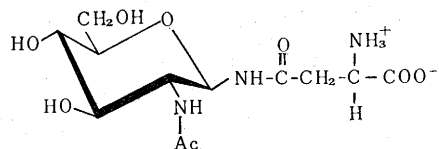


氏 名	田 中 教 男
	た な か みち お
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	薬 博 第 123 号
学位授与の日付	昭 和 49 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 製 薬 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	種々のアスパルチルグリコシラミンの合成, 性質, 酵素分解の研究

論文調査委員 (主 査) 教授 山科郁男 教授 富田謙吉 教授 矢島治明

論 文 内 容 の 要 旨

糖タンパクにおける糖とアミノ酸の結合様式の代表的なものとしてアスパルチルグリコシラミン結合が多くの糖タンパクに見出されている(右図参照)。アスパルチルグリコシラミンのアミド結合を切断する酵素, 4-L-アスパルチルグリコシラミン アミド ヒドロラーゼ(アミダーゼと略称)



Asn—GlcNAc の構造式

が見出され, 種々の起源のものについて精製と性質の検討がなされてきた。その結果, 酵素の作用様式, 基質特異性に関して重要な事実が明らかにされたが, 基質の糖部分に対する特異性に関しては未だ充分に明らかにされていない。また, アスパルチルグリコシラミンとしては糖部分がN-アセチルグルコサミンのもの(Asn—GlcNAc と略称)しか天然に見出されておらず, この型の化合物の一般的性質に関しては知られていない。著者は種々のアスパルチルグリコシラミンを合成し, その性質を検討すると共にアミダーゼの特異性に関して研究を行なった。

まず, Asn—GlcNAc の糖部分をN-アセチルガラクトサミン, ガラクトース, マンノース, ベンゼン, シクロヘキサンに置換したもの(それぞれ, Asn—GalNAc, Asn—Gal, Asn—Man, Asp—AN, Asp—CHA と略称)を合成した。合成は, アセチル基で保護した糖の1-アミノ誘導体またはアニリン, シクロヘキシルアミンと1-カルボキシル基, 2-アミノ基を保護したアスパラギン酸誘導体をDCCを用いて縮合させ, 次いで保護基をはずすという方法によった。

これらの合成アスパルチルグリコシラミンのアノマー構造は合成の経路, および生成物の旋光度, ORD スペクトル, NMR スペクトルに基いて, いずれもβ型であると結論した。

合成化合物の酸, アルカリに対する安定性を調べた。すなわち, N HCl または0.2N NaOH中, 100°Cで遊離するアスパラギン酸を経時的に定量し, 加水分解反応が1次反応に従うことを確かめたのち反応速度定数kを求め, それを指標として各化合物のアスパルタミド結合の酸, アルカリに対する安定性を論じ

た。酸性条件では, Asn—GlcNAc, Asn—GalNAc, Asn—Gal, Asn—Man, Asp—AN は k 値が $3.2 \sim 7.1 \times 10^{-3}$ (min^{-1}) とほぼ同程度の安定性を示したが, Asp—CHA は k 値が 0.46×10^{-3} と非常に安定であった。アルカリ性でもほぼ同じ傾向 (Asp—CHA が 0.15×10^{-3} , その他は $1.4 \sim 2.8 \times 10^{-3}$) を示したが, 例外的に Asn—Man の k 値が 51.3×10^{-1} で, アルカリ性では Asn—Man が他の化合物に比して著しく不安定なことを示した。これはマンノースの 2 位に axial OH 基が存在するためであろうと推定した。

ブタ血清よりアミダーゼの精製をすすめ, およその分子量 ($85,000 \sim 90,000$) と等電点 ($4.22 \sim 4.55$) を求めた。

このアミダーゼおよびブタ腎臓から精製されたアミダーゼを種々のアスパルチルグリコシラミンおよび類似物質に作用させて基質特異性を調べた。その結果, ブタ血清および腎臓のアミダーゼは共に, Asn—GlcNAc の他に Asn—Glc (糖部分がグルコース), Asn—GalNAc, Asn—Gal, Asn—Man をも分解したが, 最大速度 $V_{\max}$, ミハエリス定数 K_m は基質により, また酵素により異なっていた。血清アミダーゼの場合 Asn—GlcNAc, Asn—Glc, Asn—Man, Asn—Gal に対する $V_{\max}$ はほぼ等しく, Asn—GalNAc に対しては低かった。腎臓の酵素では Asn—Gal に対する $V_{\max}$ が低い以外は血清の酵素とほぼ同じ傾向を示した。 K_m は, 血清の酵素では Asn—GlcNAc と Asn—Glc が等しく, Asn—GalNAc, Asn—Gal は高く, Asn—Man が中間の値を示し, 腎臓の酵素では, Asn—GlcNAc, Asn—GalNAc, Asn—Glc がほぼ等しく, Asn—Man, Asn—Gal は中間的な値を示した。

アミダーゼはこのほかアスパラギン, アスパルトヒドロキサム酸, アスパルトヒドラジドをも遅い速度ではあるが分解した。Asp—AN および Asp—CHA は分解されなかったが, 種々のアスパルチルグリコシラミンの分解を拮抗的に阻害した。また, 種々のアスパルチルグリコシラミンは互いにアミダーゼによる分解を拮抗的に阻害した。このときの見掛けの阻害物質定数 K_i はそれぞれ分解時の K_m ともよく一致していた。従って, 種々のアスパルチルグリコシラミンと類似物質がすべて同一の酵素によって分解されることが明らかとなった。

これらの結果より, アミダーゼはアスパルチルグリコシラミンの糖部分については低い特異性しか示さず, アスパラギン部分に高い特異性を有する酵素であると結論された。事実, ヒドロキシルアミン存在下で Asn—GlcNAc に作用させることによってアミダーゼは, *E. Coli* やモルモット血清のアスパラギナーゼと同様, 反応中間体としてアスパルチル—酵素結合物を生成した。しかし, アスパラギンに対する作用は弱く, 従来から知られている *E. Coli* や *Proteus vulgaris* 由来のアスパラギナーゼとは異なるものであった。これらのアスパラギナーゼは Asn—GlcNAc を分解しなかった。

以上, 種々のアスパルチルグリコシラミンと類似物質の合成と性質の検討およびアミダーゼの特異性を明らかにしたことは, 糖タンパクの生化学的研究のために意義あることと考えられる。

論文審査の結果の要旨

アスパルチルグリコシラミンは糖タンパク質に見られる糖とアミノ酸の結合様式としては代表的なものである。その分解は糖タンパク質異化の 1 段階として重要であるが, 分解を行なう酵素の作用機作につい

ては不明な点が多かった。

本論文においてはアスパルチルグリコシラミン分解酵素の基質特異性を明らかにすることを主たる目的として、天然に存在する、アスパルチル—N—アセチルグルコサミンのほか種々の糖を含むアスパルチルグリコシラミンおよびその類似物質が合成された。合成物については種々の物性定数を測定して意図した構造をもつものであることを確かめ、さらに酸、アルカリ中での安定度も調べられている。

ブタ血清および腎臓から精製された分解酵素は種々の速度で、合成したすべてのアスパルチルグリコシラミンを分解し、さらに、アスパラギン、アスパルトヒドロキシラミン、アスパルトヒドラジドをも僅かながら分解することが明らかにされた。これらのことから、酵素は糖部分よりもアスパラギン部分に強い親私性をもつことが推定された。さらに、ヒドロキシラミン存在下でのアスパルチルグリコシラミンの分解の追跡から、アスパルチルグリコシラミンは「アスパルチル—酵素、中間体を経て分解されるという反応機作が提出されるに至った。このように、糖タンパク質の異化の1段階の機作が明らかにされたことは生化学にとって貢献するところが少くない。

また、種々のアスパルチルグリコシラミンの種々の物理的・化学的性質が明らかにされたことは、今後、糖タンパク質における新たな結合様式を検索する際の有力な手掛りを与えるものである。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。