

Title	ヒトリゾチームの立体構造
Author(s)	平下, 尚治
Citation	
Issue Date	1999-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10119/2585">http://hdl.handle.net/10119/2585</a>
Rights	
Description	Supervisor:大久保 忠恭, 材料科学研究科, 修士

# ヒトリゾチームの立体構造

平下 尚治 (大久保研究室)

130アミノ酸残基からなり、4つのジスルフィド結合を持つヒトリゾチームは、涙、唾液など多くの分泌物に存在する溶菌酵素であり、細菌細胞壁を構成する糖鎖の $\beta(1-4)$ 結合を加水分解する。ヒトリゾチームとニワトリ卵白リゾチームのアミノ酸配列を比較すると、約40%の残基が異なっている。ニワトリ卵白リゾチームは、X線結晶解析およびNMRにより立体構造が決定されているのに対し、ヒトリゾチームではX線結晶解析の結果しか報告されていない。そこで、本研究においてNMRによるヒトリゾチームの立体構造の決定を行なった。

本研究において使用したヒトリゾチームは、酵母により分泌されたものをHPLCを用いて精製した。Uniform $^{15}\text{N}$ ラベル化は、 $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を窒素源として酵母を培養することにより行なった。タンパク質濃度2mM、pH4.0の15%D $_2$ O/85%H $_2$ OのNMR試料を調整した。NMR測定はバリアン社製Unity plus750装置を使用し、温度35の条件下で二次元NMRである $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  COSY、 $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  NOESYと $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HMQCおよび三次元NMRである $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  NOESY-HMQCと $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  TOCSY-HMQCの測定を行なった。

NMRピークの帰属は、COSYを用いてスピン系の解析を行なうことでアミノ酸の種類を同定し、隣接残基間のNOE情報を用いて一次構造に沿って帰属を行なう連鎖帰属法を用いて行なった。隣接残基の $\text{C}_\alpha\text{H}$ -NH間の強いNOE、また隣接残基のNH間の連続する強いNOEと3残基離れた残基間のNOEにより、 $\beta$ シートや $\alpha$ ヘリックス構造等の二次

構造を同定した。さらに側鎖間も含めて約900個のNOE情報を入力データとしてソフトウェアXPLORを使用し、ディスタンス・ジオメトリーと拘束条件付分子動力学計算を行ない立体構造を決定した。

得られた計算構造のうちエネルギーの低い5個を最終構造にした。5個の構造間の主鎖原子座標のrmsd( root-mean-square-deviation )は1.9Åであった。また、X線結晶解析結果との比較から全体の立体構造は両者似かよっていたが、主鎖原子座標のrmsdは2.6Åであった。計算結果から、残基4~16、24~35、91~99、111~115において4本の $\alpha$ ヘリックス、残基2~3、39~40の2本鎖と、残基44~46、52~55、59~61の3本鎖よりなる2個の $\beta$ シート構造の存在が明らかになった。また、二次構造形成領域では計算構造は収束していたが、ループ領域では比較的収束していなかった。



図1: ヒトリゾチームの立体構造

残基4~15、24~33、91~99、109~116で $\alpha$ ヘリックス、残基2~3、38~39、42~46、51~55、59~60で $\beta$ シート構造を形成

keywords

ヒトリゾチーム, 立体構造, NMR, NOE