

氏名	八木史郎
学位の種類	農学博士
学位記番号	農博第262号
学位授与の日付	昭和52年7月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科食品工学専攻
学位論文題目	BIOCHEMICAL AND CRYSTALLOGRAPHIC STUDIES ON SOYBEAN β-AMYLASE (ダイズ β -アミラーゼの生化学的ならびに結晶学的研究)

論文調査委員 (主査) 教授 森田雄平 教授 千葉英雄 教授 広海啓太郎

論文内容の要旨

本論文はダイズ β -アミラーゼの構造と機能との関係を明らかにすることを目的として、本酵素の化学組成、物理化学的性質、化学修飾および結晶学的構造解析などを研究した結果をとりまとめたものである。

著者はまず市販低温脱脂ダイズを材料として2種の β -アミラーゼを精製結晶化し、これらの分子量、分子形、化学組成、アミノ末端およびカルボキシル末端残基、一次構造の一部などを決定して、本酵素が分子量57,000の単量体酵素であることを明らかにした。ついで分子内のアミノ酸側鎖との関連において酵素学的性質を研究して、二三の興味ある知見を得た。すなわち本酵素1分子中には5個のSH基が存在するが、これらの間にはメルカプチド形成における反応性の差が認められ、活性発現には1個のSH基だけが必要であること、またメルカプチド形成はタンパク構造の微小な変化を伴うことなどを明らかにした。さらに、アニオンと本酵素との相互作用を研究し、リン酸、クエン酸アニオン非拮抗的に活性を阻害することを認めたが、この阻害反応にはヒスチジン、リジン側鎖は関与せずアルギニン側鎖が関与することを化学修飾の実験結果に基づいて示唆した。

ついで著者は本酵素のpH5.4および4.0の硫酸アンモニウム溶液からそれぞれ三方晶および六方晶系に属する単結晶を調製し、結晶の単位胞、対称性などをX線解析により決定した。その結果、前者が結晶学的構造解析に好適な試料であることを認め、この結晶について、重原子多重同型置換法を応用して立体構造解析を行った。すなわち、*p*-chloromercuribenzene sulfonate, K_2PtCl_4 が良好な同型置換誘導体を形成することを認め、差パターン法、差フーリエ法により重原子パラメーターを決定し、結晶格子内における分子配列を明らかにした。

著者はまた焦点電気泳動法により、ダイズ (*Glycine max*) の異品種ならびに類縁 *Glycine* 属約20種類の種実中の β -アミラーゼの多型成分を解析し、等電点の値がそれぞれ5.12, 5.25, 5.39, および5.52の4種のアイソザイムが存在することを認め、これらが遺伝的変異に基づく成分であること、これらの

成分の分布とダイズのつる化特性との間には密接な関係があることを明らかにし、 β -アミラーゼのザイモグラムがダイズの育種学的研究に役立つことを示唆した。

論文審査の結果の要旨

β -アミラーゼは広く植物組織中に存在する酵素であり、これに関する植物生理学的研究や食糧科学的応用面での研究報告は多数にのぼっている。しかしタンパク化学的観点からのこの酵素の構造研究は比較的少なく、化学構造と触媒機能との関連性はほとんど明らかにされていない。著者はダイズ β -アミラーゼを結晶状に単離精製して、詳細に物理化学的特性や酵素化学的性質を研究し、その構造と機能について以下のような新しい知見を得ている。

1. 市販低温脱脂ダイズを材料として電気泳動易動度の異なる2種の β -アミラーゼを結晶状に調製し、いずれも分子量57,000の単量体単純タンパクであることを明らかにするとともに、アミノ酸組成、末端アミノ酸残基、一次構造の一部を決定した。
2. 本酵素1分子中に存在する5個のハーフシスチンはすべてシステイン形であり、そのSH基メルカプチド形成反応性には差異があること、5個のうち1個のメルカプチド形成に伴って活性がほとんど消失すること、またメルカプチド形成は微細なタンパク構造変化を伴うことを明らかにした。
3. β -アミラーゼの活性はアニオンの種類と濃度の影響をうけるが、とくにリン酸およびクエン酸イオンは非拮抗的に活性を阻害する。酵素分子内のリジンおよびヒスチジン残基の側鎖はこの阻害反応にほとんど無関係であるが、アルギニン残基のグアニジル側鎖が関与することを化学修飾の実験により明らかにした。
4. pH 5.4の硫酸アンモニウム溶液から三方晶系に属する単結晶を調製し、重原子多重同型置換法を応用してX線構造解析を行って、結晶の単位胞の大きさ、対称性、結晶格子内における分子配列、重原子誘導体中の重原子位置、占有率などを決定し、三次構造研究のいとぐちを開いた。
5. ダイズおよび近縁 *Glycine* 属種実中に含有される β -アミラーゼの多型成分を焦点電気泳動法により解析し、4種の遺伝的変異アイソザイムが存在すること、またこれらの分布様式がダイズの形態学的特性と密接な関係を有することを認めた。

以上のように本論文はダイズ β -アミラーゼの構造と機能について重要な新知見を加えたものであり、とくにアミラーゼについてはじめて結晶構造解析への道を開いたことは、酵素化学、タンパク質化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。