



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	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/27767">https://hdl.handle.net/11094/27767</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

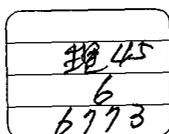
The University of Osaka

リボヌクレアーゼT<sub>2</sub>の一次構造決定  
と  
触媒機能関与アミノ酸残基の研究

1985年

大阪大学蛋白質研究所  
化学構造部門

河田 康志



# 目 次

	緒 言	1
第 I 部	リボヌクレアーゼ T <sub>2</sub> の一次構造決定	4
第一章	序 論	5
第二章	実 験 及 び 結 果	7
第一章	実験方法	7
第二章	RNase T <sub>2</sub> の純度, 分子量, アミノ酸組成と酵素活性	15
第三章	ブロムシアンペプチド, CMF-2 フラグメントの一次構造決定	17
第四章	ブロムシアンペプチド, AEF-3 フラグメントの一次構造決定	26
第五章	RNase T <sub>2</sub> の全一次構造の比喩	36
第六章	RNase T <sub>2</sub> の糖鎖の組成分析	38
第七章	RNase T <sub>2</sub> の S-S 結合部位の部分決定	45
第三章	考 察	48
図 表		52

第Ⅱ部	リボヌクレオラーゼ <sub>T2</sub> の触媒 機能に關与するアミノ酸残 基の検索	84
オ一章	序論	85
オ二章	実験	88
オ三章	結果	
オ1節	RNase T <sub>2</sub> の化学修飾	95
オ2節	RNase T <sub>2</sub> 中のHisの <sup>1</sup> H-NMR測定	98
オ3節	RNase T <sub>2</sub> の光CIDNP	103
オ4節	CM-Hisの位置決定	109
オ5節	3-ニトロチロシン残基(NO <sub>2</sub> -Tyr) の位置検索	114
オ四章	考察	
オ1節	活性部位のHisについて	117
オ2節	活性部位のTyrについて	122
オ3節	RNase T <sub>2</sub> の触媒機能關与ア ミノ酸残基と、その環境について	124
	結語	125
図表		127
謝辞		153
文献		154

略号

RNase	リボヌクレアーゼ
DNase	デオキシヌクレアーゼ
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
MTS	メタンスルホン酸
PITC	フェニルイソチオシアネイト
PTH	フェニルチオヒダントイン
Nle	ノルロイシン
CM-Cys	S-カルボキシメチルシステイン
AE-Cys	S-アミノエチルシステイン
IsoPrOH	イソプロパノール
Glc N.	グルコサミン
GlcNAc	N-アセチルグルコサミン
Man	マンノース
Fuc	フコース
Gal	ガラクトース
AcP I	<i>Achromobacter lyticus</i> プロテアーゼ I.
V-8	Staphylococcal (プロテアーゼ)
Cpase	カルボキシペプチダーゼ
EDTA	エチレンジアミンテトラアセテート

$\Delta$ Thr	デヒドロスレオニン
$\Delta$ Ser	デヒドロセリン
M <sub>w</sub>	分子量
Con A	コンカナバリン A
Tris	トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン
3'-AMP	アデノシン-3'-リン酸
NMR	核磁気共鳴
CIDNP	Chemically Induced Dynamic Nuclear Polarization
DEP	ジエチルピロカーボネイト
TNM	テトラニトロメタン
CM-His	N-カルボキシメチルヒスチジン
NO <sub>2</sub> -Tyr	3-ニトロチロシン
DTNB	5,5'-ジチオビス-2-ニトロ安息香酸

## 緒 言

ウシ膵臓リボヌクレアーゼAの一次構造が決定されて以来、リボヌクレアーゼの構造と機能の関連性についての詳細な研究が数多く行なわれてきた。これらの研究対象となったりリボヌクレアーゼの起源をみても、高等動物から微生物まで多岐にわたっているが、その多くは分子量1万程度の小さい酵素であり、わずかにウシ膵臓DNaseやStaphylococcalヌクレアーゼなどが、分子量2~3万程度の大きい酵素に分類されるにすぎない。しかし、ここ数年来見いだされた多種類の制限酵素をはじめ、核酸加水分解酵素の多くは、高分子型のものであるが、これらの酵素の構造-機能相関については、ほとんど研究が行なわれていないのが現状である。本研究では、これら高分子型の核酸分解酵素の構造と機能の関連性を明らかにするために、その代表としてリボヌクレアーゼT<sub>2</sub>を取りあげた。

リボヌクレアーゼ<sub>2</sub> (RNase<sub>2</sub>) は、1957年、Satoら<sup>(1)</sup>によってこうじ菌 (*Aspergillus oryzae*) の産生するタカジヌスターゼ中に発見され、Rushizky<sup>(2)</sup> や Uchida<sup>(3)</sup> によって精製された。この酵素は分子量約3万6千で12~15%の糖成分を含む。RNAに対する塩基特異性は、グアニル酸に優先性を示すが、特異性自体はそれほど厳格ではなく最終的にRNAはモノヌクレオチド-3'-リン酸の混合物にまで分解される。この性質を利用してRNase<sub>2</sub>はRNAの塩基組成分析<sup>(2)(4)</sup>に利用されているが、そのタンパク質化学的性質に関する知見は皆無に等しい。

さらに興味あることは *Aspergillus oryzae* は RNase<sub>2</sub> に加えて低分子型の RNase<sub>T1</sub><sup>(5)</sup> (104残基) と、高分子型のヌクレアーゼ<sub>S1</sub><sup>(6)</sup> を産生することである。前者はグアニル酸に対して高い基質特異性を示すリボヌクレアーゼであり、後者はRNase<sub>2</sub>と同じく一本鎖DNAのみを無差別に分解する。したがってRNA,

DNA との差はあるものの核酸のホスホジエステル結合の加水分解を触媒する3種類の酵素、しかも同じ菌がつくる RNase T<sub>1</sub>, RNase T<sub>2</sub> Nuclease S<sub>1</sub>, の間の一次構造上の相同性の有無、共通の祖先タンパク質の存在、さらに触媒機能の発現メカニズムに共通性の有無などタンパク化学的にも酵素化学的にもはたまた、分子進化の観点からも、きわめて興味ある問題を提起している。

以上の観点から本研究は、高分子型 RNase の構造機能相関を明らかにするとともに、同一菌体がつくる3種の核酸分解酵素相互間の構造と機能との関連性や存在意義について検討することを目的として行なったものである。本論文のオI部では、RNase T<sub>2</sub> の一次構造決定を、オII部では触媒機能に関与するアミノ酸残基について検討した結果を述べる。

# 第 I 部

リボヌクレアーゼ T<sub>2</sub> の  
一次構造決定

## 第一章 序論

RNase T<sub>2</sub> 中には、唯一つのメチオニン残基が含まれている。このメチオニン残基をブロムシアン分解し、シスチンを還元 S-カルボキシメチル化すると RNase T<sub>2</sub> はほぼ半分の大きさな二つのフラグメント F-2 と F-3 に分離する。従って RNase T<sub>2</sub> の一次構造決定には、F-2, F-3 のフラグメントの一次構造をそれぞれ決定すればよいことになる。第二章では、これら F-2, F-3 フラグメントの一次構造決定と最近導入された、微量かつ迅速にタンパク質・ペプチドの一次構造を決定できる気相式シーケンサーを利用した結果に対するの考察も適宜おこなわれながら記述した。さらに RNase T<sub>2</sub> に結合している糖鎖の位置を決定するとともにその糖組成分析を行ない、その糖鎖構造の推定をした。また、RNase T<sub>2</sub> 中に存在する 5 組の S-S 結合のうち、2 組を明らかにした。

最後の第三章では、第二章で明らかにした

RNase T<sub>2</sub> の一次構造をもとにして他の RNase 類との相同性について論じた。またその一次構造上にみられる特徴や、それから予測されるハイドロパシーと二次構造についても考察した。

## 第二章 実験及び結果

オ 1 節: 実験方法, 実験機器

1-1, 実験材料・試薬

RNase T<sub>2</sub> はタカジアスターゼ原末から Uchida<sup>(3)</sup> の方法により精製した標品を用いた。モノヨード酢酸は半井化学の特級品をクロロフォルムから再結晶して使用した。エチレンジイミン(相互薬品工業)は、茨城大学の正木先生からいただいた。2-メルカプトエタノールは和光純薬の特級品を再蒸留 (bp 30°C, 3 mm Hg) して用いた。尿素は和光純薬の生化学用特級品を用いた。手動エドマン法に用いた PITC, DMAA, TFA は和光純薬製のアミノ酸配列分析用試薬を用いた。またベンゼン, 酢酸エチルは、市販品特級のものを再蒸留して用いた。

HPLC の溶媒に用いた水は蒸留水を、アセトニトリル, イソプロパノールは和光純薬の HPLC 用を使用した。

*Achromobacter lyticus* プロテアーゼ I<sup>(7)</sup> (AcPI) は茨城大学の正木先生からいただいた。Staphylococcus

aureus (V-8) プロテアーゼは Miles 社から、キモトリプシン、ペプシンは Worthington 社から購入したものを用了。

4M-メタンサルホン酸は Pierce 社のものを使用した。

その他の一般試薬はすべて市販品特級をそのまま使用した。

### 1-2, 酵素分解

#### a) AcPI 分解

蛋白質またはペプチドの 30 ~ 100 ナノモルを 200  $\mu$ l の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 9.0) に溶かし、プロテアーゼ溶液 (170.5  $\mu$ g/ml 20 mM Tris-HCl, pH 9.0) を 酵素/基質 =  $\frac{1}{400}$  (モル比) 相当に加え、37°C で 6 ~ 8 時間分解した。

#### b) V-8 プロテアーゼ 又は キモトリプシン分解

ペプチド 100 ナノモルを 200  $\mu$ l の 0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  緩衝液 (pH 8.0) に溶かし、同じ緩衝液に溶かした V-8 プロテアーゼ 又は キモトリプシンを 酵素/基質 =  $\frac{1}{100}$  (モル比) 相当に加え、6 ~ 8 時間

分解した。

なお、酵素分解の至適時間は、適宜逆相HPLCによって反応物を追跡して決めた。

1-3, プロテアーゼ分解ペプチドの分離、精製。

酵素分解したペプチドはすべて逆相型HPLCカラム、ODS-120A, (4×250mm, 東洋曹達), ODS-Lichrospher, (孔径500Å, 4×300mm, Merck) を用いた高速液体クロマトグラフィー (Gilson HPLC System) によって分離精製を行なった。展開は、0.1% TFA から IsoPrOH/CH<sub>3</sub>CN (容量比 3/7) - 0.1% TFA (0.1% TFA - IsoPrOH/CH<sub>3</sub>CN 系), あるいは、0.1% TFA から、CH<sub>3</sub>CN - 0.1% TFA (0.1% TFA - CH<sub>3</sub>CN 系) への直線濃度勾配法によって行なった。再クロマトグラフィーは同じ溶媒系を用い、濃度勾配を緩くするかあるいは、0.1M HCOONH<sub>4</sub> - 60% CH<sub>3</sub>CN 系 (pH 6.4) の溶媒を用いて行なった。

1-4, アミノ酸分析。

蛋白質、ペプチドのアミノ酸組成分析は、

4 M MTS, または 6 M 塩酸 (2 回蒸留) - 0.2% フェノール で  $110^{\circ}\text{C}$ , 24 時間加水分解し, 日立 835-S, 835-S-30, または KLA-5 アミノ酸自動分析機を用いて行なった。

1-5, 手動エドマン分解及び気相式シークエレカーによる自動エドマン分解

手動エドマン分解は直接エドマン法<sup>(8)</sup>によって行なった。この際, 数ナノモル以下の微量サンプル, 数残基以下の短いペプチドや疎水性アミノ酸を多く含むペプチドなどの場合は, PITC とのカップリング反応後, ベンゼン (0.1 ml) による洗浄を 2 回に減らして, ペプチドの流出をできるだけおさえるようにした。

20 残基以上の比較的長いペプチド, あるいは, 微量しか得られなかったペプチドのエドマン分解にはすべて Applied Biosystem 社の 470 A 気相式シークエレカーを用いた。この際用いた試料の量は 300 ピコモルから 3 ナノモルであった。

PTH-アミノ酸の同定には, Hewlett-Packard 社

の Data Module (3390A) を装備した Waters QA-1 HPLC 及び Spectra Physics 社の HPLC システム (SP4200, SP8100, SP8440) を用いて行なった。

分析用の逆相カラムには、ODS-120T (4x250mm, 東洋曹達), Microsorb (ODS, 4x250mm, Rainin) を用い、39.5% CH<sub>3</sub>CN, 0.01M 酢酸ナトリウム (pH 4.5), 0.02% SDS の単一溶媒系による溶出分析を行なった<sup>(9)</sup>。

Waters QA-1 HPLC システムでは、溶出液の 254 nm と 320 nm との二波長検出を行ない、PTH-ΔThr と PTH-ΔSer ピークの同定を同時に行なった。この HPLC システムによる PTH-アミノ酸の検出同定限界は数ピコモルであり、定量分析用の内部標準として PTH-Nle を用いた。

### 1-6 RNase T<sub>2</sub> の純度検定

RNase T<sub>2</sub> の純度検定は、逆相 HPLC (RP-P, 4x250mm, Synchropak) で、0.1% TFA - IsoproH/CH<sub>3</sub>CN 系溶媒を用いて、あるいは、1% SDS, 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.2), 7.5% ゲル電

気泳動<sup>(10)</sup>によつて行なつた。

超速心法は Kakiuchi's<sup>(11)(12)</sup>の方法に従い、50 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl, pH 7.5 緩衝液中で、0.13, 0.18, 0.25% 濃度の RNase T<sub>2</sub> において行なつた。

### 1-7 CMF-2 フラグメントの調製

RNase T<sub>2</sub> (40 mg) を、17 mg (Met の 120 倍当量) のブロムシロソを含む 2.2 ml の 70% ギ酸に溶かし、室温で一晩放置しブロムシロソ分解<sup>(13)</sup>をした。これに水 60 ml を加え希釈した後、凍結乾燥した。さらに水 10 ml を加え凍結乾燥するという操作を 3 回くり返した。

この凍結乾燥品を 8 M 尿素, 5% EDTA を含む 0.2 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.6), 6 ml に溶かし、120  $\mu$ l の 2-メルカプトエタノールを加え、窒素ガス置換を充分おこなひ室温で一晩攪拌した。この溶液に 0.32 g のモノヨード酢酸を 1.2 ml の 1 M NaOH に溶かしたものを、氷冷下で加え、さらに室温で 30 分間攪拌した<sup>(14)</sup>。このときの pH は 8.4 であった。この反応混合物をアルミホイルで遮光した Sephadex G-25

カラム (2×90cm) を用い 0.1M NH<sub>4</sub>OH にて脱塩し、凍結乾燥した。

この凍結乾燥品を 6M 尿素, 5% EDTA を含む 1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.6) 7ml に溶かし、あらかじめ 0.2M NaCl を含む 0.1M NH<sub>4</sub>OH で平衡化しておいた Sephadex G-100 (2.8×175cm) にてゲル濾過を行ない各ペプチドに分離した。

#### 1-8 AEF-3 フラグメントの調製

RNase T<sub>2</sub> (40mg) を 1-7 で記述した方法と全く同じようにしてブロムシアンで Met を切断し、さらに 2-メルカプトエタノールでシステインを還元した。その溶液にエチレンジミン 70μl を加え、10分間室温で攪拌した。この操作を 3回くり返し、エチレンジミンの総量は 2-メルカプトエタノールの 5倍当量使用した。3回目にエチレンジミンを加えてから 30分後に、6M HCl をゆっくりに加え反応溶液の pH を 3 にし、0.2M 酢酸に対して 1日透析を行ない凍結乾燥をした。

この凍結乾燥品は 0.1% TFA-CH<sub>3</sub>CN 系を用

いた逆相 HPLC ( ODS-Lichrospher, 孔径  $500 \text{ \AA}$ ,  $4 \times 300 \text{ mm}$ , Merck ) にて 分離精製した。

オ 2 節 RNase T<sub>2</sub> の純度, 分子量, アミノ酸組成と酵素活性.

本研究に用いた RNase T<sub>2</sub> は, 0.1% TFA - Iso-PrOH/CH<sub>3</sub>CN 系の逆相 HPLC (RP-P, 4x300mm, Synchropak) において単一であった。また, 1% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (7.5% ゲル, pH 7.2) でも単一バンドを示し, 分子量として 31,400 が得られた。

図 1-1

また超遠心法により測定された分子量は, 30,800 であった。

RNase T<sub>2</sub> のアミノ酸組成は表 1-1 に示すように, グルコサミンを含む約 240 残基の糖タンパク質であることを示しており, メチオニンがー残基しか存在しない。そこでこのメチオニンのところでブロムシオン分解を行ない, ジスルフィド結合を還元後カルボキシメチル化することにより, 2つの大きな断片ペプチド (フラグメント) に分離できた。従って一次構造決定は, これらのフラグメントを用いて行なった。

表 1-1

なお、RNase T<sub>2</sub> の活性は Uchida<sup>(3)</sup> と同一であり、また 6M 塩酸グアニジン存在下での DTNB<sup>(15)</sup> 試薬による SH 基は確認できなかった。

オ3節 ブロムシアンペプチド CMF-2 フラグメントの一次構造決定.

3-1: CMF-2 フラグメントの分離・精製.

図 1-2 に RNase T<sub>2</sub> をブロムシアン分解後、還元カルボキシメチル化したもののゲルクロマトグラフィーを示した。

図 1-2

分離は、Sephadex G-100を用いて行ない、0.2 M NaCl が必要であった。それぞれの3つのピークを水に対して透析脱塩をした後凍結乾燥をし、CMF-2 (16.0 mg, 収率 72.4%), CMF-3 (13.5 mg, 収率 79.8%) を得た。CMF-1 (5.0 mg, 収率 12.5%) は、アミノ酸分析の結果から、メチオニンのブロムシアンによる未分解物であった。

RNase T<sub>2</sub> はブロムシアン分解だけでは断片ペプチドに分別できなかった。このことは、CMF-2 と CMF-3 の間にジスルフィド結合が存在することを意味する。また CMF-2, CMF-3 共に、回収率が高いことから透析膜 (Seamless Cellulose Tubing, Union Carbide 社, 分子量 1 万ダルト) を

通過しなかったことがわかる。アミノ酸分析から CMF-2, CMF-3 共にアミノ糖 (グルコサミン) を含んでいることも判明した。またエドマン分解による N 末端分析から CMF-2 は RNase T<sub>2</sub> の C 末端部分に相当し、CMF-3 は N 末端部分に相当することが判明した。

3-2: AcPI による分解とそのペプチドの一次構造決定

CMF-2 フラグメント、100 ナノモルを AcPI (酵素/基質 = 1/400 モル比) で pH 9.0 で 8 時間分解を行ない、逆相 HPLC で図 1-3 のように合計 18 本のピークに分離した。

図 1-3

Ac-7 のペプチドは、手動エドマン法から 2 つのペプチドの混合物であることが判明したので、再クロマトグラフィーを行なった。

図 1-4

各々の分離精製したペプチドのアミノ酸組成値、収率を表 1-2 に示した。

表 1-2

ペプチドのアミノ酸配列は手動エドマン法、または気相式シーケンサーによって決定した。

### 図 1-5

Ac-9 (収率 10%) および Ac-16 (収率 16%) ペプチドはともに Ac-18 ペプチドの部分分解により生成したことが判明し、AcPI による非特異的切断 ( $\text{Gly} \downarrow \text{Ala}$ ,  $\text{Glu} \downarrow \text{Ile}$ ) がおこっているものと思われる。一方、Ac-9, Ac-17, Ac-18 ペプチドには、共に Lys-Pro のアミノ酸配列があり、AcPI によって切断されなかった。また、Ac-12, 13 および Ac-17, 18 は、それぞれ同じアミノ酸組成、同じアミノ酸配列であった。これらのペプチドは、それぞれ 25 残基、21 残基と、他に比べて長いペプチドであり、Ac-12, 13 中には Pro を、Ac-17, 18 中には Trp を含んでいるため、前者では Pro のペプチド結合でのシス、トランスの異性化、後者では Trp の酸による部分分解のために、異なった溶出時間に現われたものと思われる。これらのペプ

4ドは、気相式シークエンサーによって、2カ  
モルで最終残基まで同定することができた。

Ac-1 ペプチドでは、Lysのみしかアミノ酸分  
析で定量されなかった。CMF-2フラグメントの  
N末端分析からは Lys-Lys-Tyr-Trp-Pro...である  
ことが判明しているのので、Ac-1のアミノ酸配  
列は、Lys-Lysと決定した。Ac-2ペプチドは、  
アミノ酸分析によりグルコサミン (GlcN) を含ん  
でいた。エドマン分解をやる段階目まで行な  
い、消去法で確認するとともに、残りを 2M  
HCl, 110°C 5時間水解し、アミノ酸分析から  
Asp と GlcN を同定した。このことから Ac-2の  
構造を Lys-Ser-Glu-Asn<sub>CHO</sub> と決定した。

表 1-1, 1-2 において CMF-2フラグメントの  
Lysのアミノ酸分析値がアミノ酸配列からの  
数値に比べて1~2個低くなっている。

タンパク質が還元糖と中性アルカリ性溶液  
中にあるとき、タンパク質中のアミノ基 (N  
末端, Lysのε-アミノ基) が糖と付加物をつ  
くり、それが Amadori 転位<sup>(16)</sup> を起こすともはや

塩酸水解でももとのアミノ酸 (Lys) の回収率はかなり低下することが知られている (Lys の  $\epsilon$ -アミノ基の場合 50%<sup>(17)</sup>)。従って CMF-2 フラグメントを調製するときタンパク質から脱離した糖と Lys の  $\epsilon$ -アミノ基が一部反応して、アミノ酸回収率が若干低下したものと考えられる。

従って Lys を除いては、CMF-2 フラグメントの値 (146 個) とそれぞれの Ac-ペプチドのアミノ酸配列から計算された総計とよく一致しており、未回収ペプチドがないものと考えられる (Ac-9, Ac-16 のような分散して切断されたペプチドは除く.)。

3-3 接続ペプチド (V-8 プロテアーゼ分解ペプチド) の単離と一次構造決定。

3節-2では、AcPI 分解によりその C 末端が Lys であるペプチドのアミノ酸配列を決定した。これらの相互ペプチド間の配列順序を決定するためには、CMF-2 フラグメント 100 ナノモルを V-8 プロテアーゼ (酵素/基質 = 1/100 モル比)

で、pH 8.0で8時間分解した。分解物は図1-6に示すように逆相HPLCによりV-1~V-10の10種のペプチドに分離した。

図 1-6

手動エドマン法のN末端分析により、V-6ペプチドは2つの混合物であったので、再クロマトグラフィーを行ないV-6-R-1, V-6-R-2に分離した。

図 1-7

表 1-3 および図 1-8にそれぞれのペプチドのアミノ酸組成値、収率、アミノ酸配列を示した。

表 1-3, 図 1-8

なお、図 1-6で素通り分画、11分、20分付近に溶出されたピークにはほとんどアミノ酸は含まれていなか、たので省略した。

V-1ペプチドはV-8ペプチドのAsp-Serの間で、V-4ペプチドはAsp-Leuの間で切断がおこっていた。またGluまたはAspがアミノ酸配列上で連続あるいは近接しているとき、V-3 (Glu-His-Glu), V-5 (Glu-Glu), V-9 (Asp-

Glu-Glu-Phe) にみられるように、GluのC末端側での切断が起こりにくいか、あるいは切断されてもわづかであった。

V-7ペプチドの26段階目は何も同定されなかったが、アミノ酸分析でGlcNが存在すること、さらに25段階目までに決まったアミノ酸から計算して、Aspが1つ足りないこと、また3節-2で決定した糖ペプチド Lys-Ser-Glu- $\text{Asn}_{\text{CHO}}$  の3つめまでのアミノ酸配列が同じであることなどから、このV-7ペプチドの26番目をAsn-CHOであるものと決定した。

気相式シークエンサーを用いてアミノ酸配列を決定すると、Asn-CHOは検出されないものと考えられる。これはペプチドを支持しているガラスフィルター上のポリブレン層から親水性の高いPTC-Asn-CHOがブチルクロリドで抽出されにくいためと考えられる。このことは、才4節での他の糖ペプチドのアミノ酸配列で、Asn-CHOの部分のみ何も検出されず次からのサイクルではうまくPTH-アミノ酸が検出されることから支持される。

## 3-4. CMF-2 フラグメントの一次構造

図 1-5 の Ac-ペプチド および 図 1-8 の V-8 ペプチドのアミノ酸配列から 図 1-9 に示すように、それぞれのペプチドはすべてオーバーラップしており、矛盾なく並べる事ができた。

## 図 1-9

また、CMF-2 フラグメントそのものを気相式シークエンサーにかけることにより 30番目の Glu まで同定することができた。CMF-2 フラグメントは、RNase T<sub>2</sub> の C 末端部分であり、したがって CMF-2 フラグメントの C 末端 Asn-CHO が RNase T<sub>2</sub> の C 末端ということになる。また、表 1-1, 1-2, 1-3 に示したように、アミノ酸合計がよく一致していることから、ブロムシアン分解、および酵素分解後の分離精製過程での未回収ペプチドはなく、<sup>146</sup>Asn-CHO の後に続くペプチドはないものと判断される。さらに RNase T<sub>2</sub> および CMF-2 フラグメントの CPase Y による分析<sup>(18)</sup>、ヒドラジン

分解<sup>(9)</sup>によっても何も検出されなかったことから C 末端アミノ酸は Asn-CHO であるものと思われる。

CMF-2 フラグメントの一次構造の特徴として、i) 8番目の Glu から 18番目の Glu までにおいて酸性アミノ酸のクラスターが存在すること (<sup>8</sup>Glu-Gly-<sup>10</sup>Asp-Asp-Glu-Glu-Phe-<sup>15</sup>Trp-Glu-His-<sup>18</sup>Glu), ii) Lys-Lys のアミノ酸配列が 3ヶ所 (24, 35番, 60, 61番, 76, 77番), Ala-Leu-Ala が 2ヶ所 (62, 63, 64番, 84, 85, 86番) と、同じくり返し配列が存在していることがあげられる。

半シスチン残基は 25番, 33番, 98番, 132番の 4ヶ所に存在しており、ブロムシスチン分解だけでは RNase T<sub>2</sub> は 2つの部分に分かれなかったことから、この中のどれかは、CMF-3 フラグメントの半シスチン残基と S-S 結合していることも判断できる。

## 第4節 ブロムシオンペプチド AEF-3 フラグメントの一次構造

### 4-1. 序

ブロムシオン分解・還元カルボキシメチル化後分離した CMF-2 フラグメントが RNase T<sub>2</sub> の C 末端側の断片であることが判明したので、CMF-3 フラグメントは、N 末端側の断片に相当することになる。CMF-3 フラグメントには、Lys が 2 個、Arg が 2 個存在するので(表 1-1 参照)、まず、AcPI による分解を試みた。しかし、このペプチドはほとんど小さなペプチドには切断されなかった。

### 図 1-10

表 1-4 に示したようにアミノ酸分析から、CMF-3-Ac-1 は、Lys を 1 個含む 7 個のアミノ酸から、CMF-3-Ac-2 は、H-Ser を 1 個、Arg を 2 個含む 23 個のアミノ酸からなっていることが判明した。

### 表 1-4

従って残りの 1 個の Lys は C 末端から 24 番目にあるものと予想された。また、この CMF-3 フラグメントは、V-8 プロテアーゼや、

トリプシンでもやはりほとんど消化されなかった。

そこでこれらのプロテアーゼで分解されにくい大きなコラーゲンの一部分の断片化の方法として、AcPIの基質特異性を考えて、Cysの利用を試みた。すなわち、CMF-3フラグメントには、6個の半シスチン残基が存在しており、このCysをS-アミノエチル化するとAcPIの作用を受け、ペプチド結合が切断されるものと予想された。事実、網状コラーゲンはS-アミノエチルシステイニル結合はリジル結合と同じようにAcPIで切断されることを見い出しており、CMF-3の断片化にその方法を応用した。

#### 4-2, AEF-3フラグメントの分離・精製

RNase T<sub>2</sub>をブロムシアノン分解・還元アミノエチル化後、0.1% TFA - CH<sub>3</sub>CN系を用い、孔径500Åの逆相HPLCカラム(ODS-Lichrospher, 4x300mm)で分離精製し、AEF-2(10mg, 収率45.2%), AEF-3(7.5mg, 収率

44.4%)、各フラグメントを得た。なお、AEF-1 はブロムシ  
オン分解されなかったものであった。その分  
離パターンを図 1-11 に示した。

図 1-11

4-3, AcPI による分解ペプチドの  
一次構造決定。

RNase T<sub>2</sub> の Cys を還元 S-アミノエチル  
化したブロムシオンペプチド AEF-3 フラグメント、100ナ  
ノモル相当を AcPI で分解し、逆相 HPLC  
(ODS-120A, 0.1% TFA-CH<sub>3</sub>CN系) で分離精  
製したパターンを図 1-12 に示した。Ac-1~  
Ac-15 まで 15本のピークが得られたが、Lys +  
AECys = 8 から予想される数より多かった。

図 1-12

Ac-1, Ac-2 は 同じ溶媒系を用い緩やかな  
グラジエントで再クロマトグラフィーを行なった。  
そのクロマトグラムが図 1-13, 14 である。

図 1-13, 14.

それぞれのペプチドのアミノ酸分析値、収率を  
表 1-5 に気相式シーケンサーで決定した

アミノ酸配列を図 1-15 にそれぞれ示した。

表 1-5, 図 1-15

Ac-2-R-1, 2, 3, Ac-10, 11, 12, および Ac-13, 14, 15 のペプチドはすべて同一のものであり、これらのペプチドのアミノ酸個数を重複しないように計算すると、インタクトな AEF-3 のアミノ酸組成値と比較的よく一致しており、AcPI で分解されたペプチドは取り逃がすことなくすべて回収されていることを示している。Ac-2-R-1, 2, 3, Ac-10, 11, 12 にはそれぞれ糖鎖が結合しており、そのために溶出時間が異なっていることも考えられる。また、Ac-10, 11, 12 は、その C 末端が H-Ser であり、その H-Ser ラクトンへの変化も関係しているものと考えられる。Ac-13, 14, 15 は、36 残基の長いペプチドではあるが、Pro を 5 個、Trp を 3 個と比較的多く含んでおり、3 節-2 で述べた同じ理由によりその溶出時間が異なっているものと推定される。

図 1-15 のそれぞれのペプチドの C 末端は

Lys が AE Cys であり、AcP I は AE Cys も Lys と同様に認識して切断することがわかった。また、その切断の優劣の差は HPLC で分解ペプチドの生成量をみる限りでは、同程度であった。ただし、Ac-6 のペプチドは、6 番目の AE Cys で切断されなかったもので、これは 8 番目に存在する Asn-CHO の立体障害によるものと考えられる。

Asn-CHO の部分は気相式シーケンサーでは何も検出されないが、ペプチド全体のアミノ酸組成から考慮して決定おぼができた。さらに Ac-2-R-1, Ac-10 のペプチドのように N 末端から比較的近いところに存在する Asn-CHO は手動エドマン法によって得られた PTH-Asn-CHO を 2M HCl で 110°C 5 時間水解し、アミノ酸分析機にかけることにより、グルコサミンを確認し同定した。また、Ac-13, 14, 15 のペプチドは、3 アミノルを気相式シーケンサーにかけることにより C 末端までアミノ酸配列を決定することができた。

4-4, 接続ペプチド(キモトリプシンペプチド)の単離と一次構造決定.

AEF3 フラグメントからの ACP I 分解ペプチドの相互配列を決定するために, AEF3 フラグメント 100+1モルをキモトリプシンで 8時間分解した。得られたペプチドの分離精製クロマトグラフィーの様子を図 1-16 に示した。

図 1-16

Ch-10, Ch-15 のペプチドは, その N 末端分析から 2 種類のペプチドの混合物であることが判明したので, 0.1M  $\text{HCOONH}_4$  -  $\text{CH}_3\text{CN}$  (pH 6.4) 系の溶媒で再クロマトグラフィーを行なった(図 1-17, 図 1-18)。

図 1-17, 18

それぞれのペプチドのアミノ酸組成値, 収率を表 1-6 に示した。

表 1-6

AEF3 フラグメントは, Leu, Phe, Trp 等疎水性アミノ酸を比較的多く含んでいるためキモトリプシンで分解したペプチドは, たとえば, Ch-18 と

Ch-10-R-1, Ch-12 と Ch-15-R-1, Ch-9 と Ch-13 のようにかなり分散して切断されていることが判明した。それぞれのペプチドのアミノ酸配列を 図 1-19 に示した。

### 図 1-19

Ch-2, Ch-4, Ch-11 のアミノ酸配列は、Ch-7 のアミノ酸配列と、キモトリプシンの切断アミノ酸の特異性から判断して決めた。Ch-7 のペプチド (Leu-Ser-Tyr-HSer) の Leu, または、Tyr の C 末端側での切断によって、それぞれ生じたものが、Ch-1 (HSer), Ch-2 (Ser-Tyr-HSer), Ch-4 (Ser-Tyr), Ch-11 (Leu-Ser-Tyr) に相当する。

また Ch-10-R-2 の N 末端から 4 番目の Asn-CHO は、手動エドマン分解で、PTH-Asn-CHO を得て、4 節-3 で述べた方法と同様にしてグルコサミンを検出し、同定した。表 1-6 でペプチドのアミノ酸総計が、AEF-3 のそれより 7 残基少ないのは、<sup>10</sup>Pro-<sup>11</sup>Phe, <sup>25</sup>Ser-<sup>Asn</sup>-<sup>Ile</sup>-<sup>Thr</sup>-<sup>Ala</sup>-<sup>Ile</sup>-<sup>Leu</sup> のペプチドを取り逃がしたためであった (図 1-20

参照)。

#### 4-5, AEF-3 フラグメントの一次構造

AEF-3 フラグメントの AcPI 分解ペプチド (図 1-15) およびキモトリプシン分解ペプチド (図 1-19) のアミノ酸配列をもとにして決定した RNase T<sub>2</sub> の N 末端半分 (AEF-3 フラグメント) の一次構造を図 1-20 に示した。

図 1-20

N 末端 Glu から始まり <sup>13</sup>H-Ser まで 93 個のアミノ酸から成っている。このフラグメントには、糖が 2ヶ所結合している (15番目と 76番目の Asn)。Lys は 7番目と 70番目にあり、AcPI で Cys をカルボキシメチル化した CMF-3 フラグメントを分解しても 8番目から 69番目の大きなペプチドは依然消化されずに残ることが理解できる。またアミノ酸分析からでは Glu は 10個存在するが、そのうち 6個は Gln であり、残りの 4個の Glu のうち、1番目の Glu を除き、その他はすべて C 末端付近に偏在しているため (Glu-73, 83, 88) V-8 プロテアーゼ分解

による小ペプチドへの断片化は困難であったことも理解される。

また気相式シーケンサーで一次構造を決定するとき、C末端が、Lys, AECysの場合、かなり長いペプチドでも最後まで決定できた。

これは、手動エドマン法の場合のように Lys の  $\epsilon$ -アミノ基にも PITC が反応して、ペプチドが洗い流され C末端アミノ酸までの同定が困難である傾向とは対照的である。気相法では C末端 Lys の  $\epsilon$ -アミノ基のフェニルチオカルバミル化のため、試料ペプチドがガラスフィルター上のポリブレン層に保持されやすくなっているものと考えられる。

このように、F-3 フラグメントを小断片化する上でも、また気相式シーケンサーで構造を決定する上でも、Cys をアミノエチル化して AcPI 分解したことは、その一次構造を決定するために大変有効であった。おそらく、この手法は他のタンパク質の断片化や一次構造決定のために有用であろう。

キモトリプシン分解ペプチドで <sup>15</sup>Ser から  
 81 Leu までのペプチドを取り逃しているのは、  
 おそらく <sup>76</sup>Asn に糖鎖が結合しているために、  
 かなり親水性なペプチドとなり逆相 HPLC  
 で、素通り分画と溶出され、取りそこねたも  
 のと考えられる。

糖鎖が結合している Asn は 2ヶ所とも、<sup>15</sup>Asn-  
 Ser-Thr, <sup>76</sup>Asn-<sub>CHO</sub>Ile-Thr 構造をしており、糖タ  
 ンパク質に共通の構造である <sup>Asn-X-Thr(Ser)</sup><sub>CHO</sub> に  
 合致している。

## オ5節 RNase T<sub>2</sub>の全一次構造のまとめ

オ3節, 4節で決定した2つのフラグメントで、そのN末端分析からF-3フラグメントがRNase T<sub>2</sub>のN端半分、F-2フラグメントがC端半分に相当する。従ってRNase T<sub>2</sub>の全一次構造は図1-21に示すようになる。

図1-21.

N末端Gluから始まりAsn-CHOのC末端で終わる239残基のアミノ酸から成り、N末端から15番目, 76番目, 239番目のAsn, 3ヶ所に糖鎖が結合した一本のグリコペプチドである。唯一つ存在するMetはN末端から93番目に存在し、Hisは53, 110, 115, 182番目に位置し、合計4残基であった。一次構造に基づいて計算したアミノ酸は、Lysに関しては糖タンパク質のためやや少なめな値が出ているが(3-2参照)、その値のアミノ酸は、RNase T<sub>2</sub>のアミノ酸分析値とよく一致しており、ブロムシアン分解後、S-Sを還元カルボキシメチル化して得られたCMF-2フラグメントとCMF-3

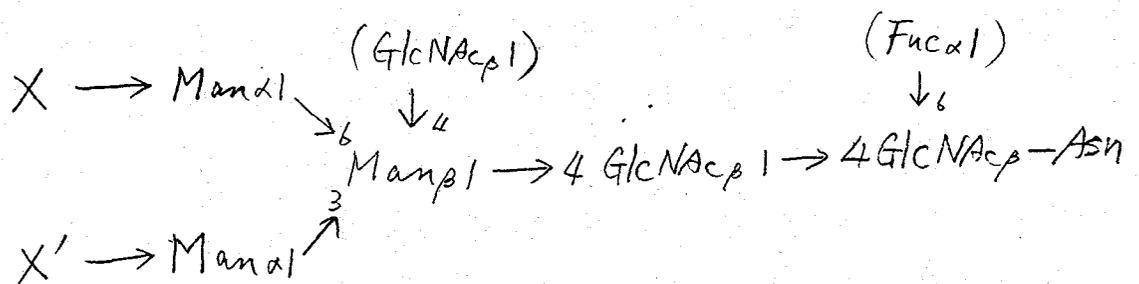
フラグメント以外に他の小さなペプチドの存在はない(表1-1参照)。

糖鎖を除いたポリペプチドのみの分子量は27,500, 糖鎖の分子量は合計約2,600である(オ6節参照)。従って RNase T<sub>2</sub> の分子量は30,100 (糖鎖, 8.3%) であり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 ( $M_w$  31,400), 超遠心法 ( $M_w$  30,800) から求めた分子量とよく一致する。

## オ6節, RNase T<sub>2</sub> の糖鎖の組成分析.

### 6-1, 序.

RNase T<sub>2</sub> は糖鎖を3ヶ所に持っていることが、一次構造解析の結果判明した。それらの位置は、Asn 15, Asn 76, Asn 239 で、すべて Asn に結合している。Asn に結合している糖鎖構造は、高マンノース型、複合型、混合型に分類され<sup>(20)</sup> その基本構造を示すと次のようになる。



高マンノース ;  $X, X' : (\text{Man})_n$

複合型 ;  $X, X' : (\text{NeuAc} \rightarrow \text{Gal} \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc})_n$

混合型 ;  $X : (\text{Man})_n$

$X' : \text{NeuAc} \rightarrow (\text{Gal})_n \rightarrow (\text{GlcNAc})_n$

高マンノース型は GlcNAc (2個) と Man (3個~) のみ、複合型は GlcNAc (2個), Man (3個~), Fuc, Gal, シアル酸, 混合型では GlcNAc (3個), Man (3個~), Gal, シアル酸を含んでいる。

それぞれの Asn に結合する糖の組成分析を行なえば、おおよそのタイプを推定できる。おなめち、GlcNAc と Man だけならば、高マンノース型、さらに Fuc, Gal, シアル酸が検出されれば、複合型、GlcNAc, Man, Gal, シアル酸ならば、混合型であることが予想される。

糖タンパク質の分子量を、ゲル浮遊などの分子ふるいを用いて求めるのは、一般に誤差をまぬきやまい<sup>(2)</sup>。従って RNase T<sub>2</sub> の糖組成を決めることは、糖鎖構造を推定したり、この糖タンパク質の正確な分子量を決定するため重要である。本節では RNase T<sub>2</sub> の Asn 15, Asn 76, Asn 239 の各残基に結合する糖組成の分析について述べる。

## 6-2; 実験方法

3節-1 で調製した CMF-3 フラグメントには、2ヶ所に糖鎖が結合しているのでそれぞれの糖鎖について分析を行なうために CMF-3 100 ナノモルを AcPI で分解し、図 1-10 に示したように分離精製した。CMF-2 フラグメントに

は、1ヶ所にしか糖鎖が結合してゐるので  
そのまま以下の分析に用いた。

各糖ペプチド および RNase T<sub>2</sub> 5~10 ナノモル  
相当に内部標準物質としてイノシトール(5ナ  
ノモル)を加え乾燥させた。これに 1.5M HCl/  
メタノール溶液, 250  $\mu$ l を加え封管後 90°C で 2 時間  
メタノリシスを行なった。反応後、反応溶液  
を小試験管に MeOH で移しかえ、窒素ガスで  
乾燥させ、これに 2-ME/セリジン(核酸合成用;  
井井化学)(1%) 溶液 200  $\mu$ l, 無水酢酸 10  
 $\mu$ l を加え室温で 10 分間アセチル化を行なっ  
た。反応溶液を窒素ガスでとばした後、新し  
く調製したトリメチルシリル化試薬(セリジン:1,  
1,1,3,3,3-ヘキサメチルジシラン:トリメチルクロロシラン  
= 5:2:2%) 50  $\mu$ l を加え 50°C 水浴中 10 分  
間反応させた。この反応後 反応溶液はデシケ-  
ター中でなるべく乾固させ(5分以内)、これに  
n-ヘプタンを少量加え、ガスクロマトグラフィー  
分析を行なった。

ガスクロマトグラフィーの装置は、島津 GC-9A (記録計:C-

R2AX), 分析カラムは、2% シリコン OV-17 ( $4_3$  mm  $\times$  2.1 m) を用い、分析は、110°C から 250°C まで 40 分の昇温によって行なった。

糖ペプチドのアミノ酸, グルコサミン (GlcN) の定量は 4M-MTS (Pierce) 50  $\mu$ l で 110°C 24 時間水解し、NaOH-緩衝液 250  $\mu$ l を加えて中和し、そのまゝアミノ酸分析機で行なった。

### 6-3: 結果, 考察

図 1-10, 表 1-4, 図 1-20 から明らかのように、 $^{15}\text{Asn-CHO}$  は、CMF-3-Ac-3 に、 $^{76}\text{Asn-CHO}$  は CMF-3-Ac-2 に含まれていることがそのアミノ酸分析, アミノ酸配列から明らかになっている。 $^{23}\text{Asn-CHO}$  は、CMF-2, または AEF-2 に含まれている。

GlcN とそのペプチドの定量は、アミノ酸分析機で、Man は、アミノ酸分析に供した 2 倍量をガスクロマトグラフ分析で行なうことにより、それらの比をお求めた。表 1-7 に各々のペプチドのペプチド 1 モルあたりに結合している GlcN と Man の比を示した。

表 1-7

グルコサミンンがすべて  $N$ -アセチルグルコサミンンであると仮定すると、CMF-3-Ac-2 ( $^{16}\text{Asn-CHO}$ ), CMF-3-Ac-3 ( $^{15}\text{Asn-CHO}$ ) は、 $N$ -アセチルグルコサミンン (GlcNAc) と Man のみを含み、それぞれのペプチド 1 モルあたり、GlcNAc; 2 モル, Man; 3~4 モルであることから  $^{16}\text{Asn-CHO}$ ,  $^{15}\text{Asn-CHO}$  は、高マンノース型であることが推定される。同じタカジスターゼ由来のタカミラーゼ A の  $^{197}\text{Asn}$  に結合している糖鎖も GlcNAc 2 モル, Man 5~6 モルを含む高マンノース型である<sup>(22)</sup>。ただし Man が、1~2 モル少ないことは、マンノシダーゼによる切断、あるいは、ペプチド精製中における化学的な脱離 (例えば、0.1% TFA) によるものと、考えられる。1982年 Yamamoto<sup>(31)</sup> は RNase T<sub>2</sub> と同じ *Aspergillus oryzae* から、1;2- $\alpha$ -マンノシダーゼの精製を行なった。従って RNase T<sub>2</sub> の 15 位、16 位の高マンノース型の非還元末端の Man がこれらのタイプの酵素によって切断されたと考えられることは十分に可能である。

CMF-2 フラグメント中に含まれる C 末端  $^{239}\text{Asn}$  に結合している糖は、ペプチド 1 モルに対して GlcN が 1 モル、Man は痕跡 (0.1) しか定量されなかった。このフラグメントは、CMF-3 フラグメントと同一操作を経て分離精製されたものであるため、その精製中に CMF-2 フラグメントの  $^{239}\text{Asn-CHO}$  だけから Man や GlcNAc が脱離するとは考えにくい。RNase T<sub>2</sub> 自体の分析値からでも GlcN は 48 個、Man は 7.5 個であるから、 $^{239}\text{Asn-CHO}$  は、GlcNAc は 1 個しか存在していないものと考えられる。また Man のないことが、CMF-2 の ConA Sepharose への親和性がないことにも一致する。

$^{239}\text{Asn}$  は RNase T<sub>2</sub> の C 末端残基であり、ポリペプチド鎖内に存在する  $^{15}\text{Asn-CHO}$ ,  $^{16}\text{Asn-CHO}$  に比べてグリコシダーゼの作用を受けやすいものと考えられる。しかしながら、糖鎖がグリコシダーゼによって短くなったからこそ、プロテアーゼや、Cpase などの攻撃を受けて  $^{239}\text{Asn}$  が C 末端になったとも考えられる。

1981年、A. Klemm<sup>(23)</sup> は、同じ *Aspergillus oryzae* から単離精製した RNase T<sub>2</sub> の糖組成分析の結果、Man : Glc : Fuc : GlcN : Gal : Xyl が 14 : 8 : 6 : 6 : 4 : 1 であると報告しているが、今回の実験結果とは大きく異なっている。

オウ節. RNase T<sub>2</sub> の S-S 結合部位の部分決定.

### 7-1. 序.

RNase T<sub>2</sub> の一次構造が決定された結果、10個のシステイン残基の位置が判明した (Cys-5, 13, 23, 24, 60, 68, 118, 126, 191, 255)。半シスチン残基の位置をみると、ブロムシオン分解しても2つのフラグメントに分離できなかったことから、両フラグメント間に、S-S結合が存在していることも容易に推定できる。また23, 24番目にはCysが連続して存在しており、これらの2つのCysが関与するS-S結合の位置の決定には、相当の困難が予想される。とはいえ、他の半シスチン残基間のS-S結合対について検討した。その結果、RNase T<sub>2</sub> に存在する5組のジスルフィド結合のうち、2組を決定することができたのでその結果を述べる。

### 7-2 実験方法

RNase T<sub>2</sub>, 30 ナノモルを 0.1 M AcOH (pH 4.0),

200  $\mu$ l に溶かし、ペプシンを基質に対して 100 モル比相当量、加え、37°C で 1 晩分解した後、さらにもう 100 モル比相当量のペプシンを加え、また 10 時間分解を行なった。分解ペプチドは ODS-120A 逆相カラムを用い、0.1% TFA-CH<sub>3</sub>CN 系を用いた HPLC で分離精製を行なった。得られたペプチドはすべて過キ酸酸化<sup>(24)</sup>を行ない、システイン酸を含むペプチドを捜索し、そのアミノ酸配列は負相式シーケンサーにて行なった。

### 7-3、結果、考察、

未変性の RNase T<sub>2</sub> は、中性プロテアーゼ（トリプシン、AcPI, V-8 プロテアーゼ）では、ほとんど分解されない（酵素、100 モル比、37°C, 8 時間）。酸性プロテアーゼのペプシンでも、例外ではなく、長時間分解したにもかかわらず依然未分解物が残った。その HPLC 分離パターンを図 1-22 に示した。

図 1-22

溶出時間 32 分付近にみられる大きなピーク

が、未分解物である。各ピークに分別されたペプチドのアミノ酸分析により、シスチン残基を含むペプチドは、Pep-1 と Pep-2 の 2 つのピークに存在することが判明した。それぞれのペプチドのアミノ酸組成値、収率、およびアミノ酸配列の結果を図 1-23 に示した。

図 1-23

一次構造から照らし合わせた結果、Pep-1 のペプチドは、191 番目の Cys と 225 番目の Cys が、Pep-2 のペプチドは、68 番目の Cys と、118 番目の Cys が S-S 結合していることが明らかに became。

またそれ以外のシスチン残基を含むペプチドは見つからず、ペプシン分解では、ネイティブの RNase T<sub>2</sub> から切り出されなかったものと考えられる。

### 第三章 考察

図 1-21 に示した一次構造を持つ RNase T<sub>2</sub> は、糖鎖を含んだ分子量 30,100 であり他の分子量の小さい (~1万) リボヌクレアーゼ類 (RNase T<sub>1</sub>, A, St<sup>(25)</sup>, Bi<sup>(26)</sup>, Ba<sup>(27)</sup>) と比較して、その分子量の違いにおいて特徴的である (表 1-8)。

表 1-8

また RNase T<sub>2</sub> は、同一菌体がつくる RNase T<sub>1</sub> と一次構造のホモロジーはなく、またやはり塩基特異性のブロードな、同じ *Aspergillus* 属に属する RNase Ms<sup>(28)</sup> とも他の RNase 類 (RNase A, St, Bi, Ba) と同様ホモロジーは低いものであった。このことは、RNase T<sub>2</sub> は他の菌由来の RNase 類と同じ遺伝子から進化したり、また RNase T<sub>1</sub> の遺伝子重複によって発生したものではないことを示唆する。

また 3万1千の分子量をもつウシ膵臓デオキシリボヌクレアーゼ A との一次構造上でのホモロジーも見あたらなかった。

このように RNase T<sub>2</sub> は同じヌクレアーゼという機能を持つにもかかわらず、その一次構造上での他のヌクレアーゼ類とのホモロジーが低いということは、大変興味深いものである。

一次構造上で特に目につくことでは、101残基から115残基間に、酸性アミノ酸と Trp, Phe, His など芳香族残基が集中していることがあげられる。<sup>101</sup>Glu Gly Asp Asp<sup>105</sup>Glu Glu Phe Trp Glu<sup>110</sup>His. Glu Trp Asn Lys<sup>115</sup>His と、特徴的なアミノ酸配列をしており、115番目の His が活性部位残基であることが推定されている（オII部参照）。

RNase T<sub>2</sub> の一次構造をもとに Chou-Fasman<sup>(29)</sup> の方法から予想される二次構造と、親水性、疎水性領域の分布、ハイドロパシー<sup>(30)</sup> を図1-24に示した。

図 1-24.

中央の点線は、7残基ごとに計算したハイドロパシーの平均値を示しており、これを基準に

左側がより親水性、右側がより疎水性である。

親水性領域が分子表面に、疎水性領域が分子内部に存在する傾向があるとすると、RNase T<sub>2</sub>では、40番目の Thr あたりから 115番目の His あたりの残基までが、より親水性であり、分子表面上に位置しやすいものと予想される。特に 95番目の Lys から、115番目の His 付近までは、その傾向が強い。これはこの位置に先に述べた酸性アミノ酸のクラスターがあるためと思われる。

15番目、76番目の Asn に結合している糖鎖については、ハイドロパシーの計算には考慮していないので、実際にはこの付近はもっと親水性になっているものと考えられる。

110番目と115番目の His は分子表面上に、53番目と182番目の His は分子内部にやや埋もれ気味であることが予想される。オII部で詳しく述べるが、これらの His のうち、115番目と53番目の2つが RNase T<sub>2</sub> の酵素活性に関与しているものと推定されている。

Chou-Fasman 法による二次構造の予測から  
では、RNase T<sub>2</sub> の構造中には 30 (Gly) ~ 40 (Thr)  
番目, 100 (Tyr) ~ 113 (Asn) 番目, 154 (Lys) ~ 181 (Ile)  
番目あたりに、 $\alpha$ -ヘリックスが、その前後に、  
 $\beta$ -シート、 $\beta$ -ターンが存在することが予想される。  
また S-S 結合は、126 番目までと、RNase T<sub>2</sub> の分子中  
の N 末端前半部に 4 組が集中し、 $\alpha$ -ヘリックスの前後  
に位置しているものと推定される。

15 番目, 76 番目の Asn に結合している糖鎖  
がこのような二次構造さらに三次構造に対し  
てどのような影響を与えているか、またその  
糖鎖の存在の意義については不明である。た  
だ、糖鎖による立体障害のため、RNase T<sub>2</sub> 自  
身の、プロテアーゼに対する抵抗性が、高  
くなっていく可能性は考えられるであろう。

このように RNase T<sub>2</sub> は一次構造上では他の  
RNase 類とは全体的にもホモロジーはないが、  
同じ機能を果たす意味でその活性部位の重要  
な残基には、ホモロジーがあるものと推定さ  
れるであろう。

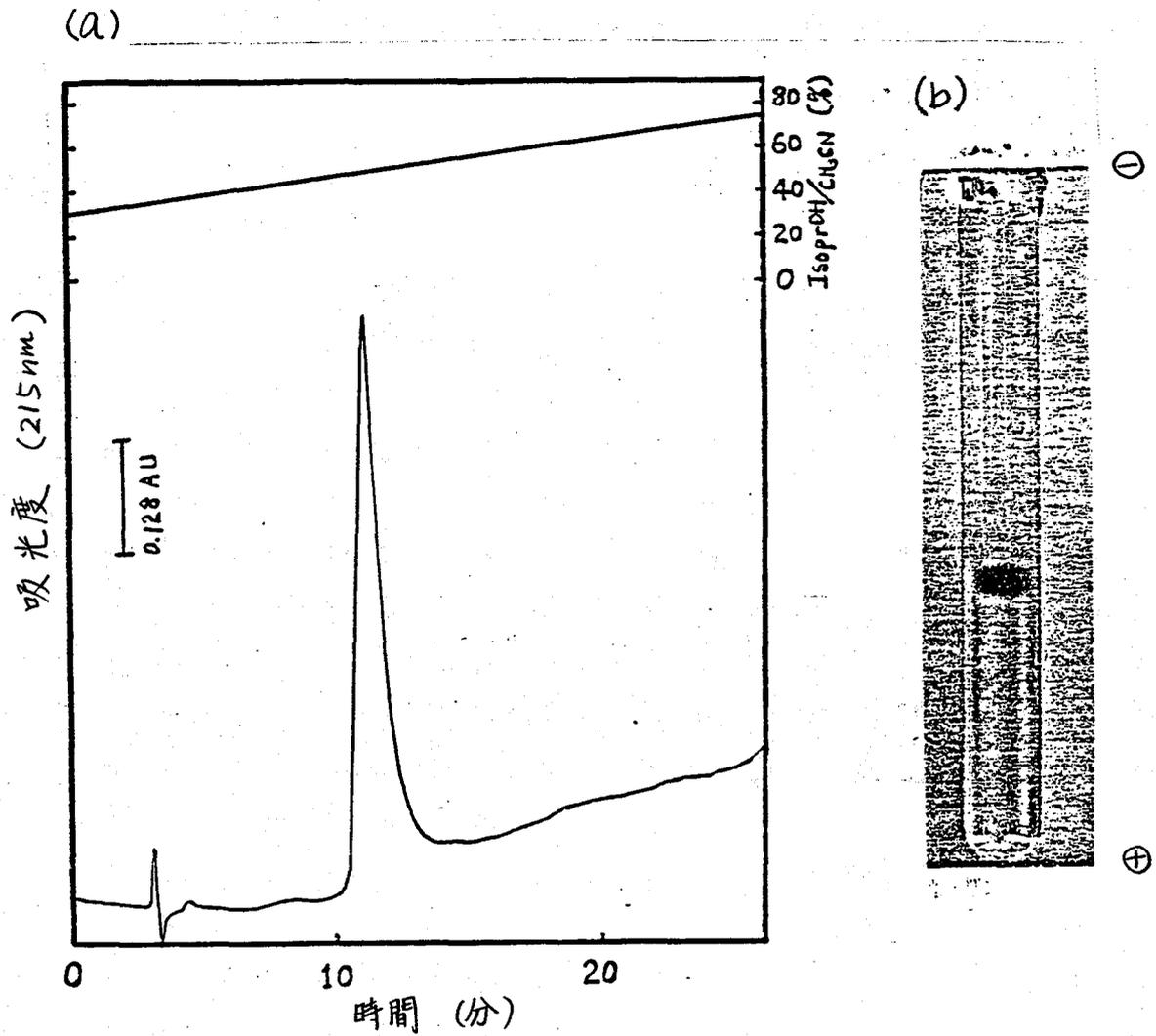


図 1-1. RNase T<sub>2</sub> の純度検定

(a) 逆相 HPLC (RP-P, 4×300 mm)

(b) 1% SDS 電気泳動 (7.5% T<sub>1</sub>L, pH 7.2)

試料: 50 μg.

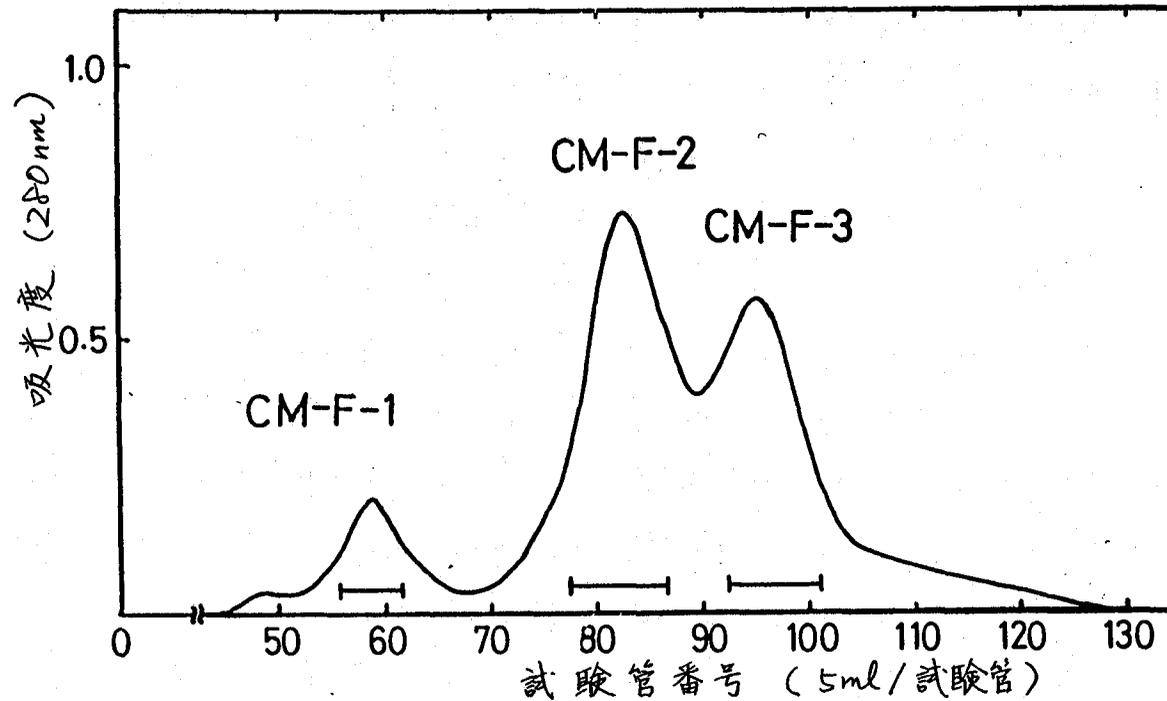


図1-2. RNase T<sub>2</sub> のフロムシアン分解後、還元 S-カルボキシメチル化した試料のゲルクロマトグラフィー

カラム : Sephadex G-100 (φ2.8×175 cm)

浴媒 : 0.2M NaCl を含む 0.1M NH<sub>4</sub>OH

流速 : 20ml / 時間

試料量 : 6M 尿素, 5% EDTA を含む 1M Tris-HCl (pH 8.6) 緩衝液  
7ml に試料 40mg を溶かし、チャージした。

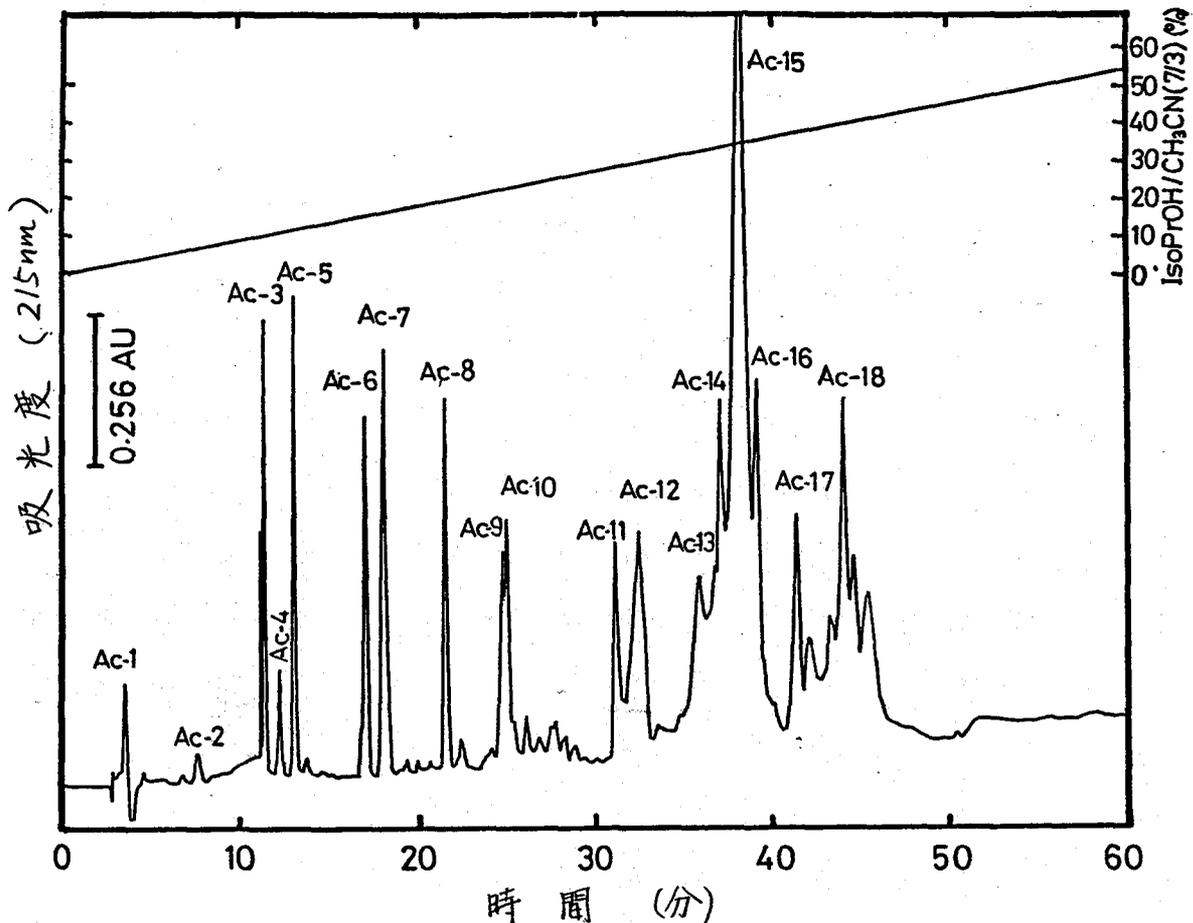


図1-3. CMF-2 フラグメントの *Achromobacter lyticus* プロテアーゼ I による分解物の HPLC 分離パターン

試料： $\Lambda$ 704ド100 $\mu$ モルを 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH9.0) 200 $\mu$ l に溶かし、 $\frac{1}{400}$ モル比 酵素で 37 $^{\circ}$ C, 8時間 分解した後、その  $\frac{1}{5}$ 量を コロトグラフ に供した。

カラム：ODS-120A (4 $\times$ 250mm)

流速：1ml/分

溶媒：0.1% TFA - IsoPrOH / CH<sub>3</sub>CN = 7/3 (%)系

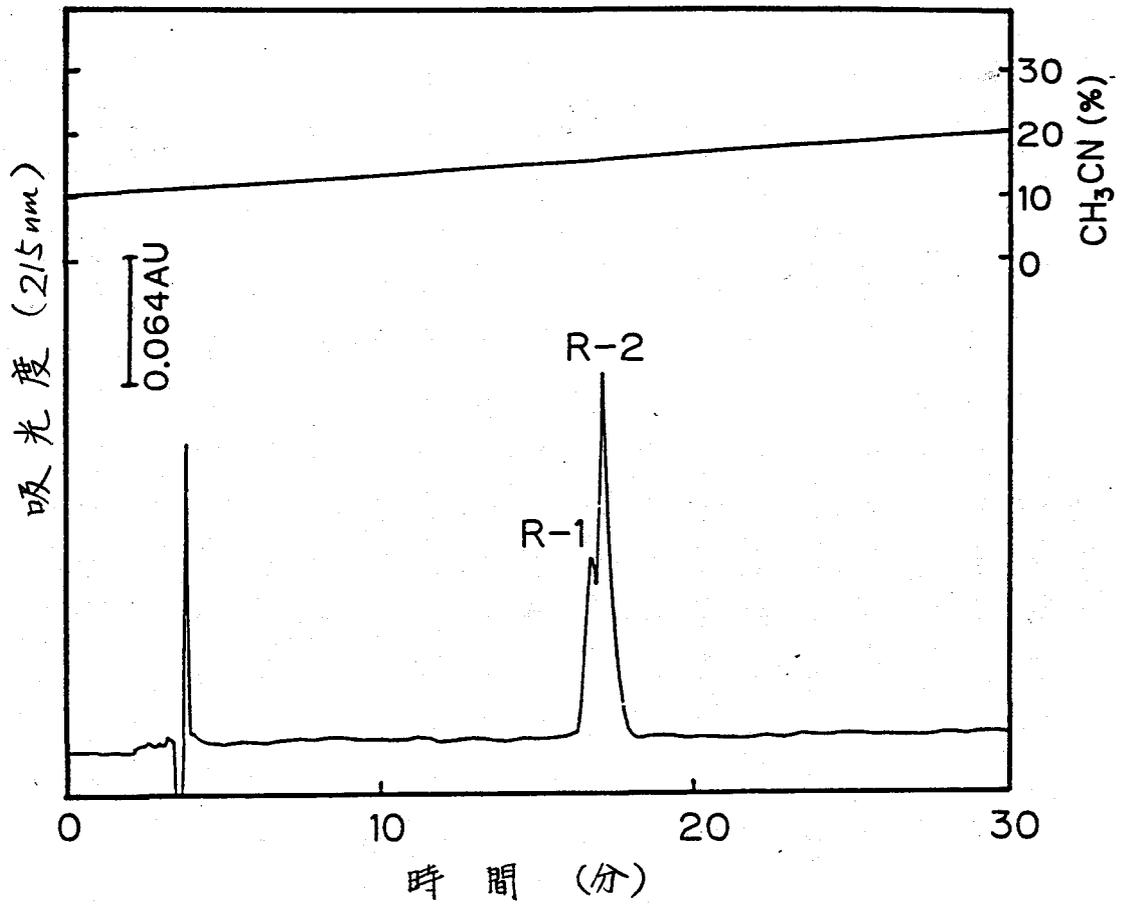


図1-4. CMF-2-Ac-7の再クロマトグラフィー

カラム : ODS-120A (4×250mm)  
流速 : 1ml/分  
溶媒 : 0.1% TFA - CH<sub>3</sub>CN系

- AC-1 : KK <sup>CHO</sup>
- AC-2 : K S E N
- AC-3 : I Y K
- AC-4 : A L A K
- AC-5 : D Y S P Q K
- AC-6 : Y L P K
- AC-7-R-1: G L D S Y K
- AC-7-R-2: A G I V P D S S K
- AC-8 : E V G D Y L Q K
- AC-9 : K P Y I S C E D G
- AC-10 : H G T C I N T I E P S C Y K
- AC-11 : I V D L F K
- AC-12 : G N A I I G E Y Q P I D T L T S P G C S T S G I K
- AC-13 : G N A I I G E Y Q P I D T L T S P G C S T S G I K
- AC-14 : R S E I E S A L A A I H D G K
- AC-15 : Y W P N Y E G D D E E F W E H E W N K
- AC-16 : I W Y F Y N I K
- AC-17 : K P Y I S C E D G A L N E I W Y F Y N I K
- AC-18 : K P Y I S C E D G A L N E I W Y F Y N I K

図1-5. CMF-2 フラグメントの *Achromobacter lyticus* プロテアーゼ I による分解ペプチドのアミノ酸配列

CHO : 糖鎖を表わす  
 ⇨⇨⇨ : 手動エドマン法にて決定  
 ————— : 気相式シーケンサーにて決定

C: CM-Cys, D: Asp, T: Thr, S: Ser, E: Glu, P: Pro  
 G: Gly, A: Ala, V: Val, I: Ile, L: Leu, Y: Tyr, F: Phe  
 K: Lys, H: His, W: Trp, R: Arg

手動エドマン法では5~20ナモル, 気相式シーケンサーでは1~2ナモルのサンプルを用いた

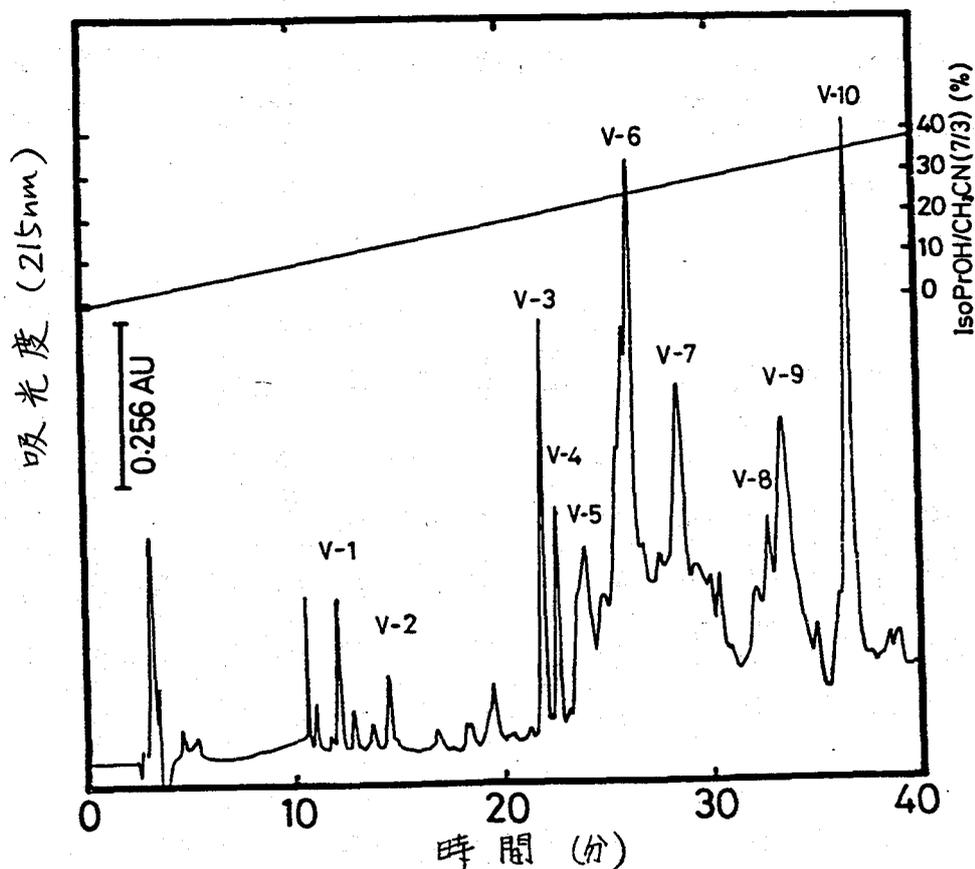


図1-6. CMF-2 フラグメントの V-8 プロテアーゼ分解物の HPLC 分離パターン

試料:  $\text{NH}_4\text{F}$  に 100  $\mu\text{M}$  の  $200\mu\text{l}$  の  $0.1\text{M}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  に溶かし V-8 プロテアーゼ (100  $\mu\text{M}$  比) で  $37^\circ\text{C}$ , 8 時間分解後, その  $5\mu\text{l}$  を  $70\mu\text{l}$  の  $\text{H}_2\text{O}$  に希釈した

カラム: ODS-120A (4  $\times$  250 mm)

流速: 1 ml / 分

溶媒: 0.1% TFA - IsoPrOH/CH<sub>3</sub>CN = 7/3 (v/v) 系

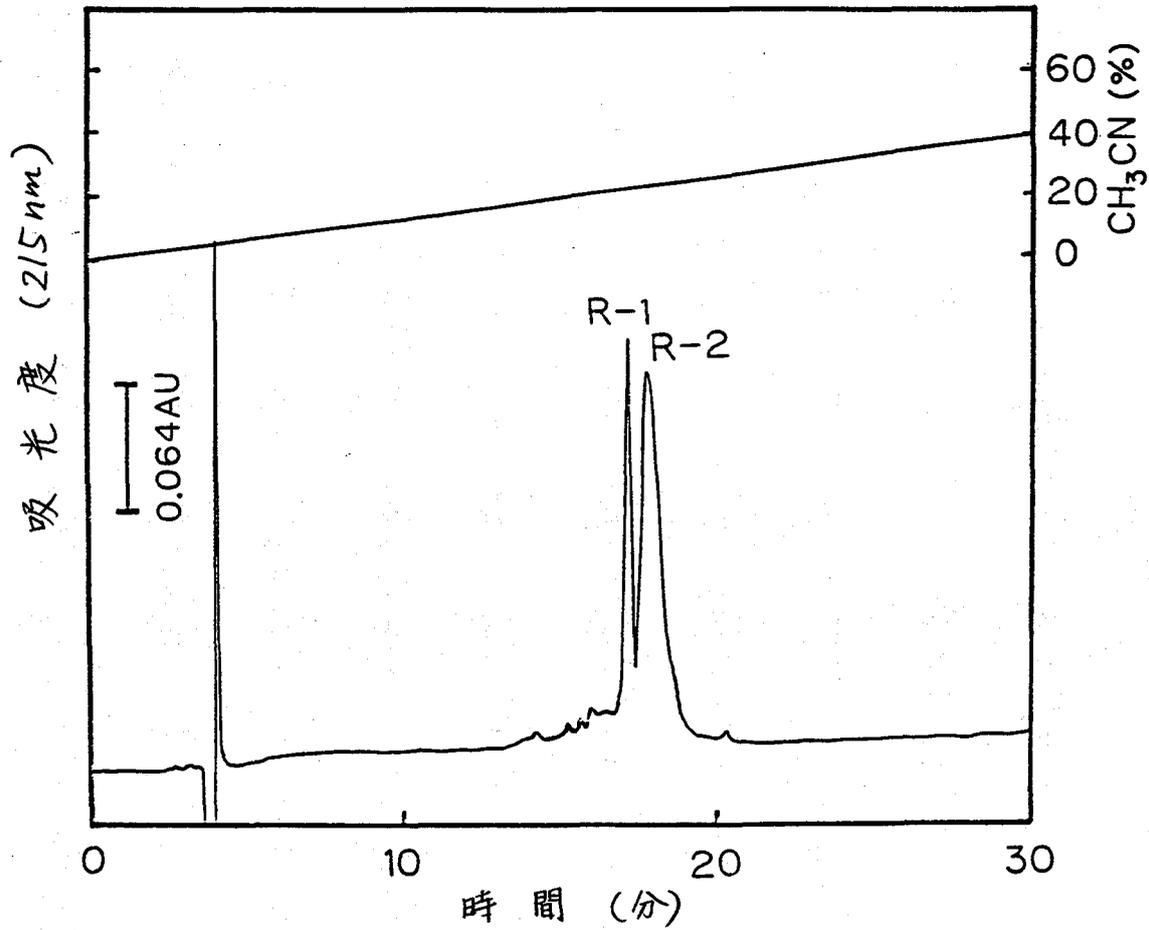


図1-7. CMF-2-V-6の再クロマトグラフ

カラム : ODS-120A (4×250mm)  
流速 : 1ml/分  
溶媒 : 0.1% TFA-CH<sub>3</sub>CN系

V-1	: <u>SSKTYKRSE</u>
V-2	: <u>DGA</u> <u>NE</u>
V-3	: <u>FE</u> <u>HE</u>
V-4	: <u>VG DY LQKTVD</u>
V-5	: <u>KKYWP NYEGDDEE</u>
V-6-R-1	: <u>SALAAIH DGKKPYISCE</u>
V-6-R-2	: <u>WNKHGTCINTIEPSCYKDYS PQKE</u>
V-7	: <u>YQP IDTLTSPGCSTSGIKYLPKKSEN</u> <sup>CHO</sup> <sub>N</sub>
V-8	: <u>LFKGLDSYKALAKAGIVPDSSKTYKRSE</u>
V-9	: <u>KKYWP NYEGDDEEFWE</u>
V-10	: <u>IWFYNIKGNAITGE</u>

図1-8. CMF-2 フラグメントの V-8 プロテアーゼ  
分解ペプチドのアミノ酸配列

CHO : 糖鎖を表わす  
 →→→ : 手動エドマン法にて決定  
 —→ : 気相式シーケンサーにて決定

手動エドマン法では 5~10 ナモル, 気相式シーケンサーでは  
 1~2 ナモルのサンプルを用いた。

-文字略号は 図 1-5 と同じである (図 1-5 参照)

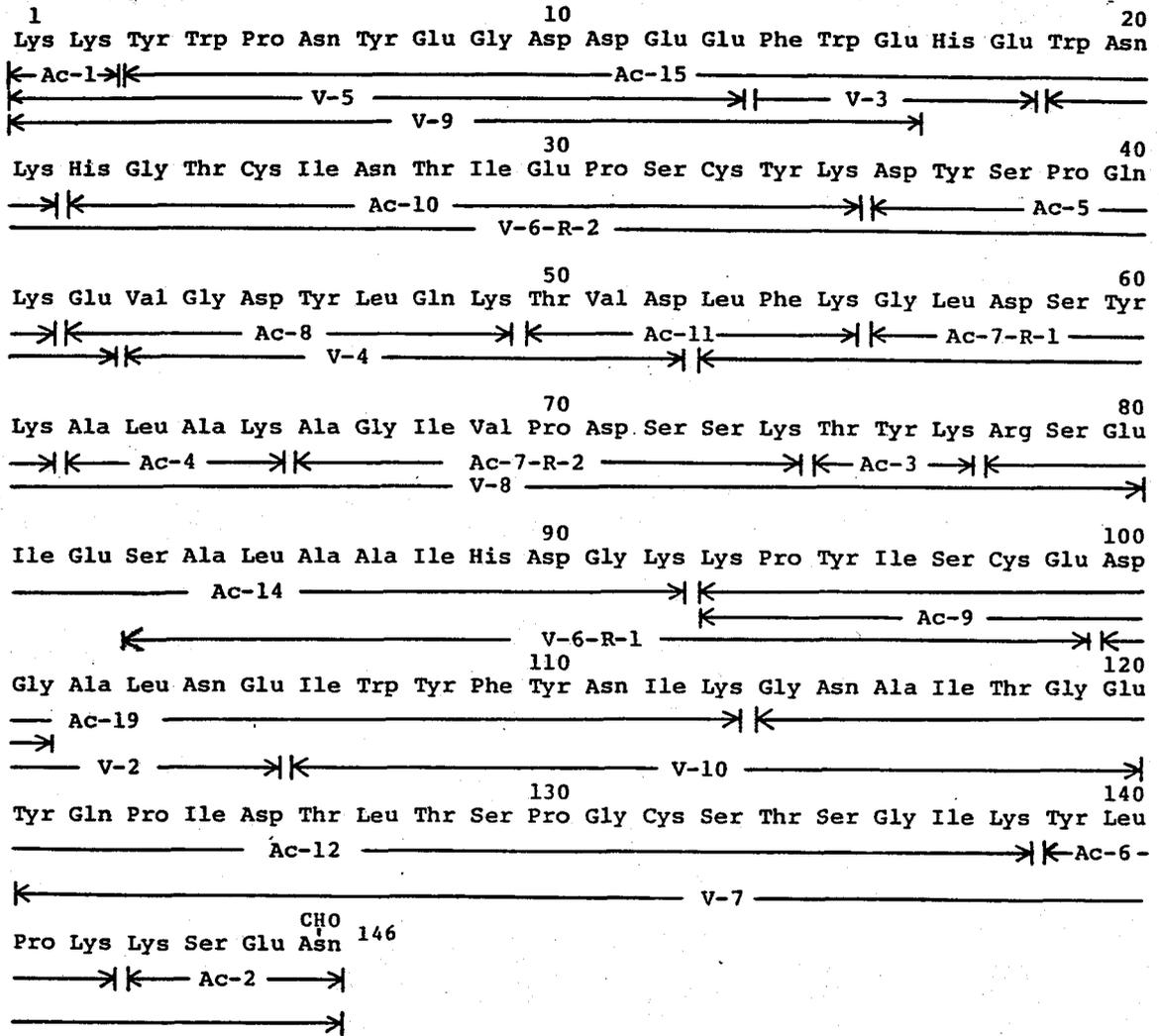


図1-9. CMF-27フラグメントの一次構造決定のまとめ

CHO: 糖鎖を表わす

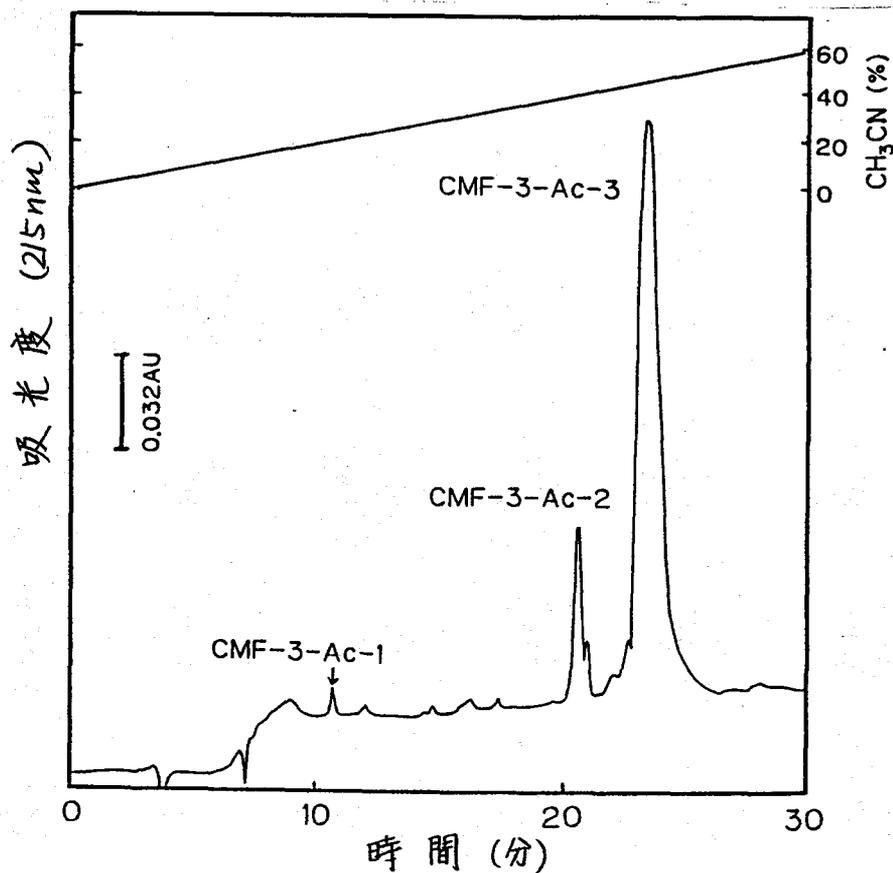


図 1-10. CMF-3 フラグメントの *Achromobacter lyticus* プロテアーゼ I による分解物の HPLC 分離パターン

試料: CMF-3 フラグメント 30  $\mu$ mol/L 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.6) 200  $\mu$ l に溶かし, 酵素を 400  $\mu$ mol/L 比に加え, 37 $^{\circ}$ C, 8 時間 分解した.

カラム: ODS-120A (4 $\times$ 250mm)

流速: 1ml / 分

溶媒: 0.1% TFA-CH<sub>3</sub>CN 系

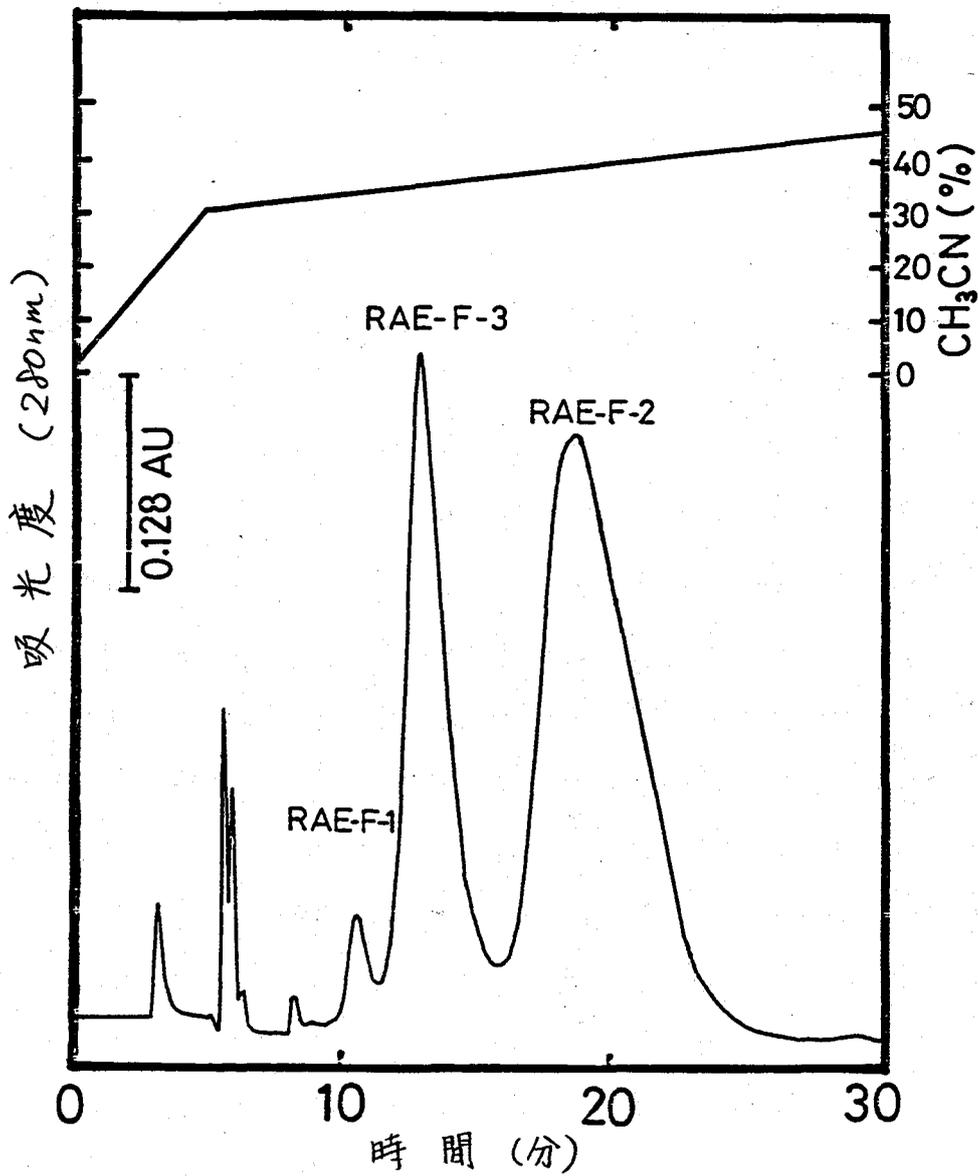


図1-11. RNase T<sub>2</sub>のブロムシアン分解後還元S-アミ  
イチル化した試料のHPLC分離パターン

カラム: ODS-Lichrospher (孔径 500 Å, 4x300mm)  
溶媒: 0.1% TFA-CH<sub>3</sub>CN系  
流速: 1ml/分

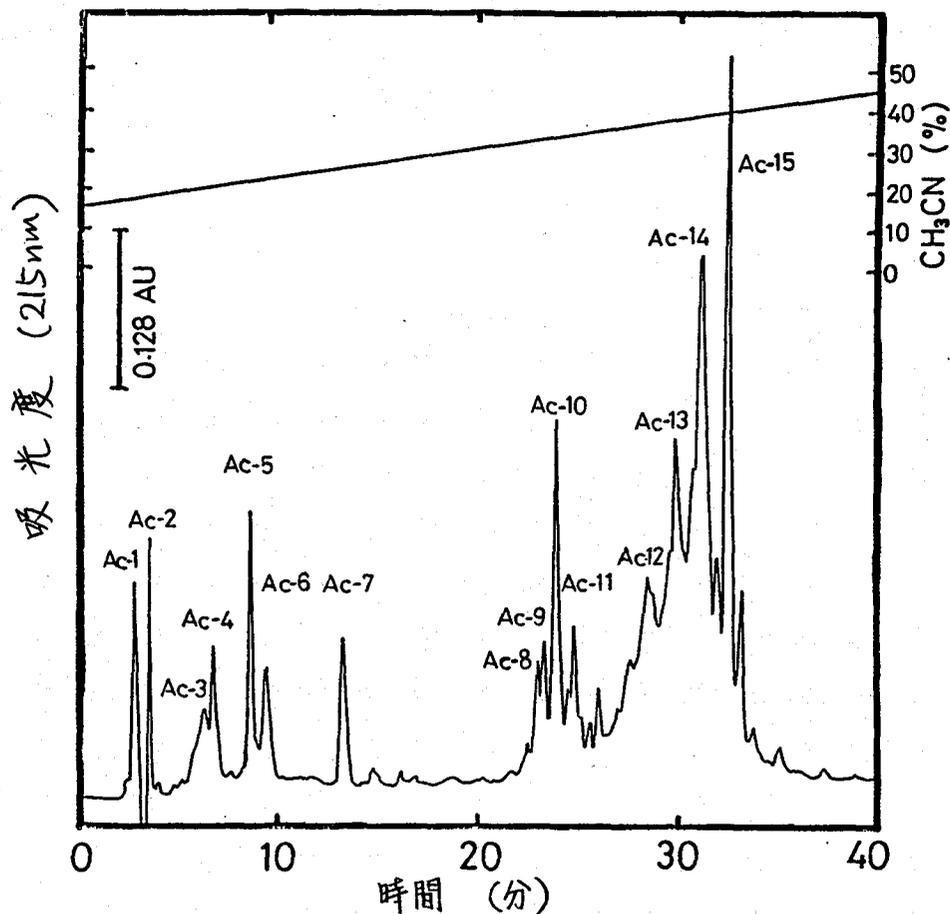


図 1-12. AEF-3 フラグメントの *Achromobacter lyticus* プロテアーゼ I による分解物の HPLC 分離パターン

試料 : ペプチド 100 ナノモルと 酵素 1/400 モル比において同様に  
分解した。

カラム : ODS-120A (4×250mm)

溶媒 : 0.1% TFA-CH<sub>3</sub>CN 系

流速 : 1ml / 分

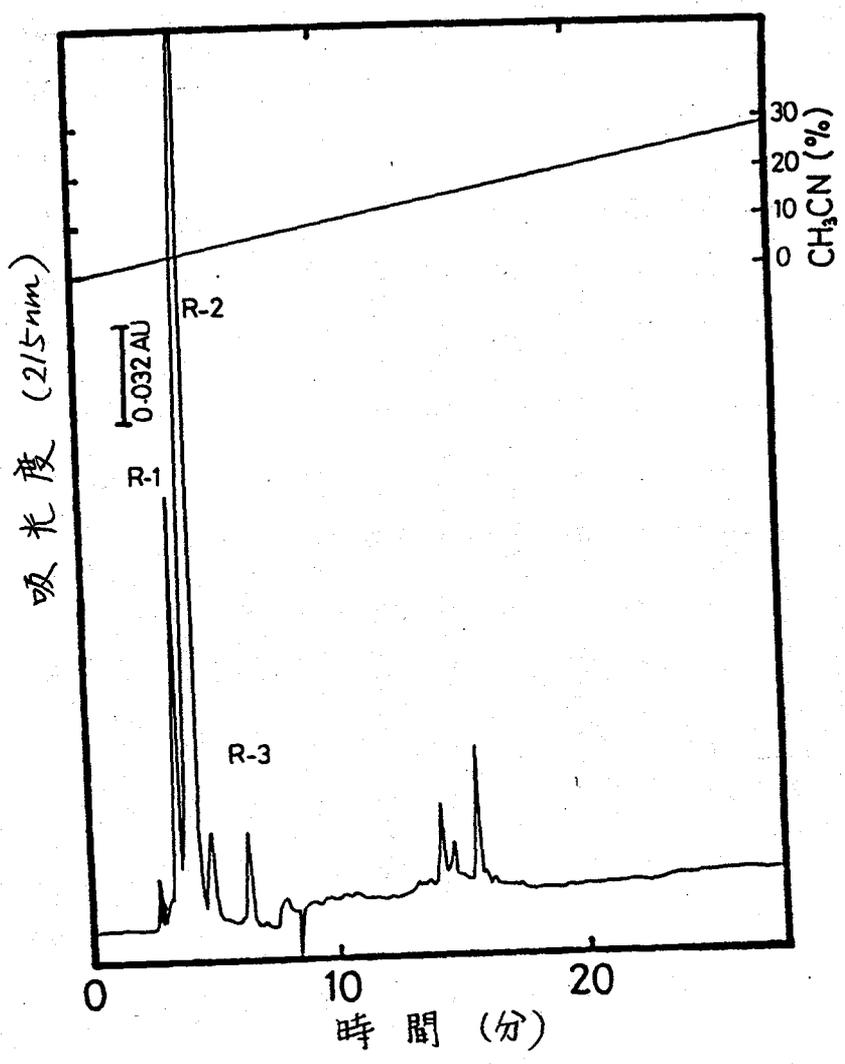


図 1-13. AEF-3-Ac-1 の再クロマトグラフィー

カラム: ODS-120A (4x250mm)  
溶媒: 0.1% TFA-CH<sub>3</sub>CN系  
流速: 1ml/分

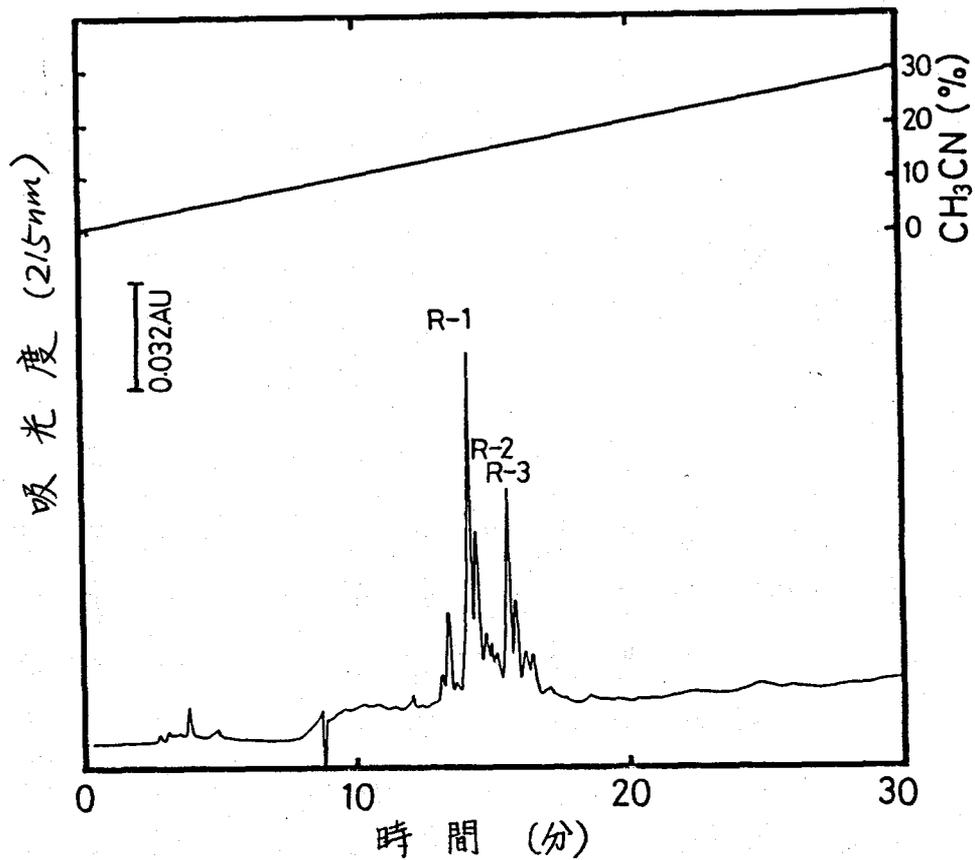


図1-14. AEF-3-Ac-2の再クロマトグラフィー

カラム: ODS-120A (4×250mm)  
溶媒: 0.1% TFA - CH<sub>3</sub>CN系  
流速: 1ml/分

AC-1-R-1 : C

AC-1-R-2 : D KAC-1-R-3 : P KAC-2-R- $\begin{matrix} 1 \\ 2 \\ 3 \end{matrix}$  :  $\begin{matrix} \text{CHO} \\ | \\ \text{Q} \end{matrix}$  N S T A V A D S CAC- $\begin{matrix} 3 \\ 4 \end{matrix}$  : E F P S CAC-5 : D G S Y G Q F CAC-6 : D I P F S C  $\begin{matrix} \text{CHO} \\ | \\ \text{Q} \end{matrix}$  N S T A V A D S CAC-7 : D I P F S CAC- $\begin{matrix} 8 \\ 9 \\ 10 \\ 11 \\ 12 \end{matrix}$  : S R E Y  $\begin{matrix} \text{CHO} \\ | \\ \text{N} \end{matrix}$  I T A I L Q E Q G R T E L L S Y H SerAC- $\begin{matrix} 13 \\ 14 \\ 15 \end{matrix}$  : F N S P G G A L L Q T Q F W D T N P P S G P S D S W T  
I H G L W P D N C

図 1-15. AEF-3フラグメントの *Achromobacter lyticus* プロテアーゼ I による分解ペプチドのアミノ酸配列

- CHO : 糖鎖を表わす  
 →→→ : 手動エドマン法にて決定  
 ————— : 気相式シーケンサーにて決定,  
 ---- : PTH-アミノ酸が検出されなかったことを示す

AC-13, 14, 15 のペプチドは 3カメルを用いて気相式シーケンサーにて C 末端まで同定できた。Asn-糖の部分は気相式シーケンサーでは同定できないが、手動エドマン法とアミノ酸分析を組み合わせで決定した。

C: AE-Cys を表わす。その他の 1 文字略号は 図 1-5 と同じ

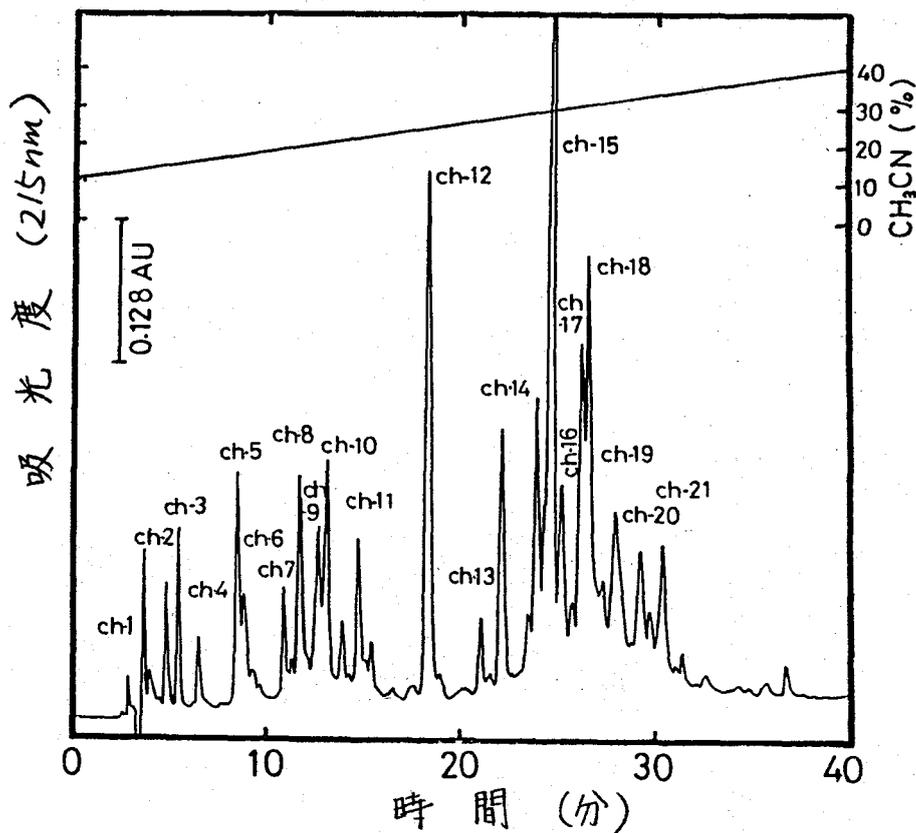


図1-16. AEF-3フラグメントのキモトリプシン分解物の  
HPLC分離パターン

試料 : ペプチド100ナモルを200 $\mu$ lの0.1M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH8.0)に  
溶かし、キモトリプシン 100ナモル比を加え、37 $^{\circ}$ C, 8時間  
分解, 凍結乾燥した試料の1/2量をクロマトグラスに供した

カラム : ODS-120A (4 $\times$ 250mm)

溶媒 : 0.1% TFA- $\text{CH}_3\text{CN}$ 系

流速 : 1ml / 分

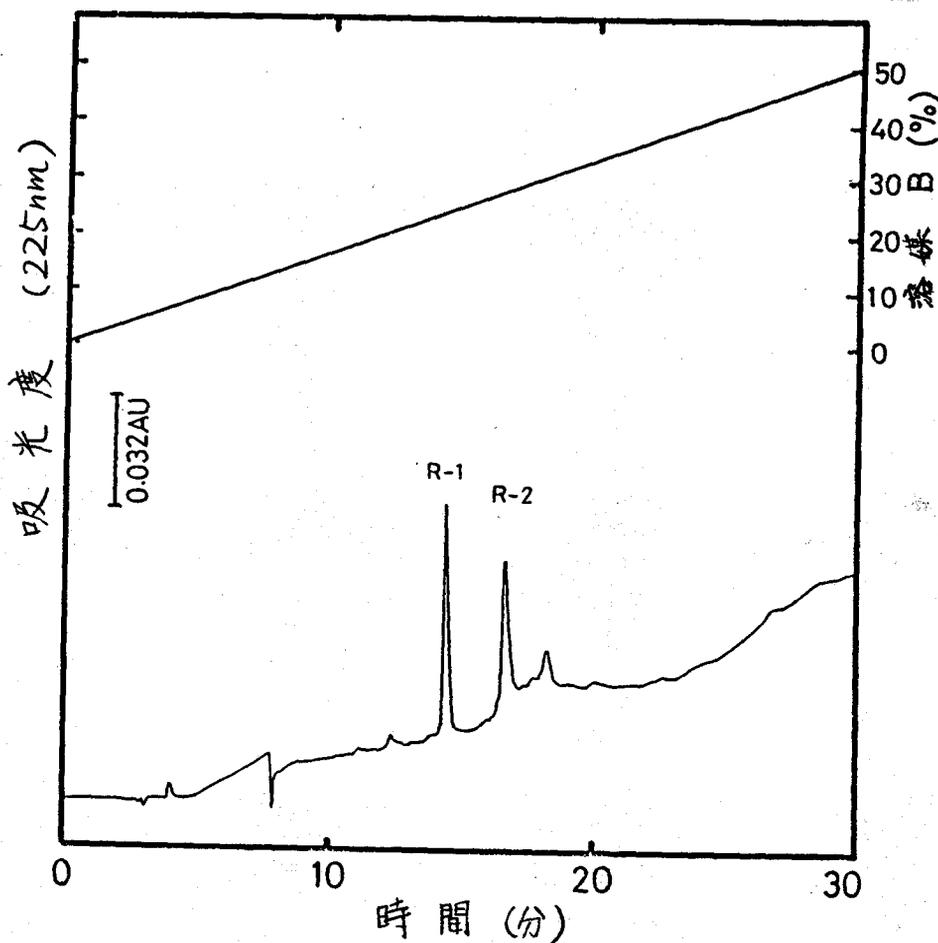


図 1-17 AEF-3-Ch-10 の再クロマトグラフィー

カラム: ODS-120A (4x250mm)  
溶媒A: 0.1M HCOONH<sub>4</sub> (pH6.4)  
溶媒B: 60% CH<sub>3</sub>CN を含む 0.1M HCOONH<sub>4</sub> (pH6.4)  
流速: 1ml / 分

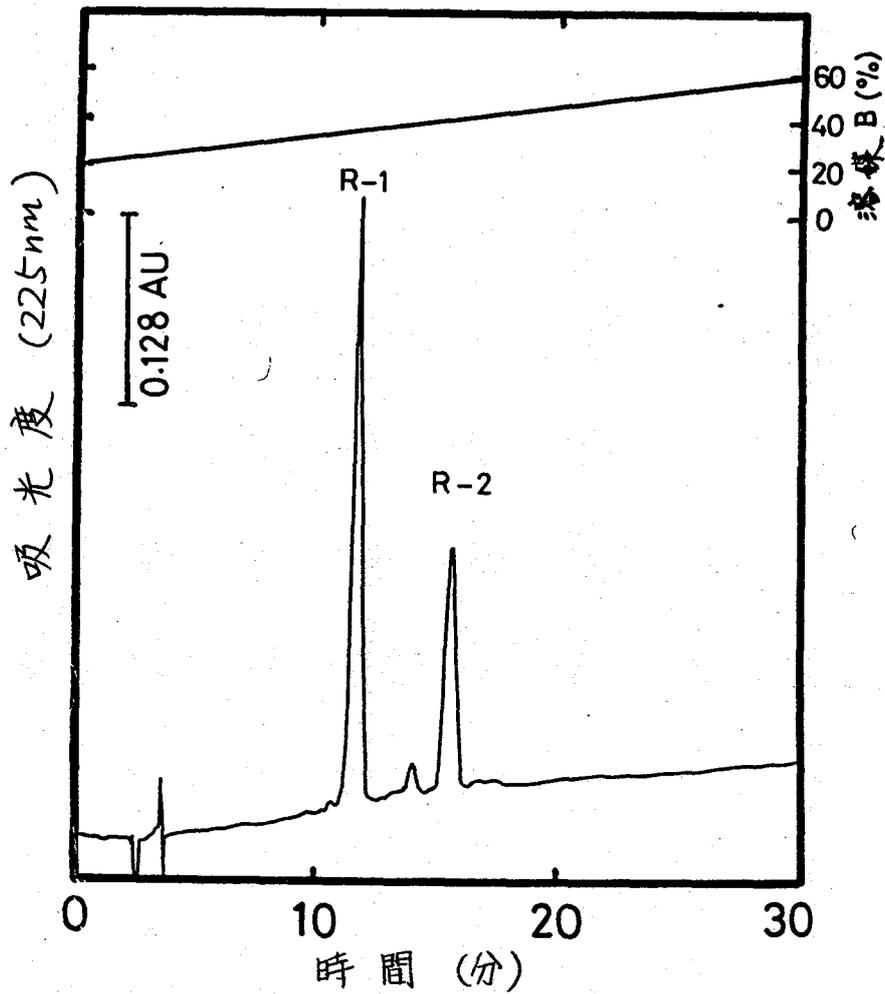


図1-18 AEF-3-Ch-15の再クロマトグラフィ

カラム : ODS-120A (4x250mm)  
 溶媒A : 0.1M HCOONH<sub>4</sub> (pH6.4)  
 溶媒B : 60% CH<sub>3</sub>CNを含む 0.1M HCOONH<sub>4</sub> (pH6.4)  
 流速 : 1ml/分

Ch- 1 : HSer  
 Ch- 2 : S Y HSer  
 Ch- 3 : I I H  
 Ch- 4 : S Y  
 Ch- 5 : C D K S R E Y  
 Ch- 6 : D K S R E Y  
 Ch- 7 : L S Y HSer  
 Ch- 8 : G Q F  
 Ch- 9 : Q E Q G R T E L  
 Ch-10-R-1 : Q T Q F  
 Ch-10-R-2 : S C Q N S T A V A D S C C F  
 Ch-11 : L S Y  
 Ch-12 : D T N P P S G P S D S W  
 Ch-13 : Q E Q G R T E L L  
 Ch-14 : N S P G G A L L  
 Ch-15-R-1 : W D T N P P S G P S D S W  
 Ch-15-R-2 : G L W P D N C D G S Y  
 Ch-16,17 : T I H G L W P D N C D G S Y  
 Ch-18 : Q T Q F W  
 Ch-19 : E F  
 Ch-20,21 : E F P S C P K D I

図1-19. AEF-3フラグメントのキモトリプシン分解  
への4つのアミノ酸配列

CHO : 糖鎖を表す

→→→ : 手動ドマン法にて決定

————→ : 気相式シーケンサーにて決定

PTH-N<sub>CHO</sub> は手動ドマン法 およびアミノ酸分析にて決定した。

C; AE-Cys を表す。その他の1文字略号は図1-5と同じ

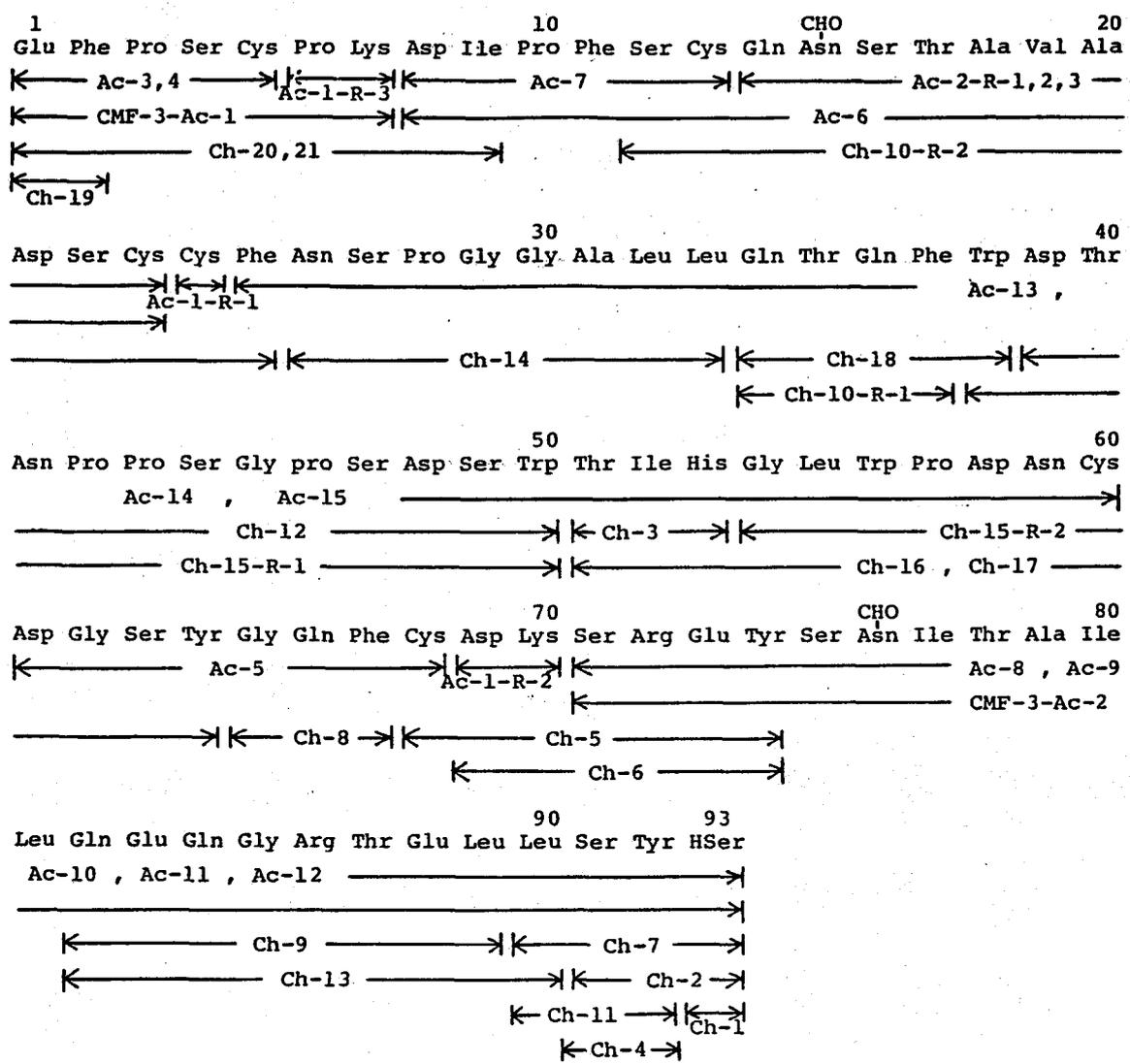


図1-20. AEF-3 フラグメントの一次構造決定のまとめ

CHO : 糖鎖を表わす

1		10		CHO	20														
Glu	Phe	Pro	Ser	Cys	Pro	Lys	Asp	Ile	Pro	Phe	Ser	Cys	Gln	Asn	Ser	Thr	Ala	Val	Ala
									30										40
Asp	Ser	Cys	Cys	Phe	Asn	Ser	Pro	Gly	Gly	Ala	Leu	Leu	Gln	Thr	Gln	Phe	Trp	Asp	Thr
									50										60
Asn	Pro	Pro	Ser	Gly	Pro	Ser	Asp	Ser	Trp	Thr	Ile	His	Gly	Leu	Trp	Pro	Asp	Asn	Cys
									70						CHO				80
Asp	Gly	Ser	Tyr	Gly	Gln	Phe	Cys	Asp	Lys	Thr	Arg	Glu	Tyr	Ser	Asn	Ile	Thr	Ala	Ile
									90										100
Leu	Gln	Glu	Gln	Gly	Arg	Thr	Glu	Leu	Leu	Ser	Tyr	Met	Lys	Lys	Tyr	Trp	Pro	Asn	Tyr
									110										120
Glu	Gly	Asp	Asp	Glu	Glu	Phe	Trp	Glu	His	Glu	Trp	Asn	Lys	His	Gly	Thr	Cys	Ile	Asn
									130										140
Thr	Ile	Glu	Pro	Ser	Cys	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Ser	Pro	Gln	Lys	Glu	Val	Gly	Asp	Tyr	Leu
									150										160
Gln	Lys	Thr	Val	Asp	Leu	Phe	Lys	Gly	Leu	Asp	Ser	Tyr	Leu	Ala	Leu	Ala	Lys	Ala	Gly
									170										180
Ile	Val	Pro	Asp	Ser	Ser	Lys	Thr	Tyr	Lys	Arg	Ser	Glu	Ile	Glu	Ser	Ala	Leu	Ala	Ala
									190										200
Ile	His	Asp	Gly	Lys	Lys	Pro	Tyr	Ile	Ser	Cys	Glu	Asp	Gly	Ala	Leu	Asn	Glu	Ile	Trp
									210										220
Tyr	Phe	Tyr	Asn	Ile	Lys	Gly	Asn	Ala	Ile	Thr	Gly	Glu	Tyr	Gln	Pro	Ile	Asp	Thr	Leu
									230										CHO
Thr	Ser	Pro	Gly	Cys	Ser	Thr	Ser	Gly	Ile	Lys	Tyr	Leu	Pro	Lys	Lys	Ser	Glu	Asn	

## 図 1-21. RNase T<sub>2</sub> の一次構造

同定した

S-S結合 : 68位と118位の Cys  
191位と225位の Cys

CHO : 高マンノース型糖鎖 (Asn-15, 76)  
GlcNAcのみ (Asn-239)

分子量 : 30,100

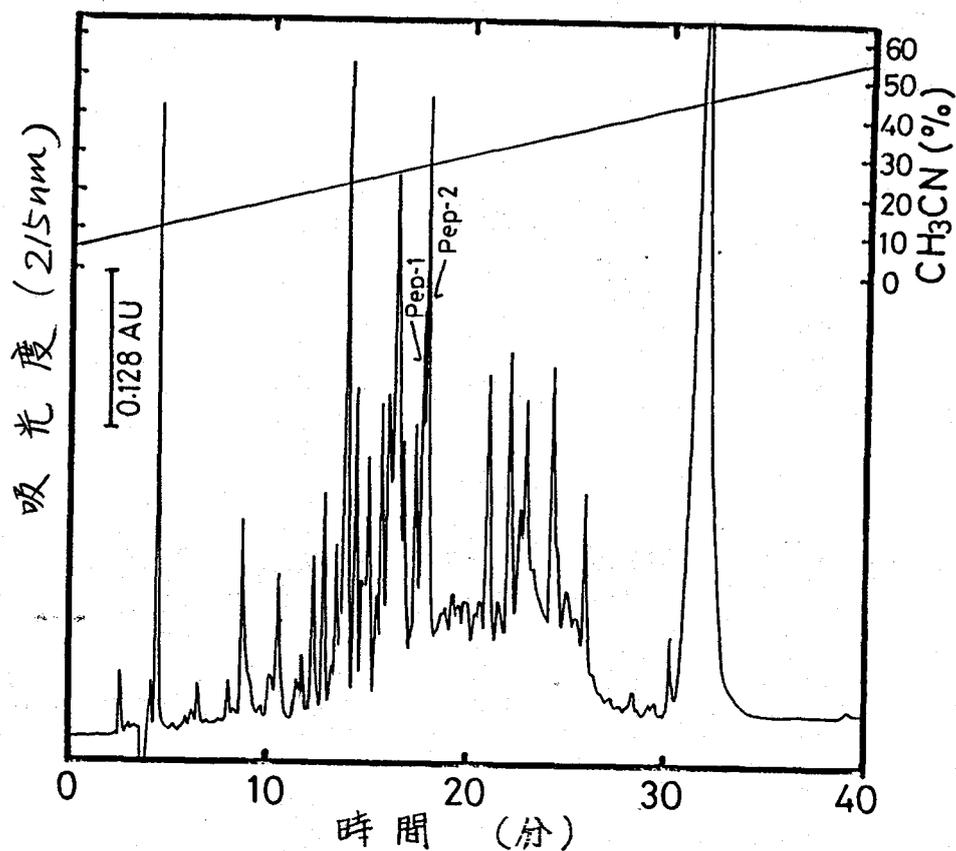


図1-22. RNase T<sub>2</sub> のペプシン分解物の HPLC 分離パターン

試料: RNase T<sub>2</sub> 30ナモル, 0.1M AcOH (pH4.0) 200 $\mu$ l に  
 溶かし ペプシン  $\frac{1}{100}$ モル比を加え, 37 $^{\circ}$ C で1晩分解後  
 さらにペプシン  $\frac{1}{100}$ ナモル比を追加し, 共10時間分解した.  
 その $\frac{1}{3}$ 量をクロマトグラフに供した.

カラム: ODS-120A (4x250mm)

溶媒: 0.1% TFA - CH<sub>3</sub>CN系

流速: 1ml / 分

T<sub>2</sub>-Pep-1

アミノ酸分析  
収率, 33.0%

CySO<sub>3</sub>H:1.8(2) , Lys:1.8(2) , His:0.6(1)  
Asp :1.7(2) , Thr:1.5(2) , Ser:3.3(4)  
Glu :1.0(1) , Pro:1.9(2) , Gly:3.4(4)  
Ala :1.7(2) , Ile:1.6(2) , Leu:1.1(1)  
Tyr :0.7(1) 計 26 残基

シーケンシング

A A I H D G K K P Y I S <sup>191</sup> C E D G  
L T S P G C S T S G <sub>225</sub>

T<sub>2</sub>-Pep-2

アミノ酸分析  
収率, 24.0%

CySO<sub>3</sub>H:1.8(2) , Lys:1.6(2) , His:0.9(1)  
Arg :0.8(1) , Asp:2.8(3) , Thr:1.9(2)  
Ser :1.2(1) , Glu:2.0(2) , Gly:2.3(2)  
Ile :1.0(1) , Phe:0.9(1) , Trp:0.1(1)

シーケンシング

G Q F C <sup>68</sup> D K S R E  
W N K H G T C I N T <sub>118</sub>

計 19 残基

図 1-23. RNase T<sub>2</sub> の S-S 結合の位置決定

図 1-22 で得られた T<sub>2</sub>-Pep-1 と T<sub>2</sub>-Pep-2 のアミノ酸組成値と そのペプチドのアミノ酸配列を示した。  
CySO<sub>3</sub>H は 過キ酸酸化 として求めた値を示す。  
シーケンシングは 気相式シーケンサーで行なったが、  
シスチンのところは 何も検出されなかった。

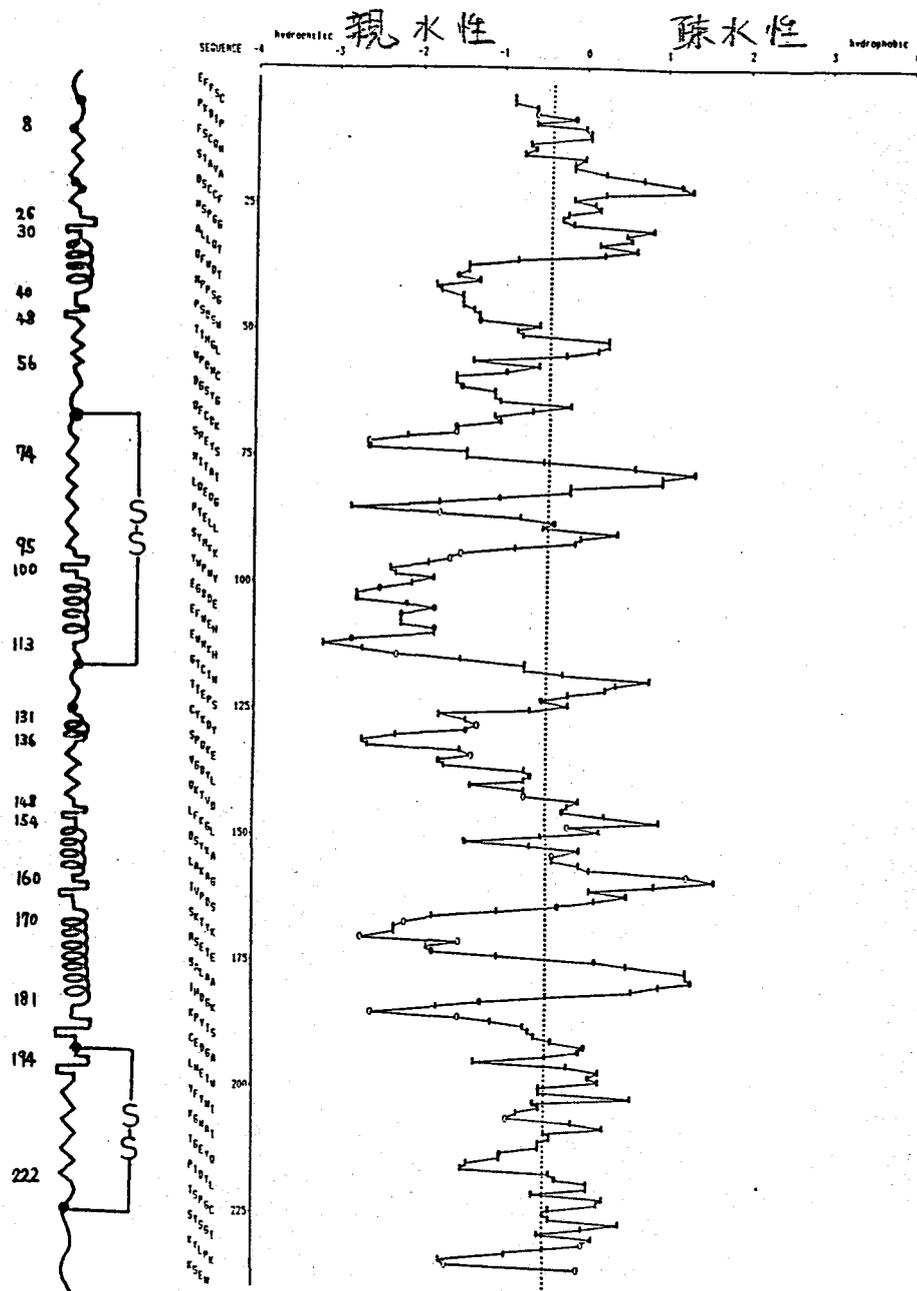


図1-24. RNase T<sub>2</sub>のハイドロパシーと二次構造の予測

ハイドロパシーは アミノ酸残基ごとに、その平均値とその中央のアミノ酸の位置にプロットしてある。点線よりも左にあれば親水性、右にあれば疎水性である傾向が定性的に理解される。

図中の左端は Chou-Fasman らの方法により予想される二次構造を示した。

〰〰〰〰 :  $\alpha$ -ヘリックス,  $\sim\sim\sim$  :  $\beta$ -シート,  $\sqcup$  :  $\beta$ -ターン,  $\sim$  : ランダムコイル,  $\bullet$  : Cys  
 (表記は単に  $\alpha$ -ヘリックス,  $\beta$ -シートなどを表わすだけで、その巻き数には何ら意味はない)

表1-1. RNase T<sub>2</sub> および CMF-2, CMF-3 フラグメントの  
アミノ酸組成

アミノ酸	CMF-2	CMF-3	RNase T <sub>2</sub>
CySO <sub>3</sub> H <sup>(a)</sup>			9.9 (10)
CM-Cys	3.2 (4)	4.7 (6)	
Asp	16.2 (Asp 10 Asn 7)	11.5 (Asp 8 Asn 4)	28.6 (Asp 18 Asn 11)
Thr <sup>(b)</sup>	7.9 (8)	5.8 (6)	13.5 (14)
Ser <sup>(b)</sup>	11.8 (12)	10.8 (12)	22.8 (24)
Glu	15.3 (Glu 13 Gln 3)	9.5 (Glu 4 Gln 6)	25.6 (Glu 17 Gln 9)
Pro	8.0 (8)	7.6 (8)	15.8 (16)
Gly	10.9 (11)	7.1 (7)	17.8 (18)
Ala	7.7 (8)	3.9 (4)	11.9 (12)
Cys <sup>(c)</sup>			4.6 (5)
Val	2.8 (3)	1.0 (1)	3.9 (4)
Met			0.9 (1)
Ile	10.2 (11)	3.9 (4)	14.6 (15)
Leu	7.9 (8)	6.1 (6)	14.0 (14)
Tyr	11.4 (12)	3.1 (3)	14.7 (15)
Phe <sup>(d)</sup>	3.0 (3)	5.2 (5)	8.3 (8)
Lys	14.6 (17)	1.6 (2)	17.8 (19)
His	2.8 (3)	0.9 (1)	3.9 (4)
Trp <sup>(c)</sup>	3.3 (4)	2.4 (3)	6.8 (7)
Arg	1.0 (1)	2.0 (2)	3.1 (3)
H-Ser(L)		0.7 (1)	
グルコサミン	+	++	+++
収率(計)	72.4% (146)	76.9% (93)	(239)

かつこの値は、そのアミノ酸配列(図1-21)から計算した。  
アミノ酸組成比は、Ala, Leu, Arg を基準として得た。

- (a) 過キ酸 酸化後の値
  - (b) 24, 48, 72時間加水分解値を0時間に外挿した値
  - (c) 4M MTS水解後の値
  - (d) グルコサミンを含んだ値
- H-Ser(L)は、H-SerとH-Ser-Lの両方を合計した値を示す

表 1-2. CMF-2 フラグメントの *Achromobacter lyticus* プロテアーゼ I 分解物のアミノ酸組成

アミノ酸	Ac-1	Ac-2	Ac-3	Ac-4	Ac-5	Ac-6	Ac-7-R-1	Ac-7-R-2	Ac-8	Ac-9	Ac-10	Ac-11	Ac-12-13	Ac-14	Ac-15	Ac-16	Ac-17-18	計	CMF-2
CM-Cys										0.8(1)	1.2(2)		0.6(1)				0.6(1)	4	3.2
Asp		1.0(1)			1.0(1)		1.0(1)	1.0(1)	1.0(1)	1.0(1)	1.0(1)	1.0(1)	2.0(2)	1.1(1)	3.8(4)	1.0(1)	2.9(3)	17	16.2
Thr			0.9(1)								1.6(2)	0.9(1)	3.4(4)					8	7.9
Ser		0.9(1)			0.9(1)		0.9(1)	1.7(2)		0.9(1)	0.9(1)		2.6(3)	1.5(2)			0.8(1)	12	11.8
Glu		1.0(1)			1.0(1)				1.9(2)	1.0(1)	1.0(1)		2.1(2)	2.1(2)	4.7(5)		2.0(2)	16	15.3
Pro					1.0(1)	1.0(1)		1.1(1)		0.8(1)	1.0(1)		1.9(2)		1.1(1)		1.0(1)	8	8.0
Gly							1.0(1)	1.0(1)	1.0(1)	1.0(1)	1.0(1)		3.7(4)	1.0(1)	1.2(1)		1.1(1)	11	10.9
Ala				2.1(2)				1.0(1)					1.2(1)	2.7(3)			1.0(1)	8	7.7
Val								0.6(1)	0.9(1)			1.0(1)						3	2.8
Ile								0.6(1)		0.8(1)	1.4(2)		2.4(3)	1.4(2)		1.3(2)	2.4(3)	11	10.2
Leu				0.8(1)		0.8(1)	0.8(1)		0.8(1)			0.9(1)	1.0(1)	0.8(1)			0.9(1)	8	7.9
Tyr			1.0(1)		1.0(1)	1.0(1)	0.8(1)		1.0(1)	0.9(1)	0.8(1)		0.9(1)		1.9(2)	1.6(2)	2.7(3)	12	11.4
Phe												1.0(1)			0.9(1)	0.8(1)	1.0(1)	3	3.0
Lys	2.0(2)	0.9(1)	1.0(1)	1.0(1)	0.9(1)	1.0(1)	0.8(1)	1.0(1)	0.9(1)	0.9(1)	1.1(1)	1.0(1)	1.1(1)	1.0(1)	1.1(1)	1.0(1)	2.0(2)	17	14.6
His											0.8(1)			0.7(1)	1.0(1)			3	2.8
Trp															1.4(3)	+	0.2(1)	4	3.3
Arg														0.8(1)				1	1.0
グルタミン		+																+	+
計	2	4	3	4	6	4	6	9	8	9	14	6	25	15	19	8	21	146	
収率(%)	32.2	40.5	50.8	45.5	46.9	43.7	12.1	28.9	53.0	10.0	28.3	48.4	44.8	42.2	58.7	15.0	27.5		

かっこ内の数字はアミノ酸配列(図1-5)から計算した値を示す  
 アミノ酸の合計は分散したペプチドは計算にいれていない  
 Lysの分析値が低いのはアミノ糖を含むためと思われる。(第二章3節参照)

表 1-3. CMF-2フラグメントの V-8 プロテアーゼ分解物のアミノ酸組成

アミノ酸	V-2	V-3	V-4	V-5	V-6-R-1	V-6-R-2	V-7	V-8	V-10	計	V-1	V-9
CM-Cys					0.7(1)	1.3(2)	0.5(1)			4		
Asp	1.9(2)		1.9(2)	3.0(3)	1.1(1)	3.0(3)	2.1(2)	2.1(2)	1.9(2)	17		3.0(3)
Thr			0.8(1)			1.7(2)	2.5(3)	0.9(1)	0.9(1)	8	0.9(1)	
Ser					1.6(2)	1.6(2)	3.4(4)	3.3(4)		12	2.5(3)	
Glu	1.0(1)	2.0(2)	1.0(1)	3.0(3)	1.1(1)	3.0(3)	2.1(2)	1.1(1)	1.0(1)	15	1.0(1)	3.9(4)
Pro				1.2(1)	1.1(1)	1.8(2)	3.1(3)	1.1(1)		8		1.1(1)
Gly	1.0(1)		1.0(1)	1.2(1)	1.0(1)	1.1(1)	2.0(2)	2.0(2)	1.8(2)	11		1.1(1)
Ala	1.0(1)				2.6(3)			2.8(3)	1.0(1)	8		
Val			1.7(2)					0.6(1)		3		
Ile					1.6(2)	1.8(2)	1.9(2)	0.6(1)	2.3(3)	10		
Leu	0.8(1)		0.8(1)		0.9(1)		2.1(2)	2.6(3)		8		
Tyr			0.9(1)	2.0(2)	1.0(1)	1.9(2)	1.8(2)	2.0(2)	1.8(2)	12	0.8(1)	2.0(2)
Phe		0.9(1)						0.9(1)	0.9(1)	3		1.0(1)
Lys			1.0(1)	2.0(2)	2.0(2)	2.9(3)	2.8(3)	4.6(5)	1.0(1)	17	1.7(2)	2.0(2)
His		0.8(1)			0.8(1)	1.0(1)				3		
Trp		0.2(1)		0.2(1)		0.3(1)			0.3(1)	4		0.6(2)
Arg								0.8(1)		1	0.7(1)	
グルタミン							+			+		
計	6	5	10	13	17	24	26	28	15	144	9	16
収率(%)	39.1	17.3	35.0	23.0	23.0	6.3	40.5	10.9	54.5		14.0	30.3

カッコ内の数字はアミノ酸配列(図1-8)から計算した値を示す  
 V-1, V-9は分散ペプチドなのでアミノ酸合計数には計算していない。

表14. CMF-3フラグメントの *Achromobacter lyticus* プロテアーゼI  
分解物のアミノ酸組成

アミノ酸	CMF-3-Ac-1	CMF-3-Ac-2	CMF-3-Ac-3
CM-Cys	0.8 (1)		4.6 (5)
Asp		1.2 (1)	11.1 (11)
Thr		1.7 (2)	3.2 (4)
Ser	0.9 (1)	2.2 (3)	6.1 (8)
Glu	1.0 (1)	5.1 (5)	4.2 (4)
Pro	1.8 (2)		5.5 (6)
Gly		1.0 (1)	6.2 (6)
Ala		1.0 (1)	3.0 (3)
Val			0.9 (1)
Ile		1.5 (2)	2.1 (2)
Leu		2.8 (3)	2.6 (3)
Tyr		1.9 (2)	0.7 (1)
Phe	1.0 (1)		3.8 (4)
Lys	1.0 (1)		0.7 (1)
His			0.7 (1)
Trp			1.6 (3)
Arg		1.7 (2)	
H-Ser(L)		0.7 (1)	
グルタミン		2.1 (2)	2.1 (2)
計	7	23	63
収率 (%)	34	41	35

カッコ内の数字は、アミノ酸配列から計算した値を示す

H-Ser(L)は H-Serと H-Ser-Lの両方を合計した値を示す



表 1-6. AEF-3フラグメントのキモトリポシン分解物のアミノ酸組成

アミノ酸	Ch-1	Ch-2	Ch-3	Ch-4	Ch-5	Ch-6	Ch-7	Ch-8	Ch-9	Ch-10-R-1	Ch-10-R-2	Ch-11	Ch-12	Ch-13	Ch-14	Ch-15-R-1	Ch-15-R-2	Ch-16-17	Ch-18	Ch-19	Ch-20-21	計
As-Gys					0.9(1)						2.9(3)						0.9(1)	1.2(1)			0.5(1)	6
Asp					1.0(1)	1.0(1)					1.7(2)		3.0(3)		1.0(1)	2.7(3)	2.8(3)	3.0(3)			1.0(1)	11
Thr			1.0(1)						0.9(1)	0.8(1)	0.9(1)		0.9(1)	0.9(1)		0.9(1)		0.9(1)	0.9(1)			5
Ser		0.9(1)		1.1(1)	0.9(1)	0.9(1)	1.1(1)				2.3(3)	1.1(1)	2.8(3)		0.9(1)	2.6(3)	0.9(1)	1.0(1)			0.8(1)	11
Glu					1.0(1)	1.1(1)		1.0(1)	3.7(4)	2.0(2)	1.2(1)			4.0(4)					2.0(2)	0.9(1)	0.8(1)	10
Pro													3.2(3)		1.0(1)	3.0(3)	1.1(1)	1.3(1)			2.1(2)	7
Gly								1.0(1)	0.9(1)				1.1(1)	1.1(1)	1.9(2)	1.0(1)	2.0(2)	2.0(2)				7
Ala											1.8(2)				0.9(1)							3
Val											0.9(1)											1
Ile			0.8(1)															0.9(1)			0.6(1)	2
Leu							0.9(1)		1.0(1)			0.8(1)		1.6(2)	1.8(2)		1.0(1)	0.9(1)				5
Tyr		1.0(1)		1.0(1)	0.9(1)	0.8(1)	1.0(1)					1.0(1)						1.1(1)	0.9(1)			3
Phe								1.0(1)		0.9(1)	1.1(1)								1.0(1)	1.0(1)	1.1(1)	4
Lys					0.9(1)	0.7(1)															1.0(1)	2
His			1.0(1)															0.5(1)				1
Trp													0.4(1)			1.2(2)	0.2(1)	0.3(1)	0.4(1)			3
Arg					0.9(1)	0.8(1)			0.8(1)					0.8(1)								2
H-Ser(L)	1.0(1)	0.7(1)					0.8(1)															1
グルタミン											+											+
計	1	3	3	2	7	6	4	3	8	4	14	3	12	9	8	13	11	14	5	2	9	84
収率(%)	23.8	19.6	43.3	13.8	47.2	24.2	19.6	91.0	47.5	41.0	10.0	33.4	40.9	20.6	94.2	15.7	9.2	16.0	34.9	34.0	38.1	

カッコ内の数字は アミノ酸配列 (図 1-9) から計算した値を示す  
 同一ペプチドは アミノ酸合計数には入れていない

H-Ser(L)は H-Serと H-SerLの両方を合計した値を示す

表 1-7. RNase T<sub>2</sub> および その糖ヘプタドの  
糖組成分析

モル/モル タンパク	ヘプタド <sup>(a)</sup>	グルコサミン <sup>(a)</sup>	マンノース <sup>(b)</sup>
CMF-2	1.0 Asn-239	0.8 (1)	0.1
AEF-2	1.0 Asn-239	0.9 (1)	0.1
CMF-3-AC-2 ( <sup>71</sup> Ser ~ <sup>93</sup> HSer)	1.0 Asn-76	2.1 (2)	2.9 (3)
CMF-3-AC-3 ( <sup>8</sup> Asp ~ <sup>70</sup> Lys)	1.0 Asn-15	2.1 (2)	3.7 (4)
CMF-3	1.0 Asn-15,76	3.7 (4)	6.2 (6)
RNase T <sub>2</sub>	1.0 Asn-15,76 239	4.8 (5)	7.5 (8)

- (a) アミノ酸分析機からの値. 4M MTS水解 (110°C, 24時間)  
ヘプタドは Ala または Leu を基準にした。
- (b) ガスクロマトグラフィーからの値

表1-8. RNase T<sub>2</sub> とその類縁RNase との比較

	RNase						
	T <sub>2</sub>	T <sub>1</sub>	A	St	Ms	Bi	Ba
アミノ酸総数	239	104	124	101	106	109	110
起源	Asperigillus oryzae		Bovine pancreas	Streptomyces erythraeus	Asperigillus saitoi	Bacillus intermedius	Bacillus amyloliquifaciens
特異性	A >> U >G > C		ピリミジン 特異的	グアニン 特異的	非特異的	非特異的	非特異的

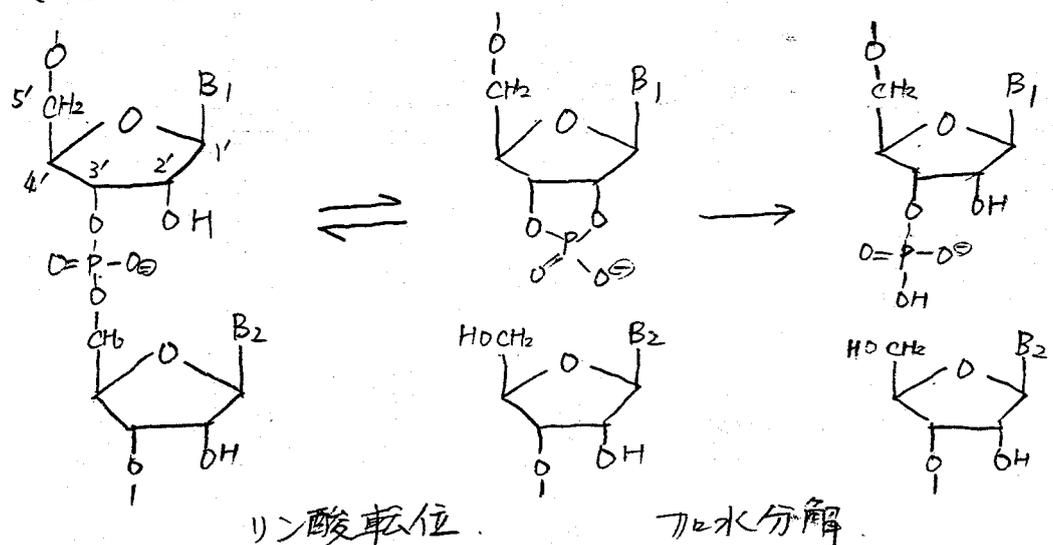
## 第 II 部

リボヌクレアーゼ T<sub>2</sub> の触媒機能に  
関与するアミノ酸残基の検索

# 第一章 序論

リボヌクレアーゼ (RNase) の触媒機能に関する研究は、古くから行なわれてきた。特に詳しく研究されているのは、ウシ膵臓 RNase A と、RNase T<sub>2</sub> と同じようにこうじ菌, *Aspergillus oryzae* が産出する RNase T<sub>1</sub> であり、化学修飾, 核磁気共鳴, X線結晶解析などが行なわれてきた。その結果、RNase A の触媒基は、His-12 と His-119 であると推定されている。

RNase の RNA の水解反応は一般に 2 つの段階を経て止む。<sup>(32)</sup>



あるいは、オーザン反応は 3', 5'-リン酸ジエステル の 5'-リン酸基の 2'-水酸基への転移

反応であり、2',3'-サイクリックリン酸エステルを生成してRNAの鎖状構造が切断される。オニ段の反応は、2',3'-サイクリックリン酸ジエステルの活性化された水分子による加水分解反応である。オニ段目の反応で、水を活性化するアミノ酸残基は、RNase A, T<sub>1</sub>ともに His<sup>(33)</sup> であるが、オ一段目の2'-水酸基のプロトンが引き抜かれ、2',3'-サイクリックリン酸エステルが生成する際の2'-水酸基のプロトン引き抜きに関与するアミノ酸残基は、RNase Aでは His<sup>(33)</sup>、RNase T<sub>1</sub>では Glu<sup>(34)</sup> である。このように RNase A と RNase T<sub>1</sub> ではその触媒反応のオ一段目で塩基触媒として働くアミノ酸残基が異なっている。

RNase T<sub>1</sub> と類縁である微生物起源の RNase 類 (U<sub>1</sub><sup>(35)(36)</sup>, Ch<sup>(37)</sup>, St<sup>(38)</sup>, U<sub>2</sub><sup>(39)</sup>, Ms<sup>(40)</sup>) についても RNase T<sub>1</sub> と同様に Glu が一次構造上ホモロジーのある位置に存在し、これらの低分子型 RNase に共通の触媒基であることが示されている。しかし、これらの RNase 類と異なり、分子量が大きい。

RNase T<sub>2</sub>においては、その触媒反応に関与しているアミノ酸残基が、RNase A型か、RNase T<sub>1</sub>型かということは不明であり、それぞれについての知見を得ることは、RNase T<sub>2</sub>の触媒機能を化学的に理解する上で興味あるところである。

著者は、これらの観点に基づき、オI部でその一次構造が決まったRNase T<sub>2</sub>の触媒機能に関与するアミノ酸残基の決定、およびその活性部位付近の環境を明らかにするため、化学修飾、プロトンNMR、光CIDNPなどを用いて研究を行なった。オII章には、その実験方法を、オIII章には実験結果を、そしてオIV章ではその結果を基にした、触媒機能関与アミノ酸残基の、RNase AとRNase T<sub>1</sub>との比較について考察した。

## 第二章 実験

### 第1節 実験試薬 機器

RNase T<sub>2</sub> は I 部で一次構造を決定したものと同一ロットのものを用いた。

活性測定用の基質 (RNA), ジエチルピロカ  
ーボネイト (DEP, 特級) は半井化学から、テ  
トラニトロメタン (TNM, 特級) は片山化学か  
ら購入し、そのまま使用した。NMR測定用  
の重水 (99.8%) はフランス原子力庁 (CEA) か  
ら購入した。7.5 M DCl は Merck から、9~  
12 M NaOD は CEA から購入し、重水で約 1  
M 溶液に薄めて使用した。3-N-カルボキシ  
メチルフラビンは、大阪大学蛋白質研究所、  
物性部門の林君からいただいた。その他、主  
な溶媒、試薬はすべて特級を用いた。

H-NMR, CIDNP スペクトルは、日本  
電子 GX-500 NMR スペクトロメータにて  
測定した。

## 2節 実験方法

### 2-1: RNase T2の活性測定

活性測定は RNase T2 0.5~1  $\mu$ g を用い、Takahashi<sup>(41)</sup>の方法によって行った。

### 2-2: NMR測定

His の C(2) プロトンピークを妨害する可ミド  
 プロトンを重水交換するために、RNase T2  
 (8 mg~15 mg) を約 1 ml の重水に懸濁させ、  
 溶液が透明になるまで  $\text{ND}_4\text{DCO}_3$  を少量づつ  
 加え、60°C で 3 分間、続いて 37°C で 10 分間、  
 インキュベーションをし、凍結乾燥をした。  
 このサンプルをさらにもう一度、重水に溶か  
 し、凍結乾燥した後、0.2 M NaCl を含む  
 重水 0.4 ml に溶かし、500 MHz  $^1\text{H-NMR}$  を  
 測定した。通常 繰り返シパルス時間 1.5 秒  
 で 1000~2000 回積算をした。ケミカルシフト  
 は、トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウ  
 ム-d4 (37°C, 重水中, 0.0 ppm) から換算し  
 た H-O-D のケミカルシフトを 4.64 ppm (37°C)  
 として基準にした。

3'-AMPは、少量の水には溶けにくいため  
1M NaODを当モル量加えて溶かし、NMR  
チューブに直接適当量を加えた。

サンプルのpHは1M NaOD, 1M DClを  
加えることにより調節した。pHメーターは  
インゴールドのガラス電極(直径: 3mm)を  
装備したPHM84(真興交易社) pHメーター  
を用いた。pHの測定は24°Cで行ない。キャ  
リブレーションには、軽水の標準緩衝液を  
用いた。

pKaは、目立ベークマスタースタンドレベル3  
パーソナルインピーターを用い、Sakiyama  
の<sup>(42)</sup>計算式をもとに算出した。

光CIDNP NMRスペクトルは、Hayashi<sup>(43)</sup>  
の方法によって測定した。測定用プローブは  
光照射専用を用いた。また、フラビンの光励  
起用の光源には、日本電気GLC-3300アルゴン  
イオンレーザーを用い、488nmシングルラ  
インによって測定した。レーザー光による温  
度上昇、試料の破壊などの効果をできるだけ

最小限にするため、出力 1 W, 24°C で、光照射 FID と非照射 FID を交互に観測し、各々の FID の差をフーリエ変換してスペクトルを得た。また、光照射時間は、高い S/N が得られながらも、スペクトルが複雑化する交差緩和ができるだけ最小限度になる 100 ms を用いた。<sup>(43)</sup> なお、光 CID NP 用のサンプルには、3-N-カルボキシメチルフラビンを 0.2 mM になるように入れ、上述の方法と同様にして調整した。

## 2-3: 化学修飾

### a) DEP との反応

RNase T<sub>2</sub> 50 μg を pH の異なる数種の 0.1 M クエン酸または 0.4 M クエン酸-リン酸ナトリウム緩衝溶液 50 μl に溶かし、10% DEP-ジオキサソール溶液 3 μl を加え (3.6 mM DEP = 120 倍当量, 最終ジオキサソール濃度 5%)、23°C で 30 分間反応させた後、活性を測定した。なお対照実験にはジオキサソールのみを 3 μl 加え、同じ条件で活性測定をした。

3'-AMP存在下でのDEPとの反応は、3'-AMPを水に溶解させた後、最終濃度が10mMになるように加え、同様な反応を行ない、活性変化を測定した。

### b) モノヨード酢酸との反応

RNase T<sub>2</sub> 50  $\mu$ gを 0.1M モノヨード酢酸 (3000倍mole) を含む pHの異なった数種の0.5Mクエン酸緩衝溶液 50  $\mu$ lに溶かし、37°Cで反応を行ない、一定時間ごとにその一部をとり出し活性を測定した。

アミノ酸分析、ペプチドマッピング用には、RNase T<sub>2</sub> 3mgを 0.1M モノヨード酢酸 (600倍当量) を含む 0.25Mクエン酸緩衝溶液 (pH 5.6) 1mlに溶かし、37°Cで8時間反応を行ない、限外濾過装置 (アミコン) で脱塩後、凍結乾燥をした。この場合も一定時間ごとに活性測定を行なった。

### c) テトラニトロメタン (TNM) との反応

RNase T<sub>2</sub> 3mgを pH 7.8, 8.1, 8.5 の 50 mM Tris-HCl 緩衝溶液 200  $\mu$ lに溶かし、1%

TNM-エタノール溶液 10  $\mu$ l (80倍当量, 最終エタノール濃度 0.5%) を加え、23°C で1時間反応させた後、0.1% TFA - CH<sub>3</sub>CN 系溶媒を用いた逆相HPLC (カラム: ODS-120A) で脱塩し、アミノ酸分析を行った。

NMR, マッピング用には、RNase T<sub>2</sub> 10mg を50mM Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 8.5), 2ml に溶かし、75% TNM-エタノール溶液 10  $\mu$ l (80倍当量, 最終エタノール濃度 0.2%) を加え、23°C で1時間反応させた後、氷酢酸 10  $\mu$ l を入れ、反応を停止させた。反応溶液は、ただちに、Sephadex G-10 ( $\phi$  2 x 28cm) カラムを用い、0.05M 酢酸で脱塩後、活性を測定、凍結乾燥した。

#### 2-4: ペプチドマッピング

RNase T<sub>2</sub> を化学修飾したサンプルのペプチドマッピングは、メチオニンをブロムシアン分解後、2-メルカプトエタノールでジスチンを還元し、アミノエチル化反応を行ない、0.1% TFA - CH<sub>3</sub>CN 系溶媒を用いた逆相HPLC (カラム:

ODS - Lichrospher. 孔径  $500\text{\AA}$ ) で AEF-2, AEF-3 各フラグメントに分離した。各操作は、オI部、オII部、オIV部 に示した方法と全く同様にして行なった。

また、AEF-2, AEF-3 フラグメントの断片化は、*Achromobacter lyticus* プロテアーゼ I を用いて同様にして行ない、0.1% TFA - CH<sub>3</sub>CN 系溶媒を用いた逆相 HPLC (カラム: ODS-120A) でペプチドマッピングを行なった。

各ペプチドのアミノ酸組成は、Waters社 "PICO-TAG Amino Acid Analysis" システム, および 日立 835-S アミノ酸自動分析機を用いて決定した。

### 第三章 結果

オ 1 節, RNase T<sub>2</sub> の化学修飾.

1-1; DEP による修飾.

His と特異的に反応する DEP を用いて、RNase T<sub>2</sub> を化学修飾した。pH 6.0 で DEP の量をモル比で酵素の 10, 100, 1000 倍と増加させて 23°C, 30 分間反応させた。このときの活性の変化は、表 2-1 に示したように 110, 56, 0% で、DEP の増加とともに RNase 活性が低くなることわかった。

表 2-1

次に DEP を酵素の 120 倍当量に固定して pH の影響を調べた。図 2-1 に示すように RNase T<sub>2</sub> は、pH が 4.0 から 5.8 付近までは DEP による不活性化をうけず、その活性はほぼ 100% であったが、pH 6 を越えると pH が高くなるにつれて酵素活性は急速に減少した。

図 2-1

この不活性化のカーブは、pH 依存性を示すシグモイド型をしており、その中点の pH は

6.4であった。また DE P との反応をクエン酸緩衝液の代わりに、クエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液を用いて同様に行なうと、活性は低下しなかった。10mMの3'-AMPを共存させた場合も、DE P との反応による活性低下は起こらなかった。これらの結果は、Hisが、リン酸イオンや、3'-AMPによって、ブロックされ、DE P による修飾を受けなくなることを示唆する。換言すれば、RNase T<sub>2</sub>の触媒活性の発現にHisが関与していることを示唆する。

1-2; モノヨード酢酸による修飾、

RNase T<sub>2</sub>を0.1Mのモノヨード酢酸と、種々のpHで、37°Cで反応させたときの酵素活性の変化を図2-2に示す。

図 2-2

5時間反応後のRNase T<sub>2</sub>の失活度を各反応pHでプロットしたものが図2-3である。

図 2-3

RNase T<sub>2</sub>の失活度は、pH 5付近から徐々に増していき、pH 7付近が最大となり、pH 8

を越えると急激に減少する。つまり RNase T<sub>2</sub> は、RNase T<sub>1</sub> と違って pH 7 付近で最もモノヨード酢酸の反応を受け易く、したがって、失活しやすいことが明らかにになった。

### 1-3; TNM による修飾.

テトラニトロメタン (TNM) は弱アルカリ性でタンパク質中の Tyr と反応し、3-ニトロチロシンを生成することが知られている<sup>(44)</sup>。

この TNM を RNase T<sub>2</sub> の 80 倍当量用いて、pH 7.8, 8.1, 8.5 で 23°C 1 時間反応させ、その活性と修飾されて生成する 3-ニトロチロシン (NO<sub>2</sub>-Tyr) の量を求めた。

表 2-2

pH 8.5 で反応させたとき、Tyr は 2~3 個ニトロ化されるが、酵素活性は 75% 残存しており、このアミノ酸は活性発現に必須ではないと考えられる。なお、アミノ酸分析では Tyr 以外のアミノ酸組成は未修飾 RNase T<sub>2</sub> と同じであった。

オ又節; RNase T<sub>2</sub>中の His の <sup>1</sup>H-NMR 滴定.

2-1, ネイティブ RNase T<sub>2</sub>.

オ1節で述べた DEP による RNase T<sub>2</sub>の修飾実験の結果, His が酵素活性に密接に関与していることが明らかになったが, その残基のミクロ環境を調べるために <sup>1</sup>H-NMR pH 滴定も行なった。図 2-4 に RNase T<sub>2</sub>の 500 MHz <sup>1</sup>H-NMR スペクトル全域を, 図 2-5 に pH を様々に変えて測定した低磁場域のスペクトルを示した。

図 2-4, 5

RNase T<sub>2</sub>は, オI部で明らかにしたように分子量 30,100 の高分子であり, 500 MHz 高分解能 NMR でも低磁場域の共鳴シグナルはかなり重なっている (図 2-4)。

図 2-5 に見られるように, pH によって, 明らかにその化学シフトが大きく動き, 滴定される His C(2) プロトンは 2個 (H-1, H-2) 存在している。RNase T<sub>2</sub>中には His 53, His 110, His 115, His 182 の合計 4個存在しており, こ

これらの中の2残基が、pHにより滴定されることになり、これは、分子表面に露出しているか、分子表面近くに存在しているものと考えられる。

また、重水中で pH 7.7, 37°C, 43 時間のインキューベーションで、H-D 交換<sup>(45)</sup>をさせたところ、その交換速度は、H-2 が最も速く、ついで H-1 であった(図 2-6)。

図 2-6

このことは、これらのイミダゾール基が近傍の官能基と特別の相互作用をしていないと仮定すると、pH 滴定される His の中でも、H-2 の方が H-1 よりも分子表面への露出度が大きいことを示している。

図 2-7 に各 His の C(2) プロトンシグナルの pH 滴定の結果を示した。H-1 の pKa は、7.23, H-2 の pKa は 6.43 であり Hill 係数はそれぞれ 2.38, 0.45 であった。また酸性域においても化学シフトはほとんど変化しておらず、RNase T<sub>1</sub> のように<sup>(46)</sup> 酸性アミノ酸の影響を受けていない可能性が高い。

## 図 2-7

H-3, H-4 は pH によって化学シフトはほとんど変化しない。また  $\delta$  7 ppm から  $\delta$  2 ppm 付近まで移動するシグナルは、 $pK_a$  6.55 を示し H-2 の His の 4 位のプロトンに相当する。この結果は、後で述べる光 C I D N P によって確認された。

D E P の His の修飾による活性の低下率のシグモイドカーブの中心は pH 6.4 であり、 $^1H$ -NMR 滴定により決まった H-2 の  $pK_a$  (6.43) と一致する。さらに分子表面への露出度や D E P に対する高い反応性を考慮すれば H-2 が RNase T<sub>2</sub> の活性に関与する残基である可能性が高い。

2-2, 3'-AMP 存在下での  $^1H$ -NMR 滴定 RNase T<sub>2</sub> は、4 種類のヌクレオチド (3'-リン酸) の中で、3'-AMP に対する結合力が最も大きい。<sup>(47)</sup> 従って 3'-AMP を共存させて、NMR 滴定をすれば、活性部位付近に存在するアミノ酸残基のミクロ環境が変化するはずで

ある。

RNase T<sub>2</sub> に 3'-AMP を 0.5, 1.2, 3.6 倍モルと pH 4.7 付近で徐々に加えていったときの低磁場域の NMR スペクトルを図 2-8 に示した。

図 2-8

ピーク H-1 は、ややブロードになり、0.1 ppm 程度低磁場へシフトし、ピーク H-2 も若干低磁場へシフトした。H-2 の 4 位のプロトンによるピーク (H-2(4)) は、3'-AMP を加えることにより、消失 (恐らく高磁場へ移動) した。H-3, 4 の化学シフトはほとんど変化はみとめられなかった。これらの結果は、H-1, H-2 の His が活性部位に存在していることを予想させるものである。3'-AMP を加えるにつれて増加して 8.35 ppm 付近のピークは 3'-AMP の 8 位のプロトン由来のものである。

3'-AMP を RNase T<sub>2</sub> の 3.6 倍モル加えて、pH 滴定を行なったスペクトルを図 2-9 ; その結果を図 2-10 に示した。

図 2-9, 10.

3'-AMPを共存させた場合、特に pH が高くなると、H-1, H-2 のピークは「かなりブロード」になり、pH 8 以上では同定は不可能であった。

また H-3, H-4 のピークは重なったままで pH によってほとんどその化学シフトは変化しなかった。

図 2-10 から明らかのように、H-1, H-2 のピークの挙動が、3'-AMP が存在しない場合に比べて大きく変化し、これらの His の pKa はかなり上昇した (H-1; pKa  $>$  ~7.5, H-2; pKa  $>$  ~7.5)。この結果は、まさに予想したように、3'-AMP の結合部位、すなわち、活性部位に H-1, H-2 の His が存在していることを示している。

## オ3節; RNase T<sub>2</sub>の光CIDNP

### 3-1; 序

光CIDNP法<sup>(48)</sup>は、1978年 Kaptein<sup>5</sup>によってタンパク質に初めて応用され、タンパク質の分子表面に存在する His, Tyr, Trp に関する情報を極めて選択的に取り出せるのが特徴である。この場合、これらのアミノ酸の側鎖はフラビンと相互作用できることが必須条件であり、酵素の活性部位に存在する His, Tyr, Trp のシグナルを選択的に取り出すのに適している。

RNase T<sub>2</sub>においてもオ2節のH-D交換の実験結果から分子表面に His (H-1 と H-2) が存在していることが予想された。従って RNase T<sub>2</sub> に光CIDNP法を用いることで、これらのヒスタジン残基や、Tyr, Trp のミクロ環境を調べることができると期待される。

### 3-2 ネイティブ RNase T<sub>2</sub> の光CIDNPと pH 滴定

RNase T<sub>2</sub> の pH 4.8 での光CIDNPスペクトルを図 2-11 に、pH 7.7 での低磁場域のもの

を、図 2-12 に示した。

図 2-11, 12.

Tyr の CIDNP シグナル (3, 5位のプロトン) が、6.5~7.0 ppm に観測され、そのうちの2本 (6.6 ppm, 6.7 ppm) の強度が強い。つまり、RNase T<sub>2</sub> には、その分子表面に露出していてフラビンと相互作用ができる Tyr が 3~4個存在しており、その中の2個の露出度は比較的高いことが判明した。

中性溶液中では、His の CIDNP シグナルも観測され、8.3 ppm 付近のシグナルは H-2 の C(2) プロトン、7.4 ppm 付近のシグナルは H-2 の C(4) プロトンによるものと同定された。従って、H-2 のヒスチジン残基は分子表面に露出していることにはなるが、H-1 のシグナルは観測されず、H-2 程露出していないものと推測される。この結果は H-D 交換による結果とも一致する。

これらの結果から、フラビンと相互作用できるものは、His が 1個 (H-2)、Tyr が 3~4個

で、これらのアミノ酸は、RNase T<sub>2</sub>の分子表面上に存在しているが、そのほかのHis, Tyr, Trpは、分子内部に埋もれているか、あるいは、分子表面上近くに存在していても、フラビンと相互作用しない環境に位置していることが明らかにされた。

pHを変えて測定した光CIDNP差スペクトルを図2-13に、そのpH滴定の結果を図2-14に示した。

図2-13, 14.

TyrのCIDNPシグナルは、pHを変えよることによって化学シフトを若干変化した。また、H-2とH-2(4)のシグナルは、pH6付近からアルカリ性にかけて出現してくる。Hisではイミダゾール基が、プロトン化している方が、CIDNP強度が強く、HisのpKa付近から高いpH域でCIDNPシグナルが観測され始める。H-NMR滴定により、H-2のpKaは6.43であることが判明しているので、pH > 6におけるCIDNPシグナルの出現

も理解できる。また CIDNP法によると、H-2の4位のプロトンシグナルも同定され、  
 このことから逆に、オ2節での<sup>1</sup>H-NMR測定でのシグナルの帰属が正しいことを示している。

3-3: 3'-AMP存在下での RNase T<sub>2</sub>の光CIDNP.

pH 4.7付近で RNase T<sub>2</sub>に競争阻害剤である3'-AMPを徐々に加えて光CIDNPスペクトルを測定すると Tyrのシグナル強度が減少した(図 2-15)。

図 2-15.

3'-AMPを1.2倍当量加えることにより、特にγ-2のシグナルが消失あるいはγ-1のシグナルに重なりピークがブロードになることがわかる。また3.6倍当量加えると、γ-1, γ-2は、ほとんどピークが消失した。

同様に3'-AMPの存在下、pH 6.8で、光CIDNPスペクトルを測定した(図 2-16)。

図 2-16.

この条件では H-2シグナルも観測されるよ

うに存在が、3'-AMPを等量加えるとこのシグナルは完全に消失した。つまり、RNase T<sub>2</sub>の分子表面上に存在する His (H-2) と 2個の Tyr (Y-1, Y-2) は、CIDNPシグナルを与えるが、3'-AMPを存在させると、もはやそれらのシグナルを示さなくなる事が明らかになった。

3-4: TNMによって化学修飾した RNase T<sub>2</sub> の光CIDNP.

RNase T<sub>2</sub>を pH 6.5 で 80倍当量の TNMを用い、23°Cで1時間反応させた試料を、pH 4.5で測定した光CIDNPスペクトルを図2-17に示した。未修飾の RNase T<sub>2</sub>で、現われていた Tyr のシグナルは、ニトロ化されることにより、ほぼ完全に消失した。

### 図 2-17

3-ニトロチロシン (NO<sub>2</sub>-Tyr) の光CIDNPのシグナルの強度は、Tyrのそれと比べて、非常に弱く、ほとんどCIDNPシグナルは観測されない<sup>(49)</sup>。TNM修飾 RNase T<sub>2</sub> (NO<sub>2</sub>-T<sub>2</sub>) のアミノ酸分析の結果、Tyr が 4~5個 (RNase T<sub>2</sub>

中には、Tyrは15個存在する。)減少しており、  
それを代わって少なくとも3個程度のNO<sub>2</sub>-Tyr  
が生成している(表2-5参照)。これらの事実  
からRNase T<sub>2</sub>の分子表面に露出しているTyr  
(Y-1, Y-2, Y-3)がTNMによってニトロ化  
を受けたものと判断できる。

才4節; CM-His の位置決定、

RNase T<sub>2</sub> は、2節-2 に記したようにモノヨード酢酸による修飾で、失活する。この試薬により修飾されたアミノ酸を明らかにするため、修飾酵素 (CM-T<sub>2</sub>) のペプチドマッピングをおこなった。修飾反応を特定アミノ酸にできるだけ選択的に行なうために、RNase A の His 12, His 119 の修飾に用いた条件<sup>(50)</sup> (pH 5.6, 37°C) で行なった。図 2-18 にモノヨード酢酸による RNase T<sub>2</sub> の失活の時間経過を示した。

図 2-18

8時間後には、RNase T<sub>2</sub> の酵素活性はほぼ完全に消失した。こうして得られた CM-T<sub>2</sub> を Sephadex G-25 で脱塩後、ブロムシオン分解でメチオニル結合を切断し、2-メルカプトエタノールでシスチンを還元後 S-3 ミノエチル化し、HPLC で AE-CM-F-2, AE-CM-F-3 フラグメントに分離した。これらの断片のアミノ酸組成を表 2-3 に示す。

表 2-3

CM-T<sub>2</sub>では、Hisが1~1.5個減少し、3-N-カルボキシメチルヒスチジン (3-N-CM-His) が生成していることが明らかになった。3-N-CM-Hisは、アミノ酸分析において、Alaのすぐ後に溶出される<sup>(6)</sup>。また His 以外のアミノ酸の分析値は、修飾の前後でほとんど変化がなかった。

AE-CMF-2 フラグメントは、Hisを3個 (His 110, His 115, His 182) 含んでいるがカルボキシメチル化反応後のアミノ酸分析結果からでは、ほぼ1個減少しており、それに代わって 3-N-CM-His が検出された。また AE-CMF-3 フラグメント中には、His 53 のみが存在するが、His は約 0.5 個しか回収されず、3-N-CM-His の存在が確認された。

以上の結果から、AE-CMF-2 フラグメント中の3個の His の1個、AE-CMF-3 フラグメント中の His 53 の0.5個がカルボキシメチル化されているものと判断した。そこで、AE-CMF-2 フラグメント中の3個の His のうち、どの His がカルボキシメチル化されているかを

決定するために、*Achromobacter lyticus* プロテアーゼ I 分解を行ないペプチドマッピングを行なった。図 2-19 にその結果を示した。

### 図 2-19

His 110 は、38分付近に溶出するピークに存在し (Tyr 96 ~ Lys 114; (b) の CM-4 に相当), His 115 を含むペプチド (His 115 ~ AECys 118) は、8分付近に Lys 236 ~ Asn<sub>CHO</sub> 239 ペプチドと重なって溶出した。また His 182 は 34分付近のピーク (Arg 171 ~ Lys 185, (b) の CM-3 に相当) に含まれていた。モノヨード酢酸で修飾したペプチドマッピング (b) の図) と、比較すると、His 110 は (b) の CM-4, His 182 は、CM-3 にそれぞれ含まれ、未修飾の酵素からの AEF-2 フラグメントのペプチドマッピングで得られたピークと溶出時間、アミノ酸分析共に同一であった。また、それらと同じアミノ酸組成を持つ他のピークは見られなかったことと、CM-3, CM-4 のペプチドの収率は、それぞれ 35%, 28% であり、未修飾酵素からの場合の収率とはほぼ同じであった。

ことから、His 110, His 182 には、モノヨード酢酸は反応してゐないことが判明した。

His 115 を含むペプチドのピークは、未修飾酵素の対応するピークより約1分早く溶出し、(CM-1)、Lys 236 ~ <sup>CHO</sup>Asn 239 (CM-2) と完全に分離して得られた。CM-1 は、アミノ酸組成(表 2-4) から明らかたように、3-N-CM-His を1個含み、その他のアミノ酸の組成は、His 115 ~ AECys 118 部分のペプチドのアミノ酸組成に一致した。また CM-2 のアミノ酸組成値から、His 115 ~ AECys 118 のペプチドはもはやここに含まれてゐないことが確認された。

表 2-4

従ってカルボキシメチル基は、His 115 のみに、ほぼ定量的に導入されてゐることが明らかになった。

なお、16分、31分付近に新たに出現、あるいは、吸光度が高くなつてゐるピークは、アミノ酸分析の結果、<sup>207</sup>Gly ~ <sup>225</sup>AECys ~ <sup>231</sup>Lys のペプチドが <sup>225</sup>AECys で切断されて2つに分かれて生じたも

のであり、Hisの修飾とは無関係のピークであった。また同様に20分、42分付近のピークも $^{186}\text{Lys} \sim ^{191}\text{AECys} \sim ^{206}\text{Lys}$ のパプキドが $^{191}\text{AECys}$ で切断されたことによるものである。これは、インタクトのAEF-2フラグメントのプロテアーゼ分解が完全ではなかったものと考えられる。

以上の結果は、RNase T<sub>2</sub>の触媒反応に115番目のHisと53番目のHisが関与していることを強く示唆するものである。

## 第5節 3-ニトロチロシン残基 ( $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ ) の位置検索

ニトロ化された Tyr の位置検索をするため、RNase T<sub>2</sub> を pH 8.5 で 1 時間、80 倍当量の TNM と反応させた試料について マッピングを行った。

3節-2, 3 で述べたようにこの条件では、3~4 個の Tyr がニトロ化されており、光 CID NP の実験結果から、それらは分子表面に露出し、3'-AMP の結合に関与する Tyr であることが明らかにされた。

ニトロ化 RNase T<sub>2</sub> ( $\text{NO}_2\text{-T}_2$ ) のペプチドマッピングは 4 節で記述した方法と全く同じ方法により、ブロムシロソ分解後還元 S-3 ミノエチル化を行ない、AE- $\text{NO}_2\text{-F-2}$  フラグメントと AE- $\text{NO}_2\text{-F-3}$  フラグメントに分離した。それぞれのフラグメントのミノ酸分析値を表 2-5 に示した。

表 2-5

RNase T<sub>2</sub> の一次構造によれば、F-2 フラグメントは、Tyr を 12 個 (Tyr 96, 100, 127, 130, 139,

153, 169, 188, 201, 203, 214, 232) 含んでおり、F-3 フラグメントは、Tyr 64, 74, 92 の 3 個だけを含む。アミノ酸分析の結果は、AE-NO<sub>2</sub>-F-2 フラグメント中には、2~3 個、AE-NO<sub>2</sub>-F-3 フラグメント中には、1 個の NO<sub>2</sub>-Tyr の存在が予想されたので、まず、分析しやすい AE-NO<sub>2</sub>-F-3 フラグメントのマッピングを行なった。AE-NO<sub>2</sub>-F-3 フラグメントを *Achromobacter lyticus* プロテアーゼ I で分解し、HPLC で未修飾 AEF-3 フラグメントとのマッピングの比較を行なった。図 2-20 にその結果を示した。

### 図 2-20

クロマト条件は AEF-3 フラグメントの一次構造決定において用いた系と同一なので、3 個の Tyr 含有ペプチドは ピーク 1 と 2 に溶出される。ピーク 1 は、Tyr 64 を含む Asp 61 ~ AECys 68, ピーク 2 は、Tyr 74, 92 を含む Ser 71 ~ HSer 93 である。図 2-20 から明らかのように、ピーク 1 はニトロ化により消失しており、その代わりに 5 分程遅れた位置に新た

存ピーク (NO<sub>2</sub>-1) が出現した。ピーク 2 には、修飾による溶出位置の変化は全くみとめられない。

NO<sub>2</sub>-1 画分のアミノ酸分析の結果、このペプチドは、Asp 61 ~ AE Cys 68 に相当し、Tyr 1 個の消失と NO<sub>2</sub>-Tyr 1 個の存在がみとめられた。(表 2-5 参照)。またピーク NO<sub>2</sub>-2 のアミノ酸組成は、未修飾酵素から得られたピーク 2 と同一アミノ酸組成を示し、その他のピークにも同様に NO<sub>2</sub>-Tyr は、検出されなかった。従って、Tyr のニトロ化は 64 番目の Tyr のみにおこっていると結論した。なお、AE-NO<sub>2</sub>-F-2 フラグメント中の NO<sub>2</sub>-Tyr の位置検索は今後ひまづき行なう予定である。

## 第四章 考察

才1節 活性部位の His について、

RNase T<sub>2</sub> は、モノユード酢酸との反応によって His 115 がカルボキシメチル化され、酵素活性を失う。また His 53 も同時に 50% カルボキシメチル化されたことから、RNase T<sub>2</sub> の活性部位は His 115 と His 53 が対峙して存在し、RNase A の His 12 と His 119 に対峙する触媒基ペアとして、触媒機能の発現に関与していることが考えられる。しかし詳細に比較すると、RNase A は、モノユード酢酸との反応で His 119 のイミダゾール基の N(1)位が、His 12 は N(3)位が、それぞれカルボキシメチル化<sup>(50)</sup>され、それぞれ同時に修飾<sup>(51)</sup>されないが、RNase T<sub>2</sub> では His 115 も His 53 もイミダゾール基の同じ N(3)位が、カルボキシメチル化されるという点において異なっている。

また RNase T<sub>1</sub> の場合のよう<sup>(52)</sup>な、Glu 残基へのカルボキシル基の導入の有無については、<sup>14</sup>C でラベルしたモノユード酢酸を用いて実験をしてい

ないので、その可能性は完全には否定できない。  
 しかし、Gluの $\gamma$ -カルボキシル基がエステル化されたペプチドが、存在するならば、ペプチドマッピングにおいても他のペプチドの溶出時間と異なり、容易に検出されるはずである。今回の実験では比較的短いペプチドが生成しているにもかかわらず、そのようなペプチドは見あたらなかったことから、おそらくGluにはカルボキシル化は起こっていないものと考えてよいだろう。

図1-7に示したH-1, H-2のpH滴定曲線からpKaを求めたときのHill係数は、いずれも1よりも小さい値であった。RNase AにおいてもHis 12とHis 119のNMR滴定曲線のHill係数は、それぞれ0.67, 0.79と1よりも小さく、これらは活性部位のHis 12とHis 119が静電気的相互作用をしているためであると考えられている<sup>(53)</sup>。従ってRNase T2においても、H-1; H-2のHisにRNase Aの場合と同様の静電気的相互作用が存在するものと考えられ、

His 115, His 53 に対応する H-1, H-2 (順不同)は触媒機能に直接関与するアミノ酸残基であると考えられる。

本研究では H-1, H-2 の His 115, His 53 への帰属を行なうことができなかったが、H-1 の  $pK_a$  が 7.2, H-2 の  $pK_a$  が 6.4 である点と、モノヨード酢酸によるアルキル化反応の結果とを考慮して、この点について若干の考察が可能である。この修飾は、pH 5.6 で行なっていることに注目すると、 $pK_a$  7.2 の H-1 のイミダゾール基は、約 98% がプロトン化しており、求核種として働くものは、2% 余りにすぎない。一方、H-2 のイミダゾール基の  $pK_a$  は 6.4 であるので、脱プロトン化状態の分子種が約 14% である。仮に、RNase T<sub>2</sub> の活性部位に存在するヒスタジン残基の反応性がその  $pK_a$  のみに従うと考えれば、 $pK_a$  6.4 の H-2 が、 $pK_a$  7.2 の H-1 より多く修飾されるであろう。従ってそのようになっているとすれば、H-2 は His 115 で、H-1 は His 53 と帰属される。

ここで His 115 の  $pK_a$  が 6.4, His 53 の  $pK_a$  が 7.2 として、これまでに得られた結果を考えてみよう。

まずオ第三章に述べたように、DEP によって修飾される His は 115 番目であり、この残基は分子表面に露出している。したがって 3'-AMP や、リン酸イオンが活性部位に結合すると、DEP による求電子的な攻撃をうけなくなり酵素活性を維持する。

3'-AMP が結合すると、His 115 (H-2) と His 53 (H-1) の  $pK_a$  が上昇するのは、結合した 3'-AMP の 3'位のリン酸基の負電荷によるものであると解釈できる。

光cIDNPにおいて観測された His 115 のシグナルは、3'-AMP を共存させると消失するが、その原因として分子表面に存在する His 115 は、活性部位に結合した 3'-AMP に覆われて、フラビンとの相互作用ができなくなったためだと解釈される。

RNase T<sub>2</sub> の活性部位に存在する His 53, His 115 の諸性質を RNase A の His 12, His 119,

RNase T<sub>1</sub> の Glu 58, His 40, His 92 と比較した結果を表 2-6 に示す。

### 表 2-6

この表を一見してわかるように、RNase T<sub>2</sub> の活性部位に存在する 2 つのヒスチジン残基の特性や環境が、RNase A と似ているのか、RNase T<sub>1</sub> と似ているのか即断するのは容易でない。しかし、RNase T<sub>2</sub> の pH 5.5 でのモノヨード酢酸との反応では、Glu のエステル化ペプチドが検出されなかったことと、His 53 と His 115 が同時にカルボキシメチル化されて失活したことを考えると、RNase T<sub>2</sub> は RNase T<sub>1</sub> よりも、RNase A に似た触媒部位を形成していると考えられる。

才又節, 活性部位の Tyr について、

才三章で述べたように、RNase T<sub>2</sub>には、分子表面に露出している Tyr が3個以上存在していることが明らかにあったが(図2-11参照)、このうち2残基(Y-2とY-1)は、3'-AMPの共存下では、CIDNPシグナルが消失することから、活性部位に存在すると考えられる。さらに、RNase T<sub>2</sub>のTNMとの反応により3~4個の Tyr がニトロ化され(表2-5参照)未修飾酵素で観測されていたCIDNPシグナルが消失した(図2-17参照)。従ってニトロ化された Tyr は、活性部位に存在していると考えてよいであろう。また RNase T<sub>2</sub>の酵素活性は、ニトロ化しても75%を維持しているので、修飾された Tyr は触媒基というよりも基質結合に関与する残基であると推定される。ニトロ化 RNase T<sub>2</sub>の分析から、修飾チロシン残基の一つとして Tyr 64 が同定され、この残基が、3'-AMPとの結合に関与する可能性が示唆される。

RNase T<sub>1</sub><sup>(34)</sup>では、Tyr 42の主鎖と Tyr 45の間ではすみ込むように基質のグアニン塩基を結合していることが明らかにされている。RNase T<sub>2</sub>でもそのような基質結合様式をしているのかどうかについては、今後の検討が必要である。

オ3節 RNase T<sub>2</sub>の触媒機能関与了ミノ酸残基と、その環境について、

以上述べてきた結果をまとめると、RNase T<sub>2</sub>の活性部位には、His 53, 115 とさらに少なくとも2つの Tyr が存在し、触媒機能の発現に重要な役割を果たしていると考えてよいであろう。115番目と53番目のヒスチジン残基は触媒反応に直接あずかる了ミノ酸残基、Tyr 64は基質の塩基の結合に関与する可能性が高い。

CIDNPの実験結果から触媒基である、His 115と基質結合に関与すると予想される2つの Tyr は、分子表面にかなり露出していると考えられる。また His 53は露出度が高いとは言えないが、H-D交換の実験、モノユード酢酸との反応性を考慮すると、半ば分子内部に埋もれているものと推定される。

## 結 語

本研究において高分子型のヌクレアーゼである RNase T<sub>2</sub> の一次構造は、低分子型の RNase T<sub>1</sub> や RNase A とほとんど似ていないことが明らかになったが、同じ菌の産生する高分子型酵素であるヌクレアーゼ S<sub>1</sub> との構造比較は、その一次構造が未決定であるので現在のところできない。もし基質特異性の厳格性と分子量の大きさに類似性を求めるならば、RNase T<sub>2</sub> が、RNase T<sub>1</sub> よりもむしろ分子量3万6千のヌクレアーゼ S<sub>1</sub> に一次構造上の類似性がみとめられるかも知れない。基質が RNA と DNA という差があるもののヌクレアーゼ S<sub>1</sub> の一次構造が明らかにされることを期待したい。

RNase T<sub>2</sub> と、RNase T<sub>1</sub>、RNase A は、リボヌクレアーゼという点においては、同じ機能を持つ。本研究の結果、RNase T<sub>2</sub> の触媒機能に関与するアミノ酸残基として His 115, His 53, Tyr 64 を同定することができた。いずれの残基

も、他の2つのリボヌクレアーゼ中に存在し、酵素作用に関与するアミノ酸としてみとめられているものである。もしこれら2つのHisが触媒基とすれば、低分子量のRNase AのHis 12, His-119-と同様の役割がこれらのヒスチジン残基に期待される。

RNase T<sub>1</sub>のような低分子型から、RNase T<sub>2</sub>のようなモノマータイプの高分子型、さらにEco RI, RNAポリメラーゼのようなオリゴマータイプの分解酵素や合成酵素などの研究は、生物の基幹物質である蛋白質と核酸の相互作用メカニズムの解明に重要な手がかりを与える。従って、核酸の生物学的意義を考えると、その合成、分解、機能の制御、安定化などに関与する蛋白質の研究は、極めて重要であり、比較的小さい分子でかつモノマー酵素として機能を発揮するリボヌクレアーゼの研究は、その第一歩として意義のあるものと考えられる。

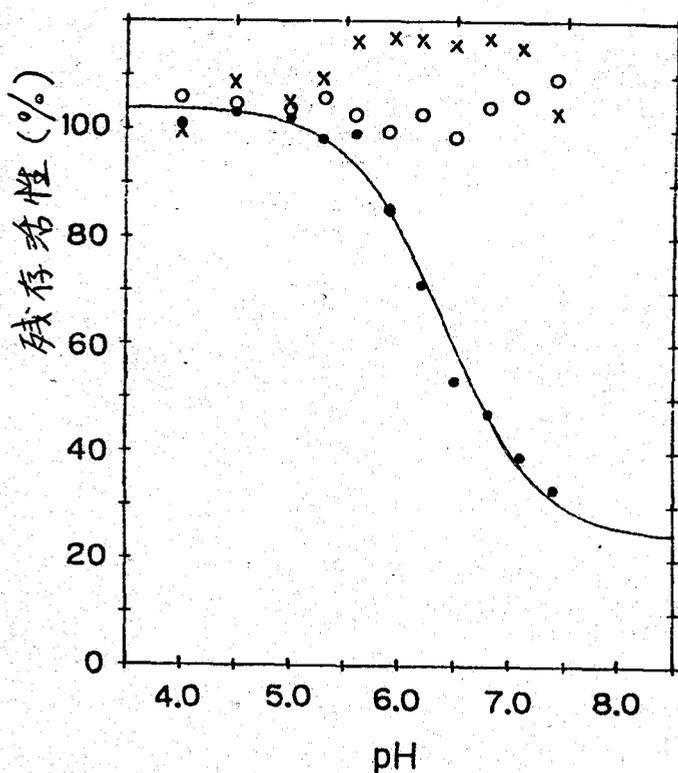


図 2-1. RNase T<sub>2</sub> のジエチルピロカ-ボネイト  
による失活と pH との関係

- RNase T<sub>2</sub> : 1 mg/μl
- : 0.1M クエン酸緩衝液中, 曲線の中点の pH は 6.4
  - x : 0.4M クエン酸-リン酸緩衝液中
  - o : 10mM 3'-AMP を含む, 0.1M クエン酸緩衝液中
- DEP : 3.6mM (RNase T<sub>2</sub> の 120 倍当量使用)
- 反応 : 23°C, 30 分間

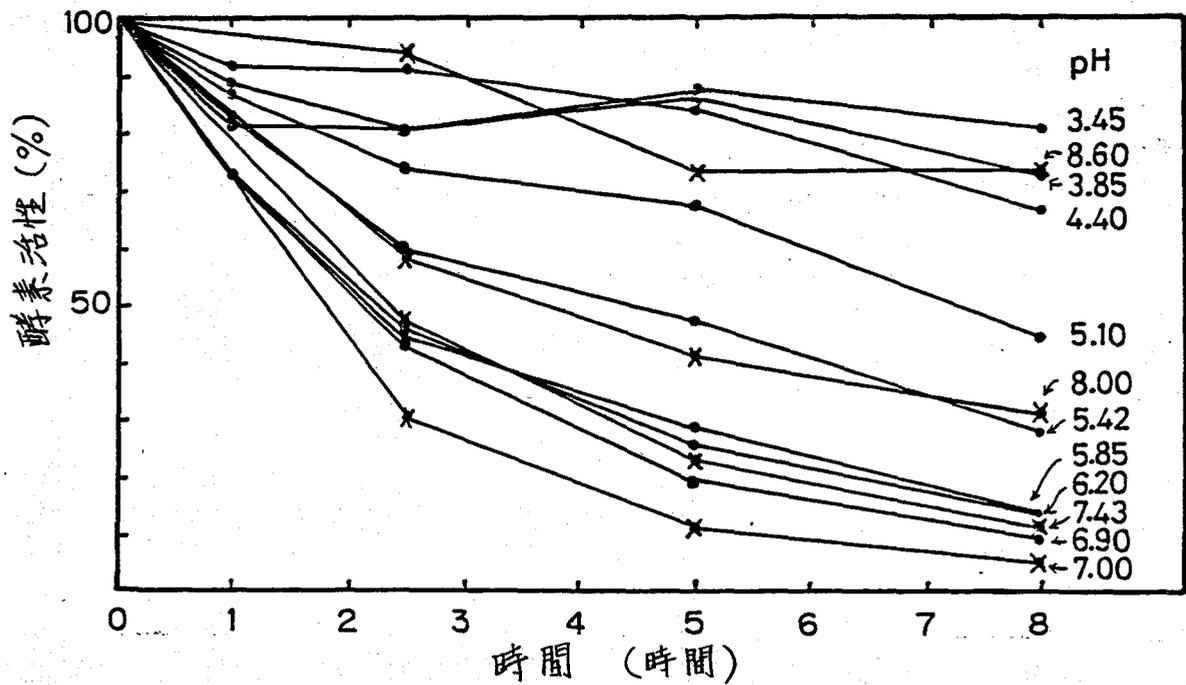


図2-2. RNase T<sub>2</sub>のモイヨード酢酸による 様々な pHでの失活の時間経過

RNase T<sub>2</sub> : 1mg/μl  
 緩衝溶液: 0.1M モイヨード酢酸を含む 0.5M グイン酸  
 緩衝溶液 (●), 0.5M Tris-HCl 緩衝  
 溶液 (×)  
 反応温度: 37°C

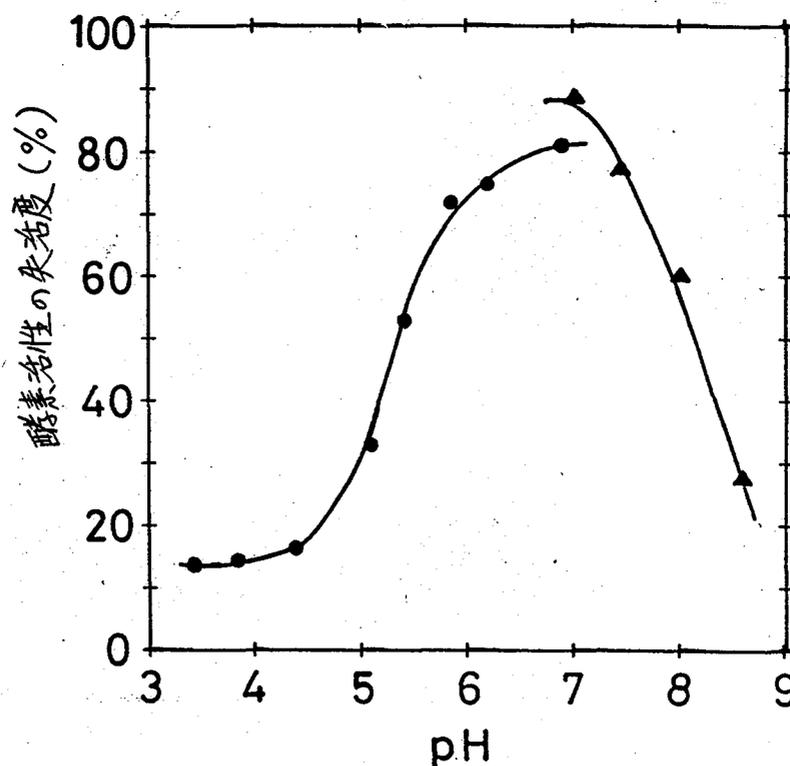


図2-3. RNase T<sub>2</sub> のモノヨード酢酸による5時間後の失活度とpHとの関係

RNase T<sub>2</sub> : 1 mg/μl  
 0.5M グリシン緩衝液中 (●)  
 0.5M Tris-HCl 緩衝液中 (▲)  
 モノヨード酢酸: 0.1M (RNase T<sub>2</sub> の 3000倍当量)  
 反応 : 37°C で 5時間

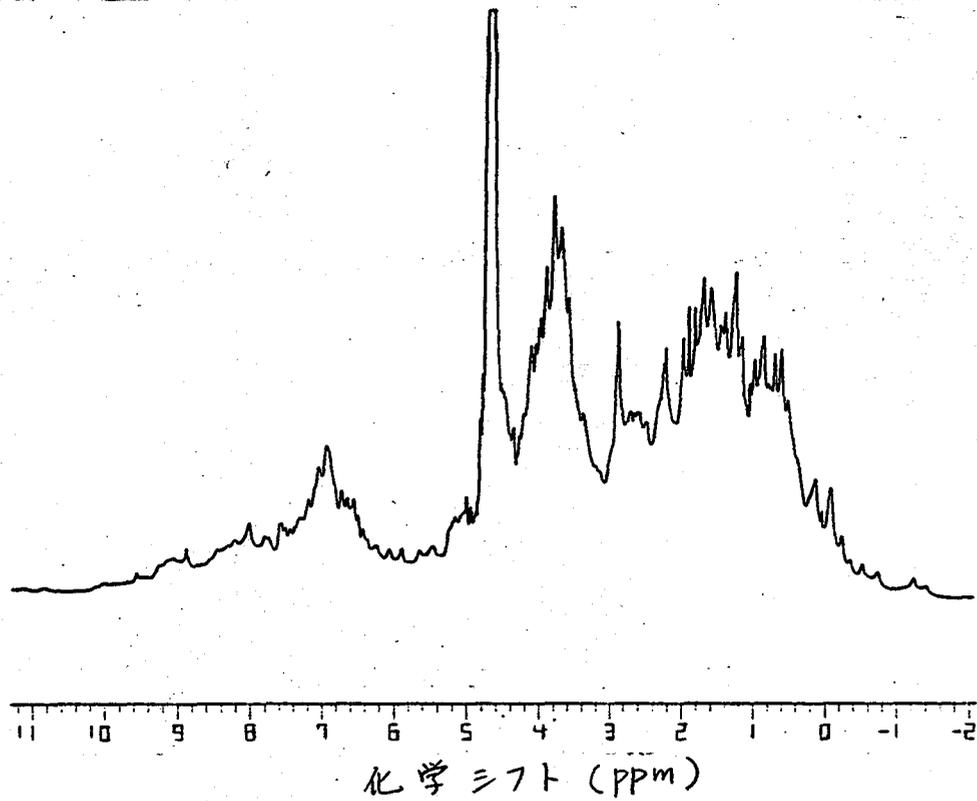


図 2-4. RNase T<sub>2</sub> の 500MHz <sup>1</sup>H-NMR スペクトル

1.4mM RNase T<sub>2</sub>, pH 4.5, 37°C で 2000 回積算  
化学シフトは H-O-DE 4.64 ppm とした。

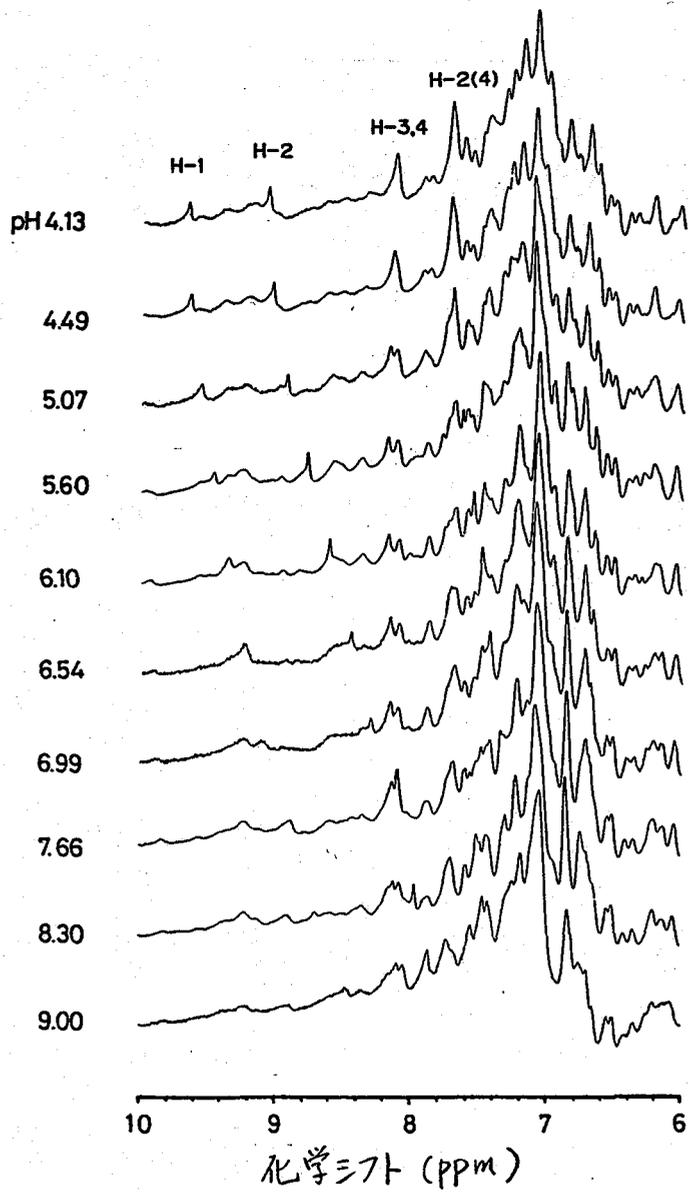


図 2-5. RNase T<sub>2</sub> 中のヒスタジンの NMR - pH 滴定

0.2M NaCl を含む 1.4mM RNase T<sub>2</sub>

37°C で, 1000 回積算. パルス繰り返し時間 約 1.5 秒

His の C(2) プロトンシグナルを低磁場から順に H-1, H-2, H-3, H-4 とした。H-3, H-4 は酸性では重なっているが中性付近では 2 つに別れる。H-3 は低磁場側のピーク。H-2(4) は H-2 の His の 4 位のプロトンによるシグナル。

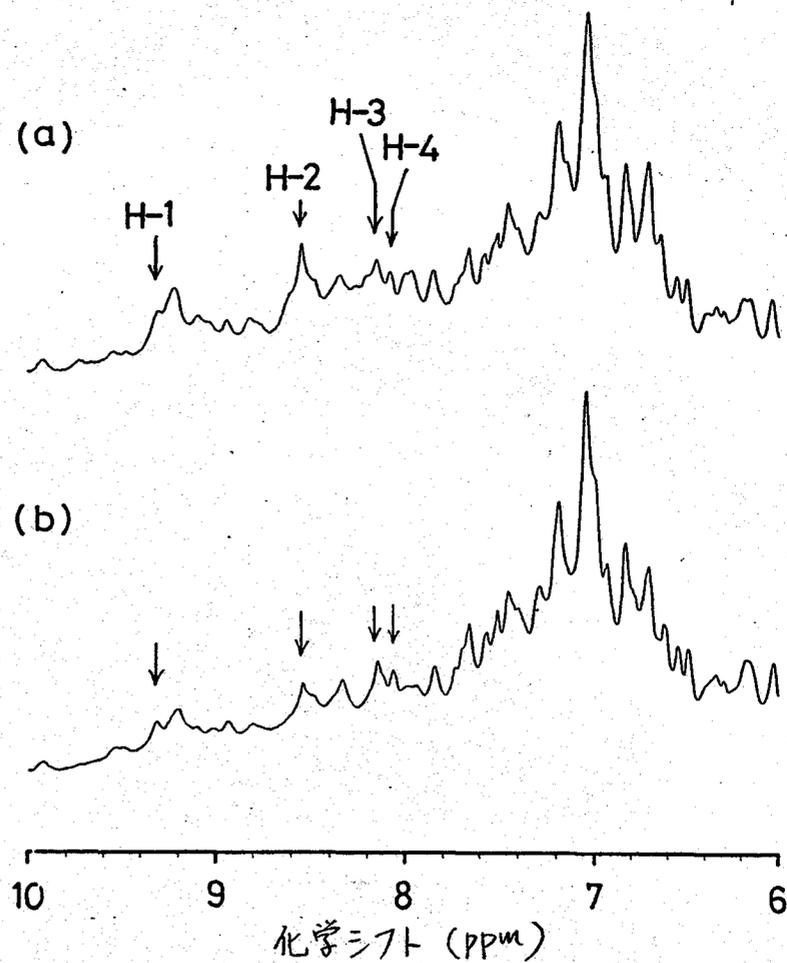


図 2-6. RNase T<sub>2</sub> のヒスタジン C-2 プロトンの H-D 交換

- (a) 0.2M NaCl を含む 0.7mM RNase T<sub>2</sub> , pH6.1, 37°C  
 (b) 0.2M NaCl を含む 0.7mM RNase T<sub>2</sub> , pH6.2, 37°C  
 ただし, 測定前に NMR キューブ中で pH7.5, 37°C,  
 43時間 インキベーションしたサンプル

(a) のスペクトルで 9.2ppm 付近のシグナルはアミドによるものと思われる。(図 2-5 参照)

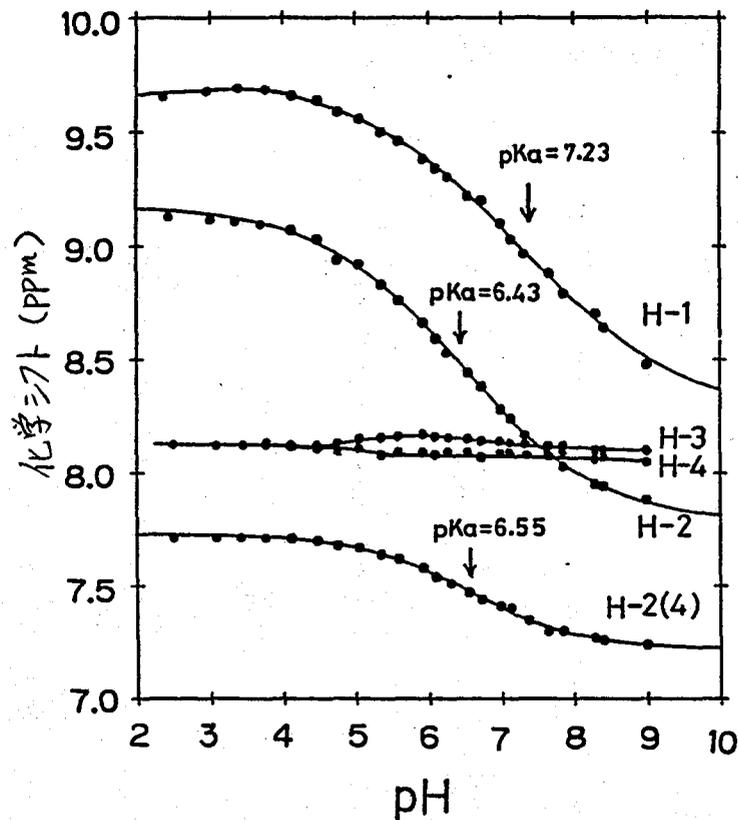


図 2-7. RNase T<sub>2</sub> 中のヒスタジンの NMR 滴定曲線

0.2M NaCl を含む 1.6mM RNase T<sub>2</sub>, 37°C で  
800~1000 回積算. パルス繰り返し時間 約 1.5 秒

H-1: pKa = 7.27, Hill 係数, 0.38  
 H-2: pKa = 6.43, Hill 係数, 0.45  
 H-2(4): pKa = 6.55, Hill 係数, 0.57  
 H-2 の 4 位の 7 プロトンに相当

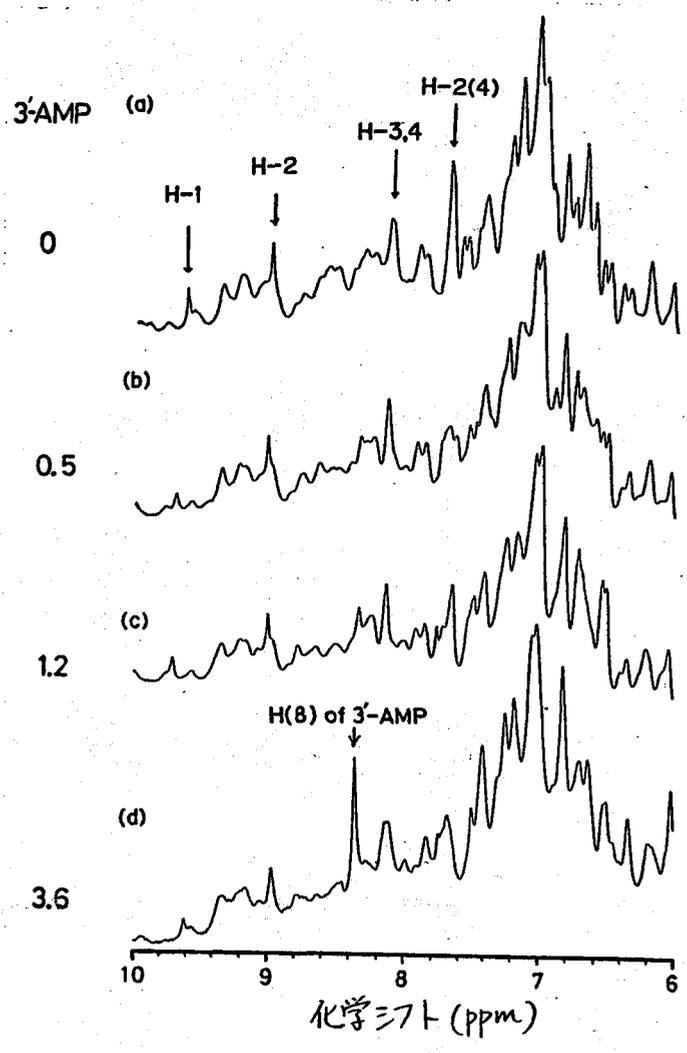


図 2-8. RNase T<sub>2</sub> に 3'-AMP を加えていった時の NMR スペクトルの変化

1.7mM RNase T<sub>2</sub> , 0.2M NaCl , 37°C

- (a) ネイティブ RNase T<sub>2</sub> , pH4.6
- (b) 0.5倍当量の 3'-AMP 存在 . pH4.7
- (c) 1.2倍当量の 3'-AMP 存在 . pH4.8
- (d) 3.6倍当量の 3'-AMP 存在 , pH4.7

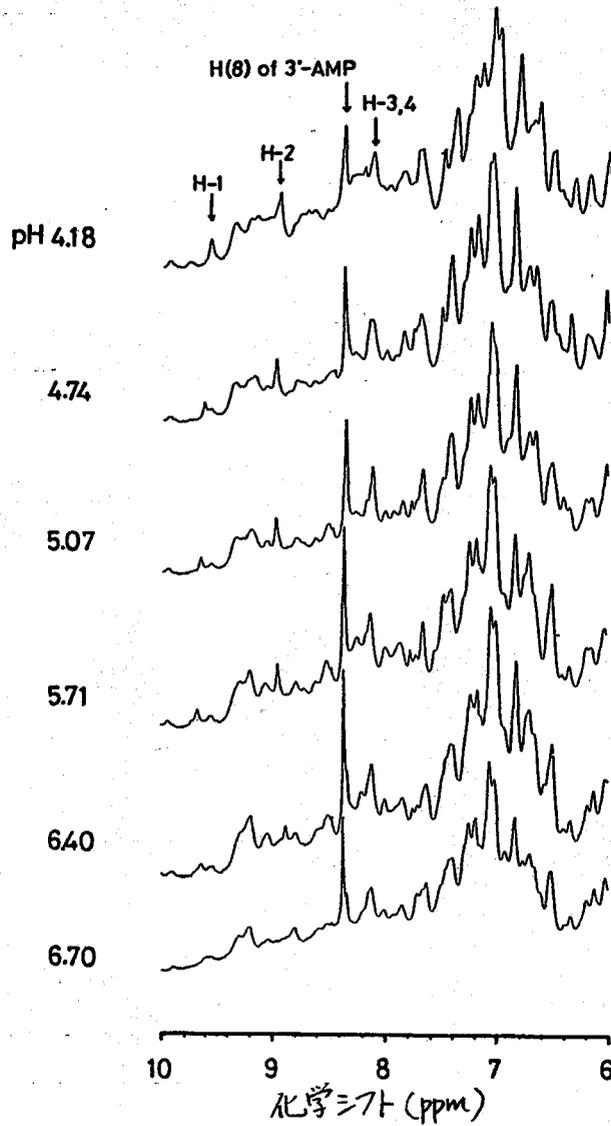


図2-9. 3.6倍当量の3'-AMP存在下でのRNase T<sub>2</sub>のヒスチジン残基のC(2)プロトンのNMR-pH滴定

1.7mM RNase T<sub>2</sub>, 0.2M NaCl, 37°C

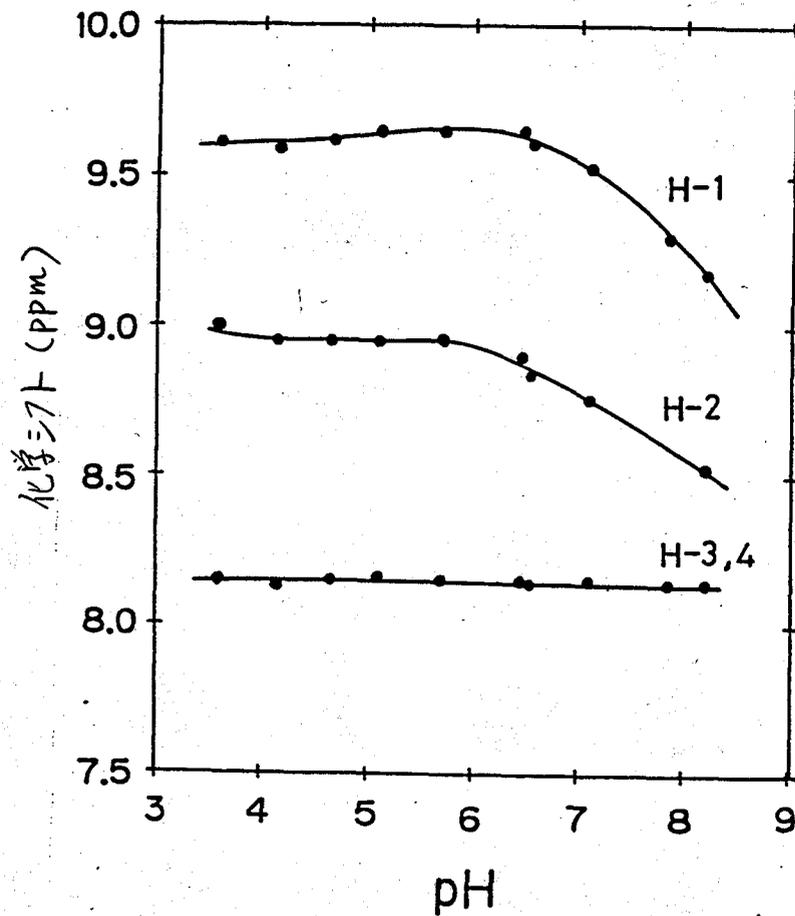


図2-10. 3.6倍当量の3'-AMPの存在下でのRNase T<sub>2</sub>のヒスタジン残基のpH滴定曲線

1.3mM RNase T<sub>2</sub>, 0.2M NaCl, 37°C

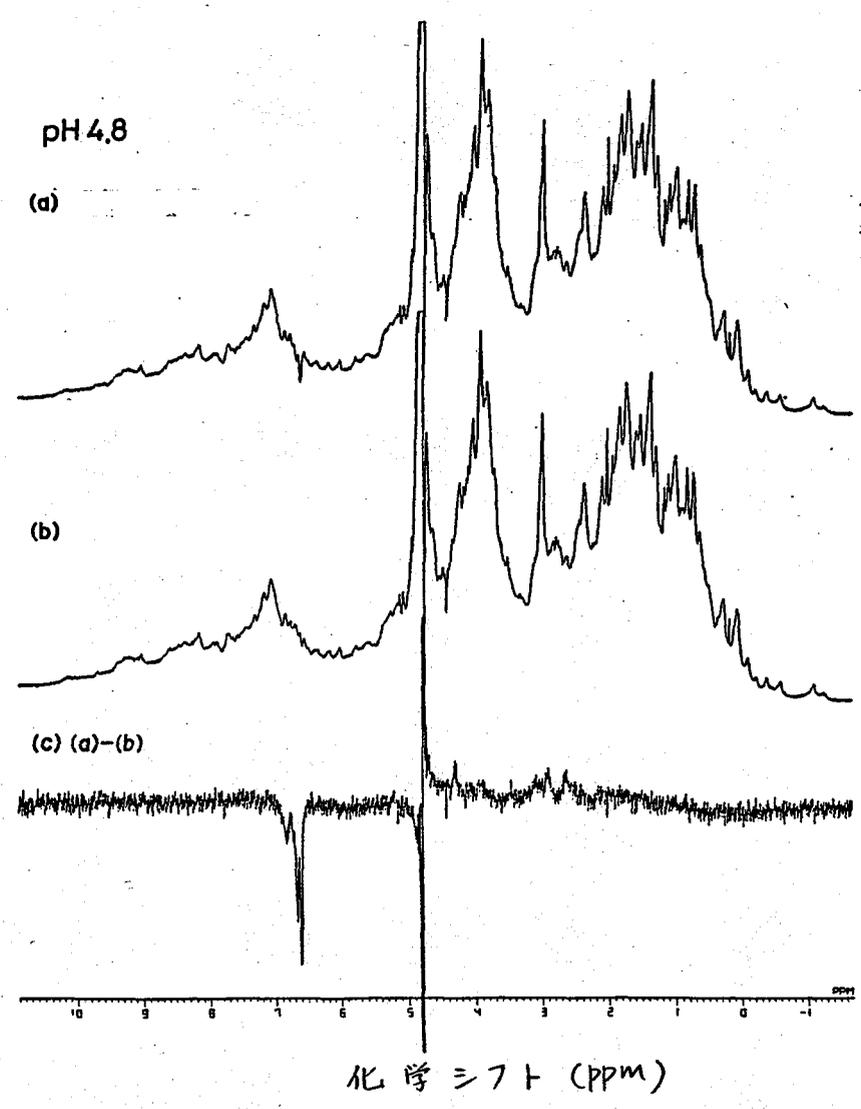


図2-11. RNase T<sub>2</sub> の 500MHz 光CIDNP (pH4.8)

1.1mM RNase T<sub>2</sub>, 0.2M NaCl, 0.2mM フラビン  
pH4.8, 25°C, 200回積算, L-ザ-出力1w (488nm)

- (a) 光を照射した時の NMR スペクトル
- (b) 光を照射しない時の NMR スペクトル
- (c) (a) のスペクトルから (b) のスペクトルを引いたもの

pH7.7

138

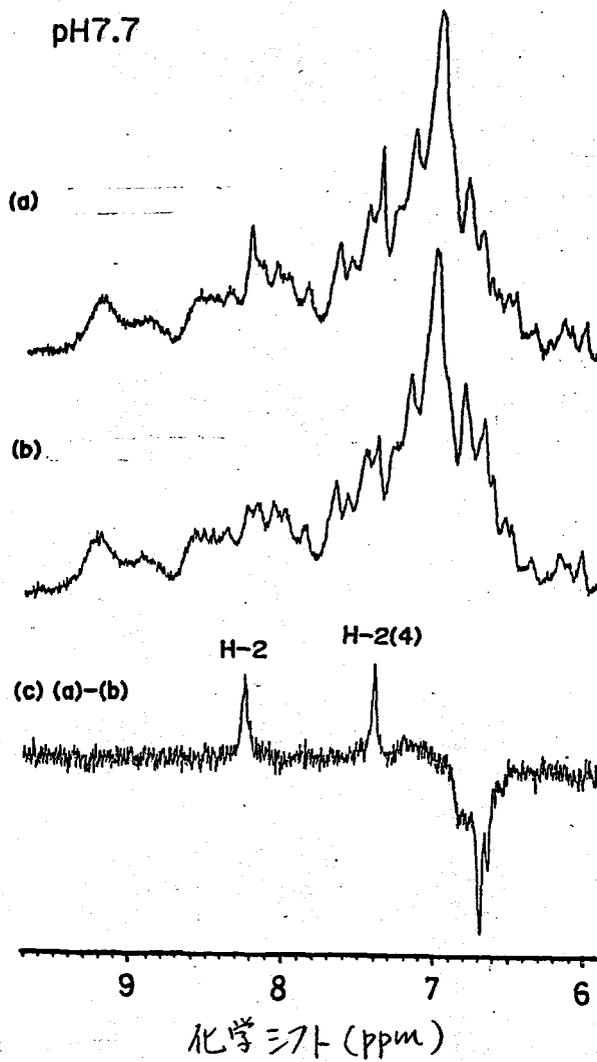


図 2-12. RNase T<sub>2</sub> の 500 MHz 光 CIDNP (pH 7.7)

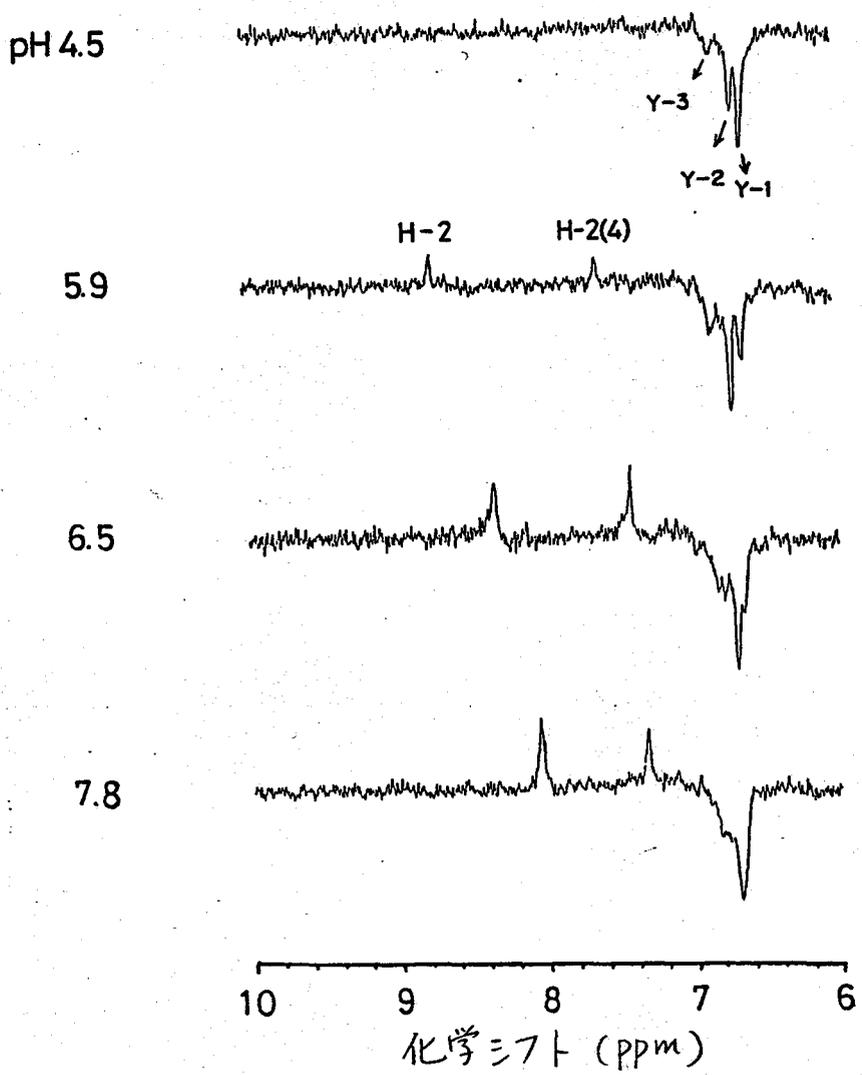
1.1mM RNase T<sub>2</sub>, 0.2M NaCl, 0.2mM フラビン  
pH 7.7, 25°C, 200回積算

H-2 : ヒスタジン, H-2(4) : ヒスタジン H-2 の 4 位のプロトン

(a) 光照射したときの NMR スペクトル

(b) 光照射しない時の NMR スペクトル

(c) (a) のスペクトルから (b) のスペクトルを引いたもの



図・2-13. RNase T<sub>2</sub> の 光CIDNP - pH 滴定

1.6 mM RNase T<sub>2</sub>, 0.2 M NaCl, 0.2 mM フラビン  
 24°C, 100回積算

Y-1, Y-2, Y-3 : Tyr の 3, 5 位の  $\gamma$  プロトンに由来 (3コ)  
 H-2, H-2(4) : His に由来 (1コ)

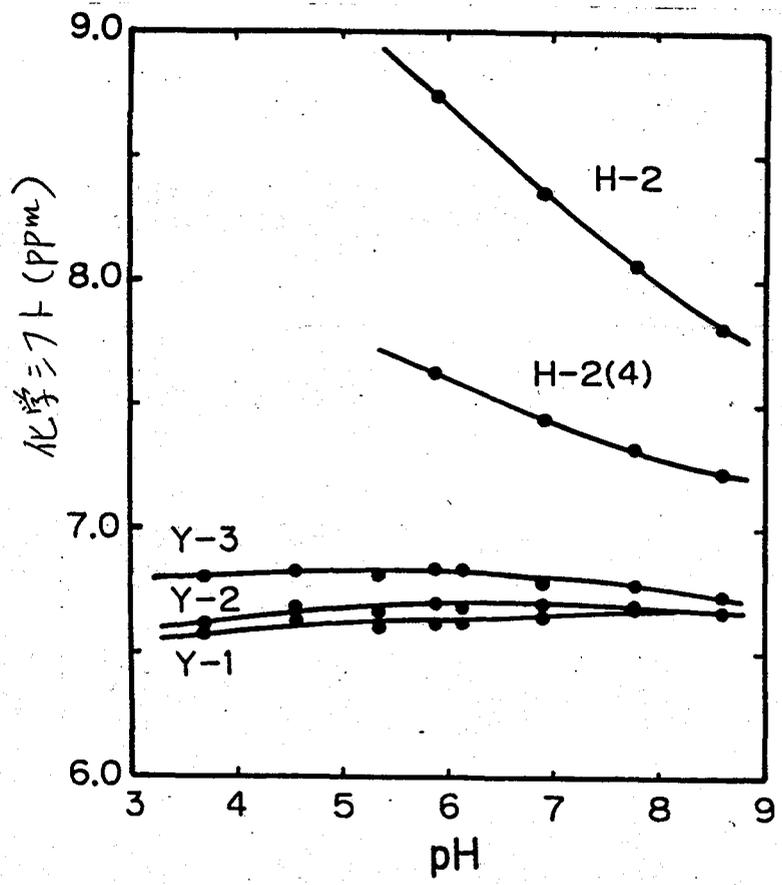


図 2-14. RNase T<sub>2</sub> の光CIDNP-pH 滴定曲線

1.6 mM RNase T<sub>2</sub>, 0.2 mM フラビン  
0.2 M NaCl, 24°C, 100 回積算

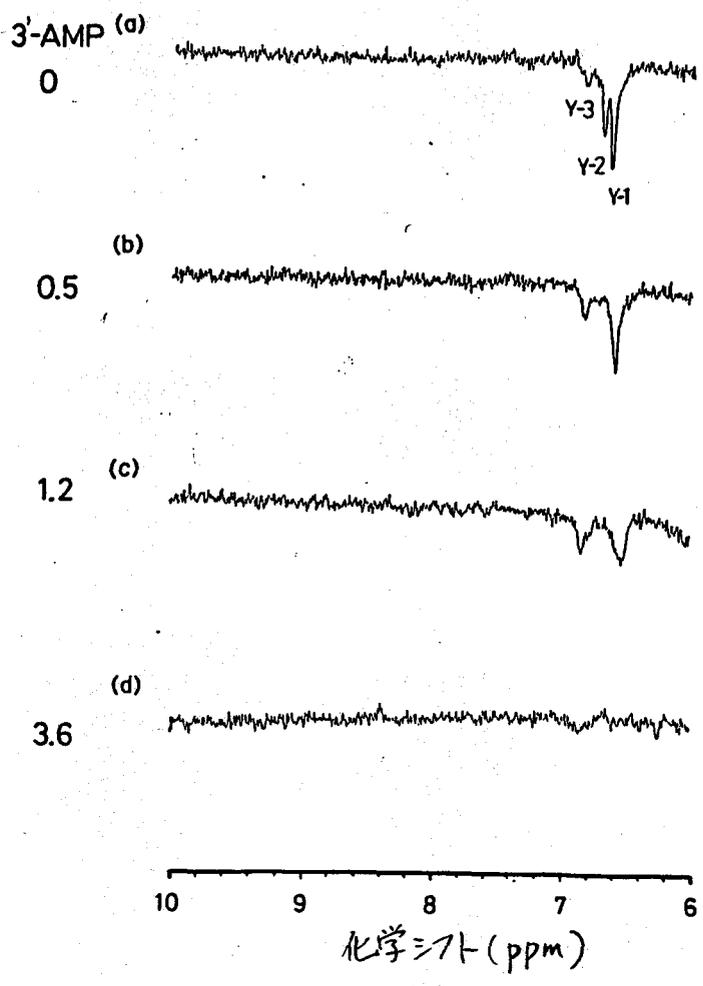


図 2-15. RNase T<sub>2</sub> に 3'-AMP を加えていた時のチロシンの CIDNP 変化

1.6 mM RNase T<sub>2</sub>, 0.2 M NaCl, 0.2 mM フラビン  
24°C, 100 回積算

- (a) 実行中 RNase T<sub>2</sub>, pH 4.5
- (b) 0.5 倍当量の 3'-AMP 存在下, pH 4.7
- (c) 1.2 倍当量の 3'-AMP 存在下, pH 4.8
- (d) 3.6 倍当量の 3'-AMP 存在下, pH 4.7

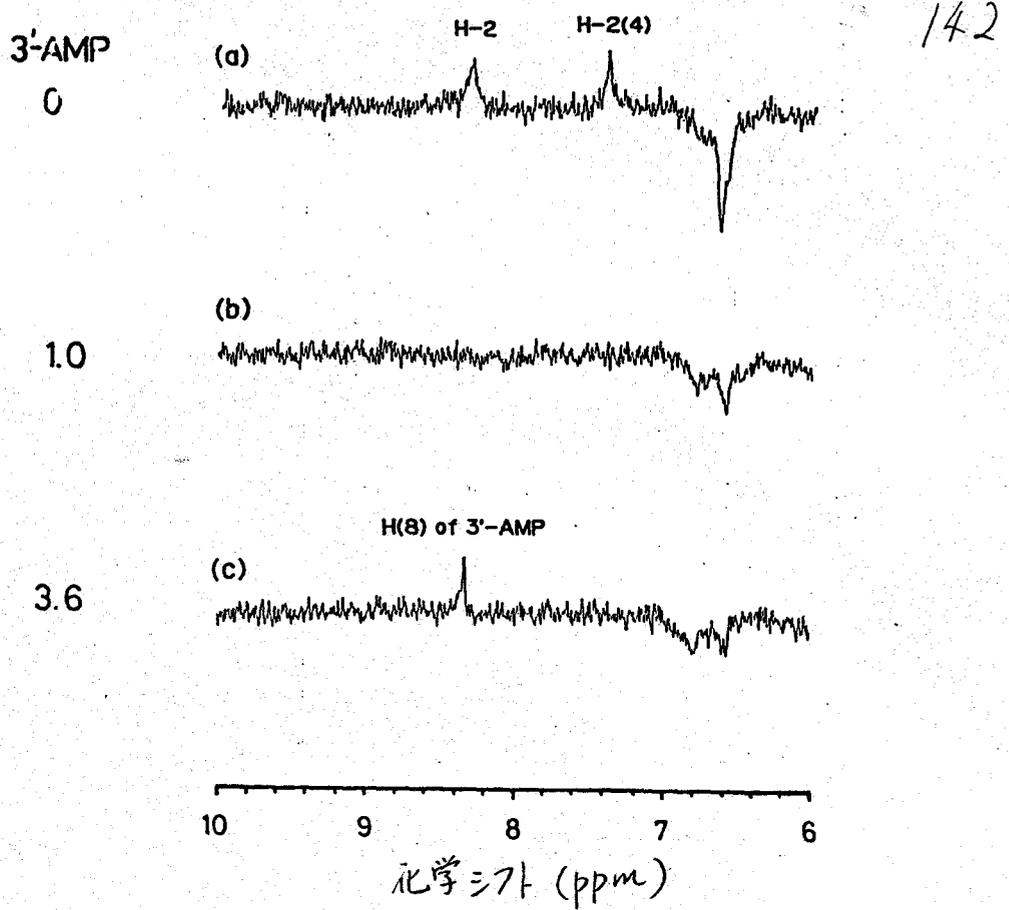


図 2-16. RNase T<sub>2</sub> に 3'-AMP を加えていった時のヒスチジンの CIDNP 変化

1.4mM RNase T<sub>2</sub>, 0.2M NaCl, 0.2mM 7-ラビン  
24°C, 100回積算

- (a) 未反応 RNase T<sub>2</sub>, pH 6.8
- (b) 1倍当量の 3'-AMP 存在下, pH 6.8
- (c) 3.6倍当量の 3'-AMP 存在下, pH 6.9

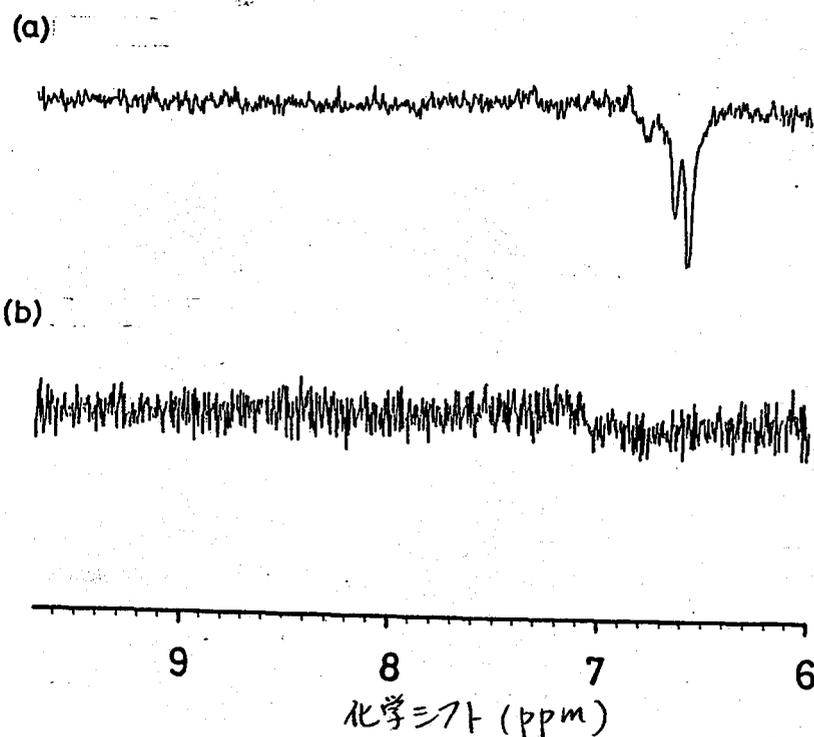


図2-17. RNase T<sub>2</sub> のCIDNPスペクトルの  
テトラニトロメタン修飾前後の比較

- (a) 1.4mM RNase T<sub>2</sub>, 0.2M NaCl, 0.2mM フラビン  
pH4.5, 24°C, 100回積算
- (b) 0.7mMのニトロ化されたRNase T<sub>2</sub>, 0.2M NaCl  
0.2mM フラビン, pH4.5, 24°C, 100回積算  
Y軸の倍率を(a)の2倍にあげている。

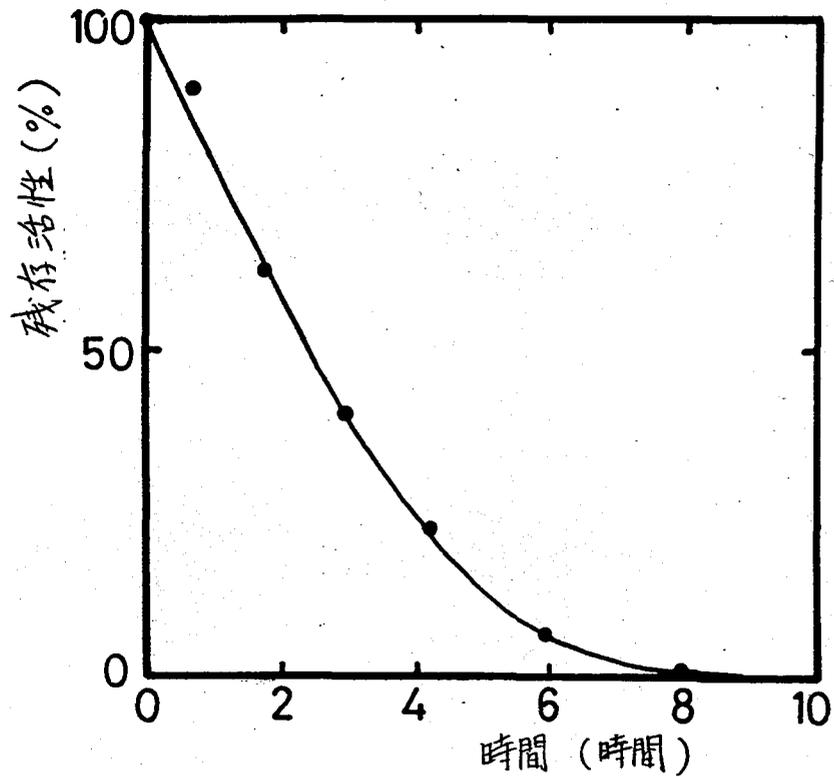


図2-18. RNase T<sub>2</sub> のモ)ヨード酢酸による失活の時間経過

RNase T<sub>2</sub> : 3mg/ml  
緩衝溶液 : 0.25M グイン酸緩衝溶液 (pH5.6)  
モ)ヨード酢酸 : 0.1M  
反応温度 : 37°C

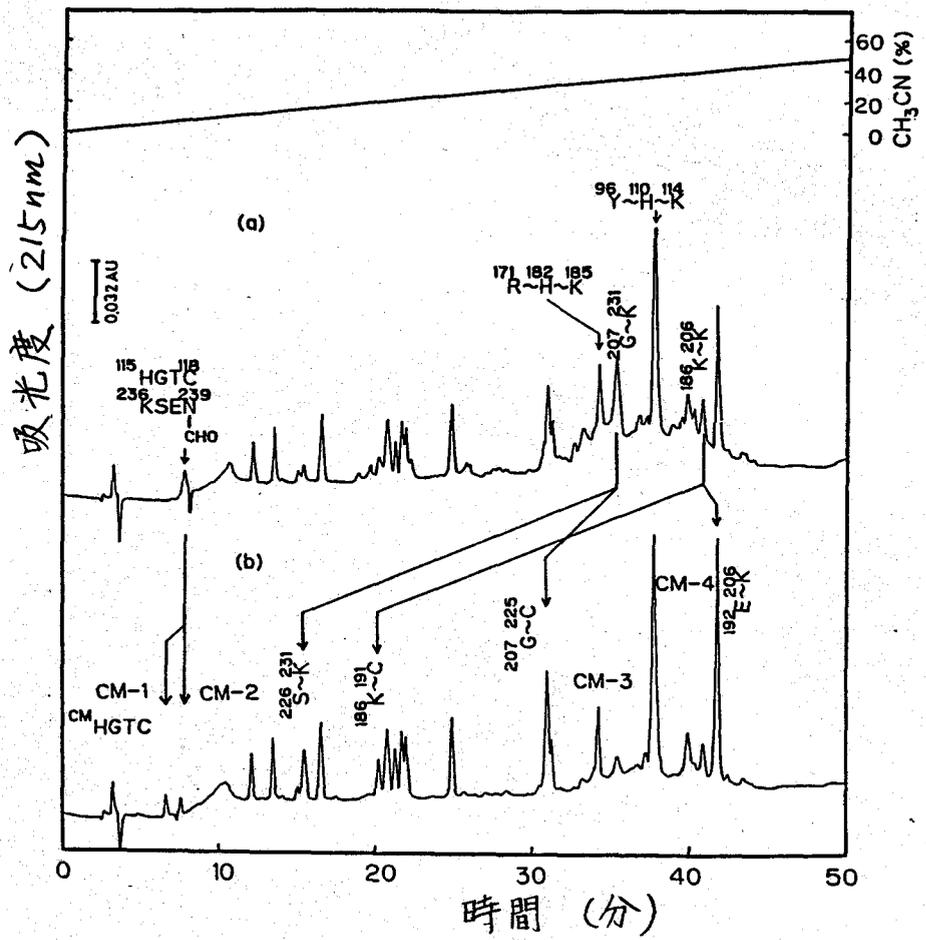


図2-19. モノヨード酢酸によって修飾された AEF-2 フラグメントのペプチド・マッピング

(a) インタクト AEF-2 フラグメントの *Achromobacter lyticus* プロテアーゼ分解物のペプチドマッピング 試料: 2 ナノモル

(b) モノヨード酢酸で修飾された AEF-2 フラグメントの *Achromobacter lyticus* プロテアーゼ分解物のペプチドマッピング 試料: 2 ナノモル

カラム: ODS-120A (4 x 250 mm)  
 溶媒: 0.1% TFA-CH<sub>3</sub>CN系

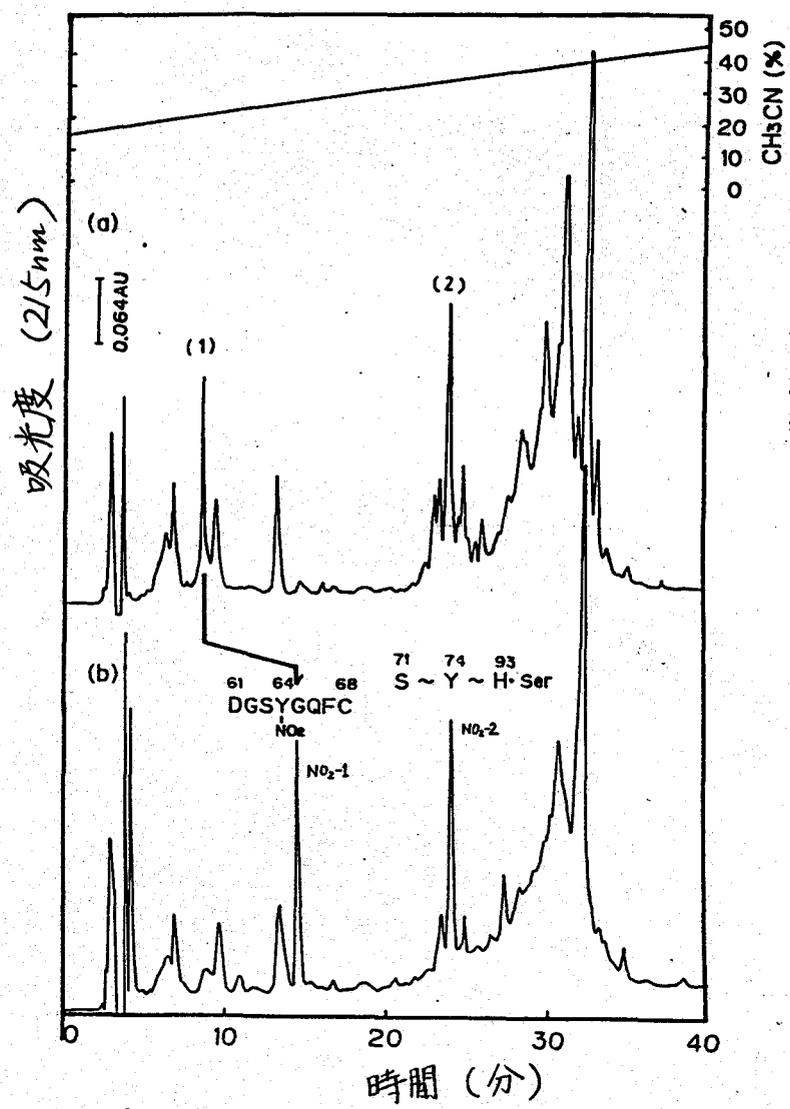


図 2-20. テトラニトロメタンにおいて修飾された AEF-3 フラグメントのヘプタド マッピング

(a) インタクト AEF-3 フラグメントの *Achromobacter lyticus* プロテアーゼ分解物のヘプタド マッピング

(b) テトラニトロメタンにおいて修飾された AEF-3 フラグメントの *Achromobacter lyticus* プロテアーゼ分解物のヘプタド マッピング

カラム: ODS-120A (4 × 250 mm)

溶媒: 0.1% TFA - CH<sub>3</sub>CN系

表 2-1. RNase T<sub>2</sub> のジエチルピロカボネイトとの反応

	DEP 濃度		
	0.3mM (10 倍当量)	3mM (100 倍当量)	30mM (1000 倍当量)
活性 (%)	110	56	0

RNase T<sub>2</sub> : 100 μg/ml, 0.1M グイン酸緩衝溶液 pH6.0

反 応 : 23°C, 30分, 最終ジオキサン濃度 10%.

表 2-2. RNase T<sub>2</sub> の テトラニトロメタン との 反応

	pH		
	7.8	8.1	8.5
活性 (%)	97	93	75
NO <sub>2</sub> -Tyr (モル/モルタンパク)	0	0.6	2.4

テトラニトロメタン : RNase T<sub>2</sub> の 80倍当量

緩衝液 : 50mM Tris-HCl

反応 : 23°C, 1時間, 最終イソール濃度 0.5%

NO<sub>2</sub>-Tyr : アミノ酸分析から計算されたもの

表 2-3. モノイオド酢酸によって修飾された RNase T<sub>2</sub> と  
そのフラグメントのアミノ酸組成

	CM-T <sub>2</sub>	AECM-F-2	AECM-F-3
Asp	27.4 (26.2)	15.9 (16.1)	11.6 (11.7)
Thr	12.8 (12.3)	7.4 (6.7)	5.5 (5.7)
Ser	21.1 (19.0)	10.9 (10.2)	10.4 (10.5)
Glu	25.3 (25.7)	16.5 (16.4)	10.4 (9.5)
Pro	15.4 (15.0)	7.6 (7.3)	7.4 (7.5)
Gly	17.6 (17.0)	11.0 (11.0)	7.0 (6.8)
Ala	12.0 (12.0)	9.2* (8.0)	4.7* (3.9)
Cys	2.9 (3.4)		
Val	3.7 (3.8)	2.8 (2.7)	1.1 (0.9)
Met	0.9 (0.9)		
Ile	13.2 (12.8)	9.9 (9.7)	3.7 (3.9)
Leu	14.0 (14.1)	8.5 (8.7)	6.8 (6.7)
Tyr	14.2 (14.0)	11.4 (11.2)	2.9 (3.0)
Phe	7.8 (7.3)	3.3 (2.8)	4.9 (4.8)
Lys	17.9 (17.3)		
His	<u>2.4</u> ( <u>3.6</u> )	<u>1.8</u> ( <u>2.6</u> )	<u>0.4</u> ( <u>0.8</u> )
Trp	2.0 (1.8)	2.0 (1.5)	0.5 (0.5)
Arg	3.0 (2.9)	1.0 (1.2)	2.0 (1.9)
H-Ser(L)			0.6 (0.7)
Lys+AE-Cys		17.7 (17.5)	7.1 (6.9)
3-N-CM-His	+	++	+

かこ内の値は非修飾のもの値を示す

\* : 3-N-CM-His を含んだ値

表 2-4. AECM-F-2フラグメントのマッピングでヒスタジンを  
含むペプチドのアミノ酸組成

	CM-1	CM-2	CM-3	CM-4
AE-Cys	0.9 ( 1 )			
Asp		0.8 ( 1 )	1.1 ( 1 )	3.8 ( 4 )
Thr	0.9 ( 1 )			
Ser		0.9 ( 1 )	1.7 ( 2 )	
Glu		1.0 ( 1 )	1.7 ( 2 )	
Pro				1.1 ( 1 )
Gly	1.0 ( 1 )		1.0 ( 1 )	1.0 ( 1 )
Ala			2.6 ( 3 )	
Val				
Ile			1.6 ( 2 )	
Leu			1.0 ( 1 )	
Tyr				1.8 ( 2 )
Phe				1.0 ( 1 )
Lys		0.9 ( 1 )	1.0 ( 1 )	1.0 ( 1 )
His			0.8 ( 1 )	0.8 ( 1 )
Trp				2.0 ( 3 )
Arg			0.9 ( 1 )	
3-N-CM-His	0.9 ( 1 )			
グルタミン		+		
計	4	4	15	19
	115 118	236 239	171 185	96 114
	CM <sub>H</sub> - C	K - N <sub>CHO</sub>	R - K	Y - K

かこ内の値はアミノ酸配列から予想される残基数を示す

表 2-5. テトラニトロメタンにより修飾された RNase T<sub>2</sub> とそのフラグメントのアミノ酸組成

	NO <sub>2</sub> -T <sub>2</sub>	AE-NO <sub>2</sub> -F-3	AE-NO <sub>2</sub> -F-2	NO <sub>2</sub> -1	NO <sub>2</sub> -2
Asp	27.2 (29)	11.8 (12)	16.1 (17)	0.9 (1)	1.0 (1)
Thr	12.6 (14)	5.6 (6)	6.7 (8)		1.7 (2)
Ser	19.5 (24)	9.7 (12)	9.7 (12)	0.9 (1)	2.6 (3)
Glu	25.7 (26)	10.2 (10)	16.2 (16)	1.0 (1)	5.0 (5)
Pro	15.4 (16)	8.0 (8)	7.3 (8)		
Gly	17.6 (18)	7.1 (7)	11.0 (11)	1.9 (2)	1.1 (1)
Ala	12.1 (12)	4.0 (4)	8.0 (8)		1.0 (1)
Cys	2.5 (5)				
Val	3.8 (4)	1.0 (1)	2.5 (3)		
Met	0.9 (1)				
Ile	14.0 (15)	3.8 (4)	9.7 (11)		1.6 (2)
Leu (a)	14.0 (14)	6.6 (6)	7.4 (8)		3.0 (3)
Tyr	<u>9.8</u> (15)	<u>1.7</u> (3)	<u>7.9</u> (12)		1.7 (2)
Phe	7.4 (8)	4.6 (5)	2.8 (3)	1.0 (1)	
Lys+(AE-Cys)	17.7 (19)	6.5 <sup>(b)</sup> (8)	16.4 <sup>(b)</sup> (21)	0.9 (1)	
His	3.7 (4)	0.9 (1)	2.4 (3)		
Trp	0.9 (7)	0.5 (3)	0.7 (4)		
Arg	3.1 (3)	1.9 (2)	1.2 (1)		1.8 (2)
H-Ser(L)		0.6 (1)			0.6 (1)
NO <sub>2</sub> -Tyr	<u>2.4</u>	<u>0.6</u>	<u>1.7</u>	0.9 (1)	

かこ内の値はアミノ酸配列から計算された値を示す

(a) グルコサミンを含む値

(b) Lys のフラクターで計算されたもの

NO<sub>2</sub>-T<sub>2</sub> で Lys の値が低いのは、糖タンパクのためと考えられる (第 I 部, 3 節-1 参照)

表 2-6. RNase T<sub>2</sub>, RNase A, RNase T<sub>1</sub> の活性部位残基の比較

		RNase T <sub>2</sub>		RNase A		RNase T <sub>1</sub>		
		H-1 (His53)	H-2 (His115)	His12	His119	Glu58	His40	His92
pKa	free	7.2	6.4	5.8	6.2 <sup>(1,2,3)</sup>	4.3	7.9	8 (7)
	+3'-AMP/3'-CMP/ 3'-GMP	7.5	7.5	7.4	8.0 <sup>(4)</sup>		8.6	8.5
H-D 交換 C(2) proton		Slow	Fast	Slow	Fast <sup>(1)</sup>		Fast	Slow <sup>(7)</sup>
Photo- CIDNP	free	—	+	—	+		—	—
	+3'-AMP/3'-CMP/ 3'-GMP	—	—	—	— <sup>(5)</sup>		—	— <sup>(8)</sup>
カルボキシメチル化		3-N-CM- His	3-N-CM- His	3-N-CM- His	1-N-CM- <sup>(6)</sup> His	CM- ester	CM-His	CM-His <sup>(9)</sup>
		minor product	major product	minor product	major product	major product		
反応 pH		5.6		5.5		5.5	8.0	
pI		5.0		7.8			3.8	
至適 pH		4.5		7.5			7.4	

(1) Ohe *et al.* (1974) (45). (2) Mankley (1975) (54) (3) Shindo *et al.* (1976) (55) (4) Meadows *et al.* (1968) (56)  
 (5) Bolscher *et al.* (1979) (57), Lenstra *et al.* (1979) (58) (6) Crestfield *et al.* (1963) (50) (7) Y. Arata *et al.* (1979) (59)  
 (8) H. Nagai *et al.* (1984) (60) (9) K. Takahashi (1976) (61)

+ : CIDNP シグナルが出現, — ; CIDNP シグナルは出現しないことを表わす.

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導御鞭撻下さいました大阪大学蛋白質研究所、崎山文夫教授に心から深く感謝の意を表します。また一次構造決定において御指導、御討論文いただきました、網沢道、戸田弘子、西博士に、多大な数のアミノ酸分析をしていただいた八木芳子氏に深く感謝の意を表します。また、NMR測定に御便宜を計って下さいました大阪大学蛋白質研究所京極好正教授に深く感謝の意を表わします。さらに、実際の測定でお世話になりました林文晶君をはじめ、物性部門の皆様にも深く感謝致します。糖組成分析を行なうにあたり御便宜、御指導いただきました大阪大学理学部地中徳治教授ならびに妻鹿友弘博士に心から感謝の意を表します。本研究中、常に励まして下さいました三共株式会社泉高司君、富士フィルム株式会社景山茂樹君に、また、蛋白質研究所化学構造部門の皆様にも感謝致します。

## 文 献

- (1) K. Sato and F. Egami, *J. Biochem.*, 44, 753 (1957)
- (2) G. W. Rushizky and H. A. Sober, *J. Biol. Chem.*, 238, 371 (1963)
- (3) T. Uchida, *J. Biochem.* 60, 115 (1966)
- (4) T. Uchida and F. Egami, *J. Biol. Chem.*, 61, 44 (1967)
- (5) K. Takahashi, *J. Biol. Chem.*, 240, 4117 (1965)
- (6) T. Ando, *Biochim. Biophys. Acta*, 114, 158 (1960)
- (7) T. Masaki, M. Tanabe, K. Nakamura and M. Soejima, *Biochim. Biophys. Acta*, 660, 44 (1981)
- (8) P. Edman, *Acta. Chem. Scand.*, 4, 227 (1950)
- (9) S. Tunasawa, J. Kondo and F. Sakiyama, *J. Biochem.*, 97, 701 (1985)
- (10) K. Hayashi, E. Matsutera and Y. Ohba, *Biochim. Biophys. Acta*, 342, 185 (1974)
- (11) K. Kakiuchi and J. W. Williams, *J. Biol. Chem.*, 241, 2781 (1966)
- (12) E. J. Cohn and J. T. Edsall, "Proteins, Amino acids and Peptides" Reinhold. Publ. Corp. New York, p84, Table 5 (1943)
- (13) E. Gross and B. Witkop, *J. Biol. Chem.*, 237, 1856 (1962)
- (14) C. H. W. Hirs, "Methods in Enzymology" Academic Press. New

York, 11, 199 (1967)

- (15) A. N. Glazer, R. J. Delange and D. S. Sigman, "Chemical Modification of Proteins", p. 21, 101, North-Holland, American Elsevier (1975)
- (16) R. J. Koenig, S. H. Blobstein and A. Cerami, J. Biol. Chem., 252, 2992 (1977)
- (17) 加藤博通, 生化学, 才56卷, 4号, p. 245 (1984)
- (18) R. Hayashi, S. Moore and W. H. Stein, J. Biol. Chem., 248, 2296 (1973)
- (19) S. Akabori, K. Ohno and K. Narita, Bull. Chem. Soc. Jap., 25, 214 (1952)
- (20) 高橋禮子, 西部云存, 日本化学会誌, 10, 1588 (1982)
- (21) P. Andrews, Biochem. J. 96, 595 (1965)
- (22) H. Yamaguchi, T. Ikenaka and Y. Matsushima, J. Biochem., 70, 587 (1971)
- (23) A. Klemer, H. M. Künemeyer and H. Matern, Z. Naturforsch., 36b, 1163 (1981)
- (24) C. H. W. Hirs, "Method in Enzymology" Academic Press, New York vol 11, 197 (1967)
- (25) K. Miyamoto, 大阪大学学位論文 (1979)

- (26) G.A. Aphanasenko, S.M. Dudkin, L.B. Kamnir, I.B. Leshchinskaya and E.S. Severin, FEBS Lett., 97, 77 (1979)
- (27) R.W. Hartley and E.A. Barker, Nature New Biol. 235, 15 (1972)
- (28) H. Watanabe, K. Ohgi and M. Irie, J. Biochem, 91, 1495 (1982)
- (29) P. Y. Chou and G.D. Fasman, Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol. 47, 45 (1978)
- (30) J. Kyte and R.F. Doolittle, J. Mol. Biol., 157, 105 (1982)
- (31) K. Yamamoto, J. Hitomi, K. Kobatake and H. Yamaguchi, J. Biochem. 91, 1971 (1982)
- (32) G. C. K. Roberts, E.A. Dennis, D.H. Meadows, J.S. Cohen and D. Jardetzky, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 62, 1151 (1969)
- (33) F.M. Richards, H.W. Wyckoff, W.A. Carlson, N.M. Altewell, B. Lee and Y. Mitsui, Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol., 36, 35 (1971)
- (34) U. Heinemann and W. Saenger, Nature (London), 299, 27 (1982)
- (35) J. Hashimoto and K. Takahashi, J. Biochem., 81, 1175 (1977)
- (36) J. Hashimoto, T. Uchida and F. Egami, J. Biochem., 70, 903 (1971)

- (37) P. L. Fletcher, Jr and J. H. Hash, *Biochemistry*, 11, 4281 (1972)
- (38) K. Ohgi, H. Watanabe, K. Emman, N. Yoshida and M. Irie, *J. Biochem.*, 90, 113 (1981)
- (39) T. Uchida and S. Sato, in *Ribosomes and RNA Metabolism* ed. J. Zelinka, J. Balan, p453, Publishing House of the Slovak, Academy of Science, Bratislava (1973)
- (40) K. Ohgi and M. Irie, *J. Biochem.*, 86, 35 (1979)
- (41) K. Takahashi, *J. Biochem.*, 49, 1 (1961)
- (42) F. Sakiyama and Y. Kawata, *J. Biochem.*, 94, 1661 (1983)
- (43) 林文晶, 大阪大学理学部修士論文 (1984)
- (44) M. Sokolovsky, J. F. Riordan and B. L. Vallee, *Biochemistry*, 5, 3582 (1966)
- (45) M. Ohe, H. Matsuo, F. Sakiyama and K. Narita, *J. Biochem.*, 75, 1197 (1974)
- (46) F. Inagaki, Y. Kawano, I. Shimada, K. Takahashi and T. Miyazawa, *J. Biochem.*, 89, 1185 (1981)
- (47) S. Sato, T. Uchida and F. Egami, *Arch. Biochem. Biophys.*, 115, 48 (1960)
- (48) R. Kaptein, K. Dijkstra, F. Müller, C. G. von Schagen and

- A. J. W. G. Visser, *J. Magn. Resn.*, 31, 171 (1978)
- (49) E. H. J. M. Jansen, H. Meyer, G. H. de Haas and R. Kaptein,  
*J. Biol. Chem.*, 253, 6346 (1978)
- (50) M. Crestfield, W. H. Stein and S. Moore, *J. Biol. Chem.*,  
238, 2413 (1963)
- (51) M. Crestfield, W. H. Stein and S. Moore, *J. Biol. Chem.*,  
238, 2421 (1963)
- (52) K. Takahashi, W. H. Stein and S. Moore, *J. Biol. Chem.*,  
242, 4682 (1967)
- (53) J. L. Markley and W. R. Finkenstadt, *Biochemistry*, 14,  
3562 (1975)
- (54) J. L. Markley, *Biochemistry*, 14, 3546 (1975)
- (55) H. Shindo, M. B. Hayes and J. S. Cohen, *J. Biol. Chem.*,  
251, 2644 (1976)
- (56) D. H. Meadows and O. Jardetzky, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*,  
61, 406 (1968)
- (57) B. G. J. M. Bolscher, J. A. Lenstra and R. Kaptein,  
*J. Magn. Res.*, 35, 163 (1979)
- (58) J. A. Lenstra, B. G. J. M. Bolscher, S. Stob, J. J. Beintema  
and R. Kaptein, *Eur. J. Biochem.*, 98, 385 (1979)

- (59) Y. Arata, S. Kimura, H. Matsuo and K. Narita, *Biochemistry*,  
18, 18 (1979)
- (60) 永井 広史, 林 文晶, 京極好正, 生化学会誌,  
56, p994, 1984.
- (61) K. Takahashi, *J. Biochem.*, 80, 1267 (1976)