The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	リゾチームの活性部位の構造と触媒作用 : 4-メチルウンベリフェリルキトオリゴ糖の加水分解反応
Author(s)	梁, 栄錫
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32624
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

【29】

氏名・(本籍)	梁(りょう)　栄(えい)　錫(さく)
学位の種類	理　学　博　士
学位記番号	第　4883　号
学位授与の日付	昭和55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	**リゾチームの活性部位の構造と触媒作用——4-メチルウンベリフェリルキトオリゴ糖の加水分解反応——**
論文審査委員	(主査) 教授 浜口　浩三 (副査) 教授 福井　俊郎　教授 成田　耕造

論文内容の要旨

リゾチームの加水分解反応を調べるために，基質となる4-メチルウンベリフェリルキトオリゴ糖（$(GlcNAc)_n$-MeU）を合成し，それを用いて，ニワトリ，シチメンチョウ，およびヒト・リゾチームの加水分解反応を調べた。

ニワトリおよびシチメンチョウ・リゾチームによる（$(GlcNAc)_3$-MeUの加水分解反応をpH2から8の範囲で調べた（イオン強度0.1，42℃）。リゾチームによって（$(GlcNAc)_3$-MeUのアリールグリコシド結合は加水分解され，遊離してくるMeUの蛍光を測定して反応速度を求めた。$(GlcNAc)_3$-MeUの加水分解反応のkcat, 1/Kmおよびkcat/KmのpH依存性を解析して，ニワトリおよびシチメンチョウ・リゾチームの触媒基であるAsp52およびGlu35のpK値，およびニワトリ・リゾチームのAsp101のpK値を決定した。ニワトリおよびシチメンチョウ・リゾチームのAsp52およびGlu35のpK値は，それぞれ3.60および6.20，そして非分解性複合体のAsp52およびGlu35のpK値は，それぞれ3.95および6.55と決められた。また，糖が結合していないニワトリ・リゾチーム，分解性複合体，および非分解性複合体のAsp101のpK値は，それぞれ4.20，3.95，および3.30と決められた。Asp52，Glu35およびAsp101のpK値は，我々の研究室において分光学的方法で決められたpK値とよく一致した。このことは，X線解析の結果から推定されていたリゾチームの触媒機構が妥当であるということを示している。

ニワトリ・リゾチームによる（$(GlcNAc)_4$-MeUの加水分解反応をpH2から8の範囲で調べ(イオン強度0.1，42℃），加水分解反応のkcat，1/Km，およびkcat/KmのpH依存性を解析した。その結果，Asp52，Glu35およびAsp101のpK値は，糖が結合していないリゾチームでは，それぞれ3.60，6.20

および4.20，分解性複合体では，それぞれ3.40，6.55および3.40，そして非分解性複合体では，それぞれ3.95，6.55および3.30と決められた。ニワトリ・リゾチームによる$(GlcNAc)_2$-MeU,$(GlcNAc)_3$-MeU，および$(GlcNAc)_4$-MeUの加水分解反応の比較から，基質結合部位であるAおよびBサイトにおける糖との相互作用は，単に基質を固定化するだけでなく，触媒基近傍のコンホメーション変化を誘導し，活性に影響することが示唆された。

ヒト・リゾチームによる$(GlcNAc)_3$-MeUおよび$(GlcNAc)_4$-MeUの加水分解反応をpH3から8の範囲で調べて（イオン強度0.1，42℃），加水分解反応のkcat，1/Km，およびkcat/KmのpH依存性を解析した。その結果，触媒基であるGlu35のpK値は，6.68と決められた。このpK値は，我々の研究室において分光学的方法で決められたpK値とよく一致した。このことは，ヒト・リゾチームでもニワトリ・リゾチームと同様の触媒機構で，糖が加水分解されることを示している。$(GlcNAc)_4$-MeUの加水分解反応において，ニワトリ・リゾチームはヒト・リゾチームの1.8倍の活性を示した。このことは，ヒト・リゾチームの立体構造はニワトリ・リゾチームのそれと非常によく似ているが，活性部位の構造がわずかに異なるというX線解析の結果とよく対応している。

論文の審査結果の要旨

リゾチームの触媒作用については，種々の基質を用いて多くの研究がなされてきたが，用いた基質が複雑であったり，加水分解反応と同時に糖転移反応がおこることなどのために，触媒機構についてはほとんどわかっていない。梁君は4-メチルウンベリフェリルキトオリゴ糖（$(GlcNAc)_n$-MeU, n=2,3,4）を合成し，リゾチームによる加水分解で生ずる4-メチルウンベリフェロンを測定する方法を用いて，加水分解反応の動力学的定数のpH依存性を解析した。リゾチームとしてニワトリ卵白，シチメンチョウ卵白，ヒト尿リゾチームを用いた。その結果，リゾチームの触媒作用は分光学的方法で求められた触媒基（Asp52とGlu35）と基質結合に関与するAsp101のpK値でよく説明しうることを示した。また，X線解析の結果をもとにして推定されていた，Asp52が解離し，Glu35が非解離のリゾチーム分子種のみが活性であるという機構も梁君の研究によって始めて証明された。また，$(GlcNAc)_n$-MeUの糖鎖の長さによる動力学的定数の変化，また，$(GlcNAc)_6$との比較から，糖とサブサイトとの相互作用が触媒活性に重要な影響を与えることを示した。

以上述べたように，梁君の研究はリゾチームの触媒作用と活性部位の構造との関連を明らかにする上で大きな貢献をしたものであり，理学博士の学位論文として十分価値あると認める。