

氏 名	六 鹿 宗 治 ろく しか そう じ
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	論 理 博 第 465 号
学位授与の日付	昭 和 49 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	<b>Effects of gamma irradiation on the function and conformation of ribonuclease A in dilute solution</b> (水溶液中に於けるガンマ線照射のリボヌクレアーゼAに及ぼす影響)
論文調査委員	(主 査) 教 授 波多野博行    教 授 香月裕彦    教 授 大杉治郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

重要な生体成分の一つである酵素分子について水溶液中における放射線照射による酵素の失活の機構の研究を行い、酵素の生物的活性発現の機能と酵素分子の構造変化との関連を明らかにするために、ウソ腺臓のリボヌクレアーゼAに対する  $^{60}\text{Co}$  の  $\gamma$  線照射の影響を研究した。

精製したリボヌクレアーゼAの0.02~0.1%水溶液に  $^{60}\text{Co}$  の  $\gamma$  線を照射すると、低分子合成基質である 2'-3'-環状シチジル酸 (cCMP)' に対して一次反応型の失活曲線が得られ、また高分子基質である酵母のリボ核酸 (RNA) に対して低線量域で折れ曲がりを持つ失活曲線が得られた。この酵素の失活に関するG値は種々の酵素濃度に対する37%の線量で0.44であった。

これらの失活機構を解明するために、二種類の基質 cCMP および RNA を用いてこの酵素の照射前後のミカエリス定数  $K_m$ 、および阻害剤である 2'-シチジル酸に対する阻害定数  $K_i$  を求めて比較した。その結果、0.1%水溶液において、220 Krad 照射で  $K_m$  に変化はみられず、また  $K_i$  については RNA に対してのみ線量と共に増大することが認められた。 $K_i$  の変化がみられない低分子基質 cCMP と構造が類似した阻害剤 2'-シチジル酸とこの酵素の阻害定数は  $2.4 \times 10^{-6}\text{M}$  であったから、 $10^{-4}\text{M}$  の阻害剤で平衡化したビオゲル P-4 のカラムを用いて浸透クロマトグラフィーを行った結果、阻害剤の結合量は照射線量の増加に伴ない酵素活性と平行して減少した。この減少では阻害剤の結合量の減少の方が遅かったことから  $\gamma$  線照射によって触媒活性を失ってもまた阻害剤、従って低分子基質との結合が可能な酵素分子が存在することが認められた。その割合は活性分子の数%であった。

酵素分子の触媒活性が  $\gamma$  線により影響を受けることを知るために酵素反応の熱力学的パラメーターをアレニウスプロットにより求めた結果、120 Krad の照射によって酵素活性が半減した酵素でも活性化パラメーターに変化がみられなかった。

リボヌクレアーゼAの1分子中の4個のヒスチジン残基の解離定数はそれぞれ異なっているが  $\gamma$  線照射によるこれらの解離定数の変化を検討した結果、酵素自身および酵素-基質複合体のいずれにも影響はみ

られなかった。このことから活性中心部における解離性基の存在状態には影響がないことがわかった。

この酵素のアミノ酸組成の $\gamma$ 線照射による変化は 160 Krad の照射の場合、チロシンのG値が最も高く、次いでセリン、シスチン、メチオニン、およびリジンであった。これらの一次構造の変化が高次構造と活性に及ぼす影響をしらべるために旋光分散の測定を行った結果、照射線量の増加に従って平均残基旋光度は減少した。この結果は $\gamma$ 線照射により $\alpha$ ヘリックスおよび $\beta$ 構造が崩壊することを示すものである。この変化量は活性の減少と対応せず、照射線量に比例したので、高次構造の変化を調べるためにジアゾニウム-1-H-テトラゾールによるチロシンおよびヒスチジン残基の化学修飾を行った。その結果 60 Krad の照射により 6 個のチロシン残基がすべてモノアゾ化またはビスアゾ化され「埋もれた」状態にある 3 残基が他の 3 残基と同様にたんぱく質の表面に「露出した」状態に変ることが示された。またこの酵素の可逆的熱変性の活性化パラメーターの値も減少することが示され、活性中心部の構造が $\gamma$ 線の照射により熱変性をうけ易い状態に変ることが明らかとなった。

以上の結果を総合して、水溶液中で $\gamma$ 線の照射をうけたウシ膵臓リボヌクレアーゼAは、比較的特定のアミノ酸残基が修飾され、活性中心部に構造の変化が現れるが、基質や阻害剤との結合に変化が現れるまでには至らず、さらに活性中心のアミノ酸残基が損傷をうけてはじめて失活するものであることが明らかにされた。

参考論文は、第1部は $\gamma$ 線照射による水溶液中のアミノ酸の酸化的脱アミノ反応について、第2部は $\gamma$ 線照射による細菌アルカリ性プロテアーゼの乾燥状態における失活、第3部はシスチンの放射線分解機構、第4部はリボヌクレアーゼの放射線損傷を調べた研究である。第5部は核酸関連化合物のイオン交換クロマトグラフィー、第6部から第9部に至る一連の研究はアミノ類のイオン交換クロマトグラフィー、そして第10部は還元糖のゲル浸透クロマトグラフィーに関する研究の成果である。

### 論文審査の結果の要旨

酵素が存在する水溶液の状態で放射線を照射した場合の溶質は溶質分子の放射線損傷のほかに溶質分子が水の放射線分解生成物と反応する変化が起るものである。この際水から生成する分解物はラジカル種の $H\cdot$ や $OH\cdot$ のほかに水和電子 $e_{aq}^-$ あるいはヒドロパーオキシラジカル $O_2H\cdot$ や過酸化水素 $H_2O_2$ などである。これらの活性種には強い酸化的作用を示すものが多く、生物に対する放射線の作用の初期の過程に於ても、生体を構成する種々の分子と反応し、特に $OH$ ラジカルや水和電子が反応することにより、電子状態の変化を惹き起し、これが分子の他の部分に波及して生物的活性をもつ分子の失活が起り、遂には生物の死に至るものと考えられている。これらは化学的立場からは生体に関連する化合物の酸化的あるいは分解的修飾であると考えることができる。

このような化学的立場から生物的活性物質を扱うことは必ずしも容易ではないが、申請者はこのような立場から生物的活性を有する生体物質の放射線照射による変化と活性の変動の化学的機構を明らかにする研究を行い、それをとおしてその生物活性発現に必要な機能と構造との関連を明らかにしようとしている。

この研究に於てはウシ膵臓のリボヌクレアーゼAの精製標品を用いその水溶液に $^{60}Co$ の $\gamma$ 線を照射して、低分子合成基質の2'-3'-環状シチジル酸(cCMP)、高分子天然基質の酵母リボ核酸(RNA)に対す

る作用を解析した。その結果、前者の場合には一次反応型失活が、後者の場合には低線量域で折れ曲がる型の失活が観測され、G 値として  $D_{37}$  線量より 0.44 の値を得た。さらにこれらの反応速度論的パラメーターを求め、Michaelis 定数  $K_m$  および阻害定数  $K_i$  を比較したところ、 $K_m$  の変化はみられず、また cCMP に対する  $K_i$  も変化なく、RNA に対する  $K_i$  が照射線量と共に増大することが認められた。cCMP に対する  $K_i$  に変化がみられないので cCMP と類似構造をもつ 2'-シチジル酸と酵素との結合を研究し酵素と阻害剤との複合体における阻害剤のモル数を求めた結果、失活酵素分子でもなおよく低分子基質と結合可能な分子が存在していることを認めている。Arrhenius プロットによって求めた熱力学的パラメーターの値からも活性の半減した酵素分子でも活性化パラメーターに変化はみられないことも指摘している。

酵素活性に関与する活性中心に含まれるアミノ酸残基については、4 個のヒスチジン残基のうちの 12 番および 115 番目の活性残基について解離定数の変化を Dixon プロットから求め、解離定数に変化がみられないことを認めている。このことは活性中心部の解離状態は変化していないことを示すものである。化学的修飾法を用いてチロシン残基とヒスチジン残基の状態識別を行った結果では、チロシン 6 残基のうち 3 個が '埋もれた' 状態から '露出した' 状態に変化することが認められ、またジアゾニウム-1-H-テトラゾールとの反応性も高くなることが示された。

このような結果と、参考論文で示されたアミノ酸組成の変化の結果などを併せて、水溶液中で  $\gamma$  線照射されたウシ膵臓リボスクレアーゼ A は水より生成した種々の活性種により一次構造上比較的特定のアミノ酸残基が修飾を受け、酵素たんぱく質分子の等電点は変化し、分子内水素結合は破壊されて局所的構造に変化が起ることが明らかにされた。これらの変化は比較的低線量域でも起るが、それらの変化にも拘らず酵素活性を保持している分子がなお多くあることも示された。しかし、活性中心部の構造はかなり弛緩しており、活性中心を構成するアミノ酸残基に損傷が直接及ぶと、この酵素は 'all or none' の形で失活するものであることが明らかにされている点は全く新しい結論をえたものと判断される。

要するに申請者の研究は放射線化学と放射線生物学の境界領域において貴重な知見を加えたものでこの分野の進歩に寄与する処が少なくない。また参考論文を含めて申請者は豊富な知識と優れた研究能力をもっていることを認めることができる。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。