

| | |
|--------------|---|
| Title | タカアミラーゼAの構造と機能—ジスルフィド結合の位置決定と酵素活性関与アミノ酸の同定 |
| Author(s) | 近藤, 淳 |
| Citation | 大阪大学, 1985, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/34621 |
| 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。 |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

| | | | |
|---------|--|---------|----------|
| 氏名・(本籍) | こん 近 | どう 藤 | じゅん 淳 |
| 学位の種類 | 理 | 学 | 博 士 |
| 学位記番号 | 第 | 6 7 7 8 | 号 |
| 学位授与の日付 | 昭和 60 年 3 月 25 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 | | |
| 学位論文題目 | タカアミラーゼ A の構造と機能—ジスルフィド結合の位置決定と酵素 活性関与アミノ酸の同定 | | |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 崎山 文夫 (副査) 教授 福井 俊郎 教授 池中 徳治 | | |

論 文 内 容 の 要 旨

タカアミラーゼ A (TAA) は麹菌 (*Aspergillus oryzae*) によって生産される α -アミラーゼ (EC 3, 2, 1, 1) であり澱粉やアミロースの α -1,4-グルコシド結合の加水分解反応を触媒する酵素である。本酵素は 478 残基のアミノ酸より成り、その 197 位アスパラギンに高マンノース型糖鎖を結合した糖タンパク質である。最近その一次構造および立体構造が解明された。

本酵素の構造と機能に関しては、本酵素が 1950 年にタカジアスターゼから精製されて以来、主に化学修飾法によって研究されてきた。しかしながら、チオール基の酵素活性への関与が示唆されている以外には酵素活性発現に必須なアミノ酸に関する明確な情報は得られていない。そこで、本酵素の活性発現に関与するアミノ酸の検索を目的として、チオール基と、未だその活性への関与が検討されていないカルボキシル基について検討した。

まず最初に、その存在様式が未決定のままであった 10 個の半シスチン残基の存在様式を明らかにした。その結果、30 位—38 位、150 位—164 位、240 位—283 位、439 位—474 位がそれぞれジスルフィド結合していた。チオール基は 227 位にのみ存在しており、既報の一次構造における 73 位シスチン残基は本研究では検出されなかった。

次に、チオール基とカルボキシル基の化学修飾により、それらの活性発現への関与を検討した。227 位チオール基の S-シアノ化はアミラーゼ活性に対して大きな影響はなかった。しかしながら、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC) によるカルボキシル基の修飾により、酵素活性は大きく減少した。さらに、修飾されたカルボキシル基は 230 位グルタミン酸であることが明らかとなった。これらの 230 位グルタミン酸と 227 位シスチンの機能に関して、アミラーゼの

立体構造に基いて議論した。

論文の審査結果の要旨

タカアミラーゼAはこうじ菌の産生する α -アミラーゼで、1950年赤堀らにより精製されて以来、種々の酵素的化学的研究が行われてきたが、1980～1981年に一次構造と立体構造が明らかにされ、この酵素の構造機能相関を分子レベルで研究可能な段階に至った。近藤君はこの期をとらえ、タカアミラーゼAの酵素活性に関与するアミノ酸を化学的に同定するため行ったのが本研究である。

近藤君は本酵素の化学構造において存在様式が不明であった10個の半シスチン残基について検討し、4組のジスルフィド結合の位置と227位シスチン残基を確定した。また、73位半シスチン残基についてはスレオニン残基への置換を見いだすとともに、その周辺3ヶ所にも微視的な不均一性が存在することを明らかにした。本酵素のアミノ酸変異が一次構造上平均して起るのではなく、特定の領域に偏在するという知見は、酵素機能や遺伝子構造とも関連して興味深いものである。

近藤君は、さらに227位シスチン残基のS-シアノ化を行い、触媒機能の大半が維持されることからチオール基触媒基説を否定する結果を得た。そこで化学修飾法により酵素活性の発現に関与するアミノ酸の検索を進めた結果、230位グルタミン酸が必須であることを見いだした。このアミノ酸はX線結晶解析の結果から触媒基と推定されているものである。

タカアミラーゼAを含めアミラーゼの触媒作用の分子機構についての詳細な研究は始まったばかりであり、触媒活性に密接に関与するアミノ酸としてグルタミン酸が化学的に同定されたのはこれが最初である。澱粉分解酵素として生物学的に極めて重要なアミラーゼの触媒機構について貴重な知見を提供する本論文は、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。