

氏名	菅 沼 俊 彦 すが ぬま とし ひこ
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 288 号
学位授与の日付	昭 和 53 年 11 月 24 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	Studies on Subsite Structures of Amylases and Their Action Patterns (アミラーゼのサブサイト構造と作用様式に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 廣 海 啓 太 郎 教 授 上 久 保 正 教 授 森 田 雄 平

### 論 文 内 容 の 要 旨

デンプンの加水分解を触媒するアミラーゼは、動植物界および微生物界に広く分布し、その種類も作用様式もともに極めて多様である。それらの作用特性は、食品工業や繊維工業などの応用面において、種々の目的に活用されている。

種々のアミラーゼの作用様式は、それらの活性部位の構造と密接に結びついていると考えられ、その相互関係を分子論的に定量的に究明することは、反応機構の解明に役立つばかりでなく、その利用の面に寄与するところが大きい。

本論文は、アミラーゼの活性部位の構成単位と見なされるサブサイトの概念に立脚して、理論的かつ実験的にこの問題を究明したものである。

アミラーゼの活性部位は、基質のグルコース残基に対してそれぞれ固有の親和力をもつ数個のサブサイトと呼ぶ単位からなりたっており、このサブサイト親和力の配列状態(これをサブサイト構造と名づける)が、そのアミラーゼの特性的な作用様式を一義的に決定していると考えられる。サブサイト親和力を評価する有用な方法の一つとして、還元性末端を  $^{14}\text{C}$ -グルコースで標識したマルトオリゴ糖を基質とし、これから生じる標識された種々の重合度の生成物の生成速度を測定する方法(生成物分析法と呼ぶ)がある。この方法は元来 endo 型のアミラーゼにしか適用できなかつたが、著者はこの方法に加えて、速度パラメーターの直鎖状基質の重合度への依存性に基づく速度論的方法の原理を併用することにより、exo 型のアミラーゼにも適用できる、より精度の高いすぐれた方法を開発した。またアミラーゼの種類によっては、加水分解のほかにグリコンル転移及び縮合を随伴するものもあるが、転移作用と縮合作用の寄与の度合いを決定するのに、従来の化学的な方法に加えて、酵素を用いる新しい方法を考案した。

これらの方法を、4種類のアミラーゼ(*Aspergillus oryzae* のタカアミラーゼA, *Streptomyces* の  $\alpha$ -アミラーゼ, *Bacillus subtilis* の糖化型  $\alpha$ -アミラーゼ, 及びダイズの  $\beta$ -アミラーゼ)によるマルトオリゴ糖の分解反応に適用し、それらの酵素のサブサイト親和力ならびに転移と縮合の寄与を定量的に評価し、

各酵素の反応機構を明らかにした。さらに得られたサブサイト親和力の値と、水解、転移、縮合に関する3個の速度定数を用いて、反応に伴う生成物の分布の時間的経過を、計算機シミュレーションによって理論的に予測し、実験結果と比較することにより、この取り扱いの妥当性を立証した。

本研究により、種々のアミラーゼの特色ある反応機構が明らかにされたが、中でも *Streptomyces* の  $\alpha$ -アミラーゼがマルトトリオースを殆んどすべてマルトースに変換するという一見奇異な作用様式が、この酵素の非常に強い転移作用と、特色あるサブサイト構造に由来することを解明したこと、及び  $\beta$ -アミラーゼについては、酵素が同一の基質分子を2回以上続けて水解するという multiple attack の寄与が、基質のマルトオリゴ糖の重合度とともに増大することを見出すなど、多くの重要な新知見を得ている。

### 論文審査の結果の要旨

アミラーゼのデンプンに対する加水分解の作用様式は、その種類によって極めて多様であり、それぞれの特性的な作用特性が、食品工業はじめ諸種の応用面に広く活用されている。種々のアミラーゼの作用様式は、その活性中心の構造と密接に関係していると考えられ、両者を結びつける統一的な理論の確立とその応用は、アミラーゼの反応機構の解明とその利用面の開発において極めて重要な意義をもつものである。

アミラーゼの活性中心が、基質の構成単位であるグルコース残基と特異的に相互作用する数個のサブサイトからなるとし、その相互作用の強さをサブサイト親和力と名づける。サブサイト親和力の配列状態（これをサブサイト構造と呼ぶ）は、個々のアミラーゼに固有であり、これがその酵素の作用様式を決定しているという考え方は、サブサイト理論と呼ばれ、種々のアミラーゼの作用機構の定量的な解明に有用である。サブサイト親和力を評価する方法には、水解反応速度の直鎖状基質の重合度依存性による速度論的方法と、還元性末端を  $^{14}\text{C}$ -グルコースで標識した種々の重合度のマルトオリゴ糖を基質とし、これから生じる標識された生成物を分離定量することによる生成物分析法の2種があるが、それぞれ長所短所があり、適用対象に制限がある。

著者は、生成物分析法に速度論的方法の長所を加味することにより、より広い適用範囲とよりよい精度をもつ新しい方法を開発した。またアミラーゼの反応機構において重要な意義をもつ転移作用と縮合作用の定量的な評価に関しても、酵素を用いる新しい方法を考案している。これらの方法を、4種のアミラーゼ、すなわち *Aspergillus oryzae* のタカアミラーゼA、*Streptomyces* の  $\alpha$ -アミラーゼ、*Bacillus subtilis* の糖化型  $\alpha$ -アミラーゼ、ならびにダイズの  $\beta$ -アミラーゼ、によるマルトオリゴ糖の分解反応に適用して、それらの酵素のサブサイト親和力を決定するとともに、各酵素の反応機構をそのサブサイト構造に基づいて解明している。

著者はさらに加水分解、グリコシル転移および縮合を含む最も一般的な反応機構式に基づき、サブサイト親和力と3個の速度定数という極めて少数個のパラメーターを用いて、反応に伴う全生成物の時間経過を計算する方法を確立し、計算機シミュレーションによって得た理論曲線と実験結果がよく一致することを、代表的な例について確かめている。

このように本論文は、食品工業に最も多く利用されているアミラーゼにつき、その活性中心のサブサイト構造と作用様式とを、少数個のパラメーターを用いて定量的にかつ統一的に関係づけられることを、理

論と実験の両面において示したものであり、酵素化学および食品工学に貢献するところが極めて大きい。  
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。