The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	トリプトフィル結合の非酵素的切断
Author(s)	森下, 美千代
Citation	大阪大学, 1968, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29607
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【20】

氏名・(本籍)	森　下　美千代（もり　した　みちよ）
学位の種類	理　学　博　士
学位記番号	第　1362　号
学位授与の日付	昭和43年3月28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
学位論文名	**トリプトフィル結合の非酵素的切断**
論文審査委員	(主査) 教授　成田　耕造 (副査) 教授　鈴木　友二　教授　松島　祥夫

論文内容の要旨

蛋白質の一次構造を決定するための新しい手段の開発を目的とし，次のような，γ-オキシアシル誘導体を経る二段階の化学反応によって，トリプトフィル結合を選択的に切断する方法について検討した。即ち，第一段階では，ペプチド鎖中にあるトリプトファン残基をオゾン酸化によってN-ホルミルキヌレニン残基に変え（γ-オキソ基の導入），次にヒドラジンを作用させ，ヒドラゾン形成を経て，テトラヒドロピリダゾン誘導体に導き，トリプトフィル結合のカルボキシル側を切断（第二段階の脱アシル反応）する方法である。

まず，上の第二段階の反応条件を，簡単なモデル物質（Levulylphenylalanine, β-Benzoylpropionyl-leucylglycine など）を用いてしらべ，弱酸性溶液中で，置換基のないヒドラジンと加熱下（105°C）に反応させると，30分～2時間で定量的に脱アシルし，反応の速さは，アシル基の性質に依存することがわかった。

次に第一段階の反応条件について，トリプトファンオリゴペプチドを用いて検討し，ギ酸中室温でのオゾン酸化によって，約60～95%の収率でキヌレニン残基が生成することがわかった。また，レゾルシノールの共存によってキヌレニン残基の収率は高くなることが確められた。しかし天然ポリペプチドや蛋白質の場合には，レゾルシノールの存在は必ずしも有効ではなく，その存在，非存在に関係なく，60～100%の収率でキヌレニン残基の生成が認められた。他の残基の修飾については，蛋白質の種類によって異なり，R-AE-Bence-Jones protein, tyrocidin B, gramicidin, glucagon ではトリプトファン残基のみが酸化されたが，TMVの場合にはシステイン，glucagon ではメチオニン，lysozyme ではチロシンおよびシスチン残基が部分的に酸化された。この酸化生成物に，上述の第二段階の反応条件を適用すると，合成オリゴペプチドでは約35～70%の収率でトリプトフィル結合が切断された。天然ポリペプチドや蛋白質では，tyrocidin B, TMV, R-AE-Bence-Jones protein (Sh)

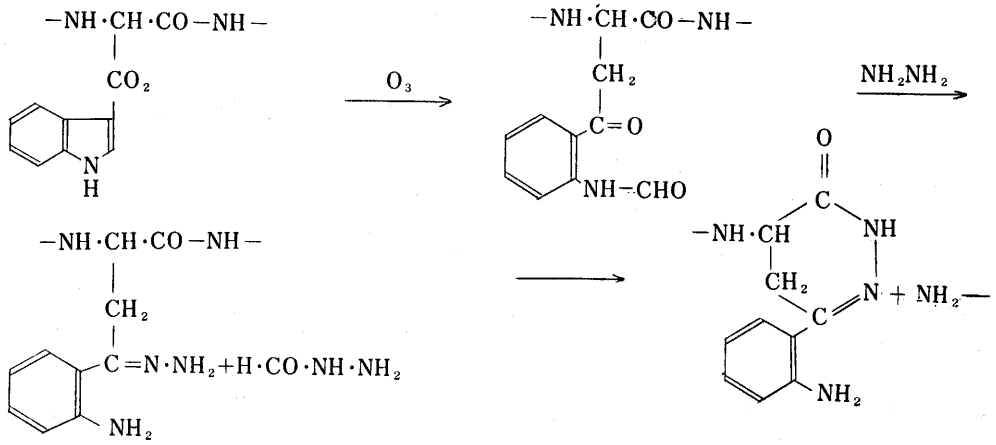
の場合，8～17%の収率でトリプトフィル結合のみが選択的に切断された。しかし，lysozyme, R.-CM-lysozyme, glucagon の場合には他のペプチド結合の非選択的な加水分解が認められた。一方，切断反応で生成したカルボキシル末端のテトラヒドロピリダゾン誘導体は 4-位の アミノ基の脱離反応によって，ペプチド部分から遊離することが見出された。

結論として，このトリプトフィル結合の切断反応は，収率，選択性の両方で必ずしも満足できるものではないが，原理的には有効であり，今後反応条件（特に第二段階）の改良によって，蛋白質の構造決定に利用され得ると思われる。

一般のペプチド結合の切断反応と異なり，この方法の特徴は，二段階の反応であることで，第一段階ではペプチド鎖中のトリプトファン残基の側鎖の修飾のみを行なう。導入されたN-ホルミルキヌレニン（またはキヌレニン）残基は特徴のある紫外吸収スペクトル，円偏光二色性，螢光性を示し，従って酵素蛋白質の化学修飾による構造と機能の関係の研究等の有効な手段の一つとして利用できると思われる。また，理想的に反応が進行する場合には，第一段階で修飾されたトリプトファン残基の位置を，第二段階の反応によって決定することも出来，構造研究と機能の研究の双方に利用が可能と考えられる。

論文の審査結果の要旨

森下君の論文は4部分から構成されている。トリプトファンは通常のタンパク質構成アミノ酸中で少ない構成員子の一つであるので，トリプトフィル結合を選択的に切断する方法が開発されれば，タンパク質の一次構造決定のための一手段として極めて有用である。そこで森下君は次のような原理によるトリプトフィル結合の切断方法を試みた。



すなわち，トリプトファン残基をホルミルキヌレン残基にオゾン酸化し，これにヒドラジンを作用させてヒドラゾンを形成，ついでテトラヒドロピリダゾン環形成と同時にトリプトフィル結合を切断するという機構である。

キヌレニル残基のモデルとしてγ-オキソアシル基をもつ levuloyl-Phe, β-benzoylpropionyl-Phe, β-benzoylpropionyl-Leu-Gly, γ-oxoornithyl-Phe を合成し，ヒドラゾン形成反応，引続くテトラヒ

ドロピリダゾン環形成反よるペプチド結合の開裂反応の条件を検討し，弱酸性（pH 3.8〜5.8）で105°Cに0.5〜2時間加熱すると，定量的にペプチド結合が開製することを見出した。次に第一段階の反応であるトリプトファン残基のオゾン酸化の条件を検討し，蟻酸中室温で2当量のオゾンを使用すると，合成ペプチドについて50〜95％収率で，また天然ペプチドやタンパク質について60〜100％収率でホルミルキヌレニンが生成することを観察した。酸化ペプチドやタンパク質にヒドラジンを作用させて新たに遊離するアミノ酸，あるいはN末端基を定量したところ，合成ペプチドでは35〜70％，数種のタンパク質では8〜20％の収率でトリプトフィル結合の切断が確認された。しかしトリプトファン残基の酸化の際にシスチン，メチオニン，チロシン残基も一部酸化され，また切断収率も定量的には程遠い結果であった。しかしながら，この反応の機構そのものはタンパク質に有効であることを示しており，反応条件の改良によって初期の目的を達することが十分可能なことを示し，さらにトリプトファン以外のアミノ酸でも，γ-オキソ基に導くことができれば，本反応の機構を応用することができることを示した。

以上の森下君の研究結果は，理学博士の学位論文として十分価値あるものと判断した。