

Title	ニワトリ卵白リゾチームの基質特異性
Author(s)	原, 三郎
Citation	大阪大学, 1970, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30035
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	はら 原	さぶ 三	ろう 郎
学位の種類	理	学	博 士
学位記番号	第	1 9 1 2	号
学位授与の日付	昭 和 45 年 3 月 20 日		
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当		
学位論文題目	ニワトリ卵白リゾチームの基質特異性		
論文審査委員	(主査) 教授	松島 祥夫	
	(副査) 教授	奥貫 一男 教授 成田 耕造 助教授 池中 徳治	

論 文 内 容 の 要 旨

ニワトリ卵白リゾチームの基質特異性を明らかにするため、基質の水酸基およびN-アシル基に注目して、それらと酵素分子の活性部位との関連について研究した。

グリコール・キチンに由来するN-アセチルアミノ糖やN-アセチルアミノ糖アルコールは、ガス・クロマトグラフを用いて分析した。標準物質として、N-アセチル-3-O-(2'-ヒドロキシエチル)-D-グルコサミン、N-アセチル-6-O-(2'-ヒドロキシエチル)-D-グルコサミンおよびそれらの糖アルコールを合成した。グリコール・キチンの酸加水分解物をガス・クロマトグラフで分析し、N-アセチル-D-グルコサミン、N-アセチル-3-O-(2'-ヒドロキシエチル)-D-グルコサミンおよびN-アセチル-6-O-(2'-ヒドロキシエチル)-D-グルコサミンを同定した。

リゾチームによるグリコール・キチンの切断点を明らかにするため、グリコール・キチンのリゾチーム消化物の還元末端に存在する糖残基のみを NaBH_4 で還元して糖アルコールにし、生成する糖アルコールの分析を行なった。その結果、N-アセチル-D-グルコサミンとN-アセチル-3-O-(2'-ヒドロキシエチル)-D-グルコサミンが還元末端基として同定された。

つぎに、消化物に含まれる単糖の分析を行ない、N-アセチル-D-グルコサミンのみを見出した。リゾチームの加水分解作用によって、置換を受けたグルコサミンは単糖として遊離されなかった。

さらに、消化物に含まれるオリゴ糖を、Sephadex G-15 と Bio-Gel P-2 によるゲルろ過およびペーパー・クロマトグラフによって分離精製した。構造解析の結果、(1)N-アセチル-D-グルコサミン、(2)N, N'-ジアセチル-キトビオーズ、(3)N, N'-ジアセチル-3-O-(2'-ヒドロキシエチル)-キトビオーズ、(4)N, N'-ジアセチル-6'-O-(2'-ヒドロキシエチル)-キトビオーズ、

ル) —キトビオーズ, および, (5) N, N' —ジアセチル—3,6' —ジ—O— (2' —ヒドロキシエチル) —キトビオーズの 5 種類の糖を同定した。

アミノ糖の N—アシル基と酵素活性との関連を明らかにするため, *Micrococcus lysodeikticus* の細胞壁のヒドラジン処理によってアミノ酸と大部分の N—アセチル基を除去して水溶性の物質を得た。この物質は, リゾチームによってほとんど分解を受けなかったが, アミノ基を再アセチル化することによって非常によく分解を受けようになり, N—アセチル基が酵素活性に必要であることを示した。一方, アミノ基をプロピオニル化したものでは, 全く分解を受けなかった。

グリコール・キチンについても同様の結果であった。すなわち, グリコール・キチンのヒドラジン処理によって N—アセチル基の量が減少すると, リゾチームの作用を受けにくくなり, 再アセチル化により再びリゾチームによる分解をうけやすくなった。N—プロピオニル化ではこのようなことは起らず, リゾチームの活性に影響を与えなかった。

以上の結果を総括すると, 3 位の水酸基が置換されたグルコサミン残基は Phillips のモデルにおける sub-site D と F に結合できるが, sub-site C と E には結合できない。また, これとは逆に 6 位の水酸基が置換されたものでは sub-site C と E には結合できるが, sub-site D と F には結合できない。一方, 基質に含まれている N—アシル基の大きさは, リゾチームの特異性を決定する上で非常に重要な役割を演じていると考えられる。

論文の審査結果の要旨

一種の溶菌酵素であるニワトリ卵白リゾチームは, タンパク質としての一次構造が決定され, さらに X—線結晶解析によって高次構造までが明らかにされている。またこの酵素と N, N, N-Acetyl-chitotriose 結合体の X—線解析により, ES 複合体のコンホメーション, さらには基質の加水分解の機作に関する仮説が呈出されている。原君の研究は上述の X—線結晶学的研究より呈出された仮説に対する化学的検証を行なったもので, その研究の骨子は次の如きものである。

リゾチームの基質であるキチンを, エチレンオキシドを用いてグリコール化するとき, 長鎖状であるキチン分子の処々に, かなりかさ高い $—CH_2—CH_2OH$ 側鎖を導入することができる。このような半合成的基質が, 酵素反応の必須条件である ES 複合体生成にどのような影響をあたえるかを, 酵素反応生成物の構造解析により知ることができる。古典的表現を用いるならば, 錠前(酵素)の鍵穴の大きさ・形を種々の大きさ・形をもった鍵(合成基質)を使って調べようとした。実験においては, 酵素反応生成物の複雑な混合物を分析するために, 斬新な工夫が行なわれ, 以下の反応生成物を確認した。

1. N-Acetyl-glucosamine
2. N, N-Acetyl-chitobiose
3. 3-Hydroxyethyl-N, N-acetyl-chitobiose
4. 6'-Hydroxyethyl-N, N-acetyl-chitobiose

5. 3, 6'-Dihydroxyethyl-N, N-acetyl-chitobiose

これらの酵素反応生成物は、X線研究よりの仮説の正当性を支持するものである。以上の如く、原君の業績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。