

氏 名	大 西 正 健 おおにし まさ たけ
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理 博 第 197 号
学 位 授 与 の 日 付	昭 和 45 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	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Spectrophotometric and Kinetic Studies on Interaction of Bacterial α-Amylase and its Substrates (細菌 α -アミラーゼとその基質との相互作用に関する分光光度法および反応速度論による研究)

論文調査委員 (主 査)
教 授 波多野博行 教 授 大杉治郎 教 授 香月裕彦

論 文 内 容 の 要 旨

枯草菌の産生する α -アミラーゼは液化型と糖化型との酵素があってそれぞれ相異なる基質特異性をもっている。酵素が触媒作用を発現するに当ってはその酵素と基質との結合部位のアミノ酸残基の種類とその立体的な配置に大きく依存し、活性中心と基質との相互作用の特異性によって発現されるものと考えられる。

この問題を解明するために申請論文においては分光光度法とくに示差スペクトル法を用い、またこの微細構造を明らかにするために反応速度論的な検討を加えた。

主論文第1部においては基質あるいはその同族体と酵素との複合体の形成を速度論的ならびに分光光度法によって研究しこの複合体形成に関与するアミノ酸残基を明らかにし基質との結合部位の特異性を検討した。この研究においてはアミロースを加水分解する枯草菌の液化型 α -アミラーゼを研究対象とし7個のグルコースの環状デキストリンである β -シクロデキストリンとマルトース、およびグリコースがこの酵素の加水分解作用を拮抗的に阻害することを見出した。

この阻害反応における K_i 値及びこれら基質同族体と酵素との複合体の形成による自由エネルギー変化を計算した結果グルコース、マルトース、 β -シクロデキストリンの $-\Delta G^\circ$ 値から各基質によって占有される活性中心の Subsite の数を推定した。

その結果から基質同族体の大きさの違いを利用して、占有される Subsite の特性を分光光度法によって区別し、示差スペクトルを利用してチロシンの25残基のうち5~6残基が、また Sol-vent perturbation 法によってトリプトファンの15残基のうち8~9残基が露出し得る状態にあることを明らかにした。グルコース、マルトース及び β -シクロデキストリンと酵素との相互作用による見かけの分子差吸光係数と真の分子差吸光係数とを求めて β -シクロデキストリンの濃度に対する Line-weaver-Burk のプロットから酵素-阻害剤複合体の解離定数を求めると反応速度論的方法による阻害剤との結合定数 K_i の値とよく一致した。またこのプロットから求めた分子差吸光係数の値から β -シクロデキストリンの結合によりトリプト

ファン及びチロシン各約1残基がマスクされることが明らかとなった。

主論文第2部においては枯草菌糖化型 α -アミラーゼを用いその基質としてマルトースを選び基質と酵素との相互作用を分光光度法によって研究し、この酵素が基質マルトースの添加によって特異的な示差スペクトルを生ずることを見出した。 $\Delta\epsilon_{app}^{293m\mu}$ を算出してエチレングリコールによる非特異的 Solvent perturbation の $\Delta\epsilon$ を差し引き特異的相互作用による真の $\Delta\epsilon$ を求めた。主論文第1部におけると同様なプロットから求めた酵素-基質複合体の解離定数は反応速度論から求めた K_m 値と一致することからこの示差スペクトルがマルトースと酵素との特異的相互作用によるものであることを明らかにした。またその示差スペクトルの形と大きさからトリプトファン及びチロシン各約1残基がマルトースの酵素との結合によってマスクされることを明らかにした。

参考論文その1は細菌 α -アミラーゼのモノヨード酢酸による化学修飾が共存するイオン種により異なることを指摘し、リン酸イオン共存下ではリン酸イオンによってカルシウムが除去されメチオニン残基がモノヨード酢酸と反応してタンパク質の変性が起こり失活沈殿することを示した。

その2は酢酸イオン共存下におけるモノヨード酢酸による化学修飾を行なうと失活するが、どのアミノ酸残基とも反応せず沈殿も生じない。旋光分散測定及び分光学的滴定の結果から失活の原因となっている構造変化がみとめられた。

その3はタンパク質中の酸アミドとアンモニアを分離定量するために微量廻転拡散法とインドフェノール法とを組み合わせて95%以上の精度で分析できる方法を確立した。

論文審査の結果の要旨

細菌、殊に枯草菌の産生する α -アミラーゼにはいわゆる液化型と糖化型と称せられる異種の酵素があってそれぞれ相異なる基質特異性を有することが知られている。この相異は酵素とその基質との結合部位を構成するアミノ酸残基の種類とその立体的な配置に依存した活性中心と基質との相互作用の特異性によるものと考えられる。酵素作用におけるこの基質特異性は酵素の基質結合部位における基質の特異的選択に外ならない。従って基質結合部位の特性を明らかにすることは酵素の作用機構を理解する上で最も重要な課題である。

この問題を解明するために従来は化学的修飾法が用いられてきたがこの方法は活性に関与するアミノ酸残基の種類やその数を明らかにし得るにすぎない。申請者によって用いられた分光光度法、とくに示差スペクトル法はこの問題を解明するのに極めて有効な方法であって、これに反応速度論的な検討を加えることによってこの問題を解決するために新しい方法論が確立されている。主論文第1部においては基質とその同族体と酵素との複合体の形成を速度論的ならびに分光光度法によって研究しこの複合体形成に関与するアミノ酸残基を明らかにし基質との結合部位の特異性を論じている。この研究においては枯草菌の液化型 α -アミラーゼがアミロースを分解するに際して7個のグルコースの環状デキストリンである β -シクロデキストリンとマルトース、およびグルコースが拮抗的阻害を起すことを見出している。

この阻害反応における K_i 値及びこれらの基質同族体と酵素との複合体の形成による自由エネルギー変化を計算し、基質と結合する酵素の活性中心の Subsite の数を推定している。またその結果から基質同族

体大きさの違いを利用して、これによって占有される Subsite の特性を分光光度法によって区別できる可能性が考えられる。その方法の一つとしてタンパク質のトリプトファンおよびチロシン残基の存在状態の変化に起因する示差スペクトルを利用して活性中心に含まれるアミノ酸残基の数と存在状態に関する知見をえている。さらにこれらの基質と酵素との相互作用による見かけの分子差吸光係数 $\Delta\epsilon$ が基質 β -シクロデキストリンと酵素の活性部位との特異的な相互作用に起因するものであることが立証されている。またその値から基質と酵素との結合によってマスクされるアミノ酸残基の数が明らかにされた。

グルコース、マルトース及び β -シクロデキストリンの阻害の強さ及びこれらによって生じる差スペクトルの違いを総合して考察するとこれらのアミノ酸残基がグルコース及びマルトースの結合する Subsite ではなく β -シクロデキストリンの結合する Subsite に存在することが結論されている。

主論文第2部は枯草菌糖化型 α -アミラーゼを用いその基質としてマルトースを選び基質と酵素との相互作用を分光光度法によって研究したものである。マルトースは加水分解速度がきわめて遅いので示差スペクトルを測定して酵素と基質との結合を明らかにするのに最も適当な系である。この研究において申請者はこの酵素が基質マルトースの添加によって特異的な示差スペクトルを生ずることを見出した。また主論文第1部と同様にしてその示差スペクトルの形と大きさからトリプトファン及びチロシン各約1残基がマルトースの酵素との結合によってマスクされることが示され、また $\Delta\epsilon$ 値のpH依存性からpK 6及び4付近の解離基を持つアミノ酸残基がこの基質複合体に関与していることが明らかにされた。

参考論文はいずれも細菌 α -アミラーゼのモノヨード酢酸による化学修飾を取扱ったもので、共存するイオンが磷酸の場合と酢酸の場合でその失活の機構が異なる事を見出し酵素の構造の変化を論じたものである。なお、この種の研究に用いられるタンパク質中の酸アミドとアンモニアとの分離定量法を確立している。

要するに、申請者は極めて巧妙な新しい物理化学的方法を用いて酵素と基質との相互作用を研究し、困難なその相互作用の機構を明らかにし、数々の興味ある貴重な知見を酵素の物理化学の分野に加え、この研究領域の発展に寄与するところが少なくない。また主論文、参考論文を通じて申請者が生物化学および物理化学に豊富な知識と優れた研究能力とをもちていることを認めることができる。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。