

Title	リボヌクレアーゼT ₂ の一次構造決定と触媒機能関与アミノ酸残基の研究
Author(s)	河田, 康志
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/27767
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【6】

氏名・(本籍)	かわたやすし 河田康志
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 6773 号
学位授与の日付	昭和 60 年 3 月 25 日
学位授与の要件	理学研究科 有機化学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	リボヌクレアーゼ T ₂ の一次構造決定と触媒機能関与アミノ酸残基の研究
論文審査委員	(主査) 教授 崎山 文夫 (副査) 教授 池中 徳治 教授 京極 好正

論 文 内 容 の 要 旨

リボヌクレアーゼ T₂ (RNase T₂) は、こうじ菌の産出する RNA 分解酵素で、同じ起源の RNase T₁ やウシ睪臓 RNase A などと比較して分子量が大きい (~3 万)。今日まで高分子量を持つヌクレアーゼの構造や機能についてはほとんど研究されておらず、この RNase T₂ は、RNase T₁ や RNase A の構造や機能と比較すれば、興味深い結果が得られるものと考えられた。

RNase T₂ は分子内に唯一個の Met を含んでおり、ブロムシアン分解後 S-カルボキシメチル化をすると CMF-2, CMF-3 の 2 つの大きな断片に分けられた。CMF-2 中には、Lys が 17 個も含まれており、Achromobacter プロテアーゼ (ACPI) 分解と、V-8 プロテアーゼ分解とによってその 146 個の全アミノ酸残基の配列を決定することができた。CMF-3 フラグメント中には、Lys が 2 個しかなかったため、比較的多く存在する半シスチン残基 (6 個) に注目し、これを S-アミノエチル化して AEF-3 フラグメントを得た。AEF-3 を ACPI 分解し、キモトリプシン分解ペプチドと合わせて、その 93 個の全アミノ酸配列を決定することができた。

従って RNase T₂ は N 末端 Glu から始まる 239 個のアミノ酸から成り、Asn-15, 76, 239 に糖鎖が結合した分子量 30,100 のポリペプチドであることが判明した。その結果 RNase T₂ は、一次構造上 RNase T₁ にも RNase A にもほとんど似ていないことが明らかになった。つぎに、RNase T₂ の触媒機能に関するアミノ酸残基の検索を行った。RNase T₂ は 0.1 M の ICH₂COOH と 37°C, 8 時間 (pH 5.6) ではほぼ完全に失活する。この修飾蛋白質のペプチドマッピングをしたところ、His 115 がほぼ完全に、His 53 が 50% 程、カルボキシメチル化されていることが判明した。

このことは、ほぼ同じ条件で活性部位の Glu58 がカルボキシメチル化される RNase T₁ よりは、むしろ

るHis 119がカルボキシメチル化されるR Nase Aによく似ているように思われる。

またR Nase T₂には分子表面に露出しているTyrが3個以上存在しており、この残基は、3'-AMPを共存させた実験から活性部位に存在していることが判明した。これらのTyrはすべてTNMによって修飾されることがCIDNPによって判明した。またその修飾を受けた酵素は依然75%の活性を維持していることを考え合わせると、これらのTyrは、基質結合に関与するものと判断された。このニトロ化されたR Nase T₂のペプチドマッピングより修飾を受けたTyrの1つはTyr 64であることが判明した。従ってこの残基は活性部位に存在して基質結合に関与している可能性が高いものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

こうじ菌の産生する核酸分解酵素としてT₁、T₂、S₁の3種が知られているが、これまでに一次構造が決められたのは主成分のリボヌクレアーゼT₁(分子量1.1万)のみである。リボヌクレアーゼT₂はグアニル酸に厳格な特異性を示すリボヌクレアーゼT₁と異なり、基質特異性が広く分子量も約3倍の糖蛋白質である。したがって同じ菌が産生するこれらのリボヌクレアーゼの一次構造の異同を明らかにすることは、2つの酵素の触媒特性から考えて興味あることである。本論文はこの点を明らかにするために行ったリボヌクレアーゼT₂の一次構造解析および触媒機能関与アミノ酸の検索を取扱ったものである。

本酵素の一次構造解析において河田君は微量分析に適した気相式シーケンサーの使用やリジルエンドペプチダーゼによるポリペプチドの新しい断片化法の導入など新手法を積極的に組入れて、限られた試料を有効に用いて実験を行った。その結果、本酵素は239個のアミノ酸から成る単一ペプチド鎖からできており、分子内の2個所のアスパラギンに高マンノース型糖鎖が、C末端アスパラギンに(N-アセチル)グルコサミンが結合していることが明らかになった。また、リボヌクレアーゼT₁とT₂では一次構造が全く異っており、T₂がT₁の遺伝子重複により生じた可能性は低い。

河田君はさらにプロトンNMR、化学修飾、光CIDNPなどの手法を駆使して本酵素の活性部位の検索を行い、2個のヒスチジン残基が触媒機能に関係していること、それらの挙動や機能はT₁よりウシ膀胱リボヌクレアーゼAに類似することなどを明らかにした。

以上のように、本論文はリボヌクレアーゼT₂の一次構造の解明だけでなく、蛋白質の一次構造解析法および高分子型リボヌクレアーゼの活性部位についての重要な知見を含むものであり、理学博士の学位論文として価値あるものと認める。