

氏名	鷹野重威 がんのしげただけ
学位の種類	理学博士
学位記番号	論理博第85号
学位授与の日付	昭和39年12月22日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	Studies on Bacterial Proteinase (細菌プロティナーゼに関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 波多野博行 教授 田中正三 教授 後藤良造

論文内容の要旨

著者は主論文でバクテリアルプロティナーゼの新しい精製法を確立し、この酵素の物理化学的ならびに化学的諸性質に関して報告し、さらに非 SH 酵素に対する放射線の作用機構に関する新しい model を提出した。

著者の用いた試料は *Bacillus subtilis* と称する枯草菌の生産するたん白質分解酵素で、硫酸塩析法とアセトン沈殿法によって得られた結晶をゲルろ過法とカラムクロマトグラフィーとによって精製したものである。塩析、沈殿法によって得られた結晶は顕微鏡的に均一であり、従来の研究ではこれが純粋な単一たん白質試料として用いられてきたものである。

著者はこの酵素試料をセファデックス G-75 を用いてゲルろ過を行なったところ、酵素活性の存在する主成分のたん白質のほか活性のない成分が存在しており、これらを相互に分離することができることを見出した。そこでこの活性の存在する主成分を十分透析した後、さらにセファデックス G-75 によるゲルろ過法と、イオン交換セルローズにより直線的勾配溶出法を行なう液体クロマトグラフィーとを繰返してクロマトグラフ的に均一な試料を得た。さらに、この試料の電気泳動分析、超遠心分析を行ない、いずれの分析によっても単一な成分であることを確かめ、その均一性を証明した。この精製の過程においてゲルろ過の後、TEAE セルローズクロマトグラフィーの前に必ず一定濃度の緩衝液を用いて透析を行なわねばならぬ点を強調している。

このようにして得られた均一な試料は十分物理化学的および化学的研究に耐えるもので、著者はこれを用いてこの酵素の性質を詳細に検討した。その結果、酵素作用の至適温度は 50~60°C、耐熱安定性は 0~30°C であり、また至適 pH は 8、安定 pH 域は 5~9 であることがわかった。この酵素は SH 基に特異的に作用する試薬並びに金属イオンにはすべて全く作用しない。反応速度定数は $K_m 4.17 \times 10^{-3} \text{g/ml}$ 、等電点は pH 3.98 であることを見出した。また、アミノ酸自動分析計を用いて、正確なアミノ酸組成を決定し、超遠心分析と粘度測定の結果から沈降定数 $S = 5.4 \times 10^{-3} \text{sec}$ 、分子量 $M = 46,000$ を決定した。

かくしてこの酵素はSH基をもたないばかりでなくシスチン残基を全く含まない酵素であることが見出された。

著者はこの点に着目し、この酵素の水溶液に対する γ 線の作用を研究した結果、この酵素はSH酵素とは著しく異なって、 γ 線に対する感受性が低く、酵素活性を最初の1/2まで失活させるに要する線量LD₅₀はSH酵素では $10^3 \sim 10^4$ rであるのに比べて、この酵素では 2×10^6 rであることを見出した。また、 γ 線を照射した酵素のアミノ酸組成を系統的に調べた結果 1.8×10^5 rの γ 線照射によってこの酵素のチロシン残基が全く消失してしまうにもかかわらずなお酵素活性は約55%残存していることを見出した。このことは酵素たん白質の構成アミノ酸のうちチロシン残基が放射線感受性が著しく高いが酵素活性の発現に直接関与していないことを示すものである。遊離のチロシンは放射線感受性が著しく低いものであることが見出されているから、このようにポリペプチド鎖に組み込まれたチロシン残基の放射線感受性が著しく高いことは極めて特異的で、注目に値する知見である。

酵素たん白質、チロシン、およびこの酵素たん白質の構成アミノ酸の組成比に相当する遊離アミノ酸の混合物に無水無酸素状態で電子線を照射し、生じた遊離基のESRスペクトルを測定解析した結果、酵素たん白質への放射線照射の初期の過程で明らかに遊離基が生成し、これがチロシン残基芳香核のOH基の酸素に基づくスペクトルであることが証明された。この事実から、放射線照射によって酵素たん白質に生じた電子的欠陥がチロシン残基におよんでチロシンラジカルとなってあらわれ、水溶液中ではチロシンが最先に分解される結果となるとする作用機構を提出した。このチロシンの役割はSH酵素のSH基の役割と似たものであるがSH酵素とは異なって、この酵素のようにチロシンが直接酵素活性に関与しない酵素では放射線の影響は直接活性の変化となってあらわれてこない。

放射線の作用に対する酵素の感受性は酵素活性の変化を指標として測定しているわけであるから、SH酵素が放射線に敏感であり、この酵素のように非SH酵素が抵抗性が大きい理由がこの作用機構によって理解できる。

参考論文その1~4はSH酵素に対する放射線の作用機構を明らかにしたもので、その7はアミノ酸の放射線作用感受性に関するもの、その8は酵素たん白質の遊離基生成を証明したものである。その5と6は酵素系および助酵素に対する放射線の影響をしらべたものである。

論文審査の結果の要旨

細菌バクテリアルプロティナーゼに関しては、塩析法ならびに有機試薬による沈殿法を用いて得られた試料について、萩原らおよび福本らの報告がある。これらの研究の内容はこの酵素についての酵素学的な二三の性質に関するものに止まるもので、この酵素に関する物理化学的な研究を行なうためにはその試料の均一性について、なお多くの検討を必要とする。

著者は、最近開発された新しい分析法であるセフアデックスを用いるゲルろ過法およびTEAEセルローズを用いるイオン交換クロマトグラフィーを用いて、従来の研究に用いられた試料の均一性について検討した結果、それが必ずしも均一なものではないことを見出した。そこでこの酵素をこれらの方法を用いてさらに精製し、また電気泳動法ならびに超遠心分析法によってクロマトグラフ的にも、電気泳動的に

も、また超遠心的にも、全く均一な試料を得ることに成功している。

著者はこの試料を用いてこの酵素の物理化学的ならびに化学的諸性質、すなわち、酵素作用に最適の温度ならびに pH 域、熱および酸、アルカリに対する安定性、SH 試薬ならびに各種金属イオンの影響を明らかにすると共に、酵素反応速度を決定し、広い pH 域に亘って電気泳動易動度を測定することによって、この酵素たん白の等電点を決定、かつ超遠心分析と粘度測定を行なって沈降定数ならびに分子量を決定した。また正確なアミノ酸分析を行なってそのアミノ酸組成を明らかにした。これらの成果は単にこの酵素の諸性質が明らかにされたというに止まらず、さらに物理化学的な研究が可能であることを示すものである。事実、この研究の結果、この酵素は、酵素の活性化に SH 基を必要とするいわゆる SH 酵素ではないということが明らかにされたばかりでなく、シスチン残基を全く含まない酵素であることが判明した。

そこで著者はこの酵素を用いて非 SH 酵素に対する放射線の作用機構を研究し、電子スピン共鳴スペクトルの測定の結果から、この酵素に対する放射線の作用の初期の過程においては、この酵素たん白に含まれるチロシン残基が遊離基として観測されることを見出した。これはチロシン残基がちょうど SH 酵素における SH 基と同じような役割を果していることを示すもので、この事実に基づいて非 SH 酵素に対する放射線の作用機構のモデルを提出した。このモデルに従えば、従来非 SH 酵素が SH 酵素に比べて放射線の作用に対して抵抗性が大きいとされてきた事実も矛盾なく説明できることは注目に値する。

参考論文 8 編のうち 4 編は SH 酵素の放射線失活の機構を明らかにしたもので、また 2 編はたん白を構成するアミノ酸の放射線感受性と、電子スピン共鳴吸収法によって遊離基の生成とを明らかにしたものである。

要するに、著者鷹野重威は、たん白質加水分解酵素の研究の分野において、試料精製法を確立し重要な価値ある知見を加えて、この分野の発展に大きく貢献するとともに生物物理化学の研究領域において豊富な知識と、すぐれた研究能力とを有することがみとめられる。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値があるものとみとめる。