

氏名 近藤 仁司
 学位の種類 農学博士
 学位記番号 農博第310号
 学位授与の日付 昭和54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 ANALYSIS OF AMYLASE REACTIONS USING
 A FLUORESCENCE DYE AS A PROBE
 (蛍光色素をプローブとするアミラーゼ反応の解析)

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

本論文は、蛍光色素 2-*p*-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate (TNS) が、シクロデキストリン及びアミロースなどの多糖類と結合して、その蛍光強度が著しく増大することを発見したことに端を発し、これをプローブとしてアミラーゼ反応を解析する手法を確立した成果をまとめたものである。著者はまず、TNS と α -、 β -、 γ -シクロデキストリンとの相互作用を定量的に研究し、 α -および β -シクロデキストリンの混合系における両者の分別定量法を確立するとともに、 α -アミラーゼによるシクロデキストリンの開環反応が、TNS をプローブとすることにより、選択的に連続的に追跡できることを示し、これを用いてタカアミラーゼ A によるシクロデキストリンの水解反応の速度論的研究を行っている。

さらに、TNS がアミロースおよびマルトオリゴ糖と結合すること、ならびにその蛍光強度の増大が重合度に依存することを見出し、これを利用して、高分子基質のアミラーゼによる解重合過程を追跡する方法として、従来のヨウ素-澱粉反応を用いる青価法にはるかに優る新しい方法を開発した。

この蛍光法により、ブタ膵臓 α -アミラーゼによるアミロースの水解反応を追跡して得た実験的反応曲線と、酵素の活性部位を構成するサブサイトの親和力に基づいてその作用様式を定量的に統一的に解析しようとするサブサイト理論により得た種々の理論曲線とを比較することによって、一回の酵素と基質の出会いにより、同一の基質分子が数回引き続いて切断されるという、いわゆる“multiple attack” (多重攻撃) の機構を詳細に研究し、この蛍光法がアミラーゼ反応の微視的機構の解析に極めて有用であることを示している。

さらに、本蛍光法に加えて、高速液体クロマトグラフィーによる各種生成物の分離定量法を用いて、すでにサブサイト構造が解明されている3種のアミラーゼ (タカアミラーゼ A, 細菌液化型 α -アミラーゼ, 及びグルコアミラーゼ) の各単独系、ならびに2種のアミラーゼの複合系における各種の生成物分布の時間的経過を詳細に追跡し、サブサイト理論によって得た理論曲線と比較して、各酵素の multiple attack の寄与の程度などを評価することにより、反応機構を詳細に究明している。その結果、酵素の活性部位を

構成する数個のサブサイトの親和力と、真の水解反応の速度定数、ならびに multiple attack に関する 2 個の定数という、少数個のパラメーターにより、任意の重合度のアミロースの種々のアミラーゼの単独系ならびに複合系における全反応の時間経過を計算によって予測し得ることを立証している。

論文審査の結果の要旨

アミラーゼは工業的に利用されている酵素の首位を占める重要な酵素であるが、その構造及び反応機構の詳細についてはまだ不明の点が多い。反応機構の究明のために不可欠な、反応の連続追跡の手段に乏しいことが、研究の発展を阻む重要な一因となっている。

著者は、2-*p*-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate (TNS) という蛍光色素が、シクロデキストリンのみならず、アミロースなどの多糖類及びマルトオリゴ糖等と結合してその蛍光強度を著しく増大すること、ならびにその蛍光強度がアミラーゼに対する直鎖状の基質の重合度とよい相関関係にあることを見出した。この蛍光色素をプローブとして、従来から強く要望されていた新しいアミラーゼ反応の連続追跡法を開発するとともに、酵素の活性部位を構成するサブサイトの親和力に基づいてその作用様式を统一的に定量的に解析しようとするサブサイト理論を駆使して、実験的ならびに理論的に、種々のアミラーゼの反応の時間経過を詳細に解析し、注目すべき多くの成果を挙げている。

まず、TNS と α -、 β -、 γ -シクロデキストリンとの相互作用を蛍光を指標として詳細に調べ、その結合様式等を解明するとともに、 α -、 β -シクロデキストリンの混合系における両者の分別定量法を確立したことは、高く評価できる。

この蛍光プローブによるアミラーゼ反応の追跡法は、従来のヨウ素-澱粉反応を用いる青価法に比し、より低重合度の基質にも適用できる点、及び連続測定が可能で、より優れた方法であり、これをブタ膀胱 α -アミラーゼによるアミロースの水解反応に適用することにより、一回の酵素と基質の出会いにおいて、同一の基質分子が数回つづけて切断されるという、“multiple attack”の機構を解明し、この種の研究に極めて有力な方法となることを立証している。

さらに、この蛍光法とともに高速液体クロマトグラフィーを活用して、3種のアミラーゼ（タカアミラーゼ A、細菌液化型 α -アミラーゼ、及びグルコアミラーゼ）の単独系、ならびに2種の酵素の複合系における全反応経過に伴う生成物分布の時間経過を詳細に追跡し、サブサイト理論に基づく計算による理論曲線と比較し、反応の微視的機構を明らかにするとともに、少数個のパラメーターを用いるサブサイト理論による計算が、反応に伴う生成物分布の推移を予測するのに極めて有用であることを実証している。

このように本研究は、TNS という新しいプローブを発見したこと、またこれの活用がアミラーゼ反応の時間経過を理論的および実験的に解明するのに極めて有用であることを示したこと、ならびにサブサイト理論がアミラーゼの工業的利用にも有効に活用できる端緒を開いた点で、高く評価してよいと思われ、酵素化学、酵素工学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。