Potato Phosphorylase の基質特異性についての研究

（その　1）

山　岡　邦　雄・秋　本　美都子

On the Substrate Specificity of Potato Phosphorylase. (Part 1)

Abstract.

Phosphorylase catalyses the starch synthesis reaction of Glucose-1-Phosphate(G-1-P) and Primer which has α-1-4 bond over trisaccharides.

It was found that potato phosphorylase could use maltose as a primer and synthesized starch although very weak.

Maltose reactivities were reported.

1. まえがき

生体内における化学反応に触媒として関与している酵素には，基質特異性と呼ばれる特性がある．

これは，酵素の非常に厳密な基質選択性のことで，各々の酵素は，ある特定の基質の特定の反応のみに作用する．じゃがいもデンプンから抽出された Phosphorylase（加リン酸分解酵素）が，ある種の多糖類（$C_6H_{10}O_5$）n を Primer として，glucose-1-phosphate との反応に触媒として関与し，デンプンを生成する反応がある．これまで，この酵素反応の Primer としては α-1，4結合を有する n≧3 である三糖類以上の糖のみが成り得るという報告がなされていた．

しかし，我々の研究において，maltose を基質として，このデンプン合成反応を行なわせたところ，弱いながらも明らかに酵素活性が認められた．このことから，α-1，4結合をもつ二糖類（n＝2）も Primer と成り得ると推定された．

2. 試薬と方法

1）試薬；実験に使用した主な試薬を以下に示す．

maltose（和光純薬工業），starch（純正化学），Glucose-1-phosphate dipotassiumsalt）97％；片山化学工業），TCA（Trichloroacetie acid；和光純薬工業）EDTA（第一化学薬品）

2）使用酵素

じゃがいもデンプンの抽出粗酵素

酵素液調製法

この操作は，すべて4℃の条件で行う．

試料100g の皮むき，細断してすりつぶす．1mM の EDTA 50ml を加え，1分間隔で2回 homogenize する．濾過して濾液を12,000rpm，45分間遠心分離する．上清を取る．これを粗酵素抽出液として使用する．

3）生成デンプン量の測定法

生成したデンプンは，ヨウ素デンプン反応で発色させ，この液を島津 Spectronic 20と日立分光光度計により，570mμにおける吸光度を測定し，生成デンプン量を算出した．

4）実験操作法

a）ヨウ素デンプン反応による着色液の可視吸収0.005％ starch 水溶液9.8ml に（5mg I_2＋10mgKI）/ml の溶液0.2ml を加え，この液の400～600mμにおける吸収を調べた．

b）市販 maltose 試薬中の starch 含有量の測定

5～25wt ％の maltose 水溶液および0～0.001wt％の starch 水溶液を調製し，これらの溶液の570mμ での吸光度を測定し，それによって得られた検量線から，市販 maltose 試薬中の starch 含有量を求めた．

c）酵素反応における starch 生成速度の測定

実験操作法は基本的には，酵素研究法（II）[1] の Arreguin-Lozano &Bonner らの方法を用い，以下に示すように行った．

pH 5.9の Acetatebuffer 3 ml，3 mg/ml の G-1-P 10ml，基質（maltose または starch）2 ml，粗酵素液5 ml を各々加え，反応液とする．この混合液を25°C の恒温槽で incuvate し，一定時間毎に反応液を 1 ml 取り出し，16% TCA 1 ml を加え，酵素反応を中断させる．数回水で沈澱を洗浄し，濾液に（5 mg I_2＋10mg KI/ml の I_2・KI 溶液0.5ml を加える．これを水で全量12.5ml として，570mμ における吸光度を測定する．上記のような方法にて，次のような実験を行った．

① Primer として，0 %，0.01%，0.1%，0.5%の starch 水溶液を用い，一定時間毎の starch 生成速度を測定した．

② Primer として，0 %，2 %，5 %，10%のmaltose 水溶液を用いて，一定時間毎の starch 生成速度を測定した．

③ 基質を加えない溶液（以下 Blank と呼ぶ）の酵素液の濃度を変化させて，starch生成速度を測定した．

④ Primer として，1 % starch，5 % maltose を用い，G-1-Pの濃度を変化させた時の一定時間毎の starch 生成量を測定した．

3. 結　果

(a) ヨウ素デンプン反応により，starch 生成量を測定するために，0.005% starch 水溶液9.8ml に（5 mg I_2＋10mgKI）/ml の水溶液0.2ml を加え 400～700mμ における可視吸収を調べた結果，Fig. 1 に示すようになった．この図より，570mμ の辺りにピークが見られ，570m での検量線を作ったところ Fig. 2 に示すようになった．これより以下，デンプン反応による starch 生成量の測定は，570mμの吸光度を測定することにより算出することとした．

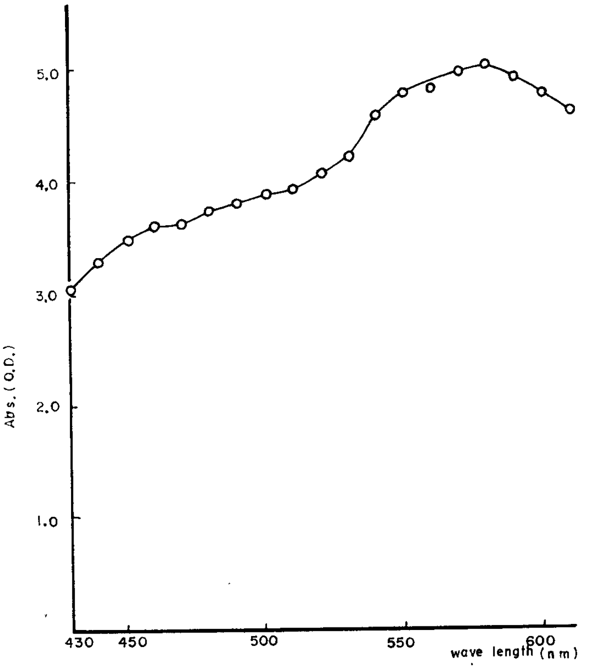

Fig. 1 Visibie absorption spectrum of starch iodine reaction solution

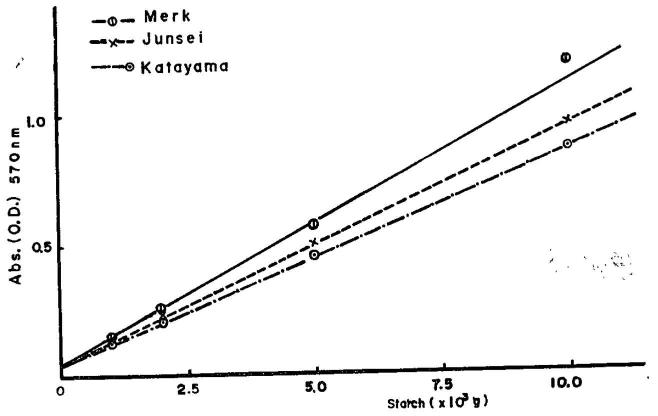

Fig. 2 Callibration curve of starch

(b) 基質として作用する maltose 中に starch が含まれていて，それが Primer となっているのではないかという疑いを明らかにするために，maltose 試薬中の starch 量の測定を行ない．Fig. 3 に示す検量線が得られた．

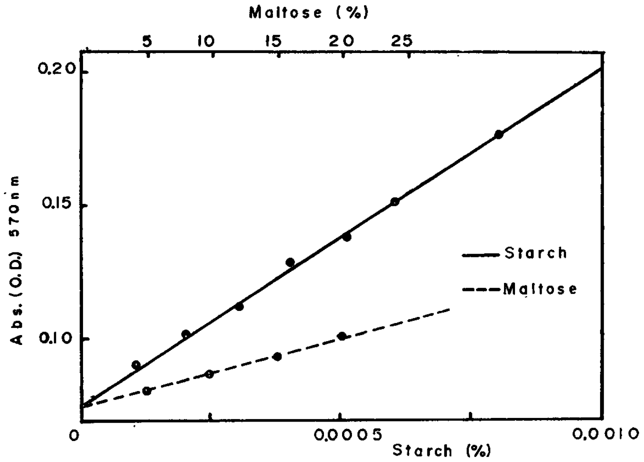

Fig. 3 Amount of starch in maltose

これから，maltose 試薬中の starch 量を計算すると次のようになる．

$$\frac{0.00019}{20} \times 100 = 0.00095 \ (\%)$$

(C－1) 次に各種濃度の starch と maltose を Prim

er として starch 生成速度を測定すると，Fig. 4，5 に示すような結果が得られたが，starch の生成速度は Primer の濃度が高い程速いことがわかる．また，どちらの図においても，Blank でも吸光度が時間の経過に伴って高くなっているため，Blank に酵素液を，2倍加えたものについても，生成速度を測定してみた．

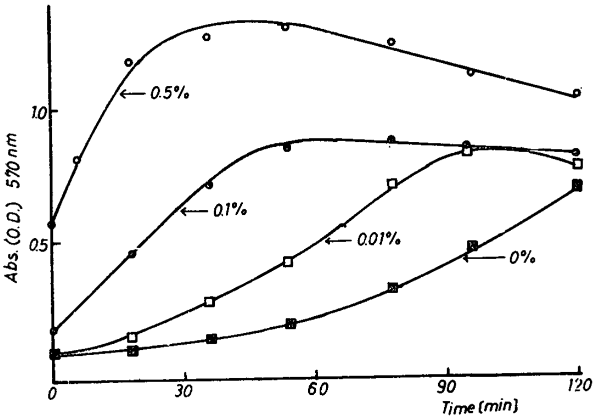

Fig. 4 Velocity of starch synthesis (primer : starch)

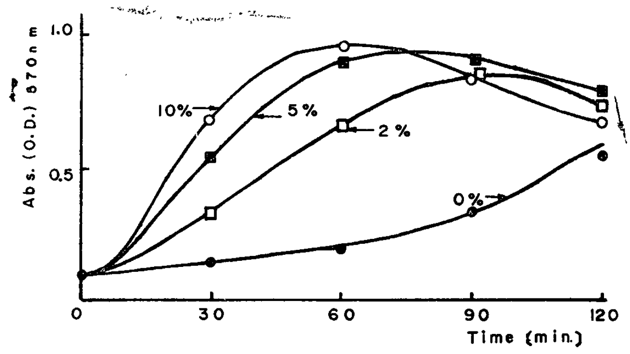

Fig. 5 Velocity of starch synthesis(primer : maltose)

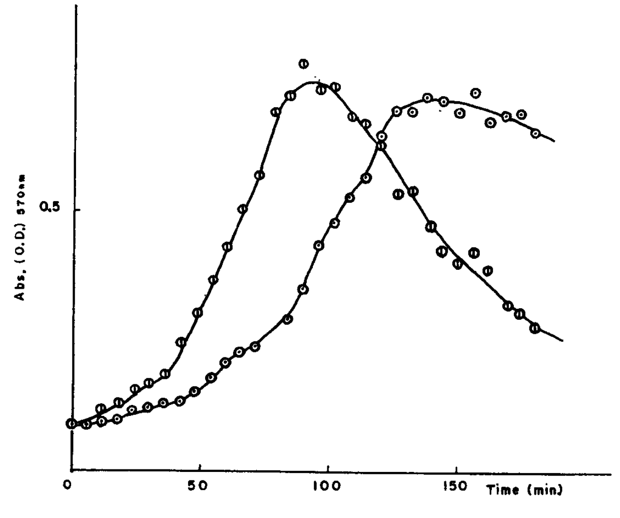

Fig. 6 Effect of enzyme concentration on starch synthesis

Primer として何も加えていない場合でも，生成速度は遅いが，starch は生成されることが認められた．これは使用している酵素液が粗酵素液であり，不純物として starch が含まれているためと考えらた．その証拠として，酵素液を2倍加えると，含まれる starch 量も2倍となり，生成速度も速くなっている．しかし，Primer として maltose を加えた方が，Blank よりも starch 生成速度が速いことから，酵素中に不純物として含まれる starch のみが Primer となったのではないこともわかる．

（C－2）以上の結果より，Primer として starch と maltose を使った場合の starch 生成速度のほぼ等しいグラフを並べると Fig. 7 のようになる．この図から，いま maltose 試薬中の starch のみが Primer として

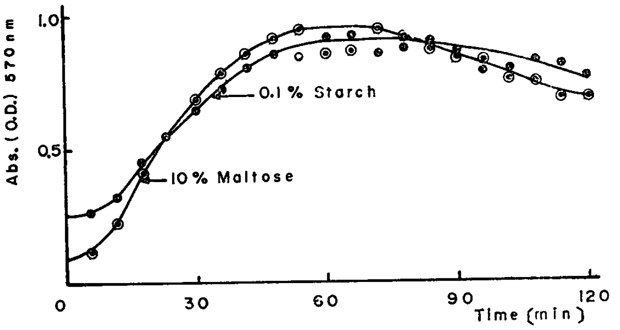

Fig. 7 Amount of synthetic starch

働いたと仮定すると，不純物としての starch が $\frac{0.1}{10}\times 100=1$（%）含まれていかなければならない．しかし，実際には，Fig. 3 で示したように，maltose 試薬中に含まれる不純物としての starch 量は 0.00095 %であるため，maltose 試薬中の starch のみが Primer となるのではないことが確認されると同時に，これらの図は maltose がその Primer としての能力は，starch に比べて，はるかに劣っていることも示している．

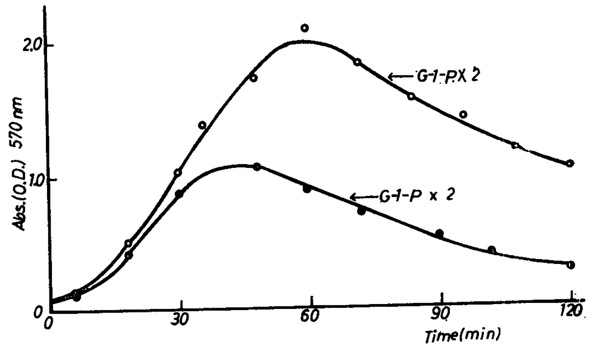

Fig. 8 Velocity of starch synthesis (primer : maltose)

(C－3) 次に我々は，上記の実験においていずれもstarch 最大生成量がほぼ等しくなることに注目し，G--Pの濃度のみを変化させて，その starch 生成量を測定した．(Fig. 8) 図に示されるとおり，G-1-P の2倍濃度のものは，Starch 生成量も2例することが確認された．

4. 考　察

Fig. 3の結果から，市販 maltose 中の不純物としての starch は，せいぜい 0.00095 %にすぎないこと，また Fig. 7の結果から，maltose 中の starch のみが Primer として働いたと仮定すれば，1%の starch が含まれていなくてはならない．本報で得られたこれらの実験結果から malose 中の不純物としての starch および酵素抽出液中の不純物としての starch が primer として作用したのではないかという疑問点は打ち消され，maltose もその Primer としての能力は starch に比べ，はるかに劣ってはいるが，充分に Primer と成り得ることが明らかになった．

このことから，じゃがいもから抽出した phosphorylase を使って，α-1, 4結合を有する二糖類である maltose を primer として，デンプンの合成反応が行い得ると考えられる．また，酵素抽出液が不純であるため，他の酵素による反応も同時に起り，時間経過と共に，吸光度が減少していく現象も見られた．この点については，今後じゃがいも酵素抽出液から，phosphorylase のみを純粋分離し，比活性等を数値で正確に表わす必要がある．

5. 要　約

Glucose-1-phorphate との反応において，じゃがいも phosphorylase の Primer として，α-1，4結合を有する二糖類である maltose が，反応しうることが判明した．

また，その反応性は，starch に比べ，はるかに劣っていることも明らかとなった．

参考文献

1) 赤堀四郎：酵素研究法，2，576，(1968)
2) 日本化学会：実験化学講座，24，398—403，(1958)

(昭和50年11月6日受理)