

2023 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。**

食用キノコの 1 つであるヒラタケは、分子量 10kDa の RNase Po1 を産生する。グアニン塩基特異的で反応中間体にサイクリック体を形成後、3'-GMP を遊離することから、RNase T1 ファミリーに分類できる。RNase Po1 はヒト白血病細胞に対し、今までこのタイプの RNase には見られない強い生育阻害作用をもたらす (Kobayashi H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1486-1491, 2013)。今まで抗腫瘍活性を有する RNase はオンコナーゼをはじめとする動物由来の RNase A ファミリーから報告されており、RNase T1 ファミリーが真菌、細菌のみから得られることから、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高く、抗腫瘍薬としての可能性が高いと考える。オンコナーゼと RNase Po1 の共通点は、RNase T1 よりも等電点が高く、構造的に安定であることである。そこで、RNase Po1 の X 線結晶構造解析、及びその構造決定を行った。(Kobayashi H, Suzuki M, *et.al.*, *Biol.Pharm.Bull.* **37**, 1843-1847, 2014)。その結果、RNase Po1 の分子表面がより正に荷電状態しており、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、より正荷電な RNase Po1 ががん細胞に接着する際、有利になると考えられた。また、免疫染色による検討で、RNase Po1 が細胞内に導入されていることを確認している (日本薬学会第 140 年会)。

一方、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。RNase T1 と同様に等電点が低いことから、分子表面がより負に荷電しているためと考えられる。また、Po1、T1 を含めてほとんどのこのタイプ RNase は至適 pH を中性側に有するのに対し He1 は弱酸性側に有する。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受けていると考えられ、RNase He1 の 12 残基の Asp、Glu を Asn、Gln 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た (Kobayashi H, Suzuki M, *et.al.* *Biosci.Biotechnol.Biochem.* **79**, 211-217, 2015)。He 1-Zn 複合体の構造 (Kobayashi H, Suzuki M, *et.al.* *Biol.Pharm.Bull.* 42(12), 2054-2061, 2019)、2'-GMP との複合体の X 線結晶構造解析構造 (Kobayashi H, Suzuki M, *et.al.* *Biol.Pharm.Bull.* 2023;46(12):1778-1786.)、2022 年に改変体 12He1(PBD.No.7W05) の X 線構造解析に成功した。これらの構造の比較から、867-ループ (He1:87-95) の酸性アミノ酸残基が形成する水素結合ネットワークが至適 pH の酸性化機構を規定していることを示唆した。また、これらの変異は抗腫瘍増殖活性を促進していた。