

氏 名	いし かわ かず ひこ 石 川 一 彦
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 1815 号
学位授与の日付	平 成 5 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	STUDIES ON FUNCTIONAL AMINO ACID RESIDUES AND CATALYTIC MECHANISM OF MAMMALIAN α -AMYLASES (哺乳類 α -アミラーゼの機能性アミノ酸残基と触媒機構に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 外村辨一郎 教 授 杉本悦郎 教 授 松野隆一

論 文 内 容 の 要 旨

糖類加水分解酵素の一つである α -アミラーゼは自然界に広く分布するが、哺乳類由来の α -アミラーゼについては、その触媒機構の詳細はほとんど判っていなかった。本論文は、哺乳類の α -アミラーゼの触媒機構を明らかにする目的で、ブタ膵臓由来の酵素 (PPA) 及び PPA と一次構造上高い相同性を示すヒト膵臓由来の酵素 (HPA) について行われた詳細な解析の結果について述べたものである。

著者はまず、PPA についてジエチルピロカルボネートによるヒスチジン残基 (His) の化学修飾を試み、総計 8 残基中 5 残基の His が修飾された分子種 (修飾 PPA) を得た。修飾 PPA では、澱粉またはアミロースの中の α -1, 4-グルコシド結合を加水分解する活性 (アミラーゼ活性) が大きく低下するが、*p*-ニトロフェニル-D-マルトシドを加水分解して *p*-ニトロフェノールを生成する活性 (マルトシダーゼ活性) は逆に増大した。さらに、未修飾の PPA と強く結合し全活性を阻害する、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) 由来のタンパク質性アミラーゼインヒビターが、この修飾 PPA のマルトシダーゼ活性を全く阻害しないことを見出だした。化学修飾とインヒビターによる選択的阻害により新しく限定された基質特異性が現れた。著者はサブサイトの概念を適用してこの現象を説明している。

著者はついで、PPA のアミラーゼ活性の至適 pH が、低分子の基質を用いるとき酸性側に移動すること、この際 K_m 値が pH の影響を受けないことを明らかにした。この現象は、従来考えられてきた 2 個の触媒残基による触媒機構では説明できない。そこで著者は 3 個のプロトン解離基を含む反応機構を想定し、理論曲線を実験結果に最適化させることにより、これら解離基の pK_a 値が 4.78, 5.54 および 8.62 であることを示した。そして、酵素活性の pH 依存性に及ぼす温度の効果の解析から、 $pK_a=4.87$ と $pK_a=5.54$ の残基はアスパラギン酸 (Asp) またはグルタミン酸 (Glu), $pK_a=8.62$ の残基は His であると推定した。

著者は種々の基質に対する PPA のアミラーゼ活性の至適 pH を測定した結果、前記の至適 pH の移動は、基質の被切断結合から還元性末端側へ 2 番目の残基が結合するサブサイト 5 を基質が覆っているか否かに関係しているらしいことを突き止めた。そこで著者は、5 量体のオリゴ糖の還元性末端にグルコース類縁物を含む種々の基質を合成し、これらについて PPA 及び HPA との結合並びに加水分解の pH 依存性を解

析した結果、サブサイト5は、糖残基上の水酸基を個別に認識するのではなく、単糖の6員環の大きさとその全体の形状を認識し、それが活性と至適 pH の変化を起こさせていると結論した。

PPA の触媒部位近傍には3個の His (101番, 201番, 299番) があるが、これらは HPA を含む哺乳類 α -アミラーゼにおいて一次構造上よく保存されていて、酵素の機能に重要な関わりをもつことが予想された。著者は遺伝子が既にクローン化されている HPA について、遺伝子工学的手法によりこれらの His をアスパラギン残基に置換した変異型酵素を作成し、それらのアミラーゼ活性を測定・解析した。この結果、His101と His299は触媒機能発現に関与することが示唆され、一方、His201は基質特異性並びに至適 pH の制御に関与し、また、インゲンマメ由来のインヒビターの結合や、哺乳類 α -アミラーゼの一般的な活性化剤である塩化物イオンの結合にも寄与する重要な残基であることが判明した。さらに、前記の化学修飾による基質特異性の変化は His201の修飾に起因することが示された。著者はこれらの結果と考察に基づき、哺乳類 α -アミラーゼにおける Asp197, Asp300及び His101が関与する触媒機構モデルを提案している。

論文審査の結果の要旨

α -アミラーゼは、澱粉やグリコーゲンなどの、D-グルコースが1,4 α -結合により連なった多糖類のグルコシド結合をエンド型に加水分解する酵素であり、自然界に広く分布している。なかでも哺乳類の α -アミラーゼは、澱粉の消化に係わる酵素であり、我々に馴染み深い。その触媒機構の詳細はこれまでほとんど不明であった。本研究は、哺乳類の α -アミラーゼの触媒機構を明らかにする目的で、ブタ膵臓由来の酵素 (PPA) 及び PPA と一次構造上高い相同性を示すヒト膵臓由来の酵素 (HPA) の反応について精緻な解析を行ったものであり、評価すべき点は次のとおりである。

1. 著者は、ジエチルピロカルボネートによりヒスチジン残基 (His) が修飾された PPA 分子種 (修飾 PPA) では、アミラーゼ活性が大きく低下するが、マルトシダーゼ活性は逆に増大することを発見した。また、インゲンマメ由来のタンパク質性アミラーゼインヒビターが、この修飾 PPA のマルトシダーゼ活性を全く阻害しないことを発見した。化学修飾とインヒビターによる選択的阻害の組合せにより新しく限定された基質特異性が現れることになる。著者はサブサイトの概念をこの現象に適用し、PPA の基質結合部位の構造と His の役割について新しい解釈を与えている。

2. 著者は、PPA のアミラーゼ活性の至適 pH が、低分子の基質を用いるとき酸性側に移動することを見出した。この現象を説明するために、3個のプロトン解離基を含む反応機構を提唱し、理論曲線を実験結果に最適化させることにより、これら解離基の pKa 値を求めた。さらに、酵素活性の pH 依存性及び温度の効果の解析の結果を踏まえ、各 pKa 値に対応するアミノ酸残基を特定した。これは、 α -アミラーゼの触媒機構における3解離基関与説に定量的な基盤を与えたものとして貴重である。

3. 著者は、5量体のオリゴ糖の還元性末端にグルコース類縁物を含む種々の基質を合成し、これらについて PPA 及び HPA との結合及び加水分解の pH 依存性を解析した結果、酵素の基質結合部位のサブサイト5の基質分子認識の特徴を明らかにし、それが活性と至適 pH の変化を起こさせていると結論した。特定のサブサイトがもつ役割に微視的解釈を与えたものとして興味深い。

4. 哺乳類 α -アミラーゼの触媒部位近傍には一次構造上よく保存されている3個の His (101番, 201番,

299 番)がある。著者は、HPA を対象として、遺伝子工学的手法によりこれらの His をアスパラギン残基に置換した変異型酵素を作成し、それらのアミラーゼ活性を解析した結果、各 His がどのような酵素機能に関与するかを明らかにした。これは、哺乳類 α -アミラーゼの構造と機能の関係の解明を一步前進させたものとして重要である。

5. 著者はこれらの知見と考察に基づき、哺乳類 α -アミラーゼにおける Asp197, Asp300 及び His101 が関与する触媒機構モデルを提案している。

以上のように本論文は、哺乳類 α -アミラーゼの触媒反応に関与する機能性アミノ酸残基と触媒機構について新しい重要な知見をもたらすものであり、酵素化学、栄養化学、及び食品工学の分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成4年12月22日、論文並びにそれに関与した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。