

DA
2345
1999
HG

有機溶媒／水系における
セリンプロテアーゼの構造変化と安定性

工学研究科
筑波大学

2000年3月

山本信治

寄贈
山本信治氏

目次

第1章 序論

1-1 研究の背景と目的	1
1-2 酵素	
1-2-1 はじめに	3
1-2-2 酵素の分類	4
1-2-3 α -キモトリプシン(α -CT)	7
1-2-4 スプチリシン	10
1-2-5 酵素の構造	11
1-3 有機溶媒中での酵素反応	
1-3-1 有機溶媒を用いた酵素反応の経緯	15
1-3-2 反応系に有機溶媒を用いた際の特徴	16
1-4 蛍光分光法	
1-4-1 蛍光の利用	17
1-4-2 蛍光の特性	17
1-4-3 タンパク質の蛍光スペクトル	19
1-4-4 蛍光の消光	21
1-5 有機溶媒中での酵素の安定化	
1-5-1 酵素の変性	24
1-5-2 有機溶媒中での酵素活性の保護	24
1-6 研究目的	26

第2章 酵素の蛍光スペクトルから見た有機溶媒／水系での構造変化

2-1 実験	
2-1-1 使用試薬	27
2-1-2 使用機器	28
2-1-3 実験方法	
2-1-3-1 ホウ酸緩衝液の調製	29
2-1-3-2 アミノ酸エステルの加水分解反応の測定	29
2-1-3-3 酵素の蛍光および蛍光消光の測定	31
2-2 結果および考察	
2-2-1 酵素の蛍光波長と触媒活性の関連性	34
2-2-2 酵素の蛍光波長の経時変化と触媒活性	38
2-2-3 酵素の消光の経時変化	45
2-2-4 Stern-Volmer の式を用いた解析	66
2-3 まとめ	74

第3章 有機溶媒／水系における酵素の安定性の向上	
3-1 実験	
3-1-1 使用試薬	75
3-1-2 使用機器	78
3-2 添加剤を用いた有機溶媒／水系における酵素の安定化	
3-2-1 実験方法	
3-2-1-1 HEPES 緩衝液の調製	79
3-2-1-2 <i>N</i> -アセチル-L-チロシンメチルエステル(ATME)の合成	79
3-2-1-3 添加剤を用いた際の酵素活性の測定	80
3-2-2 溶媒組成によるアミド類を添加した際の効果の変化	81
3-2-3 アセトニトリル-緩衝液 10%系での添加剤効果	
3-2-3-1 糖類を添加した際の効果	90
3-2-3-2 その他の物質を添加した際の効果	95
3-2-3-3 エステル交換反応における添加剤効果	98
3-2-3-4 HEPES 緩衝液を用いた際の効果	100
3-3 共凍結乾燥による有機溶媒／水系での酵素の安定化	
3-3-1 実験方法	
3-3-1-1 凍結乾燥酵素の調製	102
3-3-1-2 共凍結乾燥酵素を用いたエステル交換反応の測定	102
3-3-2 シクロデキストリンを用いた際の効果	
3-3-2-1 シクロデキストリン	103
3-3-2-2 共凍結乾燥の効果	105
3-3-2-3 シクロデキストリンのサイズの違いによる効果	107
3-3-2-4 置換基の違いによる効果	109
3-3-2-5 保存安定性に及ぼすシクロデキストリンの効果	109
3-3-2-6 他の酵素との複合体におけるシクロデキストリンの効果	112
3-3-2-7 共凍結乾燥剤の量を変化させた場合の効果	114
3-3-2-8 複合体の外観写真	131
3-4 まとめ	135
第4章 総括	136

謝辞

参考文献

研究発表