

Title	枯草菌アミラーゼの再生現象と菌体内における立体構造の形成
Author(s)	福士, 尹
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/29622
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 3 】

氏名・(本籍)	福 士 尹 よく し つかさ
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 1 2 4 5 号
学位授与の日付	昭 和 4 2 年 6 月 1 2 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	枯草菌アミラーゼの再生現象と菌体内における立体構造の 形成
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 佐藤 了 教 授 倉橋 潔

論 文 内 容 の 要 旨

立体構造を完全に破壊されたタンパクは単に変性環境を除くことによりそのタンパクに固有な立体構造を回復することができる。この現象は「再生」と呼ばれ生合成系でつくられたポリペプチドの立体構造はそのアミノ酸配列によってのみきめられるという仮説の拠りどころとなっている。

この論文は枯草菌アミラーゼの再生過程における立体構造の変化を調べ再生現象が枯草菌内におけるアミラーゼの立体構造の形成にどのような形で関与しているかについて述べている。

(I) 再生過程における酵素活性と立体構造の変化

酸性 8 M 尿素で変性させたアミラーゼ溶液から変性剤を除去すると酵素活性は徐々に増加し約 6 時間後 60~80% 回復して停る。立体構造の回復を示すパラメーター (旋光分散値および差吸光係数) は変性剤の除去と同時に 70~80% 回復しそれ以後変化しない。これらのことから変性アミラーゼは変性剤を除去すると急速に固有の立体構造に近い構造をとり、それから徐々に再配列することにより正しい構造になり活性を発現するということが推定される。再生途中のまだ活性のない分子の構造は明らかに正しい固有の構造とは違いプロテアーゼにより分解されたガラス器壁に吸着される傾向があり、また SDS の存在や高温 (40~50°C) により再生が抑制される。再生中のアミラーゼの電気泳動を行なうと活性の増加につれて変性しないアミラーゼに相当するバンドが顕著になってくる。これらのことは再生中のアミラーゼの示す活性は完全に活性を回復した分子と全くあるいは少ししか活性のない分子との混合物によるものであることを示唆する。SDS および温度による再生の阻害はそれらを除去することにより除かれる。この実験を次のように発展させることができる。もし再生を抑制するような条件で枯草菌を培養できるなら生合成されたアミラーゼ分子鎖の立体構造は形成されるだろうか。

(II) 再生抑制の条件で培養された菌のアミラーゼ産生

ある濃度の SDS の存在下で菌の生育は正常であるがアミラーゼの産生が抑えられる。しかしその培養液を希釈しても活性の増加が見られないので立体構造の形成が阻害されたために見かけ上の産生が抑えられたのではない。また細胞内にアミラーゼの蓄積も認められないのでアミラーゼ合成そのものが阻害されたと解釈される。

菌を45°Cで培養した場合37°Cにくらべて生育およびアミラーゼ産生に著しい相異は認められない。また培養液を室温に戻しても活性の増加は見られない。このことは生体内におけるアミラーゼの立体構造形成には再生の実験で考慮されなかった要因が存在することを示している。それはいくつか考えられるが次の2つの点を考慮してアミラーゼの誘導体をつくり再生の実験を行った。(1)生合成系ではリボゾームに固定されているため立体構造形成中の分子どうしの相互作用がない。(2)生長しつつあるポリペプチド鎖のC端は絶えずリボゾーム上に固定されている。

(Ⅲ) カルボキシメチル・セルロースおよびポリアミノ・ポリスチレンに結合させたアミラーゼ

カルボキシメチル・セルロースのカルボキシル基とアミラーゼのアミノ基、ポリアミノ・ポリスチレンのアミノ基とアミラーゼのチロシン残基のフェニール基を結合させ不溶性アミラーゼ(夫々 CMC-A および PS-A と呼ぶ)をつくった。このアミラーゼ誘導体はもとのアミラーゼに対して夫々2.4%および0.8%の酵素活性をもっていた。またこのアミラーゼ誘導体はもとのアミラーゼに比べ変性環境(4.5M尿素, 50°C)に対して強い抵抗性を示す。アミラーゼ誘導体を8M尿素, pH 3.2あるいは8M尿素, M/400 EDTA 中に24時間放置し変性剤を除去すると PS-A の酵素活性は10~30%しか回復しないが CMC-A の活性は Ca イオンが十分に存在する場合急速にもとの値まで回復する。Ca 量が不十分な場合あるいは EDTA または SDS が存在する場合回復は阻害される。再生の最適 pH はアミラーゼが8.0~8.5で細胞の pH より幾分アルカリ性であるのに対して CMC-A では7付近である。変性処理で CMC-A の立体構造が完全に破壊されているかどうかという疑問は残るが、少なくとも完全に失活しているということは pH 5.0 で再生させた場合ほとんど活性が回復しないことから明らかである。また定性的にも変性・未変性 CMC-A の差スペクトルで変性による青方移動が認められる。菌体内におけるアミラーゼの立体構造形成に温度(45°C)の影響は認められなかったが CMC-A の再生に対しても Ca 量が充分である場合は影響しない。

このようにカルボキシメチル・セルロースに結合させたアミラーゼの再生はいくつかの点で生体内におけるアミラーゼの立体構造形成の過程と類似している。即ち再生現象において分子どうしが互いに隔離されていることおよび1点あるいは数点(生合成系ではC端1点だけであるが)でポリペプチド鎖が固定されているという物理的制限を加えるならば生合成系における立体構造の形式により矛盾なく再生現象を適用することができる。

論文の審査結果の要旨

タンパク質のもつ完全空間構造はそのタンパク質の一次構造によって自然に定められるという考えは今日ひろく受け入れられつつある。従って変性タンパク質から未変性の構造が再生してくる現象と生合成系におけるタンパク質の完全空間構造の形成とが全く同一に取り扱えるかどうかは興味のある

問題であり、この研究ではその問題への一つの近接をこころみている。

用いられたタンパク質は、枯草菌の産生する α -アミラーゼであってその立体構造の検討には、物理化学的には旋光分散係数と紫外差吸収スペクトルの測定により、他方生化学的にはこの酵素のアミロース分解能によって追跡している。8 M尿素で酸性溶液中で変性した枯草菌アミラーゼより、変性剤をのぞくと、ほとんど同時に旋光性や差スペクトルは70~80%まで復元するが、酵素の活性は約6時間を経て、同程度の回復がみられるにすぎない。この再生過程にある分子は、プロテアーゼの作用を受け、SDSの存在や加熱(40~50°)によって再生を抑制される。電気泳動の結果によると再生中の系は未変性構造に回復したものと、若干の変化をうけたものの混合系で中間の活性を示す構造の存在は否定せられた。

また SDSの存在下での枯草菌の培養から SDSによるアミラーゼの産生の低下は、高分子鎖の正しい折りたたみの阻害によるのではなく合成そのものの阻害によることが明らかにされた。また温度による産生の相違をしらべ45°Cと37°Cではほとんど差のないことを認め、生合成系での立体構造形成と変性タンパク質の再生との間に明らかな差のあることを示した。

次に、アミラーゼのポリペプチド鎖を他の高分子に固定し不溶化して再生実験を行なった。すなわちカルボキシメチルセルロースまたはポリアミノポリスチレンにアミラーゼを結合させて得られる誘導体の変性と再生の実験を行なった。これらの誘導体は元のアミラーゼにくらべると酵素活性は低いが、たとえばカルボキシメチルセルロース・アミラーゼでは完全回復が見られることを示した。またアミラーゼ自身が急速に変性する4.5M尿素50°Cという条件でも比較的安定なことを認め、ポリペプチド鎖の固定によって変性タンパク質の再生現象と生合成系の立体構造形成の間に類似性が一層増すことを明らかにした。

以上富士君の研究は、タンパク質の完全空間構造の保持と形成に新しい知見を加えたもので理学博士の学位論文として十分価値のあるものと認める。