

この報文は第一回日本生物物理学会（昭和37年5月
於阪大）に於て講演したものである

高压による酵素の失活について

鈴木啓三*・北村 清**・宮川金二郎

蛋白の変性及び酵素の失活については古くより種々の変性剤を用いて研究されているが、加圧による変性及び酵素の失活については比較的知見が少ない。特に二、三の側を除いて加圧失活については速度論的には取り扱われていない。酵素の失活は酵素蛋白の構造の変化に起因するものと考えられるから、酵素作用の機構を考える場合のみならず、蛋白質一般の変性についても何等かの知見を考えるものと考え我々は高压下における酵素の失活を主として速度論的

実験結果及び考察

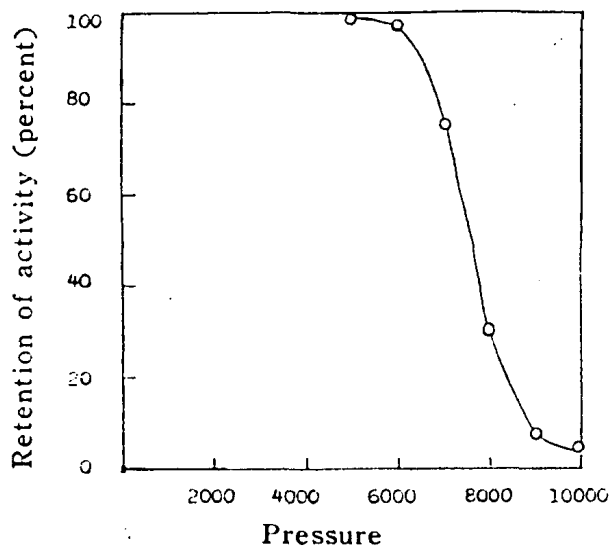


Fig. 1 Inactivation of α -amylase
under high pressure
0.1 M Phosphate buffer pH 6.9
Temperature 30°C
Pressing duration; 5min.

* 立命館大 理工・物化
** 旭化成 中央研

立場より本研究を進めて来た。

実験に供した酵素は澱粉分解酵素として枯草菌 α -amylase, ダエキ α -amylase, 大麦 β -amylase, 蛋白分解酵素として Trypsin, Chymotrypsin, 枯草菌 A1-proteinase を用いた。酵素活性は Amylase 系に対しては Sumner のジニトロサリチル酸により、デンプンを基質として酵素作用の結果生ずる還元力を測定し, protease 系に対しては casein-folin 法による呈色を測定して定めた。

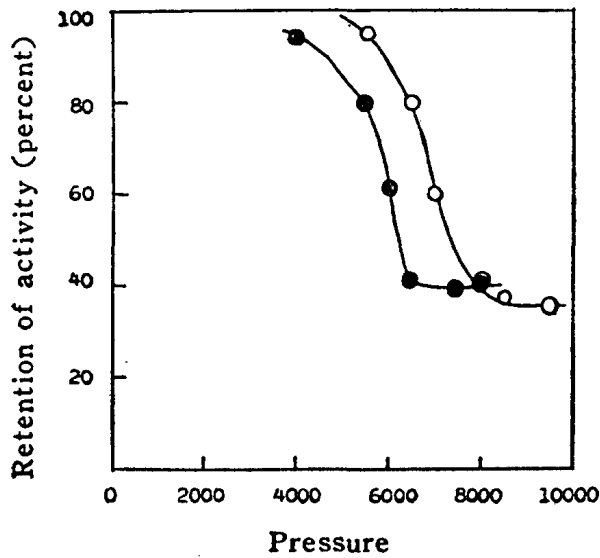


Fig. 2 Inactivation of Trypsin and Chymotrypsin pH 7.7 $\frac{1}{3}$ M Phosphate buffer Temperature 25°C
 ○ Trypsin
 ● Chymotrypsin

Fig. 1 は α -amylase の, Fig. 2 は Trypsin 及び Chymotrypsin の圧による失活の度合を示したものである。3種の amylase 系酵素はいずれも室温で数千 kg/cm² の加圧により失活し 10,000kg ではほぼ活性が零になるが Protease 系の Trypsin, Chymotrypsin では, 8000kg 及び 6000kg までは圧の増加に伴って失活の度合も大きくなるが, それ等の圧を限度としてそれ以上の圧で加圧

するも, もはやそれ以上失活しなくなる。しかしこの場合でも圧を繰り返し加える事によりさらに失活する様になる (繰り返し効果)。

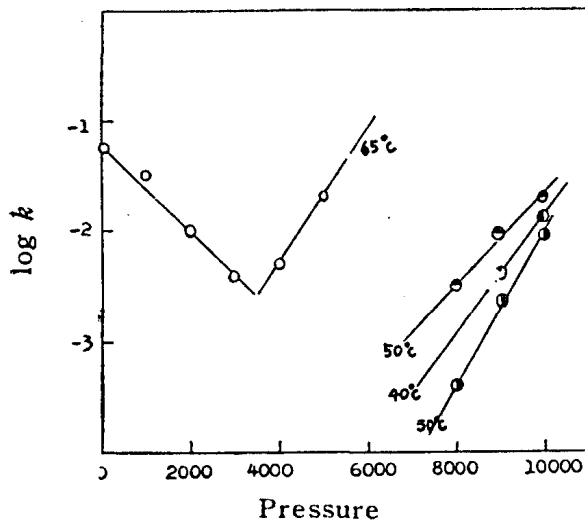


Fig. 3 Influences of pressure on the rates of inactivation of proteinase in 0.05 M phosphate buffer pH 7.6

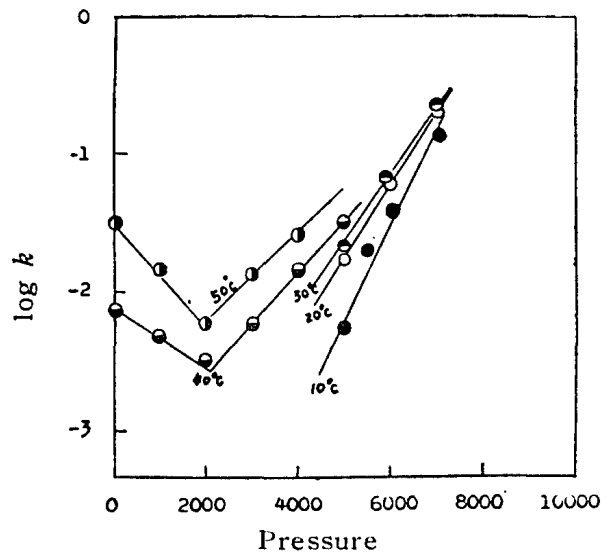


Fig. 4 Influences of pressure on the rates of inactivation of β -amylase (barley). in 0.2 M acetate buffer (pH 4.8)

Table 1 Molar Volume changes of activation ΔV^* , c.c./mole

	temp. °C		10	20	30	40	50
	pH						
Bact. α -amylase	5.8			-39			
ダエキ α -amylase	6.9				-30		
オオムギ β -amylase	4.8		-43	-39	-35	-28	-22
Bact. Proteinase	7.6				-36	-34	-24
Trypsin	7.6			-20			
Chymotrypsin	7.6		-40	-39	-36		

Table 2 Apparent activation energy, E , Kcal/mole

	pH	pressure kg		4000	4500	5000	5500	6000	6500	7000	7500	8500
		temp. °C										
Bact. α -amylase	4.8	10~50									+22	
ダエキ α -amylase	5.9										+5.7	
オオムギ β -amylase	4.8	10~50		+17		+12		+4.6				
Bact. Proteinase	7.6								+6.0			
Trypsin	7.6	15~45									+4.0	+4.5
Chymotrypsin	7.6	15~45					+5.5	+3.5				

Proteinase は圧に対し非常に抵抗性をもち 10,000kg 迄の範囲ではいちぢるしい失活が認められない。 α -Amylase において proteinase digestion 法による変性度の測定値とジニトロサリチル酸法による活性度の測定値とは平行関係にあるので一応圧による酵素の失活と変性とは一致するものと思われる。

失活はいずれの酵素についても一次の非可逆的反応である事が認められた。失活速度は通常圧の増加に伴って急激に増す。

Fig. 3 及び Fig. 4 は β -amylase 及び proteinase の種々の温度下での速度定数と圧力の関係を示したものでいずれも直線となる。これ等の勾配から得た ΔV^* (活性化容積) を計算すると Table I の如くなる。

ΔV^* の値は $-20 \sim -50$ cc/mole の範囲であるがいずれも温度上昇に伴って絶対値が小さくなり、amylase 系と protease 系とでは差は認められない。熱失活を起す温度においては β -amylase では 2,000 kg 迄は失活の速度は減少しそれ以上では増加する (Fig.3)。proteinase では 3,500 kg を境として同一傾向を持つ (Fig.4)。即ちある圧までは圧は熱失活を抑制する。失活速度と温度 (50°C 以下) との関係は Fig. 3, Fig. 4 にみる如く温度係数は正で、これらから得られた見かけの活性化エネルギー E の値を表 2 に示す。

いずれも今まで取扱った酵素の E の値は正で非常に小さな値をとり。圧の増加につれて減少する。 ΔH^* の値はほぼ、 $3 \sim 10$ kcal/mole で、 $\Delta S^* < 0$ の値をとり $-40 \sim -60$ e.u である。

pH による失活速度に及ぼす影響は比較的大きく水素イオン濃度の約 0.5~1 乗に比例する。

以上の如く現在迄の所、澱粉分解酵素と蛋白分解酵素の数種について実験を行ったがほぼ類似した熱力学的諸数値を与えるが蛋白分解酵素では特異な圧失活を示す事が特色づけられる。この事は酵素蛋白の構造上に大きな差異がある事を暗示している。