

氏 名	功 刀 滋 く ぬぎ しげる
学位の種類	工 学 博 士
学位記番号	工 博 第 552 号
学位授与の日付	昭 和 53 年 5 月 23 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	工 学 研 究 科 高 分 子 化 学 専 攻
学位論文題目	Study on the Mechanism of Enzyme Catalysis : Synthetic Polyelectrolytes and Chymotrypsin (酵素触媒機構に関する研究：合成高分子電解質および キモトリプシン)
論文調査委員	(主 査) 教 授 伊 勢 典 夫 教 授 中 島 章 夫 教 授 福 井 三 郎

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は合成高分子電解質およびキモトリプシンの触媒作用機構を明らかにする目的で行なわれた著者の研究をまとめたもので二編十章からなっている。

第一編第一章では、無機イオン間反応の速度に対する高分子電解質の添加効果における各種相互作用の寄与について概観し、さらに第二章から第四章において述べられる高分子電解質の触媒作用の研究の位置づけ、さらにそれに利用される測定装置の詳細な記述を行なっている。

第二章においては、 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$ と種々の $\text{Co}(\text{III})$ 錯体 [$\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Br}^{2+}$, $\text{cis-Co}(\text{en})_2\text{NH}_3\text{Cl}^{2+}$, $\text{cis-Co}(\text{en})_2\text{H}_2\text{OCl}^{2+}$, $\text{cis-Co}(\text{en})_2\text{pyCl}^{2+}$, $\text{trans-Co}(\text{en})_2\text{Cl}_2^+$, en : エチレンジアミン, py : ピリジン] の間の外圏型電子移動反応について述べている。すなわちこの反応をポリエチレンスルホン酸ナトリウム塩 (NaPES) あるいはポリスチレンスルホン酸ナトリウム塩 (NaPSS) の存在下において進行させ、これら高分子イオンにより反応が顕著に増加することを報告し、この加速の度合が $\text{Co}(\text{III})$ 錯体の電荷数と錯体配位子の種類によりいかに変化するかを調査している。また、反応の活性化パラメーターの決定により、反応速度がエントロピー的であるか、あるいはエンタルピー的であるかを検討し、その結果を内圏型電子移動反応の場合と対比させている。

第三章にあっては、 Ni^{2+} と各種錯体形成配位子 [フェナントロリン, ジピリジル, ピリジン-2-アゾ-P-ジメチルアニリン, ムレキシド] との間の錯体形成反応に対する高分子電解質の添加効果を調査し、反応素過程の速度 (生成速度, 解離速度) に対する影響を記述している。また疎水性残基を有する高分子電解質について活性化パラメーターを決定し、反応加速の原因を検討している。

第四章では、いわゆる Zincke 反応の機構の判定に高分子電解質触媒作用を利用することを提案している。一般的傾向としてカチオン間反応はアニオン性高分子イオンにより、アニオン間反応はカチオン性高分子イオンにより大きく加速され、またカチオン-アニオン間反応はいずれの高分子イオンによっても大きく減速を受けることが判明している。この章ではこのことを利用し、イオン性反応中間体の生成、ある

いは消滅速度に対する高分子電解質の添加効果を調査することにより、当該反応中間体の荷電の有無、その符号を決定する方法が記述されている。

第五章～第十章は第二編を構成し、 α -キモトリプシンによる加水分解反応の機構の研究が中心になっている。第五章では β -(2-フリル) アクリロイル基を種々の基質に導入することにより、反応中の基質の変化を直接光学的に観測し、いわゆる非定常状態速度論を用いて、反応機構を決定する方法を記述している。

第六章では、フリルアクリロイルトリプトファンメチルエステルの加水分解反応を広い pH 領域で測定し、速度定数、ミカエリス定数を決定している。この結果、いわゆる三段階機構にしたがって反応が進むものと結論している。

第七章においては、チロシンメチルエステル、フェニルアラニンメチルエステル、ロイシンメチルエステルについて反応パラメータを決定し、これまでに他の方法により推定された値との比較を行い、本研究において基質に導入されたフリルアクリロイル基の役割を議論している。

第八章では非特異的発色性基質の一つ (N-インドールアクリロイルイミダゾール) を用い、アシル化キモトリプシンの紫外吸収を正確に分析している。この研究により pKa 値を決定し、脱アシル化過程を支配していると考えられる解離基のそれと比較している。Trp, Tyr および Phe の誘導体については、ミカエリス錯体をスペクトル法により確認し、違ったコンホメーションを有する二つの化合物の混合系であることを推論している。

第九章では、各種の特異的および非特異的基質の加水分解反応の熱力学的パラメーターを決定し、特異的基質の脱アシル化過程の活性化エネルギーを比較し、その速度がエントロピー支配であると結論している。非特異的基質についても考察し、この場合、アシル化過程が大きな活性化エネルギーと活性化エントロピーを示すことを報告している。

第十章では以上の各章において得られた知見にもとづき詳細な反応機構が報告され、非平衡仮定、三段階モデル等の概念が検討され、その限界が討論されている。

論文審査の結果の要旨

本論文は合成高分子電解質およびキモトリプシンの触媒作用機構に関する実験的研究結果をまとめたもので得られた結果は次のとおりである。

1) $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$ と二、三の $\text{Co}(\text{III})$ 錯体間の外圏型電子移動反応はポリエチレンスルホン酸ナトリウム塩 (NaPES) やポリスチレンスルホン酸ナトリウム塩 (NaPSS) の添加により加速される。加速因子は100倍程度であり、 $\text{Co}(\text{III})$ 錯体の電荷数が大きい程高いが、配位子の種類によらない。またこの加速は活性化エントロピーの減少に起因し、内圏型電子移動反応の場合と対照的である。

2) Ni^{2+} の錯体形成反応はアニオン性配位子の場合高分子イオンにより減速されるが、平衡定数は変化しない。非イオン性配位子では、NaPSS が正反応速度定数を増大させる。この変化はエンタルピー的要因にもとづくものである。

3) 高分子電解質の触媒作用の利用により Zincke 反応の第一段階はカチオン性中間体と OH^- との反

応であり、次に生成した中間体が第二段階において疎水性、かつカチオン性のアミンと反応していることが明瞭にされた。

4) フリルアクリロイル基を導入した発色性のトリプトファンメチルエステルのキモトリプシンによる加水分解反応の素反応速度定数、ミカエリス定数を決定し、反応が三段階機構にしたがうことを確認した。またこの基質は 10^{-6} M 程度の非常に小さいミカエリス定数を持つことを見出した。さらにチロシン、フェニルアラニン、ロイシンの誘導体についても同様の解析を行い、基質の特異性が結合過程、アシル化過程、脱アシル化過程において必ずしも同一順位で出現しないことを認めた。

5) 上記の発色性基質を用い、それらの加水分解反応におけるミカエリス錯体をスペクトル法により確認することに成功した。

6) 特異的および非特異的基質の熱力学パラメーターを決定し、特異的基質については脱アシル化過程は同じ活性化エネルギーをもち、またエントロピー因子により支配されるが、この事情は非特異的基質の場合と明瞭に相異していることを見出している。以上の知見を総合し、トリプトファンエステルについて反応開始より終了にいたる間のエネルギー図を作成し、これより酵素触媒作用の高効率性がエントロピー項に由来し、基質結合による酵素の活性部位からの水分子の除去が重要な因子であると結論している。

以上要するに本論文は、合成高分子電解質と酵素の触媒機構に関して、非定常状態法を利用した実験的研究成果を記述したもので、反応機構の理解を一段と深める重要な示唆を与えており、学術上、工業上寄与するところが少なくない。

よって、本論文は工学博士の学位論文として価値あるものと認める。