

Title	タカアミラーゼAの化学構造の研究
Author(s)	次田, 皓
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/28189
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 7 】

氏名・(本籍)	次	田	皓
	つぎ	た	あきら
学位の種類	理	学	博 士
学位記番号	第	9	号
学位授与の日付	昭和 33 年 9 月 25 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	タカアミラーゼ A の化学構造の研究		
	(主 査)	(副 査)	
論文審査委員	教授 赤堀 四郎	教授 奥貫 一男	教授 伊勢村寿三
		教授 二国 二郎	

論 文 内 容 の 要 旨

酵素の活性と化学構造の関連は興味深く、かつ重要な問題と思われる。赤堀研究室ではタカアミラーゼ A の結晶化に成功し続いてその化学構造ならびに作用機作が研究されて来た。

この論文では比較的多量に得られるタカアミラーゼ A を素材とし、その化学構造を検討し、その結果えられた二、三の結果を報告する。

1, タカアミラーゼ A の二、三のペプチドの構造

タカアミラーゼ A を DNP 化し得られた DNP- タカアミラーゼ A を濃塩酸 37°C で部分加水分解し、分解物をタルク、セライト吸着、活性炭吸着を用いて各々リジンおよび有核アミノ酸含有ペプチドを分画し、その各々を向流分配法、カラムクロマトグラフィー等を用いて精製し、次の三つのペプチドの構造を推定した。

Val-Lys-Glu-Asp, Phe-Asp, Leu-Asp-Tyr.

2, タカアミラーゼ A のアミノ末端部分のアミノ酸結合順序

タカアミラーゼ A の N- 末端部分は赤堀らによって Ala が N- 末端アミノ酸であること、またこの部分のペプチドが Ala-Gly であることが推定されている。さらにこの附近の構造を明らかにするため、DNP- タカアミラーゼ A を蟻酸 100°C で部分加水分解し、アミノ末端ペプチド部分を抽出し、向流分配法、濾紙電気泳動法、および二、三のクロマトグラフィーを用いて約 10 ヶの末端ペプチドを単離精製し、その構造をそれぞれ決定して次のようにアミノ末端ペプチドの結合順序を推定した。

Ala-Gly-Asp-Glu-Ser-Ala-Leu-Thr-(Val₂, Asp, Ser, Phe, Lys)

またこのとき同時に分離されたリジン含有ペプチドの構造について次のような知見を得た。

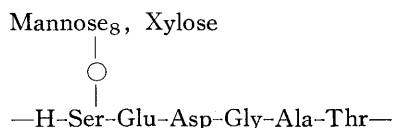
Val-(Gly, Asp, Ser, Lys), Val-(Gly, Asp, Ser, Phe, Lys), (Lys Asp, Glu, Leu, Arg) (Lys, Asp, Phe,

Tyr) (Lys, Glu, Ala), (Lys, Asp, Gly)

3, タカアミラーゼAの糖ペプチドの構造

タカアミラーゼAの結晶が糖成分を含むことは花房らによって既に報告されているが、単に蛋白質化学の面からのみでなく、その澱粉分解活性とも関連して興味深い。

タカアミラーゼAを放線菌プロテアーゼによって部分分解し、部分分解物より、Dowex 50のカラムクロマトグラフィーを用いて二つの糖含有ペプチドを精製した。糖ペプチドを各々、種々な方法により精製し、その糖成分、アミノ酸結合順序、糖の結合点を検討して次のような構造を推定した。



このペプチド中に含まれる糖はヘキソサミン2モルを除いてはタカアミラーゼA中の全ての糖成分と一致する。即ち糖は、ヘキソサミンを除いて一塊となってSerと結合しているものと思われる。

4, 結晶タカアミラーゼAの弱塩基性交換樹脂クロマトグラフィーによる精製

これらタカアミラーゼAの化学構造を研究する際問題となるのは、この酵素標品の純度であるが、一般に結晶蛋白質がなお均一なものでないということが多く報告されている。これらの欠点からDuolite A₂によるカラムクロマトグラフィーをタカアミラーゼAについて試みた。この結果、塩濃度の連続的变化によって少量の他成分(マルターゼらしく思われる)を分離し、タカアミラーゼAの単一と思われる溶出曲線を得た。これによって結晶製品よりさらに窒素当りの酵素活性10~20%をあげることに成功した。

以上の実験で赤堀らのヒドラジン分解法がペプチドのC-末端の決定法として、優れた方法であること、向流分配法が蛋白の部分分解物の粗分離に適用しうること、さらにDuolite A₂が酸性蛋白のクロマトグラフィーに利用しうることを示した。

またこれらの結果からは、直接的な化学構造と活性との関係は明らかにされるには至っていない。

論文の審査結果の要旨

次田君の論文はタカアミラーゼAの化学構造に関するものである。この酵素は最近容易に且つ多量に結晶性に得られる様になったので次田君はこれを材料として化学構造に関する研究を進めその一部を明らかにすることが出来た。

本論文は4編よりなっている。第1編はタカアミラーゼAの部分加水解によって生ずる二、三のペプチドに関するものである。タカアミラーゼAをジニトロフェニル化(以下DNP化と記す)して得られるDNP—タカアミラーゼAを37°に於て濃塩酸で加水分解し、生成物中よりタルクーセライト吸着並びに活性炭吸着を用いてリジン含有ペプチド1種及び有核アミノ酸含有ペプチド2種を分離し、その各々を更

に向流分配法及びカラムクロマトグラフィーによって精製し夫々単一なものとなすことが出来た。次でそれらペプチドのアミノ酸組成を決定し且つアミノ末端を Sanger の DNP-法によりまたカルボキシル末端を赤堀等のヒドラジン法によって決定し、その結果に基いて上記3種のペプチドの構造を夫々次の如く推定することが出来た。

(1) Val—Lys—Glu—Asp

(2) Phe—Asp

(3) Leu—Asp—Tyr

(1)における Glu の位置は天然の蛋白質に於て酸性アミノ酸が接続して存在する頻度が極めて高いことに基く推定である。

第Ⅱ編はタカアミラーゼAのアミノ末端ペプチドの化学構造に関するものである。この酵素のアミノ末端は赤堀、池中、成田等によって Ala—Gly—であることが推定されているが、次田君はこれを著しく広い範囲に研究してアミノ末端より第8番目のアミノ酸までその結合順序を決定することが出来た。すなわち DNP—タカアミラーゼAを80%蟻酸を用いて 100°で分解し、アミノ末端ペプチドを抽出し、向流分配法、濾紙電気泳動法及びクロマトグラフィー等を用いて約10種の DNP—アラニルペプチドを分離し且つアミノ酸組成を測定した。その結果によってタカアミラーゼAのアミノ末端ペプチドの構造が次の如くであることを推定し得た。

(H) Ala—Gly—Asp—Glu—Ser—Ala—Leu—Thr—

また Thr に続いて [Val₂, Asp, Ser, Phe, Lys] の組成を有するペプチド群が存在することを認めた。その他 Lys を含むペプチド6種をも分離し夫々そのアミノ酸組成を決定した。

第Ⅲ編は糖を含むペプチド部分の研究である。タカアミラーゼAの糖成分は酵素1分子に対し、マンノース8、キシロース1、ヘキソザミン2であることが報告されている。次田君はタカアミラーゼAを放線菌のプロテアーゼによって分解し、その生成物中よりイオン交換樹脂クロマトグラフィーによって糖を含むペプチドを分離し2種の単一成分を得た。この2種のペプチドは何れもマンノース8、キシロース1分子を有しヘキソザミンは含んでいない。これによってタカアミラーゼA中のヘキソース及びペントースは1団となって結合していることが知られた。次田君はこの糖ペプチドのアミノ末端が何れも Ser であることを確かめ、更に2規定塩酸による部分加水分解生成物の検索、全体のアミノ酸組成等より帰納してタカアミラーゼ分子中に次の如き糖ペプチド部分の存在することを推定した。

[(Mannose)₈, (Xylose)₁]—O—S(H)er—Glu—Asp—Gly—(Ala, Thr)—

第Ⅳ編は弱塩基性イオン交換樹脂 Duolite A₂ を用い従来の方法によって得られた結晶タカアミラーゼAを更に精製して不純物を除去した実験報告である。

以上次田君の論文は極めて困難な実験的研究を丹念に行ったものでタカアミラーゼAのアミノ末端ペプチドの構造に関する知見を著しく深めかつ糖の結合する部分の構造を明らかにしたもので蛋白質化学並びに酵素化学上注目すべき業績である。従って同君の論文は理学博士の学位論文として十分な価値を有するものと認める。