

Title	バクテリア α -アミラーゼ分子の安定性と変性の可逆性について
Author(s)	今西, 晟
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29376
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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)	今 西 晟 いま にし おきら
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 987 号
学位授与の日付	昭 和 41 年 6 月 15 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 α -アミラーゼ分子の安定性と変性の可逆性について
論文審査委員	(主査) 教 授 伊勢村寿三 (副査) 教 授 奥貫 一男 教 授 二国 二郎

論 文 内 容 の 要 旨

α -アミラーゼは一般に Ca^{2+} を結合しそれが活性発現に重要な役割を果しているといわれている。バクテリア α -アミラーゼは、細菌産生酵素の特性とも考えられるが、-S-S-結合を含まないという点で他の α -アミラーゼと異なっている。従って、この分子の高次構造は非共有結合のみによって保持されている訳である。このような点から、バクテリア α -アミラーゼの高次構造の安定性、変性とその可逆性およびそれらと結合 Ca^{2+} との関連性などについて、主に物理化学的な測定法を用いて調べた。

このアミラーゼは Ca^{2+} が含まれている場合、pH 4 から11.5~12の領域まで native な高次構造や活性を可逆的に保つことができる。まず分子のもっている解離基の挙動に注目してみる。チロシン残基 (Tyr) の OH 基の pH 11.5 までに正常に解離する数は24残基中僅か7残基にすぎず、その他は更に高い pH 領域で分子の unfolding とともに解離をはじめ。一方、酸性 pH 領域では、イミダゾール基の解離やカルボキシレート基の protonation に異常性がみられた。例えば、pH 3.5 で放置すると異常な-COO⁻ (17個) が次々と protonate されはじめ、それと同時に Tyr やトリプトファン (Try) による紫外吸収スペクトルの blue shift がおこりはじめる。これは異常-COO⁻ 基が protonate されはじめるとともに高次構造が unfold しはじめることを示している。この現象は、異常解離する Tyr の OH 基と-COO⁻ の間に水素結合ができて高次構造の安定化に寄与しており、これの切断が分子の unfolding につながると考えることもできる。このような水素結合に関係している Tyr は少なくとも分子表面の近傍に存在していると思われるが、種々の有機溶媒を添加しておこる紫外吸収スペクトルの溶媒効果からは溶媒と接する状態にある Tyr や Try は各々24残基中10-12、15残基中5残基であると推定せられた。Tyr の10-12残基から正常解離する数を引けば、異常解離し、しかも溶媒と接しうる状態の残基数は異常 COO⁻ の数に比べ非常に少ない。この点から上記の水素結合の可能性は少ないと考えられた。おそらく、異常解離する Tyr の大部分はその側鎖の強い疎水性から分子内で

hydrophobic bond の形成に寄与していると思われ、一方、異常 COO^- は分子表面で正荷電の残基と静電的な相互作用をしていると考えるのが妥当であろう。分子表面が全般的に親水基でおおわれ、反対荷電をもつ解離基間で静電的な相互作用があることは hydrophobic bond を弱める効果の大きい有機溶媒中でアミラーゼが沈澱し易いこと、イオン性界面活性剤の影響を受け難いことなどからも予想される。

酸変性の研究から酸による分子の unfolding は完全でなく、一部もとの構造が残っていることがわかった。しかし、pH を中性にもどしても著しい活性の回復は認められない。この不可逆性は分子内に S-S 結合を含んでいないためと考えられた。しかし、EDTA を含む尿素中でアミラーゼはほぼ完全に変性するが、尿素を除いたり稀釈したりすると活性が良い効率で回復することがわかった。回復率はアミラーゼ濃度や pH に著しく依存する。活性を回復したアミラーゼは Tyr 残基の解離の異常性も回復しており、もとの高次構造が再形成されていることを示している。この結果は、完全に unfold した分子鎖が適当な条件下では分子内の非共有結合のみで活性をもった高次構造を充分につくりあげることができることを示しているとともに、蛋白質の高次構造が構成アミノ酸の性質と配列順序によって決められるという考えをも支持するものである。

この様に立体構造が組立られて行く過程で、又その構造の保持のうえで Ca^{2+} はどんな役割を果しているのだろうか。 Ca^{2+} を電気透析で完全に除いたアミラーゼについてその高次構造、 Ca^{2+} の結合力や様式について調べた。 Ca^{2+} 除去アミラーゼは非常に外圍の変化に敏感で安定領域はせばめられているが、Ca を含んでいる場合 (native) と同様な立体構造を保っていることが物理化学的に確認せられた。このアミラーゼが native アミラーゼと同様な活性と構造の安定性を回復するためには溶液中に 4~5 gr. atom/mole の Ca^{2+} を必要とする。透析平衡実験から分子上には静電的に作用し合わない位置には \approx 結合力の等しい 3 個所の Ca^{2+} 結合サイトがあること、結合常数は $1 \sim 2 \times 10^6$ で EDTA の pH 6.5 での Ca とのみかけのキレート生成常数 (6×10^{-6}) に近いことがわかった。結合の熱力学的パラメーターから Ca^{2+} の結合は静電的なものであることが示唆され、立体的に Ca 特異的なサイトを形成している Group の一つはカルボキシル基であることが明らかとなった。このサイトは尿素によって分子の高次構造がこわれると同時に失われるが、なお変性状態でも弱い Ca^{2+} の結合が認められた。以上の結果から、高次構造の形成過程での Ca^{2+} の役割について推論を試みた。

論文の審査結果の要旨

蛋白質を変性して完全にその空間構造をこわすと、元の状態には戻りにくい。変性が可逆的なものは分子内に多くの-S-S-架橋のあるものに限られるように考えられていた。今西君は分子内に-S-S-架橋のない枯草菌の α -アミラーゼを用い、しかも沈降、粘度、旋光分散、紫外差スペクトルなどの物理化学的方法を駆使して、分子が完全に糸まり状となったことをたしかめた変性蛋白質から元の未変性状態の蛋白質分子に戻すことができることを示した。

論文は 5 部よりなり、第 1 報ではアルカリ領域における変性と尿素変性を取扱っている。pH をあげて 11.5 に達するまでにその全フェノール性 OH のは 30% だけが可逆的に滴定せられ、分子はわず

かに膨張するにすぎない。それより高い pH で残部のフェノール性 OH が滴定せられ分子はほどけて酵素活性が失われる。このようにこの酵素は強アルカリ性でもかなり安定である。尿素変性の枯草菌 α -アミラーゼは変性剤の除去または稀釈による変性剤濃度の低下により酵素活性を回復する。第 2 報ではこの変性過程における沈降定数、固有粘度、旋光分散定数等の測定結果についての結果より未変性状態の分子への復元は溶液の pH、タンパク質の濃度、溶液のイオン強度などを適当にして分子間の会合をさけつつ、生物活性のある環境へ変性蛋白質分子を移行させることが必須であることを明らかにした。このようにして変性に際し分子が化学的に修飾をうけない限り変性蛋白質を元へ戻すことが可能であることがわかった。第 3 部では酸変性の結果を論じ、pH 4 以下の protonation のおこった状態ではさらに尿素を加えて変性させても溶媒の接近しえない残基が存在し、旋光分散の結果は若干のラセン構造の残存することが示唆された。第 4 報では蛋白質に対するアニオン性・カチオン性および非イオン性の界面活性剤の作用を調べており、界面活性剤は変性剤としてきわめて強力なものであるに拘らず、部分的にはかえって α -ラセンなどの二次構造がつけられることを旋光分散の結果より推論した。この α -ラセン形成の度合は pH に依存するが、イオン性界面活性剤では極端な酸性や極端なアルカリ性のところでも α -ラセンは形成せられる。このとき α -ラセンは界面活性剤によってつけられる疎水性の組織中につけられる。界面活性剤による α -ラセン形成の促進は Bence Jones 蛋白質についても認められる。最後に第 5 報において、このような分子内架橋のない長鎖分子である枯草菌 α -アミラーゼが固有の稠密な構造を安定化するのにカルシウムが大きい役割を果していることを述べている。電気透析によって完全にカルシウムを除去した蛋白質とカルシウム塩溶液との透析平衡によってこの酵素に対する結合定数を求め、その温度変化から熱力学パラメーターを決定し、結合によるエンタルピー変化が小さく、エントロピー変化の大きいために安定化がもたらされることを明らかにした。

以上今西君の研究は、分子内架橋結合のない蛋白質分子の変性の可逆性を分子の諸定数の測定によって空間構造変化を検討した研究として、先駆的な研究であって、蛋白質の物理化学に貢献するところは大きい。15 篇にのぼる参考論文をあわせ考えると、理学博士の学位論文として十分価値があるものと認める。