



Title	リゾチームとN-アセチルグルコサミンオリゴ糖との相互作用
Author(s)	中江, 良子
Citation	大阪大学, 1976, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31549
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

氏 名・(本籍)	中 江 良 子
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	第 3 5 6 0 号
学位授与の日付	昭 和 51 年 3 月 25 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	リゾチームと N-アセチルグルコ サミンオリゴ糖との相互作用
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 浜口 浩三 (副査) 教 授 松原 央 教 授 京極 好正

論 文 内 容 の 要 旨

ニワトリ卵白リゾチームの基質結合部位にある Trp62, Asp101 の状態, 基質との結合による触媒基のイオン化状態の変化を円二色性 (CD) を用いて調べた。Trp62 の状態はこの残基のみを選択的に 2-ニトロフェニルスルフェニル化したリゾチーム (NPS-リゾチーム) を用いた。触媒基のひとつ Glu 35 については, ヨード酸化により Glu 35 と Trp 108 の間にエステル結合を形成させたリゾチーム (108 エステルリゾチーム) を用いた。これまでリゾチームと糖との相互作用に触媒基の Asp52 の関与は知られていなかったが, NPS-リゾチームと糖との結合の pH 依存性に Asp52 が関与することが示されたので, ニワトリ・リゾチームと N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 単量体との相互作用を詳しく調べた。ニワトリ・リゾチームの Asp101 の関与は, この残基が Gly に置換している シチメンチョウ・リゾチームを用いて比較した。

糖の結合定数は CD および蛍光測定により求めた。

ニワトリ・リゾチーム-糖複合体の X 線解析より, (GlcNAc)₃, (GlcNAc)₂, および GlcNAc は, それぞれ, サブサイト A B C, B C, C に結合することが示されている。108 エステルリゾチームに対する (GlcNAc)₂ と GlcNAc の β -メチル配糖体 (β -Me-GlcNAc) の結合定数は, pH 5.2 以下では, 未修飾リゾチームの場合と全く一致した。そして, この pH 以上では, 108 エステルリゾチームの結合定数は一定になるが, 未修飾リゾチームの場合は pK 6.0 の解離基の解離に伴って減少した。このことから, 糖の結合に関与する pK 6.0 の解離基は Glu35 であることが明らかになった。また, エステル化で BC サイトのコンホメーションは変化しないことがわかった。(GlcNAc)₂ がニワトリ・リゾチームに結合すると Glu35 の pK は 6.0 から 6.5 に, Asp101 の pK は 4.4 から 4.0 に変化した。倉光らは, (GlcNAc)₃ の結合定数の pH 依存性をニワトリ・リゾチームとシチメンチョウ・リゾチームで比較して, 前

者では、Glu35と Asp101が関与することを報告した。この場合、Asp101の pK 移動 (-1.0) は (GlcNAc)₂の場合よりも大きく、(GlcNAc)₃は A と B サイトで Asp101と水素結合するという X 線解析の結果ともよく合っている。

NPS-リゾチームは、活性の pH 依存性や金属イオンとの相互作用を調べるとニワトリ・リゾチームのものとコンホメーションをかなり保持していることがわかった。NPS 発色団にもとづく 375nm の CD 帯の pH 変化から、Trp62とその近傍の状態は近くに存在する Asp 101のみならず、遠く離れた Glu35のイオン化と連動して変化することが示された。NPS-リゾチームに対する β -Me-GlcNAc の結合定数の pH 依存性には、唯一の転移しかみられず、この糖の結合によって Asp52の pK が 3.3 から 3.8 に移動した。また、(GlcNAc)₃あるいは (GlcNAc)₂の NPS-リゾチームへの結合には Asp 101, Glu35以外に Asp52が関与し、それらの結合様式は未修飾リゾチームの場合と少し異なっている。

β -Me-GlcNAc がシチメンチョウ・リゾチームに結合すると、Asp52と Glu35の pK がそれぞれ、3.5から 3.9、6.0から 6.5に移動しニワトリ・リゾチームの場合には、さらに Asp101の pK が 4.0に変化した。X線解析により GlcNAc 単量体は Asp101と直接、相互作用しないことが示されているにもかかわらず Asp101の解離によって β -Me-GlcNAc の結合定数が変化することは糖の結合に重要な Trp 62とその近傍の状態が Asp101の解離の影響をうけるためであろう。

ニワトリ・リゾチームとシチメンチョウ・リゾチームに対する α -Me-GlcNAc の結合定数の pH 依存性はよく似ていて Glu35の pK が 6.0から 6.5、および、Asp101と同じ pK 値をもつ解離基の pK が 4.4から約 3.7に移動した。この解離基は Asp52の近くに存在する Asp48であると考えられる。

108エステルリゾチームに対する (GlcNAc)₃の結合定数は、(GlcNAc)₂や β -Me-GlcNAc の結合の場合と異なり、すべての pH で未修飾リゾチームの場合より大きかった。これは糖が BCD サイトにも結合できるように D サイトが変化したためと考えられる。各サブサイトが独立であると仮定すると、108エステルリゾチームの D サイトへの糖の結合の標準自由エネルギー変化 ($\Delta G_{u,D}$) は -1.8kcal/mole (pH5) と求められる。 $\Delta G_{u,D}$ の pH 依存性から D サイトに糖が結合すると Asp52の pK が変化することも示唆された。

論文の審査結果の要旨

ニワトリ卵白リゾチームの活性部位 (サブサイト A ~ F より成る) には、触媒基 Glu35, Asp52の他に、基質との結合に関与する Asp101, Trp62, Trp63, Trp108 がある。中江君の論文は基質アナログである N-アセチルグルコサミンオリゴ糖との相互作用を種々の pH において詳細に調べ、基質アナログとの結合による Glu35, Asp52, Asp101, Trp62の状態変化を明らかにした。論文は次の 3 つから成る。

(1) Trp62を 2-ニトロフェニルスルフェニル化したリゾチームの色素に基づく円二色性の pH 変化から、Trp62の状態が Glu35のイオン化によって変化することを明らかにした。この修飾リゾチームと糖との相互作用に Asp52の関与することを見出した。

(2) 糖との結合に関与するニワトリ・リゾチームの Asp101が Gly に置換しているシチメンチョウ・リ

ゾチームと糖との相互作用を調べ、ニワトリ・リゾチームと糖との相互作用による Asp101 のイオン化状態の変化を明らかにした。また、N-アセチルグルコサミンの α -メチルおよび β -メチル配糖体の相互作用を調べ Asp52 の関与を明らかにした。

(3) ヨード酸化により Glu35 と Trp108 の間にエステル結合をつくらせたリゾチームと糖との相互作用を調べ、Glu35 の関与を明らかにした。また、この修飾によってサブサイト B, C の状態は変化しないが、サブサイト D の状態が変化し、サブサイト D と糖との相互作用を推定することができた。

以上のように、中江君の研究はリゾチームの活性部位に存在するいくつかの残基の状態を明らかにし、リゾチームの触媒機構解明のためのもっとも基本的で重要な貢献であると考えられる。従って、こ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。