

Title	プロテアーゼによって部分分解したフェニルアゾベンゾイルタカアミラーゼAの単離
Author(s)	戸田, 弘子
Citation	大阪大学, 1962, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28358
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

【 5 】

氏名・(本籍)	戸	田	弘	子
	と	だ	ひろ	こ
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	257	号	
学位授与の日付	昭和 37 年 2 月 7 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	プロテアーゼによって部分分解したフェニルアゾ ベンゾイルタカアミラーゼ A の単離			
	(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 成 田 耕 造		

論 文 内 容 の 要 旨

酵素蛋白質の構造と活性の関係を解明する一つ的手段として、酵素分子を部分分解して活性断片を単離し、小分子化によっておこる酵素蛋白質の大きさ、構造の変化が酵素活性にどのように反映するかを調べて、活性の維持に必要な酵素蛋白質の大きさと構造を明らかにすることが考えられる。

本研究では、Taka-Amylase A (TAA) の活性と構造の関係を上記のような見地から明らかにするために、TAA の protease による部分分解をおこない、二三の結果を得た。

TAA は他の α -Amylase と同様に native な状態では種々の protease に耐性でその作用を受けないが、phenylazobenzoylation によって、phenylazobenzoyl 基をモル当り 1 個導入した phenylazobenzoyl-Taka-Amylase A (PhAB-TAA) は protease 被分解性となる。また PhAB- 基は可視部に吸収を持ち、しかも TAA の活性中心の近くに導入されていると考えられるので、この吸収を標識として活性断片の追跡をすることが考えられた。

以上の二点から PhAB-TAA を出発物質とし "Pronase" で限定分解をおこない、分子量 36,000 の modified enzyme を単離した。

I. Isolation of proteolytically modified phenylazobenzoyl-Taka-amylase A.

protease 分解の様式を検討し、PhAB-TAA が "Pronase" により限定分解を受けることを示した。次に modified enzyme (M-PhAB-TAA) を結晶状に単離し、これが電気泳動、超遠心的に均一であることを証明した。さらに DEAE-セルロースを用いたクロマト的研究からも、均一でかつクロマト的挙動に若干の差異があることを明らかにした。

II. Characterization of proteolytically modified phenylazobenzoyl-Taka-amylase A.

精製した M-PhAB-TAA の分子量を沈降-拡散から 36,000 と算出した。また、結合している PhAB-基 1 個あたりの最小分子量は 35,000 である。この結果から、もとの PhAB-TAA の分子量を 53,000 と仮定

すると、“Pronase”による分解度は約30%であることが示された。次に小分子化に伴う酵素活性の変化を比活性、速度定数並びに酵素反応の熱力学量の変化から調べて、部分分解による primary structure の変化が、高次構造にも変化を及ぼしたことを示唆した。

Ⅲ. Terminal groups and amino acid composition of the proteolytically modified phenylazobenzoyl-Taka-amylase A.

M-PhAB-TAA の N-および C-末端をそれぞれ DNP 法および CPase 法で検討した。すなわち、N-末端はアラニンで、C-末端がもとの sequence と異なることが明らかにされた。また、構成アミノ酸組成を比較検討し、結局 PhAB-TAA の C-末端側から約120アミノ酸残基が限定分解で除去されたと結論した。

論文の審査結果の要旨

酵素蛋白質を蛋白質分解酵素によって限定分解し、酵素作用をもった分解断片を分離してその化学構造を究明することは、蛋白質の機能と生理作用との関係を明らかにする一つの手段である。Taka-amylase A は native の状態では試みた蛋白質分解酵素によって殆んど加水分解されず、酵素作用をもった断片を分離することはできなかった。ところがこの酵素に phenylazobenzoyl 基を 1 モル導入しても酵素作用は消失せず、またこの酵素誘導体は蛋白質分解酵素によって加水分解されることを戸田君は見出した。

特に放線菌の生産するプロテアーゼは酵素作用を著しく変化させることなく、Taka-amylase 誘導体を相当程度まで加水分解するので、このプロテアーゼによる限定分解を試み、分解産物中から小分子化された Taka-amylase 誘導体を結晶状に取出すことに成功した。このものの分子量はもとの Taka-amylase A の約 $\frac{1}{3}$ の大きさで、N 末端基はもとと同一であるが、C 末端基附近はカルボキシペプチターゼを用いて、相当変化していることを認めた。従って Taka-amylase 分子の小分子化は C 末端から生じたことが推定された。この結果は Taka-amylase の C 末端に近い分子の約 $\frac{1}{3}$ は酵素作用には直接必要でないことを物語っている。また小分子化された Taka-amylase 誘導体のアミノ酸分析の結果は、特に酸性アミノ酸量が減少したことを示し、C 末端に近い分子鎖中に多量の酸性アミノ酸が分布していることを暗示している。またこの Taka-amylase 誘導体の酵素反応の速度論的研究の結果、酵素の活性部分の立体構造が小分子化されたために変化したことを推論した。

以上の戸田君の研究結果は Taka-amylase A の構造と機能の関係を究明する上にも多大な貢献を果しており、博士の学位論文として十分な価値あるものと認める。