

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	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/31605
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

【 4 】

氏名・(本籍)	木 村 定 雄
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 3 8 5 5 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 活性部位のマイクロ環境解析——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 T₁分子中に存在する 3 個の His 残基について³H-交換滴定, および NMR 滴定(360 MHz および 100 MHz)を行ない, 本酵素の活性部位におけるマイクロ環境解析を行なった。

まず, RNase T₁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³H-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, ① NMR 滴定曲線と³H-交換滴定曲線の比較 ② NMR 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³H-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 T₁の³H-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 T₁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, ³¹P 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) T₁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D₂O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 T₁をトリチウム水中で37℃に加温して各His残基ヘ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。

His-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、pD 4 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 T₁ 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わらないが、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 N 7 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 T₁ 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 T₁ 分子中の個々のHis残基周辺のマイ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。