



Title	コウジカビのN-アセチル- β -D-グルコサミニダーゼに関する研究
Author(s)	妻鹿, 友弘
Citation	大阪大学, 1972, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30658
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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	妻 鹿 友 弘
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	第 2487 号
学位授与の日付	昭 和 47 年 3 月 25 日
学位授与の要件	理学研究科生物科学専攻 学位規則第5条第1項該当
学 位 論 文 題 目	コウジカビのN-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼに 関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松島 祥夫 (副査) 教 授 成田 耕造 教 授 福井 俊郎

論文内容の要旨

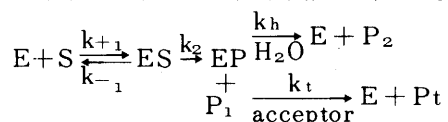
N-Acetyl- β -D-glucosaminidaseは、自然界に広く分布し、糖蛋白の構造研究に有用であるので、かなりの研究が報告されているが、その作用機作に関する研究は、ほとんどなされていない。

A. oryzae の酵素は、1954年に Kuhn によって、その特異性が少し調べられているだけである。近年 N-Acetyl glucosamine の polymer に働く、endo-型の Lysozyme はX線解析によって、その作用機作が最も詳細に研究されている。それゆえ、exo-型と思われる本酵素の作用機作を研究し、比較することは意義深いと思われる。

タカジアスターゼより精製した本酵素は、分子量14—14.6万、糖を約 3.8%含む糖タンパクであった。本酵素が非還元末端から N-Acetyl glucosamine を遊離する exo-型であることを、N-Acetyl-chitopentaitol を用いて証明した。N-Acetyl-chitooligomer の水解速度の研究から、この酵素の活性部位は、N-Acetyl glucosamine 2 残基が結合出来る 2 個のサブサイトからなることがわかった。

アグリコン側のサブサイトの様子は、本酵素が強い糖転移作用を持っていたので、acceptorの特異性を調べることによって明らかにしようと試みた。Phenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (I) を高基質濃度で酵素消化すると、基質自身への転移が起り、GlcNAc- β -(1-4)GlcNAc- β -phe と、GlcNAc- β -(1-6)GlcNAc- β -phe が、約13:1の割合で生成した。

転移反応を定量的に扱うため、次の3段階機構を考えた。



但し、 k_h, k_t は、EP の水解速度定数及び転移速度定数、

$P_1(\text{aglycon})$ と $P_2(\text{glycon})$ の遊離速度の Lineweaver-Burk plot によって求めたミカエリス定数、

最大速度定数は、

$$K_m(P_1) = K_m(P_2) = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \cdot \frac{c_1 k_h + c_2 k_t}{c_1 k_h + c_2 k_t + k_2}$$

$$V_{p1} = k_2 (c_1 k_h + c_2 k_t) e_0 / (c_1 k_h + c_2 k_t + k_2)$$

$$V_{p2} = k_2 \cdot c_1 k_h \cdot e_0 / (c_1 k_h + c_2 k_t + k_2) \text{ となる。}$$

但し C_1, C_2 は water と acceptor の濃度

(k_t/k_h) を転移率とすると、最大速度定数から次の関係が得られる。

$$(k_t/k_h) = \frac{C_1}{C_2} (V_{p1}/V_{p2} - 1)$$

これらの関係が成り立つことは、acceptorとして、種々のアルコールを加えた時、Lineweaver-Burk plot が直線になり、しかも実験誤差の範囲内で同じ K_m を与えたこと、acceptor濃度を変えても、 (k_t/k_h) は、ほぼ同じ値になったことによって確かめられた。 (k_t/k_h) が大きな値となったのに、アルコールを加えた時の最大速度定数 V_{p1} が、アルコールを加えない時の値とかわらないことから、この酵素反応は、 k_2 が律速段階であることが推測された。

グリコンの方の酵素のサブサイトの様子は Phenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (I) の deoxy 及び methoxy誘導体を用いて調べた。酵素と基質(I)、酵素と deoxy誘導体との、それぞれの、結合エネルギーの差は、各水酸基と酵素との interaction によるエネルギーと考えられる。(これを部分結合エネルギーと呼ぶ。)

2位の acetamido と酵素との部分結合エネルギーは、(I) と Phenyl- β -D-glucoside との結合エネルギー差から、aglycon の結合エネルギーは(I) と 2-Acetamido-2-deoxy-1,5-anhydroglucitol との結合エネルギーの差から得た。これらの部分結合エネルギーの総和は、ほぼ(I)の結合エネルギーに近い値となった。又、これらの部分結合エネルギーの値、methoxy化合物の水解速度を Lysozyme と比較することにより、次の事が推測された。

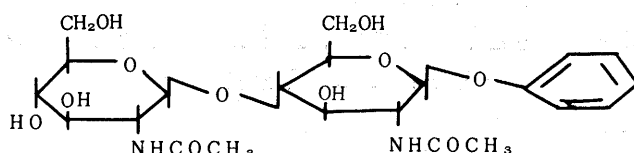
2位の acetamido は、Lysozyme のサブサイトCにおいていわれているような、2個の水素結合と、acetamido の methyl と酵素との hydrophobic interaction によって強く結合しているように思われる。3位及び4位の水酸基は、部分結合エネルギーが共に 1.1 Kcal/mole であることから、水素結合をしているのではないかと想像され、その場合、3-O-methyl誘導体が容易に酵素作用をうけることから、酵素側の hydrogen を通して水素結合をしているのではないかと考えられる。又、3-deoxy誘導体が非常に酵素作用をうけにくいことから、3位の水素結合は、酵素作用にとって重要な役割を演じているものと思われる。

論文の審査結果の要旨

酵素 N-acetyl- β -D-glucosaminidase は、種々の糖タンパク質、その他ムコ多数の構造研究に有用であるが、妻鹿君はこの酵素を *Aspergillus oryzae* の分泌物より抽出精製し、はじめてディスク電気

泳動で単一のバンドをあたえるまで純化し、その種々の性質を綿密に検討した。この酵素は一種の糖タンパク質であることが判明したが、分子量は超遠心沈降平衡法により140,000乃至146,000と決定された。また種々の天然基質または合成基質に対する加水分解触媒作用を検討し、基質中 N-acetyl-glucosamine 残基の4位が酵素タンパクに極めて近接する必要があるらしいこと、また aglycon 部分の構造如何により酵素作用が鋭敏に左右されることを見出した。

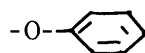
次にこの酵素が加水分解作用の他に強力な糖転移作用を持つことを見出し、この作用を利用して化学的には合成が困難な



を結晶として

調製することに成功した。また N-acetyl-chitopentaitol に対する酵素作用を検討し、還元力を有する生成物として N-acetyl-glucosamine のみしか認められないことより、この酵素が *exo*-glycosidase に属することを証明した。また糖転移反応と加水分解反応の速度常数の比 k_t/k_h が $C_1/C_2 (V_{p1}/V_{p2}-1)$ (C_1, C_2 夫々水および acceptor の濃度、 V_{p1}, V_{p2} 夫々 aglycon および glycon 生成の最大速度) に等しいことを理論的に誘導し、種々のアルコール類を acceptor としてこの値を測定した結果、本酵素の acceptor site はかなり hydrophobic であるように思われる。

次に phenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide の種々の基質アナログに対する酵素作用の比較から、本基質においては各官能基と酵素タンパクとが下記のエネルギーで結合して複合体を形成することを推定した。

-O- 	0.60 Kcal/mole
-NHC(=O)CH ₃	3.4
-OH(C ₃)	1.1
-OH(C ₄)	1.1
-OH(C ₆)	0.35

以上、本論文は *Aspergillus oryzae* の N-acetyl- β -D-glucosaminidase の純粋分離およびその性質について綿密な研究を行なったもので、理学博士の学位論文として十分な価値があると認める。