

氏 名	谷 水 直 樹
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1069 号
学位授与の日付	平成 11 年 5 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 農 芸 化 学 専 攻
学位論文題目	Conformational properties of amino acid residues in the active site of bovine pancreatic ribonuclease A (ウシ膵臓リボヌクレアーゼ A の活性中心アミノ酸残基の配向特性)

論文調査委員 (主 査) 教 授 林 力 丸 教 授 池 田 篤 治 教 授 岩 村 俣

論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質の構造機能相関については、X線結晶構造解析やNMRなどの手法の進歩により、多くの情報が得られるようになったが、アミノ酸残基それぞれが立体構造を規定するうえでどのような役割を果たしているのか、触媒残基の組み合わせおよびその間の配向性が機能発現の上でどの程度重要であるのか、また、この配向性が規定されるために周辺のアミノ酸残基がどのような役割を果たしているのかなどについては明らかになっていない。

本論文では部位特異的変異導入法を用い、ウシ膵臓リボヌクレアーゼ A (以下 RNase A と略す) の活性中心構造の構築に関する研究と、タンパク質の安定性維持とフォールディングにおける疎水性アミノ酸残基の役割についての解析を行っている。

その主な内容は以下に示す通りである。

第一章では、RNase A についての現在までの研究をまとめ、本酵素についての疑問点を提示することで、本研究の目的を明確にしている。

第二章では、RNase A の触媒残基の His12 と His119 の組み合わせを、RNase T₁ でみられるような、ヒスチジンと酸性アミノ酸残基の組み合わせに変換した場合の活性変化を検討し、①H12D および H12E の変異体酵素の触媒活性が大きく低下すること、②ヨード酢酸による失活速度の測定およびコンピューターシュミレーションの結果から、変異体酵素では触媒残基が正しく配向していないこと、③化学修飾部位の解析から、His12 に代わって導入されたアスパラギン酸やグルタミン酸の反応性がヨード酢酸を求核攻撃できないほど低いことなどを明らかにしている。以上のように、Asp12 と Glu12 が T₁ の触媒残基である Glu58 とは対照的な性質を持つことから、効率の良い触媒反応を行うためには、触媒残基間の最適な配向が欠かせないものであることを明確にし、活性中心の構築原理を明らかにするためには触媒残基周辺のアミノ酸残基の役割を解析しなくてはならないと指摘している。

第三章では、活性中心の構築における触媒残基近傍のアミノ酸残基の役割について検討し、His12 と His119 の近傍に存在する Phe120 をロイシン、アラニン、トリプトファン、グルタミン酸に置換すると、活性が低下することを明らかにしている。ヨード酢酸による失活速度の測定と、コンピューターシュミレーションの結果から、変異体酵素では His12 の配向が変化していることを活性低下の原因としてあげている。以上のことから、Phe120 は His12 の配置を制約し、2つのヒスチジン残基間の配向を正しく保つのを助けていると推定している。さらに、触媒残基の Lys41 と水素結合を形成している Asn44 をアラニンに置換した場合にも活性が大きく低下することを示し、触媒残基の配向が周辺のアミノ酸残基によって正確に規定されていると結論している。

第四章では、RNase A の構造安定性に対する Phe120 の役割を検討し、これをアラニンやグルタミン酸に置換すると熱安定性が大きく低下することを明らかにし、Phe120 は疎水性アミノ酸残基として RNase A の安定性を維持していると結

論している。さらに、アラニンやグルタミン酸に置換した変異体酵素では、リフォールディングの速度と効率が大幅に低下することを示し、間違ったジスルフィド結合が蓄積することを示唆している。以上のことから、Phe120 はジスルフィド結合の形成を伴うリフォールディングを正しく進行させるために、中間体を安定化する役割も担っていると結論している。

第五章では、活性中心近傍のループ構造に存在する Gly68 の触媒機能と構造安定性およびリフォールディングに対する役割を検討し、これをバリンに置換しても活性にはほとんど影響しないが、熱安定性とリフォールディングの効率がともに大きく低下することを明らかにしている。以上のことから、ループ構造に存在するグリシンは RNase A の構造およびリフォールディング中間体の安定性を高める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

X 線結晶解析や NMR などによって構造解析されたタンパク質についての課題は、アミノ酸残基それぞれが機能発現や立体構造を規定する上でどのような役割を果たしているかを明らかにすることである。本論文は、ウシ膀胱リボヌクレアーゼ A の活性中心の構築における触媒残基およびその周辺のアミノ酸残基の役割に関して詳細な研究を行ったものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. 酵素が効率の良い触媒反応を行うためには、触媒残基の配向が非常に厳密に規定されなくてはならないことを示すとともに、その配向が規定されるためには、触媒残基周辺のアミノ酸残基の役割が大きいことを明らかにした。

2. 触媒残基近傍のアミノ酸残基は、ファンデルワールス相互作用や水素結合などの非共有結合によって触媒残基間の配向を規定し、活性中心の構築に寄与していることを明らかにした。つまり、触媒残基はその周辺のアミノ酸残基と協調して、活性中心を構築していることを明らかにした。

3. Phe120 は疎水性アミノ酸残基として、酵素の安定性を高める役割とともに、リフォールディングが正しく進むように中間体を安定化する役割も担っていることを明らかにした。

4. ループ構造に存在する Gly68 をバリンに置換すると構造安定性が大きく低下し、正しいリフォールディングの過程が乱されることを明らかにした。

以上のように、本論文は、酵素の触媒残基の正しい配向を規定するためには周辺のアミノ酸残基の役割が重要であることを明らかにし、また、タンパク質の構造安定性およびジスルフィド結合の形成を伴うリフォールディングにおける疎水性アミノ酸残基の役割について新たな知見を与えており、生体高分子化学、酵素化学および構造生物学の発展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 11 年 3 月 5 日、論文なら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。