The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	リボヌクレアーゼT1のジスルフィド結合変換体に関する研究
Author(s)	Jeanne, Adiwinata Pawitan
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37049
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）	JEANNE ADIWINATA PAWITAN（シャーネ アディウィナタ パウィタン）
学位の種類	薬　学　博　士
学位記番号	第　9144　号
学位授与の日付	平成2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	**リボヌクレアーゼT_1のジスルフィド結合変換体に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教授 北川　勲 （副査） 教授 今西　武　教授 岩田 宙造　教授 冨田 研一

論文内容の要旨

RNase T_1は，コウジ菌（Aspergillus oryzae）が産生する菌体外リボ核酸分解酵素で，1本鎖RNAのグアニン塩基を特異的に認識し，その3'側でリン酸ジエステル結合を切断する酵素である。本酵素は104アミノ酸からなる酸性の球状蛋白質で，分子内に2つのジスルフィド結合（C2−C10, C6−C103）を持っている。類縁のカビ由来のグアニン塩基特異的なRNaseの多くは，この位置にジスルフィド結合を持つが，RNase F_1には2番目と10番目のジスルフィド結合がなく，代わりに24番目と84番目のジスルフィド結合が存在している。ジスルフィド結合が蛋白質の安定性に重要な役割を持つことはよく知られている。RNase T_1では，Tyr24とAsn84は活性部位の反対側にあり、分子動力学計算から，それらの間にジスルフィド結合を形成させることが可能で，かつ活性部位の立体構造のずれはごく小さいことが予測された。そこで著者は耐熱性の増加したRNase T_1変換体を作成すること，またジスルフィド結合の蛋白質の安定性に及ぼす影響を調べることを目的とし，遺伝子工学の手法で3種類のRNaseT_1変換体すなわち，3つのジスルフィド結合（C2−C10, C6−C103, C24−C84）を持つRNase T_1S，2つのジスルフィド結合（C6−C103, C24−C84）を持つRNase T_1S（C2S, C10S）および1つのジスルフィド結合（C6−C103）しか持たないRNase T_1（C2S, C10S）を作成し，それらの構造ならびに性質を調べた。

RNase T_1S，T_1（C2S, C10S）およびT_1S（C2S, C10S）の遺伝子は，これまでに報告されている化学合成デオキシオリゴヌクレオチド（オリゴマー）を用い，RNase T_1遺伝子合成法を参考にし，カセット変異法（cassette mutagenesis）で作成した。RNase T_1S, T_1（C2S, C10S）およびT_1S（C25, C10S）の各遺伝子はtrp promoterとalkaline phosphatase signal

peptide に相当する配列をもつ発現vectorに挿入し，目的の蛋白質をperiplasm 区分に分泌発現させる方法をとった。この方法で，各変換体は天然型RNase T_1 と同程度の発現が見られ，osmotic shock法でperiplasm 画分を回収し，Q−Sepharose，Sephadex G−50のカラムクロマトグラフィーで精製した。各変換体蛋白質の収量は，1リットル培地当りRNase T_1Sは1.6㎎，T_1（C2S，C10S）は1.1㎎，T_1S（C2S，C10S）は2.9㎎であった。N末端のアミノ酸配列分析から，RNase T_1Sがalkaline phosphatase signal peptideから，正しく切断されたことを確認した。

RNase T_1S，T_1（C2S，C10S）およびT_1S（C2S，C10S）の構造を明らかにするため，3種類（還元条件，非還元条件および未変性条件下）のポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）ならびにCDスペクトルでRNase T_1S，T_1（C2S，C10S）およびT_1S（C2S，C10S）の構造を調べた。またCDスペクトルの240 nmでの〔θ〕値の温度による変化およびurea 濃度による変化から，構造の耐熱性および変性剤であるureaに対する安定性を調べた。還元条件のSDS−PAGEならびに未変性条件下のPAGE の結果から，完全にunfoldedの状態あるいはfolded の状態では，変換体の立体構造は3つとも天然型と同じことが明らかになった。一方非還元条件のSDS−PAGE の結果から，RNase T_1S の3番目のジスルフィド結合が形成されていることが明らかになった。RNase T_1S が3つのジスルフィド結合を持っていることはEllman 法によりfreeのSH基が検出されないことからも確かめられた。

CDスペクトルについて，25℃での遠紫外部（200−235nm）および近紫外部（250−310 nm）のCDスペクトルは，RNase T_1S，T_1（C2S，C10S），T_1S（C2S，C10S）ともRNase T_1 に比べ，大きな変化がなかったため，大きな構造の変化もないと考えられる。次にCDスペクトルの240 nmでの〔θ〕値の温度変化，およびurea濃度による変化を測定し，unfoldingの自由energyを求めた。これらの結果から，3つの変換体は構造的に熱に対しても，変性剤に対しても，それぞれ同様の安定性を示し，3つのジスルフィド結合を持つ変換体は一番安定で，RNase T_1 と2つのジスルフィド結合を持つ変換体とはほぼ同じ，1つのジスルフィド結合を持つ変換体は一番不安定となった。

活性については，37℃ではRNase T_1SはRNase T_1 とほぼ同じ活性（91.4％）を示し，RNase T_1（C2S，C10S）およびT_1S（C2S，C10S）の活性（RNaseT_1（C2S，C10S）は38.9％，RNase T_1S（C2S，C10S）は63.3％）は少し低くなった。このことから，最大の活性を持つためには2番目と10番目のジスルフィド結合が必要なことが明らかになった。活性の温度変化はCDスペクトルの240.nmでの〔θ〕値の温度変化と相似したパターンを示し，50％活性の温度が9℃も上昇した。また，100℃で15分間熱処理をした後，さらに37℃で活性測定をしたところ，RNase T_1 の活性は44％までもどったが，RNase T_1Sの活性は（RNase T_1の37℃での活性に比較）4％しかもどらなかった。ほかの変換体では，RNase T_1（C2S，C10S）の活性は26％までもどり，RNase T_1S（C2S，C10S）の活性はRNase T_1S と同様に，5％しかもどらなかった。このことからRNase T_1は失活させにくい酵素であるが，24番目と84番目との間に3本目のジスルフィド結合を導入すると失活させやすい酵素になることが明らかになった。

以上まとめると，RNase T_1のジスルフィド変換体3種を遺伝子工学的手法によって大量に生産し，そ

の性質について比較検討した。２４番目と８４番目の新しいジスルフィド結合は，RNase T_1 の foldfng の安定化に寄与すること，また完全に熱変性した後に，refoldingする時，２４番目と８４番目のジスルフィド結合は障害になること，RNase T_1 が最大の活性を持つためには，２番目と１０番目のジスルフィド結合が必要であることが明らかになった。

RNase T_1 SはRNase T_1 に比べ，高温で使用可能で，かつ失活させることが容易なので，RNA の高次構造を研究する際，今までにはない有用な酵素試薬になると考えられる。

論文の審査結果の要旨

リボヌクレアーゼT_1は，RNA の塩基配列や二次構造の研究に汎用される有用な酵素である。一方，蛋白質の安定性を向上させることは，蛋白質の医薬品などへの応用を考える上で重要である。

本論文では，遺伝子工学的手法により，リボヌクレアーゼT_1の系において，ジスルフィド結合による架橋の数を変えた変換体を作製し，その活性および熱や変性剤に対する安定性を調べ，酵素活性を落とさずに安定性を向上させることに成功している。同様の試みは他の酵素でも行われているが，失活してしまう場合が多い。また，ジスルフィド結合を１個から３個までもつ３種の変換体の性質が調べられ，熱および変性剤に対する安定性が，ジスルフィド結合の個数とともに向上することが明瞭に示されたことも重要な成果である。

以上の成果は，薬学博士の学位請求論文として，充分価値のあるものと認められる。