

|             |                                                                                                                                      |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | 檜 山 圭 一 郎<br>ひ やま けい いち ろう                                                                                                           |
| 学 位 の 種 類   | 工 学 博 士                                                                                                                              |
| 学 位 記 番 号   | 論 工 博 第 1012 号                                                                                                                       |
| 学位授与の日付     | 昭 和 52 年 9 月 24 日                                                                                                                    |
| 学位授与の要件     | 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当                                                                                                              |
| 学 位 論 文 題 目 | <b>Studies on Bacterial Chondroitinases</b><br>— <b>Enzyme Chemistry and Applications</b> —<br>(細菌のコンドロイチナーゼに関する研究)<br>— その酵素化学と応用 — |

論文調査委員 (主査) 教 授 福 井 三 郎 教 授 松 浦 輝 男 教 授 田 伏 岩 夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は細菌のコンドロイチナーゼに関する研究と題し、その酵素の化学的性質と応用の可能性について著者が行なった研究を緒論、本論 8 章および結論にまとめたものである。

緒論では本研究の歴史的背景、動機、目的および研究成果の概要が述べられている。コンドロイチン硫酸は動物の組織中に存在し、その生理的な意義、病態との関連が最近明らかになりつつある。このような基礎医学の研究の上でコンドロイチナーゼは分析用酵素として重要性を増してきている。そこで著者は細菌起源のコンドロイチナーゼを研究の対象とし、その酵素の一般的性質を解明することにより、酵素化学的基礎および応用に新知見を提供しようとして、この研究を企てたものである。

第 1 章はコンドロイチナーゼ生産菌の検索方法、単離した菌株の菌学的性質、その菌によるコンドロイチナーゼの生産条件の検討を行なっている。そこで得られた *Arthrobacter aurescens* の一菌株が、コンドロイチン硫酸あるいはその消化物によって適応的に著量のコンドロイチナーゼを分泌することが明らかにされている。第 2 章ではこの菌のコンドロイチナーゼの精製・結晶化の方法と、酵素の性質について検討している。このコンドロイチナーゼは、ヒアルロン酸に最もよく作用するが、コンドロイチン硫酸 A, C およびコンドロイチンにも作用してほぼ完全に不飽和 2 糖まで分解することから、コンドロイチン硫酸 AC リアーゼであると結論している。第 3 章にはコンドロイチナーゼのアミノ酸組成、分子量、2 次構造について述べられている。この酵素はサブユニットを持たず、活性基としてスルフヒドリル基を含み、若干の糖を結合していることが明らかにされている。

第 4 章では起源の異なる 2 種のコンドロイチナーゼ AC として著者の得た *Arthrobacter aurescens* の酵素と *Flavobacterium heparinum* の酵素の作用様式を検討し、同じようなエンド型酵素であっても詳細な作用様式の点で前者は逐次分解型、後者はランダム分解型であり、前者の作用が化学修飾による基質の部分的な構造変化の影響を受けやすいことを明らかにしている。

第 5 章では基質の数平均重合度と粘度平均重合度の測定値よりエンド型酵素の多重攻撃の回数を計算

する一般式を導き、この式を用いて2種のコンドロイチナーゼ AC の作用の違いを数値で表現している。第6章では著者が単離した菌のコンドロイチナーゼの作用に及ぼすイオン強度の影響を調べ、イオン強度が酵素・基質複合体の解離定数に影響を及ぼすこと、すなわちイオンが基質の形状を変えて活性化し、一方酵素に拮抗的に結合することが推論されている。コンドロイチン硫酸中のウロン酸のカルボキシル基がエピマーである デルマトン硫酸によってコンドロイチナーゼ AC が拮抗阻害を受けることも明らかにされている。起源の異なる2種のコンドロイチナーゼの酵素・基質複合体の解離が生成物を生じる反応よりも非常に速いと仮定して求めた熱力学パラメーターより、酵素・基質複合体形成を導く力は、*Arthrobacter* の酵素ではイオン性の相互作用であり、*Flavobacterium* の酵素では疎水性の相互作用であると推定し、さらにエンド型酵素の作用様式とこれらの相互作用の種類との関連性を考察している。

著者が単離した菌のコンドロイチナーゼは、培養条件の変化に伴い等電点の異なる3成分に変化する。第7章は、これらの成分のアミノ酸組成、分子量、酵素的性質には差異がなく、糖含量にのみ差が認められることから、これらの成分がコンドロイチナーゼ AC の多形であることを証明している。第8章ではこれらの多形の変換について述べられている。最初に生産された糖鎖を含む酵素にさらに糖残基が結合することと、一方最初の酵素より糖残基が遊離することにより、培養液中での多形の変換が起ることを証明し、多形発現の1つのモデルを提示している。

結論では、細菌のコンドロイチナーゼの応用の現状と将来について述べられている。現在の用途である分析用酵素としては、著者が新たに単離した菌のコンドロイチナーゼの方が従来用いられてきた酵素よりも多くの優れた性質を有していることと、将来この酵素の応用面として医療用、畜産用、食品加工用などの広範囲にわたっての可能性があると述べられている。

### 論文審査の結果の要旨

近年、ムコ多糖の生理的機能が解明されるにつれて、ムコ多糖分解酵素の基礎及び応用に関する知識の重要性が増大してきている。本論文は細菌起源のコンドロイチナーゼについて、酵素化学的に詳細な研究を行うとともに応用面の発展に役立つ知見を提供している。得られた主要な成績は以下のごとくである。

(1) 土壌より *Arthrobacter aurescens* の新菌株を分離し、この細菌をコンドロイチン硫酸またはその酵素分解産物を含む培養液に培養すれば著量のコンドロイチナーゼが生産されることを発見し、培養の最適条件を設定した。

(2) 本菌の生産するコンドロイチナーゼを精製結晶化し、分子量 (76,000)、構成アミノ酸組成、高次構造を明らかにし、若干の糖が結合した糖たん白質であることを示した。この酵素は、基質特異性の点からコンドロイチン硫酸 AC リアーゼに属するものであるが、従来知られている *Flavobacterium* 属細菌の酵素に比較し、生産量・精製の容易さ・安定性が優れ、基質類似物質による阻害を受けない点に特長が認められた。

(3) 起源の異なる2種の細菌コンドロイチナーゼ AC である *Arthrobacter* 酵素と *Flavobacterium*

酵素の性質を比較し、基質にたいする作用様式が前者は逐次分解型、後者はランダム分解型であり、前者の作用が基質の部分的な構造変化による影響を受けやすいことを明らかにした。さらに、基質にたいする酵素の多重攻撃の回数を計算するための一般式を基質の数平均重合度と粘度平均重合度の測定値より導き、この式を用いて2種のコンドロイチナーゼACの作用様式の相違を数値的に示した。また、酵素・基質複合体の形成を起こす力が *Arthrobacter* 酵素ではイオン性の相互作用であり *Flavobacterium* 酵素では疎水性相互作用によることを示す実験成績を得た。

(4) *Arthrobacter* コンドロイチナーゼACは培養条件の変化に伴って等電点の異なる3つの型を与えることを観察し、これらの多形の変換は酵素分子に含まれる糖部分の鎖長が酵素作用により変化するためであることを示した。

以上のように明らかにされた細菌コンドロイチナーゼの性質は、本酵素を医学分野においては臨床検査、治療薬として、食品加工分野では拡散促進剤などとして応用するための基礎となるものである。

以上を要するに、本論文は学問的にも応用面でも有用な細菌コンドロイチナーゼに関する興味深く重要ないくつかの知見を与えたものであり、学術上ならびに実用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。