

Title	Structural Studies on the Reaction Mechanism and Substrate Binding Manner of Ribonuclease T1
Author(s)	合田, 圭吾
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41064">https://hdl.handle.net/11094/41064</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">〈a href="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">〈/a〉</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	合 田 圭 吾
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 1 3 4 7 7 号
学位授与年月日	平成 9 年 12 月 16 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Structural Studies on the Reaction Mechanism and Substrate Binding Manner of Ribonuclease T <sub>1</sub> (リボヌクレアーゼ T <sub>1</sub> の反応機構と基質結合様式に関する構造学的研究)
論文審査委員	(主査) 教授 京極 好正 (副査) 教授 谷澤 克行 教授 福山 恵一

## 論文内容の要旨

序 RNase T<sub>1</sub> は、グアニン塩基特異的な一本鎖 RNA 加水分解酵素である。高いグアニン塩基特異性は、認識領域との水素結合と、2つの Tyr の塩基の挟みこみによることが明らかにされている。触媒反応は、2',3'-環状リン酸体を中間体とする 2段階反応であり、関与しているアミノ酸残基が同定されている。第一章は、触媒反応でのアミノ酸残基の役割について、構造学的な知見を得るため、3'GMP と RNase T<sub>1</sub> の複合体結晶を作製し、X線結晶構造解析を行った。また、RNase T<sub>1</sub> には、サブサイトが存在することが、速度論的研究により、示唆されている。そこで、第二章では、サブサイトへの結合様式を調べることを目的として、グアノシンの 5' 側、3' 側に残基を持ち、糖部 2' 水酸基がフッ素に置換されている修飾グアノシン (G<sup>f</sup>) を含む ApG<sup>f</sup>pA と RNase T<sub>1</sub> (Y45W) 複合体の X線結晶解析を試みた。また、第三章として、第二章で用いた修飾グアノシンを DNA 類似体と見なし、制限酵素 *EcoRI* の反応機構の研究にも適用することを試みた。

1. RNase T<sub>1</sub> の触媒反応に関する構造学的な研究 触媒反応は、2つのモデル (触媒残基として、Glu58 と His92、又は、His40 と His92 の組み合わせ) が提出されている。構造解析の結果、3'GMP の糖部は、2',3'-環状リン酸化合物の単結晶構造で見られている O4'-endo 型をとっており、本構造は、触媒反応の直前あるいは直後の状態に近いものであることが示唆された。糖部 2' 水酸基は、His40 及び Glu58 と共に水素結合を形成していた。2' 水酸基と His40 間との直接的な相互作用を見出したのは、これが最初の例である。この結果から、RNase T<sub>1</sub> のもつ特徴的な性質 (非常に高い比活性、広い至適 pH) は、His と Glu の 2つの残基が 2' 水酸基上のプロトンへ共同した関与を示しているためであると考えられ、His40 と Glu58 の両残基が共同で反応を触媒していることが示唆された。

2. RNase T<sub>1</sub> のサブサイト結合様式に関する構造学的な研究 N1-site サブサイトとして、RNase T<sub>1</sub> (Y45W)/2' AMP 複合体等の解析結果から His92 が、候補としてあげられている。構造解析の結果、ApG<sup>f</sup>pA は、分解され、3'AMP と G<sup>f</sup>pA の 2つに分かれて結合していることが明らかになった。グアニン結合部位には G<sup>f</sup>pA が、触媒部位には 3'AMP が結合していた。3'AMP は、塩基部が溶媒側に突き出した配向をとっていた。この配向は、2'AMP 複合体等で見られた塩基部が His92 に結合するものとは異なっていた。2',5'GpG との複合体でも、本複合体と同様な構造も観測

されており、今回、3'AMPの結合様式が、2'AMP複合体のものとは異なっていたことから、非常に特異的なグアニン結合部位への結合とは異なり、N1-siteへの結合様式は、厳密でないことが示唆された。

3. EcoRIとその認識配列を持つ合成オリゴヌクレオチドとの相互作用の研究 修飾グアノシンを含む4種のオリゴマー (d(GG\*AATTCC)<sub>2</sub>: G\*=dG, dGfl, dGcl, rG) を合成した。EcoRIとの親和性は、ほぼ同等であったが、切断性は大きく異なっていた。オリゴマーの性質を調べた (UV, CD, <sup>31</sup>P NMR) 結果、修飾オリゴマーの糖リン酸骨格は歪んでいることが分かった。その度合いは、2'-位のかさ高さ、及び切断反応性の順列と一致していた。2'位の立体的な影響が、切断部分近傍の糖リン酸骨格の構造変化を引き起こし、触媒反応に影響を及ぼしていることが示唆された。すなわち、切断部位周辺の構造には、立体化学的に厳密な配座が必要とされることが明らかになった。

まとめ 本研究で、RNase T<sub>1</sub>の反応機構、及び、サブサイトの結合様式に関する新たな知見を得る事ができた。特に、触媒残基が His40 か Glu58 で、論争が続いている触媒反応に関して、両者ともに反応に関与していることを示唆する結果が得られたことは、意義深いと思われる。また、サブサイト結合に関しては、酵素による分解を受けない類似体を用いての、詳細な検討がなされるべきであろう。EcoRIの触媒反応に関しても、新たな知見を得ることができた。

## 論文審査の結果の要旨

合田圭吾氏はリボ核酸鎖をグアニン残基のところを選択的に切断する酵素、リボヌクレアーゼ T<sub>1</sub> と、基質分解産物および基質アナログとの複合体の X線結晶構造解析を行い、従来提唱されていた本酵素の反応機構の解釈を変える知見を得、また、サブサイトへの結合様式を初めて明らかにした。これらの知見と、それにもとづく反応機構の解明研究は生物学的にも工業的にも有用な本酵素の特性を説明する重要な業績であり、博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。