



Title	結晶細菌プロテイナーゼ
Author(s)	松原, 央
Citation	大阪大学, 1958, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28185
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 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

【 5 】

氏名・(本籍)	松	原	央
	まつ	はら	ひろし
学位の種類	理	学	博 士
学位記番号	第	7	号
学位授与の日付	昭和 33 年 6 月 12 日		
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当		
学位論文題目	結晶細菌プロテイナーゼ		
	(主 査)	(副 査)	
論文審査委員	教授 奥 貴 一男	教授 赤堀 四郎	教授 二国 二郎
		教授 伊勢村寿三	

論 文 内 容 の 要 旨

I

一種の陽イオン交換樹脂, Duolite C-10, を用いて *Bac. subtilis* のプロテイナーゼを結晶化に導く一方法を記した。市販の酵素材料を溶かした液を中性で樹脂柱に通す。洗滌後吸着したプロテイナーゼを高濃度のアルカリ性塩溶液で溶離すると元存在した色素は除去される。無色の溶出液の硫酸塩析で酵素を濃縮しアセトン沈澱法などを併用して最後にアセトン溶液中で針状又は板状に結晶する酵素を得た。再結晶酵素の収量は活性にして20%以上である。

II

Bac. subtilis, N'(BPN') の結晶プロテイナーゼは超遠心分析均一であることが判った。又この酵素はシスチン, シスチンは含んでいない。BPN' の希溶液は 40° 以下では pH 6~9 で安定であるが, 50° では pH 7~7.5 の間で安定である。濃溶液は中性, 40° 以下でもやや不安定で, 自己消化を起すためと思われる。かかる不活化は振盪により促進されるが, 菌体抽出液やアンモニウム塩で保護される。フォルモール法による最大活性 pH は約 8.0, カゼイン—Folin 法では約10であるが, 後者の場合は pH 7~11の範囲でも非常に活性な状態である。メチル酪酸, エチル吉草酸, エチルイソ吉草酸の様なエステルもこの酵素により分解され, メチル酪酸での最大活性 pH は約 9.0 である。

III

中性域での安定性, 蛋白分解能の種々測定法による比較, カゼイン, ゼラチンの消化経過などを結晶トリプシンと比べた。BPN' の 0.1%溶液が失う活性の度合はトリプシンに比べ 30倍も長く時間がかかる。またBPN' の活性は種々の方法で比べてトリプシンの 1.9~3.3 倍であり, ミルク凝固作用は約 10 倍強い。

IV

フルオロジニトロベンゼン法によりこの酵素の末端アミノ酸はアラニンであることが判った。三塩化酢酸、ジイソプロピルフルオロリン酸などを自己消化防止剤として用いた場合の末端基について少々考察を加えた。また分子量についても触れた。

V

BPN' の蛋白分解およびエステル分解能は同時にジイソプロピルフルオロリン酸で阻害され、その阻害物と酵素の結合物を安定な結晶状に分離しえた。プロテイナーゼ法を用いて調べたところ BPN' の二次構造は変化がないことを認めた。またその結合物の性質を二、三記した。トリプシンに比し細菌プロテイナーゼは種々条件下で結晶大豆トリプシン阻害蛋白質で阻害されないが、ジャガイモやソラマメの粗抽出液では強く阻害される。

VI

ジイソプロピルフルオロリン酸で阻害された BPN' の燐含量を調べ、燐結合箇所および隣接するペプチドの構造を分析した。1原子燐が1モル蛋白中に存在することおよび燐の結合せるアミノ酸はセリンであり、その近辺にグリシン、グルタミン酸またはグルタミン、その他のアミノ酸が存在することを知った。

論文の審査結果の要旨

枯草菌の培地中に分泌するプロテイナーゼは α -アミラーゼとともに、いろいろな用途があるため、従来応用方面における研究が多数報告されていたが、その工業的結晶化は後述のイオン交換樹脂を用いた精製法によってはじめて完成されたといえよう。松原央君の論文はプロテイナーゼの結晶化、その結晶プロテイナーゼの酵素化学的研究結果によってこの酵素の諸性質を明らかにしたものである。

プロテイナーゼ活性測定法を確立し、枯草菌培地中のプロテイナーゼを pH6.5 に緩衝化した弱酸性カチオン交換樹脂 (Duolite C-10) に吸着させ、共存する α -アミラーゼを通過させて完全に分別後、水洗して着色物質をのぞき、pH11.3 の濃厚硼酸緩衝液 (0.2M) で溶出、プロテイナーゼ濃厚液をつくり、これを硫酸分別塩析後 0.02 M 酢酸ソーダ液にとかし、冷却アセトンで沈澱させ、少量の上記酢酸ソーダ液にとかして蛋白質濃度を約10%に調整し、これにアセトンを少量滴下密栓冷蔵してプロテイナーゼの結晶を析出させ、これを集めて再結、大きな板状結晶として得る方法を詳記している。次にこの結晶プロテイナーゼの超遠心、電気泳動的に均一なることを確かめ、化学分析を行って C49.5%, H7.5%, N15.1%, S1.0%, 灰分 1.33% なる結果を得た。さらにこの酵素の一般的性質、すなわち、pH、温度、振盪などの諸条件下における安定性、pH-活性曲線などを詳しくしらべた。最適 pH はフォルモール滴定法では約 8.0 であるがカゼインを基質とした Folin 呈色法では 7~11 にわたっているから、いわゆるアルカリ性プロテイナーゼであり、酪酸メチルエステルの水解も触媒するからトリプシンに似ている。しかし以下の論文で明示しているようにいろいろな点でトリプシンと区別されるから、全く別個な酵素である。カゼイン、ゼラチン、血色素などを基質として、結晶細菌プロテイナーゼと結晶トリプシンの活性度をいろいろ

ろな測定法で比較して、前者が後者の約2倍強いことを明らかにしたが pH 7 付近における両酵素の安定性を比較すると結晶トリプシンの方が約30倍すみやかに失活することを指摘した。主論文1の第4編では結晶細菌プロテイナーゼの分子量を、光散乱、界面化学、超遠心法などで測定し、約30,000と推定した。主論文2の第5編ではN末端アミノ酸がアラニン1分子であるポリペプチド鎖からなる球状蛋白質であることをDFP法で証明し、システインまたはシスチンを欠くが、その他の多くのアミノ酸を多かれ少なかれ検出した。この酵素活性は Diisopropyl fluorophosphate (DFP) と1:1の比で結合失活する(ただし、残存活性0.17%)が、この結合物は安定な結晶として単離される。このものは結晶細菌プロテイナーゼによってすこしも分解されないが、加熱処理をほどこすと変性し、すみやかに消化されるようになる。したがって、この阻害剤は酵素蛋白質の2次構造にみるべき変化を与えないで失活をおこすものであると考えられる。また他方、この結晶細菌プロテイナーゼは大豆から結晶として単離されたトリプシン阻害蛋白質によって全く阻害されないものであるから、この点でもトリプシンと異なることが明示された。

主論文3の第6編ではDFPで失活した酵素について研究し、その構成アミノ酸のうちセリンがDFPと結合していることを蛋白質化学的に証明した。結局、このプロテイナーゼの活性中心にはセリン、グリシン、グルタミン酸またはグルタミンをふくむペプチドがあり、ヒスチジンとともに酵素の接触作用をいとなむものであると考えられるに至った。他方この酵素のペプチド結合に対する特異性が広く、中性アミノ酸や酸性アミノ酸などのNまたはCの両側を水解できるため、基質を分解する限度はトリプシンのばあいよりも約18%高く、約50%に達するのみならず、分解生成物が平均トリペプチドであることを参考論文の1つで明らかにしていることおよび、この結晶細菌プロテイナーゼを用いて酵素蛋白の失活と変性の研究を行い幾多の新知見を得た参考論文の結果とを併せ考え、博士の学位論文として十分な価値あるものと認める。