

氏 名 藤 森 治 子
ふじ もり はる こ

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 博 第 246 号

学位授与の日付 昭 和 51 年 9 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 THE REACTION MECHANISM OF
SACCHARIFYING α -AMYLASE FROM *BACILLUS
SUBTILIS***

(*BACILLUS SUBTILIS* 糖化型 α -アミラーゼの反応機構に関する研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 廣海啓太郎 教 授 千葉英雄 教 授 森田雄平

論 文 内 容 の 要 旨

Bacillus subtilis の糖化型 α -アミラーゼは、1951年、福本らによって結晶化された、分子量42,000の単量体酵素であるが、このアミラーゼは今までに知られている他の α -アミラーゼと著しく異なる数々の特異な作用様式をもつことが知られている。特に α -アミラーゼとしては珍らしく、多量のグルコースを生じること、マルトースよりかなり速かにグルコースを生成すること、およびその速度の基質濃度への依存性が、いわゆるアロステリック酵素に特有と考えられている顕著なS字型を示すことが注目される。本論文は、この酵素のマルトースに対する反応機構を詳細に追究することにより、その速度の基質濃度に対するS字型の依存性——すなわち正の協同性——の発現機構を明らかにするとともに、酵素活性に関連があると考えられるトリプトファン残基の存在状態とその役割を、化学修飾法を用いて解明しようとしたものである。

1. マルトースに対する反応機構に関する研究

まず、マルトースを基質とする本酵素の反応を、高感度旋光計を用いて追跡した結果、反応初期に明瞭なラグの現われることを見出した。さらにペーパークロマトグラフィーにより、その反応経過を詳細に定量的に調べたところ、ラグの間には何の変化も起っておらず、数分間のラグを過ぎた後に、マルトースの減少とともにグルコースの増加が始まるが、これに伴って重合度3および4のマルトオリゴ糖（マルトリオースとマルトテトラオース）が出現し、反応の終結とともに消滅することを見出した。さらに反応系に少量のマルトリオースを添加すると、ラグの消失することが認められた。

これらの結果にもとづき、本酵素のマルトースに対する反応機構を次のように推定した。すなわち、本来この酵素のマルトースに対する作用は非常におそいが、かなり強い転移作用を有するため、一度マルトリオースが少量でも生成すると、これが基質となって速かに転移および水解反応が進行し、これとマルトテトラオースとの間に反応サイクルが形成され、マルトースを受容体として消費しつつグルコースを生成するというものである。反応初期に認められたラグは、反応進行の引き金の役目を演ずるマルトリオ

ースが臨界濃度に達するまでの潜在期間に相当する。この反応機構にもとづき、サブサイト理論を活用して計算機によるシミュレーションを行った結果、反応曲線にラグを生じること、および定常状態の速度が基質初濃度に対してS字型の依存性を示すことが、いずれもよく再現され、これによって反応機構の妥当性が立証された。すなわち、ここに見られた正の協同性というアロステリックな挙動は、従来考えられていたような酵素蛋白の立体構造変化によるものではなく、その特異な反応機構自体から生じることが明らかに示された。

2. 化学修飾による研究

N-ブロモサクシンイミド(NBS)によるこの酵素のトリプトファン残基の化学修飾を、酵素の光吸収および蛍光を指標として、静的に観察するとともに、高速反応の測定技術として重要なストップフロー法を用いて速度論的に研究し、また種々の基質についてこの化学修飾の効果を比較検討した。その結果、この酵素のもつ4個の露出したトリプトファン残基の中で、二番目に反応性が高いと推定される残基が、この酵素の転移作用に何等かの寄与をしていることを見出し、その存在位置をも推定した。

論文審査の結果の要旨

Bacillus subtilis の生産する糖化型 α -アミラーゼは、デンプンより多量のグルコースを生成する特異な α -アミラーゼで、これを用いて製造した水飴は独特の風味をもつといわれており、食品工業への利用も有望視されている酵素である。この酵素は分子量42,000の単量体酵素であるが、種々の特色ある作用様式を示すことが知られている。中でも注目されるのは、そのマルトースに対する反応の速度が、顕著な正の協同性——すなわちS字型の基質濃度依存性——を示すことである。このような挙動は、いわゆるアロステリック酵素の特徴とされており、アロステリック酵素に関する現存の理論は、いずれも酵素蛋白の立体構造変化がその成因であるとしている。強い正の協同性は、複数個のサブユニットからなる多量体酵素に多く認められているが、単量体酵素において本酵素ほど強い正の協同性の見られた例はほかになく、その発現機構は酵素反応の一般的な問題としてもきわめて重要である。またその反応機構の解明は、本酵素の利用面においても、その特異な作用様式を活用するために大いに有意義と考えられる。

本論文はこの酵素の反応機構を二つの面から解明しようとしたものである。第一にマルトースを基質とする反応の機構を詳細に究明すること、第二に本酵素の活性に関係があると考えられるトリプトファン残基の存在状態とその役割を明らかにすることである。

マルトースを基質とする反応については、高感度旋光計ならびにペーパークロマトグラフィーによる定量分析を用いて、その反応の時間経過を詳細に追跡した。その結果、反応初期にラグの現われること、および反応の中間体として重合度3および4のマルトオリゴ糖(マルトトリオースとマルトテトラオース)の生じることを見出し、さらに少量のマルトトリオースの添加によってラグの消失することを見出した。これらの結果にもとづき、加水分解とともに転移および縮合を含む一般的な反応機構を想定し、計算機によるシミュレーションを行ってその妥当性を立証し、ラグの成因ならびに顕著な正の協同性の発現機構を解明することに成功した。これによって、この酵素の示す正の協同性は、従来考えられていたように酵素蛋白の立体構造変化によるのではなく、この酵素の特異な反応機構自体に起因するものであることが明ら

かとなった。これらの成果は、この酵素の特色ある作用様式の基礎をなす反応機構を明らかにした点できわめて有意義であるばかりでなく、アロステリック酵素の挙動に対して新しい解釈を与えたものとして注目される。

またトリプトファン残基の存在状態とその役割の研究に関しては、静的な研究方法とともに、高速反応の測定技術を用いる新しい速度論的な方法を活用することにより、4個の露出したトリプトファン残基のうちの1個（恐らくは二番目に反応性に富むもの）が、この酵素の転移作用に寄与していることを見出し、その存在位置を推定している。

このように本研究は、*Bacillus subtilis* の糖化型 α -アミラーゼのマルトースに対する反応、およびトリプトファン残基の存在状態と役割につき、詳細な解析を行い、本酵素の特異な反応機構を明らかにするとともに、アロステリック酵素の一般的な問題にも有用な新知見を加えたもので、酵素化学および食品工学の分野に貢献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。