The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	リボヌクレアーゼT1活性部位のミクロ環境解析 : His残基を中心として
Author(s)	木村, 定雄
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31605
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【4】

氏名・(本籍)	木村定雄（きむらさだお）
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 3855 号
学位授与の日付	昭和52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_1 活性部位のミクロ環境解析——His残基を中心として——」**
論文審査委員	(主査) 教授 成田 耕造 (副査) 教授 松島 祥夫 教授 芝 哲夫

論文内容の要旨

RNase T_1分子中に存在する3個のHis残基について^{3}H-交換滴定，およびNMR滴定(360 MH_zおよび相関100 MH_z)を行ない，本酵素の活性部位におけるミクロ環境解析を行なった。

まず，RNsae T_1のNMRスペクトルに現われる3個のHis残基C-2位プロトンシグナルの帰属を^{3}H-交換滴定法（この方法で，一次構造上の帰属が明確に決定できる）を用いて同定を行なった。すなわち，①NMR滴定曲線と^{3}H-交換滴定曲線の比較 ②NMRスペクトルにおけるHis C-2位プロトンシグナルの重水素交換速度と各His残基の^{3}H-交換速度の比較，により同定を行なうので，その帰属には疑問の余地はまったく無い。

次に拮抗阻害剤3′-GMP存在下，および非存在下において，RNase T_1の^{3}H-交換滴定，NMR滴定を行ない各His残基それぞれについて測定した結果に基づき，本酵素の活性部位について，次のような新しい知見が得られた。

すなわち，His-40はnativeな状態では，pKa＝7.6で，活性部位の表面近くに存在し，その近傍にあるpKa＝4.1の酸性解離基と相互作用している。RNase T_1に3′-GMPが結合するとこの相互作用が切断され，His-40は3′-GMPのリン酸部分と新しい相互作用を形成する。

一方，His-92は活性部位の奥に埋もれており，これは3′-GMPのグアニン塩基N-7位と水素結合を形成するので，阻害剤の結合部位と考えられる。

このような酵素—阻害剤複合体における活性部位の構造は，^{31}P NMRの結果からも支持される。

また，His-27は活性部位とは関係のない部分に埋もれた状態で存在している。

His-92およびHis-27は，His-40と同称いずれも高いpKa値を示し，かつそれらの滴定曲線が低

pH域で変曲点を有することは，これら各His残基がともに近傍に存在する酸性基と相互作用しているためと考えられる。

論文の審査結果の要旨

リボヌクレアーゼ(RNase) T_1には3個のヒスチジン(His)残基が含有されており，本酵素のD_2O溶液についてNMRスペクトルを測定すると，低磁場にそれぞれのHis残基に由来する3個のシグナルがあらわれる。木村君は溶液のpDを種々変化させて，シグナルのpD依存性から各His残基の解離定数(pKa)を測定した。一方，種々なpHでRNase T_1をトリチウム水中で37℃に加温して各His残基へトリチウムが取り込まれる反応速度を測定し，反応速度のpH依存性から各His残基の反応性とpKaとを測定した。後者の方法では一次構造上のどのHis残基の反応速度およびpKaかを確実に知ることができる。これら2方法による結果を用いて，NMRスペクトル上の3個のHis残基に由来するシグナルの同定に成功した。これら両測定結果から求めた各His残基のpKaは実験誤差範囲内で一致することを明らかにした。

Hia-27, His-40およびHis-92に由来するNMRシグナルの化学シフトとpDとの相関性を示す曲線は，何れも単純なシグモイドを与えず，pD4付近に変曲点を与え，各His残基周辺にカルボキシル基の存在を推定させる結果を得た。またRNase T_1の阻害剤である3′-GMP存在下にNMRスペクトルおよびトリチウム交換反応速度を測定した結果，His-27に関しては3′-GMP非存在下の測定結果と変化ないが，His-40およびHis-92に関しては，両測定法とも3′-GMP非存在下と比べて大きな変化が観察され，得られた結果を解析し，His-40は3′-GMPのリン酸部位と相互作用し，His-92は3′-GMPのN7位と水素結合していることを示した。さらに各His残基のトリチウム交換反応速度の測定から，His-40はRNase T_1の分子表面近くに存在し，His-27およびHis-92は埋れた状態に存在することを結論した。

以上のように，NMR滴定およびトリチウム交換滴定の両方法を併用することによって，RNase T_1分子中の個々のHis残基周辺のミクロ環境の解析に成功した木村君の論文は，理学博士の学位論文として十分価値あるものと認められる。