

鶏の α -アミラーゼに関する研究 (その 1)

佐 藤 雅 子

Studies on chicken α -amylase

Masako SATO

序 論

動物の α -アミラーゼとしては、唾液や膵臓の α -アミラーゼがよく知られている。ところが鶏の組織の α -アミラーゼ活性を測定していた折、脾臓にもかなり強い α -アミラーゼ活性が認められたので、この酵素を精製分離しその性質を検討したいと考え本実験を行なった。

実 験 方 法

I. 試料の調製

鶏の脾臓は死後出来るだけ早く冷アセトンに浸漬し、数日後乳鉢にて磨碎し、2倍量のアセトンで3回、アセトン・エーテル等量混液で3回、最後に等量のエーテルで3回、それぞれ激しく攪拌した後ヌッチェで吸引し、脱脂並びに脱水した。エーテルを完全に蒸発させ、セイン状部分や脾臓の膜などを取除いた後、真空デシケーターで乾燥した。この操作により脾臓の約20%に相当する淡褐色の粉末が得られた。

II. 酵素活性の測定

α -アミラーゼ活性の測定は Blue-Value法¹⁾に従い、アミラーゼによる澱粉のヨード呈色の変化から求めた。即ち1.1%可溶性澱粉2mlにVeronal緩衝液1mlを混和し55°Cの恒温槽中で5分間予温してから酵素液1mlを加え30分間反応させ、0.5N酢酸10mlを添加し反応を停止させた。この中の1mlを、0.005%ヨード溶液10mlと反応させ分光光度計で700m μ の吸光度を測定した。対照として、酵素液のかわりに水1mlを加えて同様の操作を行った。

酵素活性度単位は55°C、30分間に700m μ の吸光度を10%低下せしめた基質のmg数で表わした。(DB_{mg}^{55°30'}A)

実 験 結 果

I. 酵素の精製

1) 抽 出

上述のごとく調製した乾燥粉末約60gを15倍量の0.25M酢酸ナトリウムに分散させトリオール及びオクチルアルコールを加え2日間徐々に攪拌しながら抽出した。遠心分離して濃赤紫色透明液

を取出した。

2) アセトン分別

抽出液に冷アセトンを攪拌しながら徐々に滴下しアセトン 40~80% の分別を行った。沈澱は 150 ml の水で溶解し再びアセトン 30~80% の分別を行い沈澱を 75 ml の水に溶解した。

3) 硫安分別

溶液は 0.1 N アンモニアで pH 8.0 に調製し、同じ pH に調製した冷飽和硫安溶液を徐々に加え硫安 0.45 飽和の分別を行った。この状態で酵素は安定していたので、酢酸抽出→硫安 0.45 飽和までの操作を繰返し行い酵素を貯えた。尚抽出操作では再抽出液についても同様の操作を行った。抽出→硫安分別を 10 回これらを全部合して遠心分離し沈澱を 200 ml の水に溶解した。同様にして再び冷飽和硫安溶液を加え硫安 0.35 飽和の分別を行い沈澱は 200 ml の水に溶解した。

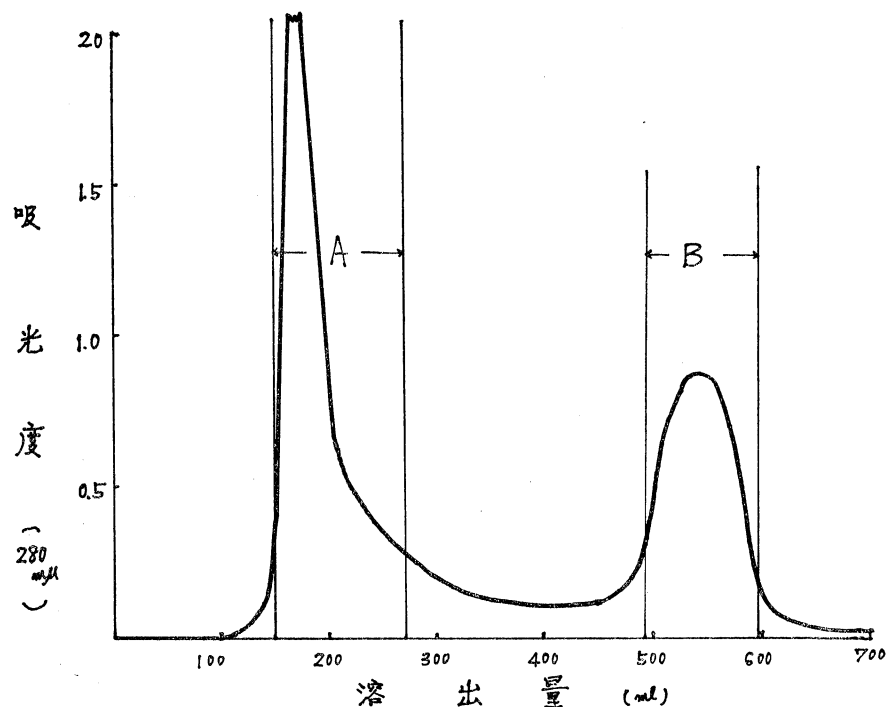
この溶液は予め 1 N 酢酸ナトリウムで処理した Amberite CG-50, 50 g の樹脂層を通過させ SO_4^{2-} を Ac^- と交換した。同様に再度、新しい樹脂層を通過させ水で洗った。

4) アセトン分別

引続き更にアセトンを滴下しアセトン 80% の分別を行い沈澱は $\frac{M}{40}$ Tris 緩衝液, pH 8.0 に溶解し Sephadex G-25 で濃縮した。

5) Sephadex G-75 によるカラムクロマトグラフィ

濃縮液のうち 10 ml を予め溶媒で平衡化した Sephadex G-75 のカラム (2.8×98 cm) に添加



第 1 図 Sephadex G-75 によるカラムクロマトグラフィ

溶媒: $\frac{M}{40}$ Tris 緩衝液, pH 8.0

カラム: 2.8×98 cm 溶出速度: 15 ml/hr

し、 $\frac{M}{40}$ Tris 緩衝液, pH 8.0 を溶媒とし, 15 ml/hr の流速で溶出を行った。溶出液の蛋白量は 280 m μ の吸光度から測定した。

その結果第 1 図に示すごとく蛋白質画分 A と蛋白質画分 B との 2 つの主要成分に分離した。

各段階に於る α -アミラーゼ活性は第 1 表に示した。

表から明らかなように Sephadex G-75 により分離した 2 つの蛋白質画分 A 及び B はいずれも α -アミラーゼ活性を示した。これら 2 種の α -アミラーゼを比較してみると, 蛋白質画分 A はカラムに添加した試料の比活性度とほとんど大差はなかったが, 蛋白質画分 B の活性度は非常に高く, 比活性度はカラム試料の約 30 倍に相当し, かなり純度の高い α -アミラーゼであると思われる。 $\frac{M}{40}$ Tris 緩衝液で溶出した蛋白質の N 量はカラム試料の 54% であり, 残りはカラムに吸着したものである。

酢酸抽出液をアセトン分別, 硫酸分別, ゲルろ過を行うことにより, 蛋白質画分 A は酢酸抽出液の約 20 倍, 蛋白質画分 B では約 600 倍に純度が高められたことがわかる。

第 1 表 精製過程における α -アミラーゼ活性

I アセトン分別および硫酸分別

	液量 (ml)	活性度 DB $_{mg}^{55,30}$ A/ml	全活性度 DB $_{mg}^{55,30}$ A $\times 10^{-3}$	比活性度 DB $_{mg}^{55,30}$ A/mgN
酢酸抽出液	5,350	618	3,280	53.2
アセトン 40~80% 溶解液	1,640	1,620	2,670	
アセトン 30~80% 溶解液	820	2,920	2,400	292
硫酸 0.45 飽和 溶解液	200	9,730	1,950	
硫酸 0.35 飽和 溶解液	200	8,610	1,720	672
アセトン 80% 第 1 回溶解液	15	73,800	1,110	
第 2 回溶解液	9	37,400	337	

II Sephadex G-75 によるカラムクロマトグラフィー

カラム試料	10	48,500	485	1,000
蛋白質画分 A	130	145	18.8	1,090
蛋白質画分 B	105	2,010	211	29,100

II. 酵素の性質

Sephadex G-75 により分離した蛋白質画分 A 及び B は凍結乾燥し, 要時水で溶解後, 透析して塩を取除き酵素溶液とした。

1) 最適 pH

種々の Veronal 緩衝液を用い 55°C に於る蛋白質画分 A, B の最適 pH を求め第 2 表に示した。

第 2 表 最 適 pH

酵 素	pH	5.0	6.0	6.5	6.75	7.0	7.25	7.5	8.0	9.0
	蛋白質画分 A		96.2	116	125	130	121	118	111	108
蛋白質画分 B		91.5	121	123	123	120	120	117	109	88.3

表より A, B 両アミラーゼはいずれも pH 6.75 で最も高い活性を示すことがわかった。

2) 最適温度

pH 6.75 の条件下で A, B 両酵素を種々の温度で反応させ最適温度を求めた。その結果は第 3 表に示すように、A, B 両アミラーゼはいずれも最適温度 55°C であり、60°C, 65°C でかなり酵素活性は低下した。

第 3 表 最 適 温 度

酵 素	温度°C	35	40	45	50	55	60	65
	蛋白質画分 A		48.2	120	154	181	200	187
蛋白質画分 B		31.1	76.4	107	127	159	77.6	18.9

3) 分解生成物

澱粉溶液に A, B 両アミラーゼを加え、pH 6.75, 55°C で 6 時間分解し (ヨード澱粉反応は無色であった)、マルトース, グルコース標品と共に上昇法によりペーパークロマトを行い、A, B 両アミラーゼの分解生成物を検討した。溶媒は n-ブタノール:酢酸:水 (4:1:5) 及び n-ブタノール:ピリジジン:水 (3:2:1.5) を用い、ベンゼントリクロル酢酸で糖の検出を行った。その結果、A, B 両アミラーゼは澱粉を分解してマルトースを生成することがわかった。

4) 各種無機物の影響

1.1%可溶性澱粉に Veronal 緩衝液を混和後、各種無機物を $\frac{M}{1,000}$ になるように添加し酵素液を加え、 α -アミラーゼ活性を測定した。活性度は無機物を添加しない時の活性度を 100 とし、それに対する相対活性度であらわした。

その結果は第 4 表に示すように、A, B 両アミラーゼは各種無機物に対してほとんど同じような挙動を示すことがわかった。即ち各種無機物の中では CaCl₂, NaCl, Na₂SO₄, KCl などの無機物

第 4 表 各 種 無 機 物 の 影 響

無 機 物	相 対 活 性 度		無 機 物	相 対 活 性 度	
	蛋白質画分 A	蛋白質画分 B		蛋白質画分 A	蛋白質画分 B
none	100	100	BaCl ₂	95	89
Li ₂ SO ₄	102	101	MnCl ₂	87	83
NaCl	107	105	FeSO ₄	84	92
Na ₂ SO ₄	107	101	FeCl ₃	30	27
NaNO ₃	100	98	Fe ₂ (SO ₄) ₂	46	44
KCl	105	107	CoCl ₂	85	72
MgCl ₂	100	102	CuSO ₄	0	0
MgSO ₄	100	102	ZnSO ₄	0	0
CaCl ₂	111	108	SnCl ₂	80	78

は酵素活性を高めたのに対し、 CuSO_4 、 ZnSO_4 は酵素反応を全く阻害してしまった。

5) 金属の影響

α -アミラーゼは金属と密接な関係を持っており、透析操作あるいは EDTA の反応により酵素活性は低下すること²⁾³⁾、 Ca^{2+} を補うと可逆的に酵素活性を回復することが報告されている²⁾。

そこで鶏の脾臓の両アミラーゼについて金属の影響を検討してみた。

①EDTA に対する安定性

A、B 両酵素溶液に EDTA を種々の濃度になるように添加し室温 (15~18°C) に 10 分間放置後 α -アミラーゼ活性を測定した。酵素活性は EDTA を加えない時の活性度を 100 とし、それに対する相対活性度であらわした。

その結果は第 5 表から明らかなように A、B 両アミラーゼはいずれも EDTA に対してかなり不安定であり、EDTA 濃度 $\frac{M}{100}$ では、10 分間の反応で酵素活性を全く失ってしまった。蛋白質画分 B は画分 A に比べて一層 EDTA に対して不安定であった。

第 5 表 EDTA に対する安定性

酵素		EDTA 濃度				
		0	$\frac{M}{1000}$	$\frac{M}{500}$	$\frac{M}{100}$	$\frac{M}{50}$
A	活性度	97.4	95.4	74.3	0	0
	相対活性度	100	98	76	0	0
B	活性度	87.8	66.7	51.5	0	0
	相対活性度	100	76	59	0	0

②各種金属の補足効果

まず酵素溶液に EDTA を $\frac{M}{100}$ になるように添加し室温に 10 分間放置後、 Ca^{2+} を各種濃度になるように加え α -アミラーゼ活性を測定した。活性は EDTA 及び Ca^{2+} を添加しない時の活性度を 100 としそれに対する相対活性度であらわした。

その結果は第 6 表 I に示すように A、B 両アミラーゼはいずれも EDTA 添加により酵素活性を全く失っていたが、 Ca^{2+} を補うことにより可逆的に活性を回復することがわかった。 $\frac{M}{100}$ EDTA 濃度に対して Ca^{2+} 濃度は $\frac{M}{50}$ の場合に最も回復効果は大きいことを知った。

第 6 表 金属の補足効果

I Ca^{2+} の補足効果

酵素		Ca 濃度			
		0	$\frac{M}{100}$	$\frac{M}{50}$	$\frac{M}{10}$
A	活性度	0	41.3	58.1	14.2
	相対活性度	0	42	60	15
B	活性度	0	22.4	23.0	17.5
	相対活性度	0	25	26	20

II 各種金属の補足効果

酵素	各種金属							
	活性度	none	Mg ²⁺	Ba ²⁺	Sn ²⁺	Co ²⁺	Mn ²⁺	Fe ²⁺
A	活性度	0	54.5	51.9	48.7	5.8	0	0
	相対活性度	0	56	52	50	6	0	0
B	活性度	0	24.4	17.6	35.1	3.5	0	0
	相対活性度	0	28	20	40	4	0	0

そこで Ca²⁺ 以外の各種金属を $\frac{M}{50}$ になるように添加し, Ca²⁺ の場合と同様に行いその回復効果を検討してみた。

その結果第6表IIから明らかなようにA, B両アミラーゼはいずれも Ca²⁺ のほか, Mg²⁺, Ba²⁺, Sn²⁺ などの金属を補うことにより可逆的に酵素活性を回復することを知った。金属相互の間では回復効果に幾分相異がみられたが, Ca²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, Sn²⁺ の補足により蛋白質画分Aでは50~60%, 画分Bでは20~40%の酵素活性を回復した。これに対し Co²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺ などの金属の補足効果はみられなかった。

以上の実験から鶏の脾臓 α -アミラーゼは金属と密接な関係を持っていることを知った。次に α -アミラーゼは金属の中でも Ca²⁺ は重要であり精製過程で酵素を保護すること³⁾, 結晶アミラーゼの失活を防ぐために Ca²⁺ を添加すること⁴⁾が行われており, Fisher²⁾ は金属分析の結果, 各種 α -アミラーゼはカルシウムを含む金属蛋白質であることを報告している。そこで本実験でもカルシウムについて検討を行なった。

③Ca²⁺ の最適濃度

酵素反応に於る Ca²⁺ の最適濃度を知るために, 酵素液に Ca²⁺ を各種濃度になるように添加し, α -アミラーゼ活性を測定した。活性は Ca²⁺ を加えない時の活性度を100としそれに対する相対活性度であらわした。

その結果は第7表に示すようにA, B両アミラーゼはいずれも Ca²⁺ の濃度に比例して相対活性度は高まったが, 蛋白質画分Aでは $\frac{M}{20}$ Ca²⁺ で, 画分Bでは $\frac{M}{100}$ Ca²⁺ で活性は最も高くそれ以上の Ca²⁺ 濃度ではかえって活性は低下する傾向がみられた。

④熱処理に対する Ca²⁺ の影響

酵素液に Ca²⁺ を $\frac{M}{100}$ になるように添加したものと無添加のものを種々の温度で10分間熱処理し, 直ちに氷水中で冷却後 α -アミラーゼ活性を測定した。活性は熱処理をせず Ca²⁺ を加えないものの

第7表 Ca²⁺ の最適濃度

酵素	Ca ²⁺ 濃度								
	活性度	0	$\frac{M}{1000}$	$\frac{M}{500}$	$\frac{M}{200}$	$\frac{M}{100}$	$\frac{M}{50}$	$\frac{M}{20}$	$\frac{M}{10}$
A	活性度	117	130	131	132	136	141	142	141
	相対活性度	100	111	112	112	115	120	121	120
B	活性度	113	123	128	130	132	116	119	118
	相対活性度	100	109	113	115	116	102	105	104

第 8 表 Ca^{2+} の熱処理に対する保護効果

酵素	温度			20	30	40	45	50	55	60	65	
	°C											
		相対活性度										
A	Ca^{2+} 無添加	99	91	86	68	32	13	0	0			
	Ca^{2+} 添加	107	100	95	94	91	82	40	7			
B	Ca^{2+} 無添加	99	90	89	60	28	0	0	0			
	Ca^{2+} 添加	105	98	95	85	78	39	24	0			

活性度を 100 としそれに対する相対活性度であらわした。

その結果は第 8 表に示すように A, B 両アミラーゼはいずれも Ca^{2+} 無添加の場合は 40°C 以下の熱処理に対してはかなり安定しているが温度の上昇に伴って不安定になり, 蛋白質画分 B は 55°C , A 画分では 60°C の熱処理で完全に酵素活性を失ってしまった。これに対し Ca^{2+} 添加したものは 50°C の熱処理でも相対活性はかなり高く, 55°C でやや低下するが, 60°C の熱処理でも 20~40% の相対活性を保っていた。蛋白質画分 B は画分 A に比べて熱処理に対して幾分不安定であった。

この実験から Ca^{++} は熱処理に対して酵素を保護することがわかった。

⑤ pH に対する Ca^{2+} の保護効果

酵素液に Ca^{2+} を $\frac{\text{M}}{100}$ になるように添加したものと無添加のものに各種 pH の Veronal 緩衝液を加え, 室温 ($15\sim 18^{\circ}\text{C}$) に 1 hr 放置後, α -アミラーゼ活性を測定した。 Ca^{2+} 無添加のもので pH 6.75 の Veronal 緩衝液を加えたものの活性度を 100 としそれに対する相対活性度であらわした。

その結果は第 9 表に示すように A, B 両アミラーゼはいずれも Ca^{2+} 無添加の場合にはアルカリの pH に対しては, 不安定であり, pH 9.34 で酵素活性を失ってしまったが, Ca^{2+} を添加したものは, アルカリの pH に対して活性の低下は緩慢であり pH 9.34 でも 30~50% の活性を保っていた。

この実験から豚の膵臓 α -アミラーゼ⁶⁾ に見られる程, 顕著ではなかったけれども, Ca^{2+} はアルカリの pH に対して酵素を保護することがわかった。

第 9 表 Ca^{2+} の pH に対する保護効果

酵素	pH		3.20	4.10	5.20	6.45	7.25	8.55	9.64
	相対活性度								
A	Ca^{2+} 無添加	0	45	72	89	100	45	0	
	Ca^{2+} 添加	0	52	90	100	112	62	27	
B	Ca^{2+} 無添加	0	55	92	99	104	56	0	
	Ca^{2+} 添加	0	60	98	103	117	95	55	

考 察

鶏の脾臓からアセトン分別, 硫酸分別及び Sephadex G-75 によるゲルろ過により 2 種の α -アミラーゼを分離した。これら 2 種の α -アミラーゼはその諸性質を調べた結果, 最適 pH, 最適温度いずれも同じであり, 各種無機物や金属に対する挙動もほとんど同じであったことなどから, 同じ作用機作をもつ α -アミラーゼであると思われる。蛋白質画分 B は画分 A に比べて酵素活性は非常に高

く、比活性では画分Aの約30倍に相当し、蛋白部分がかなりはずれたほとんど活性基からなる α -アミラーゼであると思われる。鶏の脾臓中に2種の α -アミラーゼが存在していたが、Millionら⁷⁾⁸⁾ は人の唾液から Sephadex, リン酸カルシウム, DEAE セルロースを使ったカラムクロマトグラフィにより3種の α -アミラーゼを分離しており、この3種の中で最も量的に多く安定性の強いものが Meyer ら⁹⁾ がアセトン分別, 硫酸分別によって結晶化した α -アミラーゼであろうと述べている。大賀ら¹⁰⁾ も Asp. Oryzae から硫酸分別, DEAE-Sephadex により4種の α -アミラーゼを分離している。

これら脾臓の α -アミラーゼの性質を唾液や膵臓など他の組織の α -アミラーゼと比較してみると、澱粉を分解してマルトースを生成すること、最適 pH は大体中性付近にあること¹¹⁾、金属と関連性を持っているなど、同じような傾向がみられたが、脾臓の α -アミラーゼが生体内でいかなる生理機能を営んでおり、又他の組織の α -アミラーゼといかなる関係にあるか今後更に検討を加えたい。

要 約

1) 鶏の脾臓からアセトン分別, 硫酸分別及び Sephadex G-75 によるゲルろ過により、2種の α -アミラーゼを分離した。

2) 2種の α -アミラーゼの性質はほとんど同じであった。

① 澱粉を分解してマルトースを生成する。

② 最適 pH 6.75, 最適温度 55°C である。

③ 各種無機物の中では CaCl_2 , Na_2SO_4 , KCl , NaCl などが酵素活性を促進し, CuSO_4 , ZnSO_4 などは阻害する。

④ EDTA により酵素活性を失う。

⑤ EDTA により失活した酵素は Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sn^{2+} などを補うと可逆的に酵素活性を回復する。

⑥ カルシウムは熱及びアルカリの pH に対して酵素を保護する。

本研究に当り御指導いただいた奈良女子大学栄養学教室浜口陽一教授に厚く感謝致します。

文 献

- 1) H. Fuwa: J. Biochem (Japan) **41**, 5 (1954), 末堀四郎: 酵素研究法 **2**, 108.
- 2) Bert. L. Valle, Erie A. Stein, William N. Sumerwell & Edmond H. Fisher: J. Biol. Chem., **234**, 2901 (1959)
- 3) Erie A. Stein & Edmond H. Fisher: J. Biol. Chem. **232**, 867 (1958)
- 4) S. Akabori: J. Biochem. (Tokyo), **43**, 741 (1956)
- 5) M.L. Calwell & Jo-fen Tung Kung: J. Am. Chem. Soc., **75**, 3132 (1953)
- 6) Edmond H. Fisher & Erie A. Stein: The Enzyme **4**, 234 (1962)
- 7) D. J. Millin & M. H. Smith: Biochem. Biophys. Acta., **62**, 450 (1962)
- 8) Ruth Shainkin & Yehudith Birk: Biochem. Biophys. Acta., **122**, 153 (1966)

