The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	リゾチームの構造と安定性に関する研究
Author(s)	油谷, 朝子
Citation	大阪大学, 1965, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28698
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【19】

氏　名・(本籍)	油　谷　朝　子（ゆ たに あさ こ）
学位の種類	理　学　博　士
学位記番号	第　6 6 5　号
学位授与の日付	昭和40年3月26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	**リゾチームの構造と安定性に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 伊勢村寿三　(副査) 教授 奥貫　一男　教授 松島　祥夫

論　文　内　容　の　要　旨

蛋白質の諸性質が，そのおかれている環境によって変化することから変性剤中の挙動より構造と安定性についての知見を得ようとする試みは広く行なわれている。リゾチームの水溶液中の構造と安定化の機構を，変性から明らかにしようとした。

リゾチーム分子にふくまれているトリプトファン（6ケ），チロシン（3ケ）の変性剤による存在状態の変化を紫外部吸収スペクトルの変化で調べ，旋光分散の測定から得られる2次構造に関する知見を合わせて構造変化を研究した。

5M以上の塩酸グアニジンの存在により，リゾチームは完全に unfold した形となるが，7.2M 尿素では，紫外部吸収スペクトルに変化が起こるがヘリックス量は native なリゾチームと同じである。これらのことは，native なリゾチームはヘリックス構造の外に他の構造を持っていることを示唆する。ヘリックス構造以外に存在している内部構造の性質と安定性をアルコール類水溶液中の挙動から検討した。

水溶液中のリゾチームに対して，種々の濃度のメタノール溶液中のリゾチームとの間に生ずる差スペクトルは60%までのメタノールの存在によって，292mμ における吸・光度($\triangle\varepsilon_{292}$)が直線的に増加する。これは，native なリゾチームにおいて表面にあって溶媒と接しているトリプトファン残基に対する溶媒効果のみをあらわしている。70%以上のメタノールの存在は，差スペクトルの形を変え，$\triangle\varepsilon_{292}$ は減少する。これは，分子の内部にうめこまれていて高い屈折率を持つ環境にあったトリプトファンが露出されて，溶媒と接するようになったために生ずるスペクトルの "blue shift" によるものと考えられる。一方，旋光分散の測定により得られるパラメーターb_0の値は，メタノール濃度の増加によってほとんど変化しない。同様の挙動はエタノール中でも見出された。又，50%-iso- プロパノール，30%-n-プロパノール，65%-エチレングリュールモノメチルエーテル，16%以上の2-クロロ

エタノールも $\triangle\varepsilon_{292}$ を減少させるけれども，いずれの場合もヘリックス量の減少は見出されない。しかし，グリセロールは，$\triangle\varepsilon_{292}$ の減少を起こさせない。エチレングリコールも又，$\triangle\varepsilon_{292}$ にもヘリックス量にも影響を与えないことが報告されている。

$\triangle\varepsilon_{292}$ の減少に及ぼすアルコール類の効果はアルキル鎖の長さと共に炭化水素含量の高い程，強力となるが，OH 基の導入は，その効果を著しく弱めることが示された。$\triangle\varepsilon_{292}$ の減少の起こる前に旋光度，粘度等は変化せず，$\triangle\varepsilon_{292}$ の減少後に変化する。

$\triangle\varepsilon_{292}$ の減少は，1部のトリプトファン残基のマスクされている内部構造の破壊を示している。このような内部構造の破壊された分子は，flexibility を増大する。これは 2-クロロエタノール中において $\triangle\varepsilon_{292}$ の減少が起こるとヘリックスが増加するより前に粘度の増加が起こることより示される。又，メタノール，エタノール，プロパノール中では会合を起こす。内部構造の破壊された分子は環境に応じて大きな conformation の変化を起こす。

iso-プロパノール，70%以上，n-プロパノール，40%以上，2-クロロエタノール32%以上，α-モノクロロヒドリン60%以上等ですべてヘリックス構造を増加していることが示された。2-クロロエタノールは特に蛋白質に対してヘリックスを形成させるので有名であるが，リゾチーム分子において，メタノール，エタノール，プロパノール等の酸性溶液中の挙動は全く2-クロロエタノールと同様でありヘリックスを形成させた。

エチレングリコールモノメチルエーテルも又，内部構造を破壊されたリゾチーム分子ではヘリックスを形成させた。

以上の結果よりリゾチーム分子にはヘリックス構造と共に内部構造が存在し，その安定化には hydrophobic bonds が重要な役割を果していることが明らかにされた。

論文の審査結果の要旨

油谷君はさきに浜口氏らと共同してリゾチームの構造にはラセン構造のほかにおそらくはクロス β 構造と思われる internal fold の存在していることを指摘しているが，この論文は，その構造を安定化している力の本性を知らんとして行なった研究に関するもので主論文は2篇よりなっている。

まず第1篇においてはメタノール，プロパノール，イソプロパノールなどの一価アルコール，エチレングリコールおよびグリセロールなどの2価および3価のアルコール類をこの蛋白質に変性剤として加えたときの conformation の変化を残基旋光度，Moffitt のパラメーターa_0，b_0，還元粘度，紫外差スペクトルの測定などによって追求した。紫外差スペクトルではL-ロイシル-L-トリプトファンの同じ溶媒条件における差スペクトルとの比較をも行なった。

その結果リゾチーム分子の internal fold は変性剤として用いるアルコールの炭素鎖長に関係して破壊され，また炭化水素基の含量に比例して破壊される。他方エチレングリコールおよびグリセロールなどはリゾチームの internal fold およびラセン含量に対してほとんど有意の影響をおよぼさない

ことがわかった。これらの結果はアルキル鎖によって internal fold がこわされるが，溶媒の水酸基はその構造変化には関与しないことを示している。これらの事実から主として internal fold が疎水結合によって保たれていることがわかる。またエタノールやメタノールの添加は分子のラセン含量に変化は与えぬが，n-およびイソープロパノールの添加によってラセン含量が増加するが，エタノールおよびメタノールを添加したときでも塩酸酸性ではラセン含量が増加し，旋光性のほか紫外差スペクトルの挙動も2-クロロエタノール中における変化と類似することを見出している。

次に第２篇においてはエチレングリコールモノメチルエーテルと塩酸グアニジンとの溶液にリゾチームを溶かした場合，これにさらに2-クロロエタノールを添加した系について，旋光性および紫外差スペクトルの測定より混合変性剤中での conformation 変化をしらべた塩酸グアニジンは水素結合を切断し蛋白質のラセン構造を破壊することはよく知られているが，エチレングリコールモノメチルエーテルや２クロロエタノールのような水素結合の生成を促し internal fold をこわすものと混合した溶液では塩酸グアニジンも internal fold の破壊を促進することがみとめられた。しかしながら塩酸グアニジンの添加でこわされた internal fold はさらにエチレングリコールモノメチルエーテルを添加するとラセン構造に移行することが示された。このことからリゾチームには疎水結合で主として安定化されている internal fold の存在することが明らかとなった。

以上油谷君の研究はリゾチームが球状蛋白質としての形状保持に主として疎水結合によって保たれている内部構造のあることを明らかにすることができた。リゾチームの構造と題する参考論文３篇も各種変性剤による構造変化を論じたものでいずれも蛋白質化学に重要な知見を与えている。従って油谷君の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。