The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	リパーゼのX線結晶構造解析（2.8Å分解能）
Author(s)	畑，安雄
Citation	大阪大学，1979，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32165
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

【18】

氏名・(本籍)	畑(はた)　安(やす)雄(お)
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 4540 号
学位授与の日付	昭和54年3月24日
学位授与の要件	理学研究科 高分子学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**リパーゼのX線結晶構造解析 (2.8Å分解能)**
論文審査委員	(主査)教授 角戸 正夫 教授 田所 宏行　助教授 田中 信夫

論文内容の要旨

リパーゼは生物界に広く分布する脂肪加水分解酵素である。微生物が産生するリパーゼは工業的及び医学的利用の面で特に注目を集めている。リパーゼの酵素反応における特徴は，ミセル状基質に対して高い活性を示す点にある。このリパーゼの作用機構を構造面から解釈する為にX線結晶構造解析を行なった。解析には不完全菌のGeotrichum candidum(ATCC34614）から抽出したリパーゼを用いた。このリパーゼは分子量55000で429個のアミノ酸残基と約7％の糖及び微量の脂質からなる酵素で，トリオレインに対し強い親和性を示す。アミノ酸配列は未だ決定されていない。システイン残基を含まずS-S結合を持っていない。

結晶は濃縮法により容易に得られたが，化学的衝撃に弱く塩溶液中では溶けてしまった。そこで0.37％グルタルアルデヒド溶液(0.1M酢酸緩衝液，pH5.6)中に結晶を5時間浸けて結晶状態で蛋白質に分子間架橋を施し解析に用いた。結晶は，空間群$P2_1$，格子定数a＝59.5Å，b＝84.4Å，C＝55.9Å，β＝100.1°で非対称単位中に蛋白質1分子を含んでいる。

構造解析は重原子同型置換法で行なった。同型置換体としては重原子試薬$UO_2(AcO)_2$及びK_2PtCl_4を用いsoaking法によりウラン及び白金誘導体が得られた。soaking条件は各々2.09mM濃度で6日間及び0.18mM濃度で5日間であった。2.8Å分解能までの13400個の反射強度は4個の蛋白結晶及び各々6個の誘導体結晶から得られた。解析は，まず低分解能で行なった。差パターソン関数・差フーリエ合成よりウラン2個及び白金4個の重原子位置が得られ，続いて蛋白質の電子密度図から分子境界及びα-ヘリックス領域が数ケ所見い出された。更に，低分解能での解析結果に基づき，有意な11000個の反射を用いて計算した2.8Å分解能の電子密度図の解釈から蛋白質主鎖の流れを見い出し，リチャーズ・

ボックスを用いて1Å＝1cmの大きさで針金モデルを作製することができた。そしてこのモデルから次のようなことがわかった。

リパーゼ分子は70Å×50Å×50Åの回転楕円体で，1本の6回転α-ヘリックス，3本の3回転α-ヘリックス及び5本の2回転α-ヘリックスが分子表面に位置し，β構造も2ケ所見い出された。また白金による酵素の失活を利用して白金の位置から酵素の活性部位を推定したが，その位置は6回転のα-ヘリックスを含む3本のα-ヘリックスによってできた亀裂中に位置し，β構造に沿った亀裂もあって基質が近づきやすい状態になっていることもわかった。更に，電子密度図から活性部位にヒスチジンとチロシンが向いあって存在し，近くに糖と思われる電子密度分布もあることがわかった。

論文の審査結果の要旨

畑　安雄君の論文は，従来その構造はもちろん生化学的研究すら非常に少なかった脂肪分解酵素リパーゼについて，結晶化およびX線構造解析を実行し，分子構造の大要を明らかにすると共にその活性部の位置と作用機構を推定するまでの一連の研究をとりまとめたものである。

リパーゼは，Geotrichum Candidum(ATCC34614)から抽出したもので，分子量は約55,000,429のアミノ酸残基と約7％の糖および脂質を含むが，そのアミノ酸配列についての知識は全く明らかにされていない。しかしながら，このリパーゼはミセル状に分散した基質の界面で反応する特異な酵素であり，X線解析は極めて困難にもかかわらず解析に着手した。

まず濃縮法によってその結晶化に成功した。結晶は極めて不安定で，特に重原子置換反応において溶解することがわかった。同君はこのため分子を格子に固定する方法としてグルタルアルデハイドによる分子間架橋を試み，結晶を安定化することに成功，この架橋蛋白質によって構造解析を進めた。その結晶定数は，格子定数a＝5.95nm, b＝8.44nm, c＝5.59nm, β＝100.1°, 空間群P2, で，非対称単位は1分子であった。置換試薬は$UO_2(AcO)_2$とK_2PtCl_4につきそれぞれ良質同型体が得られた。

X線回折実験は自動回折計により，生蛋白質および置換体につき2.8Å分解能の範囲でそれぞれ13,400個の回折強度を精密に測定した。解析計算はまず重原子位置の決定に続き，5Åフーリエを計算してその分子境界を確認し，次に2.8Åの最終フーリエ図を算出した。この電子密度分布に基づき，リチャード・ボックスによって最適骨格構造モデルを作製することができた。

現段階の解析の結果，分子は大要70×50×50nmの楕円体で，Pt附着位置やHis残基位置などからその活性部の配置を推定し，その特徴ある基質特異性を合理的に説明している。

以上同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。