The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	蛋白質工学によるリボヌクレアーゼT1の基質認識機構の研究
Author(s)	森岡, 弘志
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36399
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

【7】

氏名・(本籍)	森(もり) 岡(おか) 弘(ひろ) 志(し)
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 8637 号
学位授与の日付	平成元年3月24日
学位授与の要件	薬学研究科薬品化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**蛋白質工学によるリボヌクレアーゼT1の基質認識機構の研究**
論文審査委員	(主査) 教 授 冨田 研一 (副査) 教 授 岩田 宙造 教 授 北川 勲 教 授 枡井雅一郎

論文内容の要旨

リボヌクレアーゼT_1(RNaseT_1)は，1本鎖RNA分子中のグアニン塩基のみを特異的に認識し，その3′−5′ホスホジエステル結合を切断する酵素である。RNaseT_1の構造活性相関の解明ならびに機能の改変を目的として，(I). 化学合成されたRNaseT_1遺伝子の大腸菌における高発現系を確立させ，さらには部位特異的変異法を用いて，RNaseT_1の塩基認識部位および触媒部位の変換体を作製し，(II). RNaseT_1のグアニン塩基認識機構の解明ならびにグアニン塩基特異性の改変，および(III). RNaseT_1の触媒反応機構の解明に関する研究を行なった。

(I). 組換えRNaseT_1およびその変換体の大腸菌を用いた生産系の確立

RNaseT_1遺伝子は大腸菌で直接発現されなかった。そこで，ヒト成長ホルモンのN末 139a.a.(hGHABパート) − RNaseT1，あるいはhGHABパート − RNaseT1 − インシュリン様成長因子−I 型の融合蛋白質として産生させることを計画した。この方法により，RNaseT_1およびその変換体を大腸菌中で大量に産生させることができた。融合蛋白質の切断は，RNaseT_1がMetを含有しない蛋白質であることに注目して，つなぎ目にMetを挿入し，Metに特異的に作用するBrCNを利用した。また，もう1つの発現方法として，アルカリフォスファターゼのシグナルペプチドを用いて，RNaseT_1変換体を菌体外に分泌させることを試みた。

(II). RNaseT_1の塩基認識部位の構造活性相関

RNaseT_1と2′−GMP複合体のX線結晶解析の結果，RNaseT_1はTyr 42，Tyr 45の両芳香環によるスタッキング効果と，Tyr 42〜Glu 46およびAsn 98領域に存在するアミノ酸残基との間で形成され

る４本の水素結合によって，グアニン塩基を認識していることが示された。Tyr42およびTyr45 を同じ芳香環を側鎖に持つPheに変換すると，天然型と同程度（６３％，７７％）の活性を示したことから，これら２つのTyr残基はＸ線解析で示されたように，スタッキング効果によってグアニン塩基を塩基認識部位に保持する機能を持つことがわかった。また，Tyr45を側鎖の疎水性がより高いTrpに変換すると，活性は天然型の１２０％に増加した。Tyr45→Trp変換体の酵素反応定数（K_m，k_{cat}，k_{cat}/K_m値）を求めたところ，グアニン塩基に対する親和性は2.5倍に増加していた。すなわち，RNaseT_1 の塩基認識部位内の疎水的環境を高めることで，基質に対する親和性を増大させ，切断活性を増加させることができることがわかった。グアニン塩基と水素結合を形成していた４つのアミノ酸残基のうち，側鎖が水素結合を形成していたAsn43およびGlu46をそれぞれAlaに変換したところ，活性の低下は，Glu46→Ala変換体の方がAsn43→Ala変換体よりも大きいことがわかった。Glu46の側鎖は，反応条件下で解離して電荷を持つと推察されることから，このような電荷を持つ側鎖の関与する水素結合の寄与は大きいことが，実験的に示された。また，Asn44は主鎖の部分がグアニン塩基と水素結合を形成していたが，類縁酵素間で共通性が高く，側鎖の果たす役割に興味が持たれた。Asn44をAlaに変換したところ，活性は大きく低下した。この結果をもとに，Ｘ線結晶解析のデータを詳しく調べてみると，Asn44の側鎖が塩基認識部位のループ構造を保持していることがわかった。

RNaseT_1 がアデニン塩基を認識する割合はグアニン塩基の$1/1.5\times10^5$ といわれている。RNaseT_1 の塩基特異性をグアニンからアデニンに改変するために，塩基認識部位を特異性の若干低いRNaseMsの相当する配列に変えたRNaseT_1－Ms hybrid protein，およびグアニン塩基の認識に必須と考えられるGlu46をAlaおよびGlnに置換した変換体をそれぞれ作製し，それらの活性を調べたところ，塩基特異性がかなり変化したRNaseT_1 変換体を得ることができた。

(Ⅲ). RNaseT_1 の触媒部位の構造活性相関

RNaseT_1 のRNA分子切断反応に関与するアミノ酸残基は，化学修飾，^{1}H－NMR，Ｘ線結晶解析，類縁酵素との１次構造の比較等から，His40，Glu58，Arg77，His92であると同定されていた。これらの結果をもとに，触媒反応は，Glu58とHis40あるいはHis92の２つのHis残基のうち一方が，直接の触媒残基として働くという機構が推定されていた。しかし，Glu58の相手となるのがどちらのHis残基であるかについての結論はでていなかった。また，基質のリン酸基との相互作用が推定されたアミノ酸残基は，化学修飾からArg77，Ｘ線結晶解析からTyr38およびArg77であった。

切断反応に必須と考えられていたGlu58残基を，カルボキシル基を持たないGlnあるいはAlaに変換しても活性を示したのに対して，His40あるいはHis92残基をAlaに変換すると，活性はほぼあるいは全く失なわれた。この結果は，化学修飾や^{1}H－NMRの結果から推定された従来の触媒反応機構では説明できないものであった。そこで著者は，His40とHis92が直接触媒作用を果たすという新しい反応機構を提示した。また，Arg77を側鎖に電荷を持たないThrに変換すると，活性は全く失なわれたことから，Arg77の正電荷は活性に必須のものであることがわかった。しかし，Arg77を同じ正電荷を持つLysに変換しても，活性は天然型の0.０２％と大きく低下したことから，Arg77が必須のアミノ酸であることが推察された。Arg77→Lys変換体とTyr38→Phe変換体の酵素反応定数を比較すると，Arg

77→Lys変換体では基質に対する親和性，切断反応の代謝回転数とも大きく低下しているのに対して，Tyr 38 →Phe変換体では代謝回転数のみが低下していた。このことからTyr 38およびArg77は両残基とも触媒反応に関与しているが，基質との結合に関与しているのはArg 77のみであることがわかった。

以上，蛋白質工学的手法を用いて，.RNase T_1 の塩基認識部位，および触媒部位に存在するアミノ酸残基の構造と機能の関係についていくつかの新しい知見を得ることができた。

論文の審査結果の要旨

本論文は，蛋白質工学的手法を用いて，リボヌクレアーゼT_1の構造遺伝子を改変し，種々の人工変換体を作成し，その酵素活性の変化から基質認識機構を検討したもので，薬学博士の学位請求論文として価値あるものと認める。