

氏 名	小 宮 山 忠 純 こ み やま ただ ずみ
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	薬 博 第 90 号
学位授与の日付	昭 和 47 年 7 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研 究 科・専 攻	薬 学 研 究 科 薬 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Rhizopus 族菌の産生するリボヌクレアーゼの研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 冨 田 謙 吉 教 授 山 科 郁 男 教 授 高 木 博 司

論 文 内 容 の 要 旨

著者はかびの1種である *Rhizopus* 族菌の産生するリボ核酸を基質とし、塩基に対して厳密な特異性をもたないリボヌクレアーゼ (RNase Rh) の 1) 精製法の改良, 結晶化, 2) 精製酵素の諸性質を調べたのち, 3) 反応速度論的手法による活性中心のアミノ酸残基の推定, 4) メチレンブルーによる本酵素の光酸化, 5) ヨード酢酸アミドを用いた化学修飾の実験をおこない次に述べる結果を得た。

1) 酵素の精製

固体培養した *Rhizopus* 族菌の水抽出液をアルコールで沈澱させたものを粗酵素とし、アセトン分画, DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-75, 蒸留水透析をおこなうことにより、ディスク電気泳動, 超遠心的に均一な結晶酵素標品を比較的容易に再現性よく得ることができる。

2) 酵素の性質

本酵素は 219 残基のアミノ酸残基より成り、糖成分を含まず NH_2 末端にグリミンをもち、分子中 5 コの -S-S- 結合をもつ 1 本鎖の分子量約 24,000 の単純タンパク質である。

旋光分散の結果からおそらく本酵素は β - 構造を含むものと思われる。

分光々度滴定, Solvent Perturbation およびテトラニトロメタンとの反応性から本酵素 17 のチロシン残基中の約 10 残基が分子の表面に露出した状態で存在するものと思われる。また本酵素中に含れる 4 残基のトリプトファン残基は酵素分子の疎水領域に存在するものと考えられる。

3) 反応速度論による活性中心アミノ酸残基の推定

オルトリン酸および種々のヌクレオチドは基質と拮抗的に阻害し、ヌクレオチド阻害剤は酵素分子と 1:1 の割合で結合するものと思われる。またヌクレオチド阻害剤の阻害の強さの順はアデニル酸 > グアニル酸 > シチジル > ウリジル酸の順で、 Michaelis 定数, 阻害定数の pH 依存性から酵素反応の活性中心のアミノ酸残基として pK_a 6.0 のヒスチジン残基が推定された。

4) メチレンブルーによる本酵素の光酸化

メチレンブルー存在下の本酵素の光酸化的失活は種々の阻害剤により保護され、その保護効果の順序は酵素反応の阻害力の順序と一致し、光酸化的失活は特異的に本酵素の活性中心でおこっていることを示した。また光酸化的失活の pH 依存性から、pKa 約 6.0 のアミノ酸残基の破壊が失活原因と考えられ、ヒスチジン残基の関与が推定された。またアミノ酸分析の結果からも 1～2 残基のヒスチジン残基の活性中心への関与が示された。

5) ヨード酢酸アミドを用いた化学修飾

ヨード酢酸アミドにより本酵素は中性側ですみやかに、酸性側でゆるやかに失活する。ヨード酢酸アミドによる不活性化は種々の阻害剤により保護効果がみとめられ、その順序は阻害剤の阻害力の強さの順と一致した。1-¹⁴C ヨード酢酸アミドを用いた実験から本酵素中ヨード酢酸アミドと反応するアミノ酸残基はヒスチジンが主であり、少量のリジン、メチオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸等のカルボン酸との反応が認められた。ヒスチジンの大部分は 3-カルボキサミドメチルヒスチジンであった。これら各残基の ¹⁴C のとりこみと、失活の相関関係を詳細に追跡した結果、3-カルボキサミドメチルヒスチジンとして反応するヒスチジン残基の修飾が活性の消失の原因であることをたしかめた。モノヨード酢酸アミドにより化学修飾した酵素は、結晶酵素標品として得ることができ、この様にして得た修飾酵素標品の構造はクロシンの滴定曲線、トリプトファンの蛍光等からみれば Native 酵素のそれとほとんど変わらないことを示した。

これらの結果からモノヨード酢酸アミドにより化学修飾をうける特異的失活をもたらすアミノ酸残基は、3-カルボキサミドメチルヒスチジンとして反応する 1～2 残基のヒスチジン残基であることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

著者は、広く生体内に存在し、リボ核酸を加水分解するリボヌクレアーゼのうち、厳密な基質特異性をもたない *Rhizopus* 族菌の産生する RNase Rh を用い、酵素の構造と機能との相関を明らかにするための研究を行ない、次のような結果を得た。(1) 酵素の精製法の改良 菌体の水抽出液を DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-75 クロマトグラフィーにかけ、水透析を行なって、ディスク電気泳動、超遠心的に均一な結晶酵素標品を容易に高収量で得ることが出来るようになった。(2) 酵素の諸性質 本酵素は、アミノ酸残基 219 個、糖は含まず、N 末端にグリシン、-S-S- 結合 5 個をもつ一本鎖で分子量約 24,000 の蛋白質であることが判明した。(3) 反応速度論による活性中心のアミノ酸残基の推定 オルトリン酸、種々のヌクレオチドは基質 RNA と拮抗的に阻害する。後者は酵素分子と 1:1 の割合で結合しているものと思われ、阻害の強さは、アデニル酸 > グアニル酸 > シチジル酸 > ウリジル酸の順であった。また、Michaelis 常数、阻害物質常数の pH 依存性から、酵素反応の活性中心のアミノ酸を基として、pKa 6.0 のヒスチジン残基が推定された。そこで、このことを確かめるために次の実験を行なった。(4) メチレンブルーによる本酵素の光酸化 メチレンブルー存在下の本酵素の光酸化による失活は、種々の阻害剤によって保護され、保護効果の順序は阻害力の順序と一致した。従って、(3)の結果と併わせて、光酸化的失活は特異的に酵素の活性中心で起っていることが示された。また光酸化による失活の pH 依存性から、pKa 約

6.0のアミノ酸残基の破壊が考えられ、従ってヒスチジン残基の関与が推定された。アミノ酸分析の結果からも、ヒスチジン残基3個のうち、1～2個の活中心への関与が示された。(5)ヨード酢酸アミドによる化学修飾 ヨード酢酸アミドにより本酵素は中性で速かに、酸性ではゆるやかに失活する。この失活化も、種々の阻害剤で、その強さの順で保護される点が(4)の場合と同様であった。また $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ヨード酢酸アミドを用い、その取込みと失活の度合との詳細な研究、ならびに反応物質の分析を行ない、3-カルボキサミドメチルヒスチジンを生成するヒスチジン残基の修飾が失活の原因であることを確めた。

以上、著者は、RNase Rhの精製法を改良後、結晶酵素を用い、現在応用されているあらゆる可能な方法を駆使して活性中心の推定を行なった。この結果は、酵素の構造と機能との相関を明らかにする上で価値ある寄与をなしたものである。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。