

氏 名	内 海 滋 夫 うつ み しげ お
学位の種類	工 学 博 士
学位記番号	工 博 第 694 号
学位授与の日付	昭 和 56 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	工 学 研 究 科 工 業 化 学 専 攻
学位論文題目	THE SECONDARY STRUCTURE OF LYSOZYME IN ORGANIC SOLVENTS (有機溶媒中でのリゾチームの二次構造)

論文調査委員 (主 査) 教 授 倉 田 道 夫 教 授 福 井 三 郎 教 授 中 島 章 夫

論 文 内 容 の 要 旨

この論文は、酵素たんぱく質分子の高次構造形成過程を支配する変性中間体の構造を明らかにする目的で行なった、リゾチームの有機溶媒中における二次構造に関する実験的研究をまとめたもので、6章から成っている。

第1章は序論で、リゾチームの二次及び高次構造と、強い変性剤である塩酸グアニジン中の変性に関する従来の研究を概観すると共に、変性中間体の実体を解明するためには、弱い変性剤である有機溶媒中での変性に関する研究が必要であることを指摘し、本研究の位置づけを行っている。

第2章では、リゾチームと、還元によって S-S 結合を切断しカルボキシメチル化した RCM リゾチームの調整法、及び構造解析に用いた種々の物理化学的測定法について述べている。二次構造の解析には 200-250nm 領域の円偏光二色性、三次構造の解析には 280-300nm 領域の円偏光二色性と吸収の差スペクトル、分子量の決定には沈降係数と固有粘度の組合せ法を用いている。

第3章では、酢酸水溶液中におけるリゾチームの変性について述べている。水溶液から出発して溶媒中の酢酸濃度を上げてゆくと、常温では20—30%の濃度領域で三次構造が破壊され、酵素の活性が失われる。二次構造の一部も同時に壊れるが、一部は残存する。さらに酢酸濃度を上げると、残存二次構造が発達してゆくの観察される。この全過程を通じて分子量が一定に保たれることから、変性リゾチームに残存する二次構造は分子間の β 構造ではなく、分子内のヘリックス構造であると結論している。また、このヘリックス含量と酢酸濃度の関係を濃度ゼロまで外挿することにより、三次構造を持たない変性リゾチームの水溶液中におけるヘリックス含量を約12%と推定している。この推定は、S-S結合切断により三次構造形成能を失った RCM リゾチームの水溶液中のヘリックス含量と一致する。

第4章では、ヘリックス形成溶媒として知られている2-クロロエタノールの水溶液、及びコイル溶媒である塩酸グアニジンの水溶液中におけるリゾチームの変性について述べている。前者では三次構造が破壊されると、リゾチームの分子鎖の自由度が増してヘリックス含量は増大し、後者では著しく減少する。

前者では、222nm と 294nm の円偏光二色性を溶媒組成に対して図示した場合の転移中点が著しく異なり、後者では一致する。2-クロロエタノール中での変性リゾチームのヘリックス含量からも、外挿によって、水溶液中のヘリックス含量12%が得られる。

第5章では、1-プロパノール水溶液中における変性挙動について述べている。この溶媒中では1-プロパノールの濃度が20%以上の領域で変性が起こるが、変性直後のリゾチームは10℃において約30%のヘリックス含量を有する。そのまま放置すると1日後にはヘリックス構造が消滅し、分子間 β 構造を生成し溶液は白濁する。この β 構造は昇温により減少し、80℃以上では再び分子内ヘリックス構造に戻る。これを冷却すると変性直後の状態に戻り、長時間放置により分子間 β 構造を生成する。

第6章では、上記の実験結果に基づきリゾチームの再生に関する仮説を提出している。すなわち、変性リゾチームを変性溶媒から水溶液中に移すと、まずヘリックス含量が約12%の中間体を作り、この状態を核として三次構造の形成と酵素機能の再生が徐々に進行すると言うものである。分子間 β 構造の形成は、この再生過程を妨げ、また再生核として最も有効な中間状態のヘリックス含量は約30%であると推定している。

論文審査の結果の要旨

リゾチームは分子量が約14000の最も小さい酵素の一つであり、その立体構造もX線解析により完全に解明されている。リゾチーム水溶液に塩酸グアニジンを追加し、また除去すると、立体構造の破壊と再生にともなって酵素機能の失活と再生が可逆的に起こる。しかし再生開始の核となる変性中間体の実体は、まだ把握されていない。本研究は、この中間体の構造を明らかにするために行われたもので、得られた成果は、つぎの通りである。

1) 変性中間体を得るための溶媒、すなわち変性作用が弱く、しかも変性の可逆性をそこなう分子会合を引き起こさない溶媒として、酢酸が適格であることを見いだした。

2) リゾチームの酢酸水溶液中における円偏光二色性を、酢酸濃度ゼロに外挿する方法、及びS-S結合の切断により立体構造形成能を人為的に失わせた修飾リゾチームの水中における円偏光二色性の直接測定の方法により、水中における変性中間体がヘリックス構造に換算して約12%の二次構造を持つことを見いだした。この結果に基づいて、変性リゾチームを水中に移すと、まず変性中間状態まで戻り、これを核にして立体構造が形成されるという再生機構を提出した。

3) ヘリックス形成溶媒である2-クロロエタノール水溶液中では、立体構造の破壊と共に、自由度を解放されたリゾチームのヘリックス含量が増加すること、及びこの過剰のヘリックス部分の存在は再生核の形成を阻害することを見いだした。

4) 1-プロパノール水溶液中では、変性直後のリゾチームは可逆的に再生できるが、変性後長時間経過すると分子間 β 構造による会合が起こるため再生が阻害されること、及びこの β 構造は80℃以上の加熱により分子内ヘリックス構造に転化することを見いだした。

以上要するに、本論文は変性中間状態を実現し得る弱い変性環境を見だし、これまで実体が把握されていなかった変性中間体の二次構造をある程度明らかにして、酵素の立体構造形成機構の解明に有力な手

がかりを与えたものであり，学術上，實際上寄与するところが少なくない。

よって，本論文は工学博士の学位論文として価値あるものと認める。