

Title	3H交換滴定法による蛋白質中His残基周辺の環境解析の試み：リゾチームおよびRNaseAについて
Author(s)	寒川, 賢治
Citation	大阪大学, 1976, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/31560">https://hdl.handle.net/11094/31560</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名・(本籍)	かん 寒 川 賢 治
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 3551 号
学位授与の日付	昭和 51 年 3 月 25 日
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	<sup>3</sup> H 交換滴定法による蛋白質中 His 残基周辺の環境 解析の試み — リゾチームおよび RNaseA について —
論文審査委員	(主査) 教授 成田 耕造 (副査) 教授 浜口 浩三 教授 松原 央

### 論 文 内 容 の 要 旨

<sup>3</sup>H 交換滴定法では、タンパク質分子中の各 His 残基の pKa と反応性 ( $k_{\psi}^{ex}$ ) の 2 種のパラメーターが同時に得られる。リゾチーム (His-15) および RNase A (His-12, -48, -105, -119) について種々のイオン強度および変性剤共存下などの各条件下で <sup>3</sup>H 交換滴定を行ない、分子内 *duilt-in probe* としてこれらのパラメーター (pKa および  $k_{\psi}^{ex}$ ) の変化を追跡することによって、各 His 残基周辺のミクロ環境 (近傍電荷, 誘電率, 立体効果など) 解析を試みた。

リゾチーム: Ac·His の滴定曲線は Henderson-Hasselbalch 型理論曲線に完全に一致し、その pKa (6.9) および  $k_{\psi}^{ex}$  ( $2.00 \times 10^{-2}/hr$ ) を標準とし、他の実験結果との比較とした。イオン強度 ( $\mu$ ) が 0.1 のときのリゾチームの His-15 は、異常に高い  $k_{\psi}^{ex}$  ( $3.60 \times 10^{-2}/hr$ ) と非常に低い pKa (5.6) を示すが、イオン強度を上昇させるとその  $k_{\psi}^{ex}$  は低下し、pKa は上昇する。このような His-15 の異常な反応性と pKa, およびそれらのイオン強度変化による影響は、His-15 近傍に正電荷の存在することを示唆し、X線解析の結果よりその正電荷は Arg-14 によるものと推定し、変性によりこの影響が消失すること (pKa 6.4,  $k_{\psi}^{ex} 0.606 \times 10^{-2}/hr$ ) もこれを支持する。 $\mu=0.1$  の滴定曲線は理論曲線と一致するが、 $\mu=0.5$  および 1.0 では pH 6 付近から大きなズレを示す。このズレは pH によって His-15 周辺環境に生じた大きな変化を反映しているものと考えられる。

RNase A: RNase A ( $\mu=0.1$ ) の 4 個の His 残基の滴定曲線は、その周辺環境の違いを反映して、それぞれ互に非常に異なったものとなり、各 His 残基の pKa および  $R_{\psi}^{ex}$  は、His-12 (pKa 6.6,  $R_{\psi}^{ex} 0.135$ ), His-48 (6.6—6.9, 0.020), His-105 (6.5, 0.575), His-119 (6.6, 0.305) であった。 $\mu=0.5$  では His-119 ( $R_{\psi}^{ex} 0.460$ ), His-48 (0.040) となり、この 2 残基は  $k_{\psi}^{ex}$  に大きな変化を示した。

各滴定曲線から解析した各 His 残基の周辺環境は、X線解析の結果とかなりよい一致を示す。これらの環境要因の影響が消失すると考えられる変性条件下では、いずれの His 残基も互に類似した pKa (6.5~6.8) および  $R_{\phi}^{max}$  (0.4~0.55) を示し、His-48 の顕著な反応性の回復はとりわけ特徴的である。 $\mu=0.1$ での His-105以外の滴定曲線はいずれも理論曲線からのズレを示し、活性部位の His-12および-119に見られるズレは、それらが解離基の多いクレバス中に位置しているため、pHによるマイクロ環境変化を反映していると考えられるので、その環境解析を pKa および  $k_{\phi}^{max}$  と共に滴定曲線の形からも試みた。また、3'-CMP (拮抗阻害剤) 存在下では、活性部位の His-12, -119 および His-48に著しい pKa の変化 (それぞれ 7.6, 7.3, 7.4) が見られ、本法により活性部位 His 残基の検出が可能であると共に、His-48も何らかの形で活性部位に関与しているものと推定した。

### 論文の審査結果の要旨

タンパク質をトリチウム水と温置すると、ヒスチジン (His) 残基のイミダゾール核 C 2位の水素が  $^3\text{H}$  で選択的に交換され、この交換反応は pH 依存性であること、見掛けの交換反応速度を pH に対してプロットするとシグモイド曲線が得られ、その中点はその His 残基の pKa に相当することが成田らの研究室で見出された。反応液のイオン強度の変化、変性剤の存在下および不在下、酵素であれば基質類似の阻害剤の存在下および不在下などの種々な条件下で His 残基の  $^3\text{H}$  交換反応速度定数と pKa とを測定すれば、分子中のそれぞれの His 残基周辺の局所的な環境を解析することができる。

寒川君はこの  $^3\text{H}$  交換反応の条件を再検討し、再現的でしかも定量的結果を与える条件を確立した。この条件を用いて、1個の His 残基を含有するニワトリ卵白リゾチームについて解析を行なった。その結果、この His 残基は異常に低い pKa 値と、異常に高い反応性を示すことを明らかにした。このような異常性は、His 残基周辺に正電荷の存在を推定させるものである。X線解析の結果は、この His 周辺にアルギニン残基の存在を示しているので、このアルギニン残基の正電荷によって His 残基の異常性が生ずるものと結論した。このような異常性を与えている環境は、変性によって完全に消失することを明らかにした。さらに高イオン強度では、低 pH と高 pH とで His 周辺の局所的コンホメーションが異なることも明らかにした。

この方法を His 4 残基含有するウシ膵臓リボヌクレアーゼ (RNase A) にも適用し、4個の His 残基周辺の環境解析を行ない、X線結晶解析の結果提出された RNase A の立体構造と矛盾しない結果を得た。さらに X線解析による静的構造からは把握できない溶液における各 His 残基周辺の環境に関する多くの新しい知見を得ることに成功した。このような寒川君の論文は、新しい方法論の確立の一助ともなるもので、理学博士の学位論文として価値あるものと認める。