

Title	バクテリア- $\alpha$ -アミラーゼ分子の解離会合
Author(s)	垣内, 欣二
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/28830">http://hdl.handle.net/11094/28830</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

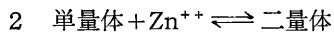
<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	垣 内 欣 二 かき うち きん じ
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 6 0 9 号
学位授与の日付	昭 和 39 年 12 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	バクテリア $\alpha$ -アミラーゼ分子の解離会合
	(主 査) (副 査)
論文審査委員	教 授 伊勢村寿三 教 授 広田 鋼蔵 教 授 藤 田 博 教 授 角 戸 正夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

バクテリア  $\alpha$ -アミラーゼ (*Bacillus subtilis*  $\alpha$ -Amylase) の 0.1M NaCl-0.005M  $\text{Ca}(\text{COOCH}_3)_2$ , pH 6.5~8.0 の水溶液中で分子量を沈降および拡散の測定から求めてみると蛋白質濃度によって変化することがみとめられた。沈降速度の測定で蛋白質濃度 0.5%以上であると、沈降図形は回転初期には Single Peak を示す。この沈降図形は時間と共に非対称性となり 2つの成分のあることがわかる。速い成分の沈降定数は 6.2S, おそい成分のそれは 5.0—5.2S であった。Fischer らは先にこの蛋白質が Ca 以外に Zn をも含んでおり、この Zn を介して 2分子会合しており自然の条件では会合したものだけが存在することを報告している。本論文でも Ca-EDTA などによって Zn を除去するといずれの蛋白質濃度でも沈降図形は対称性のある Peak を示した。その沈降定数は 4.4S, 拡散定数は  $8.5 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{sec}$  であった。これらの値より求められた分子量は 45,000 でありこの値は赤堀, Fischer らのアミノ酸分析結果とを考え合わせるとアミラーゼの単量体に相当すると考えられる。したがって次のような機構を考えた。



この蛋白質の解離会合の平衡は pH やイオン強度によって著しく影響される。pH を中性付近から約 4 まで下げると、沈降図形は対称性のある Peak を示すようになりその沈降定数は 4.4S であった。このことはこの  $\alpha$ -アミラーゼが pH 4 では単量体の形で存在することを示している。そこで Zn の結合 site にアミラーゼ分子中の Histidine 残基が考えられるが、Histidine 残基を Methylene Blue によって光酸化してやると pH を元にもどしても沈降図形からは 4.4S の成分だけしかみとめられなかった。この結果この分子の会合には蛋白分子中の Histidine 残基に Zn を介しておこなわれていることを認めた。又 pH 9 以上にすると同様に単量体だけが得られる。これはおそらく蛋白質に結合している Zn が水酸化物になり除去されるためと考えられる。

解離会合反応は又ゲル逶過になっても認められた。すなわち Sephadex G-100 にておこなった結果は沈降速度より求めた結果と同様に2つの成分からなる流出曲線が得られた。分画された2つの成分の内早く流出される成分の沈降定数は 6.2S であり Dithizone 法による金属定量の結果は Zn を含んでいることが認められた。一方、おそく流出される成分は 4.4S であり Zn の存在は認められなかった。しかし両成分には旋光分散測定結果からはほとんど差がみとめられなかった。それゆえ解離会合による分子の二次構造の変化はないと考えられる。

更に沈降平衡および光散乱の測定をおこない先に呈出した機構の正しいことを確かめ又その平衡定数を求めた。沈降平衡測定結果から分子量と濃度との関係をしらべた。Tiselius によって呈出された解離会合系の沈降平衡の理論からこのアミラーゼの系に適用できるような式を導き出した。これより求めた平衡定数は  $2.2 \times 10^9 (\text{mole/l})^{-2}$  であった。これらの測定で 0.4% 以上では、二量体として存在しほとんど解離しないことを知った。したがって 1% の濃度の沈降測定において初期には二量体だけ存在するが時間の経過と共に2成分にわかれてくる現象はメニスカス側から解離してくるためと考えられる。各時間における沈降図形から二量体の濃度を求めて解離速度定数を求めた。その値は  $1 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$  程度である。この値と平衡定数とから  $\alpha$ -アミラーゼの会合速度定数は  $2 \times 10^5 \text{mol}^2 \text{sec}^{-1}$  であるとせられた。この結果は  $\alpha$ -アミラーゼの解離速度が会合のそれに比べて非常におそいことを示している。

## 論文の審査結果の要旨

枯草菌のもつ  $\alpha$ -アミラーゼは通常1分子中に1個の亜鉛イオンをもっている。この亜鉛が化学的の処理でのぞかれると、その分子が2個の小単位になることが知られていた。

垣内君はこの研究で、溶液濃度 pH などの諸条件によって、この分子が自発的に2小単位に解離し、また逆にこの2小単位が会合して元の分子に復元する解離会合系であることを知り、超遠心沈降法光散乱法、ゲル逶過法などを用いて、この解離会合を詳細に研究したもので、論文は5篇からできている。

まず第1篇ではこの蛋白のやや濃厚な溶液 (8g/l以上) では超遠心ではただ 6.1S の単一な成分がみとめられるが、低濃度にすると 4.4S の成分があらわれる。あらかじめ Ca-EDTA で処理しておくとも後者のみとなり、また  $\text{Zn}^{2+}$  を溶液に添加しておくとも 6.1S の成分のみとなること、拡散の測定とあわせて定められる分子量から

2 単量体 +  $\text{Zn}^{2+}$   $\rightleftharpoons$  二量体の関係があり、通常は二量体として存在することを明かにした次に第2篇においては  $\text{Zn}^{2+}$  の二量体形成についての役割をしらべ、メチレンブリュー共存下で光酸化を行なうと pH や蛋白濃度と関係なく 4.4S の成分のみとなる。アミノ酸分析の結果からヒスチジンが光酸化をうけておることがわかるが蛋白全体の Conformation は余り大きくはかわっていないことがわかった。おそらく二量体はヒスチジンのイミダゾール基によって  $\text{Zn}^{2+}$  を介して2単量体が会合し

ているものでろうと推定した。

さらに第3篇ではセファデックス G-100 を用いてするゲル濾過によってこの二成分の分離をこころみ、流出速度の速い成分は 6.2S で  $Zn^{2+}$  を含みおそい成分は  $Zn^{2+}$  を含まず 4.4S であることを見出し、解離会合系をゲル濾過によって二成分にわけることができた。

第4篇においては、光散乱を用いて上記の解離会合系を検討し、アミラーゼ濃度 0.5% 以上ではつねに分子量が 97,600 となり、低濃度におけるものまたは EDTA 処理をしたものは約半分の分子量になるが、たとえ Ca-EDTA で処理しても半分よりやや大きくなるのは二量体の残存を示唆している。

光散乱でえられる重量平均分子量と濃度の関係より単量体と二量体との間の平衡定数を求め  $2 \times 10^9 \text{ mole}^{-2} \text{ liter}^2$  であることを示した。

第5篇においては沈降平衡法を応用し、この系について若干の理論的考察を行ない、これよりまた平衡定数を求めて  $2.2 \times 10^9 \text{ mole}^{-2} \text{ liter}^2 (20^\circ\text{C})$  の値をえている。さらに Belford らの方法に従って、これよりこの系の会合および解離の速度定数を算出することができた。

以上垣内君は枯草菌  $\alpha$ -アミラーゼが二小単位の会合体であってそれが解離会合する諸条件をあきらかにするとともに  $Zn^{2+}$  による会合の位置がイミダゾール基であることを推定し蛋白質化学における解離会合系として一つの興味ある事例を明かにすることができた。

参考論文4篇もいずれも学術上興味あるものであって、これらを合せ考え理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。