OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	リボヌクレアーゼSt, 及びSt. er. トリプシンの活性部位のミクロ環境解析
Author(s)	宮本, 薫
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32181
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【22】

氏名・(本籍)	宮本 薫
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 4544 号
学位授与の日付	昭和54年3月24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 *St*, 及び *St.er.* トリプシンの活性部位のミクロ環境解析
論文審査委員	(主査) 教授 成田 耕造 教授 芝 哲夫 教授 池中 徳治

論文内容の要旨

セリンプロテアーゼの活性部位に存在するヒスチジン残基の水溶液中での挙動は，近年蛋白質分解酵素の触媒機構解明のための有力な手段として，数多くの研究の対象となってきた。しかし蛋白質分解酵素に特有の自己消化作用，およびタンパク質中のヒスチジン残基の個別滴定法の限界のため，未だに明確な結論は得られていない。一方筆者は，放線菌 *Streptomyces erythreus* の生産するトリプシン様酵素（*St.er.* トリプシン）が自己消化を起さず，その活性pH領域で極めて安定であることを見いだした。しかし本酵素に関しては，若干の知見しか得られていないため，筆者はまず，本酵素の一次構造を決定した。その結果，本酵素は227残基のアミノ酸から成り，他のセリンプロテアーゼ類と明らかな相同性を示した。さらにセリンプロテアーゼの活性部位に共通に存在する，ヒスチジン，アスパラギン酸，セリンの各残基は，本酵素の対応する一次構造上に見出され，それらの周辺アミノ酸残基に高い相同性が見られた。

さらに近年筆者らの研究室で開発されたトリチウム交換滴定法と ^{1}H-NMR滴定法とを併用し，本酵素の活性部位に存在するヒスチジン残基のミクロ環境解析を試みた。トリチウム交換滴定法では，本酵素中に存在する4個のヒスチジン残基の帰属は明確であり，^{1}H-NMR滴定曲線の帰属もまた，トリチウム交換滴定の結果を利用して一義的に決定できた。

これらの滴定の結果より，活性部位ヒスチジン残基，His 42 (57)，はpKa 6.7を示し，かなり埋もれた環境にあることが判明した。これらの結果は，セリンプロテアーゼの活性部位のいわゆる“電荷移動”系において，ヒスチジン残基は，イオン対として，隣接するアスパラギン酸負電荷と相互作用していることを強く示唆している。さらに以上の結論に基づき，セリンプロテアーゼの触媒機能につ

いてさらにくわしい考察を行った。

一方，*Streptomyces erythreus*の生産するもう一種の酵素，リボヌクレアーゼ*St.*（RNase *St.*）の単離精製を行い，さらに本酵素の活性部位の環境解析を行った。トリチウム交換滴定および^{1}H-NMR滴定の結果から，ただ1個のヒスチジン，His 91，のみが，活性部位に存在し，拮抗阻害剤3′-GMPのリン酸部位と相互作用していることを明らかにした。さらに，^{31}P-NMR滴定法により，3′-GMPと本酵素の相互作用様式を推定した。さらに，他の二種のリボ核酸分解酵素，リボスクレアーセAおよびT_1の活性部位との比較より，リボ核酸分解酵素の触媒機能発現のメカニズムについての考察を行った。

論文の審査結果の要旨

宮本君は放線菌の一種，*Streptomyces erythreus* が培養液中に放出する酵素のうち，グアニル酸残基に特異なリボヌクレアーゼ（RNase）*St.*とトリプシン様活性を示すセリンプロテアーゼ（*St. er.* トリプシン）を分離し，両酵素の活性部位のミクロ環境を解析し，酵素の触媒反応機構解明に重要なデータを提供した。

先ずRNase *St.*については102個のアミノ酸からなる一次構造が既に報告されていたが，構成アミノ酸は101個であることを見出し，一次構造の訂正を行なった。ついで2個含有されるヒスチジン（His）残基周辺のミクロ環境を，成田研究室で開発されたトリチウム交換滴定法，^{1}Hおよび^{31}P NNMR 滴定法を併用して解析し，さらに拮抗阻害剤である3′-GMP存在下において同様の研究を行なった。その結果His-60は近傍のカルボキシル基と強い相互作用をし，活性部位とは無関係の分子表面からやや埋れた部位に存在すること，His-91は分子表面の活性部位に存在し，3′-GMPのリン酸基と結合し得る触媒基の一つであることを明らかにし，この残基周辺には正負の両電荷が存在することを推定した。

一方，*St. er.* トリプシンの一次構造は不明であったので，127個のアミノ酸からなる一次構造を決定し，引続いて4個含有されるHis残基周辺のミクロ環境をRNase *St.* の場合と同様の手段を用いて解析した。その結果His-12は分子表面に存在し近傍の正電荷と強い相互作用をしていて4.8という極めて低いpKaを与えることを見出した。His-42は活性部位のチャージリレー系に関与するHisであること，活性部位クレパスに半ば埋れて存在することを明らかにした。近傍のAspと強い相互作用をしているにも拘らず，pKa 6.7の正常値に近いpKaを与えることから，周辺のミクロ環境について推論を加え，この酵素の触媒反応機構を提出した。His-77 は溶媒と全く接触できない疎水環境に存在すること，His-136は分子表面近くに存在し，近傍の負電荷と弱い相互作用をしていることを明らかにした。

以上の宮本君の研究は，両酵素の活性部位のミクロ環境を溶液中で始めて解析し，触媒機作解明に貴重なデータを提供したものであり，理学博士の学位論文として充分価値あるものと判定する。