リボヌクレアーゼの構造と機能

入江昌親

星薬科大学微生物学教室, 〒142 品川区荏原 2-4-41

Structures and Functions of Ribonucleases

Masachika IRIE

*Department of Microbiology, Hoshi College of Pharmacy,
Ebura 2-4-41, Shinagawa, Tokyo 142, Japan*

(Received April 15, 1997)

1. In order to understand the differences in pH optima and reaction rates of RNase A towards low molecular weight substrates and polymer substrates, the subsite structure of bovine pancreatic RNase A was studied. The kinetic studies of various sizes of oligouridylic acids showed that the size of the subsite is three nucleotides long. The kinetic studies on the inhibition of pUp, X-ray crystallographies of RNase A-ApC and pTp complexes, ³¹P-NMR studies on the binding of RNase A-pAp, and pTp showed the presence of P0, P2 and B3 sites. The location of the P0 site was assigned to be Lys66 by X-ray crystallography of the RNase A-pTp complex. The location of the P2 and/or P3/B3 site was determined by studying the enzymatic activities of several S-peptide analogs in which N-Leu was substituted for Lys7 and/or Lys1 coupled with S-protein toward various chain lengths of oligouridylic acids. The experiment suggested that P2 is Lys7 and P3/B3 is Lys1.

2. Several new pyrimidine base specific RNases were isolated and their primary structures were determined. They were two non-secretory RNases, a bovine liver alkaline RNase, a bovine brain RNase, and a bullfrog liver RNase. The bovine brain RNase has extra 16 amino acids at the C-terminus with O-glycosylated Ser. The bullfrog liver RNase was an extremely heat-stable RNase so far known.

3. Two new RNases belonging to RNase T1 family were isolated and their primary structures were elucidated. They were RNases isolated from *Aspergillus saitoi* and a mushroom (hiratake).

The former RNase has a similar structure to RNase T1, but it was a base non-specific and guanylic acid preferential enzyme. From the results of X-ray crystallographic studies of this RNase, we suggested that the mechanism of RNase T1 RNase is essentially a general acid-base catalysis between His40 and Glu58.

4. We isolated several fungal, plant and animal base non-specific acid RNases with a molecular mass about 24 kDa or more, and elucidated their primary structures. These RNases contain two sequences containing common 7-8 amino acid residues in common which include most of the amino acid

residues important for the catalysis. Therefore, we proposed to designate these RNases as RNase T2 family RNase. On the basis of chemical modifications, kinetic studies and protein engineering studies of RNase Rh from *Rhizopus niveus* and RNase M from *A. saitoi*, we assigned that the catalytic site of RNase Rh consists of His46, His104, His109, Glu105, and Lys108. In the mechanism we proposed for RNase Rh, His46 and His109 work as a general acid and base catalysts. His104 was a phosphate binding site, and Glu105 and Lys108 might work to polarize a P=O bond of the substrate or stabilize the pentacovalent intermediate. However, in the reverse reaction of the transfer reaction step and the hydrolysis step of RNase Rh, His109 and His46 work as an acid and base catalyst, respectively. The X-ray crystallographic studies of RNase Rh, an RNase Rh-2'-AMP or d(ApC) complex, and the protein engineering studies of several mutant enzymes assigned the components of the major base recognition site (B1 site) and the minor base recognition site (B2 sites) of RNase Rh. The enzymatic studies of several mutant enzymes indicated that (i) Asp51 is very crucial for adenine base recognition, and the replacement of Asp51 by other amino acid, such as Thr, Ser, Glu, Asn makes RNase Rh more guanylic acid preferential, (ii) the replacement of Trp49 by Phe, and Tyr57 by Trp make the enzyme more pyrimidine and purine bases preferential, respectively. These trials are the first example of marked artificial change in the base specificity of RNases.

Key words—ribonuclease; mechanism; structure; active site; subsite; protein engineering

リボヌクレアーゼと呼ばれる酵素は数多くあるが、本稿で述べるリボヌクレアーゼ (RNase) は古典的な RNA を分解し中間体として 2',3'-環状ヌクレオチドを経て 3'-ヌクレオチドを生成する酵素に限定したい (Fig. 1). リボヌクレアーゼは 1963 年に Smyth らによりウシ膵臓の RNase A の一次構造が決定されて以来¹⁾ 酵素として最もよく研究されてきた。この酵素の触媒中心に 2 つの His 残基と 1 個の Lys 残基が存在していることが明らかとなったのは 1960 年代前半であった。²⁾ しかしながらこの酵素の基質として低分子ヌクレオチドと RNA を使用した場合の至適 pH が異なること、(Fig. 2), ³⁾ dinucleosidephosphate (XpY, X は U 又は C, Y は A, G, U, C のいずれかをさす) の分解され易さは特異性を支配する X のみでなく Y によっても変わること⁴⁾ など簡単な活性中心構造のみからは説明出来ない現象が数多く見いだされた。本稿においてはまずこの点についての解明の過程をサブサイト構造の解明という観点から記述したい。RNase A はピリミジン塩基に対して特異性のある酵素であるが 1980 年代の後半からウシ膵臓の RNase A 以外の新しいピリミジン塩基特異的 RNase の構造が明らかにされだした経過について著者の関わり合いを記述したい。また自然界においては大きく分けてピリミジン塩基特異的酵素以外に、グアニン塩基特異的な酵素が真菌、細菌に、また塩基非特異的な酵素が多くの生物に見いだされている。このうち日本において発見されながら長い間研究の遅れていた第 3 のグループである塩基非特異的 RNase の構造と機能についての最近の研究についてふれたい。

RNase A のサブサイト構造

RNase A による低分子基質 dinucleosidephosphate (XpY) の分解速度を測定すると X が同一であっても Y によって速度が変わる (Table 1). この現象は酵素分子に X を認識する部位と Y を認識する部位があることを示している。X の塩基に対する結合部位を B1 site, X と Y の間の

Fig. 1. Reaction Mechanism of Ribonuclease
B, base

Fig. 2. Optimal pH of RNase A at Various Ionic Strength with RNA and 2',3'-cCMP as Substrates
(a) 2',3'-cCMP as substrate, (b) RNA as substrate.

Table 1. Kinetic Parameters of RNase A at pH 7.0

Substrate	K_m (mM)	V_{max} (s^{-1})
cCMP	3.0	5.5
CpA	1.0	3000
CpG	3.0	500
CpC	4.0	240
CpU	3.7	27
UpA	1.9	1200
UpG	—	—
UpC	3.0	40
UpU	3.7	11

磷酸基に対応する部位を P1 site, Y に対応する部位を B2 site と呼んでいる.²⁾ この関係は Fig. 3 に示す. 酵素による切断は B1 と B2 との間で起こる (Fig. 3). Subsite B1, P1 及び B2 についての説明は RNase A と dinucleosidephosphate の同族体との複合体の X-線結晶解析によって示された.²⁾ また Gamble らによる ATP, GTP, UTP, CTP などによる RNase A の阻害効果は 3'-nucleotide の場合はピリミジン塩基の方がプリンヌクレオチドより強かったのに反し 5'-nucleotide の場合は阻害力は ATP > GTP >> CTP, UTP でありプリンの方が阻害が強かった. この順番は XpY の分解時の Y 塩基の影響とよく似ていた.

このことは ATP, GTP などの塩基が B2 site に結合する可能性を示唆していた.⁵⁾

我々は uridine 2, (3'), 5'-diphosphate (pUp) が 3'-UMP (Up) より 10 倍以上も強力な阻害剤であること, RNase A の活性中心の His 残基をカルボキシメチル化された RNase A でも十分に結合することから (Table 2), 活性中心の 5'-側に磷酸の結合部位があることを推定した.⁶⁾ この部位 (P0 site) は pUp の同族である pTp と RNase A の複合体の X-線結晶解析により Lys66 と同定された.⁷⁾ これは活性中心以外に同定されたサブサイトの初めての例であった. 三井らによる ApC-RNase A 複合体の X-線結晶解析は C が B1 site に A は酵素分子の外側に出ていることを示していた. したがって B1 site の 5'-側には塩基結合部位がないことになる.⁸⁾ RNase A-ApsU 複合体 (sU は thiouridine) に 3'-UMP (Up) を加えると ApsU の解離が起こるが 5'-AMP (pA) の添加では複合体にさらに pA が結合することから pA の 5'-磷酸は P1 site に A は B2 site に結合することが明らかになった.⁹⁾ pA の 5'-p が P1 site に結合することはさらに次の実験から明らかになった. RNase A-pAp 複合体の ³¹P-NMR において 5'-磷酸は活性中心の 2 つの His 残基の影響を受けて 2 段階の適定曲線を示し, 一方 3'-磷酸は一段の適定曲線を示し未結合の 3'-磷酸より少しシフトする. この現象は 3'-磷酸も酵素との結合に関与し, 5'-磷酸は P1

Fig. 3. Schematic Representation of the RNase A Active Site and Adjacent Nucleotide Binding Subsites

B, R, and P refer to the base, ribose and phosphate binding subsites, respectively.

Table 2. The Dissociation Constants of Enzyme-Nucleotide Complex at pH 5.0

Enzyme	Method	K_i (μM)		K_i for Up
		Up	pUp	K_i for pUp
RNase A	Enzymatic	12.5	1.60	7.7
	Spectrophotometric	7.0	0.50	14.0
CM RNase A	Spectrophotometric	4000	18.0	220

Fig. 4. pH-Dependence of the Chemical Shift of the ^{31}P Resonance of pdTp (A) and pAp (B) in the presence and absence of RNase A

(a) ---, ^{31}P signal of pdTp; Ap ●, and ○, ^{31}P signals for 3'-phosphate and 5'-phosphate of pdTp or pAp, respectively. (b) The dotted line and solid line are the ^{31}P signals for 5'-phosphate and 3'-phosphate of pdTp or pAp in the absence of RNase A, respectively. The filled circle and the open circles are the ^{31}P signals of 3'-phosphate and 5'-phosphate of pdTp or pAp in the presence of RNase A.

site に位置することを示していると同時に B2 site の隣に磷酸の結合部位 P2 site の存在を示している (Fig. 4).¹⁰⁾

一方 trinucleosidediphosphate, UpApA と UpApG の分解速度の明らかな相違は B3 site の存在を示していた (Table 3).¹¹⁾ 我々は鎖長の異なるオリゴウリジル酸を基質として, RNase A の反応動力学定数を測定したところ K_m , V_{max} 値はオリゴウリジル酸の鎖長と共に変化し鎖長が3個程度で一定となることから (Fig. 5) subsite は trinucleotide のサイズであると推定した.¹¹⁾ これらの研究で P0, B1, B2, P2, B3 などの subsite の存在が明らかとなったが活性中心の位置 B1, P1, B2 以外は一次構造上の位置が明らかではなかった. Cuchillo らは 6-chloropurinenucleoside による化学修飾体が U>p, UpU などに対する活性中心における触媒能を妨げずオリゴヌクレオチドの分解を妨げることから, このヌクレオチドの修飾位置である Lys1 は B3 site であると推定した.¹²⁾ 我々はこの位置の推定に Richards らによって開発された RNase S' の系を利用した. この系は RNase A を枯草菌のプロテアーゼで限定分解すると RNase A の N-末端から 23 アミノ酸残基のところで切断され, 121 残基の RNase S-protein と 23 残基の S-peptide の複合体を形成する (活性あり). この両者を分離すると活性がなくなるが再び混合すると活性が復活する.²⁾ 我々は Richards の RNase S'-dinucleoside-phosphate の同族体との X-線結晶解析を参考とし, N-末端の Lys7, Lys1 を P2, P3 site と予測し, この1つないし両者を norleucine に置換した S-peptide を合成し S-protein と混合してオリ

Table 3. Kinetic Constants of the Hydrolyses of UpA, UpApA and UpApG at pH 5.0 and 25°C

Substrate	K_m (μM)	V_{max} (min^{-1})
UpA	61	45300
UpApA	29	112000
UpApG	40	234000

Table 4. Kinetic Parameters of Various RNase S'-Derivatives at pH 5.5 and 25°C

Substrate	UpU		UpU>p		UpUpU>p	
	K_m ($M \times 10^4$)	V_{max} (min^{-1})	K_m ($M \times 10^4$)	V_{max} (min^{-1})	K_m ($M \times 10^4$)	V_{max} (min^{-1})
RNase S'	1.73	231	0.159	272	0.057	326
NL RNase S'	1.73	144	0.214	164	0.129	210
LN-RNase S'	2.00	231	0.542	186	0.197	200
NN-RNase S'	1.73	154	0.580	134	0.344	139
Ac-RNase S'	1.81	124	0.832	104	0.573	134

NL-RNase S', 1-norleucine-S-peptide and S-protein; LN-RNase S', 7-norleucine-S-peptide and S-protein; NN-RNase S', 1,7-dinorleucine-S-peptide and S-protein; Ac-RNase S', Tri-N-acetyl RNase-S-peptide and S-protein.

Fig. 5. Dependence of the Kinetic Parameters of the Transesterification of Oligouridylic Acids (Up) n U>p by RNase A at pH 7.0 on the Degree of Polymerization of the Substrate (n)

●, (Up) n U>p; ○, UpU; □, U>p.

Fig. 6. Schematic Representation of the Interaction of Polynucleotide and RNase A

○, nucleoside; B⁺, non-specific binding site, with positive charge.

ゴウリジル酸に対する活性を測定した (Table

4). この結果, U>p, (2',3'-cyclicUMP), UpU

ではあまり活性に影響がなかったが, UpU>p,

UpUpU>p になると Lys7 ついで Lys1 の置換の影響が現れることから Lys7 は P2 site, Lys1 は P3 又は B3 site であることを考えた.¹³⁾ Cuchillo らの結果と考えあわせると P2, B3 site が解明されたことになる. これらの実験によって RNase A の P0, P1, P2 subsite の実体を明確に出来 B2, B3 site の存在が示されたことになる. これらの結合部位は 1993 年になりフランス, スペインのグループによりオリゴヌクレオチドと RNase A の複合体の X-線結晶解析で確認され,¹⁴⁾ B3 site に His119 が関与していることも明らかとなった. 我々のポリウリジル酸を基質とした反応速度論的研究はポリマーの分解速度は UpUpU>p の分解速度の 10 倍近く速いことが示されており, また速度の基質濃度依存性はシグモイド状であることを示しており, RNase A の反応がアロステリックであることが明らかである.¹¹⁾ この現象の理論的説明はなされていないが Fig. 6 に示すようにポリマー基質の結合が活性中心の構造をより有利にしているものと考えられる.

Fig. 7. Primary Structures of RNase A Family RNases

RNase UL, RNase A, and porcine pancreas are secretory RNase from human urine, bovine and porcine pancreas, respectively; Rb, RNase from bovine brain; BL4 and PL3 are the most alkaline RNase from bovine and porcine liver, respectively; Us, K2 and PK3 are non-secretory RNases from human urine, bovine and porcine kidney, respectively; turtle, turtle pancreatic RNase; CL2, chicken liver RNase; bullfrog liver and egg, RNases from bullfrog liver and egg, respectively; *Rana japonica*, *R. japonica* egg RNase; onconase, RNase from Leopard frog (*R. pipiens*).

ウシ膵臓の RNase A 以外のピリミチン塩基特異的 RNase

ウシ膵臓の RNase A の化学の進歩に伴って種々の動物の膵臓の RNase の構造研究が分子進化のよき材料として取り上げられ現在までに 40 種類を越える構造が明らかにされている。この

の大半はオランダの Beintema のグループの研究であった。¹⁵⁾ 一方種々の動物組織の中に明らかに RNase A と異なり至適 pH が 6.5 付近にある RNase の存在が知られてきた。Shugar と Sierakovska はこれらの酵素を整理し分泌型と非分泌型に分類した。分泌型は膵臓、乳腺などの分泌組織に主として存在し至適 pH 7—8 の酵素であり、非分泌型は肝臓、腎臓のような非分泌組織に存在しおそらく細胞内で作用するものであり至適 pH 6.5 付近とやや酸性にあるものとした。¹⁶⁾ しかしながら非分泌型の実体は明らかでなかった。我々はヒト尿の中に 2 種の RNase が存在していること、その 1 つが非分泌型酵素であることを見出した。¹⁷⁾ この酵素の構造を明らかにしたところウシ膵臓の RNase A の活性に必要なアミノ酸残基は保存されているが、かなり大きな欠失部位と挿入部位を持っていることが分かった。これらの構造は他の主として本稿に関わるピリミジン塩基特異的酵素とともに Fig. 7 に示した。¹⁸⁾ その後明らかにされたウシ腎臓、ブタ腎臓の非分泌型酵素の構造上の特徴もヒトの場合とよく一致していた。^{19,20)} 非分泌型の RNase は糖タンパク質であり N-グリコシド型糖鎖を持っているが分泌型酵素の場合と異なり糖鎖が大変に短く生合成後に特徴あるプロセッシングをうけていることを示している (Fig. 8).²¹⁾ この特徴は非分泌型の酵素の細胞中での局在性を示唆しているように見える。この

Fig. 8. Structure of Carbohydrate Moiety of Non-secretory RNase

酵素がリンパ系の細胞に多いこと、至適 pH が弱酸性であることなどからリソソーム酵素である可能性もあると考えている。我々がウシの臓器、体液での RNase の種類、分布をカラムクロマトグラフィー、酵素化学的方法、酵素免疫法などを利用して検討した結果ウシ組織中には少なくとも 7 種の RNase が存在することが分かった。^{22, 23)} それらは RNase A, 既にイタリアのグループによって研究されている、精嚢にあるダイマー酵素 RNase BS, 非分泌型酵素 RNase K2, ウシ脳にのみある RNase BR,²⁴⁾ ウシ肝、腎などにあり最も塩基性の高い RNase BL,²⁵⁾ ウシ血清にみられる未知の酵素,²²⁾ 酸性で脾、肝臓などにある RNase Bsp1 である。²⁶⁾ このうち RNase A, RNase BS 及び未知の血清の酵素以外は我々のグループで構造が決められたが、後に述べる RNase Bsp1 以外はピリミジン塩基特異的酵素であった。これらの酵素の構造は Fig. 7 に示した。RNase BR は C-末端が他の酵素より長くこの中にはプロリンや疎水性アミノ酸が多く、かつ糖が O-glycoside 型で結合しているものがあつた。RNase の中で O-glycoside が見つけられたことはこれが初めてである。おそらく脳での局在性に関係ある C-末端構造であろう。

ピリミジン塩基特異的酵素は現時点では動物、それも脊椎動物にのみ見出しされている。このうちでニワトリの RNase CL2,²⁷⁾ カメ脾臓の RNase など¹⁸⁾ は RNase A とはかなり構造が変わっており、RNase A の 4 個の S-S 結合の 1 つが欠失している。最も特徴的な構造を与えたものはウシガエル肝の RNase RC1 であつた。²⁸⁾ この酵素の構造は我々と前後して千谷らによって構造を決められていたウシガエルなどの卵の RNase の構造^{29, 30)} と共に Fig. 7 に示した。これらの酵素は他のピリミジン塩基特異的酵素の 4 個の S-S 結合中 1 つを欠き、別に 1 個を新設している。この新しい S-S 結合は C-末端近くにあり活性に関与する His 残基の近傍にあるためか温度に対する抵抗性が強く 75°C までは高次構造を維持しており酵素活性も全く減少をみない最も熱に強い RNase であつた。³¹⁾ なおカエル卵からの酵素はシアル酸に対するレクチン作用、抗腫瘍性を持っていることは興味ぶかい。またヒト、ウシなどには極めて弱い RNase 活性を持ち構造的にはピリミジン塩基特異的な RNase A によく似た angiogenine と呼ばれるタンパ

Fig. 9. Phylogenetic Tree of RNase A Family RNases

The tree was constructed according to the most likelihood inference method developed by Adachi and Hasegawa [Adachi J., Hasegawa M., *Comput. Sci. Monogr.*, 27, 1 (1992)].

ク質が見つかっている。このタンパク質は血管伸長作用を持つ生理活性物質である。³²⁾

これらの RNase A family の酵素の系統樹を最ゆう法を用い作成してみると、このような多くの種類が出現したのはウシ、ブタ、及びヒトのようなほ乳類の分化より早いことが分かる (Fig. 9)。

真菌の RNase (RNase T1 Family)

真菌の一種麹カビ (*Aspergillus oryzae*) に 2 種の RNase が存在していること、その 1 つがグアニル酸特異的であり他の 1 つはアデニル酸特異的であることは Sato と Egami により 1956 年に報告されている。³³⁾ グアニル酸に特異的な酵素 RNase T1 はその塩基特異性が核酸の構造決定に有用であること、分子量が 10 kDa 前後で小さいことからその研究は大いに進歩した。この初期の構造決定、触媒基についての同定などの事情は既に Takahashi と Moore によってまとめられている。³⁴⁾ その後日本を含めて数多くのグループにより三次元構造も検討がなされている。³⁵⁾ 一方アデニル酸特異的とされていた RNase T2 はその後塩基非特異的でアデニル酸優先的酵素とされた。この酵素は分子量が 30 kDa を越えていること、核酸の構造決定に対する寄与も少ないことから研究が遅れていた。

我々は真菌 *Aspergillus saitoi* の中に 2 種の RNase, RNase M と RNase Ms が存在することを知り、^{36, 37)} この酵素化学的研究を行った。この結果 RNase Ms は塩基非特異的酵素であったが基本的にはグアニル酸優先的酵素であり、一次構造からも RNase T1 の同族であることが分かった (Fig. 10)。³⁸⁾ RNase Ms, RNase Ms-dinucleosidephosphate analog 複合体の X-線結晶解析の結果もおおむね RNase T1 と類似しており、^{39, 40)} なぜこの酵素が塩基非特異的であるかについての決定的な結論は得ることが出来なかった。⁴⁰⁾ この酵素は RNase T1 と類似の構造を持ちながら塩基特異性が厳密でないことからタンパク質工学的にこの原因を追及する研究のよい対象とされた。しかしこの試みはあまり成功しなかった。この当時池原らのグループは RNase T1 の組換え体酵素を用いて反応機構を検討していたが従来この酵素は His92 と Glu58 との間の酸塩基触媒作用によって反応が進行し His40 は Glu58 の近傍にあり Glu58 に影響を与えているとされていたが、この考えに疑問を提出した。すなわち、His40, His92 をそれぞれ Ala に置換した改変体はほとんど活性を失うが Glu58 を Ala に置換した改変体では 15% 程度の残存活性を示すことを見出し、Glu58 は活性発現に対して本質的なものでなく His 残基 2 個による触媒説を提唱した。⁴¹⁾

この説は大きな波紋を投げかけた。我々はこの説に対し次の 2 点から疑問を感じた。細菌に見い出され一次構造のホモロジーはあまり高くないがやはりグアニル酸特異的であるいくつかの酵素で His40 に相当するものが欠損しているものがあること、RNase Ms の活性中心を構成していると考えられる His40, Glu58, His92 (RNase T1 の番号) の RNase Ms-GfpC (GpC の同族体) 複合体での三次元的な位置を RNase A-UpcA (UpC の同族体) の活性中心を構成する His12 と His19 の配置と比較すると RNase A の His12 と His19 に最もよく対応するのは RNase Ms の Glu58 と His92 である。したがって RNase Ms, また RNase T1 の触媒作用は Glu-His の間の一般酸塩基触媒作用によるものであると考えた。⁴⁰⁾ 一方 Steyart らは RNase T1 の改変体の反応速度論的研究から RNase T1 の本体は Glu58-His92 の間の一般酸塩基触媒であり RNase T1 の Glu58 が Ala になった場合に His40 が塩基触媒として代行する可能性を示している。^{42, 43)} RNase T1 の一次構造の決定以来各国の研究者によって同族の酵素が分離され構造が決められている。この中には Fig. 10 に示すように活性中心を構成するアミノ酸残基の相同性は保っているが、S-S の位置などの相違の見られるいくつかのグループが存在することが明らかとなっ

Fig. 10. Amino Acid Sequences of RNase T1 Family RNases

Half-cystine residues are expressed by shaded letters. Amino acid residues of the active site are boxed. The box from the 42nd to 46th residue indicate the base recognition site amino acids. The numbers at the top of the matrix are those of the RNase T1 numbering. Po, RNase from *Pleurotus ostreatus* (hiratake); U1 RNase from *Ustilago sphaerogena*; U2, RNase from *U. sphaerogena*; F1, RNase from *Fusarium moniliform*; F11, RNase from *Fusarium lateritium*; Th1, RNase from *Trichoderma harizianum*; Ms, RNase from *Aspergillus saitoi*; T1, RNase from *A. oryzae*; C2, RNase from *A. clavatus*; Ap1, RNase from *A. pallidus*; N1, RNase from *Neurospora crassa*; Pch1, RNase from *Penicillium chrysogenum*; Pb1, RNase from *P. brevi-compactum*; Sa, RNase from *Streptomyces aureofaciens*; St, RNase from *S. erythreus*; Bi, RNase from *Bacillus intermedius*; Ba, Barnase from *B. amyloliquefaciens*.³⁵⁾

てきている。³⁵⁾ 我々の見出したヒラタケの RNase もこの 1 つであった。⁴⁴⁾

真菌の塩基非特異的 RNase (RNase T2 Family RNase)

真菌の塩基非特異的 RNase の構造研究は 1989 年代まで成功しなかった。この年に Kawata らは RNase T2⁴⁵⁾ Horiuchi らは *Rhizopus niveus* の RNase Rh の構造を⁴⁶⁾ 明らかにした。前者はタンパク質化学的に後者はタンパク質化学的手法と genomic DNA の解析の両面から行われた。我々はその後も、*Aspergillus saitoi* の RNase M,⁴⁷⁾ *Trichoderma viride* の RNase Trv⁴⁸⁾ *Lentinus edodes* (シイタケ) の RNase Le2⁴⁹⁾ 及びウスバタケ RNase Irp⁵⁰⁾ などの真菌由来の酵素、*Physarum polycephalum* の RNase Phy (粘菌) の RNase⁵¹⁾ の構造を明らかにした (Fig. 11)。この結果この種の酵素には少なくとも 2 カ所の相同性の高い 7—8 個のアミノ酸残基からなるフラグメントが共通にあることが明らかとなった (カセット構造)。この 2 つのカセットを持つ RNase を RNase T2 family RNase と定義することが出来る。この構造中には後に述べるように酵素活性の発現に必要なアミノ酸残基がほとんど含まれている。一方 Glarke らはこの共通構造の検索から *Nicotiana glauca* の不和合性因子が RNase であること⁵²⁾ を見い出して以来多くの植物の不和合性因子が RNase T2 様酵素であることが分かった。⁵¹⁾ 植物由来の不和合性因子でない RNase の構造がトマト培養細胞,^{53, 54)} ニガウリの種子から⁵⁵⁾ 精製されこの構造も RNase T2 family に属することが示された。我々は動物にも酸性に至適 pH を持つ RNase が存在していることからカキ,⁵⁶⁾ ウシガエル,⁵⁷⁾ ニワトリ肝,⁵⁸⁾ ウシ脾⁵⁹⁾ などにある RNase T2 family 酵素の存在と、その構造を明らかにした (Fig. 11)。このように RNase T2 酵素は真菌から動物にまたがる大 family となったが、さらに大腸菌,⁶⁰⁾ *Aeromonas*⁶¹⁾ などの細菌、ある種の動物ウイルス

Fig. 11. Amino Acid Sequences of RNase T2 Family RNases

Rh, RNase from *Rhizopus niveus*; RNase T2, RNase from *Aspergillus oryzae*; M, RNase from *A. saitoi*; Trv, RNase from *Trichoderma viride*; Irp, RNase from *Irpex lacteus*; Le2, RNase from *Lentinus edodes*; Phyb, RNase from *Physarum polycephalum*; S2, S-gene product from *Nicotiana glauca*; P1, S-gene product from *Petunia inflata*; Le, RNase from tomato (*Lycopersicon esculentum*); MC, RNase from *Momordica charantia*; Dm, RNase from *Drosophila melanogaster*; Oy, RNase from Oyster; Bsp1, RNase from bovine spleen; CL1, RNase from chicken liver; RCL2, RNase from bullfrog.⁵⁸⁾

の表面タンパク質の中にも⁶²⁾ 同じカセットを持つ RNase が見い出され現時点では生物界のユニバーサル酵素となっている。しかしながらこれらの構造 (Fig. 11) を比較すると細菌の酵素、ウイルスの酵素はカセット部分のみが共通であり同じ系統樹の中に含める処理が出来ないほどの相違がある。また真菌、植物、動物の酵素の N-末端部分の構造及び S-S 結合の位置などから見ると真菌と動植物の間の差異は大きく動物、植物の間の類似性が高いことが明らかである。

現時点では動物細胞でのこれらの酵素の役割りは不明であるが RNase A family が消化酵素である以外に血管伸長因子などの生理活性物質を含むのと同様に、RNase T2 family の RNase には不和合性因子、植物の種子中の RNase のように種子の感染防御に働くと考えられるもの、トマトの RNase のように磷酸の欠乏時に誘導されるものもあり、動植物でも細胞内外で作用する何らかの生理作用を持つ酵素である可能性が高い。

RNase T2 Family RNase, 特に RNase Rh の作用機構

RNase T2 family の酵素の反応機構の研究は他の RNase に比べて遅れていた。この研究は主に RNase M, RNase T2 及び RNase Rh について行われている。RNase M を ¹⁴C-標識ヨード酢酸と処理すると 1 分子のヨード酢酸が反応し失活する。この標識は His 残基の上であり、この一次構造上の位置を同定しようと試みたところ Fig. 12 に示すように A と B の 2 つのペプチド上に分かれていた。⁶³⁾ A と B の標識の比率は 43 : 57 程度であった。RNase T2 についてもほぼ同様な結果が見られた。⁶⁴⁾ このことは酵素活性の発現には少なくとも 2 個の His 残基が必要でありこのいずれかの修飾により失活が起こることを意味している。一方 RNase M⁶⁵⁾ と RNase

- A Thr-Ile-His*-Gly-Leu-Trp-Pro-Asp-Asn-Cys-Asp-Gly-Ser-Tyr
 B His*-Gly-Thr-Cys-Ile-Asn-Thr-Ile-Asp-Pro-Ser-Cys-Tyr-Pro-Asp-Asp-Tyr-Ala-Pro.....

Fig. 12. Amino Acid Sequences of Two Histidine-continuing Peptides of RNase M

* The site where ^{14}C labeled PTH-amino acid was released.

Rh⁶⁶⁾ の反応動力学定数の pH-profile はいずれも pK_a 5.7—6.7 程度の His 残基と pK_a 4.5 前後のカルボキシル基が反応に関与していることを示していた (Fig. 13). RNase Rh を拮抗阻害剤シチジンの存在下水溶性カルボジイミドで修飾すると最初 1 分子の標識の取り込みで 80% 程度の酵素活性となるが、シチジンを除去した後再修飾すると約 1 分子の標識の取り込みと同時に失活する。この実験はカルボキシル基が活性中心にあることを示していた。⁶⁷⁾ RNase M は分子内に 5 個の Trp 残基を持っているがいずれも中性付近では NBS による酸化に抵抗する。しかし pH 2.0 などの酸性になると酵素の部分変性のため一部が酸化され易くなり、1 分子の Trp 残基の酸化で失活する。⁶⁸⁾

RNase M を 6-thioguanosinediphosphate と結合させ RNase M の Trp を 295 nm の光で励起させると 6-thioguanosine が蛍光を発することが見い出されている。これは Trp 残基が活性中心に結合した 6-thioguanosine の近傍にあることを示していた。⁶⁹⁾ 化学修飾の実験は RNase T2 酵素の活性中心の概要を示していたがこれに関与するアミノ酸残基の位置についてはわずかに RNase M の酵素活性に His46 と His109 (いずれも RNase Rh での番号にしてある) が関与していることしか分からなかった。我々は 1989 年に RNase Rh genomic DNA を取得していたのでこの酵素の cDNA を取りこれを酵母で発現することを試みた。堀内らが、*R. niveus* 由来の aspartic protease の酵母からの分泌に成功したシャトルベクター pYE 2211 を用いた。この glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase のプロモーターの下流に RNase Rh の cDNA でシグナルペプチドの代わりに *R. niveus* の aspartic protease のプレプロ配列を挿入したものを組み込みプラスミド pYE RNAP Rh (Fig. 14) を作成し酵母の形質転換を行った。⁷⁰⁾ この際発現した酵素は N-末端部分が複数箇所プロセッシングされていたので、さらに V8 プロテアーゼで限定分解し N-末端を揃えた。このようにして得られた酵素は RNase Rh の N-末端に Ala-Ser-Gly が付着した酵素であった。収量は 40 mg/l であった。この酵素の比活性は天然の RNase Rh と同一であり、CD スペクトルも全く同一であった。この発現の成功により以後の活性中心の研究は容易となった。⁷⁰⁾

先に述べた RNase Rh の酵母からの発現系を利用し RNase Rh に 3 個ある His 残基を Kunkel の方法⁷¹⁾ に従ってサイズと同じ Phe に変換した改変体、H46F、H104F 及び H109F を作成してその酵素化学的性質を調べた。⁷²⁾ RNA を基質として改変体の酵素活性を測定すると H104F は 2% 程度の残存活性を有していたが、H46F と H109F の活性は 0.1% 程度に低下した (Table 5)。低分子基質を用いた結果もほぼこれに一致していた。この 2 個の His 残基は先に述

Fig. 13. The pH-Profile of the Kinetic Parameters of RNase Rh toward UpU at 20°C

Fig. 14. Construction of Expression Vector for RNase Rh

The expression vector pYE Rh 2—8 is derived from the high expression vector in yeast. The pYE 2211⁷²⁾ was digested with *Eco*RI and *Sal*I, and the large fragment was purified. The pUC Rh 2—8 was digested partially with *Eco*RI and completely with *Sal*I and the 813 bp fragment containing RNase Rh gene was ligated into the *Eco*RI-*Sal*I site in the pYE 2211 plasmid to obtain pYE Rh2—8.

The cDNA for RNase Rh and intron less DNA of RNAP were subcloned into M13mp19, separately, then the *Bam*HI site was introduced by means of site directed mutagenesis to obtain plasmids M13mp19 Rh2—8*Bam* and M13mp19 RNAP*Bam*. M13mp19Rh2—8*Bam* was digested completely with *Sal*I and partially with *Bam*HI to obtain a 754 bp *Sal*I-*Bam*HI fragment containing gene for mature RNase Rh. M13mp19 RNAP-*Bam* was digested with *Eco*RI and *Bam*HI to obtain a ca. 200 bp *Eco*RI-*Bam*HI fragment containing the prepro-sequence of RNAP-I. The *Sal*I-*Bam*HI fragment of RNase Rh and the *Eco*RI-*Bam*HI fragment of RNAP-I were inserted into the *Eco*RI-*Bam*HI site of pYE 2211 to obtain pYE RNAP-Rh.

Table 5. Enzymatic Properties of the Mutant Enzymes of RNase RNAP Rh at pH 5.0

Enzyme	Relative activity		Kinetic constant	
	RNA	ApU	ApU	
			$V_{\max}$ (min^{-1})	K_m ($\text{M} \times 10^4$)
RNAP Rh	100	100	8130	1.10
RNAP Rh H46F	0.02 >	0.19	n.d.	n.d.
RNAP Rh H104F	0.30	0.88	56	2.53
RNAP Rh H109F	0.02 >	0.24	n.d.	n.d.

Enzymatic activity was measured with yeast RNA as the substrate.

ApU concentration was 0.025 mM.

n.d., Not determined.

Fig. 15. ^1H -NMR Spectra and ^1H -NMR Titration of Imidazole C2 Protons of Histidine Residues of RNase RNAP Rh and Its Phenylalanine Mutants

(A) 400 MHz ^1H -NMR spectra in the down field region of RNase RNAP Rh and its phenylalanine mutants at 37°C. (B) ^1H -NMR Titration of imidazole C2-proton of histidine residues of RNase RNAP Rh and its phenylalanine mutant as a function of pH. Titration experiments were performed in D_2O containing 50 mM NaCl at 37°C. ●, RNase RNAP Rh; ○, mutant enzymes.

べたカルボキシメチル化された RNase M の His 残基の位置と対応している。

H104F 改変体では拮抗阻害剤であるヌクレオチドに対する K_m 値が著しく増大することから、
 磷酸基に対する結合位置と考えられる。このような現象は H46F や H109F では見られない。

これらの実験結果は His46 と His109 が一般酸塩基触媒の中心であることを示唆していた。

RNase Rh 及び 3 個の改変体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルから各 His 残基のピークの帰属が明らかとなった (Fig. 15). さらにこれらのピークの pH-滴定曲線から各々の His の pK_a を求めることが出来た. His46, His104 及び His109 の pK_a はそれぞれ 6.7, 5.94 及び 6.3 であった.⁷²⁾ His109 の pK_a はこの酵素が最も酵素活性の高い酸性領域で His46 よりも脱プロトン化していると考えられるので His109 はこの反応において塩基触媒として, His46 は酸触媒として作用していると考えた. この関係は RNase M において His109 がよりカルボキシメチル化されやすい傾向とよく一致している.⁷²⁾

反応速度論的研究の結果は少なくとも 1 個のカルボキシル基が活性に関与していることを示

Table 6. Enzymatic Properties of Mutant Enzymes of RNase Rh as to Amino Acid Residues with Carboxylic Acid Side Chain at 5.0

Enzyme	Relative activity (%)			Kinetic constants for ApU	
	RNA	Substrate ApU	UpU	K_m ($\text{M} \times 10^4$)	$V_{\max}$ (min^{-1})
RNase					
RNAP Rh	100	100	100	1.33	12000
RNAP Rh D51N	66	0.19	31	n.d.	n.d.
RNAP Rh E105Q	0.96	1.84		1.60	344

Fig. 16. (a) Three Dimensional Structure of RNase Rh⁷⁴⁾ α -Carbon Chain of RNase Rh (b) Active Site of the RNase Rh-2'-AMP Complex⁷⁵⁾

していた。遺伝子工学的手法によりこのカルボキシル基の同定をすべく当時明らかであった RNase Rh, RNase M, RNase Trv, RNase Le, RNase T2, *Nicotiana alata* の不和合性因子などの RNase T2 family RNase の一次構造を比較してみたところ Asp51 と Glu105 が共通に保存されていることから、これらのアミノ酸残基を標的とし D51N と E105Q を作成しこの酵素化学的性質を調べた。⁷³⁾ D51N は RNA を基質とすると 66% の酵素活性を示し、低分子基質 ApU では 1% と活性が低下するが UpU に対しては 31% の活性を示すことからこの残基は活性中心で触媒作用に関係する候補から除いた。E105Q はすべての基質に対して活性が 1% 程度となることからこの残基が活性に必要なものと考えた。Glu105 はおそらく P=O 結合の分極などに関係して一般酸塩基触媒を助けているものと考えられる (Table 6)。

1992 年になり Kurihara らは RNase Rh の X-線結晶解析に成功した。^{74, 75)} RNase Rh は RNase T2 family 酵素のうちで糖鎖を持たないいくつかの酵素の 1 つであった。現在までにニガウリ、大腸菌、トマトなどの酵素の結晶化が報告されているが、RNase Rh は現時点では唯一の三次元構造の解明された RNase T2 family の RNase である。この構造は Fig. 16 に示した。RNase Rh のポリペプチド鎖は 7 本の β -シートと 6 本の α -ヘリックスからなり、分子中央に 4 本の逆平行 β 鎖と α -ヘリックスが並び、その背後に長い α -ヘリックスが斜めに位置している。活性中心を構成している His46 は β -シート上に His1104, His109, 及び Glu105 は α -ヘリックス上に存在している (Fig. 16)。浜島らによる RNase Rh-2'-AMP 複合体の X-線結晶解析の結果は先に推定した活性中心の構造と矛盾のないものであった。⁷⁶⁾ また先に述べた Asp51 は基質の塩基アデニンと水素結合しており、Tyr57 はアデニン塩基とスタッキングしていた。さらに Trp 49 もほぼアデニンとスタッキングする状態にあった。この解析の決定で後に述べるタンパク質工学的研究、反応機構の研究は大いに進歩することとなった。

Lys108 は Fig. 11 に見られるように多くの酵素で保存されている。例外はペチュニアの不和合性因子で Arg に⁷⁷⁾ シイタケの RNase Le2 で Thr に⁴⁹⁾ 置換されているのみであった。Lys 108 は Kurihara らの解析では活性中心近傍にありながらその側鎖は活性中心の外側に向いているが、浜島らの結果ではその側鎖が活性中心の方に向いている。この Lys108 の改変体 6 種、K108R, K108T, K106S, K108A, K108M 及び K108L を作成し RNA を基質として活性を測定したところ活性はそれぞれ 16.3, 4.8, 3.5, 3.9, 1.3, 2.1% であった。低分子基質での結果もほぼ同様であった。Lys108 は Arg に変えてもよく Thr でもやや活性があることは、塩基性を持つ側鎖、あるいは水酸基を持つ側鎖が利用可であることを示している。おそらく Lys108 は必ずしも必須とは思えないがこの塩基性によりペンタコバレント中間体の安定化に役立っているであろう。^{78, 79)}

このようにして RNase Rh の、そしておそらく RNase T2 family RNase の触媒に関与する官能基が明らかとなり、その transfer reaction (first step reaction) の最も可能な反応機構は次のようであると考えられる (Fig. 17)。

一般に RNase は transfer reaction について加水分解反応が進行し中間体の 2',3'-環状ヌクレオチドは第二段の加水分解反応により 3'-ヌクレオチドとなる。また 2',3'-環状ヌクレオチドは過剰のヌクレオシドの存在下に第一段反応の逆反応が進行し 3'-5'ヌクレオチド結合を生成する (Fig. 18)。通常この第二段反応は第一段反応と酸塩基触媒が逆転しているようなメカニズムが RNase A などでは唱えられているがこの証拠はほとんどない。RNase Rh の場合は環状ヌクレオチドの加水分解反応は容易に観察されるが、環状ヌクレオチドからのヌクレオチド結合の生成は観察できなかった。第二段反応と第一段の逆反応は水分子あるいはヌクレオシドの水酸基を活

Fig. 17. Possible Mechanism of the First Step (Transphosphorylation) Reaction of RNase Rh

In the figure, Glu105 and Lys108 may act to polarize P=O bond or stabilize the pentacoordinate intermediate. R1, R2 and R3 are one of His46, Glu105, and Lys108.

性化し P=O 結合を攻撃する点で本質的に同一の反応と考えられる。我々は H109F と H46F について第二段の環状ヌクレオチド分解速度を調べたところ H46F 改変体は全く加水分解反応を触媒出来なかったが、H109F は基質により異なるが、RNase Rh の 1—10% の分解能を保持していた。この現象は水酸基あるいは水分子の活性化は His46 によるものと考えられる。この 2 つの改変変体を使用して第一段の逆反応が進行するかを見たが、H46F では反応生成物は観察できなかったが、H109F を用いた場合は 0.1% という低い収率であったが dinucleosidephosphate を観察できた。この実験も水酸基活性化反応での His46 の役割の重要性を示している。2',3'-cyclicnucleotide が dinucleosidephosphate の分解速度より遙かに遅いことは水酸基を活性化する His46 の脱プロトン化した分子種の割合が少ないからであると考えられる。したがって第二段反応は His46 が塩基触媒 His109 が酸触媒となり第一段反応の逆になる証拠の 1 つであろう。⁸⁰⁾

RNase Rh の主たる塩基認識部位は Asp51, Tyr57, 及び Trp49 から構成されていることは先に示した。Trp49 を Phe に変えると活性は 16% に減少しその他の置換では活性がほとんどなくなる。

この現象は Trp49 の重要性を示している。W49F 置換体は RNase Rh よりピリミジン塩基に

Fig. 18. The Scheme of the Two-step Reaction of Ribonuclease

対する特異性が増加する傾向にあった (Table 7).⁸¹⁾ Tyr57 は必ずしも芳香環である必要はないが、芳香環特に Trp の場合にはプリン塩基特異性が増大する傾向にあった (Table 7).

RNase T2 family RNase では RNase Rh の Asp51 の位置は必ずしも保存されてはおらず粘菌、ペチュニアでは Glu に、トマト、ニガウリ、イカではそれぞれ Asn, Gln 及び Ser に置換されている。しかもこれらの RNase は種々の検討の結果グアニル酸に対する特異性が極めて増加していることが分かった。RNase Rh の Asp

51 を Asn, Glu, Gln, Thr, 及び Ser に置換した改変体はいずれもグアニル酸特異的になっていた。この現象は Asp51 がアデニル酸特異性に重要な役割を持つことを示していると同時に RNase の改変によって塩基特異性を大幅に変えた最初の例である。⁸²⁾ 先に述べた主要な塩基認識部位 (B1 site) 以外に dinucleosidephosphate (XpY) の Y を認識する部位 B2 site についての情報は RNase Rh-d(ApC) 複合体の X-線結晶解析から得られている。⁷⁶⁾

RNase Rh-2'-AMP 複合体の X-線結晶解析はこの酵素の触媒中心及び B1 site について多くの情報を与えた。2'-AMP よりさらに基質類似性の高いと考えられる d(ApC) と RNase Rh の複合体の X-線結晶解析の結果はさらに B2 site に関与するアミノ酸残基を明らかにすることが出来た (Fig. 19)。B2 site に結合した塩基、シトシンは Phe101 とスタッキングし Asn94, Gln95 の形成する空間に位置し、さらに Ser93 Pro92 及び Asn94 と水素結合を形成していた。この複合体においてはデオキシリボースが RNase-2'-AMP の場合と異なり裏返しになっている。これは 2'-OH の欠如によるものと考えられる。これらの B2 site に関与するアミノ酸残基の中で多くの RNase T2 family RNase に保存されているのは Phe101 と Pro92 のみであり他の残基は Asn や Gln などから構成されており、この点では RNase A などに類似している。¹⁴⁾ また B2 site を構成するアミノ酸残基には 92—95 番のアミノ酸が関与し一種のカセット状になっている。これは RNase T1 の B1 site に見られるものと似ている。現在これらのアミノ酸残基の改変体を

Table 7. Kinetic Constants of Mutant Enzymes at Trp49 and Tyr57 Derived from RNase Rh

Substrate	ApG	GpG	CpG	UpG
	$V_{\max}/K_m$ (min^{-1} , $\text{M} \times 10^4$)			
Rh	25700	90900	51300	65300
W49F	16500	6900	58100	36700
W49I	1010	725	418	449
Y57F	59800	31400	26800	12000
Y57W	95300	130000	44000	57000
Y57I	10100	11000	5350	7700

Fig. 19. Hydrogen Bond Network around d(ApC) Bound with RNase RNAP Rh(Y57W)⁷⁶⁾

作成し塩基特異性への影響を検討中であるが、F101W、及び F101L では XpY の Y が G である場合に活性が増加し、Q32E など Gln32 の改変体は Y が C である場合に活性が増大することを見い出している。⁸³⁾

ニガウリなど植物の種子の RNase では B1 site より B2 site の影響の方が大きい場合も観察されており、⁸⁴⁾ 今後の B2 site 改変の研究はさらに RNase T2 family RNase の塩基特異性研究に役立つ情報を与えるものと考えられる。RNase Rh のタンパク質工学的研究は従来あまり成功を見なかった塩基特異性の大幅な改変についてもある程度の成果を与えてきているので、今後はさらに塩基特異性の改変のための経験則を明らかにし、より特異的な酵素の開発を目指したい。

謝辞 本稿において述べた研究は東京大学薬学部浮田研究室に始まり、京都大学薬学部富田研究室、星薬科大学微生物学教室において行ったものである。研究の初歩からご指導頂いた浮田忠之進先生、研究の場を与えて頂いた富田謙吉先生並びに共同研究者の皆様に感謝する。特に長年にわたって研究活動を支えて下さった星薬科大学扇 和子、岩間正典、渡辺英昭の諸氏をはじめとする研究室の皆様に深い感謝の意を表したい。また X-線結晶解析を行って頂いた長岡技術科学大学三井幸雄教授、栗原宏之、野中孝昌博士をはじめとする三井研究室の方々、昭和大学中村和郎教授に長い間の御協力を心から感謝する次第である。また遺伝子工学について御指導を頂いた東京大学農学部高木正道教授、堀内裕之博士に感謝します。放射線総合医学研究所沢田文夫博士、神戸学院大学薬学部岡田芳男教授、東京都老人研所長木幡 陽博士に長年にわたる御厚誼を感謝する次第です。

引用文献

- 1) Smyth D. G., Stein W. H., Moore S., *J. Biol. Chem.*, **238**, 227 (1963).
- 2) Richard F. M., Wychoff H. W., "The Enzymes," ed. by Boyer P. D., Vol. IV, Academic Press, N.Y., 1971, p. 647.
- 3) Irie M., *J. Biochem.*, **57**, 355 (1965).
- 4) Witzel H., Barnard E. A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **7**, 289 (1962).
- 5) Gamble W., Wright L. D., *Biochem. J.*, **97**, 340 (1965).
- 6) Sawada F., Irie M., *J. Biochem.*, **66**, 415 (1969).
- 7) Iwahashi K., Nakamura K., Mitsui Y., Ohgi K., Irie M., *J. Biochem.*, **90**, 1685 (1981).
- 8) Mitsui Y., Urata Y., Torii K., Irie M., *Biochim. Biophys. Acta*, **535**, 299 (1978).
- 9) White M. D., Keren-Zur M., Lapidot Y., *Nucleic Acid Res.*, **4**, 843 (1977).
- 10) Irie M., Watanabe H., Ohgi K., Tobe M., Matsumura G., Arata Y., Hirose T., Inayama S., *J. Biochem.*, **95**, 751 (1984).
- 11) Irie M., Mikami F., Monnma K., Ohgi K., Watanabe H., Yamaguchi R., Nagase H., *J. Biochem.*, **96**, 89 (1984).
- 12) Pares X., Llorens R., Arus C., Cuchillo C. M., *Eur. J. Biochem.*, **105**, 571 (1980).
- 13) Irie M., Ohgi K., Yoshinaga M., Yanagita T., Okada Y., Teno N., *J. Biochem.*, **100**, 1057 (1986).
- 14) Fontecilla-Camps J. C., de Llorens R., le Du M. H., Cuchillo C. M., *J. Biol. Chem.*, **269**, 21526 (1994).

- 15) Beintema J. J., Schuller C., Irie M., Carsana A., *Prog. Biophys. Molec. Biology*, **51**, 165 (1988).
- 16) Sierakowska H., Shugar D., "Progress in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol.," ed. by Cohn W. E., Vol. 20, Academic Press, N.Y., 1977, p. 59.
- 17) Iwama M., Kunihiro M., Ohgi K., Irie M., *J. Biochem.*, **89**, 1331 (1981).
- 18) Beintema J. J., Hofsteenge J., Iwama M., Morita T., Ohgi K., Irie M., Sugiyama R. H., Schiven G. L., Dekker C. A., Glitz D. G., *Biochemistry*, **27**, 4530 (1988).
- 19) Irie M., Ohgi K., Niwata Y., Watanabe H., Iwama M., Beintema J. J., Sanda A., Takizawa Y., *J. Biochem.*, **104**, 289 (1988).
- 20) Iwama M., Sanda A., Ohgi K., Hofsteenge J., Irie M., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 2153 (1993).
- 21) Toya K., Yamashita K., Wakai S., Irie M., Morita T., Ohgi K., *Seikagaku*, **88**, 875 (1986).
- 22) Morita T., Niwata Y., Ohgi K., Ogawa M., Irie M., *J. Biochem.*, **99**, 17 (1986).
- 23) Morita T., Sanda A., Takizawa Y., Ohgi K., Irie M., *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2751 (1987).
- 24) Watanabe H., Katoh K., Ishii Y., Komoda Y., Sanda A., Takizawa Y., Ohgi K., Irie M., *J. Biochem.*, **104**, 939 (1988).
- 25) Hosoya K., Nagareda Y., Hasemi S., Sanda A., Takizawa Y., Watanabe H., Ohgi K., Irie M., *J. Biochem.*, **107**, 613 (1990).
- 26) Ohgi K., Sanda A., Takizawa Y., Irie M., *J. Biochem.*, **103**, 267 (1988).
- 27) Hayano K., Iwama M., Sakamoto H., Watanabe H., Sanda A., Ohgi K., Irie M., *J. Biochem.*, **114**, 156 (1993).
- 28) Nitta R., Katayama N., Okabe Y., Iwama M., Watanabe H., Abe Y., Okazaki T., Ohgi K., Irie M., *J. Biochem.*, **106**, 729 (1989).
- 29) Titani K., Takio K., Kuwada M., Nitta K., Sakakibara F., Kawauchi H., Takayanagi G., Hakomori S., *Biochemistry*, **26**, 2189 (1987).
- 30) Kamiya Y., Oyama F., Oyama R., Sakakibara F., Nitta K., Kawauchi H., Takayanagi Y., Titani K., *J. Biochem.*, **108**, 139 (1990).
- 31) Okabe Y., Katayama N., Iwama M., Watanabe H., Ohgi K., Irie M., Nitta K., Takayanagi Y., Oyama F., Titani K., Abe Y., Okazaki T., Inokuchi N., Koyama T., *J. Biochem.*, **109**, 786 (1991).
- 32) Riordan J. F., "Ribonucleases, Structures and Functions," ed. by D'Alessio G. D., Riordan J. F., Academic Press, N.Y., 1997, p. 446.
- 33) Sato K., Egami F., *J. Biochem.*, **44**, 753 (1957).
- 34) Takahashi K., Moore S., "The Enzymes," ed. by Boyer P. D., Vol. 15, Academic Press, N. Y., 1982, p. 435.
- 35) Irie M., "Ribonucleases, Structures and Functions," ed. by D'Alessio G., Riordan J. F., Academic Press, N.Y., 1997, p. 101.
- 36) Irie M., *J. Biochem.*, **62**, 509 (1967).
- 37) Ohgi K., Irie M., *J. Biochem.*, **77**, 1085 (1975).
- 38) Watanabe H., Ohgi K., Irie M., *J. Biochem.*, **91**, 1495 (1982).
- 39) Nonaka T., Mitsui Y., Nakamura K. T., Watanabe H., Ohgi K., Irie M., *J. Mol. Biol.*, **207**,

- 853 (1989).
- 40) Nonaka T., Nakamura K. T., Uesugi S., Ikehara M., Irie M., Mitsui Y., *Biochemistry*, **32**, 11835, (1993).
 - 41) Nishikawa S., Morioka H., Kim H. J., Fuchimura K., Tanaka T., Uesugi S., Hakoshima T., Tomita K.-I., Ohtsuka E., Ikehara M., *Biochemistry*, **26**, 8620 (1987).
 - 42) Steyeart J., Hallenga K., Wyns I., Stanssen P., *Biochemistry*, **29**, 9064 (1990).
 - 43) Steyeart J., Wyns I., *J. Mol. Biol.*, **229**, 770 (1993).
 - 44) Nomura H., Inokuchi N., Kobayashi H., Koyama T., Iwama M., Ohgi K., Irie M., *J. Biochem.*, **116**, 26 (1994).
 - 45) Kawata Y., Sakiyama F., Tamaoki T., *Eur. J. Biochem.*, **176**, 683 (1989).
 - 46) Horiuchi H., Yanai K., Takagi M., Yano K., Wakabayashi E., Sanda A., Mine S., Ohgi K., Irie M., *J. Biochem.*, **103**, 408 (1988).
 - 47) Watanabe H., Naitoh A., Suyama Y., Inokuchi N., Shimada H., Koyama T., Ohgi K., Irie M., *J. Biochem.*, **108**, 303 (1990).
 - 48) Inada Y., Watanabe H., Ohgi K., Irie M., *J. Biochem.*, **110**, 896 (1991).
 - 49) Kobayashi H., Inokuchi N., Koyama T., Watanabe H., Iwama M., Ohgi K., Irie M., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 2003 (1992).
 - 50) Watanabe H., Hamid F., Iwama M., Onda T., Ohgi K., Irie M., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 2097 (1995).
 - 51) Inokuchi N., Koyama T., Sawada F., Irie M., *J. Biochem.*, **113**, 425 (1993).
 - 52) McClure B., Haring F., Ebert P. R., Anderson M. A., Simpson R. J., Sakiyama F., Clarke A. E., *Nature* (London), **342**, 955 (1989).
 - 53) Jost W., Bak H., Glund K., Terpstra P., Beintema J. J., *Eur. J. Biochem.*, **198**, 1 (1991).
 - 54) Loeffler A., Glund K., Irie M., *Eur. J. Biochem.*, **214**, 627 (1993).
 - 55) Ide H., Kimura M., Arai M., Funatsu G., *FEBS Lett.*, **284**, 161 (1991).
 - 56) Watanabe H., Narumi H., Inaba T., Ohgi K., Irie M., *J. Biochem.*, **115**, 800 (1993).
 - 57) Inokuchi N., Kobayashi H., Miyamoto M., Koyama T., Iwama M., Ohgi K., Irie M., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 471 (1997).
 - 58) Uchida T., Hayano K., Iwama M., Watanabe H., Sanda A., Ohgi K., Irie M., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1982 (1996).
 - 59) Narumi H., Ogawa Y., Iwama M., Kusano A., Sanda A., Ohgi K., Irie M., *J. Biochem. Mol. Biol. & Biophys.*, **1**, 1 (1997).
 - 60) Meador J., III, Kennel D., *Gene*, **95**, 1 (1990).
 - 61) Favre D., Ngai P. K., Timmis K. N., *J. Bacteriol.*, **175**, 3710 (1993).
 - 62) Schneider R., Umger G., Stark R., Schneider-Scerzer E., Tiele H. J., *Science*, **261**, 1169 (1993).
 - 63) Irie M., Watanabe H., Ohgi K., Harada M., *J. Biochem.*, **99**, 527 (1986).
 - 64) Kawata Y., Sakiyama F., Hayashi K., Kyogoku Y., *Eur. J. Biochem.*, **1**, 187, 255 (1990).
 - 65) 入江昌親, 生化学, **46**, 167 (1967).
 - 66) Irie M., Ohgi K., Watanabe H., Iwama M., Nakamura K. T., Kurihara H., Nonaka T., Mitsui Y., Horiuchi H., Takagi M., *J. Biochem.*, **115**, 1083 (1994).

- 67) Sanda A., Takizawa Y., Iwama M., Irie M., *J. Biochem.*, **98**, 125 (1985).
- 68) Ohgi K., Irie M., *J. Biochem.*, **81**, 1031 (1977).
- 69) Irie M., Harada M., Sawada M., *J. Biochem.*, **72**, 1251 (1972).
- 70) Ohgi K., Horiuchi H., Watanabe H., Takagi M., Yano K., Irie M., *J. Biochem.*, **109**, 776 (1991).
- 71) Kunkel T. A., Roberts J. D., Zakour R. A., "Methods in Enzymology," Wu R. V., Grossman L., eds. Vol. 154, Academic Press, N.Y., 1987, p. 465.
- 72) Ohgi K., Horiuchi H., Iwama M., Watanabe H., Takagi M., Irie M., *J. Biochem.*, **112**, 132 (1992).
- 73) Ohgi K., Horiuchi H., Watanabe H., Iwama M., Takagi M., Irie M., *J. Biochem.*, **113**, 219 (1993).
- 74) Kurihara H., Mitsui Y., Ohgi K., Irie M., Mizuno H., Nakamura K. T., *FEBS Lett.*, **306**, 189 (1992).
- 75) Kurihara H., Nonaka T., Ohgi K., Irie M., Mitsui Y., Nakamura K. T., *J. Mol. Biol.*, **255**, 310 (1996).
- 76) 浜島雅樹, 長岡技術科学大学修士論文, 1994.
- 77) Ai Y., Singh A., Coleman C. E., Ioerger T. R., Kheyer-Pour A., Kao T-H., *Plant Reprod.*, **3**, 130 (1990).
- 78) Ohgi K., Iwama M., Tada K., Takizawa R., Irie M., *J. Biochem.*, **117**, 21 (1995).
- 79) Ohgi K., Iwama M., Ogawa Y., Hagihara T., Ono E., Kawaguchi R., Kanazawa C., Irie M., *Biochem. Pharm. Bull.*, **19**, 1080 (1996).
- 80) Irie M., Ohgi K., Iwama M., Koizumi M., Sasayama E., Harada K., Yano Y., Udagawa J., Kawasaki M., *J. Biochem.*, **121**, 849 (1997).
- 81) Ohgi K., Takeuchi K., Iwama M., Irie M., *J. Biochem.*, **119**, 9 (1966).
- 82) Ohgi K., Takeuchi M., Iwama M., Irie M., *J. Biochem.*, **119**, 552 (1996).
- 83) 扇 和子, 工藤早苗, 岩間正典, 山野敦子, 山本美穂, 入江昌親, 日本薬学会第 117 年々会, 東京, 1997 年.
- 84) Irie M., Watanabe H., Ohgi K., Minami Y., Yamada H., Funatsu G., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 497 (1993).