The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	リゾチームの酵素作用の分子的基礎 : 活性部位にある解離基（触媒基（Asp52, Glu35）, Asp101）のイオン化の挙動, トリプトファン残基（Trp62, Trp63, Trp108）の状態, および, これらの残基の基質結合における関与
Author(s)	倉光, 成紀
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31594
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

【5】

氏名・(本籍)	倉光成紀（くらみつせいき）
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 3856 号
学位授与の日付	昭和52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	**リゾチームの酵素作用の分子的基礎——活性部位にある解離基(触媒基(Asp 52, Glu 35), Asp 101)のイオン化の挙動,トリプトファン残基(Trp 62, Trp 63, Trp 108)の状態，および，これらの残基の基質結合における関与——**
論文審査委員	(主査) 教授 浜口 浩三 (副査) 教授 成田 耕造 教授 京極 好正

論文内容の要旨

1．リゾチームの触媒基のイオン化の挙動

ニワトリ・リゾチームの触媒基がAsp52とGlu35の2つのカルボキシル基であることはよく知られている。これら触媒基のpK値を決定することは，触媒作用の解明に極めて重要なことである。本研究では，ニワトリ・リゾチームおよび触媒基のいずれか一方をエステル化したニワトリ・リゾチーム，および，ニワトリ・リゾチームのアミノ酸残基が一部置換したシチメンチョウ，ヒト・リゾチームの305nm近傍の吸収帯のpH変化を差吸収，円二色性(CD)，および蛍光スペクトルを用いて詳細に調べ，触媒基のpK値を決定した。触媒基のごく近傍にあるTrp108は305nm付近に吸収帯をもち，触媒基のイオン化状態を反映することが明らかになったので，このことを利用して，リゾチームの触媒基のイオン化の挙動を詳細に調べた。イオン強度(I) 0.1, 25℃におけるニワトリおよびシチメンチョウ・リゾチームのAsp52, Glu35のマクロ定数(pK52, pK35)は3.4と6.1，ヒト・リゾチームの場合は3.4と6.8と決定された。

未修飾およびAsp52をエステル化したニワトリ・リゾチームの差スペクトルのもっとも長波長にある301.5nmのピーク($\Delta\varepsilon_{301.5}$)のpH変化を，種々のイオン強度で調べた。Asp52をエステル化したニワトリ・リゾチームのGlu35のpKを使って，未修飾ニワトリ・リゾチームの触媒基のミクロ解離定数を求めた。触媒基の片方が最初に解離する時のpK値のイオン強度依存性は，リゾチーム分子の正味の電荷($\bar{Z}$)による静電効果だけで説明できたが，もう一方がさらに解離する時のpK値のイオン強度依存性は，片方の触媒基が解離して負電荷を持っているためにみかけの$\bar{Z}$が小さくなったとして説明できた。

未修飾およびAsp52をエステル化したニワトリ・リゾチームの$\Delta\varepsilon_{301.5}$のpH変化を種々の温度で調べ

て，I＝0.1, 25℃における触媒基のイオン化の熱力学的パラメーターを求めた。いずれのイオン化の場合も$\Delta H^{\circ} \simeq 0$ kcal/maleであった。

2．リゾチームと基質類似物質との相互作用

ニワトリ・リゾチームの基質結合部位はA～Fの6つのサブサイトから成り，N－アセチルグルコサミン(GlcNAc)の3量体はサブサイトABCに結合することが知られている。リゾチームと$(GlcNAc)_3$との複合体の触媒基のpKを305nmのCD帯を利用して調べた。その結果，ニワトリおよびシチメンチョウ・リゾチームのpK_{52}, pK_{35}は3.4と6.5，ヒト・リゾチームの場合は3.4と6.7であった。

X線解析によって，ニワトリ・リゾチームの基質結合部位にあってサブサイトA，Bの糖残基と水素結合するといわれているAsp101がシチメンチョウ・リゾチームではGlyに置換している。このシチチメンチョウ・リゾチームと$(GlcNAc)_3$との結合定数(K_{ES})のpH変化は，pH 2～8の領域では触媒基の関与だけで説明できた。ニワトリ・リゾチームの場合には，触媒基の関与の他に，Asp101のpKが$(GlcNAc)_3$の結合によって4.5から3.4 へシフトするとして説明できた。ヒト・リゾチームの場合は触媒基の関与だけで説明できた。

Asp52をエステル化したニワトリ・リゾチームのGlu35のpKを使って，未修飾ニワトリ・リゾチームの触媒基に関する4つのミクロイオン化状態への$(GlcNAc)_3$のK_{ES}を求めた。その結果，触媒基がともに解離した分子種へのK_{ES}がもっとも小さく，他の3つの分子種へのK_{ES}はほとんど同じであることがわかった。

GlcNAcの3－デオキシ誘導体，6－デオキシ誘導体を合成し，ニワトリ・リゾチームとの相互作用を295および305nmのCD帯を利用して調べた。その結果，GlcNAcがサブサイトCに結合する際に，X線解析で言われてきた糖のO(6)とTrp62のインドール環のNHとの水素結合は結合の親和力にはほとんど寄与せず，糖のO(3)とTrp63のインドール環のNHとの水素結合が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

3．リゾチームのチロシン残基のイオン化の挙動

ニワトリ・リゾチームの基質結合部位にあるTrp62がヒト・リゾチームではTyrに置換している。このTyr62のpKをヒト・リゾチームと$(GlcNAc)_3$とのK_{ES}のpH変化から決定した。Tyr62のpKは$(GlcNAc)_3$の結合によって10.5から10.0へシフトすることが明らかになった。ヒト・リゾチームのアルカリ側で見られる314nmのCD帯のpH変化から，もう一つのTyrのpKが9.2と決定された。ニワトリ・リゾチームの場合にも，305nm近傍のCD帯のpH変化から一つのTyrのpKが10.0と決定された。ニワトリおよびヒト・リゾチームの残るTyrのpKを従来行われてきたように245および295nmの波長を用いた分光光度滴定で決定しようとしたが，Trpの寄与およびpH11以上でのジスルフィド結合の切断のために，正確に決定することは困難であることが明らかになった。

論文の審査結果の要旨

倉光君は加水分解酵素リゾチームの活性部位に存在する触媒基(Glu35とAsp52),基質との結合に関与するAsp101のイオン化の挙動，基質との結合に関与するTrp62, Trp63の役割を極めて詳細に解明した。論文は主として次の4つより成る。

(1) 触媒基のひとつGlu35のすぐ近くにあるTrp108の吸収帯が305nm近傍にあることを見出し，このことを利用して紫外吸収，蛍光，円二色性の測定より，ニワトリ，七面鳥，ヒト・リゾチームのGlu35, Asp52の解離定数，イオン化の熱力学的パラメーターを決定した。また，N-アセチルグルコサミンの三量体($(GlcNAc)_3$)との複合体における触媒基の解離定数も決定した。

(2) ニワトリ・リゾチームと$(GlcNAc)_3$との結合に関与するAsp101が七面鳥リゾチームではGlyに置置換していることを利用して，両リゾチームに対する$(GlcNAc)_3$の結合定数のpH変化を解析し，Asp101の解離定数を決定した。

(3) リゾチームのTrp62およびTrp63と水素結合をつくるといわれているGlcNAcのデオキシ誘導体を合成してその相互作用を調べ，Trp63が結合に重要な役割を果していることを明らかにした。

(4) ヒト・リゾチームではTrp62がTyrに置換しているが，円二色性測定よりこのTyrのpK値を決定した。分光光度滴定によるニワトリ・リゾチームのTyrのpK値の決定は，Trpの寄与およびジスルフィド結合の切断のために困難であることを明らかにした。

以上のように，倉光君の論文は，リゾチームの活性部位に存在する主な残基のイオン化の挙動と役割を極めて詳細に調べたもので，リゾチームの触媒作用の解明に重要な知見を与えたものであり，理学博士の学位論文として十分価値あると認める。