Osaka University Knowledge Archive

Title	Isotope Labeling of the C-2 Atoms of Indoles. Application to Tryptophan-62 in Hen Egg-white Lysozyme
Author(s)	Nakazawa, Takashi
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/24344
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【11】

氏名・(本籍)	中澤　隆（なかざわ　たかし）
学位の種類	理学博士
学位記番号	第　5591　号
学位授与の日付	昭和57年3月25日
学位授与の要件	理学研究科　有機化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**インドールC-2原子の化学的同位体標識法及びそのニワトリ卵白リゾチーム62位トリプトファン残基への応用**
論文審査委員	(主査) 教授 泉　美治 教授 京極　好正　教授 浜口　浩三　助教授 崎山　文夫

論文内容の要旨

本研究において新たなインドール核C-2位原子の化学的同位体標識法が確立された。この方法は次の3段階の反応から構成されている。第一段階は3位置換インドール類のN-ホルミルアンスラニロイル化合物へのオゾン酸化による変換，第二段階は後者のシアン化物イオンによる2-アミノ-3-ヒドロキシー3*H*-インドール誘導体への変換，さらに第三段階は，この3*H*-インドール誘導体の水素化ホウ素ナトリウムによる還元反応で，これにより生じた3-ヒドロキシインドリンは酸性条件で脱水され，元の3位置換インドールを再生する。この反応系において，炭素同位体で標識されたシアン化物，あるいは水素同位体で標識された水素化ホウ素化物を用いるとインドール核C-2位の炭素原子あるいは水素原子がそれぞれ標識される。

本研究では，これらの反応を低分子インドール化合物はもとより生体を構成する複雑かつ不安定な化合物，なかんづく蛋白質中のトリプトファン残基に適用し，その作用の分子論的機作を^{13}Cの導入と，核磁気共鳴法による観測を組み合わせた研究により解明することを試み，まず反応条件の改善を行った。

第一に3*H*-インドール誘導体生成を中性付近かつ低温の水溶液中で達成するために反応条件を検討し，その結果，一級アミル類の添加が有効であることが見出された。この反応はさらに一般化され，出発原料のホルミル基（アシル基）が反応の結果アミン類に転移することから，この反応を利用したアシル化反応が発見された。

第二に3*H*-インドール誘導体を数mMの低濃度水溶液中，室温，中性付近での100mM以下の水素化物による還元を試みた。その結果，この条件下では反応はほとんど進行しないにもかかわらず，3M

Li Cl（あるいはNaCl，塩酸グアニジン）及び0.2%エチレンジアミン四酢酸存在下初期条件弱酸性で反応を行うと低分子では70～80%の収率で目的物が得られた。

以上の反応条件を用いて卵白リゾチームの62位トリプトファン残基の^{13}C標識を試みた。卵白リゾチームは129個のアミノ酸残基から成り，6個のトリプトファン残基が含まれているが，既に62位のトリプトファン残基が選択的にオゾン酸化されホルミルキヌレニンに変換されることが示されている。この酸化リゾチームに上記の反応を適用し，最終生成物をイオン交換クロマトグラフィーにより精製したところ，天然物と同一溶出位置に同一の溶菌活性を有し，物理化学的諸性質も天然物と一致する標識リゾチームが得られた。

標識蛋白は^{13}C-NMRにより125ppmにトリプトファンのインドール核C-2炭素特有の共鳴シグナルを示した。このシグナルのpH依存性をリゾチームの阻害剤，N-アセチル-D-グルコサミントリマーの共存，非共存下に滴定したところ，共存下でリゾチームの触媒基，アスパラギン酸-52及びグルタミン酸-35の影響が，非共存下で前者のみの影響がそれぞれ観測された。さらに蛋白中に導入された^{13}Cをプローブとしてスピン－格子緩和時間の測定，標識反応中間生成物として得られる不活性な2-アミノ-3-ヒドロキシトリプトファン-62-リゾチームについての同様な実験から，この酵素の構造と活性の相関，トリプトファン-62の役割とその環境についての考察を行った。

論文の審査結果の要旨

トリプトファンは，蛋白質構成アミノ酸として存在率は低いが，その機能に密接に関連している場合が多く知られている。

中沢君は，このアミノ酸が蛋白質機能の発現において果す役割を解明するため，新しい研究方法の開発を行ない，それを用いてニワトリ卵白リゾチームの62位トリプトファン残基の役割および活性部位の機能について研究した。

新しく開発された研究方法は，化学修飾法と核磁気共鳴法のそれぞれの長所をたくみに組み合わせたものである。化学修飾法としては，最近自ら開発したインドール核の開環・閉環反応を利用したC-2位炭素の同位体標識法が用いられた。この方法では，最終生成物と出発物質は，同一の物質であり，化学修飾一般にありがちな局所構造の乱れは存在しない。したがって蛋白質に導入された同位体をプローブとする情報はきわめて正確である。

この同位体標識法を蛋白質に適用するためには，使用する一連の反応が温和な条件で効率よく，かつ選択的に起らなければならない。そのため中沢君は，これらの反応の機構の解明を行ない，それに立脚して反応条件を合理的に確立した。さらに，その条件下で，62位トリプトファン残基のC-2位炭素だけが^{13}Cにより標識されたリゾチームを調製し，^{13}C核磁気共鳴によりこの残基の局所環境や挙動を検討した。その結果この酵素の活性部位では，触媒部位と基質結合部位（62位トリプトファン残基）との協同作用が触媒機能の発現に重要であることを明確にした。これは単にリゾチームだけでな

く，酵素の機能発現機構を理解する上できわめて重要な知見である。

以上，研究目的に合致した方法論の樹立とそれを用いて得た酵素の触媒機能についての知見を記述する本論文は，理学博士の学位論文として十分価値あると認める。