

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	
Issue Date	
oa:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37049">https://hdl.handle.net/11094/37049</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名・(本籍)	シャ-ネ アディウィナタ パウィタン JEANNE ADIWINATA PAWITAN
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 <sub>1</sub> 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 富田 研一

### 論文内容の要旨

RNase T<sub>1</sub> 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<sub>1</sub> 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<sub>1</sub> では、Tyr 24 と Asn 84 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<sub>1</sub> 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 RNase T<sub>1</sub> 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<sub>1</sub>S、2 つのジスルフィド結合 (C6-C103, C24-C84) を持つ RNase T<sub>1</sub>S (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<sub>1</sub> (C2S, C10S) を作成し、それらの構造ならびに性質を調べた。

RNase T<sub>1</sub>S、T<sub>1</sub> (C2S, C10S) および T<sub>1</sub>S (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<sub>1</sub> 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<sub>1</sub>S、T<sub>1</sub> (C2S, C10S) および T<sub>1</sub>S (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<sub>1</sub> 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<sub>1</sub> S は 1.6 mg, T<sub>1</sub> (C2S, C10S) は 1.1 mg, T<sub>1</sub> S (C2S, C10S) は 2.9 mg であった。N 末端のアミノ酸配列分析から、RNase T<sub>1</sub> S が alkaline phosphatase signal peptide から、正しく切断されたことを確認した。

RNase T<sub>1</sub> S, T<sub>1</sub> (C2S, C10S) および T<sub>1</sub> S (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<sub>1</sub> S, T<sub>1</sub> (C2S, C10S) および T<sub>1</sub> S (C2S, C10S) の構造を調べた。また CD スペクトルの 240 nm での  $[\theta]$  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<sub>1</sub> S 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<sub>1</sub> S 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確かめられた。

CD スペクトルについて、25°C での遠紫外部 (200-235 nm) および近紫外部 (250-310 nm) の CD スペクトルは、RNase T<sub>1</sub> S, T<sub>1</sub> (C2S, C10S), T<sub>1</sub> S (C2S, C10S) とともに RNase T<sub>1</sub> 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  $[\theta]$  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<sub>1</sub> 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°C では RNase T<sub>1</sub> S は RNase T<sub>1</sub> とほぼ同じ活性 (9.14%) を示し、RNase T<sub>1</sub> (C2S, C10S) および T<sub>1</sub> S (C2S, C10S) の活性 (RNase T<sub>1</sub> (C2S, C10S) は 38.9%, RNase T<sub>1</sub> S (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  $[\theta]$  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°C も上昇した。また、100°C で 15 分間熱処理をした後、さらに 37°C で活性測定をしたところ、RNase T<sub>1</sub> の活性は 44% までもどったが、RNase T<sub>1</sub> S の活性は (RNase T<sub>1</sub> の 37°C での活性に比較) 4% しかもどらなかつた。ほかの変換体では、RNase T<sub>1</sub> (C2S, C10S) の活性は 26% までもどり、RNase T<sub>1</sub> S (C2S, C10S) の活性は RNase T<sub>1</sub> S と同様に、5% しかもどらなかつた。このことから RNase T<sub>1</sub> 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<sub>1</sub> 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<sub>1</sub>の folding 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<sub>1</sub> 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<sub>1</sub>SはRNase T<sub>1</sub>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<sub>1</sub>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<sub>1</sub>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。