



Title	ウレアーゼの結晶化法ならびにウレアーゼ阻害剤について
Author(s)	小橋, 恭一
Citation	大阪大学, 1963, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28142
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	小橋恭一
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第432号
学位授与の日付	昭和38年6月10日
学位授与の要件	薬学研究科 薬品化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ウレアーゼの結晶化法ならびにウレアーゼ阻害剤について (主査) (副査)
論文審査委員	教授 川崎近太郎 教授 羽野寿 教授 青沼繁

論文内容の要旨

従来日本産ナタマメからウレアーゼを結晶化しえなかった原因として、精製の進んだ段階においてウレアーゼは活性を失なうことなしに水に不溶性となる点にあることを見出した。著者は逆にこの性質を利用し、徹底的に不溶化することが精製の目的にかなうものであることを明らかとした。

(1) ウレアーゼの不溶化

ウレアーゼの不溶化は、中性ないし弱アルカリ性の pH において、有機溶媒の存在下に認められた。この不溶化は加温することによって、失活を全く伴なうことなくほとんど定量的に進行させることができた。えられた不溶性ウレアーゼは種々の pH の諸緩衝溶液に全く不溶性であって、基質である尿素溶液に対して懸濁状態で活性を示した。

(2) 不溶性ウレアーゼの可溶化

不溶性ウレアーゼはシスティン、グルタチオン、チオグリコール酸などの SH 化合物、また無機の還元剤である NaBH_4 、硫化水素、ハイドロサルファイトによって容易に溶解されることを発見した。とくにシスティンを用いると、その添加量に応じてウレアーゼはきわめて特異的に可溶化され、多量の不溶性タンパク質中よりウレアーゼのみが溶解され、その比活性を飛躍的に高めることができた。

(3) ウレアーゼの結晶化とその性質

不溶化と可溶化の操作によってウレアーゼは原末から 1,400 倍に精製され、アセトンの滴加によって直径 5μ 約の正八面体晶として結晶化することができた。さらにシスティンあるいはキレート剤の存在下、不溶化を伴なうことなく容易に再結晶をくりかえすことができた。

本結晶は電気泳動的に单一であり、超遠心法によって沈降定数は 16.45×10^{-13} 、比活性は 250,000 単位 1 g で Sumner のえた結晶標品の 2 倍の値を示した。また本酵素のミカエリス定数は $1.70 \times 10^{-2}\text{M}$ 、turn over number は 1.18×10^6 の値をえた。

結晶ウレアーゼの安定性とその失活防止方法について検討した。また放置による失活ウレアーゼは従来の方法では再活性化されないが、チオグリコール酸あるいは NaBH_4 によって苛酷な条件で還元的に再活性化されることを見出した。このさいウレアーゼ 1 分子あたりの SH 量は数倍に増加し、比活性は失活前と同一値まで回復し、“還元型ウレアーゼ”として結晶化することができた。

ウレアーゼの可逆的不溶化の機構として、ウレアーゼの分子内 disulfide 結合の分子間への交換反応を考え、この反応の連鎖によって重合が進行し、ついには不溶性の重合体が生成するに至ると推論した。一方可溶化の機構は、不溶性重合体中の分子間 disulfide 結合が、還元剤によって開裂し、重合体が崩壊したことによると想定した。

(4) ウレアーゼの新しい阻害剤

以上の研究に伴ない、新しいタイプに属するウレアーゼの阻害剤を発見した。

その第 1 は bis [p-nitrophenyl] disulfide および thiaminedisulfide によるウレアーゼ阻害である。両者はともにウレアーゼに対して中性ではほとんど阻害性を示さないが、pH9～11 のアルカリ性において強い阻害性を示した。それらの阻害は時間とともに進行し、阻害の速度は添加量と反応温度に左右され、過剰の SH 化合物によって防止された。またこれらの阻害は SH 化合物によって、生理的条件ではほとんど回復されないが、強い反応条件で完全に回復された。阻害の本質は、それぞれ p-nitrothiophenol 基、あるいは thiamine 残基が S-S 橋をかいしてウレアーゼの活性に影響を与える SH 基と結合したことによると推定した。

第 2 の阻害剤は、O, S-diacetylthiamine および O, S-dibenzoylthiamine で、これらの阻害と回復の諸条件は bis [p-nitrophenyl] disulfide の場合と全く同様であった。これらの化合物のチオールエステルの性質から、その阻害機構はおそらくそのアチル基がウレアーゼの活性に関与する SH 基へ転位したことによると推察された。

その他の阻害剤として、基質類似体十数種の検討によりヒドロキシラミンによる阻害を見出し、また、これまで活性化作用の知られている陰イオンの中でフッ素イオンが強い阻害性を示すことを見出した。

著者の見出したウレアーゼの不溶化および可溶化の精製操作は、全く新しい原理に基くきわめて有効な方法であって、他のタンパク質にも応用しうるものである。また阻害剤の研究により、新しい型の阻害剤を見出し、その阻害機構の解明は、ウレアーゼの活性位の性質に新しい知見を加えるものである。

論文の審査結果の要旨

本研究はビタミン B₁ 新誘導体 Diacetylthiamine のアセチル転移反応を、-SH 酵素ウレアーゼに応用するため、まず日本産ナタマメからウレアーゼの抽出とその結晶化とを試みた。ウレアーゼの結晶化は Sumner により既に 1926 年に発表されているが、日本産ナタマメからのウレアーゼの結晶化について他の研究者は成功していない。ウレアーゼは抽出精製の段階で活性を失なうことなく不溶化して行くことがあるが、本研究においてはウレアーゼを不溶化し精製する方法を考案した。アカナタマメの抽出液からアセトン濃度 20～33% で沈澱する分画を pH 7.7 のリン酸緩衝液に溶かし、アルコールまたはアセトンを加えて 35～45° に加温するとウレアーゼはほぼ定量的に不溶化し沈澱する。不溶化ウレアーゼを pH 7 のリン酸緩

衝液に懸濁しシスティンを加えると添加量に応じ可溶化され、その上清液にアセトンを加え25%とすると結晶が析出する。

この不溶化・可溶化の操作を組合せて精製することも可能で還元剤としてシスティン以外に、グルタチオン・チオグリコル酸・ハイロドサルファイド・ NaBH_4 等を用いることができる。微量のシスティンまたはEDTAを加え再結晶したウレアーゼは微細無色正八面体で、250,000単位/gであってSumnerの得た結晶と同形であるが、力値は遙かに高い。本ウレアーゼ結晶はその性状から見て单一に近い蛋白質であり、放置により失活し易いが、卵アルブミンまたはシスティンの添加で防止できる。この失活ウレアーゼがチオグリコル酸または NaBH_4 によるかなり強い還元条件で再活性化されること、ウレアーゼの活性基に対する新知見である。

つぎにウレアーゼ阻害剤として bis-[p-Nitrophenyl] disulfide (I) および Thiamine-disulfide (II) のような Disulfide 化合物を pH 9~11 のアルカリ性でウレアーゼに作用せしめるとウレアーゼが時間とともに不活性化され、(I) からは p-Nitrophenylmercaptan の生成、(II) からは Thiamine-urease 結合物の生成が証明された。Diacetylthiamine (III) を同条件でウレアーゼに作用させると (II) よりやや弱い不活性化が起りウレアーゼとアセチル基または Thiamine-thiol との結合が考えられる。

この他ヒドロキシラミン・ NaF によるウレアーゼ阻害をも実験し、-SH 阻害剤でない新しい阻害剤を見出した。

これらの研究業績によって不溶化および還元剤を用いる可溶化を応用して日本産ナタマメからウレアーゼを容易に結晶化することができ、放置により失活したウレアーゼの還元剤による再活性化ならびに Disulfide 化合物によるウレアーゼの活性基との交換反応によってウレアーゼの活性基に対する重要な新知見が得られた。

よって本論文は薬学博士の学位を授与するに十分価値あるものと認める。