

氏 名	原 田 正 富 はら だ まさ とみ
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	薬 博 第 102 号
学位授与の日付	昭 和 48 年 7 月 23 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	Aspergillus saitoi の產生するリボヌクレアーゼの カルボキシメチル化について
論文調査委員	(主 査) 教 授 富 田 謙 吉 教 授 山 科 郁 男 教 授 高 木 博 司

論 文 内 容 の 要 旨

リボヌクレアーゼは RNA を分解する酵素であり、広く自然界に分布している。これらのリボヌクレアーゼには、RNA の構成塩基に対して特異性を有する酵素と、非特異的な酵素がある。牛脾臓の RNase A および *Aspergillus oryzae* の RNase T₁ は、それぞれピリミジン塩基、グアニン塩基に特異的である。この両者については酵素の構造と機能について既に詳細な研究が行われ、触媒機能に寄与するアミノ酸残基等が明らかにされている。一方塩基特異性を持たない酵素についての研究はいまだ十分ではなく、*Aspergillus oryzae*, *Rhizopus* 属の菌に由来するリボヌクレアーゼについて若干の性質が検討されているにすぎない。

著者は塩基特異性を持たないリボヌクレアーゼの構造と機能の関係を明らかにし、RNase A, RNase T₁ と比較研究する目的で、*Aspergillus saitoi* からの塩基特異性を持たないリボヌクレアーゼ (RNase M) の精製法の改良を行い、化学組成を決定した。また RNase A, RNase T₁ の活性中心の性状を解明する手段として有用であったヨード酢酸およびヨードアセトアミドによるアルキル化反応を用いて、活性中心に存在するアミノ酸残基について検討し、次の知見を得た。

(1) 酵素原料に混入しているプロテアーゼおよびセルラーゼの影響を減らして、RNase M の収量を上げるために、過塩素酸処理、DEAE-Sephadex を用いたクロマトグラフィーが、非常に有効であることを見出した。この改良法で粗抽出液から40%の収率で 170 mg の純粋酵素を得ることができた。

(2) RNase M が14個のマノース、1~2個のグルコースおよび3個のグルコサミンを含有する分子量 38,780 の糖タンパクであり、その NH₂ 末端はトレオニン、C末端はセリンであることを明らかにした。アミノ酸組成等から酸性アミノ酸含量が高いこと、7個の S-S 結合が存在することが認められた。

(3) RNase M のヨード酢酸による失活は pH 3.5 で最大であり、RNA に対する RNase M の酵素活性の至適 pH と一致していた。また変性剤 (6 M グアニジン塩酸) の存在下では失活速度が著しく低下しており、ヨード酢酸との反応には酵素の native な構造が必要であることが認められた。

2',(3')-AMP 等の拮抗阻害剤はアルキル化による失活を保護することから、ヨード酢酸は酵素の活性中心またはその近傍のアミノ酸残基を修飾すると考えられる。

^{14}C - ヨード酢酸を利用して、RNase M 1 分子当たり約 1 残基のヒスチジンがヨード酢酸と特異的に反応して失活することを見出し、この際にヒスチジンのイミダゾール環の N-3 位がカルボキシメチル化を受けることを明らかにした。このことは今まで他のピリミジン塩基またはグアニン塩基に特異的なリボヌクレアーゼに見られなかった現象である。

RNase M とヨードアセトアミドとの反応は、ヨード酢酸と異なりアルカリ性において反応性が高く、2 残基のヒスチジンの N-3 位がカルボキサミドメチル化を受けた段階で失活した。以上の実験結果から RNase M の活性中心には 1 残基または 2 残基のヒスチジンが含まれており、そのイミダゾール環の N-3 位のアルキル化剤に対する反応性が非常に高くなっていると考えられる。

(4) カルボキシメチル化 RNase M (CM RNase M) およびカルボキサミドメチル化 RNase M (CAM RNase M) の諸性質について native RNase M と比較検討した結果、蛍光スペクトルおよび分光滴定等によって調べた限りでは全体的な酵素の構造に大きな変化はないが、CM RNase M に対する 1-フルオル-2,4-ジニトロベンゼンの反応性は CAM RNase M, native RNase M より高まっていた。またこれらの酵素誘導体に対する 2'-AMP の結合定数は、CM RNase M が native RNase M の約 $\frac{1}{11}$, CAM RNase M が約 $\frac{1}{2}$ に低下していることから、CAM RNase M は CM RNase M よりむしろ native RNase M に類似した構造をとっていると考えられる。

(5) ^{14}C - ヨード酢酸を用いてカルボキシメチル化 RNase M を調製し、タンパク分解酵素によって消化したところ、アミノ酸配列の異なる 2 個の ^{14}C - 標識ペプチドを得た。その結果、RNase M の活性中心には 2 残基のヒスチジンが含まれており、いずれか一方の化学修飾によって酵素活性が失われることが明らかになった。

リボヌクレアーゼの活性中心に 2 残基のヒスチジンが存在して酵素活性に関与していることが、RNase A においても示されている。本研究の結果は、塩基特異性を持たない RNase M の場合においても、同様に 2 残基のヒスチジンが関与する反応機構を考える根拠を与えるものとする。

論文審査の結果の要旨

酵素の活性中心に関する研究は、蛋白の構造と機能との相関を解明するために近年急速に発展しつつある分野である。原田正富は、RNA 分解酵素 RNase には、基質の構造塩基に関して特異的なものと非特異的なものがあるが、殊に後者に属する RNase の構造と機能に関する研究の乏しい事実に着目し、化学修飾法による研究を行ない以下の成果を得た。(1) 塩基特異性をもたない RNase として、入江等により、*Aspergillus saitoi* 製剤から分離されていた RNase M を選び、分離精製法を改良して Disc 電気泳動的に単一な酵素標品を 40% の高収量で得ることに成功した。(2) 精製酵素の分子量 (ゲル濾過法、約 38,000; アミノ酸組成から 35,575) を測定し、N 末端 (Thr-Ile-Asp-) 及び C 末端 (-Gln-Ser) のアミノ酸配列を決定、RNase M が一本鎖のポリペプチドであることを推定した。(3) RNase M は、その酵素反応の速度論的定数の pH 依存性、光酸化による失活速度定数の pH 依存性、また光酸化物のアミノ酸分析か

ら pKa 5.9 のヒスチジン残基が活性中心に関与しているものと予想されていた。原田はこれを確定するため、各種ハロゲン化脂肪酸による種々の pH における RNase M の失活を検討した。その結果、酵素の至適 pH 3.5 においてヨード酢酸により一残基の、また pH 8 においてはヨード酢酸アミドにより二残基のヒスチジンのアルキル化により、100 % 失活することを認めた。これらの失活は酵素変性剤 6M-グアニジン塩酸、または拮抗阻害剤 2' (3')-AMP 等により抑制された。従って、アルキル化には酵素の native な構造の必要性と、1~2 残基のヒスチジンが活性中心に含まれることが確実となった。(4)さらに RNase M を ^{14}C -ヨード酢酸で修飾して一残基のカルボキシメチル基の導入を定量的に確定し、ついで修飾された ^{14}C -RNase M のアミノ酸分析、生成物の高圧電気泳動により、ヒスチジンの N-3 位がカルボキシメチル化されていることを決定した。N-3 位の修飾は、塩基特異性をもつ他の RNase では見られなかった現象である。(5)さらに ^{14}C -カルボキシメチル化 RNase M を種々の蛋白分解酵素で処理して活性中心のヒスチジンを含むペプチドの一次構造 Thr-Ile-His-Gly-Ser と Glu-Gly-His-Gly-Thr (Ser)-Asp-Ile とを推定した。

以上の結果から、原田は RNase M において活性中心にヒスチジン二残基が関与し、一方の修飾によって他方はアルキル化されにくくなるものと推論した。

原田の研究は、手法の精確さ、計画の独創性、結果の解析において優秀であり、その成果は、酵素蛋白の構造と機能とに関して新しい貴重な知見を加えたといえる。

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。