

(様式 1-2)

提出日：2020 年 4 月 21 日

2019 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

(2) 研究成果の概要

| | | |
|--|------------------------------------|-------------------|
| 課題名 | キノコ由来リボヌクレアーゼの抗ヒト腫瘍細胞活性の作用機序の解明と応用 | |
| 研究代表者 | 氏名 | 小林 弘子 |
| | 所属機関名・部局名 | 日本大学薬学部・病原微生物学研究室 |
| | 職名 | 教授（4月より） |
| 事業名 (該当の事業名の右欄に○) | ○ | 共同研究員 |
| | | 超高磁場NMR共同利用研究課題 |
| | | クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題 |
| | | 客員フェロー |
| 蛋白研受入担当教員名 | 鈴木 守 | |
| <p>ともに、食用キノコ由来、グアニン塩基特異的 RNase (T1 ファミリー) であるヤマブシタケ由来 RNase He1 とヒラタケ RNase Po1 は同一の活性中心構造、S-S 結合を有し、60%の高いホモロジーを有している。しかし、Po1 のみ顕著に抗ヒト腫瘍細胞効果を有する。これは、両者の等電点が、He1 : pH4.5、Po1 : 9.2 と大きく異なっていることにより、ヒト腫瘍細胞内への導入効果が異なっているのではないかと考えている。今までに、Po1 (PDB: 3WHO)、Po1-3'GMP 複合体 (PDB : 3WR2)、He1-Zn 複合体 (PDB : 5GY6) の X 線結晶構造解析に成功し、Po1 と Zn の立体構造を比較したところ、分子表面の荷電状態が異なっており、Po1 が正荷電領域、He1 では負に荷電している領域が広範囲であった。ピリミジン塩基特異的 RNase (A ファミリー) に分類される抗腫瘍性 RNase の知見から、腫瘍細胞内に導入されるには正に荷電している方が優位であることがいわれていることから、Po1 はより腫瘍細胞に取り込まれやすいことが構造面から確認できた。腫瘍細胞内の Po1 及び He1 を免疫染色による検討により、Po1 のみ細胞内に導入されていることが確認できている（日本薬学会第 140 年会）。また、He1-Zn 複合体の構造から、Zn が結合することにより活性中心付近に立体障害をもたらすような構造変化が起こっていることを Po1 の構造との比較で明らかにした (<i>Biol.Pharm.Bull.</i> 42(12), 2054-2061,2019)。T1 ファミリーRNase は一般的に Zn により活性阻害をうけるので、本研究によりその機序を解明できた。一方、Po1 と He1 の至適 pH は、He1 : pH 4.5、Po1 : pH 7.5 と大きく異なっている。He1 と Po1 の活性中心近傍との立体構造が明らかになれば、両者を比較することにより至適 pH の相違を立体構造上で説明できると考えている。今年度、亜鉛フリーの RNase He1 の結晶構造および、基質である 3'-GMP と RNase He1 の複合体の X 線結晶解析を同時に成功した (PDB ID : 6LS1 登録中)。これらの構造と Po1-3'GMP 複合体を比較することにより至適 pH の違いを説明すべく鈴木准教授の支援のもと現在考察中である。同時に、RNase He1 を 12 残基改変した部分改変体において、至適 pH が Po1 と同様に pH7.5 にシフトし、Po1 と同程度の抗腫瘍活性を獲得した理由を構造面から説明することが可能になると考える。さらにこれらの知見をもとに、Po1 の部位改変体の作成により、細胞導入効果をさらに上げて、抗腫瘍細胞効果の増強を試みている。</p> | | |