Osaka University Knowledge Archive

Title	核磁気共鳴によるリボヌクレアーゼT1とインヒビターとの結合様式に関する研究
Author(s)	永井, 広史
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35777
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

【16】

氏名・(本籍)	永井広史（ながい ひろし）
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 7927 号
学位授与の日付	昭和62年12月14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	**核磁気共鳴によるリボヌクレアーゼT_1とインヒビターとの結合様式に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 京極 好正 (副査) 教授 崎山 文夫　教授 濱口 浩三

論文内容の要旨

リボヌクレアーゼT_1（RNaseT_1）はAspergillus oryzaeによって産生されるアミノ酸残基数104，分子量11085の高度にグアニン特異的なRNaseである。このためRNaseT_1は核酸分解酵素の核酸塩基認識機構を明らかにするために従来より種々の手法を用いて幅広く研究が行われている酵素の一つである。その結果からHis40，His92，Glu58およびArg77が酵素の活性発現に関与していると推定されている。

本研究では^{1}H，^{15}Nならびに^{31}PNMRを用いてRNaseT_1の塩基認識機構を明らかにすることを試みた。まずRNaseT_1に光CIDNP（Photo Chemically Induced Dynamic Nuclear polarization）を適用した。光CIDNPは蛋白質分子中にHis，Tyr，Trpの三残基を選択的に検出できるばかりでなく，これら三残基の蛋白質分子表面における露出度をも定性的に評価できる手法である。その結果芳香族領域に明瞭な4本のCIDNPシグナルが観測され，うち1本は特に強度が強かった。パターンからこれらのシグナルはTyrに由来し，分子中の9個のTyr中4個は表面に露出しそのうち1個は高い運動性を持っていることが判明した。このTyrはニトロ化，プロテアーゼによる限定分解からTyr45と決められた。このTyrの塩基認識への関与を明らかにするため14種類のプロダクトタイプのインヒビターとの結合実験を行い，光CIDNPを観測した。その結果グアノシン，イノシンを含む場合はTyr45のシグナルはインヒビターとの複合体形成によって高磁場へシフトして弱くなることから，Tyr45のフェニル環がグアニン環上にスタッキングして結合に関与し両者の位置関係はインヒビターの種類にかかわらず同一であることが明らかになった。d(GpA）のようなヘテロジヌクレオシドの場合グアニンが5′側にあっても3′側にあってもグアニンが結合したがd(GpG）のようなホモジヌクレオシドの場合は5′側

のグアニンが結合した。Tyr45は活性中心にグアニン塩基をロックする役割を担っているらしい。インヒビターのＮＯＥの解析からグアノシン部分はＲＮase T_1との結合時にはsyn形をとっていることが判明した。

二次元ＮＭＲならびにＮＯＥ差スペクトルの実験から高磁場へシフトしているメチル基は２個のIle，２個のValおよび１個のAla由来であった。各種インヒビターを加えた時のこれらメチル基のケミカルシフト変化から１個のIle δメチル基はリン酸基結合部位近傍に位置し１個のVal，１個のIle γメチル基はグアニン結合部位近傍に存在していると推定された。上述した以外のすべてのVal，Thrならびに Alaのメチル基のシグナルも同定することができた。

グアニンの窒素を^{15}Nでラベルした２′－ＧＭＰ，３′－ＧＭＰ及び３′－dＧＭＰを合成し各窒素のＲＮase T_1との複合体形成への関与について^{15}ＮＮＭＲを用いて検討した。複合体形成に判うケミカルシフト変化からＮ１，Ｎ７及び２－アミノ基の結合への関与が明らかになった。又従来提案されていたＮ７位のプロトネーションはおきていないことが判明した。しかしリン酸基の解離状態はインヒビターの種類によって異なり２′－ＧＭＰでは結合時にジアニオン形になっているが，３′－ＧＭＰ，３′－dＧＭＰではモノアニオン形で結合していた。

上述したようにプロダクトタイプのインヒビターのＲＮase T_1との結合様式はインヒビターの種類にかかわらず非常に似通っている。おそらく塩基認識の特異性は塩基環の形によって決定され，結合の強さはリン酸基の位置リボースの２′水酸基の有無で決定されると考えられる。

論文の審査結果の要旨

永井広史氏は塩基特異性の高い核酸分解酵素リボヌクレアーゼT_1と分解生成物阻害剤の結合様式を高分解能核磁気共鳴を用いて解明し，基質識別機構を明らかにすることを試みた。

永井氏の研究の中で最も特色のあるのは，光ＣＩＤＮＰ（光化学誘導動的核分極法）を駆使して本酵素の45位のチロシン残基が基質識別に重要であることを示した点である。リボヌクレアーゼT_1には、９個チロシンがあるが，光ＣＩＤＮＰによってそのうちの１個が特に露出度の高いことを明らかにした。興味あることは，グアニン系の阻害剤の結合によってこの残基の露出度が低下し，チロシン側鎖とグアニン塩基と重り合うことである。この現象は，アデニン，ピリミジン環では認められず，グアニン環に特異的である。露出した残基は，ニトロ化されやすく，プロテアーゼによる限定分解とフラグメントのアミノ酸組成分析から45位のチロシンと決定された。スクレオチドの２つ連った場合についても同様の現象は認められるが，グアニン残基が２つ並んだ時は５′側のグアニンが摑えられることも示された。又，核オーバーハウザー効果の測定から結合したグアノシン残基はどんな場合もsyn型をとることも明らかにされた。^{15}Ｎ ＮＭＲからグアニン残基のアミノ基，イミノ基が結合に関与していること２′－ＧＭＰ，３′－ＧＭＰ，５′－ＧＭＰの結合の様式を^{31}Ｐ ＮＭＲで見たところ２′－ＧＭＰの場合のみ第二解離の$_p$Ｋ値が大幅に下り，りん酸基が強く結合することが示された。これは分子内部中のカルボン酸と

プロトンを共用していることが考えられる。

以上のように永井広史君の論文はデオキシリボ核酸分解酵素，RNaseT_1の基質特異性がどのようにして決まるかを溶液中で構造的に調べたものであり，今後，本酵素の改変等の場合に有用な情報を与えものである。よって理学博士の学位として十分価値あるものと認める。