



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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・（本籍）	なが	い	ひろ	し
学 位 の 種 類	理	学	博	士
学 位 記 番 号	第	7	9	2
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 T₁ (RNase T₁) 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 RNase T₁ 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 ¹H, ¹⁵N ならびに ³¹P NMR を用いて RNase T₁ の塩基認識機構を明らかにすることを試みた。まず RNase T₁ に光 C I D N P (Photo Chemically Induced Dynamic Nuclear polarization) を適用した。光 C I D N P 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 C I D N P 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 C I D N P 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 T₁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¹⁵Nでラベルした2'-GMP, 3'-GMP及び3'-dGMPを合成し各窒素のRNase T₁との複合体形成への関与について¹⁵NNMR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 T₁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T₁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T₁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'側のグアニンが摺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。¹⁵N 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³¹P NMRで見たところ2'-GMPの場合のみ第二解離のK値が大幅に下り, リン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, RNase T₁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るものである。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。