

(様式 1-1)

提出日：2023 年 4 月 24 日

2022 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

研究成果報告書

(1) 事業名 (下記より該当事業名を選択し、ほかは削除して下さい。)

共同研究員

(2) 研究代表者

氏名：小林弘子

所属機関名・部局名・職名：日本大学薬学部・病原微生物学研究室・教授

(3) 研究課題名 (申請時に記載したものと同一課題名を記入して下さい。)

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

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：鈴木 守 (研究室名：超分子構造解析学研究室)

(5) 研究成果の概要 (公開)

***背景および目的、方法と結果、について、公開して差し支えない範囲で 1 ページ以内で記載。**

ヒラタケ由来 RNase Po1 は分子量 10 kDa の RNA を 2', 3'サイクリック体を経由して 3'-モノヌクレオチドを生成するリボヌクレアーゼで、グアニン特異的に作用することから RNase T1 ファミリーに分類される。Po1 はこのタイプの RNase とは異なりヒト白血病細胞に対して抗腫瘍活性を有する。これに対しヤマブシタケから得られた同じタイプの RNase He1 は Po1 とのホモロジーが 60%と高く、活性中心、ジスルフィド結合位置も一致しているにもかかわらず抗腫瘍活性を全く示さない。その理由として等電点の違いが考えられる。Po1 が pH9.0 であるのに対し、T1, および He1 をはじめとするこのタイプの RNase の等電点は pH3~4.5 付近の弱酸性側にある。RNase T1 および本研究支援により明らかになった Po1 (PDB ID 3WHO, 3WR2) と RNase He1(PDB ID 5GY6) の X 線構造解析から、各 RNase の分子表面の荷電状態を比較すると明らかに RNase Po1 では正に荷電している部分が多いことがわかる。がん細胞は正常細胞よりもより負に荷電していることから、この分子表面の正荷電が抗ヒト腫瘍細胞効果大きく関連していると考えている。Po1 と He1 の 1 次構造の比較では、特に活性中心サイトの裏側に Asn→Asp、Gln→Glu の変異が多く見られ、分子表面の荷電状態に相違の原因になっていると思われる。RNase He1 の 12 残基の Asp、Glu を Asn、Gln に改変した改変体 12He1 は、RNase Po1 と同程度の抗腫瘍活性を獲得し、同時に、RNA に対する至適 pH が 4.5 から 7.5 にシフトしている。これは Po1 と同様になったということである。この 12 残基の中に、至適 pH、抗腫瘍活性に関与するアミノ酸残基があると思われ、なかでも活性中心近郊の Asp、Glu、Asn、Gln のアミノ酸残基が至適 pH の変動に影響していると考えられる。そこで、本研究支援により 12He1 の結晶化を試みた。結晶化の条件は、Po1、He1 の結晶化条件を参考にしたことにより短期間で結晶化に成功し、X 線結晶構造解析を行ったところ解像度 1.29 Å で構造が決定できた。(PDB ID: 7W05)。現在、12He1、Po1、He1 の構造を比較し、至適 pH の変動に関与する候補となる Asp を選定した。これらを Asn に改変したアミノ酸残基 He1 の改変体を作成し、各々の改変体の至適 pH を測定することで構造と至適 pH の関係を検討中である。また、この 12 残基の中から分子表面の荷電に影響するアミノ酸残基を選定し、抗腫瘍活性と構造との関連を検討する予定である。