

# 論文の内容の要旨

論文題目「生化学的手法を用いた糖質加水分解酵素リゾチームの酵素反応機構に関する研究」

学位申請者 川口 裕也

キーワード：リゾチーム 糖転移反応 触媒部位 酵素活性測定 立体構造

リゾチームはN-アセチルムラミン酸 (MurNAc) と N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の共重合体やキチンを構成する GlcNAc の重合体の  $\beta$ -1, 4 結合を加水分解する糖加水分解酵素である。リゾチームは病原体の細胞壁に含まれるこれらの重合体を分解して溶菌することから、生体防御タンパク質と考えられている。リゾチームはニワトリ型、グース型および無脊椎型の3つに大きく分類され、これらのリゾチームは分子量、構成アミノ酸数、基質結合部位、触媒基および触媒反応様式が異なる。

ニワトリ型リゾチームは構造と機能に関して詳細に研究され、6個の基質結合部位 (A-F 部位) が存在し、触媒基の Glu35 と Asp52 の作用によって D-E 部位間のグリコシド結合が加水分解される。さらに、本リゾチームは糖加水分解反応とともに能率の良い糖転移反応を触媒し複雑な反応機構であることが知られている。しかしながら、その能率の良い糖転移反応の機構は不明であり、触媒基 Asp52 がどのように関与するかも明らかでない。この Asp52 は、周辺に存在するアミノ酸残基 (Asn46, Asp48, Ser50 および Asn59) と強固な水素結合ネットワークを形成している。Asn46 および Asn59 の役割に関しては報告されているが、Asp48 および Ser50 の役割は報告されていない。そこで、ニワトリリゾチーム (HEL) の触媒基 Asp52 が形成する水素結合ネットワークの役割を解明する一環として、Asp48 を Ala に置換した変異体 (D48A) および Ser50 を Ala に置換した変異体 (S50A) を作製し、HEL と比較することで、触媒基 Asp52 が形成する水素結合ネットワークの役割の解明を試みた。変異体の基質結合に対する影響を検討した結果、D-F 部位の部分的な基質結合力の低下が観察された。また、変異体の触媒活性に対する影響について GlcNAc の 5 量体を用いた活性を検討した。さらに、コンピューター・シミュレーションによってタイムコースを計算し、反応パラメーターとして基質結合部位の結合自由エネルギーとグリコシド開裂反応、加水分解反応、糖転移反応の速度定数を求めた。HEL は基質を 20 分で分解したが、D48A では、反応開始後 240 分で基質を分解した。さらに、S50A は基質を 90 分で分解した。次に、コンピューター・シミュレーションを行い、各パラメーターを求めた結果、D48A および S50A では、D から F 部位での基質結合様式が HEL とは異なることが示唆され、糖転移反応の速度定数が減少したのではないかと考えられた。次に、X 線結晶構造解析を行い、詳細な構造変化を検討した。その結果、Asp48 は D-F 部位において、Ser50 の側鎖の配向を規定することで水素結合ネットワークに重要であり、Ser50 は、Asn59 の側鎖の配向を規定する上で重要であることが明らかとなった。以上の結果、水素結合ネットワークは、触媒基 Asp52 が機能するために重要であり、糖転移反応に関与する E-F 部位の基質結合に大きく影響していることが明らかとなった。このように、HEL の触媒基 Asp52 は、周辺のアミノ酸によって固定され、触媒基の位置関係が厳密に固定されていた。さらに、Asp 残基が糖転移反応に重要であることは明らかとなったが、酵素反応機構の解明には至らなかった。そこで、加水分解反応を示すが糖転移反応を示さないグース型リゾチームである OEL の触媒基周辺に着目した。

グース型リゾチームは、大型の鳥類や魚類に含まれ、その基質結合部位に関しては、ガチョウリゾチームと (GlcNAc)<sub>3</sub> との複合体の X 線結晶構造解析から 3 つの糖残基が結合した B-D 部位が推定され、Glu73 が触媒基であると報告されている。しかし、本リゾチームは HEL の Asp52 にあたる 2 つ目の触媒基が明らかになっていない。すなわち、HEL の Asp52 の位置に Gly90 が存在し、その近傍に 2 つの Asp 残基 (Asp86 および Asp97) が存在している。そこで、これらの 2 つの Asp 残基や HEL の触媒基 Asp52 と同等の位置に存在する Gly90 に着目し、グース型であるダチョウリゾチーム (OEL) の変異体を作製し機能解析した。変異体は、Asp86 および Asp97 を Asp に置換したもの (D86A および D97A)、2 つを Ala に置換したもの (D86A/D97A)、さらに、Gly90 を Asp に置換したもの (G90D)、3 つのアミノ酸を置換したものの (D86A/G90D/D97A) を作成した。まず、Asp 残基変異体の活性を GlcNAc の 6 量体を用いて、反応生成物の経時的な変化で検討した。OEL は、基質を 180 分で分解した。一方、D97A では、反応速度が遅く、さらに、D86A および D86A/D97A では、ほとんど活性がみられなかった。このことから、この 2 つの Asp 残基が活性部位として関与することが明らかとなった。次に、Gly 残基の変異体 (G90D、D86A/G90D/D97A) の反応生成物の経時的な変化を検討した。G90D では、反応速度が遅くなった。次に、HEL と似た触媒基環境にした変異体である D86A/G90D/D97A では、D86A/D97A は活性が消失したにもかかわらず、G90D を導入することにより、活性が回復した。本結果から、導入した Asp 残基が酵素反応に新たに関与したと考えられた。さらに、HPLC を用いた解析において、反応に用いた初期基質 GlcNAc の 6 量体より高分子の基質が確認された。そこで、これらの変異体について、HPLC を用いて解析を行った。その結果、D97A、G90D および D86A/G90D/D97A において、初期基質より高分子の糖が観察された。さらに、反応産物について、質量分析機を用いて、高分子の糖を解析した結果、G90D および D86A/G90D/D97A において、GlcNAc の 11 量体までの高分子の糖が確認された。

次に、無脊椎型リゾチームであるハマグリリゾチーム (MLL) の機能と構造を比較することで、酵素反応機構の解明へのアプローチを試みた。桑野らは、MLL の GlcNAc の 5 量体に対する活性について報告し、HEL が、GlcNAc の 5 量体を約 20 分で分解し、主に 4 量体と 1 量体が生成するのに対し、MLL のオリゴマー分解能が HEL より弱い、4 量体と 1 量体を生成することを報告している。そこで、OEL の GlcNAc の 6 量体に対する活性と MLL を比較した結果、OEL は、GlcNAc の 6 量体の分解産物が 3 量体になるが、MLL は、4 量体と 2 量体に分解していた。これは、サブサイト構造の違いが考えられた。そこで、活性の違いの詳細を解析するために、立体構造の比較を行った。桑野らは、MLL の触媒基 Asp29 は HEL の Asp52 の位置とは異なった  $\beta$  シートに存在することを報告している。そこで、MLL と OEL の触媒基周辺についても比較した結果、MLL の Asp29 は、OEL の Asp86 の近傍に存在していた。さらに、ニワトリ型、グース型および無脊椎型の 3 種のリゾチームの触媒基周辺を比較した結果、触媒基 Glu 残基は、3 種のリゾチームにおいて完全に保存されていたが、Asp 残基の位置はそれぞれ異なっていた。したがって、Asp 残基の位置が酵素反応に影響を与えているのではないかと考えられた。

以上の結果より、リゾチームの酵素反応機構の中で、加水分解反応においては、触媒基 Glu 残基の位置は厳密に規定されなければならないが、Asp 残基の位置はそれぞれ異なっており、糖転移反応においては、触媒基 Glu 残基および Asp 残基は基質との位置関係が規定されている必要性が考えられた。今後、MLL の触媒基周辺のアミノ酸を変異させた変異体を作製し解析することで、より詳細な酵素反応機構の解明が期待される。