

氏名	和田野晃 わだのあきら
学位の種類	農学博士
学位記番号	農博第179号
学位授与の日付	昭和48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	農学研究科農芸化学専攻
学位論文題目	<b>STUDIES ON STRUCTURE AND FUNCTION OF AMYLASES</b> (アミラーゼの構造と機能に関する研究)
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  $\alpha$ - および  $\beta$ -アミラーゼを純粋に単離精製して、酵素蛋白の構造と機能に関する研究を行なったものである。

1. 培養初期の米麴を材料として *Aspergillus oryzae* の  $\alpha$ -アミラーゼを結晶状に調製し、等電点、偏比容、沈降定数、固有粘度などの物理化学的性質を明らかにし、さらに分子量を沈降平衡法、SDSポリアクリルアミド電気泳動法で測定し、50,000 daltons であることを認めた。また窒素、カルシウム、アミノ酸、糖、アミノ糖を分析定量してこの蛋白質の化学組成を明らかにするとともに、アミノ末端分析により Ala を末端とする1本のポリペプチド鎖から構成されていることを証明した。

ついでこの酵素蛋白を硫酸アンモニウム溶液から結晶化して、軸長が1mmをこえる大きな単結晶を調製し、プリセッション写真法によって面間間隔  $3\text{ \AA}$  までのX線回折像を撮影した。これから結晶系、空間群、単位胞の大きさなど結晶構造解析の初段階に関する知見を明らかにするとともに、解析に必要な回折強度データを収集した。

2. ダイコン中にはほとんど  $\alpha$ -アミラーゼが含まれず、また比較的不純蛋白が少ないことを知ったので、これを材料として加熱処理、酸処理を含まない穏和な方法を用いて  $\beta$ -アミラーゼを単離精製し、これを結晶状に調製した。この  $\beta$ -アミラーゼについて、等電点、沈降定数などの物理化学的特性や、至適温度、至適pH、安定pH領域などの酵素的諸性質を明らかにし、あわせてこの酵素蛋白が分子量60,000 daltons の単量体であることを明らかにした。そこで分子量200,000 daltons で4量体の高次構造をもつサツマイモ  $\beta$ -アミラーゼと対比しながら、アミロース、マルトヘプタオースを基質として速度パラメータ ( $K_m$ ,  $V$ ) を比較検討した。その結果、ダイコン  $\beta$ -アミラーゼがサツマイモ酵素とは基質特異性を異にすることを認め、この現象を高次構造の差異の観点から考察した。

## 論文審査の結果の要旨

アミラーゼは酵素類のなかで研究の歴史がもっとも古く、とくに応用面での研究報告はきわめて多数にのぼっている。しかし蛋白化学的観点からの構造研究は比較的少なく、ごく二三のアミノ酸残基の機能上の役割を除いて、構造と機能との関連性はほとんど明らかにされていない。著者は米麴を材料として *Aspergillus oryzae* の  $\alpha$ -アミラーゼを、またダイコンを材料として  $\beta$ -アミラーゼをいずれも結晶状に調製して、詳細に物理化学的特性や酵素化学的特質を研究し、その構造と機能との関係について新しい知見を得ている。

*Aspergillus oryzae* の  $\alpha$ -アミラーゼについては、これまでタカジアスターゼを材料として調製されたタカアミラーゼAがもっともよく研究されているが、著者は米麴の酵素がこれに酷似することを明らかにするとともに、前者の構造についてこれまで得られている知見を訂正した。さらに米麴  $\alpha$ -アミラーゼの単結晶を硫酸アンモニウム溶液から調製し、アミラーゼについてはじめてX線結晶学的構造研究への道を開いたことは特筆に値する。

つぎに著者はダイコンからはじめて  $\beta$ -アミラーゼを結晶状に調製したが、この酵素は分子量が小さく単量体であり、これまでもっともよく研究されているサツマイモ  $\beta$ -アミラーゼが高分子量をもち4量体であるのと著しく相異している。この観点から著者はアミロース、マルトヘプタオースを基質とし、両酵素について速度パラメータを詳細に比較検討し、高分子量の基質アミロースに対するダイコン  $\beta$ -アミラーゼの  $K_m$  値がサツマイモ  $\beta$ -アミラーゼにくらべて著しく小さいことなど、基質に対する両酵素の特異性の違いを明らかにしたほか、多くの新しい知見を得て、酵素の構造と機能との関連性を考察している。

以上のように本論文はアミラーゼの構造研究に新しい知見を加えたもので、酵素化学、食品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。