



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	https://hdl.handle.net/11094/27767
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【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　　6 7 7 3　　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 やウシ臍臓RNaseA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RNaseA 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個しかなかったので、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RNaseA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 の触媒機能に関与するアミノ酸残基の検索を行った。RNase T₂ は0.1M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よりウシ臍臓リボヌクレアーゼ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。