)。この事実は, 上の仮定が妥当であることを示唆するものであろう。この電気泳動図は Fig. 3 より, およそ 2 本のバンドが増加しているが, これは SDS 変性後, 透析処理でさらに重合したものとと思われる。

次に, 前述の同じ三つのゲル濾過区分について, メル

Fig. 7. The Relation between Mobility and Molecular Weight of Bands Appeared in Disc Gel Electrophoresis Pattern (see Fig. 5).

* Numbers of polymerized monomer were indicated in the figure.

カプトエタノールを加え, SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった (Fig. 6 B)。この結果, 3 区分とも同じ単量体の位置に, 1 本のバンドが得られた。この事実は, なんらかの要因で重合

したものが, メルカプトエタノールにより解重合することを示唆している。

以上の実験結果は, SDS の作用により本酵素は, 高次構造が変化し, 活性を失い, 生じた単量体は重合しやすい性質を持つこと, また重合したものは, メルカプトエタノールの存在下で, SDS ゲル電気泳動により解重合するものと理解される。

SDS によって変性した単量体は分子量 56,200 であるが, 69,000⁽⁹⁾の牛血清アルブミンよりゲル濾過で高分子の位置に溶出している (Fig. 4)。このことは, SDS のたん白質への結合によることが考えられるので, 溶出した区分について SDS の測定を行なった。溶出区分を 1N HCl で 100°C, 30 分間加水分解し, 生じた硫酸根を, 担体として既知量の硫酸カリウムを加え, ペンジジン硫酸として沈殿し, Dodgson ら⁽¹⁰⁾の方法で定量を行なった。微量のため正確な定量は困難であったが, 検出された SDS による単量体当りの分子量の増加は, 最大 4% にとどまり, SDS の結合による分子量の増大では説明できないことがわかった。そこで, 牛血清アルブミンを本酵素と同一条件で変性し, 透析後ゲル濾過を行なったところ, より高分子の位置に溶出が認められた (Fig. 4)。このことから, SDS により変性した本酵素は, 微量結合している SDS によって, 未変性のものより空間的に広が

った構造をとるためと考えられる。

考 察

Cook と Koshland⁽¹¹⁾ は、サブユニット構造をもつ数種の酵素について、尿素処理で解離し、ついで希釈による会合を試みた実験で、甘藷 β -アミラーゼの共存下でこの処理を行なうと、酵素活性の可逆的な回復が阻害され、 β -アミラーゼの濃度を増加すると、回復が完全に阻害されるが、尿素処理をしない β -アミラーゼでは、この阻害が起こらないことを認め、この現象は尿素処理によって変性し、空間的に広がった β -アミラーゼが、他の酵素と異種会合しやすく、他の酵素の会合を妨げるためであろうと考察している。本実験で、甘藷 β -アミラーゼを SDS により変性すると、酵素の高次構造の崩壊が起こり、その単量体は、互いに重合する性質があることを示した。このことは Cook らの結果に類似し、また変性剤のいかなを問わず、変性した単量体そのものの性質であることが推察される。

本酵素を SDS で変性し、ゲル濾過により溶出した区分の SH 基は、単量体 1 モル当り 6 個の SH 基中 4.5 個の SH 基が酸化されていた。単量体の重合が -S-S- 結合で行なわれている可能性を考慮し、SDS 変性時に DTNB で SH 基を修飾し (3mM DTNB, 2% SDS, pH 7.0, 37°C, 2 時間)、透析後、ゲル濾過を行なったが、単量体のみを得ることはできなかった。また、SDS 変性した酵素にメルカプトエタノールを加え、ディスクゲル電気泳動を行なったが、同様に 3 本のバンドが現われ、泳動図に変化は認められなかった。Cook らも、メルカプトエタノールの存在下でも、異種会合の起こることを報告している。これらの実験結果は、単量体の重合に SH 基が関与していることに否定的であるが、メルカプトエタノールを加え、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なうと、すべて単量体の位置に移動する事実は、その関

与を示唆するものであろう。最近、Brown ら⁽¹²⁾ はグリコーゲン合成酵素からグリコーゲンを除去すると、温度に依存した解離、会合の起こることを報告している。今後、本酵素での重合様式を明らかにするには、より詳細な条件を吟味する必要がある。

要 約

甘藷 β -アミラーゼを SDS で変性すると、失活と同時に高次構造がこわれ、解離した単量体は互いに重合する性質のあることが分かった。この重合体は、メルカプトエタノールの存在下で、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、単量体に解重合することが認められた。透析、ゲル濾過による SDS 除去操作を行なっても、可逆的な活性の回復は認められなかった。

- (1) Y. Takeda, S. Hizukuri and T. Murakami : *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 778 (1971).
- (2) Y. Takeda and S. Hizukuri : *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 175 (1972).
- (3) *idem* : *ibid.*, **185**, 469 (1969).
- (4) G. Schmidt : *Methods in Enzymology*, **3**, 688 (1957).
- (5) J. E. Hodge and B. T. Hofreiter : *Methods in Carbohydrate Chemistry*, **1**, 386 (1962).
- (6) G. L. Ellman : *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70 (1959).
- (7) L. Orstein : *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 321 (1964).
B. J. Davis : *ibid.*, **121**, 404 (1964).
- (8) K. Weber and M. Osborn : *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969).
- (9) C. Tanford, K. Kawahara and S. Lapanje : *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 729 (1967).
- (10) K. S. Dodgson and B. Spencer : *Biochem. J.*, **55**, 436 (1953).
- (11) R. A. Cook and D. E. Koshland, Jr. : *Pro. Natl. Acad. Sci.*, **64**, 247 (1969).
- (12) N. E. Brown and J. Larner : *Biochim. Biophys. Acta*, **242**, 69 (1971).