

審査結果の要旨

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

本論文は、糖質加水分解酵素リゾチームの酵素反応機構に関して、3つのタイプのリゾチームを用いて生化学的手法を用いて解析し、その反応に関与する触媒基の役割を解析したものである。リゾチームは細菌細胞壁多糖類を加水分解する糖加水分解酵素で、ニワトリ型、グース型、および無脊椎型リゾチームが存在する。ニワトリリゾチームは、触媒基の Glu35 と Asp52 の作用によって基質結合部位 A-F 部位の D-E 間のグリコシド結合が加水分解されると同時に高能率の糖転移活性を有する。一方、グース型および無脊椎型は加水分解反応のみを有する。そこで本論文では、各リゾチームでその位置に変化がある触媒基 Asp 残基に着目し、3種のリゾチームを用いて Asp 残基の相対位置関係に基づくアミノ酸置換体作製と活性評価、および立体構造解析による触媒基周辺の環境変化の解析を行っている。まず、ニワトリリゾチームを用いて触媒基 Asp52 が存在する水素結合ネットワークの解析のため、ネットワークを構成する 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、水素結合ネットワークの役割の解明を試みている。すなわち、GlcNAc 5 量体に対する活性測定とコンピューター・シミュレーションによって反応パラメーター計算、変性剤グアニジン塩酸に対する構造安定性を熱力学的評価、および X 線結晶構造解析による詳細な構造変化を検討している。その結果、この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を結論付けている。次に、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ダチョウリゾチームの触媒基周辺の解析を行っている。グース型リゾチームは、Glu73 が触媒基であると報告されているが、ニワトリ型の Asp52 に相当する2つ目の触媒基が明らかになっていない。すなわち、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 Gly90 について変異体を作製し機能解析している。その結果、Asp 残基変異体の活性を GlcNAc の6量体を用いて測定し、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いことを示している。このことから、この2つの Asp 残基が酵素反応に関与することを明らかにしている。次に、Gly 残基の変異体 (G90D, D86A/G90D/D97A) の活性を測定した結果、G90D では、反応速度が遅くなったが、ニワトリ型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、活性が回復することを見出している。さらに、HPLC および質量分析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を確認している。すなわち、糖転移活性を有さないグース型リゾチームに遺伝子工学的にニワトリ型触媒基を導入することにより糖転移活性を付与することに成功している。次に、無脊椎型リゾチームであるハマグリリゾチーム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ている。ハマグリリゾチームは、オリゴマー基質に対する活性の違いから他のリゾチームとサブサイト構造の違いが考えられている。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て

る。そこで、本リゾチームとニワトリ型、グース型の触媒基周辺について比較した結果、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おり、触媒基 Asp 残基の位置が酵素反応に影響を与えている可能性を見出している。

以上の結果より、リゾチームの酵素反応機構の中で、加水分解反応および糖転移反応における触媒基 Glu 残基と Asp 残基の関係を明らかにし、糖転移活性を有しないグース型リゾチームに転移活性を付与するなど、今後の酵素工学的な応用に資する有用な知見を得ている。

以上の結果、本論文は学位論文として十分な内容を有するものと審査委員全員の一致で判定された。

したがって、申請者 川口 裕也 は東海大学博士（農学）の学位を授与されるに値すると判断した。

論文審査委員

主査	農学博士	芝田 猛	総合農学研究所教授	(生物科学研究科生物科学専攻)
委員	博士(理学)	岩岡 道夫	理学部教授	(総合理工学研究科総合理工学専攻)
委員	農学博士	荒木 朋洋	農学部教授	(生物科学研究科生物科学専攻)
委員	博士(理学)	星 良和	農学部教授	(生物科学研究科生物科学専攻)
委員	博士(医学)	永井 竜児	農学部准教授	(生物科学研究科生物科学専攻)