

氏 名 (本 籍)	稲 垣 毅 (富山県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第32号
学 位 授 与 年 月 日	平成7年3月14日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	信州大学
学 位 論 文 題 目	Activating Effect of Organic Solvents on Thermolysin
審 査 委 員	主査 信州大学教授 茅原 紘 副査 信州大学助教授 只左 弘治 副査 静岡大学教授 伊奈 和夫 副査 信州大学教授 柴田 久夫 副査 岐阜大学教授 長谷川 明

論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究は酵素が有機溶媒によってどのような影響を受けるかを明らかにする目的で行われたものである。その反応例として、サーモリシンのペプチド合成反応及び分解反応を用いた。その結果、媒体中の有機溶媒が反応の速度を上げる働きを示した。これは無水有機溶媒中の酵素の活性が酵素に結合する少量の水により大きく影響されるという他の多くの研究者による結果とよく似ている。このような酵素反応への有機溶媒の効果は二つの異なる効果、間接的效果及び直接的效果という言葉で説明されてきた。間接的效果とは水-有機溶媒二相系において基質や生成物の分配、物質移動、及び化学平衡のシフトが酵素反応の速度に影響する現象であり、酵素分子への有機溶媒の本質的な作用ではない。一方、直接的效果とは有機溶媒分子が酵素の微小環境、特に活性中心へ直接影響を及ぼすような効果を言う。これらの効果はそれぞれ独立して起こりうるものと考えられ、従って、酵素反応への有機溶媒の効果は上述の二つの効果に分けて考える必要がある。本研究はその点に着目し、以下のように進められた。

酵素の性質への有機溶媒の直接的效果は間接的效果が無視されるような反応系、例えば水-非水溶性有機溶媒一相系、あるいは水-水溶性有機溶媒のような系に限って調べることができよう。しかし、前者の水飽和有機溶媒系では、先に述べた酵素-水相互作用を調べるのに適しており、また後者の系では活性化効果が得られにくいことから、これらの系は除外した。一方、酵素反応への有機溶媒の効果に関する多くの研究は間接的效果と直接

効果の両方が考慮されねばならない二相系を用いて行われてきた。そのようにして得られた結果は概して間接的効果の点から評価されることとなる。本研究で得られた、微量の非水溶性有機溶媒がサーモリシンを活性化させるという実験的事実は、二相系における酵素への有機溶媒の直接的効果は無視することは出来ないことを示している。

この実験で得られた結果から直接的効果は、サーモリシンのペプチド合成反応及び分解反応において緩衝液中への有機溶媒の添加直後から現れ、有機溶媒の溶解度が飽和点に達する前に最大に達した。従来、この方面の研究者により、直接的効果は酵素反応が有機溶媒で飽和された緩衝液中で行われる時に観察されるだろうと考えられてきた。もしこの仮定が正しいならば、最大効果は緩衝液中の有機溶媒溶解度の飽和点で得られると考えることが普通であろう。しかし、本研究の実験結果によれば、この仮定は必ずしも真ではないようであった。なぜならば、サーモリシンの活性は有機溶媒の添加直後から上昇し、最大活性点を経た後に下降する現象が見られた。しかもこの最大活性点は、有機溶媒が飽和に達する以前に得られる場合があった。この事実は先の考えとは合致しないものであり、この種の研究への新しい発見と言えよう。

さらに、この現象を有機溶媒の物理化学的定数と結びつけようと計画し、進めたところ、サーモリシンによる触媒反応の最大活性は有機溶媒の物理化学的定数よりむしろその化学構造と相関することが判った。しかし、構造の極近い同族間では有機溶媒の物理化学的定数に依存することも判った。今まで他の研究者らによって有機溶媒と酵素分子間の相関はたいてい二相系を用いて有機溶媒の物理化学的特性に関して試みられてきた。しかしながら、彼らは直接的効果と間接的効果が同時に生じるような二相系を用い、特別にそれらの区別を考えなかったためにその相関関係を確たるデータにより決定づけることに成功しなかった。別の一部の研究者らによって直接的効果は酵素の活性部位に結合する有機溶媒の構造に関係があると予想されてはきたが、その実験が、他の因子をも含むもので、純粋な意味での酵素－有機溶媒間の相互作用ではなく、その他にも実験的証拠がなく、本研究の結果によって初めてその仮定が確認された。直接的効果が発現するとき、有機溶媒分子の分布は酵素の活性部位とその周囲の間で平衡状態にあることも、この研究により明らかとなった。これは、元来酵素の活性中心は疎水性であるという考えがあるにも関わらず、疎水性の高い有機溶媒が進んで活性部位に取り込まれることはなく、活性部位近傍の有機溶媒の濃度は酵素分子周辺の濃度に等しいことを証明している。また、さらに実験結果は活性部位の有機溶媒分子は活性部位周辺の水と容易に置換され、活性部位に非共有的に結合していることが、他の水溶性有機溶媒との共存下の実験により示された。

さらに化学構造がわずかに異なる有機溶媒においてサーモリシン触媒反応の動力学的パラメーターへの有機溶媒の構造的な影響を見ると、有機溶媒は酵素に対してそれぞれ独自の挙動で作用していることが示された。さらに構造の異なる別の有機溶媒においても有機溶媒の構造のわずかな違いが酵素活性の変化を引き起こすことが確認された。

結局、有機溶媒の構造の極わずかな違いでさえも酵素の微小環境の変化に寄与し、その活性化状態に影響すると結論づけられた。

なお、この研究だけからでは、目的である有機溶媒の活性化機構を明らかにすることはできなかったが、更なる実験データからの解明ができることへの第一歩となる研究であると言えよう。

審 査 結 果 の 要 旨

有機溶媒が酵素に与える影響は、従来殆どnegativeな面で論じられてきたが、近年、通常研究に用いられる極く一般的な酵素に至るまで、相当広い範囲の有機溶媒に対する耐性をもつことが、明らかとなってきた。それが、水-有機溶媒二相系での有用物質の合成から、純有機溶媒中での合成など、広い範囲の応用へと発展した所以である。これらの系での有機溶媒と酵素の相互作用は、この問題の基礎をなす興味ある研究として、自ら注目を集めることとなったが、まだ確定的な結論を出すに至っていない。純有機溶媒中の微量の水の作用については、確実とは言えないまでも若干の考察が最近なされているが、これは上記とは別問題である。また、二相系においては、酵素-有機溶媒間の直接的な相互作用とは別の作用に係るため、上記問題を取り扱うには不適當である。

この研究は、その点を考慮して、純粹に酵素-有機溶媒間の相互作用のみを調べようとすることを、目的として進められたものである。この実験では、水系に微量の有機溶媒を添加することで、その目的を達することができた。すなわち、種々の有機溶媒が酵素（ここではサーモリシンを使用）を活性化したり、不活化したりすることを発見し、その際の活性化に着目して、それがどのような機構で起こるのかを検討した。種々の実験結果から、酵素の活性化は、有機溶媒の構造に依存していることを、明らかにした。この実験結果は、過去、この関係の研究者により、ある程度の予想はされていたが、実験によって証明されたのはこれが初めてである。また構造に依存するとはいえ、同一系列の構造を持つ有機溶媒間では、それが持つ、物理化学的特性、ここではLog P 値（溶媒の疎水性度を表す）および、Hildebrandの solubility parameter(δ) 値（溶媒の極性を表す）に対して相関を持つことと、たとえ同一系列の構造を持つ有機溶媒間でも、ほんの少しの構造上の相違がある場合には、その相関は成り立たないことも、明らかにした。

この論文の問題とすべき論点は、酵素の活性中心における有機溶媒の、直接的な働きを明らかにすることにあるが、筆者はそれを動力学的なparameter を比較することで検討を進めた。それによれば、n-アルコール系列において、 K_m 、 k_{cat} および k_{cat}/K_m とともに炭素鎖が長くなるほど小さくなり、鎖長と逆比例の関係があることが分かった。この結果は、先のまったく同一系列に属する有機溶媒間には、その物理化学的特性にたいして相関がある、という結果そのものをさらに詳細に説明するものである。一方、ごく少しの構造的変化があるn-アルコール系列有機溶媒では、 K_m 、 k_{cat} および k_{cat}/K_m に関する比例関係は存在せず、明らかに上述

の結果が結論つけられた。

有機溶媒がサーモリシンの活性中心に、どのように係ってその活性化を誘発するかについては、なお、さらなるデータを必要とするが、この実験結果が、この重要で興味ある分野へ、その解明の足がかりを築いたという点を評価し、博士の学位論文に相当するものと判断した。