

リボヌクレアーゼの抗腫瘍細胞等生理活性の解明と応用

The Investigation and Application of Ribonuclease That Exhibits Anti-Tumor Activity

小林弘子^{1*}, 勝谷拓也², 原由美子², 山田悠介³, 鈴木守^{2**}¹ 日本大学薬学部, 〒274-8555 船橋市習志野台 7-7-1² 大阪大学蛋白質研究所, 〒565-0871 吹田市山田丘 3-2³ 高エネルギー加速器研究機構物質科学研究所, 〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1Hiroko Kobayashi^{1*}, Takuya Katsutani², Yumiko Hara², Yusuke Yamada³ and Mamoru Suzuki²¹ School of Pharmacy, Nihon University; 7-7-1, Narashinodai, Funabashi, Chiba. 274-8555, Japan² Institute for Protein Research, Osaka University; 3-2, Yamadaoka, Suita, Osaka. 565-0871 Japan³ Photon Factory, KEK; 1-1, Oho, Tsukuba. 305-0801, Japan

1 はじめに

ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) 由来のリボヌクレアーゼ RNase Po1 (101 残基, 11 kDa) は、2',3'-サイクリック体を経由して 3'-モノヌクレオチドを遊離する狭義の意味でのリボヌクレアーゼ (RNase) で、グアニン塩基特異的であることから RNase T1 ファミリーRNase に分類される。このタイプの代表的な RNase として *Aspergillus oryzae* 由来の RNase T1 があげられる。RNase Po1 と RNase T1 とのホモロジーは約 40% と高く、活性中心を構成するアミノ酸残基も保持されている。しかし、RNase Po1 はシステイン残基を 6 残基有し、ジスルフィド結合を RNase T1 よりも 1 組多い 3 組有している[1]。RNase Po1 のジスルフィド結合の位置は、システイン残基の 1 次構造上の位置から 1 組は真菌由来の RNase T1 ファミリーに共通しており、他の 2 組は RNase T1 とは異なっていると考えられる。RNase Po1 の至適温度は RNase T1 よりもおよそ 20°C 高く、CD スペクトルによる分析により RNase T1 よりも高い温度で変性がおこることを確認しており RNase Po1 は熱安定性が高い。さらに、RNase Po1 はヒト白血病細胞 HL-60 やヒト神経芽腫細胞 IMR-32 に対し顕著な生育阻害作用を示す[2]。これに対し、RNase T1 及び RNase T1 とホモロジーの高い RNase で抗腫瘍細胞活性を有するものの報告はない。

本研究では、RNase Po1 の X 線結晶構造解析を行い、RNase Po1 と RNase T1 の X 線結晶構造解析と比較することにより、構造と安定性、さらに構造と抗腫瘍活性との関連について考察した。

2 実験

RNase Po1 は、大腸菌で発現し、硫酸分画後、各種カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。

RNase Po1 (10mg/ml) の結晶化は、hanging drop vapor diffusion 法により行い、沈澱剤として (3.5M sodium formate, 0.1M Bis-Tris propane pH7.5, PEG400, 2M cesium chloride) を用いた。

結晶解析は、RNase Po1 の針状結晶を用いて Photon Factory BL-17A により回折データを収集し、XDS と SCALA にて積分とスケーリングを行った後、BALBES と MOLREP で分子置換法にて位相を決定した。構造精密化には PHENIX を用いた。

3 結果および考察

RNase Po1 は、RNase T1[3]と同様に 1 本の α -Helix と 7 本の β -strand を有し、 α -Helix は「backbone」のように分子内に横たわり、4 本の $\beta_{4,6}$ -strand が逆平行に β -sheet 構造をとり α -Helix をよこぎる構造となっていた。RNase Po1 は、この 4 本の β -strand 上に、RNase T1 で触媒部位とされている 4 個のアミノ酸残基が局在し、RNase T1 と同様に活性中心のポケットを形成していると考えられた。また、RNase Po1 の $\beta_{3,4}$ strand 及び $\beta_{6,7}$ strand の間のループ上に、RNase T1 で塩基認識部位とされている 6 個のアミノ酸残基が保存されており、RNase T1 と同様の塩基認識部位を構成していると考えられた (Fig.1)。

RNase Po1 は X 線結晶構造解析より 3 組のジスルフィド結合を有していることがわかった (Cys7-Cys84, Cys9-Cys99, Cys48-Cys82)。Cys9-Cys99 は、RNase T1 と共通で N 末端と C 末端を結合させる位置にあったが、Cys7-Cys84、Cys48-Cys82 結合は RNase T1 には存在しない。Cys7-Cys84 は N 末端と β_6 strand を結合し、 β_6 strand 直後の触媒部位 His87 を安定し、Cys48-Cys82 は、 $\beta_{3,4}$ strand の間の塩基認識部位が存在するループ構造と、 β_6 strand を結合していることから、活性中心のポケット構造をより安定化する位置にあり、RNase Po1 が RNase T1 よりも熱安定性が高いことが説明できる。

RNase Po1 と RNase T1 の分子表面ポテンシャルを比較したところ、RNase Po1 の活性中心のポケットの裏側はプラスに荷電しているのに対し、RNase T1 ではマイナスに荷電していた。ヒト腫瘍細胞に対し強い増殖抑制作用が報告されている RNase A タイプのオンコナーゼは分子表面にプラス荷電領域を有し、この領域が腫瘍細胞の細胞膜に結合することにより

細胞内への導入に関与している[4]。したがって、RNase Po1 が有するプラス荷電領域が細胞膜の結合、細胞内へ導入に関与していると推測された。

今後、ラベル化した RNase Po1 を作成し腫瘍細胞への導入実験を行い、細胞内導入効果を検討する必要がある。

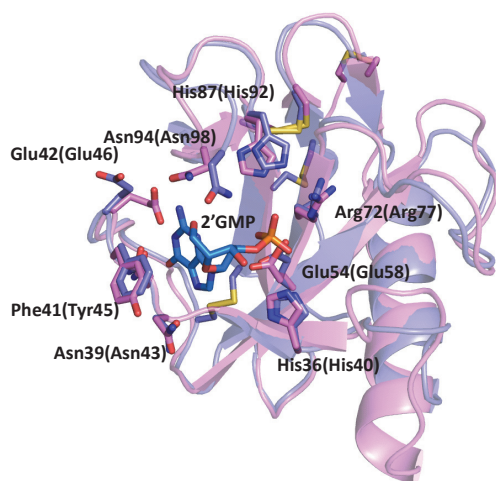


Fig. 1. Tertiary structures of RNase Po1 and RNase T1. The figure was drawn with PyMOL Structural overlay of RNase Po1 with that of the RNase T1/2'GMP complex. RNase T1 is colored pink (PDB ID: 2BU4, Proteins 1999, 36, 117-134), 2'GMP is shown as sticks colored blue and red. RNase Po1 is colored blue (PDB ID: 3WHO). Active site residues of RNase Po1 and RNase T1 are colored blue and pink, respectively. The α -helices and β -strands are marked α 1 and β 1-7, respectively. The disulfide bonds of RNase Po1 are shown as sticks colored yellow.

4 まとめ

RNase Po1 は RNase T1 と高いホモロジーを有するにもかかわらず RNase T1 が全く示さないヒト腫瘍細胞に対し生育阻害作用を有する。両者の X 線結晶構造を比較することにより、ジスルフィド結合の位置や分子表面ポテンシャルが異なっていることが明らかになった。RNase Po1 のジスルフィド結合は RNase T1 より 1 組多く、より活性中心近傍に位置し活性中心の安定性に関与していると考えられ、RNase Po1 の優れた安定性を説明できる。分子表面がプラスに荷電されていることは腫瘍細胞への導入効果に関連していると考えられる。これらの情報をもとに部位か変態を作成し、より抗腫瘍作用の強い RNase を作成し、新規抗腫瘍剤の開発に供したいと考える。

謝辞

RNase Po1 の結晶解析にご尽力いただきました高速エネルギー加速器研究所加藤龍一博士に深く感謝致します。

データ測定にあたり P F スタッフの方々に深く感謝いたします。

参考文献

- [1] Nomura H, Inokuchi N, Kobayashi H, Koyama T, Iwama M, Ohgi K, Irie M. *J. Biochem.*, **116**, 26-33 (1994).
- [2] Kobayashi H, Motoyoshi N, Itagaki T, Tabata K, Suzuki T, Inokuchi N. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 133-136 (2013).
- [3] Sugio S, Amisaki T, Ohishi H, Tomita K. *J. Biochem.*, **103**, 354-366 (1988).
- [4] Turcotte RF, Lavis LD, Raines RT. *FEBS J.*, **276**, 3846-3857 (2009).
- [5] Kobayashi H, Katsutani T, Hara Y, Motoyoshi N, Itagaki T, Akita F, Higashiura A, Yamada Y, Inokuchi N, Suzuki M. *Biol. Pharm. Bull.* **37**, 968-978 (2014).

本実験は文献[5]で発表した。

* kobayashi.hiroko@nihon-u.ac.jp

** mamoru.suzuki@protein.osaka-u.ac.jp