

氏名	ふじ 藤 井 たか 貴 ひろ 弘
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1155 号
学位授与の日付	平 成 12 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Study of structural formation of bovine pancreatic ribonuclease A : Role of the carboxyl terminal region (ウシ膵臓リボヌクレアーゼAの構造形成に関する研究 : C末端部位のはた す役割) (主 査)
論文調査委員	教 授 林 力 丸 教 授 清 水 昌 教 授 岩 村 俣

### 論 文 内 容 の 要 旨

ウシ膵臓リボヌクレアーゼ A (RNase A) はアミノ酸124残基からなる分子量13,683の単純タンパク質で、4個のジスルフィド結合を有している。これは変性、還元状態から空気酸化により構造と活性を完全に回復するが、C末端の4残基を除去すると活性の回復は見られなくなる。本研究は、RNase A のC末端アミノ酸1～4残基を部位特異的変異導入法を用いて除去あるいは置換し、それらの残基の立体構造の再生に対する役割を検討、解明している。本論文は3章より構成されており、その主な内容は以下のとおりである。

第1章では本酵素を用いて行なわれてきたタンパク質の構造形成に関する最近までの研究動向を述べ、本研究の位置付けを明らかにしている。

第2章では RNase A のC末端アミノ酸残基である Val124 を置換して6つの変異型酵素 (V124G, V124A, V124L, V124W, V124E, V124K) を作製し、その再生と諸性質に関して解析を行なっている。どの変異型酵素も二次構造、活性、熱安定性は野生型とほぼ同じであったが、変性、還元後の空気酸化による再生は、V124E と V124L 以外では低下し回復率も野生型より低いものの、グルタチオン存在下での再生はいずれも野生型と同程度に速やかに活性回復をすることを明らかにした。この際、ジスルフィド結合の形成速度は野生型と同様であった。以上のことから RNase A の Val124 の側鎖のサイズと疎水的な性質が構造の再生に重要であることを立証している。

第3章では RNase A のC末端1～4残基を順次除去した変異型酵素 (des-124-, des-(123-124)-, des-(122-124)-, des-(121-124)-RNase A), C末端の4残基をすべてアラニンとした変異型酵素 (Ala(121-124)), Asp121 を置換した変異型酵素 (D121A, D121E, D121K) を作製してその再生と諸性質に関して解析を行なっている。C末端アミノ酸を1～3残基除去した変異体は、二次構造は崩れていないが活性と熱安定性は低下しており、空気酸化による再生は除去の数が増えるにつれて活性の回復速度や回復率が低下するが、グルタチオン存在下ではいずれも速やかに再生することを明らかにした。C末端4残基を除去すると、グルタチオンの存否にかかわらず再生しなかった。ジスルフィド結合の形成速度はどの変異体も野生型と同様であった。活性の回復率が低下した原因は正しいジスルフィド結合が空気酸化により再生されないためであり、このことを臭化シアンによる断片化後、マスマスペクトルを解析することで確認した。Ala(121-124)の二次構造は野生型酵素とほぼ同じで活性は低下しており、空気酸化による再生は野生型と比較して活性の回復速度、回復率が低下することを明らかにした。また、Asp121を置換した変異型酵素 D121E の二次構造は野生型酵素とほぼ同じであるが、活性は少し低下しており、その変性、還元後の空気酸化による再生は野生型とほぼ同様であった。D121A と D121K は活性回復速度と回復率が低下した。以上のことから、RNase A の再生にはC末端部位のアミノ酸側鎖による相互作用、中でも Asp121 の側鎖の負電荷が重要であること、またそれだけでなく主鎖の長さも再生に重要な要因であることを立証している。

これらの結果から、本酵素のC末端部位は再生途中で構造形成の核となり、周囲の構造が正しく作られるのを導く役割をはたしていると推論している。さらに、RNase A のC末端部位はβシートの一部を構成しているが、βストランドが相互

作用するためにC末端部位のアミノ酸側鎖の相互作用が必要であり、また、アミノ酸側鎖間の相互作用がなくても、C末端部分を補う主鎖構造が存在すればコンパクトな構造をつくり出せると考えている。RNase A のC末端部位が存在することでこれら2つの条件を満たすことができるため、構造形成に関してC末端部位が重要な役割を担っていると結論している。

### 論文審査の結果の要旨

本論文はウシ膵臓リボヌクレアーゼ A (RNase A) のC末端アミノ酸1~4残基を部位特異的変異導入法を用いて除去あるいは置換し、それらの残基がRNase Aの立体構造の再生にはたしている役割を検討、解明したもので、評価すべき点は以下のとおりである。

- 1) RNase A のC末端から4残基のアミノ酸を順次除去すると、変性、還元状態からの空気酸化による活性の回復速度と回復率は低下し、4残基除くと正しいS-S結合ができないために活性が回復しないことを明らかにした。
- 2) C末端アミノ酸Val124を置換した変異型酵素の再生実験から、RNase Aの再生にはVal124側鎖の疎水的性質とサイズが重要であることを明らかにした。
- 3) Asp121を置換した変異型酵素の再生実験から、再生にはAsp121の側鎖の負電荷が重要であることを明らかにした。
- 4) C末端の4残基をすべてアラニンにした変異体の再生実験から、C末端部位のアミノ酸側鎖の性質だけでなく主鎖の存在そのものも再生に重要な要因であることを明らかにした。
- 5) これらの結果から、本酵素のC末端部位は再生途中で構造形成の核となり、周囲の構造が正しく作られるのを導く重要な役割を担っていると結論づけた。

以上のように、本研究はRNase AのC末端部位は、出来上がった構造や機能に重要な役割をはたすよりも、構造の形成過程において重要な役割を担うという新知見を得たものであり、生体高分子化学、タンパク質工学、生化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成12年9月21日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。