

2021 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・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)

ヒラタケは広く食用キノコの 1 つで、分子量の異なる 2 種のリボヌクレアーゼ (RNase) を産生するが、より低分子の RNase (RNase Po1) は、分子量 10 k Da のグアニン塩基特異的で典型的な RNase T1 のグループに分類できる。RNase Po1 はコウジカビ由来の RNase T1 と 1 次構造上、類似の構造であるにもかかわらずヒト腫瘍細胞に対しアポトーシスを誘導し増殖抑制作用を示す。今まで、典型的な RNase T1 のグループで抗腫瘍作用を有するものの報告はなく (Kobayashi H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1486-1491, 2013)、ヒトとはまったく生物種が異なるため脊椎動物由来の RNase 阻害剤に抵抗性である可能性があり抗腫瘍薬としての可能性が高いと考える。RNase Po1 の抗腫瘍作用を明らかにするために、X 線結晶構造解析、及びその構造決定を行い RNase T1 と比較した。その結果 RNase Po1 の分子表面の荷電状態はより正に荷電しており、がん細胞は正常細胞よりも負に荷電している傾向があることから、がん細胞に接着する際有利となると考えられた (Kobayashi H, Suzuki M, *et.al.*, *Biol.Pharm.Bull.* **37**, 1843-1847, 2014)。

一方、食用キノコであるヤマブシタケから同じグループの RNase He1 を得ている。He1 は Po1 と一次構造上 60% の高いホモロジーを有し、活性中心、ジスルフィド結合も一致しているにもかかわらずヒト腫瘍細胞に対し全く影響を示さない。また、Po1、T1 を含めてほとんどのこのタイプ RNase は至適 pH を pH7.5 の中性側に有するのに対し He1 は pH4.5 と弱酸性側に有する。He1 と Po1 間で Asn→Asp、Gln→Glu の変異が多くみられることから、この変異が至適 pH や抗腫瘍活性に何らかの影響を与えていると考えられる。また、RNase He1 の 12 残基の Asp、Glu アミノ酸残基を中性アミノ酸に改変した改変体 12He1 は、ヒト白血病細胞 HL-60 に対し RNase Po1 と同程度の増殖抑制作用を獲得している (Kobayashi H, Suzuki M, *et.al.* *Biosci.Biotechnol.Biochem.* **79**, 211-217, 2015)。この現象を構造的に説明するために He1 の X 線結晶構造解析を行った。その結果、He1-Zn 複合体の構造解析 (*Biol.Pharm.Bull.* 42(12), 2054-2061, 2019) に成功し、T1 ファミリーが Zn 共存下で活性阻害を受けるメカニズムを構造的に説明するとともに、分子表面がより負めに荷電していることを明らかにできた (PDBID: 6LS1)。現在、12He1 の結晶を得て X 線結晶構造解析を行い、He1 未変化体との構造と比較検討中である。