

Title	リパーゼのX線結晶構造解析 (2.8 Å 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、 〈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)	畑 安 雄
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 4 5 4 0 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 (2.8 Å 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、37% グルタルアルデヒド溶液 (0.1 M 酢酸緩衝液, pH 5.6) 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 $a=59.5\text{Å}$, $b=84.4\text{Å}$, $c=55.9\text{Å}$, $\beta=100.1^\circ$ 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 $\text{UO}_2(\text{AcO})_2$ 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 2.09 mM 濃度で 6 日間及び 0.18 mM 濃度で 5 日間であった。2.8 Å 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ヶ所見い出された。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 2.8 Å 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 $1 \text{ \AA} = 1 \text{ cm}$ 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 $70 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA}$ 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ヶ所見いだされた。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、分子構造の概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ヒ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 $a = 5.95 \text{ nm}$, $b = 8.44 \text{ nm}$, $c = 5.59 \text{ nm}$, $\beta = 100.1^\circ$; 空間群 $P2_1$ で、非対称単位は1分子であった。置換試薬は $\text{UO}_2(\text{AcO})_2$ 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 2.8 \AA 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、 5 \AA フーリエを計算してその分子境界を確認し、次に 2.8 \AA 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 $70 \times 50 \times 50 \text{ nm}$ 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。