



Title	リボヌクレアーゼT1の構造と機能との関連についての研究
Author(s)	玉沖, 英恒
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32502
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

氏 名・(本籍)	玉 沖 英 恒
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	第 4 7 7 4 号
学位授与の日付	昭 和 54 年 12 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	リボヌクレアーゼ T_1 の構造と機能との関連についての研究
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

リボヌクレアーゼ T_1 (RNase T_1)は *Aspergillus oryzae* が産出するグアニル酸特異的な RNA 分解酵素で、104 個のアミノ酸残基の単一ポリペプチド鎖からなる安定な酸性蛋白質 (分子量, 11.085) である。RNase T_1 分子は、一次構造上二個の -s-s- 結合を有し、活性部位として、Glu58, His40, His92, Arg77 の各残基の関与が、今までに推定されている。X 線解析はまだされていない。RNase T_1 の構造は極めて特徴的であり、本酵素の構造と機能との関連性について知ることは、酵素蛋白質の特性や RNase の反応機構の解明、また比較生化学の立場からも極めて興味深い。そこで本研究では、RNase T_1 分子中、1 残基づつ含まれる Trp59, Arg77 に注目し、化学修飾法により、これらの残基の側鎖官能基及びペプチド結合の分子構造上の役割を酵素機能と関連させて検討した。Trp59 については、側鎖インドール環のオゾン酸化反応と、酸化 Trp 残基でのペプチド開裂反応、Arg77 については、トリプシンによる選択的ペプチド開裂反応を行なった。

オゾン酸化反応により、Trp59 の N'-ホルミルキヌレニン変換(NFK-)RNase T_1 、その脱ホルミル化反応によるキヌレニン変換(Kyn-)RNase T_1 を得、単離精製した。RNase T_1 は、NFK への変換により、高次構造は変化し、至適 pH 7.5 の酵素活性は消失したが、酸性 pH 領域で 5.3% の活性を保持していた (至適 pH 4.75)。そして脱ホルミル化による Kyn-RNase T_1 は、酵素活性も上昇し、生の酵素に近い構造及び機能を保持していた。しかし、pH 7.5 での活性は消失、3'-GMP に対する結合能は低下しており、このことから、Trp59 は RNase T_1 の活性部位の構造形成や維持に関連し、触媒機能の発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。NFK-RNase T_1 のヒドラジン処理により、Trp 59 ペプチド結合が開裂した O_3 -C-RNase T_1 (1-59.60-104) を得た。RNase T_1 の Arg77 ペプチド結合

でのトリプシンによる限定分解により、T-RNase T₁(1-77.78-104)を得た。両修飾酵素とも、分子構造は破壊され、酵素機能も消失していた。さらに、両残基ペプチド結合及びこれら周辺のペプチド鎖の構造形成における役割を調べるために、両修飾酵素及び-s-s-結合還元により得られるペプチド断片を用いて、会合系による酵素活性の復元を検討した。O₃-C-RNase T₁にT-RNase T₁のようなペプチド鎖内にTrp⁵⁹-Pro⁶⁰結合を有する断片を混合した時のみ、若干の活性の回復が認められた。RNase T₁分子中、-s-s-結合からはなれ、一次構造上中央部に位置するTrp59またはArg77、とくに後者のペプチド結合は、本酵素の構造形成や維持、そして機能発現に不可欠であることが示唆された。

論文の審査結果の要旨

リボヌクレアーゼT₁(RNase T₁)は2本のジスルフィド結合、1個ずつのアルギニン(Arg-77)とトリプトファン(Trp-59)残基を含む104個のアミノ酸から構成されているグアニル酸残基を特異的に加水分解するRNA分解酵素である。玉沖君はこの酵素の触媒基の一つであるGlu-58に隣接するTrp-59の機能を知るために、RNase T₁をギ酸中でオゾン酸化し、Trp残基をN'-ホルミルキヌレニン(NFK)残基に変換し、さらに希酸中で凍結状態でNFK残基から特異的に脱ホルミル化してキヌレニン(Kyn)残基に導く条件を確立し、得られたNFK-RNase T₁とKyn-RNase T₁の酵素的および構造的諸特性を解明した。すなわちNFK-RNase T₁の主鎖の立体構造は未修飾酵素と変化しないが、側鎖の状態は可成り変化し、これに起因して活性がいちじるしく低下していること、これに反しKyn-RNase T₁は主鎖、側鎖とも未修飾酵素と大差なく、活性も高いことを明らかにした。さらに両修飾酵素とも未修飾酵素同様に触媒基Glu-58がモノヨード酢酸によって特異的にエステル化され、エステル化の程度と酵素活性とは併行していることを明らかにし、Trp-59は活性部位周辺の疎水環境に位置し、活性部位形成に重要な役割を演じていることを解明した。次にポリペプチド鎖の連続性が酵素活性の発現に重要であることを明らかにする目的で、Arg-77が関与するペプチド結合のみをトリプシンで選択的に開裂する条件を確立し、またKyn-59-RNase T₁をヒドラジン処理してKyn-59のペプチド結合を特異的に切断した酵素誘導体を調製し、その活性をしらべたが殆んど活性はないことを認めた。これら両酵素誘導体を還元してジスルフィド結合を開裂して得られるペプチド断片を分離し、未還元酵素誘導体にこれら断片を添加して活性の復元状況を調査した結果、Kyn-59位のみ切断した誘導体にTrp-59を含む断片を添加したときのみ極めて僅かの活性の復元がみられることを明らかにした。

以上の玉沖君の研究はRNase T₁中のTrp-59の役割を解明し、活性発現にペプチド鎖の連続性の重要性を確認した貴重な結果であり、理学博士の学位論文として価値あるものと認める。