

Title	バクテリアアミラーゼに関する研究
Author(s)	菅江, 謹一
Citation	大阪大学, 1960, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28243
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	菅 江 謹 一 すが え きん いち
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 8 5 号
学位授与の日付	昭 和 35 年 3 月 22 日
学位授与の要件	理 学 研 究 科 生 物 化 学 専 攻 第 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
学位論文題目	バクテリアアミラーゼに関する研究
	(主 査) (副 査)
論文審査委員	教 授 赤 堀 四 郎 教 授 奥 貫 一 男 教 授 金 子 武 夫

論 文 内 容 の 要 旨

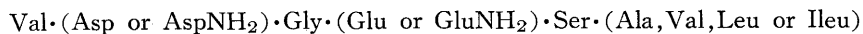
種々の α -アミラーゼが結晶化されているが、その中アミノ酸組成が決定されたのは4種位にすぎず、化学構造が研究されているのはタカアミラーゼ A (TAA) だけである。そこで比較生化学的見地から、*Bacillus subtilis*, N 及び N' の α -アミラーゼ (BA) を用いて以下の実験を行った。

I BA の N-末端アミノ酸について

Sanger 法を用いて BA の N-末端アミノ酸を決定した。常法に従って 2・4ジニトロフェニール-(DNP)-BA を調製し、蒸溜塩酸によって種々の時間 (5, 8, 15, 24 各時間) 加水分解を行い、得られた DNP-アミノ酸の定性定量をシリカゲル及びセライトのカラムクロマトグラフィーで行った。而して BA は N-末端にバリンをもつ一本のポリペプチド鎖からなる事を認めた。

II BA の N-末端ペプチドについて

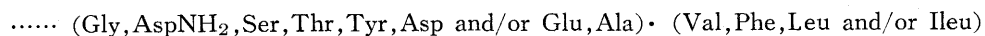
常法に従って調製した DNP-BA を、濃塩酸及び *Streptomyces protease G* (SP-G) によって部分分解し、ペーパークロマトグラフィー、シリカゲル及び Amberlite XE-64 のカラムクロマトグラフィー等によって N-末端 -DNP- ペプチドを精製した。各ペプチドについて N-末端基及び組成アミノ酸の決定 (DNP-法)、一部のペプチドの C-末端基の決定 (ヒドラジン分解法) 等を行って、次の様なアミノ酸結合順序を推定した。



この結果を TAA の結果と比較検討した。

III BA の C-末端附近のアミノ酸について

先ずヒドラジン分解法によって BA の C-末端基を検査しグリシンである事を推定したが、カルボキシペプチダーゼ A (CPase) による消化実験では一致した結果は得られず結論は出なかった。併し C-末端附近のアミノ酸として次の様なものが認められた。



更に CPase 消化と α -アミラーゼ活性との関係を調べ、少くとも C-末端附近の Leu and/or Ileu, Phe, Val 等は BA の活性に直接関係がないものと推定された。

IV BAのchemical modification について

先ず TAA に関する池中氏の報告と比較する為に、1-フロロ-2,4-ジニトロベンゼン、2,4-ジニトロベンゼンスルホン酸、*p*-フェニルアゾベンゾイルクロライドによる modification を行った。これらの結果から、上記の試薬と反応し易いあるアミノ基は BA の活性に直接関係していない様に考えられたが、試薬が BA 1 モル当り 1 モル結合した時に活性が殆ど失われる条件は見出し得なかった。それで次に種々のジアゾ試薬（ベンゼンジアゾニウムクロライド、*p*-アミノアセトフェノン及びスルファニル酸のジアゾ誘導体）による modification を試み、S³⁵ でラベルしたスルファニル酸のジアゾ誘導体により BA に関して適当な条件を見出した。併しこの条件下では TAA にはモル当り約 3 モル（Tabachnickらにより示されたアゾ-N-クロロアセチル-L-チロシンの分子吸光係数より）のアゾ基が導入される。この場合 α -アミラーゼ活性は両者共殆ど失われるが、TAA の α -フェニルマルトシダーゼ活性は 1.5 倍に増加する。

アゾ基の結合基は BA に関してのみ研究され、*p*-アゾベンゼンスルホン酸-BA の吸光スペクトル及びアゾペプチドの Folin テスト等からチロシンである事が推定された。又その附近のアミノ酸結合順序が SP-G 分解により得られたアゾペプチドについて検討され、次の様に推定された。

……Ser·Asp·Gly·(Tyr, Glu₂, Ser, Thr)……

アゾ基

論文の審査結果の要旨

最近種々の α -アミラーゼが結晶性に得られ、その中 4 種についてはアミノ酸組成が決定された。特にタカアミラーゼ A (TAA) については末端基構造並びに物理構造も詳しく研究されている。それで菅江君は比較生化学的見地から枯草菌の α -アミラーゼ (BA) について末端基の構造並びに活性点に関する研究を行った。

先ず BA を Sanger の方法によって DNP-化した後塩酸で加水分解し生成する DNP-アミノ酸をクロマトグラフィーによる分離精製、並びに定量を行ってこれが DNP-バリンであることを確かめ、その収率は数回の実験結果 BA の分子量を 48,000 とすれば 1 モルの BA に対し 0.7~0.9 モルであることをたしかめ、BA のアミノ末端は 1 ケのバリンであることを明らかにした。次に DNP-BA を室温濃塩酸或いは放線菌プロテアーゼによって分解し、生成した DNP-ペプチドをクロマトグラフィーによって分離して数種の DNP-ペプチドを得、その各々についてアミノ-末端アミノ酸及びカルボキシル-末端のアミノ酸を検索しアミノ末端ペプチド構造を次の如く推定した。

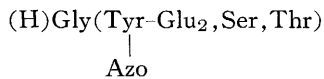
Val-Asp-Gly-Glu-Ser-(Ala, Val, Leu or Ileu)

次いでカルボキシル末端の構造を知る目的でヒドラジン分解及びカルボキシペプチダーゼ分解を行い、遊離するアミノ酸を調べカルボキシル末端近くにバリン、フェニルアラニン、ロイシン (或はイソロイシ

ン)の存在することを想像せしめる結果を得た。また BA にカルボキシペプチダーゼを長時間作用せしめ、数個のアミノ酸が遊離するに至ってもアミラーゼ活性は全く変化しないことを認めた。このことはカルボキシル末端は酵素活性と無関係であることを推定せしめるものである。

次に菅江君は BA の Chemical modification に伴う酵素作用の消長に関して詳細な研究を行った。先づジニトロフルオールベンゼン、ジニトロベンゼンスルホン酸及び *p*-フェニルアゾベンゾイルクロリドによる Modification を行ったが、試薬が BA 1 モルに対して 1 モル近く結合したとき活性が大部分失われる条件は見出し得なかつたのでアミノ基が酵素作用に直接関係があるとは考えられない。

次に種々のジアゾ試薬 (ベンゼンジアゾニウムクロリド, *p*-アミノアセトフェノン及びスルファニル酸のジアゾ化物) による Modification を試み S³⁵ を含むスルファニル酸のジアゾ化物によって BA をアゾ化し, S³⁵ の放射能によって導入されたアゾ基を定量した。pH 8 でアゾ化するときは 1 個のアゾ基の導入によってアミラーゼ活性は約 10% 以下に減少することを見出した。また TAA に於ては同様な処理によってアミラーゼ活性は殆んど失われるが, マルトンダーゼ活性は約 1.5 倍に増加することを認めた。またジアゾ化スルファニル酸によってアゾ化した BA を放線菌プロテアーゼによって消化したものから, アゾペプチドを分離し, この中のアゾ基はチロジン残基に結合していることを吸光スペクトルによって推定すると共に, アミノ酸組成を決定し, このアゾペプチドに次の如き構造を推定した。



このペプチド群と酵素活性との関連に就いて論じた。

以上菅江君の論文は BA の化学的性質について重要な知見を得たものである。

この論文は理学博士の学位論文として充分の価値あるものと認める。