

Title	タカアミラーゼAの基質特異性に関する研究
Author(s)	伊勢村, 護
Citation	大阪大学, 1968, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/2634">https://hdl.handle.net/11094/2634</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	伊 勢 村 護 い せ むら まもる
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 1 5 3 0 号
学位授与の日付	昭 和 43 年 9 月 17 日
学位授与の要件	理学研究科有機化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	タカアミラーゼAの基質特異性に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 松 島 祥 夫 (副査) 教 授 金 子 武 夫 教 授 成 田 耕 造 助 教 授 池 中 徳 治

### 論 文 内 容 の 要 旨

タカアミラーゼA (TAA) は  $\alpha$ -1.4 グルカンの内部のグリコシド結合を無秩序に加水分解し、生成物としてグルコースやマルトースその他のデキストリンの  $\alpha$ -アノマーを与える  $\alpha$ -アミラーゼとして分類されている。1951年にこの酵素が結晶化されて以来、数多くの研究が行われてきたが、その基質特異性については、酵素反応機作の解明に重要な意味をもつにもかかわらず、不明な点が多く残されている。

本研究は、O-メチル化によって化学修飾した基質の TAA 触媒下の加水分解反応を追究することによって、基質中の水酸基を TAA 作用を受けるのに、必須なものと O-メチル置換を受け得るものとに分別して、TAA の基質特異性の一部を明らかにしたものである。第一章では、天然の基質、アミロースを用いて部分 O-メチル化アミロース (MA) を調製し、TAA との反応を調べた。MA の TAA- 消化物を  $\text{NaBH}_4$  で還元したものの化学組成をガスクロマトグラフィーで分析すると、糖アルコールとして検束されたものは、グルシトールのみであること、また 2-O-メチルおよび 6-O-メチルグルコース残基の存在比には、酵素反応前と比べて変化がないこと、などから MA 中の 2-O-メチル および 6-O-メチルグルコース残基のグリコシド結合は加水分解されず、無置換グルコース残基のグリコシド結合のみが TAA の作用を受けたものと推定した。

MA の TAA-消化物をペーパークロマトグラフィーを用いて分離すると、単糖としては、グルコースのみが検出され、2-O-メチルや 6-O-メチルグルコースは全く検出されなかった。その他に分離されたオリゴ糖も、その還元末端はすべてグルコース残基であった。O-メチル基含量の異なる 4 種の MA 標品の TAA による加水分解率は、無置換グルコース残基を多く含むものほど大きく、こうした諸事実は MA 中の無置換グルコース残基のグリコシド結合のみが、TAA 作用を受けることを強く示している。

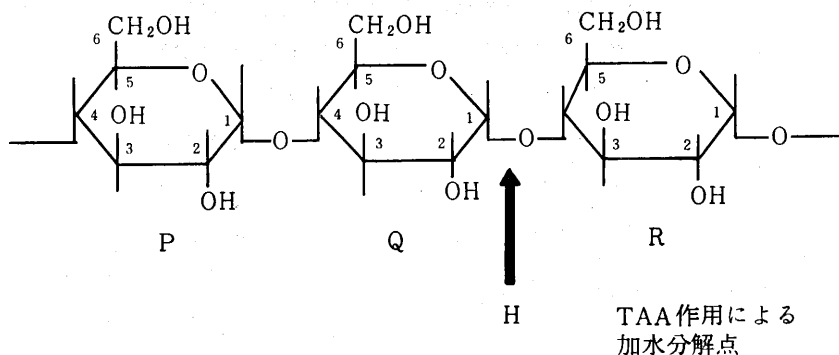
一方、MA のTAA による加水分解率は 6-O-メチルグルコース残基よりも、2-O-メチルグルコース残基の存在量に大きく影響されている事実、TAA-消化物中より、相当量の 6'-O-メチルマルトースが単離、確認されたにもかかわらず、対応する 2'-O-メチルマルトースの存在はほとんどが認められなかったことなどから、アミロースに対して、2-O-メチル化の方が6-O-メチル化よりも一そう強く、TAA の作用を受け難くさせる効果をもっているものと考えられる。6'-O-メチルマルトースが TAA-消化物中より単離同定されたので 6-O-メチルグルコースに続く グルコース残基のグリコシド結合が TAA の作用を受けることは明らかである。

第二章では、合成基質として知られているフェニル  $\alpha$ -マルトシドを部分O-メチル化してTAA の作用を検討したところ、上の結果をさらに支持する結果および 2, 3 の新しい知見が得られた。

フェニル  $\alpha$ -マルトシドの部分O-メチル化法として、一つには、アシル転移を利用する方法を用いた。この方法で得られた部分O-メチル化フェニル  $\alpha$ -マルトシドの TAA-消化物中より、グルコース、マルトースの他に、4'-O-, 6'-O- および 4', 6'-ジ-O-メチル、マルトースを分離同定することができた。マルトースの 6'-O および 4', 6'-ジ-O-メチル誘導体を得られたことは、MA を用いた実験結果を全く支持しており、4'-O- および 4', 6'-ジ-O-メチル誘導体が確認されたことは、TAA が  $\alpha$ -1, 4 グルカンの内部のグリコシド結合を加水分解する事実を考慮すれば、容易に理解できる結果である。

一方、フェニル、 $\alpha$ -マルトシドをメタノール中で  $\text{CH}_3\text{I}-\text{Ag}_2\text{O}$  でメチル化すると、グルコース残基の主として2位の水酸基にメチル基が導入された標品が得られ、2-O-メチル化の影響をくわしく検討するのによい材料となった。これらの標品の TAA による加水分解率は、2-O-メチルグルコース残基の含量が増すとともに、急激に小さくなり、2位の水酸基の酵素反応における重要性がうかがわれた。これらの標品中、MP-4 は全く TAA の作用を受けなかったが、この標品には、何ら修飾を受けていないフェニル  $\alpha$ -マルトシドは全く含まれておらず、フェニル  $\alpha$ -マルトシドの、2-O-, 2'-O- および 3-O-メチル誘導体が含まれていることが *Rhizopus niveus* のグルコミアララーゼによる加水分解反応や過ヨウ素酸化法から明らかになったので、これらの O-メチル誘導体は TAA の作用を受けないことがわかり、特に 2'-O-メチルマルトースのグリコシド結合が TAA の作用をほとんど受けないことは、MA を用いた実験からの推定と一致している。

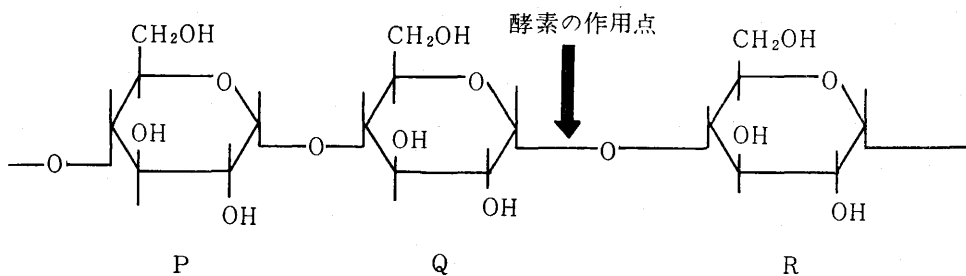
また部分O-メチル化、フェニル  $\alpha$ -マルトシドの TAA-消化物から 3'-O-メチルマルトースを分離、確認することができた。一方 2'-O-メチルマルトースの存在は、完全に否定し去ることはできな



かったが、無視できる程度と考えられる。以上の結果を総合して、MA が TAA の作用により加水分解される場合に、図に示したように、1) 加水分解点のグルコース残基Qの2, 3, 6の各水酸基はすべて O-メチル化を受けていないものであること。2) 非還元末端側のP残基の3および6位の水酸基は O-メチル化されてもH点での加水分解を受けること。3) P残基の2位の水酸基がメチル化されるH点での加水分解は著しくおこり難くなること。4) R残基の6位の水酸基にメチル基が導入されていても上の条件が満たされておれば、H点での加水分解はおこり得ること。などを明らかにすることができ、TAA の作用メカニズムを推定する上に有効な知見を得ることができた。

### 論文の審査結果の要旨

タカアミラーゼAの基質であるアミロースやフェニルマルトシドが酵素作用を受ける際には、基質分子中に多数存在する水酸基が、おそらくは酵素-基質複合体の形成に重要な関与をしていると思われる。伊勢村君は、部分メチル化フェニルマルトシドに対する酵素作用を検討し、反応生成物を詳細に分析して、以下の結論を得た。(図参照)



■ 1) 酵素により切断を受ける単糖残基Qは、その3個の水酸基がすべて遊離状態にあらねばならない。

2) 単糖残基Pの3位および6位の OH は  $\text{OCH}_3$  であってもよい。

3) 残基Pの2位が  $\text{OCH}_3$  となると酵素作用はほとんど無くなる。

4) 残基Rの6位は  $\text{OCH}_3$  でもよい。

基質のメチル化が酵素作用に及ぼす効果の化学的本性は、不明であるが、上記の実験結果は将来酵素分子の構造研究の発展と相俟って、酵素反応の化学的本性を究明する上に貢献することは確実であると思われる。よって本論文は理学博士の学位論文として十分価値のあるものと認める。