OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Effects of sonic Oscillation on Take-Amylase A and Its Derivatives.
Author(s)	Kato, Ikunoshin
Citation	大阪大学, 1964, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/941
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【9】

氏名・（本籍）	加藤郁之進（かとういくのしん）
学位の種類	理学博士
学位記番号	第478号
学位授与の日付	昭和39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ならびに，その誘導体に対する音波の影響について**
論文審査委員	（主査）教授 成田 耕造　（副査）教授 伊勢村寿三　教授 赤堀 四郎

論文内容の要旨

酵素分子の活性と構造の関係を探求する一つの有力な方法として，酵素分子の小分子化がある。しかしながら，小分子化の方法は酵素的なものに従来限られていた。高分子破かいの一つの手段として従来から用いられて来た。音波を用いて活性の保持した，小分子化された分子を得る目的で生タカアミラーゼAの破かいを試みた。

10KC. 100W. の音波発生装置を用いて 0～3°C，酸性溶液中で音波を約3時間断続的に照射した標品をDEAE-セルロース クロマトグラフイー並びにゲル濾過によって精製し活性酵素標品を得た。こうして得られた標品は，元の生タカアミラーゼAとほぼ同程度の酵素活性を保有し分子量は約1万低下している。しかし，電気泳動的，超遠心的に単一な本標品も，N-末端は単一ではなかった。そこで更に精製する目的で結晶化を試み，含水アセトンを用いて結晶化に成功した。

この結晶標品は元のタカアミラーゼAが分子量 51,000 であるのに対し，物理化学的，化学的な方法から分子量 37,000 が得られた。

以上のように，球状タンパク質であるタカアミラーゼAがその酵素活性をほとんど保持した状態で，音波によって小分子化されることが判ったが，線状タンパク質にはどのような影きょうを及ぼすかという見地から生タカアミラーゼが持つ全 S-S 結合を還元切断し，再酸化を受けないようにモノヨード酢酸を用いて遊離 SH 基をアルキル化した。酸素活性のない，一応線状タンパク質と見なしうる標品（カルボキシメチル化・タカアミラーゼA）に対し中性 pH で音波処理を行なった。

その結果は生タカアミラーゼの場合と同様にペプチド結合の切断が認められたが，その際酵素活性の出現が認められ，その程度は生タカアミラーゼAの約2％であった。更にこの活性の出現した標品を Gel 沪過によって精製した場合の活性分画は，生タカアミラーゼAの約15％であるのを認めた。

この様な活性出現が S-S 結合の音波の作用による再成によるものかどうかをしらべるために，カルボ

キシメチルシステイン含量の定量を行なったが，ほぼ之と同程度のカルボキシメチルシステインを保有しており，活性出現が S-S 結合の再生成に由来するものでないと推定された。

上記のように，高次構造を破かいしたタンパク質が音波処理によって活性発現するという事実から，更に1次構造の破かいも可能ではないかと考え，カルボキシメチル化・タカアミラーゼAを完全にトリプシン分解した標品，又，アルギニンの箇所だけトリプシ分解した標品を，それぞれ音波処理した。その結果は期待通りであった。

これらの結果は，生タカアミラーゼAの1次，2次，3次構造をかなり破かいしても，音波の作用で少なくとも活性中心附近の構造が元と異質なものである可能性はあるが，とにかく再現されると考えられる。

これらの活性出現反応に対し，Ca^{++}，中性 pH，0.2～0.1% の蛋白濃度などの条件が必要な事が認められた。

最後に，音波による不活タンパク質の活性化現象は，ペプチドの構造に対する音波のどのような作用の結果なのかを知る目的で，旋光分散，粘度の pH 依存性などを調べ，一つの可能な機作を提出した。

論文の審査結果の要旨

酵素蛋白質の活性を保持させたままで分子を小さくし，酵素活性に必要な最小限の大きさの活性断片を得る試みは数多くされているが，加藤君は，Taka-amyalse A の水溶液に音波（10KC）を照射し，活性断片を得ることを試みた。音波処理中に活性は殆んど変化しないにも拘らず，ペプチド結合の切断が生じていることを観察し，反応溶液から数段階の精製法をおこなって活性断片を結晶化することに成功し，その均一性，分子量，アミノ酸組成，酵素化学的諸性質を研究し，もとの酵素より少なくとも 15,000 分子量が低くなったこと，およびもとの酵素の比活性の60%を有することを観察した。

一方 Taka-amylase 中の4個の SS 結合を変性剤存在下に還元し，生じた SH 基をカルボキシメチル基で保護した酵素誘導体（RCM-TAA）を調整し，加藤君はさらにこれに対する音波の影響を研究した。この RCM-TAA は酵素的には不活性な蛋白質であるが，音波処理によって活性が発現することを見出し、酵素活性発現は溶液の，pH，カルシウムイオン濃度，共存無機塩のイオン強度に大きく左右されることを観察，活性発現に最適な条件を見出した。活性の復活した RCM-TAA のアミノ酸分析の結果は SS 結合が再形成されたものではいことを示した。活性化された RCM-TAA の還元粘度の pH 変化は native な酵素と酷似しているが，ヘリックスは全く含まれていないことを旋光分散の測定から推論し，最近今堀博士が提案した cross-β構造と類似した規則的立体構造を RCM-TAA が音波処理によって獲得し，その結果活性が復活するものと推定した。

RCM-TAA をトリプシンで消化すると約30個のペプチド断片に分解されるが，加藤君はこの消化液に最適条件下で音波照射を試み，ペプチドの状態でも活性が発現するという驚くべき事実を見出し，ペプチドを4群に大別し、少なくとも2群のペプチドが酵素活性発現に必須であることを示した。

以上のような加藤君の一連の研究結果は，酵素の活性中心探索に一新方法を提供するものであり，理学博士の学位論文として十分価値あるものと判断される。