



# マメ科植物発芽種子中の $\alpha$ - , 及び $\beta$ -アミラーゼ の量的変動と電気泳動的特性

河野, 昭子

---

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

1992-04-24

(Date of Publication)

2009-05-18

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1645

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3090180>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001645>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



神戸大学博士論文

マメ科植物発芽種子中の $\alpha$ -、及び $\beta$ -  
アミラーゼの量的変動と電気泳動的特性

平成4年3月

河野昭子

## 目次

|   | ページ |
|---|-----|
| 序論 .....  | 1   |
| 第 I 章. 植物の $\alpha$ -、及び $\beta$ -アミラーゼ活性測定法 .....            | 4   |
| (1) 実験方法 .....  | 4   |
| ① 試料 .....  | 4   |
| ② 試料調製法 .....   | 5   |
| ③ $\alpha$ -アミラーゼ活性測定法 .....                                  | 5   |
| ④ $\beta$ -アミラーゼ活性測定法 .....                                   | 6   |
| ⑤ 電気泳動法 .....   | 6   |
| (2) 実験結果 .....  | 6   |
| ① 標準酵素を用いた場合の Pantrac 法と Phadebas 法の測定値 .....                 | 6   |
| ② 各種植物アミラーゼ活性の 3, 5-DNS 法、Pantrac 法、<br>Phadebas 法による測定 ..... | 7   |
| ③ 各種植物アミラーゼの電気泳動後の活性染色 .....                                  | 7   |
| ④ 各種植物中のアミラーゼのザイモグラム .....                                    | 8   |
| ⑤ マメ科植物発芽種子中のアミラーゼ活性変動 .....                                  | 8   |
| (3) 考察 .....  | 8   |
| 第 II 章. アルファルファ発芽種子中のデンプン分解系酵素 .....                          | 15  |
| 第 1 節. アルファルファ発芽種子中のデンプン分解系酵素の<br>変動パターン .....                | 15  |
| (1) 実験方法 .....  | 15  |
| ① 試料調製法 .....   | 15  |
| ② 酵素活性測定法 .....   | 15  |
| ③ アミラーゼの $\text{Ca}^{2+}$ 修飾後の熱処理<br>及び EDTA 処理法 .....        | 16  |
| ④ 電気泳動法 .....   | 16  |
| ⑤ アミラーゼ活性の試験法 .....   | 16  |
| ⑥ 発芽種子中の $\beta$ -アミラーゼの検出法 .....                             | 16  |
| (2) 実験結果 .....  | 16  |

|   |     |
|---|-----|
| ①アルファルファ種子発芽中の各酵素活性の変化                                | 1 6 |
| ②Ca <sup>2+</sup> 修飾後熱処理及びEDTA処理の<br>酵素活性に及ぼす効果       | 1 6 |
| ③電気泳動後のアミラーゼの活性染色                                     | 1 8 |
| ④酵素活性の局在性   | 1 8 |
| (3) 考察  | 2 3 |
| 第2節. アルファルファ種子中のアミラーゼの精製と同定                           | 2 4 |
| 第1項. $\beta$ -アミラーゼの精製と同定                             | 2 4 |
| (1) 実験方法  | 2 4 |
| ①精製法  | 2 4 |
| ②均一性試験  | 2 5 |
| ③ $\beta$ -アミラーゼの同定法                                  | 2 5 |
| ④ $\beta$ -アミラーゼの諸性質                                  | 2 6 |
| (2) 実験結果  | 2 6 |
| ①精製過程と均一性   | 2 6 |
| ② $\beta$ -アミラーゼの同定及び諸性質                              | 2 7 |
| ③ $\beta$ -アミラーゼアイソホームの分離とその諸性質                       | 2 7 |
| (3) 考察  | 3 6 |
| 第2項. アルファルファ $\alpha$ -アミラーゼの精製と同定                    | 4 2 |
| (1) 実験方法  | 4 2 |
| ①精製法  | 4 2 |
| ②均一性試験  | 4 2 |
| ③ $\alpha$ -アミラーゼの同定法                                 | 4 2 |
| (2) 実験結果  | 4 3 |
| (3) 考察  | 4 3 |
| 第3節. アルファルファ発芽種子中での $\beta$ -アミラーゼ活性発現に<br>対する抗生物質の影響 | 4 8 |
| (1) 実験方法  | 4 8 |
| (2) 実験結果および考察   | 4 8 |
| 第III章. クローバー、アズキ、ダイズ発芽種子中における $\alpha$ -              |     |

|  |       |     |
|--|-------|-----|
| 及び $\beta$ -アミラーゼ活性の変動                   | ----- | 5 2 |
| (1) 実験方法                                 | ----- | 5 2 |
| ① 試料調製法                                  | ----- | 5 2 |
| ② 酵素活性測定法                                | ----- | 5 2 |
| ③ 等電点電気泳動法                               | ----- | 5 2 |
| (2) 実験結果                                 | ----- | 5 3 |
| (3) 考察                                   | ----- | 5 3 |
| 第 IV 章. マメ科植物 $\alpha$ -アミラーゼの電気泳動的特性    | ----- | 5 9 |
| (1) 実験方法                                 | ----- | 5 9 |
| (2) 実験結果                                 | ----- | 6 0 |
| (3) 考察                                   | ----- | 6 5 |
| 第 V 章. マメ科植物 $\alpha$ -アミラーゼ分子中の固有的な親水領域 |       |     |
| の存在とアミノ酸配列                               | ----- | 7 4 |
| (1) 実験方法                                 | ----- | 7 4 |
| ① エンドウ種子からの染色体 DNA の抽出法                  | ----- | 7 4 |
| ② アガロースゲル電気泳動法                           | ----- | 7 5 |
| ③ プライマー作成法                               | ----- | 7 5 |
| ④ PCR (Polymerase Chain Reaction) 法による   |       |     |
| $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の増幅法                   | ----- | 7 6 |
| ⑤ PCR 増幅断片のサブクローニング法                     | ----- | 7 7 |
| ⑥ エンドウ $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の部分塩基配列の決定法     | ----- | 8 0 |
| (2) 実験結果                                 | ----- | 8 3 |
| (3) 考察                                   | ----- | 8 4 |
| 要約                                       | ----- | 8 9 |
| 謝辞                                       | ----- | 9 1 |
| 文献                                       | ----- | 9 2 |

## 序論

$\alpha$ -、及び $\beta$ -アミラーゼは、デンプンなどを加水分解する酵素である。 $\alpha$ -アミラーゼは、デンプンの $\alpha$ -1, 4結合を切断するエンド型の酵素で、 $\beta$ -アミラーゼは、デンプンの非還元性末端よりマルトース単位で切断するエキソ型の加水分解酵素である。 $\alpha$ -アミラーゼは微生物、動植物などに、また $\beta$ -アミラーゼは微生物や主に植物に広く分布する。

従来、アミラーゼ活性の測定方法としては、酵素と可溶性デンプンを反応させ生成した還元糖を、3, 5-dinitrosalicylic acid (3, 5-DNS) と反応させ、比色定量するいわゆるBernfeld法<sup>1)</sup>がよく使用されている。この方法では、 $\alpha$ -、及び $\beta$ -アミラーゼの分別測定には、 $\text{Ca}^{2+}$ で $\alpha$ -アミラーゼを保護し、熱処理により $\beta$ -アミラーゼのみを失活させ $\alpha$ -アミラーゼ活性を推量するが、特異的反応とは断定できない。

Pantrac法は本来血清アミラーゼ測定用に開発されたキットであるが、植物由来の $\beta$ -アミラーゼの活性測定に適することが報告されている<sup>2), 3)</sup>。一方Phadebas法は、植物 $\alpha$ -アミラーゼの活性測定に適することが示唆されている<sup>4)</sup>。この手法を $\alpha$ -、及び $\beta$ -アミラーゼ活性の分別測定に適用することを試みた。また、電気泳動後の活性染色法で $\alpha$ -、と $\beta$ -アミラーゼを識別しうるので、特異的活性測定法が確立すれば、電気泳動法と合わせて正確な両酵素の分別検出及び測定が可能になると考えられる。

植物種子発芽時にはアミラーゼ活性が変動するため、これについての多くの研究がなされている。一般に、 $\alpha$ -アミラーゼは、乾燥種子中には存在せず発芽過程で生合成される<sup>5)-8)</sup>。それに反して、 $\beta$ -アミラーゼは発芽過程でイネ種子<sup>9)</sup>とカラシ種子<sup>10)</sup>を除いて、合成はされないとされている<sup>5), 8)</sup>。穀類種子では、 $\beta$ -アミラーゼは、遊離型と結合型で存在し、結合型酵素は、還元剤かパパイーンで抽出でき、発芽種子中で結合型は遊離型に変換することなどが報告されている<sup>11)-14)</sup>。ダイズ<sup>15)</sup>、レンズマメ<sup>8)</sup>、エンドウ<sup>5)</sup>の場合は、 $\beta$ -アミラーゼは存在するが、発芽種子中で増加しないと報告されている。

著者らは、アミラーゼ分別測定法を用いて、種々の植物発芽種子中のアミラーゼ活性の測定を行い、既報とは異なる新しいタイプのアミラーゼの存在様式を認めた<sup>16), 17)</sup>。

つまりアルファルファ種子は、既報とは逆で、発芽後、乾燥種子に含まれる $\alpha$ -アミラーゼ活性が減少し、乾燥種子に遊離型で含まれる $\beta$ -アミラーゼ活性が発芽種子中で増加するという特異的なタイプであった<sup>16)</sup>。

マメ科植物アルファルファに関して、根に $\beta$ -アミラーゼの存在が報告されているが<sup>18)</sup>、根抽出物のゲルろ過画分を用いた実験系での推定で、精製・同定はなされていない。また、 $\alpha$ -アミラーゼに関しては報告がない。そこで本研究では、既報と異なる興味あるアミラーゼ変動パターンを示すアルファルファ種子に含まれるアミラーゼを精製し同定した<sup>16)、17)、19)</sup>。

一般に、アミラーゼは等電点の接近したアイソホームからなり、個々の電気泳動的分離はかなり困難であるが、発芽過程におけるアミラーゼ分子の増減を論じる上では、それらの分別分離方法は必須となる。筆者らは、アクリルアミド中に両性電解質を共重合しpH勾配を作成する、いわゆる、イモビライジング

(Pharmacia-LKB)を用いて、等電点電気泳動を試みた。アルファルファ種子の $\alpha$ -アミラーゼの等電点は $\beta$ -アミラーゼの5個のアイソホームの等電点の中間にあり、従来のアンホライジングでの電気泳動後の活性染色では、 $\alpha$ -、 $\beta$ -アミラーゼの分別が困難であったが、イモビライジング上では、この $\alpha$ -アミラーゼのバンドが出現しないという興味ある現象が観察され、これにより $\alpha$ -、 $\beta$ -アミラーゼの分別が容易化された。この現象は著者らが初めて報告した<sup>16)、20)</sup>。

また、アルファルファと分類学上同じ連“Trifolieae”に属するクローバーについて発芽過程でのアミラーゼ活性の変動を精査した<sup>21)、22)</sup>。さらに、アズキ、ダイズの発芽種子についてもアミラーゼ活性の変動を精査した。また、これらの植物の $\alpha$ -アミラーゼのイモビライジング上での電気泳動的性質には、共通性が認められた。

次に、著者らは精製したアルファルファおよびリョクトウの $\alpha$ -アミラーゼのイモビライジング上の電気泳動的性質を調べ、さらに種々の植物 $\alpha$ -アミラーゼの電気泳動的性質の共通性を検討した。その結果、著者らは、この $\alpha$ -アミラーゼの電気泳動的性質（イモビライジング中で泳動不可、かつ失活）は、マメ科植物の $\alpha$ -アミラーゼに特異的であることを発見した<sup>20)、23)</sup>。また、このような性質は酵素分子の構造にその原因があることが考えられたので、マメ科植物 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の塩基配列の検討を試みた。オオムギ、コムギ、イネの $\alpha$ -アミ

ラーゼ遺伝子塩基配列は、すでにGenBank データベースに登録されており、マメ科植物に関しては、ケツルアズキの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の塩基配列のみしか報告されていない<sup>24)</sup>。そこで、これらの塩基配列データに基づき、アミノ酸配列の保存領域に対応するプライマーを作成し、PCR法でエンドウの $\alpha$ -アミラーゼの遺伝子を増幅させ、その塩基配列を決定し、リョクトウ及び他のイネ科の植物 $\alpha$ -アミラーゼとの相同性を比較した。その結果、マメ科植物リョクトウ及びエンドウの $\alpha$ -アミラーゼ分子に固有的な親水領域の存在を見出し、そのアミノ酸配列の特徴を考察した。

本論文において、第Ⅰ章では、『植物の $\alpha$ -、及び $\beta$ -アミラーゼ活性測定法』について、第Ⅱ章では、『アルファルファ発芽種子中のデンプン分解系酵素』について詳述する。第Ⅲ章では、『クローバー、アズキ、ダイズ種子発芽過程における $\alpha$ -、及び $\beta$ -アミラーゼ活性の変動』に関する研究を記述する。さらに、第Ⅳ章において、前章の実験を遂行するにあたり、マメ科植物の $\alpha$ -、及び $\beta$ -アミラーゼの電気泳動的同定法の基礎となった『マメ科植物 $\alpha$ -アミラーゼの電気泳動的特性』について述べる。第Ⅴ章においては、『マメ科植物 $\alpha$ -アミラーゼ分子中の固有的な親水領域の存在とアミノ酸配列』について記述し、マメ科 $\alpha$ -アミラーゼ分子の特性と構造との相関性の考察をそれぞれ記述する。

## 第 I 章 . 植物の $\alpha$ -、及び $\beta$ - アミラーゼ活性測定法

従来、アミラーゼ活性の測定には生成還元糖を 3, 5 - dinitrosalicylic acid (3, 5 - DNS) と反応させ、比色定量する、いわゆる Bernfeld 法<sup>1)</sup>がよく使用されている。この方法では、 $\alpha$  -、及び  $\beta$  - アミラーゼの個別活性測定が不可能で、従来  $\text{Ca}^{2+}$  で  $\alpha$  - アミラーゼを保護し、70 °C、15 分の熱処理により  $\beta$  - アミラーゼを失活させ、 $\alpha$  - アミラーゼ活性が推定されるが、特異的反応とは断定できない。そこで、著者らは簡便な他の活性測定法を調べた。Pantrac E.K. amylase テスト (Behring) 法は、基質として p-nitrophenyl- $\alpha$ -maltopentaoside および hexaoside を用いており、本来、血清アミラーゼ測定用に開発されたキットである。Sopanen と Lauriere らは<sup>2)</sup>、本テストが植物  $\beta$  - アミラーゼの活性測定に適することを報告している。一方、基質に不溶性の色素結合デンプンを用いる Phadebas 法 (Pharmacia) は、Ranki と Sopanen らによって植物型の  $\alpha$  - アミラーゼ活性測定に用いられている<sup>4)</sup>。著者らは、標準的な  $\alpha$  -、及び  $\beta$  - アミラーゼと、アミラーゼに関して既報の植物材料を用いて、両活性測定法のいずれが有効であるかを検討し、さらに、その有効性を電気泳動後の活性染色法で検討した。次に、これらの方法を未だ報告の少ない植物発芽種子中の  $\alpha$  -、及び  $\beta$  - アミラーゼ活性測定に適応した。

### (1) 実験方法

#### ① 試料

標準酵素剤として、pancreas  $\alpha$ -amylase (1 U / ml ; Sigma) , malt  $\alpha$ -amylase (1 U / ml ; Sigma) , *B. stearothermophilus*  $\alpha$ -amylase<sup>25)</sup> (1 U / ml) , soybean  $\beta$ -amylase<sup>26)</sup> (5 U / ml) , *B. cereus*  $\beta$ -amylase<sup>27)</sup> (5 U / ml) , alfalfa  $\beta$ -amylase<sup>17)</sup> (3 U / ml) , rice  $\alpha$ -glucosidase (2 U / ml ; Sigma) , yeast  $\alpha$ -glucosidase (2 U / ml ; Sigma) , isoamylase (2 U / ml ; Sigma) , pullulanase (2 U / ml ; Sigma) , glucoamylase (5 U / ml ; Sigma) をそれぞれ用いた。

植物種子アミラーゼ活性測定には既報の材料として、イネ (種子) (*Oryza sativa* L.)<sup>9)</sup>、コムギ (種子) (*Triticum aestivum* L.)<sup>28)</sup>、オオムギ (種子) (*Hordeum vulgare* L.)<sup>29)</sup>、リョクトウ (発芽種子) (*Vigna radiata*)<sup>30)</sup>、

西洋ニンジン（根）（*Daucus carota* L.）<sup>31)</sup>、ダイコン（根）（*Raphanus sativus* L.）<sup>32)</sup>、ダイズ（種子）（*Glycine max* Merr.）<sup>29), 33)</sup>、キャベツ（葉）（*Brassica oleracea* L.）<sup>34)</sup>、ヤマイモ（塊茎）（*Dioscorea japonica* Thunb.）<sup>35)</sup>、ワサビ（茎）（*Eutrema wasabi* Maxim.）<sup>36)</sup>、サツマイモ（塊根）（*Ipomoea batatas* Lam.）<sup>37)</sup>をそれぞれ用いた。さらに、報告のないクズ（根）（*Pueraria thunbergiana* Benth.）、アルファルファ（*Medicago sativa* L.）種子も用いた。

次に、発芽種子中のアミラーゼ活性測定用には、次の8種のマメ科種子を材料として用いた。アルファルファ（*Medicago sativa* L.）、クローバー（*Trifolium repens* L.）、アズキ（*Phaseolus angularis* W.F.Weght）、ダイズ（*Glycine max* Merr.）、リョクトウ（*Vigna radiata*）、ケツルアズキ（*Vigna mungo*）、エンドウ（*Pisum sativum* L.）、ソラマメ（*Vicia faba* L.）の各5gを24時間吸水後、濾紙上において25℃、暗黒下で7日間吸水させながら発芽させ、毎日試料採取した。

## ② 試料調製法

穀類は、5gに10mMの2-mercaptoethanol（2-ME）を加えた50mM酢酸バッファー（pH7.0）を50ml加え、野菜、イモ類は、50gに10倍濃度の上記バッファーを5ml加え、それぞれ、ホモゲナイズし、ろ過し、得た濾液の半量を50mM酢酸バッファーに対して透析し、50mlに定容して活性を測定した。残りの半量は水に対して透析し、凍結乾燥して電気泳動に供した。

## ③ $\alpha$ -アミラーゼ活性測定法

3, 5-DNS法（Bernfeld法）<sup>1)</sup>のCa修飾法とPhadebas法<sup>4)</sup>（Pharmacia Diagnostics Co.Ltd.）を用いた。3, 5-DNS法のCa修飾法は、試料溶液0.25mlに20mM酢酸カルシウム溶液0.025mlを加え、70℃で15分間熱処理し、1%可溶性デンプンを加え、37℃、10分間酵素反応させ、3, 5-DNS試薬0.5mlを加えて反応を止め、水5mlを加え、530nmで比色した。1分間に1 $\mu$ Mのマルトースを生成する酵素量を1A.U.とした。Phadebas法では、試料溶液4mlに基質1錠を加え、37℃、30分反応させ、0.5Nのカセイソーダ水溶液1.0mlを加えて、反応を止め、1500g、5分間遠心分離して、上清を620nmで比色した。

#### ④ $\beta$ -アミラーゼ活性測定法

3, 5-DNS法<sup>1)</sup>と、Pantrac法<sup>3)</sup>(Behringer Co. Ltd.)を用いた。  
3, 5-DNS法は、試料0.25 mlに1%可溶性デンプンを加え、37℃、10分間酵素反応させ、3, 5-DNS試薬0.5 mlを加えて反応を止め、水5 mlを加えて530 nmで比色した。1分間に1  $\mu$ Mのマルトースを生成する酵素量を1 A. U. とした。

#### ⑤ 電気泳動法

等電点電気泳動をLKB 2117 Multiphor II 電気泳動システム(Pharmacia-LKB)を用いて行った。ゲルはアンホラインゲル(アンホラインPAGEプレート; 等電点4.0-6.5, Pharmacia-LKB)を用いた。2000 V、30 mA、2時間、10℃に泳動条件を設定した。泳動後のゲルは、500 mM酢酸バッファー(pH 6.0)中に室温で10分浸したのち、1%可溶性デンプンを溶かした酢酸バッファー(pH 6.0, 0.2 mM)溶液、あるいは $\beta$ -リミットデキストリン溶液と15分間、37℃で反応させた。基質溶液を除去後、0.2% iodine-4% potassium iodide溶液( $I_2$ -KI)20 mlにゲルを浸し、活性バンドを検出した。

なお、 $\beta$ -リミットデキストリンは、2%可溶性デンプン溶液(20 mM酢酸バッファー pH 6.0)に、精製ダイズ $\beta$ -アミラーゼ150  $\mu$ gを加え、37℃で2時間反応させたものを用いた。

### (2) 実験結果

#### ① 標準酵素を用いた場合のPantrac法とPhadebas法の測定値

Table I - 1に結果を示した。 $\alpha$ -アミラーゼ活性はPhadebas法では高い値で検出されたのに比べて、Pantrac法では測定値は極めて低かった。ダイズ、アルファルファなどの植物 $\beta$ -アミラーゼ活性は濃度が非常に高い場合のみPhadebas法で偽陽性ほどの値であるのに反して、Pantrac法では低濃度で高い値が測定された。 $\alpha$ -グルコシダーゼは従来の3, 5-DNS法によるCa修飾法では残存活性を示して、 $\alpha$ -アミラーゼとの区別がつけられなかったが、Phadebas法では検出されなかった。イソアミラーゼ、プルラナーゼはどちらもPhadebas法で検出されなかった。グルコアミラーゼはPantrac法では低い測定値を示したが、Phadebas法では活性測定不可であった。

電気泳動後の活性染色の結果を同時にTable I - 1に付加した。アンホラインゲル上での $\beta$ -リミットデキストリンでの活性染色の結果、バンドが現れたのは、グルコアミラーゼと $\alpha$ -アミラーゼのみであった。グルコアミラーゼはPhadebas法で検出されない。そこでPhadebas法による測定値と活性染色を組み合わせれば、活性染色が陽性でPhadebas法で測定値が得られれば、 $\alpha$ -アミラーゼであると考えられる。次に、実際に粗酵素液を用いて、アミラーゼ活性の測定を試みた。

### ②各種植物アミラーゼ活性の3, 5-DNS法、Pantrac法、Phadebas法による測定

活性測定値一覧をTable I - 2に示した。各種植物のPantrac法、Phadebas法によるアミラーゼ活性を測定し、その比の値を、3, 5-DNS法とそのCa保護法との比の値と比較検討した。Pantrac法値/Phadebas法値及びBernfeld法での非保護法値/Ca保護法値、の値が $\infty$ になるにつれて、 $\beta$ -アミラーゼ活性の増加が推察される。コムギ、オオムギ、ヤマイモ、サツマイモ、ダイズは、Pantrac法値が非常に高く、 $\beta$ -アミラーゼ活性の多量の存在を示している。ワサビ、ダイコンは、 $\beta$ -アミラーゼ活性が $\alpha$ -アミラーゼ活性よりも高いことが示唆され、イネ、キャベツ、クズ、アルファルファには $\alpha$ -、 $\beta$ -アミラーゼ活性が同程度存在することを示唆している。ニンジン、リョクトウ種子中では $\alpha$ -アミラーゼ活性が主であると考えられる。

### ③各種植物アミラーゼの電気泳動後の活性染色

Fig. I - 1に示すように、可溶性デンプンを基質とした場合の活性染色で現れるバンドは $\alpha$ -、 $\beta$ -アミラーゼで、 $\beta$ -リミットデキストリンを基質とした場合に現れるバンドは $\alpha$ -アミラーゼである。コムギ種子及びオオムギ種子は $\beta$ -アミラーゼのバンドだけが現れた。イネ種子には $\beta$ -リミットデキストリンを切断し、染色されるバンドが認められ、これは $\alpha$ -アミラーゼと考えられる。ダイコンには $\beta$ -アミラーゼのバンドだけが検出された。ニンジンには、 $\alpha$ -アミラーゼと思われるバンドが2本見られた。リョクトウでは、1本の $\alpha$ -アミラーゼのバンドと1本の $\beta$ -アミラーゼに起因すると考えられるバンドが見られた。クズにも $\alpha$ -アミラーゼバンドと $\beta$ -アミラーゼバンドが検出された。アルファルファは、数本の $\beta$ -アミラーゼと1本の $\alpha$ -アミラーゼと考えられるバンドが見られた。これらの結果は、Table I - 2に示した測定値からの $\alpha$ -、 $\beta$ -アミラー

ゼの存在の推定と相関していると考えられる。

#### ④ 各種植物中のアミラーゼのザイモグラム

Fig. 1-1 に示したバンドをザイモグラムで示したものが Fig. 1-2 である。各種植物に含まれるアミラーゼの種類及びアイソザイムとその等電点を推察することができる。

#### ⑤ マメ科植物発芽種子中のアミラーゼ活性変動

Fig. 1-3 にアルファルファ、リョクトウ、ブラックマッペ、エンドウ、アズキ、ダイズ、ソラマメ、インゲンマメ種子の発芽中の  $\alpha$ -、 $\beta$ -アミラーゼ活性の変動を示した。リョクトウ、ブラックマッペ、エンドウ、アズキ、ソラマメ、インゲンマメ種子は従来からの定説通り、発芽種子中で  $\alpha$ -アミラーゼ活性が増加し、 $\beta$ -アミラーゼ活性は低く変化が少なかった。ところが、アルファルファ種子はその逆の現象を示した。すなわち、種子に含まれている  $\alpha$ -アミラーゼ活性が減少し、同じく種子に含まれている  $\beta$ -アミラーゼ活性が増加した。また、ダイズは種子に少量含まれていると考えられる  $\alpha$ -アミラーゼ活性が増加し、同じく種子に多量に含まれている  $\beta$ -アミラーゼ活性が減少するという特殊なパターンを示した。このように、アミラーゼ活性の変動に3種のタイプがあることが明らかになった。

### (3) 考察

Phadebas法は、アルファルファ、ダイズなどの植物  $\beta$ -アミラーゼ及び従来 of  $C a^{2+}$ 修飾法では残存活性を示すイネ種子由来の  $\alpha$ -グルコシダーゼには、ほとんど活性を示さず、 $\alpha$ -アミラーゼに特異的に反応することが判明した。一方、Pantrac法は  $\beta$ -アミラーゼ活性測定に有効であり、植物由来の  $\alpha$ -アミラーゼ活性に対しては測定値が低かった。そこで、両測定値の比から  $\alpha$ -、及び  $\beta$ -アミラーゼの存在割合が粗抽出液で推察しうることを認めた。

各種植物アミラーゼの活性測定の結果は、既報の結果によく一致し、電気泳動後の活性染色によるザイモグラムの結果と組み合わせることにより、本測定法が  $\alpha$ -、及び  $\beta$ -アミラーゼの個別検出法として用いることが可能であると考えられた。この方法を用いることによって、植物中の  $\alpha$ -、 $\beta$ -アミラーゼの分布及びアイソザイムの数及び等電点を同時に推定することができた。

発芽時のアミラーゼ変動パターンに関して、従来定説とされている  $\alpha$ -アミラ

ーゼ活性の増加<sup>5) - 8)</sup>と、 $\beta$ -アミラーゼ活性の減少<sup>5), 8), 15)</sup>あるいは活性化<sup>11) - 14)</sup>とは逆の現象を示すパターンがアルファルファ発芽種子で見いだされた。また、ダイズは $\beta$ -アミラーゼ活性の減少及び $\alpha$ -アミラーゼ活性の増加の点において、特殊なパターンを示した。このように、エンドウタイプ、アルファルファタイプ、ダイズタイプの3種の発芽種子中の $\alpha$ -、及び $\beta$ -アミラーゼ活性変動様式を認めた。

Table I-1 Measurement of Amylase Activity by Phadebas or Pantrac Method.

|   | Phadebas | Pantrac | Activity staining* |
|---|----------|---------|--------------------|
| $\alpha$ -Amylase (Pancreas)            | +        | +       | +                  |
| $\alpha$ -Amylase (Malt)                | +        | +       | +                  |
| $\alpha$ -Amylase ( <i>B.stearo</i> )   | +        | +       | +                  |
| $\beta$ -Amylase (Soybean)              | ±        | +       | -                  |
| $\beta$ -Amylase ( <i>B.cereus</i> )    | ±        | +       | -                  |
| $\beta$ -Amylase (Alfalfa )             | ±        | +       | -                  |
| $\alpha$ -Glucosidase (Rice)            | -        | -       | -                  |
| $\alpha$ -Glucosidase (Yeast)           | -        | -       | -                  |
| $\beta$ -Amylase+ $\alpha$ -Glucosidase | ±        | +       | -                  |
| Isoamylase                              | -        | -       | -                  |
| Pullulanase                             | -        | -       | -                  |
| Glucoamylase                            | -        | +       | +                  |

\* Activity staining of each enzyme in Ampholine gels was performed by using  $\beta$ -limit dextrin as substrate.

Table I-2 Estimation of  $\alpha$ - or  $\beta$ -Amylase in Various Plants.

|                      | Pantrac<br>(U/ml) | Phadebas<br>(U/ml $\times 10^{-2}$ ) | Pantrac<br>/Phadebas | 3,5-DNS<br>(Non./Ca) | Amylase<br>type  |
|----------------------|-------------------|--------------------------------------|----------------------|----------------------|------------------|
| Rice (seeds)         | 0.38              | 0.028                                | 13.4                 | 11.09                | $\beta > \alpha$ |
| Wheat (seeds)        | 48.33             | -                                    | $\infty > 0$         | $\infty > 0$         | $\beta$          |
| Barley (seeds)       | 17.94             | -                                    | $\infty > 0$         | $\infty > 0$         | $\beta$          |
| Yam (stems)          | 2.21              | -                                    | $\infty > 0$         | $\infty > 0$         | $\beta$          |
| Wasabi (stems)       | 182.04            | 0.412                                | 441.8                | 9.1                  | $\beta > \alpha$ |
| Sweet potato (roots) | 93.98             | 0.138                                | 679.0                | 147.5                | $\beta$          |
| Carrot (roots)       | 0.18              | 0.118                                | 1.5                  | 1.1                  | $\alpha > \beta$ |
| Radish (roots)       | 0.34              | 0.007                                | 46.6                 | $\infty > 0$         | $\beta > \alpha$ |
| Cabbage (leaves)     | 0.81              | 0.043                                | 18.8                 | 18.8                 | $\beta > \alpha$ |
| Kudzu (roots)        | 2.15              | 0.052                                | 41.7                 | $\infty > 0$         | $\beta > \alpha$ |
| Mung bean (seeds)    | 0.13              | 0.444                                | 0.3                  | 1.9                  | $\alpha > \beta$ |
| Alfalfa (seeds)      | 0.36              | 0.074                                | 4.9                  | 4.5                  | $\beta > \alpha$ |
| Alfalfa (seedlings)  | 1.00              | 0.043                                | 23.5                 | 19.4                 | $\beta > \alpha$ |
| Soybean (seeds)      | 61.76             | -                                    | $\infty > 0$         | $\infty > 0$         | $\beta$          |

$\alpha$ :  $\alpha$ -Amylase

$\beta$ :  $\beta$ -Amylase

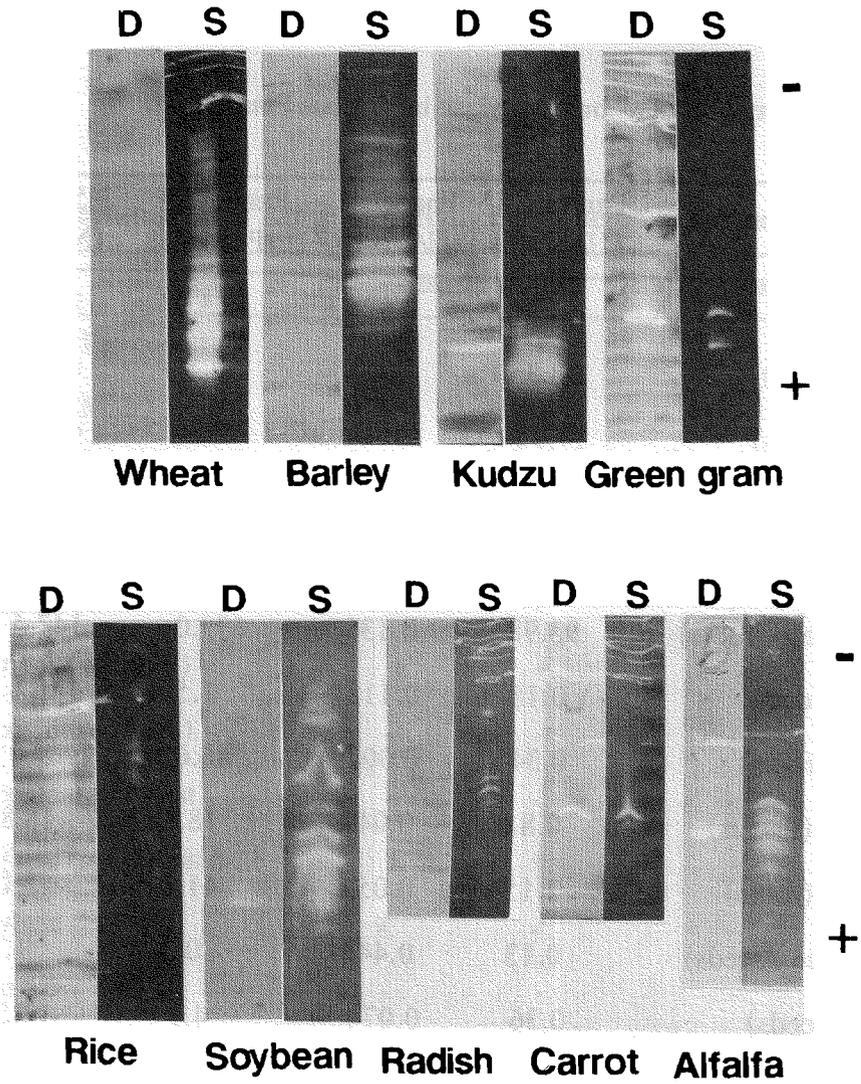


Fig. I-1 Activity Staining of  $\alpha$ -, and  $\beta$ -Amylases after Isoelectrofocusing on Ampholine Gels. Amylases in the gels were allowed to react with either  $\beta$ -limit dextrin (D) or soluble starch (S).

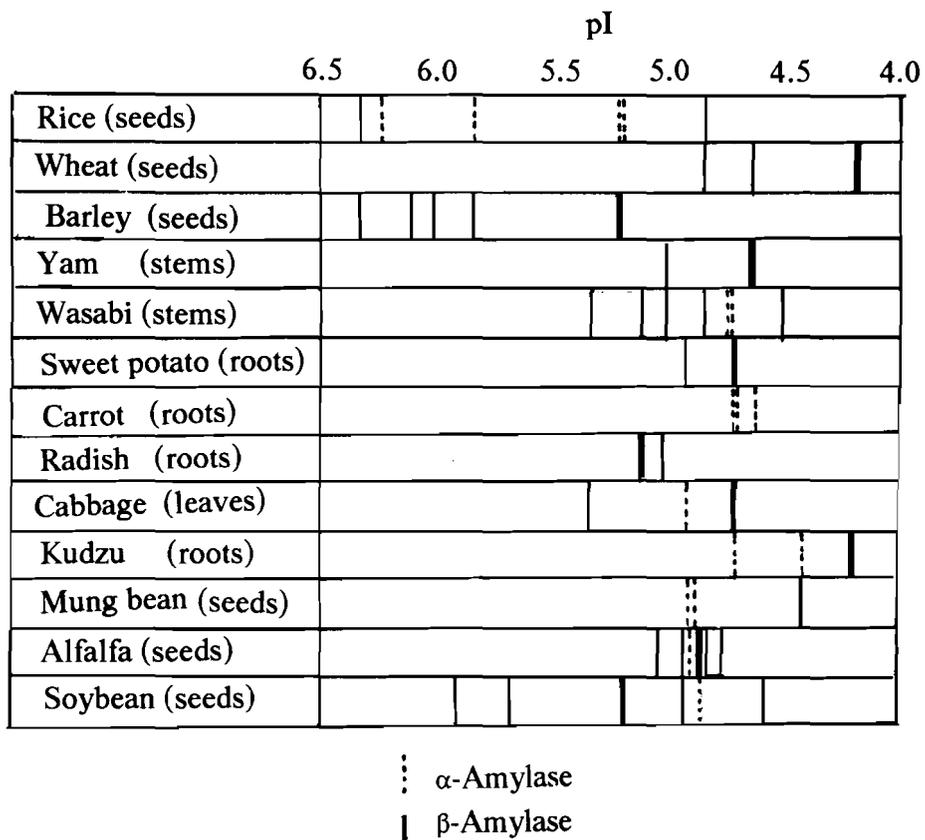


Fig. I-2 Schematic Zymograms of Amylases in Various Plants after Isoelectrofocusing on Ampholine Gels.

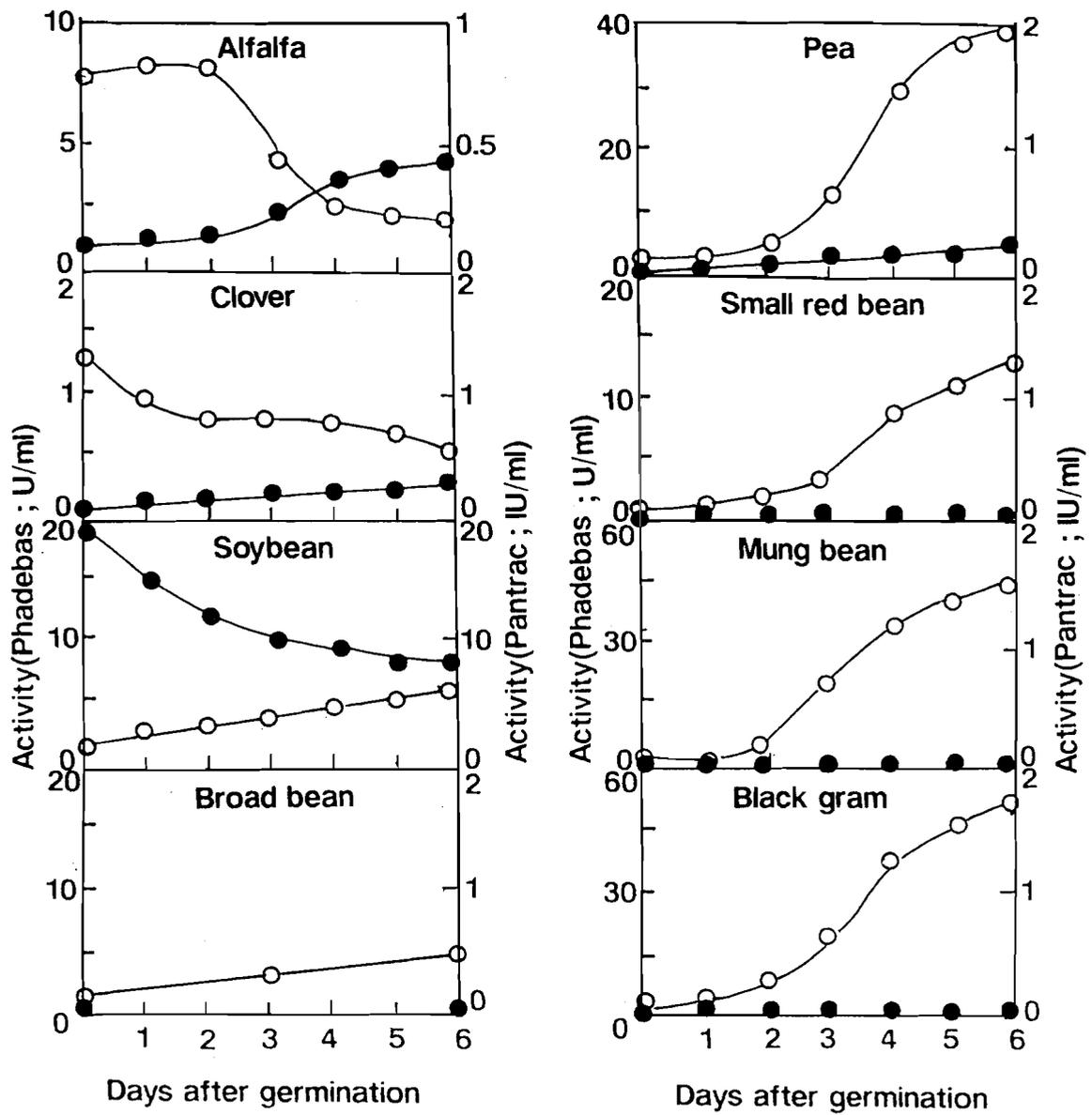


Fig. I-3 Change in  $\alpha$ - and  $\beta$ -Amylase Activities during Germination of Seeds of Various Plants.

○—○  $\alpha$ -Amylase,      ●—●  $\beta$ -Amylase

## 第 II 章．アルファルファ発芽種子中のデンプン分解系酵素

第 I 章では、種子の発芽時のアミラーゼ活性変動に多様なパターンがあることを示した。その中で、従来定説とされてきたものと逆のパターンを示すアルファルファ種子について、その発芽中のデンプン分解系酵素の活性変動を精査し、主な酵素である  $\alpha$ 、及び  $\beta$ -アミラーゼを精製、同定しその性質を検討した。一方、等電点の近接したアミラーゼアイソフォームの分離法としてイモビライン等電点電気泳動を試みた。

### 第 1 節．アルファルファ発芽種子中のデンプン分解系酵素の変動パターン

粗酵素液を用いて、次に示す種々の方法で酵素活性の測定を行い、アルファルファ発芽種子中のデンプン分解系酵素の種類及びその活性の変化を調べた。

#### (1) 実験方法

##### ① 試料調製法

第 I 章 (1) に示した。

##### ② 酵素活性測定法

3, 5-DNS 法でアミラーゼ活性を、 $\text{Ca}^{2+}$  保護後の熱処理試料の 3, 5-DNS 法で  $\alpha$ -アミラーゼ活性を定量した。Pantrac 法で  $\beta$ -アミラーゼ活性を、Phadebas 法で  $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定した。Blue value 活性の変化、マルターゼ活性の測定を行った。Blue value 変化の測定法は、0.25 ml のアミラーゼ溶液に 0.25 ml の  $\beta$ -リミットデキストリン溶液を加え、40°C で 15 分反応させ 1.75 ml の 0.2% iodine-4% potassium iodide 溶液を加え 700 nm で比色定量した。 $\beta$ -リミットデキストリン溶液の吸光度を 1.00 とした場合の反応試料の吸光度の値を、Relative Blue Value とした。マルターゼ活性 ( $\alpha$ -グルコシダーゼ) の測定は Glucose C test kit (Wako Pure Chemicals Co. Ltd.) を用いた。この測定法は  $\alpha$ -グルコシダーゼによって遊離した  $\alpha$ -D-グルコースが mutarotase によって  $\beta$ -D-グルコースにかわり、さらに glucose oxidase によって hydrogen peroxide を生成し、これが 4-aminoantipyrine と結合して、最大吸光度 505 nm の赤色色素が生成するので比色測定できる。酵素活性 1 ユニットは 1 分間に 1  $\mu$ M のグルコースを生成する酵素量である。

### ③ アミラーゼの $Ca^{2+}$ 修飾後の熱処理及び EDTA 処理法

酵素溶液に、酢酸カルシウムを 10 mM 濃度となるように添加し、70℃、15分熱処理した。また、EDTAを10mM濃度となるよう加えた。これらの処理液の酵素活性を測定した。

### ④ 電気泳動法

第1章(1)に示した。イモビラインプレート(pH4.5-5.4、Pharmacia-LKB)を用いた電気泳動条件は、10℃で、300V、1時間予備泳動し、5000Vで3時間本泳動した。

### ⑤ アミラーゼ活性の試験法

発芽種子中での、 $\alpha$ -及び $\beta$ -アミラーゼ活性の局在性を調べるため、1gの種子を発芽させ、子葉(cotyledons)、胚軸(hypocotyls)、幼根(radicles)に切断し、各部位の活性を測定した。

### ⑥ 発芽種子中の $\beta$ -アミラーゼの検出法

第1章では、アンホラインゲルを用いて、 $\alpha$ -、 $\beta$ -アミラーゼのバンドを検出した。今回は、イモビラインゲルを用い、第1章と同じ粗抽出液で、電気泳動後活性染色し、 $\beta$ -アミラーゼのバンドを検出すると同時に、粗抽出液を20mMの2-ME存在下と非存在下で調製し、 $\beta$ -アミラーゼ活性を測定し比較した。

## (2) 実験結果

### ① アルファルファ種子発芽中での各酵素活性の変化

Figure II-1 に  $\beta$ -アミラーゼ活性、 $\alpha$ -アミラーゼ活性、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性の変化を示した。 $\beta$ -アミラーゼ活性を測定しうる Bernfeld 法、Pantrac 法の値は、発芽3日から4日にかけて種子レベルの約2倍に増加を示した。ところが  $\alpha$ -アミラーゼ活性を表す Phadebas 法、及び  $\alpha$ -アミラーゼ活性を定量しうる Bernfeld 法での  $Ca^{2+}$  保護法では、未発芽種子に活性が既に存在しており、発芽2日までほぼ一定で、以降は急激に減少した。同様に、Relative blue value も発芽2日以降、急速に低下した。 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性は発芽2日まで少し増加し、また減少して種子レベルに戻った。

### ② $Ca^{2+}$ 修飾後熱処理及び EDTA 処理の酵素活性に及ぼす効果

Figure II-1 の結果から、 $\alpha$ -アミラーゼが多く存在すると考えられる発芽2

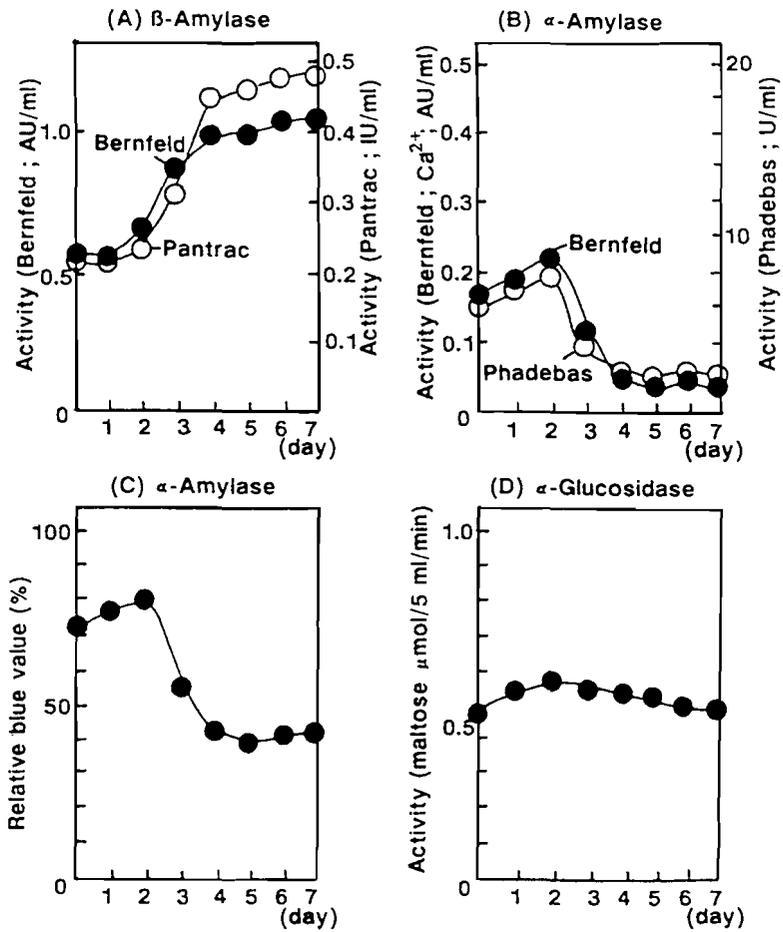


Fig. II-1 Changes in  $\beta$ -Amylase Activity (A),  $\alpha$ -Amylase Activity (B) and (C), and  $\alpha$ -Glucosidase Activity (D) during Germination of Alfalfa Seeds.

日と、 $\beta$ -アミラーゼが多く存在すると考えられる発芽5日の試料についてEDTA処理および $Ca^{2+}$ イオン存在下での熱処理をそれぞれ行い、各アミラーゼ活性の変化を調べた。その結果をTable II-1に示した。 $\alpha$ -アミラーゼ活性を示すPhadebas法では、2日の試料が高い値であったが、EDTA処理後には、未処理試料で8.06であったものが、1.78にまで著しく減少した。 $\beta$ -アミラーゼ活性を示すPantrac法では発芽5日の試料が高い値であったが、 $Ca^{2+}$ 熱処理でほとんど失活した。これらの結果から、2日の試料には $\alpha$ -アミラーゼが、5日の試料には $\beta$ -アミラーゼが主に存在するということが推察された。

### ③ 電気泳動後のアミラーゼの活性染色

Figure II-2にアンホラインゲルを用い、可溶性デンプンと $\beta$ -リミットデキストリンを基質とした場合の活性染色の結果を示した。可溶性デンプンを用いた染色では、複数のバンドが認められた。 $\beta$ -リミットデキストリンを用いた染色では、おもに1本のバンドが認められたことから、このバンドは $\alpha$ -アミラーゼと考えられ、他に複数個の $\beta$ -アミラーゼアイソフォームが存在すると考えられる。 $\beta$ -アミラーゼのバンドは発芽の進行につれて濃くなり、また、 $\alpha$ -アミラーゼのバンドはうすくなった。

Figure II-3に、イモビラインゲルを用いて等電点電気泳動後、可溶性デンプンを基質にした活性染色の写真を示し、さらに抽出バッファーに、2-MEを加えた場合と加えない場合の $\beta$ -アミラーゼ活性のpantrac法での測定値を示した。2-MEを抽出バッファーに加えても、活性の増加がみられなかった。活性染色によるバンドは、各アイソフォームが全て、発芽過程の進行につれて濃くなった。ところで、アンホラインゲルでは、主に1本の $\alpha$ -アミラーゼのバンドと複数の $\beta$ -アミラーゼのバンドが検出されたが、イモビラインゲルでは、5本の $\beta$ -アミラーゼと考えられるバンドしか検出されなかった。この事実は、イモビラインを用いた泳動後、ゲルを可溶性デンプン並びに $\beta$ -リミットデキストリンを基質に用いて、染色した、Fig. II-2のlane Aおよびlane Bをみれば、より明かである。つまりlane Bで( $\beta$ -リミットデキストリン基質)バンドが現れなかった。この事実は、lane Aの5本のバンドが $\beta$ -アミラーゼであることを示している。

### ④ 酵素活性の局在性

Figure II-4に、 $\alpha$ -、及び $\beta$ -アミラーゼ活性の分布を示した。 $\beta$ -アミラ

Table II-1 Effects of Ca and EDTA on the Amylase Activities  
Extracted from Germinating (2 days or 5 days) Seeds.

| Assay             | Bernfeld<br>(AU/ml) | Pantrac<br>(IU/ml) | Decreasing Degree<br>of Blue Value (%) | Phadebas<br>(U/ml) |
|-------------------|---------------------|--------------------|--|--------------------|
| 2 days<br>control | 0.46                | 0.21               | 79                                     | 8.06               |
| +EDTA 10 mM       | 0.32                | 0.17               | 25                                     | 1.78               |
| +Ca 10 mM 70°C    | 0.22                | 0.03               | 70                                     | 4.58               |
| 5 days<br>control | 0.88                | 0.54               | 41                                     | 2.93               |
| +EDTA 10 mM       | 0.68                | 0.47               | 4                                      | 0.24               |
| +Ca 10 mM 70°C    | 0.12                | 0.06               | 25                                     | 1.62               |

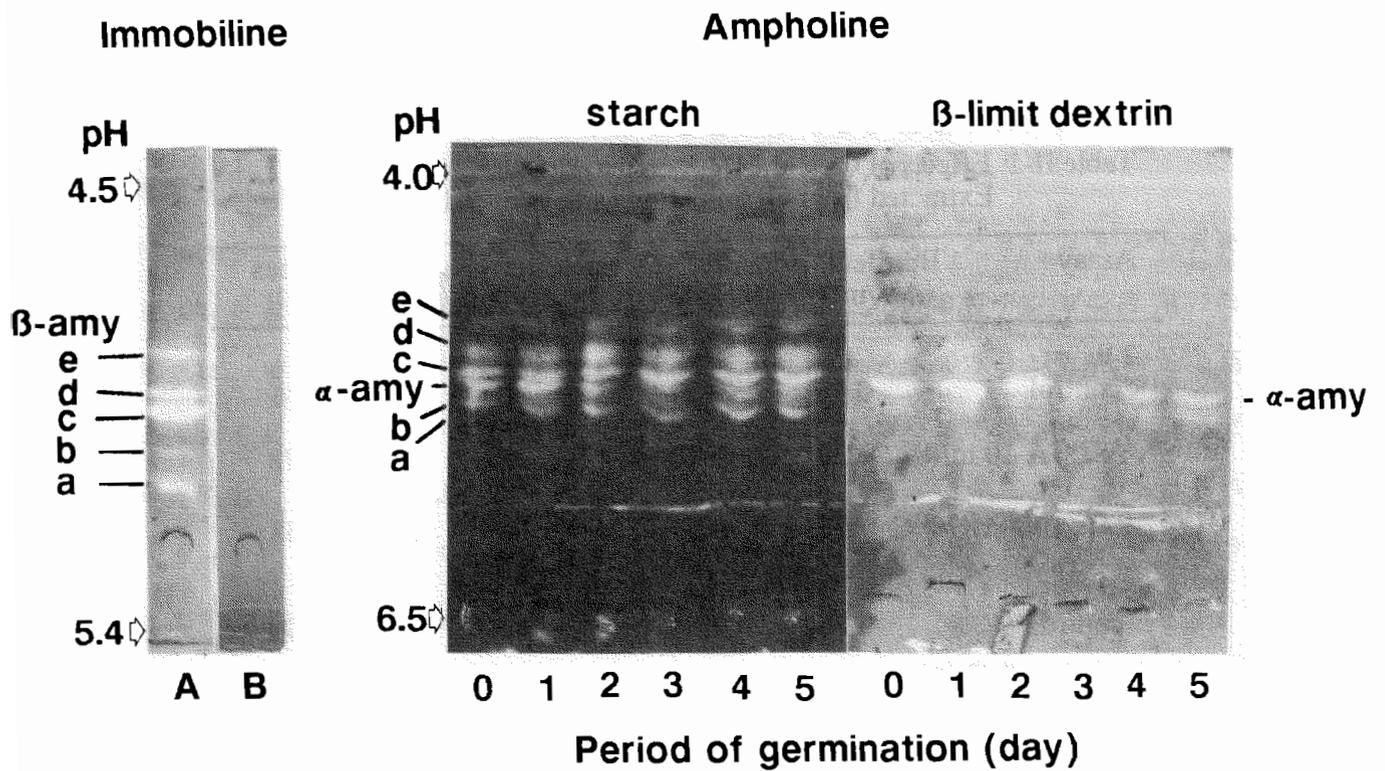


Fig. II-2 Separation and Detection of  $\alpha$ -Amylase in dry and Germinating Seedlings of Alfalfa on Ampholine Gels.  $\beta$ -Amylase (a, b, c, d, e) (identified as  $\beta$ -amy in the Figure) were detected in an Immobiline gel when the enzymes in the gel were allowed to react with soluble starch (lane A) but not when the gel was incubated in  $\beta$ -limit dextrin (lane B).  $\alpha$ -Amylase was not detected in the Immobiline gel.  $\alpha$ -Amylase ( $\alpha$ -amy) was detected in an Ampholine gel with either soluble starch or  $\beta$ -limit dextrin as substrate.  $\beta$ -Amylase (a-e) reacted only with soluble starch. The number of each lane indicates the number of days after germination (lane 0: the sample from dry seeds).

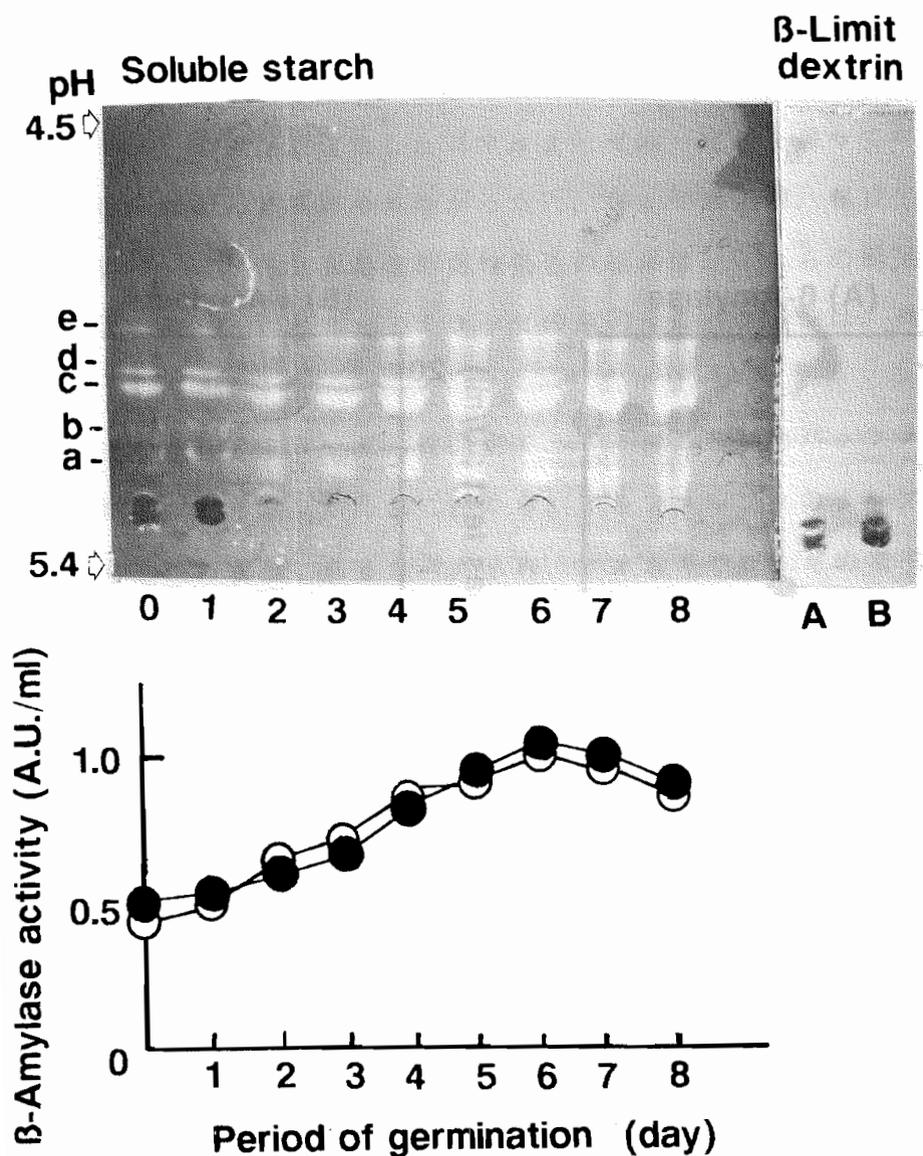


Fig. II-3 Changes in  $\beta$ -Amylase Activity during Germination of Alfalfa Seeds. Upper figure: isoelectrofocusing of crude extracts on an Immobiline Plate. Isoforms were visualized by active staining using soluble starch or  $\beta$ -limit dextrin. Lower figure: total activity of  $\beta$ -amylase in crude extracts during seed germination. Extraction was carried out in the presence (●) or absence (○) of 20 mM 2-mercaptoethanol. Lane A, enzyme preparation from seeds, and lane B, enzyme preparation from germinating seed (5 day).

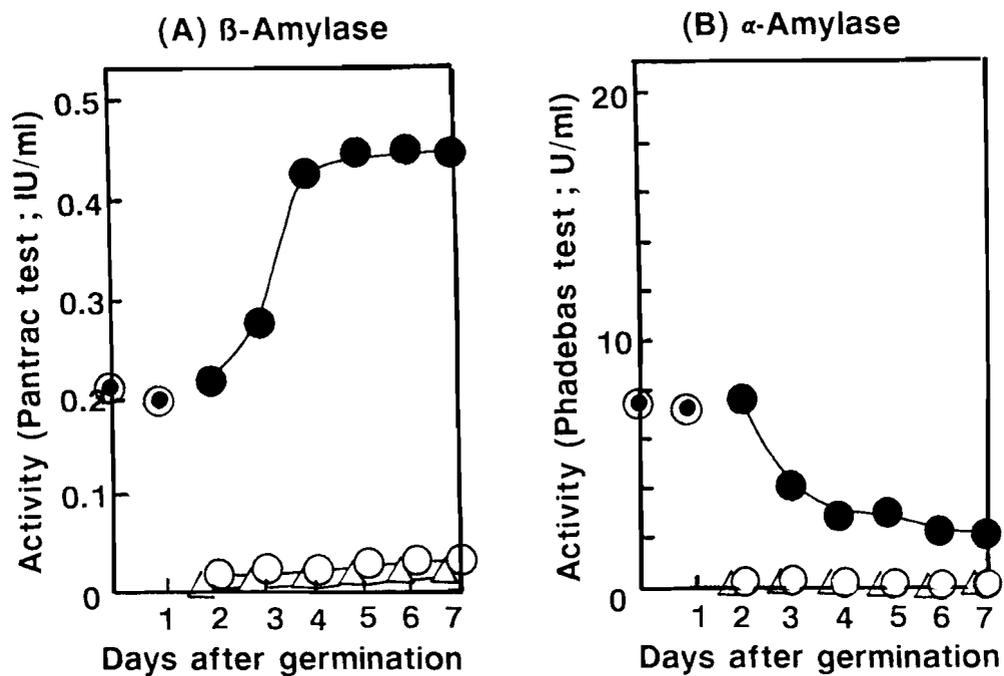


Fig. II-4 Increases in  $\beta$ -Amylase Activity and Decreases in  $\alpha$ -Amylase Activity in Cotyledons of Alfalfa.  $\beta$ -Amylase activity and  $\alpha$ -amylase activity in cotyledons (●), hypocotyls (▲) and radicles (○) were assayed by Pantrac and Phadebas tests, respectively. Numbers on the abscissa represent days after germination. In the case of samples of dry seeds (0 day) or germinating seeds soon after imbibition (1 day), the entire seedlings were used for the assays (⊙).

ーゼ活性は、子葉 (cotyledon) にのみ存在していた。発芽過程での活性の増加も子葉にのみ認められた。 $\alpha$ -アミラーゼ活性も、子葉にのみ認められ、発芽により減少した。

### (3) 考察

アルファルファ種子発芽過程では、乾燥種子中の $\alpha$ -アミラーゼ活性が減少し、逆に $\beta$ -アミラーゼ活性が増加した(マルターゼは一定量を保っていた。ホスホリラーゼ活性はほとんど認められなかった)。Ca<sup>2+</sup>熱処理、EDTA添加の酵素活性への影響、及び電気泳動後の活性染色の結果は、これらの結果を支持している。このような $\alpha$ -、と $\beta$ -アミラーゼの量的変動パターンは、発芽種子で報告はない。

発芽種子中の $\beta$ -アミラーゼ活性測定で、2-MEを抽出バッファーに加えても、活性の増加がみられなかったことから、アルファルファの $\beta$ -アミラーゼは種子中で全く遊離の状態にあると考えられ、オオムギやコムギの種子中における結合型とは存在様式が異なっている<sup>11)-14)</sup>。活性染色において $\beta$ -アミラーゼの各アイソフォームが全て発芽過程の進行に伴って濃くなったことから、5個のアイソフォームがそれぞれ増加していると考えられる。

電気泳動での活性染色の結果、イモビライジングでは $\beta$ -アミラーゼの5本のバンドしか現れなかった。つまり、アンホライジングで現れた $\alpha$ -アミラーゼのバンドが、イモビライジングでは検出されないという現象が発見された。これについては後に検討する。

アルファルファ発芽種子中には、貯蔵性多糖分解酵素に関して、 $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -マンナーゼ、 $\beta$ -マンノシダーゼが存在し、これらのガラクトマンナン分解酵素活性が、発芽過程で増加するという報告はある<sup>38)</sup>。ガラクトマンナンはアルファルファ種子中における貯蔵多糖の主なものであり、著者もデンプンの分別をシュクロース濃度勾配法で試みたが、マイナーな値で、デンプン粒の発育が不完全と考えられる。従って、アルファルファ発芽種子における $\alpha$ -アミラーゼの活性が、他のデンプンを主たる貯蔵多糖として含有する種子に比べて、低いのは理解できる。

## 第 2 節 . アルファルファ種子中のアミラーゼの精製と同定

第 II 章第 1 節の実験で、アルファルファに含まれているデンプン分解系酵素が、特異的な変動パターンを示すことが示唆された。そこで、本章では、アルファルファの  $\alpha$ -、及び  $\beta$ -アミラーゼを精製・同定し、本植物発芽種子中の  $\alpha$ -、 $\beta$ -アミラーゼ活性変動パターンについての結果に確証を与える事を目的とした。

### 第 1 項 . $\beta$ -アミラーゼの精製と同定

#### (1) 実験方法

##### ① 精製法

種子をミキサーで粉末にし、それを石油エーテルで 3 回抽出して得た脱脂粉末 4 k g に、2 0 m M 2-mercaptoethanol (2-ME), 1 m M ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt (EDTA), 1 m M ethylene glycol bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic Acid (EGTA), 0. 2 m g pepstatin と 1 m M phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) を含んだ p H 5. 0 の 1 0 m M 酢酸バッファー (バッファー A) を 4 L 加え、ホモゲナイズ後、遠心分離 (8 0 0 0 r p m, 1 0 分) して粗抽出液を得た。これに 2 5 % 飽和になるように硫酸を加え、遠心 (8 0 0 0 r p m, 1 0 分) 後、上清を 6 5 % 飽和の硫酸溶液にし、遠心分離 (8 0 0 0 r p m, 1 0 分) し、沈澱を集めた。これをバッファー A に溶解させ、バッチ法でバッファー A に平衡化した CM-Sephadex C-5 0 イオン交換体に活性画分を吸着させた。水酸化ナトリウムで p H を 6. 5 に上昇させ活性画分を溶出させた。この方法を用いることで、粘質物が除去できた。ここで得た活性画分を、バッファー A で平衡化させた S-Sephadex カラム (5 × 1 5 c m) に吸着させた。活性画分の溶出は、バッファーイオン強度を 1 0 - 1 0 0 m M に上昇させ、さらに p H を 5. 0 - 6. 4 に上昇させるグラジエント法で行った。得られた活性画分を、1 0 m M リン酸バッファー、p H 6. 5 に平衡化させた Q-Sephadex カラム (5 × 1 5 c m) に吸着させ、NaCl 濃度を 0. 4 M に上昇させることで、活性画分を溶出させた。

得られた活性画分は、蒸留水に対して透析し、凍結乾燥後、これを 0. 2 M の NaCl を含んだ p H 5. 0、5 0 m M の酢酸バッファーに溶解し、Fast

Protein Liquid Chromatography (FPLC) に連結した、Superose 12 HR10/30 カラム (1×30 cm) に通し、ゲルろ過をおこなった。得られた活性画分は、0.025 M ヒスチジン-HCl バッファーに対して透析し、FPLC に連結した、Mono P HR5/20 カラム (0.5×20 cm) に吸着させた。クロマトフォーカシングは、pH グラディエント 5.0-4.5 で、流速 1 ml/min、圧力 3 MPa の条件で行った。溶出バッファーは、0.0075 mmol/ml Polybuffer 74 を用いた。得られた活性画分をさらに、FPLC に連結した Mono S HR5/5 カラム (0.5×5 cm) に吸着させた。10 mM、pH 5.0 の酢酸バッファーでカラム洗浄後、酢酸バッファー (pH 5.0) のイオン強度を 10-100 mM に増加させるグラディエントエリクションで活性画分を溶出させた。

酵素活性の測定法は Bernfeld 法<sup>1)</sup> を用いた。タンパク質濃度は Bradford の方法<sup>39)</sup> により測定した。

## ② 均一性試験

精製  $\beta$ -アミラーゼの均一性の検討は、ポリアクリルアミドゲル (pH 9.5, 7%) によるディスク電気泳動によっておこなった。またイモビライジング (pH 4.5-5.4, Pharmacia-LKB) を用いる等電点電気泳動及び 7.5-15% アクリルアミドグラディエントゲルを用いる SDS-電気泳動法でも行った。SDS-電気泳動は Laemmli's buffer system<sup>40)</sup> を使い、 $\beta$ -アミラーゼ試料は、1% SDS と 2% 2-ME を含む 250 mM Tris-HCl バッファー (pH 6.8) に溶解し、3 分間、100°C で変性したものを用了。泳動は、8 mA で 10 時間行った。泳動後のゲル中のタンパク質は Coomassie brilliant blue R 250 (Sigma) で染色した。

等電点電気泳動条件は、300 V で 1 時間、さらに 5000 V で 3 時間の泳動を 10°C で行った。泳動後、Coomassie brilliant blue R 250 でタンパク質を染色した。糖の検出は、PAS-staining<sup>41)</sup> 法で行った。

## ③ $\beta$ -アミラーゼの同定法

1% 可溶性デンプン溶液 5 ml に、精製  $\beta$ -アミラーゼ溶液 (10 A. U.) を加え、37°C で 60 分反応させ、生成糖の同定を試みた。反応溶液を減圧濃縮し、2 ml の蒸留水に溶かし 0.45  $\mu$ m マイクロフィルターを通して、10  $\mu$ l を HPLC (Hitachi L-6200) 分析に供した。検出器は 示差熱屈折検出器

(Hitachi Co. Ltd.) を用い、カラムは Lichrosorb-NH<sub>2</sub>(Cica-Merch)を用いた。溶出にはアセトニトリル-H<sub>2</sub>O (3:1)液を用いた。流速1 ml/minで、圧力120 kg/cm<sup>2</sup>、attenuator 1/16で分析した。

旋光度の測定は、精製酵素(3 A. U.)を1%可溶性デンプン溶液(pH 5.4)2 ml中で25℃で反応させ、生成糖の比旋光度をPM-70 Polarimeter (Union Giken Co., Ltd.)を用いて、感度0.01、response 2で測定した。

#### ④ β-アミラーゼの諸性質

精製β-アミラーゼの至適pH、至適温度、分子吸光係数を測定した。精製β-アミラーゼ(0.6 A. U.)を0.55 μMの5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)、0.55 μMのp-chloromercuribenzoic acid (PCMB)及び、0.55 μMのN-ethylmaleimide (NEM)と40℃で3分間反応させ、酵素活性に及ぼす影響を検討した。

次に、精製したβ-アミラーゼアイソフォームの各20 μgをSDS-polyacrylamide gelsで電気泳動し、Matsudaira<sup>42)</sup>の方法で、Milipore PVDFメンブランにトランスファーした。メンブランをPonceau S (Sigma)で染色した後、各β-アミラーゼバンドを切りとり6M HCl中で、110℃、24時間加水分解し、Hitachi 835 amino acid analyzerでアミノ酸分析を行った<sup>43)</sup>。アミノ末端残基決定のため、メンブラン上のβ-アミラーゼをprotein sequencer (Applied Biosystems model 477A)に供した。

次に、アイソフォームcについてのマウスポリクローナル抗血清を作成した。アイソフォームc 30 μgをAdjuvant Complete Freund (Nakarai tesque)に懸濁し、マウスに、隔週2回皮下注入した。心臓閃針法により全血採取し抗血清を得た。この抗血清に対する精製アルファルファβ-アミラーゼとダイズβ-アミラーゼの抗原抗体反応をOuchterlony double-diffusion plate (Cappel Laboratories)法でテストした。

## (2) 実験結果

### ① 精製過程と均一性

Figure II-5 にS-Sepharoseカラムクロマトグラフィーの溶出パターンを示

す。Fig. II - 6 に Q - Sepharose カラムクロマトグラフィーの溶出パターンを示す。イオン交換クロマトグラフィー後、活性画分をゲルろ過した。クロマトフォーカシングによる精製過程は Fig. II - 7 に示す。ここで得た  $\beta$  - アミラーゼ標品のディスク電気泳動を行うと、ほぼ均一なバンドが得られた (Fig. II - 8)。以上の精製過程を Table II - 2 に示す。比活性は 1. 077 A. U. / mg、約 3590 倍の精製率を得た。

### ② $\beta$ - アミラーゼの同定及び諸性質

本精製  $\beta$  - アミラーゼを可溶性デンプンに反応させた場合の生成糖はマルトースのみであり、生成マルトースの変旋光測定の結果は、 $\beta$  - アノマー型のマルトースが生成後、 $\alpha$  - アノマー型に変換している事により、(Fig. II - 9) 本酵素は  $\beta$  - アミラーゼであると判断される。

分子吸光係数は、18. 3 で示適温度、示適 pH は、それぞれ 50°C、7. 0 であった。PCMB 処理で酵素活性は減少したが、Dithiothreitol (DDT) 再処理で活性が回復した。NEM 処理で活性は 20% に低下したが、DTNB 処理では失活せず、この処理を高塩条件 (0. 5 M, NaCl) で行った場合にのみ活性失活が認められた。

Figure II - 7 に示すクロマトフォーカシングのメイン活性ピークおよびサブピーク I、II、III、IV、V をイモビライジング (pH range 4. 5 - 5. 4) で等電点電気泳動し、可溶性デンプンを基質に活性染色した結果を Fig. II - 10 に示す。この結果より各ピークには、等電点が 5. 05, 4. 97, 4. 85, 4. 82, 4. 77 の 5 個の  $\beta$  - アミラーゼアイソフォームが存在すると考えられる。

### ③ $\beta$ - アミラーゼアイソフォームの分離とその諸性質

5 個のアイソフォームを分離するために、Fig. II - 7 に示した、ピーク I、II を主とするフラクション A、ピーク III を主とするフラクション B、ピーク IV、V を主とするフラクション C を続いて個々に、FPLC に連結した Mono S カラム (Pharmacia-LKB) に吸着させ、溶出させるイオン交換クロマトグラフィーを行った。その結果を、Fig. II - 11 に示す。ここで、a, b, c, d, e 計 5 個の活性ピークが得られ、それぞれのピークに含まれる酵素を、イモビライジングで等電点電気泳動し、タンパク染色を行った結果を Fig. II - 12 に示す。この結果よ

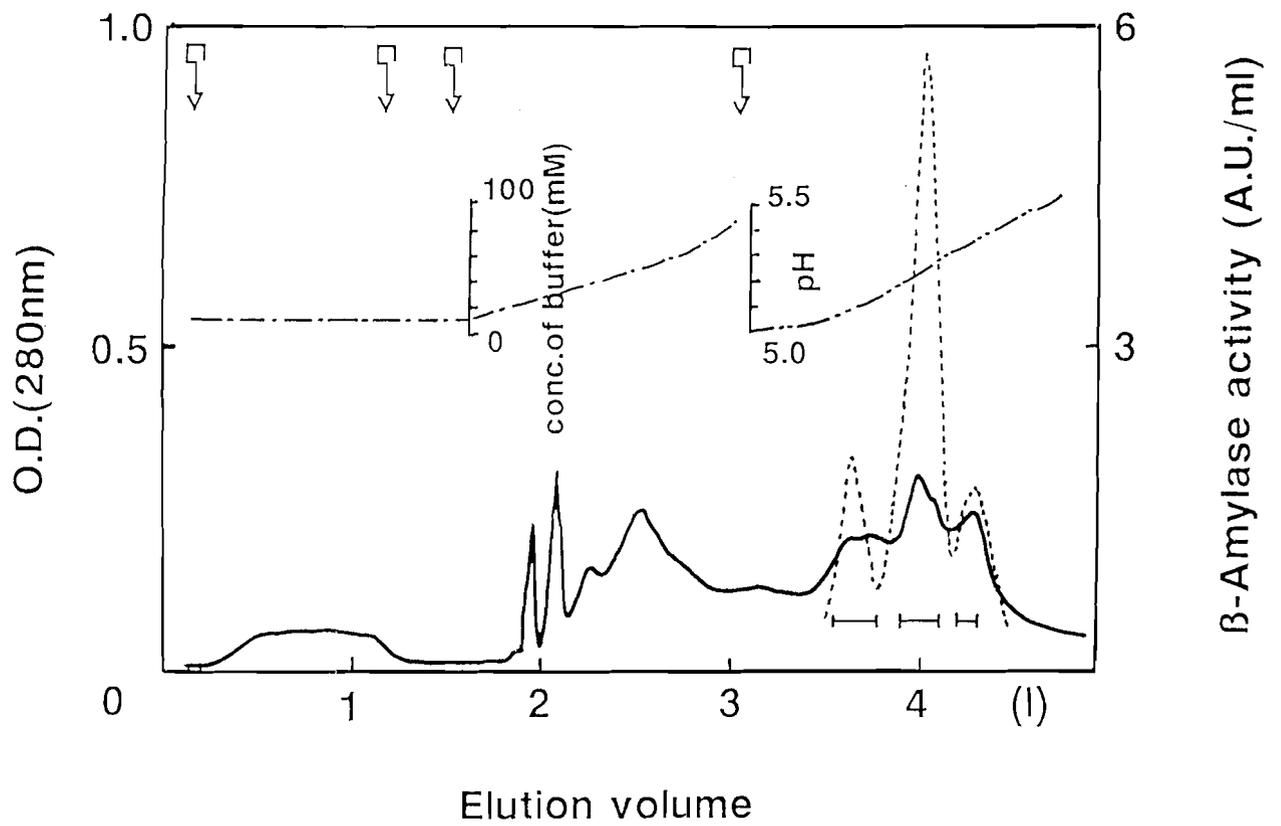


Fig. II-5 Elution Profile of Alfalfa  $\beta$ -Amylase by Ion-exchange Chromatography on the S-Sepharose Column.

— O. D. (280nm),      - - - - - Amylase activity

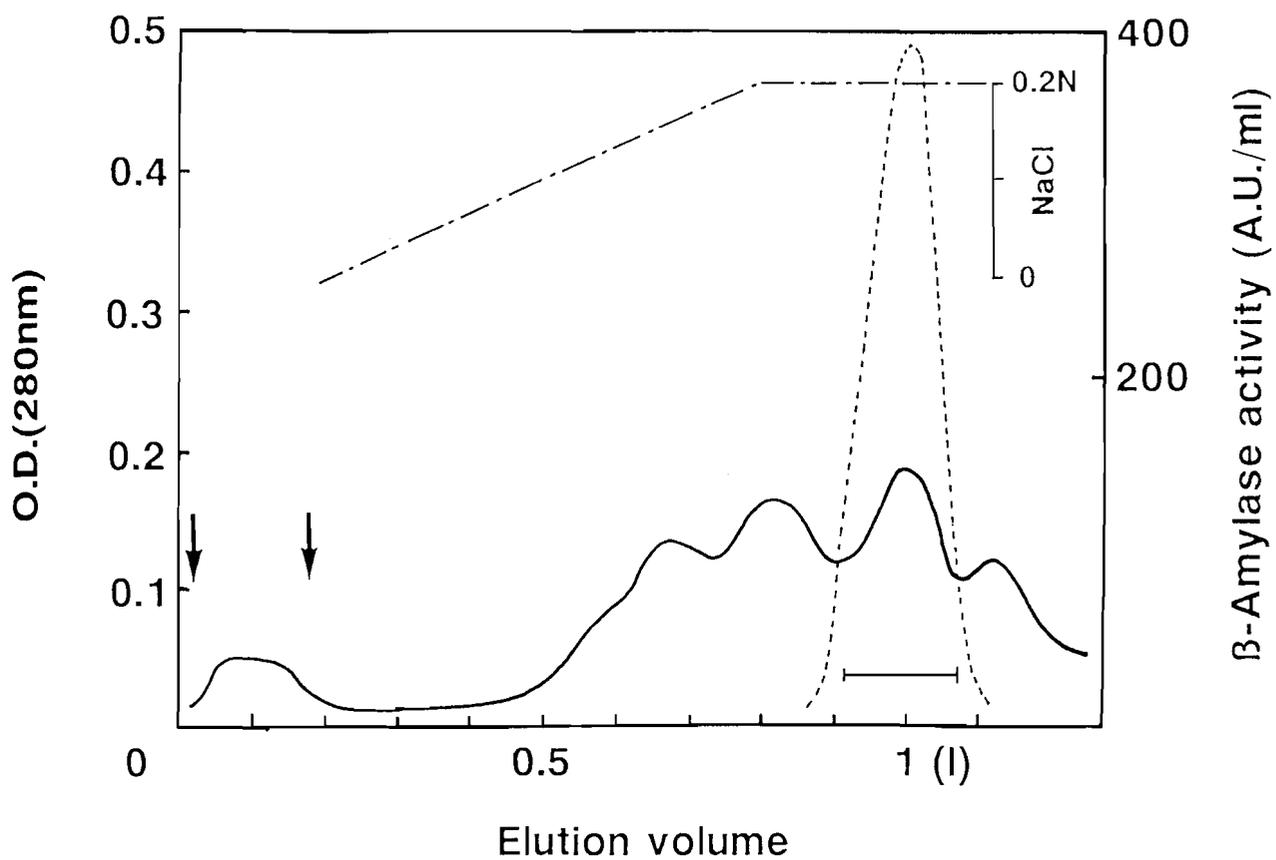
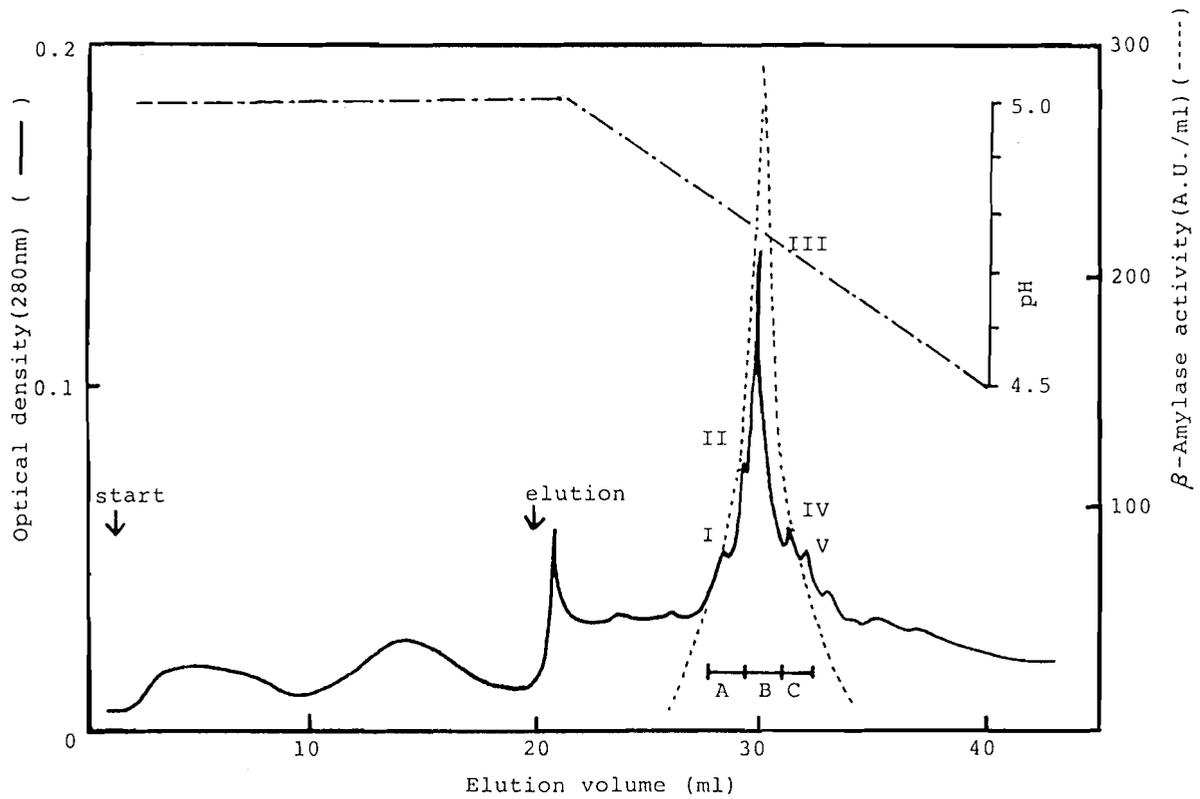


Fig. II-6 Elution Profile of Alfalfa  $\beta$ -Amylase by Ion-exchange Chromatography on the Q-Sepharose Column.

— O. D. (280nm),      - - - - - Amylase activity



**Fig. II-7 Purification of Alfalfa  $\beta$ -Amylases by Chromatofocusing. Active region of  $\beta$ -amylase was divided into five fractions (I-V) or three fractions (A-C) as indicated in the figure.**

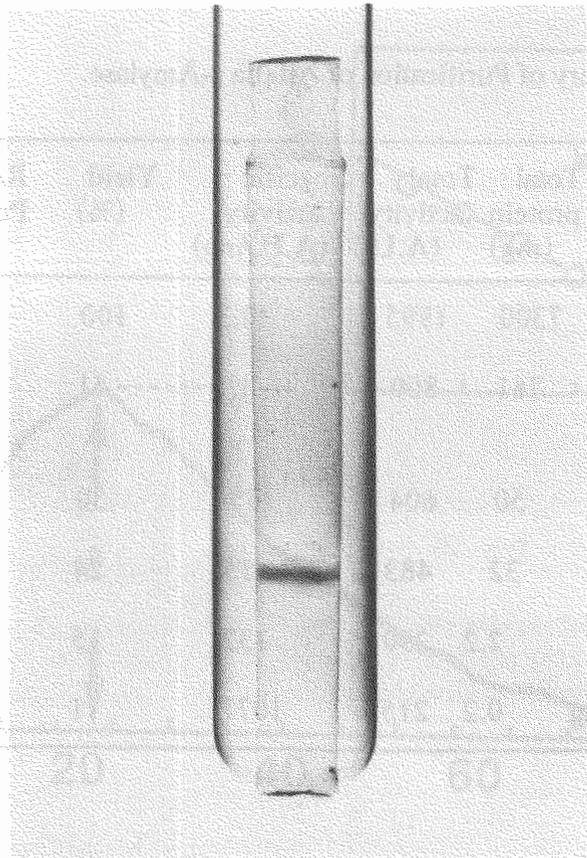


Fig. II-8 Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Alfalfa  $\beta$ -Amylase. Purified alfalfa  $\beta$ -amylase (about 25  $\mu$ g) was run on a 7% polyacrylamide gel at pH 9.5. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

Table II-2 Summary of Purification of Alfalfa  $\beta$ -Amylase.

| Purification step   | Total protein (mg) | Total activity (A.U.) | Specific activity (A.U./mg) | Yield (%) | Rate of Purification |
|---|--------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------|----------------------|
| Crude extract   | 7300               | 1995                  | 0.3                         | 100       | 1                    |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>25-65% satn. | 761                | 809                   | 1.1                         | 41        | 4                    |
| S-Sepharose   | 50                 | 604                   | 12                          | 30        | 40                   |
| Q-Sepharose   | 32                 | 483                   | 15                          | 24        | 50                   |
| Gel filtration  | 2.2                | 290                   | 132                         | 15        | 440                  |
| Chromatofocusing  | 0.2                | 215                   | 1077                        | 11        | 3590                 |

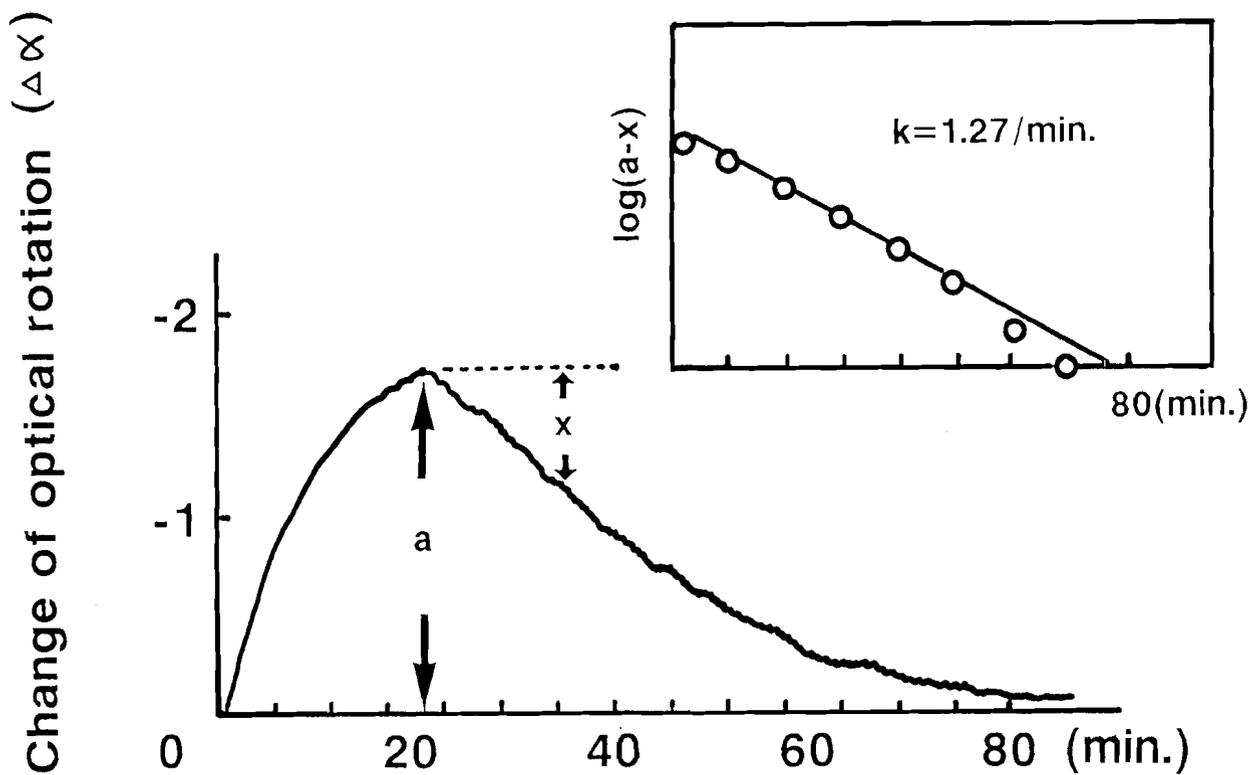


Fig. II-9 Mutarotation of Sugars Formed by Alfalfa  $\beta$ -Amylase. The purified alfalfa amylase (3 A.U.) was allowed to react with the soluble starch dissolved in 50 mM acetate buffer, pH 5.4, in a polarimeter cell incubated at constant temperature (25°C). Changes of optical rotation of sugars formed after the enzyme attack were scanned with a PM-70 High Sensitive Automatic Polarimeter. a, changes of optical rotation ( $\Delta\alpha$ ) corresponding at the finishing point of the enzyme action; x, changes of optical rotation corresponding at any point during the conversion process of  $\beta$ -maltose formed into  $\alpha$ -maltose. The first order rate constant was calculated to be 1.27/min.

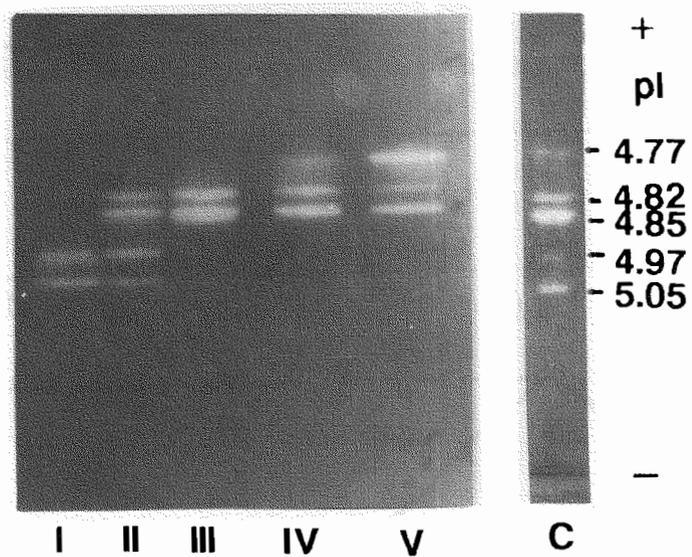


Fig. II-10 Isoelectrofocusing of  $\beta$ -Amylase. Five fractions after chromatofocusing were isoelectrophoresed on an Immobiline Plate (pH range 4.5-5.4) and visualized by active staining. Lane C; crude enzyme solution.

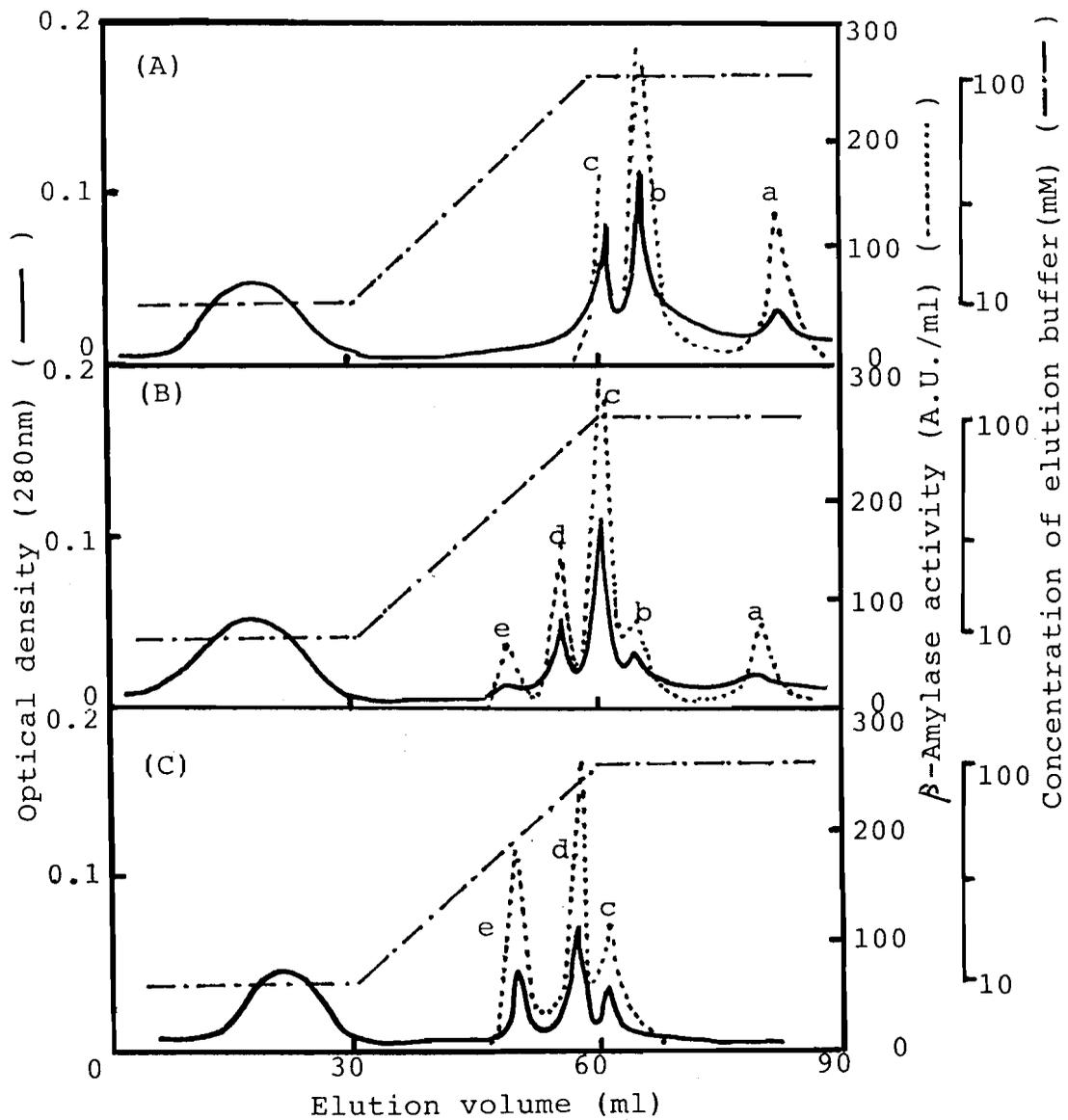


Fig. II-11 Isolation of Five Isoforms of  $\beta$ -Amylase by Cation-exchange Chromatography. Three fractions after chromatofocusing (A-C) were applied to Mono S column, and five isoforms (a-e) were isolated.

り、アルファルファの5個の $\beta$ -アミラーゼアイソフォーム a, b, c, d, e (pI 5.05, 4.97, 4.85, 4.82, 4.77) は、Mono S カラムクロマトグラフィーにより個々均一に分離できた。

5個のアイソフォームはそれぞれ可溶性デンプンを切断し、 $\beta$ -マルトースのみを生成したことから $\beta$ -アミラーゼと同定された。そのうち量的に主たるものは、isoform cであった。それぞれ0.55  $\mu$ MのPCMB処理で活性が失活した。示適pHは全て中性付近で、示適温度は50°Cであった。比活性(activity/mg)は、2106 (isoform a), 760 (isoform b), 1077 (isoform c), 911 (isoform d), 434 (isoform e)で、可溶性デンプンに対するKm値(%)は、0.25, 0.5, 0.5, 0.5, そして0.3であった。

次に各アイソフォームのSDS電気泳動の結果をFig. II-13に示す。分子量は全て等しく61000 kDaであった。

さらに各アイソフォームのアミノ酸組成をTable II-3に示す。それぞれのアイソフォームの構成アミノ酸間で、相同性は認められるが同一ではなかった。

アイソフォーム cに対するマウス抗血清は、アイソフォーム a, b, d, e とそれぞれ免疫交叉反応を示した (Fig. II-14)。

### (3) 考察

筆者らは、Mono P カラムを用いたクロマトフォーカシングにより、アルファルファ $\beta$ -アミラーゼを精製し、さらにMono S カラムでのイオン交換クロマトグラフィーにより等電点の接近した5個のアイソフォームを個々に分離精製した。それぞれのpIは、Isoform aは5.05, bは4.97, cは4.85, dは4.82, eは4.77であった。

この分離方法は他の植物種子中の $\beta$ -アミラーゼアイソフォームの分離精製に適応しうるものと思われる。なお、本 $\beta$ -アミラーゼの分子量、SH基のPCMB修飾による失活などの性質は、知られている $\beta$ -アミラーゼのそれらと一致した<sup>26), 44)</sup>。その他、N末端アミノ酸がブロックされていること、分子中に糖を含んでいないこともダイズ $\beta$ -アミラーゼと同様であった<sup>26)</sup>。しかし、等電点は低く、また、植物型の $\beta$ -アミラーゼの至適pHは酸性側であるのに対して、中性付近であるという点で異なる性質を有していた<sup>26), 45)</sup>。

得られたアミノ酸組成から、主成分 $\beta$ -アミラーゼコンポーネントcと他のも

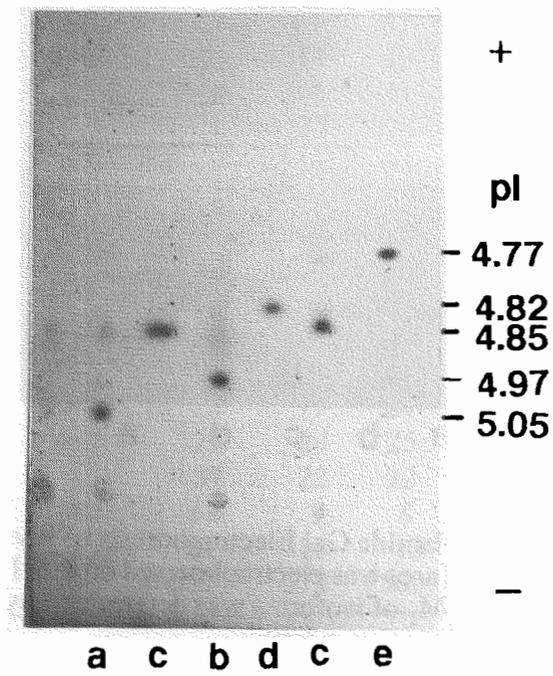


Fig. II-12 Isoelectrofocusing of Each of Five Purified Isoforms.  
 Five isoforms (a-e) isolated by cation-exchange chromatography  
 were isoelectrophoresed and stained with Coomassie blue R.

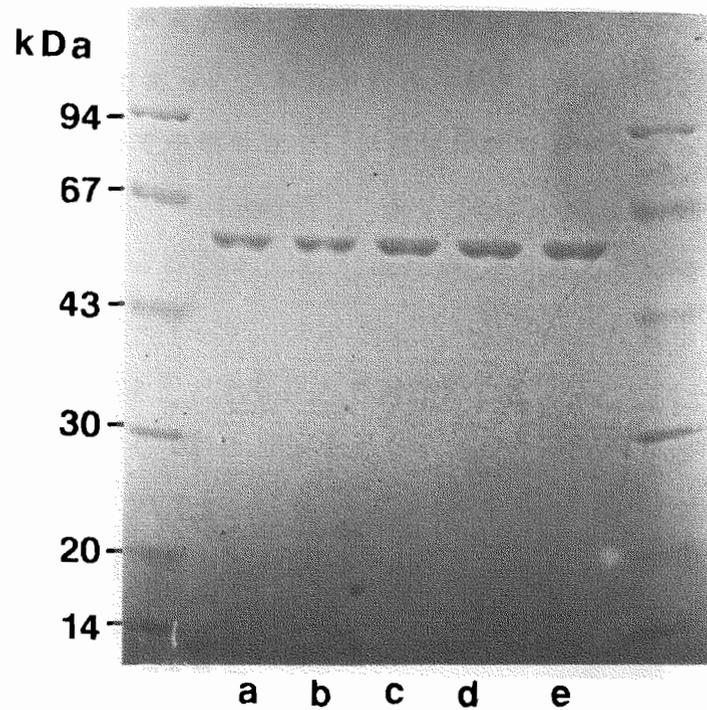
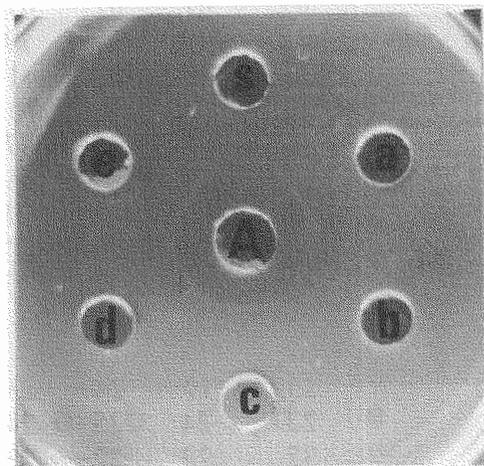


Fig. II-13 SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Five Isoforms. Each isoform (a-e) was electrophoresed on 7.5-15% acrylamide gradient gels.  $M_r$  of isoforms was determined by using protein standards (Pharmacia-LKB).

Table II-3 Amino Acid Compositions of Five Isoforms of  $\beta$ -Amylase\*

| Amino acid | Isoform |     |     |     |     |
|------------|---------|-----|-----|-----|-----|
|            | a       | b   | c   | d   | e   |
| Asn        | 69      | 61  | 67  | 67  | 55  |
| Thr        | 18      | 19  | 19  | 19  | 16  |
| Ser        | 40      | 44  | 39  | 41  | 35  |
| Gln        | 66      | 77  | 71  | 70  | 64  |
| Pro        | 32      | 34  | 35  | 37  | 38  |
| Gly        | 63      | 74  | 59  | 59  | 73  |
| Ala        | 33      | 37  | 37  | 38  | 38  |
| Val        | 31      | 39  | 38  | 37  | 39  |
| Met        | 10      | 12  | 14  | 13  | 5   |
| Ile        | 29      | 34  | 34  | 34  | 38  |
| Leu        | 48      | 53  | 55  | 54  | 62  |
| Tyr        | 23      | 17  | 24  | 23  | 23  |
| Phe        | 22      | 24  | 25  | 24  | 28  |
| Lys        | 37      | 22  | 22  | 23  | 26  |
| His        | 12      | 9   | 8   | 9   | 9   |
| Arg        | 24      | 16  | 13  | 14  | 19  |
| Total      | 557     | 572 | 560 | 562 | 568 |

\* Number of residues per  $M_r$  61,000 protein.



**Fig. II-14** Test for Immunological Reactivity of Anti- $\beta$ -amylase (isoform c) Serum against Each  $\beta$ -Amylase Isoform (a, b, c, d, e) or Soybean  $\beta$ -Amylase (S).

のの相関値を、Marchalonis の方法<sup>46)</sup>で計算すれば、Isoform a に対しては 18.56、Isoform b とは 11.13、Isoform d とは 0.56、Isoform e とは 17.54 という値が得られ、Isoform c と Isoform d とが相同性が一番高かった。また、ダイズの  $\beta$ -アミラーゼコンポーネント 2<sup>26)</sup>との相関値は 21.58 であり、ダイズ  $\beta$ -アミラーゼと Isoform c 抗血清との免疫交叉反応は認められなかった (Fig. II-14)。

各アイソフォームの分子量が同一であることより、アルファルファの  $\beta$ -アミラーゼは、オオムギの  $\beta$ -アミラーゼの翻訳後の限定プロテオリシスによる多型化<sup>47)</sup> (その場合、各アイソフォームの分子量が異なる) とは異なることが示唆された。

## 第 2 項 . アルファルファ $\alpha$ - アミラーゼ の精製と性質

第 II 章第 1 節で述べたように、アルファルファ種子中には、 $\alpha$ -アミラーゼに由来すると考えられる活性が検出された。この酵素は種子中に存在し、発芽過程で活性が減少した。そこで、本酵素を精製し同定を行い、アルファルファ種子発芽過程における特殊なアミラーゼ変動パターンの例証を試みた。

### (1) 実験方法

① 精製法 ; Koshiha and Minamikawa の方法<sup>48)</sup>を一部変更して精製した。アルファルファ発芽種子 (発芽 2 日) 500 g を 0.1 M トリス塩酸バッファー (pH 7.4, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM 2-ME) 中でホモゲナイズし、遠心分離 (8000 rpm, 15 分) して得た上清 1200 ml に、30% 飽和になるように硫酸を加え、遠心後、上清に 65% 飽和になるように硫酸を加え、溶解させ、遠心後、沈澱を集めた。続いて 50 mM 酢酸バッファー (pH 5.4, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM 2-ME) に溶解させ、アフィニティークロマトグラフィーに供した<sup>48), 49)</sup>。カラムは、 $\beta$ -シクロデキストリンを結合させた epoxy-activated Sepharose 6B を用い、50 mM 酢酸バッファー (pH 5.4, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM 2-ME) に溶かしたアミラーゼを吸着させた。次に 1.5%  $\beta$ -シクロデキストリンを溶かした上記バッファーで溶出させた。 $\alpha$ -アミラーゼを含む溶出液を、UK-10 フィルター (Toyo Co. Ltd.) を用いる限外ろ過法により濃縮後、Superose 12 カラムでゲルろ過を行なった。ゲルろ過の展開バッファーは、0.1 M トリス塩酸バッファー (pH 7.4, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM 2-ME, 0.1 M NaCl) を用いた。さらに Centrisart 1 (Sartorius) を用いて遠心濃縮を行なった。

酵素活性の測定は Phadebas 法<sup>4)</sup>、タンパク質の定量は Bradford の方法<sup>39)</sup> を用いた。

② 均一性試験 ; 等電点電気泳動は、アンホラインゲルを用い、CBB によるタンパク染色を行なった。SDS-電気泳動は、Excel gel (Pharmacia-LKB) を用い、銀染色法 (Wako kit) で均一性のテストを行った。

③  $\alpha$ -アミラーゼの同定法 ; 精製した  $\alpha$ -アミラーゼ (10 U) を 1% 可溶性デンプンに加え (液量 5 ml)、30°C で 6 時間反応させた。このうち 3 ml をと

り、凍結乾燥したのち、 $500\mu\text{l}$ の蒸留水にとかし、 $0.45\mu\text{m}$ マイクロフィルターを通した。ろ液 $10\mu\text{l}$ をHPLC分析に供した。クロマトグラフィーの条件は、第II章第2節に示した。市販の $\alpha$ -アミラーゼ (pancreasとbarley由来)は、同様にしてアフィニティークロマトグラフィーで精製し、リョクトウの発芽種子からも、アルファルファの酵素の場合と同じ方法で $\alpha$ -アミラーゼを精製し、同様にして生成糖を分析した。

## (2) 実験結果

Table II-4に、 $\alpha$ -アミラーゼの精製過程を示した。収量は1.6%で、精製率は2227倍であった。比活性は $17857\text{U}/\text{mg}$ であった。

アンホラインゲルを用いた等電点電気泳動後のCBB染色では、1本のバンドが現れ、その等電点は4.92であった (Fig. II-15, lane A)。また、 $\beta$ -リミットデキストリン基質での活性染色ではタンパク質と対応する位置にバンドが現れ (Fig. II-15 lane B)、この酵素が $\alpha$ -アミラーゼであることを示している。SDS-電気泳動後のExcel gel中には銀染色で1本のバンドが現れ、分子量は $43\text{kDa}$ であった (Fig. II-15, lane C)。

次に、Fig. II-16に $\alpha$ -アミラーゼの、可溶性デンプンに反応した生成糖を示した。市販の $\alpha$ -アミラーゼ (pancreas)は主にマルトースと、マルトオリゴサッカライド ( $G_3-G_5$ )を生成した。オオムギの $\alpha$ -アミラーゼは、主にマルトースとマルトオリゴサッカライド ( $G_3-G_7$ )を生成した。リョクトウの $\alpha$ -アミラーゼは、マルトースとマルトオリゴサッカライド ( $G_3-G_{10}$ )を生成した。アルファルファもリョクトウやオオムギの場合と同様の作用パターンであった。これらの結果より、アルファルファの本酵素が $\alpha$ -アミラーゼであると同定した。

## (3) 考察

種子および発芽種子の初期のものに含まれ、発芽が進むと減少する酵素は、精製酵素とその生成糖を調べた結果、 $\alpha$ -アミラーゼと同定された。

アルファルファ種子中の $\alpha$ -アミラーゼは、分子量 $43\text{kDa}$ 、 $pI 4.92$ で、他の植物由来の $\alpha$ -アミラーゼと分子量はほぼ等しいが、等電点が酸性側にあった<sup>50)</sup>。

以上、第II章で述べた、アルファルファ種子中に存在し、発芽過程で減少する酵素は、主として等電点が4.92の $\alpha$ -アミラーゼであり、発芽後に活性が増

加するアミラーゼは、5個の $\beta$ -アミラーゼアイソフォームであることが示された。

前章で示した、アンホラインゲル、およびイモビラインゲルを用いた、等電点電気泳動後の活性染色による、 $\alpha$ -アミラーゼと $\beta$ -アミラーゼの検出法は、他の植物発芽種子中の両アミラーゼの検出のみならず、それらの変動パターン分析に適応しうると考察される。

Table II-4 Purification of  $\alpha$ -Amylase from Germinating Seedlings of Alfalfa

| Purification step                     | Volume (ml) | Protein (mg) | Total activity (U) | Specific activity (U/mg) | Yield (%) | Purification (fold) |
|---------------------------------------|-------------|--------------|--------------------|--------------------------|-----------|---------------------|
| Crude extract                         | 3,300       | 3,208        | 25,740             | 8.02                     | 100       | 1                   |
| 30-65% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   | 500         | 873.5        | 10,400             | 11.91                    | 40.4      | 1.5                 |
| $\beta$ -Cyclodextrin<br>sepharose 6B | 2           | 0.3          | 2,000              | 6,666                    | 7.8       | 831                 |
| Superose 12                           | 0.1         | 0.0224       | 400                | 17,857                   | 1.6       | 2,227               |

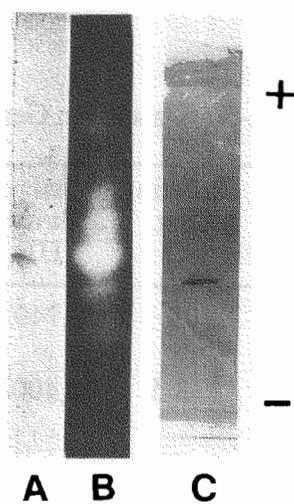


Fig. II-15 Homogeneity of Purified  $\alpha$ -Amylase. Purified  $\alpha$ -amylase was subjected to isoelectrophoresis on an Ampholine gel and stained with Coomassie blue R (lane A) or by activity staining with  $\beta$ -limited dextrin as substrate (lane B). Purified  $\alpha$ -amylase was subjected to electrophoresis in the presence of SDS on Excel gel and stained with silver (lane C).

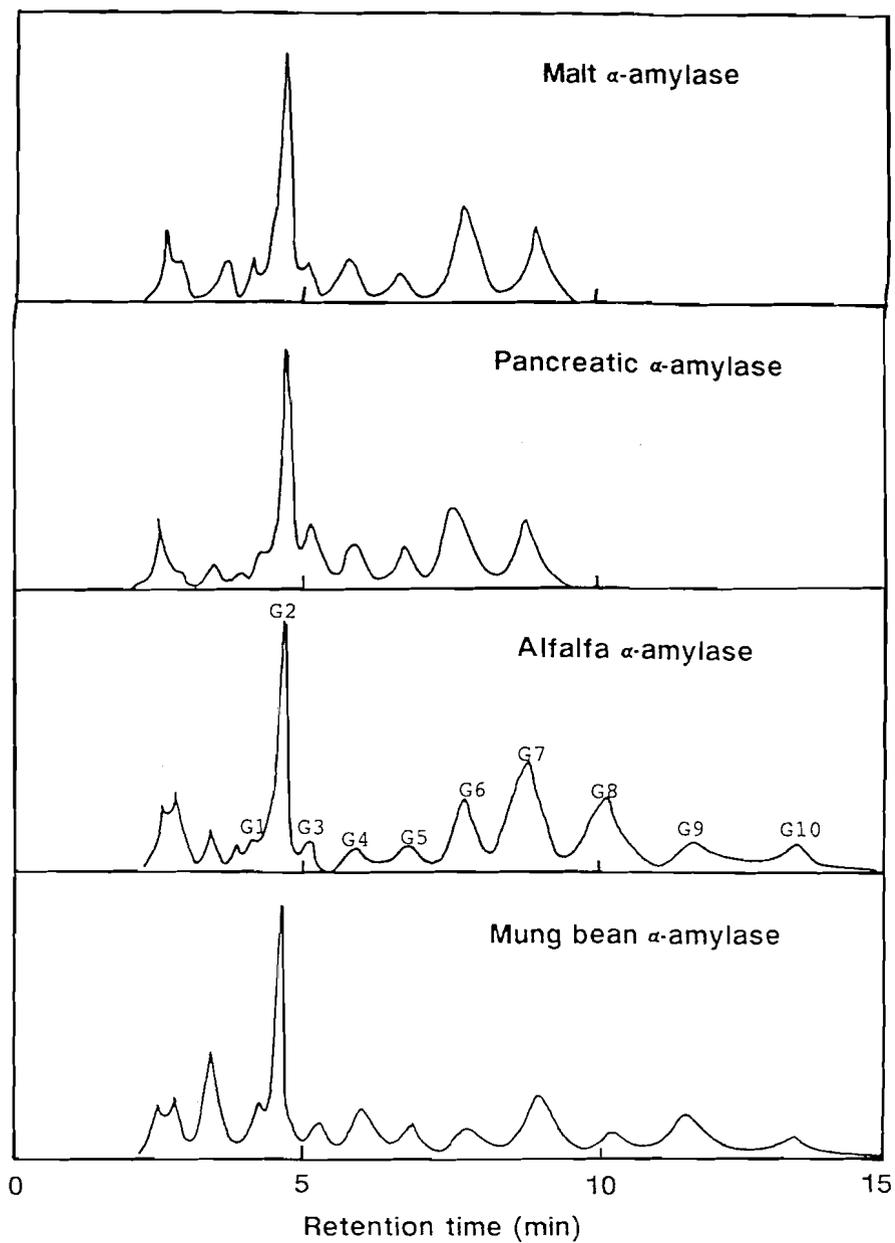


Fig. II-16 Determination of Sugars Generated by  $\alpha$ -Amylase.

### 第3節. アルファルファ発芽種子中での $\beta$ -アミラーゼ活性発現に対する抗生物質 の影響

アルファルファ発芽種子中で $\beta$ -アミラーゼ活性の増加が認められた。そこで、この原因が、発芽種子中での生合成によるものかどうかを検討するため、タンパク合成阻害剤のシクロヘキシイミドとmRNA合成阻害剤のアクチノマイシンDを種子の発芽時に添加し、 $\beta$ -アミラーゼ活性発現への影響を検討した。

#### (1) 実験方法

アルファルファ種子5gを、24時間水に浸漬し、濾紙の上におき、暗所で、25℃で7日間発芽させた。発芽期間中、毎日水洗した。抗生物質処理をおこなう試料は、種子5gをシクロヘキシイミド水溶液(30 $\mu$ g/ml)、あるいはアクチノマイシンD水溶液(30 $\mu$ g/ml)に、24時間浸漬した後、発芽させた。発芽期間中、毎日1回、1時間それぞれの抗生物質(15 $\mu$ g/ml)に浸漬した。

酵素溶液の調製は第1章(1)に示した。

$\alpha$ -アミラーゼ活性は、Phadebas法<sup>4)</sup>、 $\beta$ -アミラーゼ活性は、Pantrac法<sup>2)</sup>で測定した。抗生物質処理および未処理の試料を、イモビライジングルを用いる等電点電気泳動に供した。泳動条件は、第2章第1節(1)に示した。 $\beta$ -アミラーゼを検出するために、可溶性デンプン溶液を基質として用い、活性染色を行った。

#### (2) 実験結果および考察

Figure II-17に抗生物質処理による酵素活性の変化を示した。 $\beta$ -アミラーゼ活性は、発芽過程での増加が明らかに両抗生物質処理により抑制された。しかし、 $\alpha$ -アミラーゼ活性の変化には効果が認められなかった。Figure II-18にイモビライジングルを用いる等電点電気泳動後の活性染色の結果を示した。 $\beta$ -アミラーゼの5個のアイソザイムの中でも、とくにa, c, dの活性の増加が抑制されたことを示している。発芽時に抗生物質処理をした結果、 $\alpha$ -アミラーゼ活性の変化は認められなかったが、 $\beta$ -アミラーゼ活性の増加が抑制された。これらの結果は、 $\alpha$ -アミラーゼが種子中に存在し、発芽過程で増加しないこと及び $\beta$ -アミラーゼ活性の増加は、de novo合成によることを示唆し、知られている知見と

は逆の結果であった<sup>51)</sup>。また、アクチノマイシンDよりもシクロヘキシイミドの方が活性抑制効果があると考察され、この点、タンパク質合成系の抑止が主要因であると推論される。

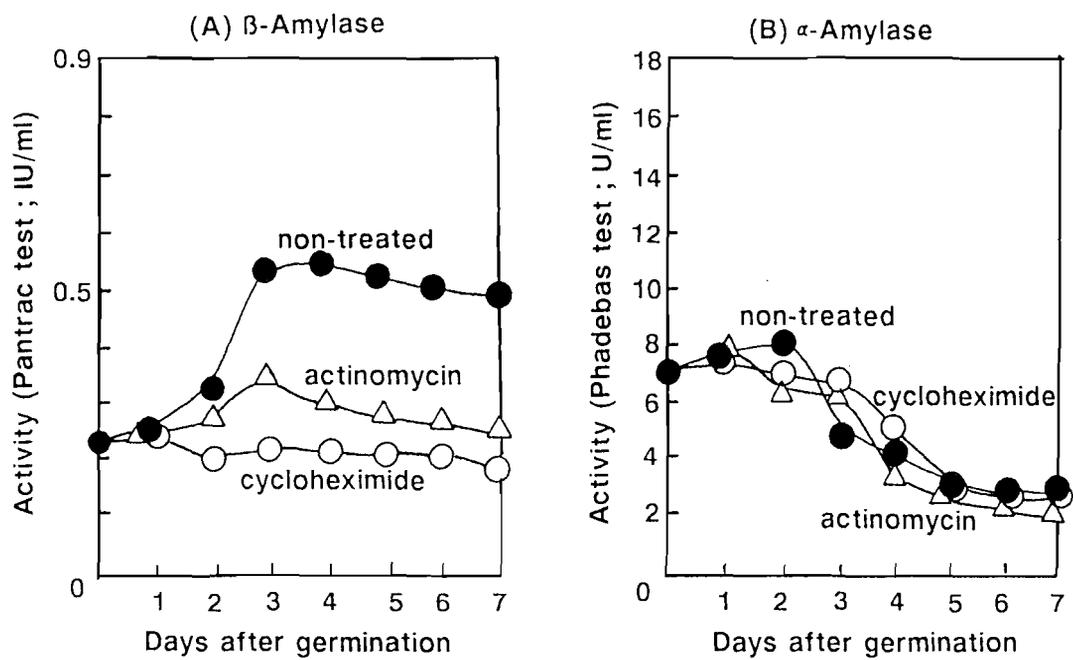


Fig. II-17 Effects of Cycloheximide and Actinomycin D on the Activity of  $\beta$ - and  $\alpha$ -Amylases during Germination.

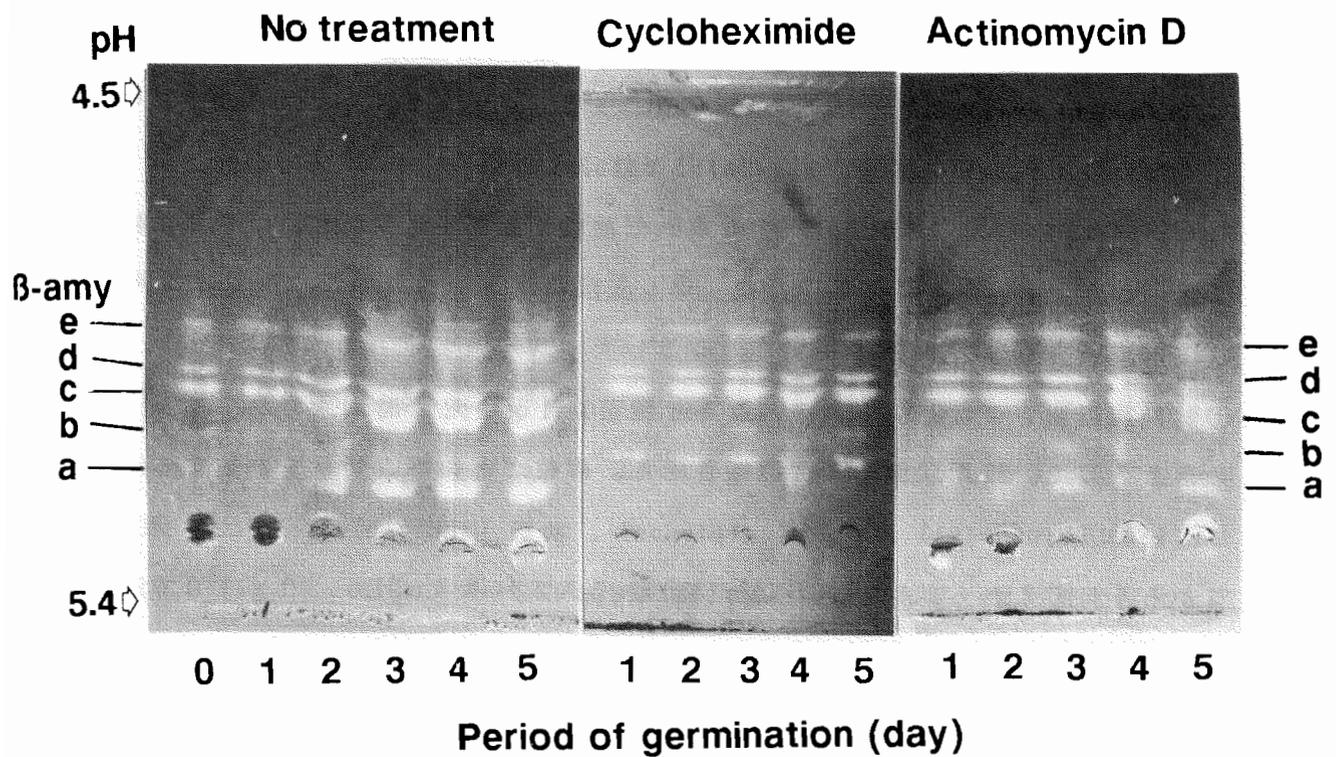


Fig. II-18 Inhibition of the Increase in  $\beta$ -Amylase Activity by Cycloheximide Actinomycin D in Germinating Seedlings of Alfalfa.  $\beta$ -Amylases (a-e; indicated as  $\beta$ -amy in the Figure) were separated in an Immobilized gels and visualized by activity staining.

### 第 III 章 . クローバー、アズキ、ダイズ発芽種子中における $\alpha$ -、及び $\beta$ - アミラーゼ活性の変動

アルファルファ種子の発芽過程でのアミラーゼ活性の変動を精査した結果、既報のものとは異なる特徴が明らかになった。そこで、このようなパターンが、他のマメ科植物種子の発芽過程においても認められるのではないかと考えて、アルファルファと同じ Trifolieae (シャジクソウ) 連に属するクローバー

(*Trifolium repens*)<sup>52)</sup>、また発芽種子中での  $\alpha$  - アミラーゼ活性の変動について知られていないアズキ (*Phaseolus angularis*)、ダイズ (*Glycine max* Merr.) について  $\alpha$  -、及び  $\beta$  - アミラーゼ活性の変動を活性測定及び電気泳動法で精査した。

#### (1) 実験方法

① 試料調製法 ; クローバー種子 (タキイ種苗) 1 g を 24 時間水浸後、濾紙上におき 25 °C で、暗黒状態にして発芽させた。部位ごとの酵素活性を測定するために、胚軸 (hypocotyl)、子葉 (cotyledon)、幼根 (radicle) に分けた。発芽 1 日から 6 日のこれら試料を、10 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) 100 ml 中でホモゲナイズし、4 °C で同バッファーに対し 1 晩透析した。遠心分離で得た上清を 100 ml とし、酵素活性を測定した。また乾燥種子及び発芽 3 日、6 日の子葉中の粗酵素抽出液 90 ml を凍結乾燥し、5 ml の同バッファーに溶解させ、遠心後 (8000 rpm、10 分)、上清を等電点電気泳動に供した。

アズキ種子、ダイズ種子は、クローバーと同様に発芽させ、発芽種子から粗アミラーゼ抽出液を調製した。

② 酵素活性測定法 ;  $\alpha$  - アミラーゼ活性は Phadebas 法<sup>4)</sup>、 $\beta$  - アミラーゼ活性は Pantrac 法<sup>2)</sup> を用い測定した。

③ 等電点電気泳動法 ; LKB 2117 Multiphor II 電気泳動装置

(Pharmacia-LKB) を用い、ゲルは、アンホラインゲル (pH 4.0 - 6.5) 及び、イモピラインゲル (pH 4.0 - 6.0) を用いた。泳動条件は、第 I 章 (1)、第 II 章第 1 節 (1) に示した通りである。泳動後のゲルは  $\beta$  - リミットデキストリン及び可溶性デンプンを基質に用い活性染色を行った。方法は、第 I 章 (1) に示した。

## (2) 実験結果

Figure III-1 にクローバー発芽種子の各器官ごとの $\alpha$ -、及び $\beta$ -アミラーゼ活性の発芽種子中での変化を示した。アミラーゼ活性は子葉中にのみ認められた。発芽により $\alpha$ -アミラーゼ活性は減少したが、 $\beta$ -アミラーゼ活性は増加した。

Fig. III-2 に、クローバー発芽種子子葉中 $\alpha$ -アミラーゼの等電点電気泳動の結果を示した。アンホラインゲルでの $\beta$ -リミットデキストリン基質の活性染色の結果、乾燥種子、発芽3日、発芽6日の子葉サンプルに、2本のバンドが現れた(lane 7,8,9)。これらのアミラーゼは、 $\alpha$ -アミラーゼで、等電点がそれぞれ4.2と4.5であり、乾燥種子により多く存在した。そしてイモビラインゲルではバンドが現れなかった(lane 4,5,6)。イモビラインゲルでの可溶性デンプン基質を用いた活性染色の結果、発芽3日、6日の子葉に4本のバンドが現れたが(lane 2,3)、これらは $\beta$ -アミラーゼで、等電点はそれぞれ4.2, 4.3, 4.5, 4.6であり、発芽6日の子葉中により多く存在した。当然、この $\beta$ -アミラーゼのバンドは $\beta$ -リミットデキストリンを基質とした場合は、活性染色不可であった。

次に、Fig. III-3 にアズキ、ダイズの発芽過程でのアミラーゼ活性の変化とアンホラインゲルを用いて、電気泳動後の $\beta$ -リミットデキストリンを基質とした活性染色の結果を示した。アズキでは、アンホラインゲルでの $\beta$ -リミットデキストリン基質を用いた活性染色の結果、1本のバンドが現れ、この $\alpha$ -アミラーゼのバンドは、発芽3日から6日にかけて濃くなった。しかし、イモビラインゲルでは、バンドが現れなかった(Fig. III-4)。

ダイズでは、アンホラインゲルを用いて、電気泳動後の $\beta$ -リミットデキストリンを基質とした活性染色の結果、 $\alpha$ -アミラーゼは発芽の進行につれて濃いバンドとなった(Fig. III-3)。しかし、イモビラインゲルでは、バンドが現れなかった(Fig. III-4)。

## (3) 考察

クローバーの発芽時のアミラーゼ活性変動パターンを調べた結果、 $\alpha$ -アミラーゼ活性は発芽種子中で減少し、 $\beta$ -アミラーゼ活性は発芽種子中で増加を示した。これは既報のパターンと逆であり、アルファルファの場合と全く同じであった。また、活性染色の結果、2本の $\alpha$ -アミラーゼと考えられるバンドと、4本

の $\beta$ -アミラーゼと考えられるバンドが現れた。そして、 $\alpha$ -アミラーゼと考えられるバンドがイモビラインゲルではバンドが現れないという現象が認められた。この現象は、アルファルファについても認められていることは、既に述べた。

粗抽出液中の $\alpha$ -アミラーゼは、アフィニティークロマトグラフィー法で $\beta$ -アミラーゼと分離され、それぞれのアミラーゼは、可溶性デンプンとの反応生成物の分析から、 $\alpha$ -及び $\beta$ -アミラーゼであると同定した。

このように、同じTrifolieae (シャジクソウ) 連に属するアルファルファとクローバーにおいて、その発芽時のアミラーゼ活性変動パターンが共に既報と逆の型であるという興味深い結果が得られた。

アズキは、発芽過程で乾燥種子中に含まれていない $\alpha$ -アミラーゼ活性発芽種子中で急激に増加し、 $\beta$ -アミラーゼ活性は低い値であった。報告されているエンドウの発芽種子中のアミラーゼ活性変動パターンと同じタイプであった<sup>5)</sup>。

ダイズは、種子中に多量に含まれている $\beta$ -アミラーゼ活性が、減少を示すことは知られているが<sup>15)</sup>、発芽過程で種子中に含まれている $\alpha$ -アミラーゼ活性が、微増することが明らかとなった。ダイズ $\alpha$ -アミラーゼ活性を、電気泳動的に検出し、発芽過程での増加を示したのは、このデータが初めてである。さらに、アルファルファやクローバーの $\alpha$ -アミラーゼと同様、アズキ、ダイズの $\alpha$ -アミラーゼも、イモビラインゲル中では、活性染色バンドとして検出されない現象が認められた。

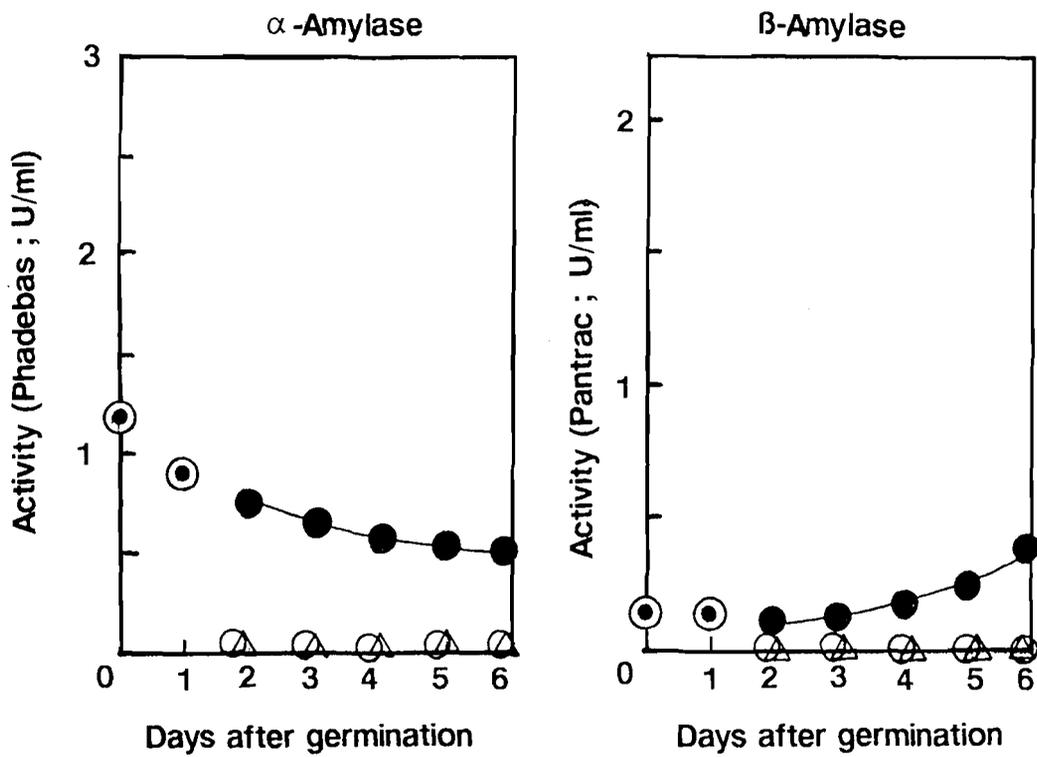


Fig. III-1 Changes in  $\alpha$ -Amylase Activity and  $\beta$ -Amylase Activity during Germination of Clover Seeds.  $\alpha$ -Amylase activity and  $\beta$ -amylase activity in whole seedling (⊙), cotyledons (●), hypocotyls (Δ) and radicles (○), were assayed by Phadebas and Pantrac tests, respectively.

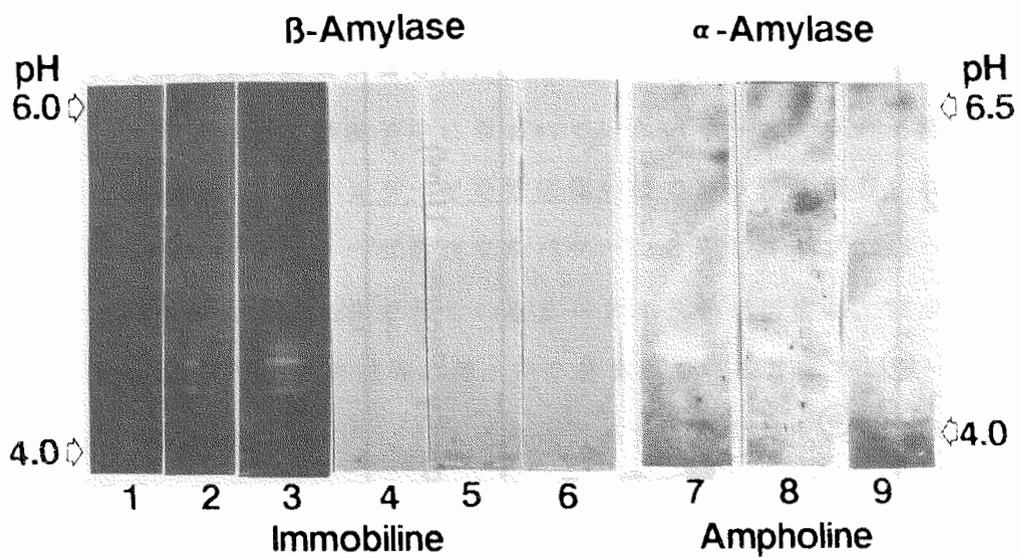


Fig. III-2 Detection of  $\beta$ -Amylase and  $\alpha$ -Amylases in Dry Seeds and Cotyledons of Clover on Immobiline Gels and Ampholine gels.  $\beta$ -Amylase was detected in an Immobiline gel when the enzymes in the gel were allowed to react with soluble starch (lane 1, 2, 3) but not when the gel was incubated in  $\beta$ -limit dextrin (lane 4, 5, 6).  $\alpha$ -Amylase was not detected in the Immobiline, but detected in an Ampholine gel with  $\beta$ -limit dextrin as substrate (lane 7, 8, 9). The samples in lanes 1, 4 and 7 were prepared from dry seeds. The samples in lanes 2, 5 and 8, and lanes 3, 6 and 9 were prepared from cotyledons on the 3rd and 6th day, respectively.

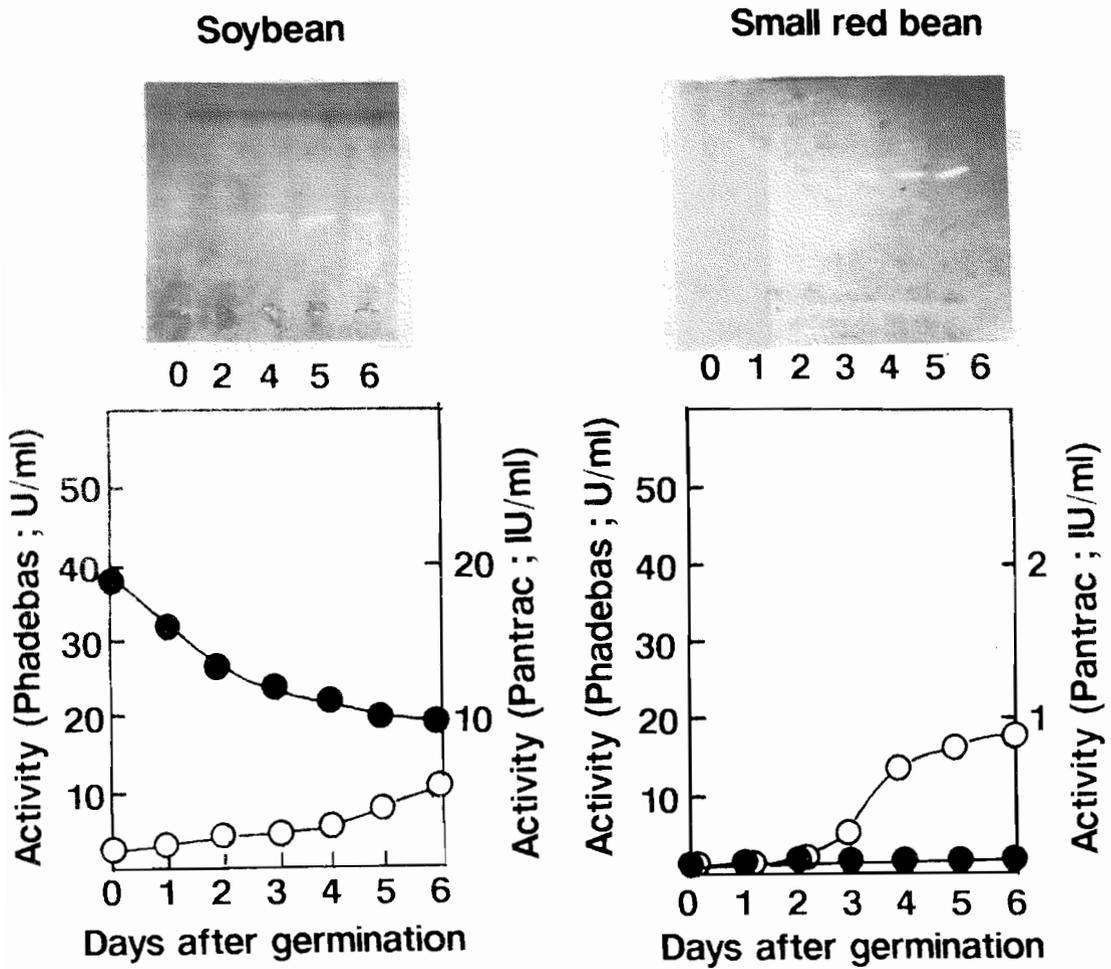


Fig. III-3 Changes of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Amylase Activities during Germination of Soybean and Small red bean Seeds.

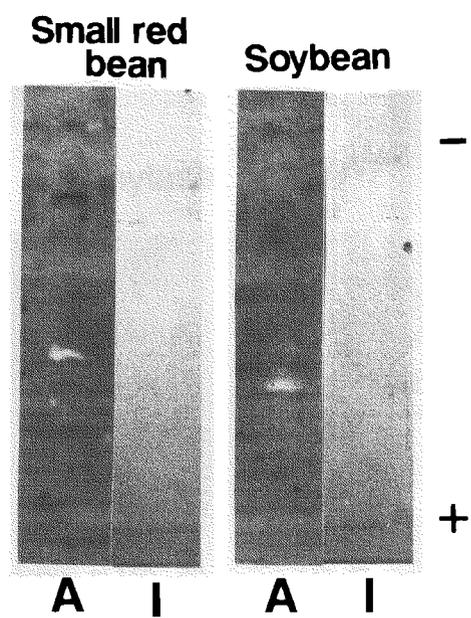


Fig. III-4 Activity Staining of  $\alpha$ -Amylases on Ampholine (A) or Immobiline Gels (I).

## 第IV章. マメ科植物 $\alpha$ -アミラーゼの電気泳動的特性

第III章で、アルファルファおよびクローバーなどの  $\alpha$ -アミラーゼがアンホラインゲル中では活性が検出されるのに反して、イモビラインゲル中では活性バンドが出現しないという現象を述べた。そこでこの現象が他の起源の  $\alpha$ -アミラーゼにもみられるかどうかを調べるため、市販アミラーゼ及び微生物、各種植物の  $\alpha$ -アミラーゼについて広く検討した。リョクトウ、アルファルファの  $\alpha$ -アミラーゼについては、精製標品を用いて、この電気泳動的特性にかかわる要因を検討した。

### (1) 実験方法

アルファルファ種子とリョクトウ種子 (*Vigna radiata*、タキイ種苗) は、200gを24時間吸水させ、濾紙上におき暗黒下で発芽させ、毎日散水した。アルファルファは、吸水1日後の発芽種子全体、リョクトウは、発芽7日めの子葉から、それぞれ  $\alpha$ -アミラーゼを精製した。クズ(根) (*Pueraria thunbergiana*) は、神戸大学農学部の津川博士から提供を受けた。イネ(種子) (*Oryza sativa*)、エンドウ(種子) (*Pisum sativum* L.)、クローバー(種子) (*Trifolium repens*) は、タキイ種苗(京都市)から購入した。ワサビ(茎) (*Eutrema wasabi* Maxim.)、キャベツ(葉) (*Brassica oleracea* L.) は、市販のものを用いた。カラスノエンドウ(種子) (*Vicia sativa* L.) は、神戸大学キャンパスで採取、ニセアカシア(種子) (*Robinia pseudacacia* L.)、ジャケツイバラ(種子) (*Caesalpinia sepiaria* Roxb.)、ネムノキ(種子) (*Albizia julibrissin* Dur.) は、神戸大学理学部の小菅博士から提供を受けた。市販酵素は、 $\alpha$ -アミラーゼ (porcine pancreas, Sigma)、 $\alpha$ -アミラーゼ (malt, Sigma)、その他、微生物酵素としては、 $\alpha$ -アミラーゼ (*Bacillus stearothermophilus*)<sup>25)</sup>を用いた。また、 $\alpha$ -アミラーゼ以外の市販のデンプン分解酵素、Glucoamylase (Sigma)、 $\alpha$ -Glucosidase (Sigma)、Isoamylase (Sigma)、Pullulanase (Sigma) も用いた。

$\alpha$ -アミラーゼ活性はPhadebas法<sup>4)</sup>で測定し、第II章第2節第2項(1)に示した方法で  $\alpha$ -アミラーゼを精製した。

また、マルトトリオース ( $G_3$ )、マルトテトラオース ( $G_4$ )、マルトヘプタ

オース (G<sub>7</sub>) の 1% 溶液 10  $\mu$  l に精製  $\alpha$ -アミラーゼ 10  $\mu$  l (10 U) を加え、30°C で 10 分、20 分、1 時間、2 時間、4 時間、7 時間それぞれ反応させたのち、遠心分離した上清 10  $\mu$  l を HPLC に連結した LiChrosorb-NH<sub>2</sub> カラムに吸着させ、アセトニトリル：水 = 75 : 25 (V/V) の混液で、糖を溶出させ、生成糖の分析を行った。

アンホライン P A G プレート (pH 4.0 - 6.5) とイモビライジングゲル (pH 4.0 - 6.0) を用い、等電点電気泳動を行った。泳動条件は、第 I 章 (1) と第 II 章第 1 節 (1) に示した。活性染色の基質としては、 $\beta$ -リミットデキストリンを用い、タンパク質は C B B 染色した。

## (2) 実験結果

種々の  $\alpha$ -アミラーゼの電気泳動的性質の検討は、イモビライジングゲルとアンホラインゲルを用いて等電点電気泳動後、 $\beta$ -リミットデキストリンを基質に活性染色を行った。得られた結果のうち、バンドが検出されたものとされないものを Table IV-1、Fig. IV-1 に示した。この電気泳動的性質 (アンホラインゲルではバンドが現れたが、イモビライジングゲルでバンドが現れない) は、マメ科植物の  $\alpha$ -アミラーゼのみに有することが判明した。マメ科以外の植物の  $\alpha$ -アミラーゼは、本研究で分析したものに関して、両方のゲルでバンドが検出された。これより、マメ科植物の  $\alpha$ -アミラーゼのみがこの共通の電気泳動的性質を有していると考えられる。なお、 $\alpha$ -アミラーゼ以外の酵素 (Glucoamylase,  $\alpha$ -Glucosidase, Isoamylase, Pullulanase) は、このような性質を示さなかった。

次に、マメ科植物アルファルファとリョクトウの  $\alpha$ -アミラーゼを精製して、イモビラインとアンホラインゲルを用いて等電点電気泳動し、活性染色及び C B B 染色を行った結果を Fig. IV-2 に示した。アルファルファとリョクトウ  $\alpha$ -アミラーゼは、ともにアンホラインゲルでしか活性バンドは現れなかった。一方、C B B 染色では、アンホラインゲルでは、対応する等電点のところにタンパクのバンドが出現したが、イモビライジングゲルでは、アプライした位置に留まったままで、 $\alpha$ -アミラーゼタンパク質が移動していないことが判明した。

これに反して、オオムギとブタ膵臓の  $\alpha$ -アミラーゼを精製して、2 種のゲルで泳動した場合は、どちらのゲル中にもバンドが現れた (Fig. IV-3)。

次に、アルファルファやリョクトウの抽出液中に、 $\alpha$ -アミラーゼと結合して

Table IV-1 Classification of  $\alpha$ -Amylases by Activity Staining on Immobiline Gels.

| $\alpha$ -Amylase | Immobiline | Ampholine |
|-------------------|------------|-----------|
| Rice              | +          | +         |
| Wasabi            | +          | +         |
| Cabbege           | +          | +         |
| Clover            | -          | +         |
| Mung bean         | -          | +         |
| Black gram        | -          | +         |
| Small red bean    | -          | +         |
| Broad bean        | -          | +         |
| Pea               | -          | +         |
| Soybean           | -          | +         |
| Kudzu             | -          | +         |
| Alfalfa           | -          | +         |

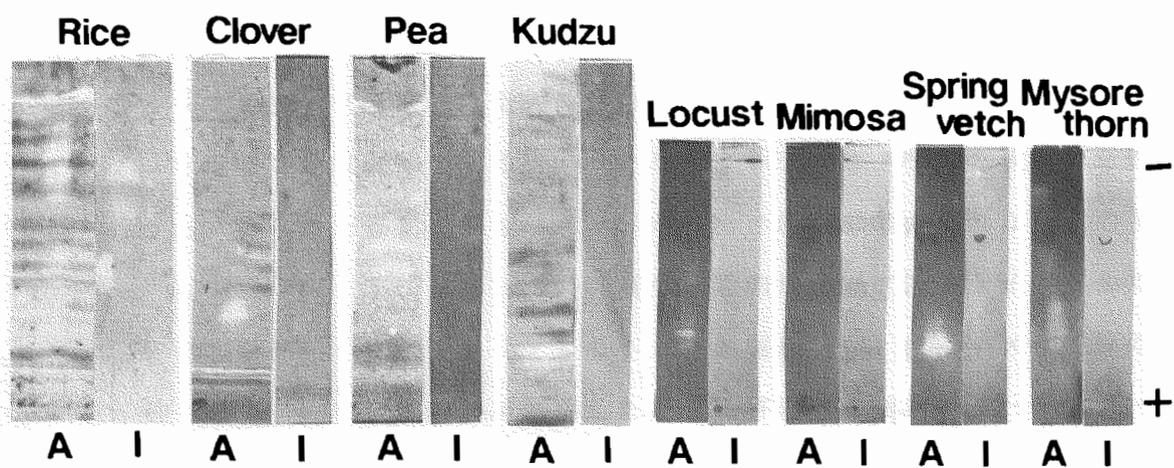
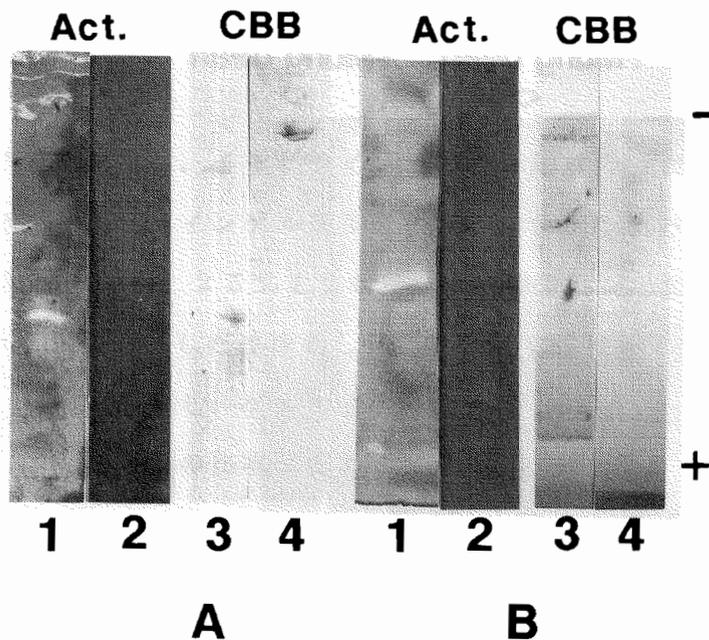


Fig. IV-1 Elucidation of a Common Property by Isoelectrofocusing of  $\alpha$ -Amylases from Leguminous Plants.  $\alpha$ -Amylase from Rice, Clover, Pea, Kudzu, Locust, Mimosa, Spring vetch and Mysore thorn were isoelectrophoresed on Ampholine gels (A) or Immobiline gels (I). All the gels were visualized by activity staining.



**Fig. IV-2** Isoelectrofocusing of  $\alpha$ -Amylase from Alfalfa and Mung Bean on Ampholine and Immobiline Gels.  
 Act.: the gels were visualized by activity staining. CBB: the gel were stained by using Coomassie brilliant blue R 250.  
 Left figure (A): isoelectrofocusing of purified  $\alpha$ -amylase from alfalfa on Ampholine gels (lane 1 and lane 3) and Immobiline gels (lane 2 and lane 4).  
 Right figure (B): isoelectrofocusing of purified  $\alpha$ -amylase from mung bean on Ampholine gels (lane 1 and lane 3) and Immobiline gels (lane 2 and lane 4).  
 About 0.5  $\mu$ g of each  $\alpha$ -amylase was applied onto the gels (lane 1 and lane 2). About 3  $\mu$ g of purified  $\alpha$ -amylase was applied onto the gels (lane A-3, 4 and lane B-4). About 10  $\mu$ g of purified  $\alpha$ -amylase was applied onto the gel (lane B-3).

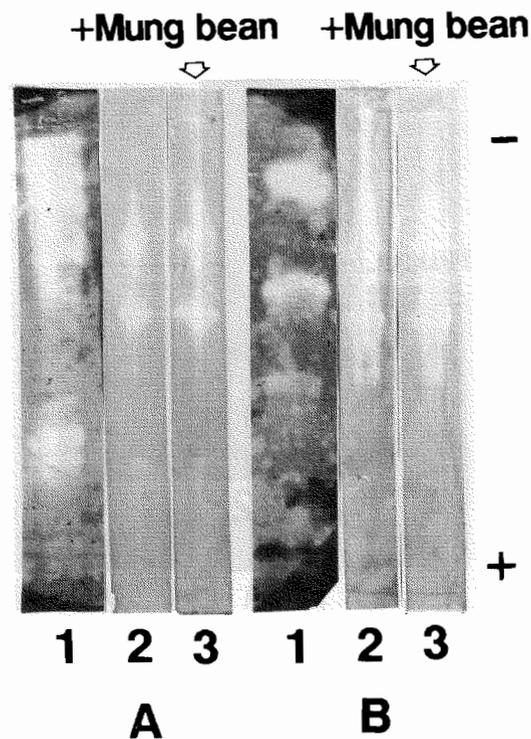


Fig. IV-3 Isoelectrofocusing of  $\alpha$ -Amylases from Malt and Pancreas on Ampholine and Immobiline Gels. All the gels were visualized by activity staining. Left figure (A): Isoelectrofocusing of  $\alpha$ -amylase from malt. Right figure (B): isoelectrofocusing of  $\alpha$ -amylase from pancreas. One microgram of each  $\alpha$ -amylase was applied onto the Ampholine gels (lane A-1 and lane B-1). One microgram of each  $\alpha$ -amylase was applied onto the Immobiline gels (lane A-2 and lane B-2). The mixtures of purified  $\alpha$ -amylase (1  $\mu$ g, malt) and an aliquot of crude extracts of mung bean was applied onto the Immobiline gels (lane A-3). The mixtures of purified  $\alpha$ -amylase (1  $\mu$ g, pancreas) and an aliquot of a solution of crude mung bean extracts was applied onto the Immobiline gels (lane B-3).

泳動を阻害する物質の存在が考えられ、その可能性を検討する目的で、リョクトウ抽出液を、ブタ膵臓とオオムギ精製 $\alpha$ -アミラーゼとに混和し、等電点電気泳動を行った。しかし、結果はそのような可能性を否定した (Fig. IV-3)。この事実は、アルファルファやリョクトウの $\alpha$ -アミラーゼ分子自身の性質と、この電気泳動的特性の間の相関性を支持した。

さらに、リョクトウの $\alpha$ -アミラーゼをイモビラインゲルのどの位置にアプライして泳動しても活性染色バンドは出現しなかった (Fig. IV-4 lane 1, 2, 3)。

これまでの実験では、イモビラインゲルの泳動前の膨潤は蒸留水で行なっていた。それで、イモビラインゲルを少量の両性担体アンホライン (Pharmacia-LKB, pH range 3.5-9.5) 0.25%を含む蒸留水で膨潤させ泳動させた。この場合には、 $\alpha$ -アミラーゼは、少しだけ泳動しはじめ活性を保持していた (Fig. IV-4 lane 4, 5)。しかし、ゲルの膨潤を10%ソルビトールを含む蒸留水で行った場合は、活性バンドの出現は認められなかった。

これらの結果より、イモビラインゲル中でのアルファルファやリョクトウの $\alpha$ -アミラーゼのこの挙動は、これらの $\alpha$ -アミラーゼ分子自身に由来するものであると考えられた。

アルファルファ、リョクトウ、オオムギ、ブタ膵臓の $\alpha$ -アミラーゼをオリゴサッカライド ( $G_3$ 、 $G_4$ 、 $G_7$ ) に作用させたときの生成糖を Fig. IV-5, 6, 7 に示した。アルファルファとリョクトウとオオムギの $\alpha$ -アミラーゼは、マルトトリオースを切断しなかった。 $G_4$ に対しては、アルファルファ、オオムギ、リョクトウの $\alpha$ -アミラーゼとも切断しにくく、特に、リョクトウの $\alpha$ -アミラーゼがあまり切断しなかった。 $G_7$ に対しては、アルファルファ、リョクトウ、オオムギの $\alpha$ -アミラーゼともよく分解した。これらの結果からは、マメ科植物 (アルファルファとリョクトウ) の $\alpha$ -アミラーゼとオオムギ $\alpha$ -アミラーゼとの基質特異性の著しい差は認められなかった。

### (3) 考察

イモビラインゲルでは、活性が現れないというアルファルファの $\alpha$ -アミラーゼの性質が、他の起源のものに見られるかを確かめるため、広く微生物や植物の $\alpha$ -アミラーゼについて検討した結果、この性質はマメ科植物の $\alpha$ -アミラーゼ

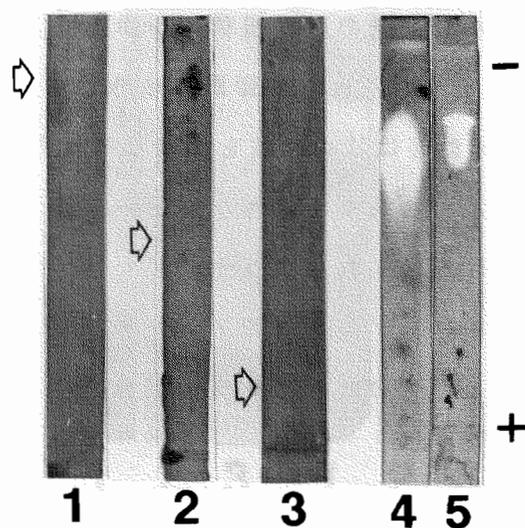


Fig. IV-4 Isoelectrofocusing on Immobiline Gels Swollen with Distilled Water Containing 0.25% Ampholine. The purified  $\alpha$ -amylase (0.5  $\mu$ g) from mung bean was applied on different positions on Immobiline gels swollen with distilled water (◊) (lane 1, 2, and 3). The purified  $\alpha$ -amylase (0.5  $\mu$ g) from mung bean and purified  $\alpha$ -amylase (0.5  $\mu$ g) from alfalfa were applied onto the Immobiline gels swollen with distilled water containing 0.25% ampholine (pH range 3.5-9.5) (lane 4, 5). All the gels were visualized by activity staining.

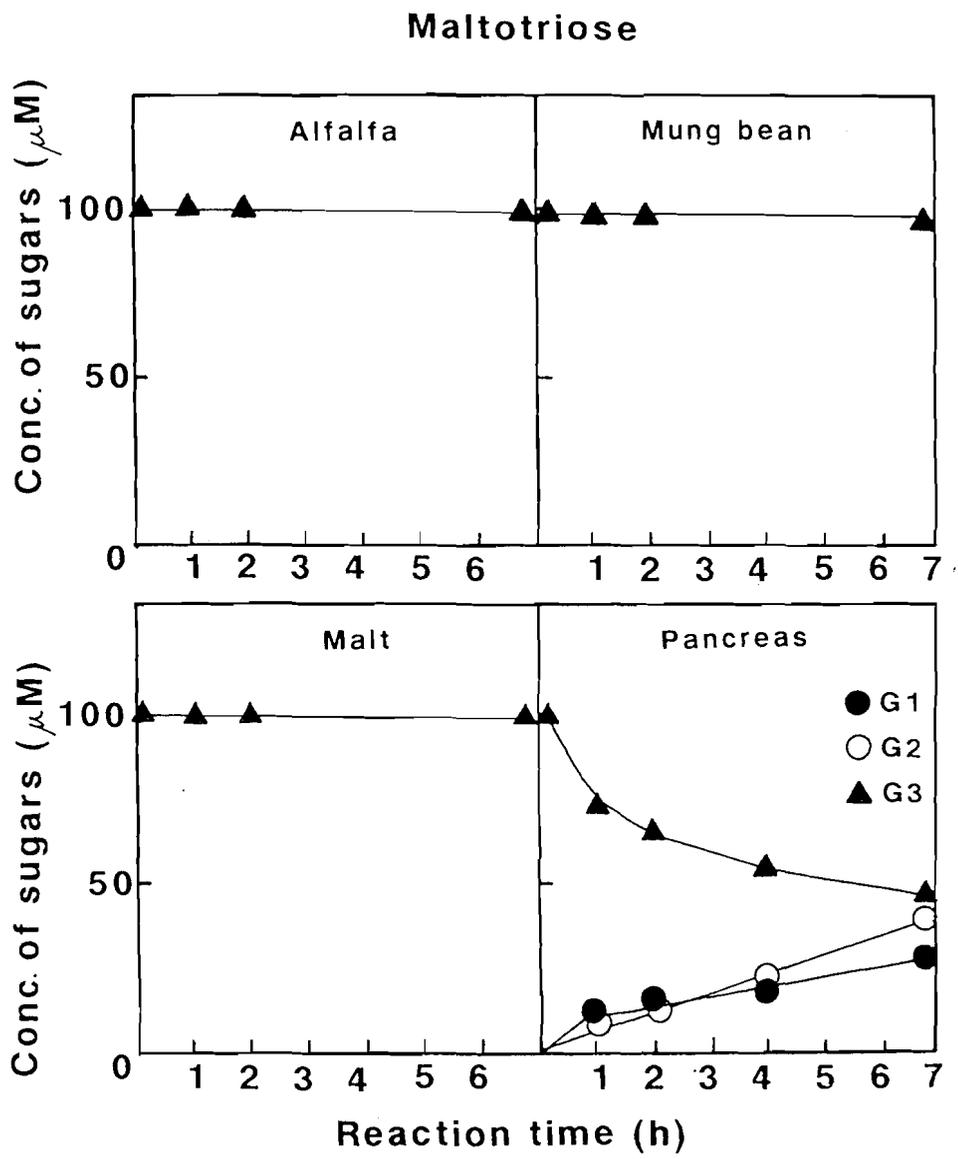


Fig. IV-5 Determination of Sugars Generated by the Action of Alfalfa, Mung bean, Malt and Pancreas  $\alpha$ -Amylases to Maltotriose.

### Maltotetraose

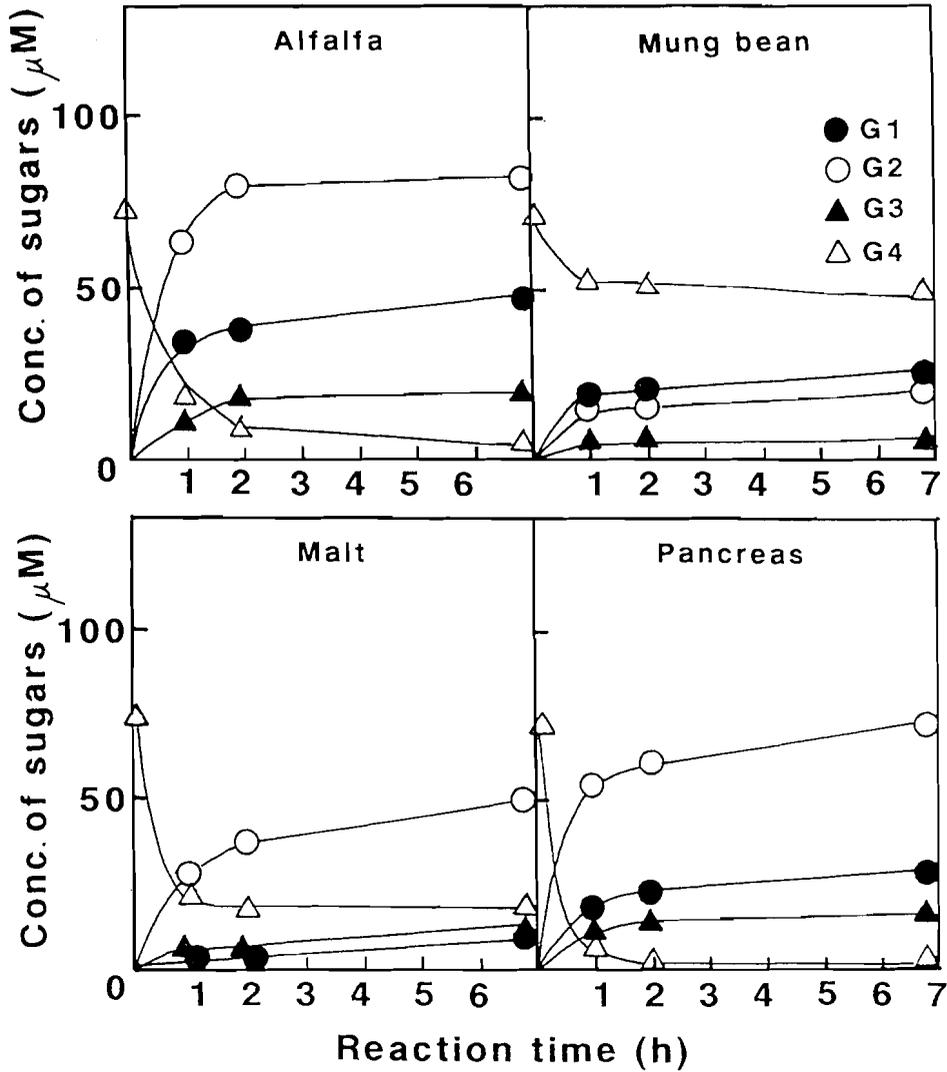


Fig. IV-6 Determination of Sugars Generated by the Action of Alfalfa, Mung bean, Malt and Pancreas  $\alpha$ -Amylases to Maltotetraose.

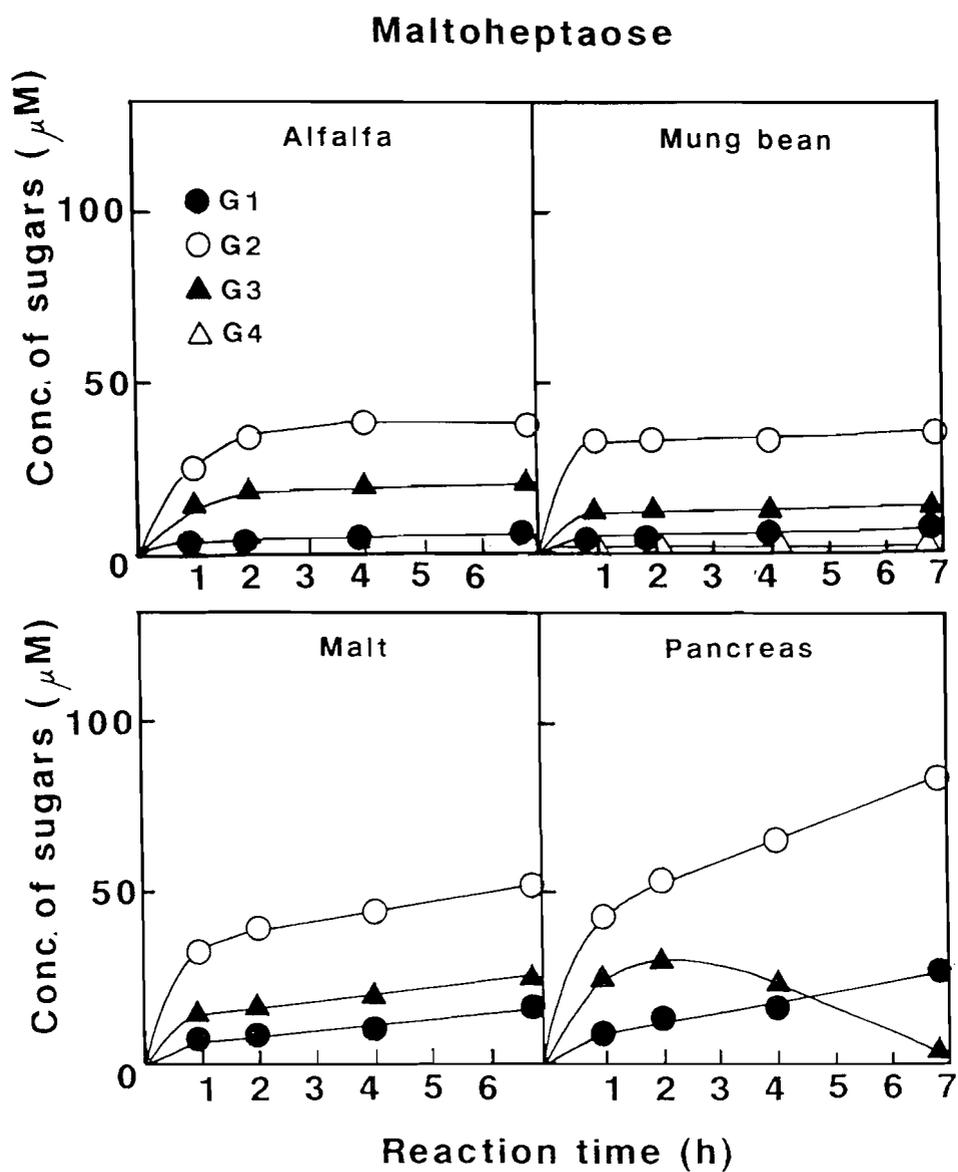


Fig. IV-7 Determination of Sugars Generated by the Action of Alfalfa, Mung bean, Malt and Pancreas  $\alpha$ -Amylases to Maltoheptaose.

にのみ認められることが判明した。これら $\alpha$ -アミラーゼはイモビラインゲル上で動かないだけでなく失活していた。アンホラインゲルは、いく種類かの両性担体、アンホラインを含有しており、通電すると、それぞれゲル中を移動し、pHグラジエントが生じる。タンパクはその等電点の位置へ移動する。

イモビラインは (  $\text{CH}_2=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\overset{\text{H}}{\text{N}}-\text{R}$  ) なる構成のアクリルアミド誘導体 (R: 両性基) で、アクリルアミドと共重合し、ゲル中に固定される。よって重合時濃度勾配を作成することにより、ゲル中にpHグラジエントが調製される。タンパク質はその等電点の位置へ移動する。マメ科植物の $\alpha$ -アミラーゼは、イモビラインと相互作用しその力が電氣的泳動力よりも強いため、アプライした位置に留まっているという考え方ができる。この状態で両性担体アンホラインが存在すれば、ちょうど溶出作用のように働いて、泳動しはじめる可能性が考えられる。

一方、一般に、植物由来の $\alpha$ -アミラーゼの等電点は、pI 6-7 ぐらいの所にあるが<sup>50)</sup>、マメ科植物 $\alpha$ -アミラーゼの場合はかなり酸性側にあるという傾向を著者らは示した。このような低いpIに由来する電氣泳動的性質とも考えられるが、例えば、ワサビの $\alpha$ -アミラーゼはpIが4.5 ぐらいであるにもかかわらず (Fig. 1-2)、イモビラインゲルを用いた等電点電氣泳動可能で、活性バンドも検出された (未発表)。この例は、等電点の低いということに、この電氣泳動的特性が由来するという考え方を支持しない。

これらの結果は、マメ科植物 $\alpha$ -アミラーゼのこの電氣泳動的特徴が $\alpha$ -アミラーゼ分子自身の構造的性質に由来するという考察を否定しない。マメ科植物の $\alpha$ -アミラーゼの反応生成糖が、他の起源の $\alpha$ -アミラーゼのそれと差異が認められなかったことは、この電氣泳動的性質が酵素の反応様式には直接関係していないことを示している。

GenBank Databaseのシークエンスデータバンクからオオムギとイネの塩基配列を検索し、アミノ酸配列に変換した。また、マメ科植物の $\alpha$ -アミラーゼは、ケツルアズキのみがその塩基配列について報告されている<sup>24)</sup>。そこで、これらのデータから疎水性分析をコンピューターソフト (Dnasis, Hitachi) で行った。各 $\alpha$ -アミラーゼの疎水性の平均指数は、ケツルアズキが-0.04、オオムギが-0.07、イネが-0.10であった。ケツルアズキの $\alpha$ -アミラーゼが、3

つのうちでは疎水度が低い値であった。Fig. IV-8にケツルアズキとオオムギとイネの疎水性指数を示した。

ケツルアズキの $\alpha$ -アミラーゼには、矢印で示す3カ所の親水性の配列があった。とりわけ、第IIIの部分はケツルアズキ、オオムギ、イネの $\alpha$ -アミラーゼ間で、疎水性の差が著しかった。この部分は、ケツルアズキの配列でいえば、

Met<sup>293</sup>からPro<sup>298</sup>であった。これらの配列部位は、ほとんどの生物の $\alpha$ -アミラーゼの保存領域で、酵素機能に関与すると考えられる配列部位中ではなかった<sup>53)</sup>。Fig. IV-9にこの部分のケツルアズキ、オオムギ、イネのアミノ酸配列を示す。オオムギではWWで、イネではWLと疎水性アミノ酸(W)が存在するのに反して、ケツルアズキでは、VKであり、より親水性の強いリジン残基(K)が存在していた。

このような特徴が、電気泳動的性質と関連があるかどうかは、今後検討を要するが、この親水基が他の泳動不能なマメ科の $\alpha$ -アミラーゼにも存在しているかどうか、興味のあるところである。

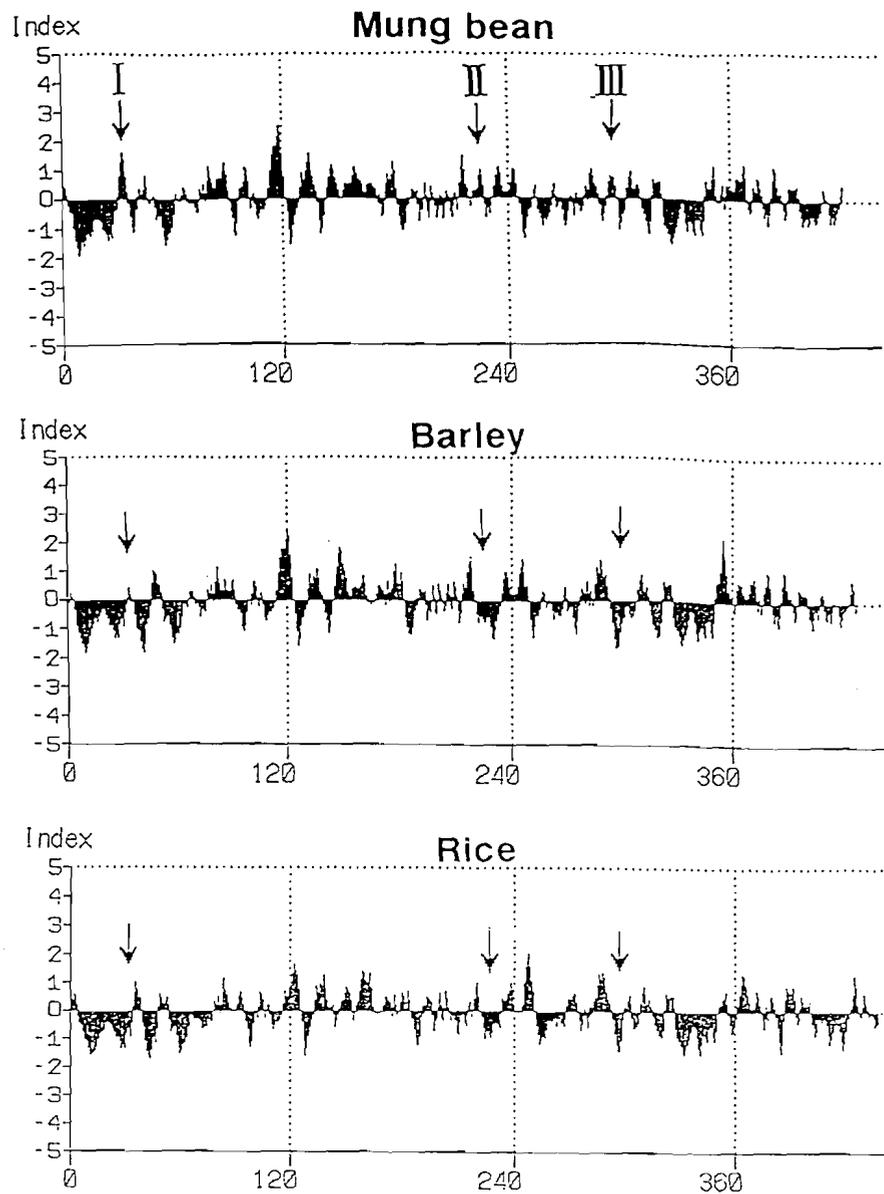


Fig. IV-8 Hydropathy Profiles of  $\alpha$ -Amylases from Mung Bean, Barley, and Rice. Each region in the amino acid sequence, which is expressed as an arrow (I, II, and III), is different in hydrophobicity among the sequences of three  $\alpha$ -amylases.

|           |     |    |     |
|-----------|-----|----|-----|
|           | 293 |    | 298 |
| Mung bean | MIG | VK | P   |
| Barley    | MIG | WW | P   |
| Rice      | MIG | W  | LP  |

Fig. IV-9 Amino Acid Sequence of a Hydrophilic Region for  $\alpha$ -Amylase from Mung Bean.

## 第 V 章. マメ科植物 $\alpha$ -アミラーゼ分子中の固有的な親水領域の存在とアミノ酸配列

第 IV 章では、イモビライジングで活性バンドがでないという現象がマメ科植物の  $\alpha$ -アミラーゼに局在していることを明らかにし、かかる電気泳動的性質とマメ科植物  $\alpha$ -アミラーゼの構造との関連性を考察した。本章では、既報のケツルアズキ  $\alpha$ -アミラーゼの塩基配列に基づき 2 種のプライマーを作成し、同じマメ科植物エンドウのクロモゾーマル DNA を鋳型とし、PCR 増幅断片を作成し、その塩基配列を決定した。得られたデータをオオムギ、コムギ、イネやケツルアズキの  $\alpha$ -アミラーゼの塩基配列と比較した。

### (1) 実験方法

#### ① エンドウ種子からの染色体 DNA の抽出法

1) エンドウ (発芽 5 日) の子葉 10 g を乳鉢にいれ、液体窒素中で凍結させながら乳棒で粉末状にした。2) 70°C に保温したビーカーに、2 × CTAB 液 5 ml を入れ、それにエンドウ発芽種子粉碎物を入れ混和した。55°C で 10 分インキュベート後、3) 5 ml クロロホルム / イソアミルアルコール (24 : 1 ; V / V) を加え、室温で 30 分間ゆっくり振とうした。4) 内容物を 50 ml ポリプロピレン遠心管 (NUNC) に移し、2800 rpm 15 分、室温で遠心分離した。5) 上層 (水層) を新しい 50 ml ポリプロピレン遠心管に移し、5 ml クロロホルム / イソアミルアルコール (24 : 1 ; V / V) を加え、10 分間室温でゆっくり振とうした。6) 2800 rpm、室温で 15 分遠心分離し、上層 (水層) を 15 ml 目盛り付きポリプロピレンチューブにいれた。7) 4) で得た下層に 5 ml の 1 × CTAB 液を加え、10 分室温でゆっくり振とうし 2800 rpm、15 分室温で遠心分離し、水層 (上層) を 4) の上層と混和した。8) 次に、この混液の 1 / 10 容の 10% CTAB 液 (約 1 ml) を加え、インバート混和し、遠心管 (50 ml 容) に移し、等容の沈澱用バッファーを加え、インバート混和し、30 分室温放置した。次に、9) 2800 rpm、15 分室温で遠心分離し上清を捨てた。10) 得られた沈澱に、5 ml の 1 M NaCl を含む TE バッファー (pH 8.0) を加え、55°C で溶解させた。11) 溶解後、5 ml のイソプロピルアルコールを加え、インバート混和し、

2800 rpm、4℃で、10分遠心分離し、上清を捨てた。12) 沈澱に5 mlの70%エタノールを加え、2800 rpm、4℃で10分遠心分離し、上清を捨て、乾燥後、3 mlのTEバッファーに55℃保温しながら溶解させた。13) 0.3 mlの10×RNase液を加え、55℃で30分インキュベートした。14) 分注し、-20℃保存。一部をアガロースゲル電気泳動法でチェックした。

## ②アガロースゲル電気泳動法

1) 100 mlフラスコに、30 mlの1×TAEをいれ、2) 0.3 gのアガロース (Dojin Agarose-1 電気泳動用) を加え、電子レンジで1-2分加熱して溶解した。3) 約50℃になるまで放置後、1.5 μlの10 mg/mlエチジウムブロマイド液を加え、ゲル作成台に注入した。4) 寒天が固まったら、コウムを抜き、泳動層にセットし、1×TAEバッファーをランニングバッファーとし、サンプル容に対して、1/6容の6×dye液を加えた試料をアプライし、50 Vで約1時間泳動した。5) 紫外線トランスイルミネーター (Spectroline, Model TC302) を用いて、DNAのバンドを確認した。

## ③プライマー作成法

発芽ケツルアヅキ (*Vigna mungo*) 子葉中のm-RNAから作成された、 $\alpha$ -アミラーゼのcDNAの塩基配列<sup>24)</sup>より翻訳したアミノ酸配列や、オオムギ、コムギ、イネの $\alpha$ -アミラーゼの2カ所に対する、相同部位のアミノ酸配列に基づくミックスプライマー1とミックスプライマー2を合成した。

相同部位1のアミノ酸配列 GIYCFEGに対応する塩基配列として、以下のミックスプライマー1 (23mer) を作成した。

5' -GG (TCAG) AT (TCA) TA (TC) TG (TC) AT  
(TCA) TT (TC) GA (AG) GG-3'

相同部位2のアミノ酸配列 FIDNHDTに対応する塩基配列に対して、コンプリメントな以下のミックスプライマー2 (21mer) を作成した。

5' - (CTGA) GT (GA) TC (GA) TG (GA) TT (GA)  
TC (TGA) AT (GA) AA-3'

ミックスプライマー合成は、Cyclone Plus DNAシンセサイザー (Miligen/Biosearch) を用いて行なった。カラムは、0.2 μmol用で、3'末端より合

成が開始されるので、プライマー1の場合はGカラム、プライマー2の場合はAカラムをそれぞれ使用した。

合成後、カラム内の残留アセトニトリルを捨て、28%アンモニア水でカラムからの切り出し後、55℃で10時間インキュベートし、脱保護を行った。オリゴヌクレオチドの精製は、オリゴパックカートリッジカラム (Milligen/Biosearch) を用いた。カラムをアセトニトリル5mlで2回洗浄し、1.0M酢酸トリエチルアミン溶液 (TEAB pH 7.4) 5mlで3回平衡化した。合成DNAアンモニア水溶液1mlに水1mlを加え、カラムに注入し、DMTオリゴヌクレオチドをカラムに吸着させた。カラムからでてきた液を再度カラムに通し、完全吸着させた。ついで、3%アンモニア水5mlで3回カラムを洗浄し、蒸留水5mlで3回カラムを洗浄した。続いて、2%トリフルオル酢酸 (TFA) 水溶液5mlをカラムに通し、DMT基を除去し、蒸留水5mlで2回洗浄後、40%アセトニトリル水溶液1mlを2回カラムに通し、合成オリゴヌクレオチドを溶出させ、遠心濃縮した。

A液 (0.1M TEAB, pH 7.0) で平衡化した  $\mu$ Bondasphere C18 300A (5 $\mu$ m 15cm) カラムを用いる HPLC (Hitachi 66 5A-12) 法で均一性を検討した。溶出はアセトニトリル濃度の5-40%のリニアグラジエント法で行った (流速 1.0 ml/min)。

#### ④ PCR (Polymerase chain reaction) 法による $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の増幅法

500  $\mu$ l エッペンドルフチューブに下記に示すように、バッファー、プライマー液、酵素液をいれた。

|                               |                        |
|-------------------------------|------------------------|
| 1. 滅菌水                        | 43.5 $\mu$ l           |
| 2. 10 $\times$ reaction bufer | 10 $\mu$ l             |
| 3. dNTPs Mix (1.25mM)         | 16 $\mu$ l             |
| 4. プライマー1                     | 5 $\mu$ l (5 $\mu$ g)  |
| 5. プライマー2                     | 5 $\mu$ l (5 $\mu$ g)  |
| 6. DNA                        | 20 $\mu$ l (4 $\mu$ g) |
| 7. AmpliTaq DNA Polymerase    | 0.5 $\mu$ l            |

混合後、ミネラルオイルを100  $\mu$ l 加え、最初のサイクルは、94℃ 5分でDNAを1本鎖にし、50℃、2分でプライマーをアニーリングさせ、72℃、

3分の伸長反応を行った。以下は、94℃、1分、50℃、2分、72℃、3分の条件で30サイクル Polymerase chain reaction をさせた。

終了後、オイルを除き、エーテル洗浄後、5  $\mu$  l をアガロースゲル電気泳動に供し増幅バンドを確認した。

#### ⑤ PCR増幅断片のサブクローニング法

1) PCR生成物は、アガロースゲル電気泳動（アガロースは、SeaKem GTG）に供し、バンドの部分をカッターで切りとり、マックスフィールド-NP核酸蛋白回収器（ATTO AE-6580）を用いて、エレクトロエリクションを行った。回収したDNAは、ブタノール抽出で、色素を除去するとともに濃縮し、エタノール沈澱で回収した。

2) プラント処理；エタノール沈澱後、アルコールを除去し、Blunting kit（宝酒造）の10×buffer 1  $\mu$  l と滅菌水8  $\mu$  l を加えて、70℃ 5分インキュベート後、37℃にもどし、T4 DNA polymerase 1  $\mu$  l を加え、37℃で5分反応させた。反応チューブを氷中におき、DNA dilution buffer（Blunting kit）を100  $\mu$  l 加え、フェノール抽出後、エタノール沈澱させた。

3) キナーゼ処理；沈澱を20  $\mu$  l のTEバッファーに溶かし、T4 PNK buffer 10  $\mu$  l、滅菌水68  $\mu$  l、100 mM ATP 1  $\mu$  l、T4 polynucleotide kinase(10unit/ $\mu$ l) 2  $\mu$  l を加え、37℃で2時間反応後、フェノール抽出し、エタノール沈澱した。これをDNA dilution buffer（Blunting kit）20  $\mu$  l に溶かし、ライゲーション試料として用いた。

4) ベクターの調製；プラスミドPUC19を有する *E. coli*。HB101をLB培地（終濃度50  $\mu$  g/mlのアンピシリン添加）5 mlに植菌後、37℃で一晩振とう培養（前培養）した。この培養液3 mlを300 mlのLB培地（終濃度50  $\mu$  g/mlのアンピシリン添加）に加え、37℃で一夜振とう培養（本培養）した。培養液を0℃、8000 rpmで10分遠心分離して、集菌し、菌体を5 mlの50 mM トリス-塩酸バッファー（pH 7.5）に懸濁させ、シリコナイズしたガラス製遠心管（corex tube）に移した。10 mg/ml濃度のRNase液 50  $\mu$  l を加えて、混和し、ついで1.7 mlのリゾチーム液（10 mg/ $\mu$ l）を加え、穏やかに混和した。0℃、10分インキュベートし、2 mlの0.5 N EDTAを加え、0℃に10分放置し、2.1

mlの0.4% Triton-X100を加え、0℃で60分間放置した。次に、0℃、  
 8000 rpmで70分間遠心分離した。上清をポリ製フタ付き遠心管  
 (NUNC)に移し、0.25 mlの5M NaClを加えた。TNE飽和フェ  
 ノールで抽出し、ついでTNE飽和フェノール：クロロホルム(1:1)で抽出  
 した。水層をジエチルエーテルで2回洗浄し、エーテルをとばした後、シリコナ  
 イズし、滅菌した遠心管(corex-tube)に移し、2 mlの5M NaCl、  
 4 mlの30%ポリエチレングリコール6000を加え、0℃で一夜放置しDNA  
 Aを沈澱させた。0℃、10000 rpmで20分遠心して、DNAの沈澱を得  
 た。沈澱を1.5 mlのTEバッファーに懸濁し、1.6 gの塩化セシウムと1  
 00 μlのエチジウムブロマイド液(10 mg/μl)を加え、超遠心用チュー  
 ープに移し、20℃で、55000 rpm、16時間超遠心した。超遠心後、チュー  
 ープにUVを当て、ベクターDNAのバンドを注射針で吸い取り、エッペンドル  
 フチューブに移し、n-ブタノールで4回抽出し、エチジウムブロマイドを除去  
 後、ジエチルエーテルで洗浄後3倍量の80%エタノールを加え、-20℃で一  
 夜放置した。12000 rpm、10分遠心し、沈澱を200 μlのTEバッ  
 ファーに溶かし、フェノール抽出、エーテル洗浄後、エタノール沈澱し、沈澱を  
 400 μlのTEバッファーに溶かし、40 μlずつ分注し、-20℃で保存し  
 た(0.8 μg/μl濃度のPUCを得た)。

続いて、PUC19のSmaI切断は、

|                               |       |                |
|-------------------------------|-------|----------------|
| PUC19                         | 10 μg | (89 μlに滅菌水で調製) |
| 10×Tバッファー (宝酒造)               |       | 10 μl          |
| 1% BSA (Bovine Serum Albumin) |       | 1 μl           |
| SmaI                          |       | 1 μl           |

の反応液を調製し、30℃、1晩反応させた。反応液をアガロース電気泳動に供  
 し、直鎖状のPUC19バンドを切り出し、エレクトロエレーションで回収した。  
 回収したDNAは、ブタノール抽出、エーテル洗浄、エタノール沈澱を行った。  
 沈澱を100 μl TEバッファーに溶かし、10×CIPバッファー 30 μl、  
 滅菌水 170 μl、CIP (Calf Intestine Phosphatase) 1.5 μlを加え、  
 37℃、30分反応させ、56℃に15分間インキュベート後、10×TNEバ  
 ッファー 35 μl、20% SDS 8.75 μl、滅菌水 6.25 μlを加

えて、全量を350  $\mu$ lとし、68℃、1時間インキュベートした。フェノール抽出、エーテル洗浄、エタノール沈澱させたものを100  $\mu$ l TEバッファーに溶解し、ライゲーション用のベクターを作成した。

#### 5) コンピテントセルの調製

*E. coli* JM109菌のグリセロールストック50  $\mu$ lを5mlのLB培地に加え、37℃で一晩振とう培養（前培養）した。培養液3mlを300mlのLB培地に加え、37℃で振とう培養（本培養）し、O. D. 650値が0.6前後になるまで培養した（2-3時間）。培養液をポリエチレン製遠心管（NUNC）に分注し、0℃で30分インキュベートし、3000rpmで10分遠心後、1本のチューブにつき50mM塩化カルシウム（0℃に保存したもの）25mlを加え、穏やかに菌体を懸濁させた。0℃に1時間放置後、4℃で、2500rpm、5分間遠心し、5mlの50mM塩化カルシウム-20%グリセロール（0℃に保存したもの）を加え、菌体を穏やかに懸濁させた。エッペンドルフチューブに500  $\mu$ lずつ分注し、-80℃で保存した。

#### 6) ライゲーションおよびトランスフォーメーション

ベクターとして作成処理したPUC19（SmaIカット、CIP処理）3  $\mu$ l（300ng）に、インサートDNA（エンドウPCR断片、プラント化およびキナーゼ処理）4  $\mu$ l（0.6  $\mu$ g）を加え、さらに、Blunting kit（宝酒造）のLigation solution A 9  $\mu$ l、Ligation solution B 4  $\mu$ lを加え、16℃ 30分間ライゲート反応を行った。この反応液（20  $\mu$ l）に10×TCMバッファー 20  $\mu$ l、滅菌水 10  $\mu$ l、コンピテントセル150  $\mu$ lを加え、0℃で20分インキュベート後、42℃で90秒ヒートショックし、トランスフォーメーションさせた。室温に10分放置し、LB培地1mlを加え、37℃で60分間インキュベートしたのち、0.3mlを、LB平板培地（1.5%寒天、+アンピシリン 50  $\mu$ g/ml、+Xgal（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -Dガラクトシド）40mg/l、+IPTG（イソプロピル- $\beta$ -D-チオ-ガラクトピラノシド）48mg/l）にスプレッドし、37℃で一晩培養した。

#### 7) クローンの選別法

ホワイトコロニーの組みかえ体と考えられるものを、滅菌した爪楊枝でLB培

地 (+アンピシリン) の入った96穴プレート (NUNC) につり上げ、37℃で一夜培養し、20%のグリセロールストックを調製した。

3 mlのLB培地に上記グリセロールストックを1白金耳植菌し、37℃で一夜培養し、菌体からプラスミドを、前述した抽出法のミニスケールレベルで調製した。1.5 mlのエッペンドルフチューブに培養液を入れ、12000 rpm、1分間遠心し、菌体を集めた。500  $\mu$  lのSTETバッファーに穏やかに懸濁し、40  $\mu$  lのリゾチーム (10 mg/ml) を加え、100℃で60秒インキュベートした。14000 rpmで20分遠心後、生じた沈澱を爪楊枝で除いた。50  $\mu$  lの3M酢酸ソーダ (pH6.0) と600  $\mu$  lのイソプロパノールを加え、-80℃に15分放置し、12000 rpm、10分間遠心後、沈澱を得た。上清を完全に除き、200  $\mu$  lのRNase (50  $\mu$  g/ml) 溶液を加え、懸濁させた。フェノール抽出、エーテル洗浄後、エタノール沈澱させ、得た沈澱を100  $\mu$  l TEバッファーに溶解させた。

得られたプラスミドDNAをアガロースゲル電気泳動に供して、大きさを推定した。約560ベースのPCR断片が組み込まれているプラスミドを選び、それを鋳型として、再びPCR増幅するかどうかを調べた。増幅したプラスミドは、 $\alpha$ -アミラーゼの遺伝子を組み込んだプラスミドであると推定し、この組みかえ体についてシーケンシングを行うことにした。

#### ⑥ エンドウ $\alpha$ -アミラーゼ 遺伝子の部分塩基配列の決定法

1) PUC増幅断片が挿入されたPUC19を有するクローン菌を、LB培地 (+アンピシリン) で500 ml培養した。アルカリリシス法でプラスミドDNAを調製した。アルカリリシス法は、培養液を遠心 (8000 rpm、10分) し、得た菌体を20 mlのSol. Iに懸濁し、ガラス製遠心管 (シリコナイズ、50 ml容) 2本に分注し、2) これにリゾチーム液 (10 mg/ml、10 mMトリス塩酸バッファーに溶解) 1 mlとSol. II 10 mlをそれぞれのチューブに加え、静かに混合した。室温に10-20分間放置した後、氷冷したSol. III 7.5 mlをそれぞれに加え、混合し、氷上で、10分放置して、白沈を生じさせた。遠心 (4000 rpm、15分) して得た上清を、新しい遠心管 (シリコナイズ、50 ml容) に移し、0.6容のイソプロパノールを加え、よく混合した。氷上10分放置後、遠心 (10000 rpm、10分) して得た

沈澱を80%エタノールで洗浄後、真空乾燥させ、TEバッファー10mlに溶解させ、RNase溶液(10mg/ml)50 $\mu$ lを加え、37 $^{\circ}$ C、30分間インキュベートした。TNE飽和フェノール抽出、TNE飽和フェノール/クロロホルム/イソアミル(25:24:1)抽出、クロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)抽出、エーテル洗浄後、2本のガラス遠心管(シリコナイズ、50ml容)に分注し、5M NaCl液を2ml、30%(w/v)PEG 6000液4mlを加え、0 $^{\circ}$ Cで一夜放置した。遠心(10000rpm、20分)後、沈澱を1.5mlのTEバッファーに溶解させた。

2) 超遠心分離による精製; 得られたプラスミッドDNAを超遠心分離により精製した。プラスミッドのTE溶液1.5ml、塩化セシウム1.6g、エチジウムブロマイド(10mg/ml)100 $\mu$ lを、4.5ml用の超遠心(Beckman)チューブ1本に入れ、60000rpm、24時間超遠心した。遠心後、テルモ注射針(22G $\times$ 1)で、プラスミッドバンドを吸い取ってエッペンドルフチューブに集めた。

得られた液を、ブタノール抽出し、エタノール沈澱後、TEバッファー200 $\mu$ lに溶解させ、フェノール抽出、エーテル洗浄、エタノール沈澱後、TEバッファー200 $\mu$ lに溶かして濃度測定し、50 $\mu$ lずつ分注して凍結保存した(1.05 $\mu$ g/ $\mu$ l)。

3) シークエンスの決定; プラスミッドDNA4 $\mu$ l(4 $\mu$ g)に、denature solution(2N NaOH 2mMEDTA)2 $\mu$ l、滅菌水14 $\mu$ lを加え37 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートしDNAを変性させ、nutrization solution(5M酢酸アンモニウム)8 $\mu$ lと100%エタノール100 $\mu$ lを加え、-70 $^{\circ}$ Cで5分間放置した。得られた沈澱を滅菌水9.5 $\mu$ lで溶かし、10 $\times$ 濃縮 buffer(TAKARA 7DEAZA シークエンスキット)1.5 $\mu$ l、M13 primer(又は合成プライマー)1 $\mu$ lを加えて全量を12 $\mu$ lとし、60 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベートし、プライマーをアニーリングさせた。クレノウ酵素(large fragment)1 $\mu$ lと<sup>32</sup>P-CTP(deoxycytidine 5'-(alpha-p32)triphosphate)2 $\mu$ lを加えて攪はんし、ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP反應用の4本のチューブに3.5 $\mu$ lずつ分注し、37 $^{\circ}$ Cで20分間反応させた。チェイス溶液1 $\mu$ lを加え、さらに20分間反応させた。stop solution を6 $\mu$ l加え、

95℃で3分間、一本鎖変性させ、氷冷したのち、3.5μlずつ電気泳動用のゲルにアプライした。

ゲルは8%アクリルアミドゲルで、予備泳動は1000V、12mAで、本泳動は2200V、25mAで行った。ランニングバッファーはTBEバッファーを用いた。

泳動後、ゲルをWhatman3MMろ紙に移しかえ、75℃で70分間真空乾燥させ、オートラジオグラフィーを行った。

#### 試薬リスト

2×CTAB: 2% Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB),  
0.1M Tris-HCl pH 8.0, 1.4M NaCl,  
1% Polyvinylpyrrolidone (PVP)

10%CTAB液: 10% CTAB, 0.7M NaCl

沈澱用バッファー: 1% CTAB, 5mM Tris-HCl pH 8.0,  
10mM EDTA

TBEバッファー: 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA

10×RNase液: 10μg/ml RNase A

TAEバッファー: 40mM Tris-acetate pH 8.0, 1mM EDTA

6×dye: 0.25% Bromophenol Blue (BPB), 0.25% Xylene  
Cyanol (XC), 30% glycerol

LB培地: 1% Bacto trypton, 0.5% Bacto yeast extract, 1% NaCl

TNEバッファー: 50mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl,  
0.5mM EDTA

10×Tバッファー: 330mM Tris-acetate pH 7.9,  
100mM Mg-acetate, 5mM Dithiothreitol,  
660mM K-acetate

CIPバッファー: 50mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM MgCl<sub>2</sub>,  
0.1mM ZnCl<sub>2</sub>, 1mM Spermidine

TCMバッファー: 10mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM CaCl<sub>2</sub>,  
10mM MgCl<sub>2</sub>

S T E T : 8 % Sucrose, 0. 5 % Triton X 1 0 0, 5 0 m M E D T A,

5 0 m M Tris-HCl p H 8. 0,

S o l. I : 5 0 m M Glucose, 2 5 m M Tris-HCl p H 8. 0,

1 0 m M E D T A

S o l. II : 0. 2 M N a O H, 1 % S D S

S o l. III : 5 M K - acetate, 1 l. 5 % (v/v) Glacial acetic acid

Stop solution: 9 5 % Formamido, 0. 1 % X C, 0. 1 % B P B

T B E バ ッ フ ェ ー : 8 9 m M Tris, 8 9 m M Boric acid, 2 m M E D T A

## (2) 実験結果

Figure V - 1 (lane 2,5) にそれぞれリョクトウ及びエンドウ発芽種子より抽出した染色体DNAの電気泳動写真を示す。これは、次の実験に使用しうるものであることを示している。そこでこれらのDNAを鋳型にして、合成プライマーをアニーリングさせ、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法により、560bのリョクトウ及びエンドウの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を増幅させた結果、約559bの増幅断片を得た (Fig. V - 1, lane 3, 6)。リョクトウのプライマー1とプライマー2間は、561b離れているので、この増幅断片は、 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の一部と考えられた。次に、エンドウの増幅遺伝子を、エレクトロエレーション後、平滑末端化し、リン酸化後、PUC19のSmaI断片に連結させ、大腸菌に形質転換させ、15個の組み換え体を得た。そのうち、3株に約560bの挿入断片がベクターに連結されていることが判明したので (Fig. V - 2, lane 3, 4, 5)、それぞれのプラスミドDNAを鋳型に合成プライマーをアニーリングさせ、PCR法で増幅し、電気泳動でチェックした結果、1株のプラスミドのみに約560bの断片が増幅された (Fig. V - 2, lane 7)。そこで、この株の挿入部分の塩基配列をM13フォワードならびにリバースプライマーを用いて、ジデオキシ法にて塩基配列の決定を試み、さらに決定された塩基配列を参考にして、合成プライマーを作成し、シーケンス用のプライマーとして、この挿入部分の全塩基配列を決定した (Fig. V - 3)。リョクトウ、オオムギ、イネなどの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の対応する部分の塩基配列と比較検討した結果、筆者らが決定した塩基配列は、エンドウの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の一部であることを示している。塩基配列を翻訳し比較検討した結果、マメ科植物エンドウ、ケツル

アズキの $\alpha$ -アミラーゼ分子中の固有的な親水領域の存在を見いだした (Fig. V-4)。その部位のアミノ酸配列は、イネではM I G W L PでオオムギではM I G W W Pと疎水性アミノ酸であるトリプトファン (W) 残基が存在していたが、ケツルアズキではM I G V K P、エンドウではL L G I K Pとそれぞれ、親水性アミノ酸であるリジン残基に置換していることが判明した。なお、決定されたエンドウの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の部分塩基配列と相同性のある配列をGenBankデータベースから検索した結果、ケツルアズキの対応部分とは77.5%のホモロジーを有し、イネ、オオムギなどの $\alpha$ -アミラーゼの対応部分とは58-59%のホモロジーを有することが判明した。

### (3) 考察

筆者らは、マメ科植物の $\alpha$ -アミラーゼの電気泳動的特性を発見し、その原因に対して考察を加え、本酵素の構造的特徴を検討する必要があることを認識した。そこでまずその一次構造を他科に属する植物の酵素の構造と比較検討した。そして実験結果の項目で示したように、マメ科植物であるリュクトウおよびエンドウの $\alpha$ -アミラーゼ分子中に固有的な親水性の高い領域があり、逆に、他科の植物の $\alpha$ -アミラーゼ分子の相当部位は、疎水性が高いことを明らかにした。このような構造的特徴と電気泳動的特徴に関連性があるか否かについては、今後検討すべきであるが、少なくとも他科の酵素と異なるマメ科植物のケツルアズキ及びエンドウの $\alpha$ -アミラーゼ分子の一特徴といえる。なおこの部位は、起源の別なく、構造に関して報告されている $\alpha$ -アミラーゼ分子それぞれにホモロジーのある領域とはいえなかった<sup>24)</sup>。この点に関して、この電気泳動的性質が、 $\alpha$ -アミラーゼの活性発現に影響しないという第IV章の考察と矛盾しない。ただし本親水性領域は、 $\alpha$ -アミラーゼ分子の第三番目の保存領域から数えて、約13アミノ酸残基N-末端側に存在しており、比較的この保存領域に隣接していると考えられる。この特徴は、マメ科植物の $\alpha$ -アミラーゼ分子の分子進化を考える上で意義がある。なお、エンドウの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子が、イネやオオムギなどの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子(58-59%)より、同じマメ科植物のケツルアズキの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子と相同性が高いのは(77.5%)、植物系統進化とそれぞれの $\alpha$ -アミラーゼの分子進化の相関性を示唆している。

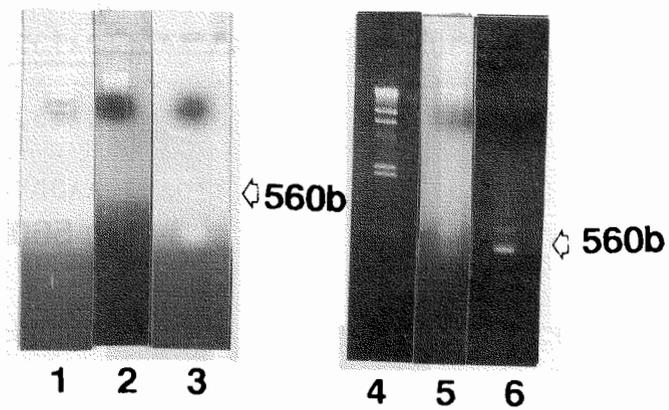
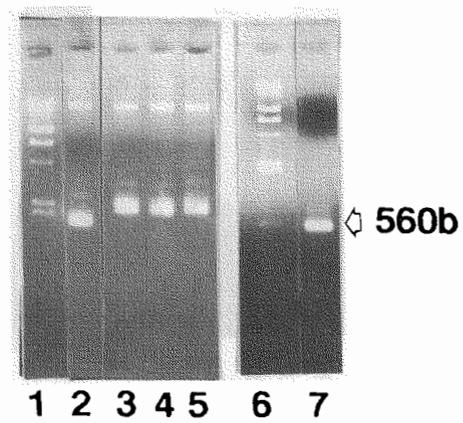


Fig. V-1 PCR Amplification of  $\alpha$ -Amylase Genes of Leguminous Plants.  
 lane 1:  $\lambda$ -HindIII  
 lane 2: chromosomal DNA from mung bean  
 lane 3: PCR amplified fragment for mung bean DNA  
 lane 4:  $\lambda$ -Hind III marker  
 lane 5: chromosomal DNA from pea  
 lane 6: PCR amplified fragment for pea DNA



**Fig. V-2 Identification of  $\alpha$ -Amylase Gene Inserted into Plasmid Vector (PUC 19) by PCR.**  
lane 1:  $\lambda$ -Hind III marker, lane 2: PUC19 vector  
lane 3, 4, 5: PUC 19 vector carrying foreign genes  
lane 6:  $\lambda$ -Hind III marker, lane 7: PCR amplified fragment

**I**

*Pisum* 5' - GGTATTTATTGTATTTTGGAGGGTGGAACTCCAGATTCAAAGCTTGATTGGGGTCCATCT  
 .....

*Vigna* 5' - GGAATATATTGTATCTTTGAAGGTGGTACTCCAGATTCACGCCAAGATTGGGGTCCATCT  
 TTCATTTGCAAAGGGGACACCACTTATTCCGATGGCAAAGGAAACGATGATACAGGAGAG<sup>1</sup>  
 .....

TTCATTTGCAGAGATGACACTGCATATTCTGATGGCACTGGAAACAATGACAGTGGAGAG  
 GATTATCAAGCTGCACCTGACATTGATCATCTCAATCCACAAGTACAAAGAGAGTTATCT  
 .....

GGATATGATGCTGCACCTGACATTGATCATCTCAATCCACAGGTGCAAAGAGAGTTGTCA  
 GAATGGATGAACAGGCTCAAAAACCGAAATTGGATTTCCGGTTGGAGGTTTCGATTTGAC  
 .....

GAATGGATGAACTGGCTCAAAAACCTGAGATTGGTTTTGATGATTGGAGGTTTGATTTTGTG  
**2**  
AAAGGTTATGCTCCTAGTATAACCAAAATTTACGTGGAACAACTAAACCAGATTTTGCA  
 .....

AAGGGCTATGCCCTAGCATCTCCAAGATCTATATGGAACAGACTAAGCCAGATTTTGCA  
 GTTGGAGAGTTATGGAACCTCACTTTCTAACGGTAATGACGGGAAGATTAACATAATCAA  
 .....

GTAGGTGAGAAAGTTGATTCTATCTCATATGGGCAGGATGGGAAGCCAAACTATAACCAA  
 GATGCGGCTAGAGGTGAACTTGTCAACTGGGTTGACGTAGTCGGTGGCGGGATTGTTAAC  
 .....

GATAGTCATCGTGGGGCACTGGTGAATTGGGTTGAATCTGCAGGTGGAGCTATT ACT  
 GCATTTGATTTTACCACCAAAGGGATTCTTCAAGCTGCTGTACAAGGTGAACTATGGAGG  
 .....

GCATTTGATTTTACAAACAAAAGGAATTCTTCAGGCTGCTGTGCAAGGAGAATTGTGGAGG  
 TTGAAAGATTGCAACGGAAAACCACTGGATTGATCGGTATAAAACCCGAAAATGGTGTA  
 .....

TTGATAGATCCAAATGGCAAGCCTCCTGGAAATGATTGGTGTGAAACCCAGAAAATGCAGTA  
**Hydro**  
**K**

**II**

ACGTTTCATTGACAACCACGACACT-3'  
 .....

ACTTTCATTGATAACCATGACACT-3'

**Fig. V-3 Partial Nucleotide Sequence of  $\alpha$ -Amylase Genes of *Pisum sativa* and *Vigna mungo*.  
 I; primer 1 for PCR, II; primer 2 for PCR,  
 1; primer for sequencing, 2; primer for sequencing,  
 Hydro; Hydrophilic region, K; Lysine**

```

Pisum  GIYCIFEGGTPDSKLDWGPSFICKGDTTYS DGKGNDDDGEDYQAAPDIDHLNPQVQREL
.....
Vigna  124GIYCIFEGGTPDSRQDWGPSFICRDDTAYS DGTGNNDSGEGYDAAPDIDHLNPQVQREL
.....
SEWMNWLKTEIGFSGWRFDFVKGYAPSITKIYMEQTKPDFAVGELWNSLSNGNDGKINY
.....
SEWMNWLKTEIGFDGWRFDFVKGYAPSISKIYMEQTKPDFAVGEKWDSISWGQDGKPNY
.....
NQDAARGELVNWVDVVGGGIVNAFDFTTKGILQAAVQGELWRLKDSNGKPPGLIGIKPE
.....
NQDSHRGALVNWVESAGGAI TAFDFTTKGILQAAVQGELWRLIDPNGKPPGMIGWKPE
.....
NGVTFIDNHDT
.....
NAVTFIDNHDT310

```

A

Hydro

B

K

Fig. V-4 Partial Amino Acid Sequence of  $\alpha$ -Amylase from *Pisum sativa* and *Vigna mungo*.  
A; Homologus region II in  $\alpha$ -amylase  
B; Homologus region III in  $\alpha$ -amylase  
Hydro; Hydrophilic region, K; Lysine

## 要約

- 1) 植物由来のアミラーゼ活性測定法の検討を行った結果、 $\beta$ -アミラーゼは基質に、p-nitrophenyl- $\alpha$ -maltopentaosideおよびhexaosideを用いるPantrac法、 $\alpha$ -アミラーゼは基質に不溶性色素デンプンを用いるPhadebas法が簡便な方法であることが判明した。特に、Phadebas法は $\alpha$ -アミラーゼ活性の検出に高い特異性を示した。
- 2) 本測定法を用いて、各種植物発芽種子中のアミラーゼ活性変動を測定した。活性変動の様式は、従来から定説とされているもの（発芽過程で $\alpha$ -アミラーゼ活性が増大し、 $\beta$ -アミラーゼ活性は乾燥種子中に含まれる）とは一致しない例が見いだされた。
- 3) アンホラインゲルを用いる等電点電気泳動後に、ゲル中の $\alpha$ -アミラーゼを $\beta$ -リミットデキストリンと反応させ、ヨウ素ヨウ化カリウムで活性染色することにより、粗酵素液中の $\alpha$ -アミラーゼが検出された。イモビラインゲルを用いる等電点電気泳動後に、ゲル中の $\beta$ -アミラーゼを可溶性デンプンと反応させ活性染色することにより、粗酵素液中の等電点の近接した $\beta$ -アミラーゼアイソホームが分離された。
- 4) 活性測定および電気泳動像より、マメ科植物アルファルファの乾燥種子中に既に $\alpha$ -アミラーゼが含まれ、発芽につれて量が減少してゆくのに反して、 $\beta$ -アミラーゼ量は、発芽過程で倍加されるという特殊例が示された。
- 5) アルファルファ種子中の $\alpha$ -、及び $\beta$ -アミラーゼの5個のアイソホームを生化学的方法でそれぞれ均一状態に精製し、これらの酵素の同定を行い、その結果、アルファルファ発芽種子で得られた4)の結果が証明された。
- 6) これらの方法（活性測定法と電気泳動法）を用いて、クローバー、ダイズ、アズキの発芽過程における $\alpha$ -、及び $\beta$ -アミラーゼ活性の変動を検討した結果、アルファルファと同じ連“Trifolieae”に属するクローバー発芽種子は、アルファルファ発芽種子と同様のアミラーゼ変動様式（ $\alpha$ -アミラーゼの減少と $\beta$ -アミラーゼの増大）を示した。ダイズは、乾燥種子中に大量に存在する $\beta$ -アミラーゼが減少し、 $\alpha$ -アミラーゼ活性が増加した。一方、アズキ種子は発芽過程で、 $\alpha$ -アミラーゼ活性は急増するが、 $\beta$ -アミラーゼ活性は変化しないことが示唆された。

7) アルファルファ、クローバー、ダイズ、アズキ、リョクトウ、エンドウなどマメ科植物の $\alpha$ -アミラーゼ分子は、イモビラインゲルで等電点電気泳動を行った場合、ゲル中を正常に泳動せず、かつ失活し、活性染色不能という共通性を示した。この電気泳動的特性は、マメ科植物以外の $\alpha$ -アミラーゼには認められず、この特性を利用してマメ科植物の $\alpha$ -アミラーゼ、及び $\beta$ -アミラーゼの各個同定が容易になった。

8) この特性は、リョクトウ、アルファルファの精製 $\alpha$ -アミラーゼでも認められ、マメ科の $\alpha$ -アミラーゼ分子の生化学的特性に起因する可能性を認めた。そこで、エンドウの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子のPCR増幅断片を調製し、大腸菌クローンを得、その塩基配列を決定し、同じマメ科植物のケツルアズキの $\alpha$ -アミラーゼやイネ、オオムギ、コムギなどの $\alpha$ -アミラーゼのアミノ酸配列と比較検討した。その結果、マメ科植物エンドウ、ケツルアズキの $\alpha$ -アミラーゼ分子中の固有的な親水領域の存在を見い出した。その部位の配列はイネではM I G W L Pで、オオムギではM I G W W Pと疎水性アミノ酸であるトリプトファン(W)残基が存在していたが、ケツルアズキでは、M I G V K P、エンドウではL I G I K Pとそれぞれ、親水性アミノ酸であるリジン残基に置換していた。なお、決定されたエンドウの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の部分塩基配列と相同性のある配列をGenBankデータベースから検索した結果、ケツルアズキの対応部分とは77.5%のホモロジーを有し、イネ、オオムギなどの $\alpha$ -アミラーゼの対応部分とは58-59%のホモロジーを有することが判明した。

## 謝 辞

本研究の遂行、ならびに本論文をまとめるにあたり、終始適切なる御指導を賜りました、神戸大学農学部、南森 隆司博士の緻密な観察力と非凡なる洞察力に敬意を表し感謝致します。

本学位論文を審査していただきました、神戸大学農学部、新家 龍博士、山口 禎博士、王寺 善清博士に感謝致します。

神戸大学自然科学研究科及び発酵生産学教室の皆様には、御助言していただきましたことを感謝致します。

本研究の遂行にあたり、設備の利用等並びに有意義な御助言を賜りました、大阪府立大学農学部、中野長久博士、新田康則博士、京都大学食糧研究所、三上文三博士、及び神戸大学理学部、松田吉弘博士、小管桂子博士に感謝致します。

長年にわたり、御助言並びに激励し続けてくださいました私の上司、香月文子教授に感謝致します。

在職しながら研究の機会を与えてくださいました大手前女子学園理事長 福井秀加教授に感謝致します。

文 献

- 1) Bernfeld, P. (1951) *Adv. Enzymol.* 12, 385 - 386
- 2) Sopanen, T. and Lauriere, C. (1989) *Plant Physiol.* 89, 244 - 249
- 3) Mathewson, P.R. and Seabourn, B.W. (1983) *J. Agric. Food Chem.* 31, 1322 - 1326
- 4) Ranki, H. and Sopanen, T. (1984) *Plant Physiol.* 75, 710 - 715
- 5) Bienvenido, O.J. and Varner, J.E. (1969) *Plant Physiol.* 44, 886 - 892
- 6) MacGregor, A.W. and Matsuo, R.R. (1982) *Cereal Chem.* 59, 210 - 216
- 7) Miyata, S. and Akazawa, T. (1982) *Plant Physiol.* 70, 147 - 153
- 8) Tarrago, J.K. and Nicolas, G. (1976) *Plant Physiol.* 58, 618 - 621
- 9) Okamoto, K. and Akazawa, T. (1979) *Plant Physiol.* 63, 336 - 340
- 10) Kotha, S. and Rameshwar, S. (1989) *Plant Physiol.* 89, 860 - 866
- 11) Pollock, J.R.A. and Pool, A.A. (1958) *J. Inst. Brew.* 64, 151 - 156
- 12) Rowsell, E.V. and Goad, L.J. (1962) *Biochem. J.* 84, 73 - 73
- 13) Numi, M., Vihunen, R. and Enari, T.M. (1964) *Proc. Eur. Brew. Conv. Stockholm* 51 - 61
- 14) Mugibayashi, N. and Shinke, R. (1976) *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 41, 295 - 303
- 15) Hidebrand, D.F. and Hymowitz, T. (1981) *Physiol. Plant.* 53, 429 - 434

- 1 6 ) Kohno, A., Nanmori, T. ( 1 9 9 1 ) *Plant Cell Physiol.* 3 2 ( 4 ) ,  
4 5 9 - 4 6 6
- 1 7 ) kohno, A., Shinke, R. and Nanmori, T. ( 1 9 9 0 *Biochem. Biophys. Acta*  
1 0 3 5 , 3 2 5 - 3 3 0
- 1 8 ) Doehlert, D. C., Duke, S. H. and Anderson, L. ( 1 9 8 2 ) *Plant Physiol.*  
6 9 , 1 0 9 6 - 1 1 0 2
- 1 9 ) Kohno, A., Nanmori, T. and Shinke, R. ( 1 9 8 9 ) *J. Biochem.* 1 0 5 ,  
2 3 1 - 2 3 3
- 2 0 ) 植物生理学会大会 1 9 9 1 年度年会講演要旨集 p. 7 9
- 2 1 ) 日本植物学会 1 9 9 1 年度 5 6 回大会講演要旨集 p. 2 8 8
- 2 2 ) Kohno, A., Nanmori, T. ( 1 9 9 2 ) *Bot. Mag. Tokyo* 1 0 5 ( 1 0 7 7 ) ,
- 2 3 ) Kohno, A., Nanmori, T. *Analytical Biochemistry* Submitted
- 2 4 ) Yamauchi, D., Minamikawa, T., ( 1 9 9 0 ) *Nucleic Acids Research,*  
1 8 ( 1 4 ) , 4 2 5 0
- 2 5 ) Kim, J., Nanmori, T. and Shinke, R. ( 1 9 8 9 ) *Appl. Environ. Microbiol.*  
5 5 , 1 6 3 8 - 1 6 3 9
- 2 6 ) Mikami, B., Aibara, S. and Morita, Y. ( 1 9 8 2 ) *Agric. Biol. Chem.*  
4 6 , 9 4 3 - 9 5 3
- 2 7 ) Nanmori, T., Numata, Y., & Shinke, R. ( 1 9 8 7 ) *Appl. Environ. Microbiol.*  
5 3 , 7 6 8 - 7 7 1
- 2 8 ) Tkachuk, T. & Tipples, K. H. ( 1 9 6 6 ) *Cereal Chem.* 4 3 , 6 2 -  
7 9
- 2 9 ) Visuri, K. & Nummi, M. ( 1 9 7 2 ) *Eur. J. Biochem.* 2 8 , 5 5 5 -  
5 6 5
- 3 0 ) 春日井愛子 ( 1 9 7 0 ) 大阪女子大学紀要、生活理学編 No. 7 , 3 5 ,  
7 5
- 3 1 ) 春日井愛子 ( 1 9 5 4 ) 家政誌 5 , 3 2 2
- 3 2 ) 森田雄平 , 和田野 ( 1 9 7 2 ) アミラーゼシンポジウム 7 , 7 9
- 3 3 ) Gertler, A. & Birk, Y. ( 1 9 6 5 ) *Biochem. J.* 9 5 , 6 2 1 - 6 2 7
- 3 4 ) 春日井愛子 ( 1 9 6 9 ) 農化 4 3 , 7 2 0

- 3 5 ) Arai, T., Kawabata, A., Taniguchi, H., ( 1 9 9 1 ) *Agric. Biol. Chem.*, 5 5  
( 2 ) 3 9 9 - 4 0 5
- 3 6 ) 春日井愛子 ( 1 9 5 9 ) *農化* 3 3, 1 1 1 5
- 3 7 ) Ball, A.K., Tompson, R.R., & Walden, M.K. ( 1 9 4 6 ) *J. Biol. Chem.* 1 6 7, 5 7 1 - 5 7 2
- 3 8 ) McCleary, B.V. and Matheson, N.K. ( 1 9 7 4 ) *Phytochemistry* 1 3,  
1 7 4 7 - 1 7 5 7
- 3 9 ) Bradford, M.M. ( 1 9 7 6 ) *Anal. Biochem.* 7 2, 2 4 8 - 2 5 4
- 4 0 ) Laemmli, U.K. ( 1 9 7 0 ) *Nature* 2 2 7, 6 8 0 - 6 8 5
- 4 1 ) Zacharius, R.M., Zell, T.E. and Morrison, J.H. ( 1 9 6 9 ) *Anal. Biochem.* 3 0, 1 4 8 - 1 5 2
- 4 2 ) Matsudaira, P. ( 1 9 8 7 ) *J. Biol. Chem.* 2 6 1, 1 0 0 3 5 -  
1 0 0 3 8
- 4 3 ) Aebersold, R.H., Leavitt, J., Saavedra, R.A. and Hood, L.E. ( 1 9 8 7 )  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8 4, 6 9 7 0 - 6 9 7 4
- 4 4 ) Nanmori, T., Shinke, R., Aoki, K., and Nishira, H. ( 1 9 8 3 ) *Agri. Biol. Chem.*, 4 7 ( 5 ) 9 4 1 - 9 4 7
- 4 5 ) Mikami, B. ( 1 9 8 8 ) *Handbook of Amylases and Related Enzymes*  
(ed. Amylase Research Society of Japan) pp 9 9 - 1 0 3 Pergamon  
Press
- 4 6 ) Marchalonis, J.J. and Wertman, J.K. ( 1 9 7 1 ) *Comp. Biochem. Physiol.* 3 8 B, 6 0 9 - 6 2 5
- 4 7 ) Lundgard, R. and Svensson, B. ( 1 9 8 7 ) *Carlsberg, Res. Commun.* 5 2,  
3 1 3 - 3 2 6
- 4 8 ) Koshihara, T. and Minamikawa, T. ( 1 9 8 1 ) *Plant Cell Physiol.* 2 2,  
9 7 9 - 9 8 7
- 4 9 ) Silvanovich, M.P. and Hill, R.D. ( 1 9 7 6 ) *Analytical Biochem.*  
7 3, 4 3 0 - 4 3 3
- 5 0 ) Thoma, J.A., Spradlin, J.E. and Dygert, S. ( 1 9 7 1 ) *Plant and Animal Amylases in The Enzymes* Vol. 5 (Boyer, P.D., ed) Academic Press, pp.

1 1 5 - 1 8 9

- 5 1 ) Hardie, D.G. ( 1 9 7 5 ) **Phytochemistry** 1 4, 1 7 1 9 - 1 7 2 2
- 5 2 ) Engler, A. ( 1 9 6 4 ) Syllabus der Pflanzenfamilien. Gebrüder  
Borntraeger, Berlin-Nikolassee. Vol. II : 2 3 7 - 2 3 8
- 5 3 ) Toda, H. ( 1 9 8 8 ) Plant Amylase in Handbook of Amylases and  
Related Enzymes. (ed. Amylase Research Society of Japan) Pergamon  
Press pp 6 7 - 7 1