

|             |                                                                                                                                    |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | ちや 茶 谷 絵 理                                                                                                                         |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (農 学)                                                                                                                          |
| 学 位 記 番 号   | 農 博 第 1222 号                                                                                                                       |
| 学位授与の日付     | 平 成 14 年 3 月 25 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      | The Structural Basis for the Functionality and Stability of Bovine<br>Pancreatic Ribonuclease A<br>(ウシ膵臓リボヌクレアーゼ A の機能性と安定性の構造的基盤) |
| 論文調査委員      | (主 査)<br>教 授 林 力 丸 教 授 關 谷 次 郎 教 授 西 岡 孝 明                                                                                         |

### 論 文 内 容 の 要 旨

本研究は、タンパク質の機能を発揮するのに必要な立体構造の構築原理を化学的規範において解明することを目標におき、構造内部でコアを形成している疎水性アミノ酸残基の役割を解析したものである。ウシ膵臓リボヌクレアーゼ A (RNase A) を研究材料として、哺乳類の酵素の間で保存性の高い Phe120 と Phe46 残基の変異体酵素各 4 種を作製し、それらの構造安定性と活性の変化を化学修飾、X 線結晶解析、熱および圧力因子による変性エネルギーの比較などにより詳細に検討している。その成果の主要な点は以下に示すとおりである。

第一章では、20世紀の初期から今日まで豊富に蓄積されている RNase A の酵素学的ならびにタンパク質化学的研究における歴史的成果のうち、特に個々のアミノ酸残基の特性が活性・構造安定性に果たす役割を中心にまとめている。そのうえで、タンパク質の構築原理を追究するために、アミノ酸残基に注目する本研究の妥当性を明確にしている。

第二章では、触媒残基 His12 と His119 の両者に近接する Phe120 の役割解明を述べている。すなわち、Phe120 を Leu, Ala, Gly, Trp 残基に置換した結果、触媒活性が大幅に減少することを明らかにしたうえ、それらの His12 と His119 へのカルボキシメチル化速度を比較するとともに、1.4 Å 高分解能で置換体の X 線結晶構造解析に成功している。これにより、Phe120 は触媒残基 His119 の空間位置を厳密に規定することによって高効率の触媒活性を可能にすることを明確にしている。

第三章では、疎水性コアの中央部に存在する Phe46 の役割解明を行っている。Phe46 を Val, Ala, Glu, Lys に置換した結果、Phe46 置換によるフォールディングの異常と構造の著しい不安定化を見出し、Phe46 が構造形成と構造安定性に大きな貢献をなすことを示している。さらに、物理的因子として熱因子に加え圧力因子を用いアンフォールディングの過程を比較した結果、アンフォールディングの中間体の変異体のみに見られることを明らかにし、Phe46 は、RNase A 固有の立体構造を形成するのに中心的な位置にあり、疎水性コアのなかでも特に重要な役割を果たすと述べている。

以上の研究成果は、通常基質などとの直接的な相互作用がほとんどなくタンパク質内部に埋もれている疎水性残基が、構造形成ばかりでなく、触媒残基の空間的配置に重要な役割を担うこと、また、疎水性残基による核形成が正しく行われて初めて機能的かつ安定なタンパク質の形成が可能となることを実証したものである。特に、Phe46 は、フォールディングに不可欠な残基であることを示し、疎水性残基がタンパク質のフォールディングにおける鍵となることを明確にしたものである。また、方法論として、タンパク質のアンフォールディング実験における変性因子として圧力を熱と併用することは、立体構造の協同性を調べるのに有効な手段であることを提起している。

### 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 の分子内部に集まる疎水性残基のうち、Phe120 と Phe46 残基が立体構造や活性に果たす役割の重要性を詳細に解析した研究であり、評価すべき成果は以下のとおりである。

1. Phe120 の変異体酵素 (F120L, F120A, F120G, F120W) の触媒活性が激減することを見出し、その原因を解明した。すなわち、Phe120 の置換と触媒残基である His12 ならびに His119 の位置変化の相関関係をカルボキシメチル化の速度変化より解析し、Phe120 残基は触媒残基の空間的位置関係を正しく保つのに重要であるとした。
  2. 野生型酵素と、3 種の変異体酵素 (F120A, F120G, F120W) の結晶化を行い、1.35-1.00 Å 分解能までのデータを得、分子置換法により最終的に 1.4 Å 分解能の高精度で立体構造を決定した。このことより、His119 側鎖の 1 Å 程度の微小な位置変化が触媒活性の激減を引き起こすことを実証した。
  3. Phe46 変異体のうち、F46E と F46K は構造が不安定化し、正しい構造を保持せず、また、F46A はフォールディングをしないことを見出し、ただひとつの残基置換が酵素分子の構造形成に致命的な欠陥を生み出すことを明らかにした。
  4. 野生型酵素と変異型酵素 (F46V, F46E, F46K) の熱と圧力によるアンフォールディングを比較し、Phe46 変異体の圧力によるアンフォールディングでは部分構造が残ることを見出した。これより Phe46 は疎水性コアの協同的構造形成に必須なことを証明した。同時に、タンパク質のアンフォールディング実験で圧力を熱と並行して用い比較する有用性を示した。
- 以上のように、本研究は、ウシ腓臓リボヌクレアーゼ A の立体構造形成や機能発現において疎水性残基の果たす役割に関して詳細に解明したものであり、生体高分子化学、酵素化学、構造生物学およびタンパク質工学の分野に寄与するところが多い。

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14年1月17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。