



Title	ヒト耳下腺唾液の β -N-アセチルグルコサミニダーゼに関する研究 : 特に等電点7.2のexo型酵素について
Author(s)	渡邊, 達夫
Citation	大阪大学, 1975, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31455
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 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

【 4 】

氏名・(本籍)	わた 渡 邊 達 夫
学位の種類	歯 学 博 士
学位記番号	第 3 4 4 5 号
学位授与の日付	昭和 50 年 8 月 1 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	ヒト耳下腺唾液の β - <i>N</i> -アセチルグルコサミニダーゼ に関する研究—特に等電点 7.2 の <i>exo</i> 型酵素について—
論文審査委員	(主査) 教授 常光 旭 (副査) 教授 竹田 義郎 教授 小谷 尚三 助教授 加藤慶二郎 講師 岩壺 克哉

論 文 内 容 の 要 旨

β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼには、*N*-アセチルグルコサミンを構成糖とする多糖ないしオリゴ糖分子内部の β (1→4) 結合を加水分解する *endo* 型のもので、分子の非還元末端残基として存在する *N*-アセチルグルコサミンの β (1→4) 結合を切断する *exo* 型のもので一応区分されている。ヒト由来の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼに関する研究は、近年になって、遺伝的複合糖質代謝異常症等と関連して盛んになり、脳、脾臓、肝臓、腎臓、胎盤および血漿中のものについて詳しい報告が行なわれている。またヒト耳下腺唾液にはリゾチームの存在が早くから知られ、その蛋白特性も明らかにされている。リゾチームは感受性細菌の細胞壁を溶解する活性に加えて、キチンを加水分解する *endo* 型の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性を持つことが示されている。一方、耳下腺唾液中の *exo* 型の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼについては、広くグリコシダーゼ研究の一環として行なわれ、本酵素活性と pH 特性を報じた Menguy ら (1970) の研究、および肝臓、血液中の本酵素研究における対照実験として混合唾液についても触れている Ikonne and Ellis (1973) らの研究があるのみである。著者はヒト耳下腺唾液より *exo* 型の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼの分離精製を試み、その性質の一端を明らかにすると共に、本酵素と耳下腺唾液より分離精製したリゾチームとのエチレングリコールキチンに対する共同作用を追究した。

ヒト耳下腺唾液は健康な成人の耳下腺開口部より採取した。酵素活性は、*p*-ニトロフェニル-*N*-アセチル- β -*D*-グルコサミニドを基質として用い、0.05M クエン酸-0.1M リン酸二ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) 中で 37℃、1 時間酵素反応をさせた後、遊離した *p*-ニトロフェノールを定量して、測定した。

採取した 13ℓ の耳下腺唾液を硫酸で塩析して濃縮した蛋白画分を、DEAE-セルロースカラムによる

クロマトグラフィにかけた。この操作で β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼは、等電点 (pI) をそれぞれ7.2および5.0とする二つの活性画分に分れた。本研究では、そのうち pI7.2の画分について、セフアデックス G-150 によるゲル濾過、ハイドロオキシアパタイトカラムクロマトグラフィ等による精製を行ない、ディスク電気泳動的に1ピークを示す酵素標品を得た。この精製酵素の分子量は、ゲル濾過法により約15万と推定された。なお SDS 電気泳動法では、本精製酵素蛋白は分子量が約86,000と66,000の二つのバンドに分れた。本精製酵素は *p*-ニトロフェニル-*N*-アセチル- β -D-グルコサミニドのみならず、*p*-ニトロフェニル-*N*-アセチル- β -D-ガラクトサミニドにも作用した。ただしこれら両基質に対する至適 pH はそれぞれ4.5および3.8であり、明確な差が認められた。しかし、① pH調節あるいは加熱による酵素蛋白の変性に対して上記両酵素活性が同様な態度を示し、その活性比が常に一定に保たれたこと、② 二種の基質を混合した場合の反応速度が、同一酵素が両反応を同時に触媒した時の理論値に近似していたこと、③ *N*-アセチルグルコサミンなどその他の拮抗阻害剤が両基質に対して同じ K_i 値を与えたこと、などから本酵素のもつ β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性と β -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ活性は、同一酵素蛋白の同一活性部位の働きによるものであることが強く示唆された。

次に精製した本酵素の糖転移活性について検討した。糖転移の反応には、 β -フェニル-*N*-アセチル-D-グルコサミニドを基質として用い、37°Cで2時間反応後、フェノールと *N*-アセチルグルコサミンの両者の生成量を測定することにより調べた。ちなみに、強い糖転移活性があることが知られている *Aspergillus oryzae* より精製した β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (阪大, 理, 松島研, 妻鹿友弘博士より供与されたもの) を陽性対照とした。ヒト耳下腺唾液の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼには糖転移活性が認められなかった。このことは薄層クロマトグラフィならびにガスクロマトグラフィで確認した。

更にこの酵素の *N*-アセチルグルコサミンポリマーに対する作用を調べるために、取り扱いが容易な水溶性のエチレングリコールキチンを基質として実験した。すなわち、本酵素を単独で、あるいはヒト耳下腺唾液より精製したリゾチームとともに、上記ポリマーに37°Cで反応させ、遊離する *N*-アセチルグルコサミンを Reissig らの方法 (1955) で測定した。本酵素のみを作用させた場合には有意の *N*-アセチルグルコサミンの遊離は認められなかったが、耳下腺唾液リゾチームと本酵素とを共同作用させると、リゾチーム単独で作用させた場合よりも *N*-アセチルグルコサミンの遊離が著明に増加した。

以上を要約すると、ヒト耳下腺唾液に存在する *exo* 型の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼには、等電点が異なる少くとも二つの画分が存在することが明らかとなった。そのうち pI7.2の画分を分離精製して、その酵素学的特性を調べた結果、次の諸点が明らかになった。すなわち、(1) 分子量は約15万と推定された。(2) *p*-ニトロフェニル-*N*-アセチル- β -D-グルコサミニドと *p*-ニトロフェニル-*N*-アセチル- β -D-ガラクトサミニドに対しては同一酵素の同一活性部位で作用することが強く示唆された。(3) 糖転移活性は検出出来なかった。(4) 本酵素は唾液リゾチームによるエチレングリコールキチンの加水分解を著しく増強した。

論文の審査結果の要旨

本研究はヒト耳下腺唾液の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼの分離精製に初めて成功し、その酵素蛋白としての特性を明らかにしたものである。また、作用の面では、この酵素には糖転移活性は認められず、唾液リゾチーム単独では加水分解されにくいエチレングリコールキチンの加水分解が、本酵素の添加により増強されることが示された。

この論文は口腔内の生理および病理過程に重要なかわりあいをもつ多糖ないしは複合多糖の代謝を支配する要因を解析する手掛りを与えるもので、歯学博士の学位に十分値するものと認める。