

Title	かんしよ β -アミラーゼの活性と構造との関連性に関する研究
Author(s)	萬年, 成泰
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/30116
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	萬 年 成 泰
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 1962 号
学位授与の日付	昭和 45 年 3 月 30 日
学位授与の要件	薬学研究科応用薬学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	かんしょ β -アミラーゼの活性と構造との関連性に関する 研究
論文審査委員	(主査) 教授 上原喜八郎 (副査) 教授 青沼 繁 教授 岩田平太郎 教授 三浦 喜温

論 文 内 容 の 要 旨

かんしょ β -アミラーゼの活性と構造との関連性を明らかにする目的で、アミノ酸組成、末端アミノ酸、アミノ酸残基の状態と活性との関連性について検討し、いくつかの新しい知見を得た。また、実験をすすめるにあたってタンパク質中のチロシンを多くの試料について定量する必要が生じたため、この目的にかなった比色定量法を開発した。

第 1 章 かんしょ β -アミラーゼの精製

日本産かんしょ高系14号より Balls らの方法に従って結晶化した。再結晶は、原報による方法では、再現性および精製効率が悪いため、これを改良して好結果を得た。実験には、再結晶したものを Sephadex カラムクロマトグラフィーによってさらに脱塩精製したものをを用いた。この段階で比活性は最高になり、以後 DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー、ECTEOLA-セルロースカラムクロマトグラフィーなどを行なっても、もはや比活性は上昇しない。またディスク電気泳動、デンブング電気泳動、チセリウス電気泳動などを行なったが、常に単一の泳動像を示した。そのほか、N末端アミノ酸としてアラニンしか見いだされないことから考えて、この酵素の純度は、ほぼ純粋に近いものと思われる。

第 2 章 アミノ酸組成および末端アミノ酸

[1] アミノ酸組成を、Thoma ら(米国)がすでに報告している値と比較すると、日本産アミラーゼの方が全体にアミノ酸残基数が多く、また、各アミノ酸の組成比も、トレオニン、セリン、グルタミン酸、バリン、メチオニン、ヒスチジンについては異なっている。したがって、両酵素は、同じ、かんしょから得たものでありながら、かなり異なったものであると考えられる。

〔2〕 SH 基は、 β -アミラーゼ 50,000g あたり 5 個見いだされた。すべて反応性に乏しく、SH 試薬 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) とはまったく反応しない、また、disulfide 結合は存在しない。

〔3〕 N 末端アミノ酸は、アラニンで、 β -アミラーゼ 50,000g あたり 1 分子存在する。C 末端アミノ酸としては、グリシン (0.7~1 分子) とプロリン (0.3~0.4 分子) が見いだされた。

第 3 章 リボフラビンおよびアデニン存在下の光化学酸化による“active”トリ

プトファンの証明

〔1〕 リボフラビン存在下の β -アミラーゼの光化学失活に及ぼすアデニン、グアニンの影響

(a) β -アミラーゼにリボフラビンの存在下で可視光線を照射すると、酵素はゆるやかに失活するが、その失活は、アデニンを加えおくことによって著しく速められた。

上原らは、酵母アルコール脱水素酵素の光化学失活がアデニンよりもグアニンによってより強く促進されると報告しているが、興味深いことに、 β -アミラーゼの場合、グアニンにはほとんど作用が認められなかった。

(b) このほかのプリンまたはピリミジン誘導体にもこのような作用はなかった。

(c) また、FAD, FMN, ルミフラビン存在下の光化学失活に対してアデニンは促進作用を示すが、そのほかの光増感色素による光化学失活に対しては、効果はなかった。

〔2〕 アミラーゼ、変性アミラーゼ、遊離アミノ酸の光化学酸化物のアミノ酸分析

(a) β -アミラーゼのリボフラビン存在下の光化学酸化によって、トリプトファン、システイン、メチオニンおよび少量のヒスチジンが分解する。

(b) さらにアデニンを加えて光を照射すると、トリプトファン、チロシン、システインおよびメチオニンの分解が促進され、これに伴って失活率も大きくなる。

(c) 分解が促進される 4 つのアミノ酸のうち、システインとメチオニンの光化学分解は、それらが遊離の状態にあってもペプチド鎖中にあってもアデニンによって促進される。

(d) これに対してトリプトファンとチロシンの光分解は、遊離の状態あるいは単に、ペプチド鎖中に組み込まれただけの状態では、アデニンを加えてもまったく促進されない。その分解が促進されるのは、ペプチド鎖が特定の構造をとることによってこれらアミノ酸残基が異常に反応性の高い“active”な状態になった場合だけである。

(e) native な β -アミラーゼ中の“active”なトリプトファン残基は特に異常で、リボフラビンとアデニン存在下の光化学分解の速度が、ゆるやかに変性した β -アミラーゼ中の“active”なトリプトファン残基の酸化速度よりも大きい、ほかのアミノ酸残基の分解速度は、すべて変性アミラーゼ中のものの方が大きい。

〔3〕 “active”トリプトファンおよびチロシン残基と活性との関連性

リボフラビンとアデニンの共存下で β -アミラーゼの光化学反応を行なった場合の β -アミラーゼ活性の低下と“active”トリプトファン残基の減少量との関係をグラフに描くと直線になった。一方、活性の低下と“active”チロシン残基の減少量との関係は曲線になった。これから、チ

ロシンについては、この段階ではっきりしたことはいえないが、“active”なトリプトファン残基は、酵素活性発現のために重要な役割を果たしていると考えられる。

第4章 タンパク質中のチロシンの比色定量法

〔1〕新しい定量法は、次のようなものである。試料水溶液 1 ml に 0.3N 水酸化ナトリウム液と 0.025N 硝酸の等容混合液 2 ml および 0.15% 1-nitroso-2-naphthol 溶液 (nitrosonaphthol を 0.1N 水酸化ナトリウム液に溶解したもの) 1 ml を加え、沸とう浴中 10 分間放置する。次いで 50°C の水浴に移し、温度が平衡に達したならば、濃硫酸 4 ml を加えて発色させる。冷却後 520 m μ の吸光度を測定する。

〔2〕チロシンと nitrosonaphthol の反応 (Gerngross の反応) を利用してチロシンの定量を行なう試みは多いが、ここに示した方法がこれまでの方法とまったく異なるのは、この反応を高濃度 (19N) の硫酸中で行なう点にある。この方法の利点を以下にする。

(a) これまでの方法ではすべて、定量に先だってタンパク質を加水分解しなければならなかったが、この方法では、19N の硫酸にタンパク質はきわめてよく溶け、また試薬ともよく反応するから、それが不要になった。

(b) 19N 硫酸中では、生成した色素がきわめて安定になった。

(c) 多量の nitrosonaphthol を用いてもにごりを生じないので、感度を大幅に高めることができた。

(d) これまでのように、過剰の試薬を有機溶媒で抽出したり、色素の安定化剤を加えたり、発色の条件を厳密にしたりする必要がないため、操作は、きわめて簡単かつ容易になった。

〔3〕この方法を使って、チロシン量がすでに知られているいくつかの酵素のチロシンの定量を行なったところ、ほぼ文献値と一致した値が得られた。

論文の審査結果の要旨

α -アミラーゼに関する研究は著しく発展しているが、 β -アミラーゼの本質に関しては重要な知見が殆んど得られていない。日本産のかんしよ高系14号の β -アミラーゼを結晶状に調製し、これを用いてそのアミノ酸組成を明らかにし、またN末端アミノ酸がアラニンであること、C末端アミノ酸がグリシンまたはプロリンであることを明らかにした。次に β -アミラーゼにリボフラビンを加えて可視光線を照射すれば β -アミラーゼは光化学的に酸化され、それに伴って失活するが、微量のアデニンはこの光化学失活を著しく促進することを認めた。この現象を詳しく研究し β -アミラーゼの活性発現にいかなるアミノ酸が関係しているかを調べ、トリプトファンが重要な役割を演じているのではないかと推察した。

なお、本研究を行なっている際蛋白質中に含まれているチロシンの定量法として 1-ニトロソ-2-ナフトールを用いる従来の方法を改良し操作も簡便であり、精度もよくまた生成した色素も安定であるという改良法を考案した。