

論文の内容の要旨

氏名：元吉 尚美

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：リボヌクレアーゼの構造と機能に関する研究

はじめに

RNA を分解する酵素は各種ヌクレアーゼやリボヌクレアーゼなど様々なものがあり生物に必須の酵素である。リボヌクレアーゼ (RNase) は RNA のホスホジエステル結合を加水分解してヌクレオチドを遊離する反応を触媒する酵素で、ほとんどすべての動物、植物、微生物に存在している。しかし、これら RNase の生理的役割についてはまだ十分に解明されているとはいえない。

本論文では RNA のみに作用するという観点から、反応時に 2', 3'-サイクリック体を形成するいわゆる狭義の RNase を対象として扱った。このタイプの RNase の代表的な酵素である牛脾臓由来 RNase A が消化器官に分泌されていることから、RNase は単なる消化酵素として認識されてきた。しかし近年、抗腫瘍作用を持つ onconase や血管伸長作用を持つ angiogenin、植物の自家不和合性因子や抗生物質 colicin などがいずれも RNA 分解活性を有し一次構造上のホモロジーも高いことから、その生理作用、特に抗腫瘍作用についての研究が盛んに行われている。

この狭義の RNase は三種類に分類され、その由来、構造、基質特異性が大きく異なっている。第一のタイプは、分子量 13,000 前後でピリミジン塩基特異的なものであり、ヒトからカエルにいたる脊椎動物から得られている。代表的なものとして前述の牛脾臓由来の RNase A があげられ、RNase A ファミリー酵素と呼ばれている。第二のタイプは、分子量 11,000 前後でグアニン塩基特異的あるいは優先的で、細菌や真菌などの下等生物から得られている。代表的なものとして *Aspergillus oryzae* から得られた RNase T1 があり、RNase T1 ファミリー酵素と呼ばれている。第三のタイプは、分子量が 24,000-40,000 で塩基非特異的で、脊椎動物から植物、菌類および原核生物まで非常に広範囲の生物から得られている。この一群はその代表的なものとして *A. oryzae* の RNase T2 があげられ、RNase T2 ファミリー酵素と呼ばれている。

本論文では、RNase T2 ファミリーに分類され棘皮動物キヒトデ (*Asterias amurensis*) 由来の RNase Aa と T1 ファミリーに分類され食用キノコの一つであるヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) 由来の RNase Po1 を用いて多角的な解析を行い、生物学的基礎研究、創薬への応用を視野にとらえた研究をすすめることにより、RNase の研究素材としての可能性を示すことを目的とした。

1. キヒトデ (*Asterias amurensis*) 由来 RNase T2 ファミリー酵素 RNase Aa の精製と一次構造の決定

棘皮動物のキヒトデは 5 つの同じ構造が放射状にのびる五放射相称という独特な形態をしているが、進化的には脊椎動物に近いとされている。そこでキヒトデ RNase の一次構造を決定し、RNase タンパク質を指標とした分子進化の系統樹の作成を試みた。

キヒトデから RNase Aa の精製法を確立し、キヒトデ生殖器約 1 kg から 11 ステップを経て最終的に 0.9 mg の RNase Aa を得ることができた。収率は 8.5% で本酵素のみかけの分子量は 31,400 であり、比活性は 789 units/mg であった。

RNase Aa の RNA を基質とした時の至適 pH は 5.0 であり、基質特異性や CD スペクトルの検討から、本酵素は RNase T2 ファミリー酵素であることが分かった。

RNase Aa をコードする cDNA の解析から成熟タンパク質部分は 231 アミノ酸残基で、40 残基のシグナルペプチドを有していた。蛋白化学的手法では 3 つのポリペプチド鎖からなると考えられるが、cDNA ではその部分は欠失も挿入もなくつながっていることから、RNase Aa は翻訳後に、N 末端側の Asn29-Gly30 と C 末端側の Thr210-Arg211 で切断されたと考えられる。動物由来の RNase T2 ファミリー酵素では Tp (イカ)、BSP1 (牛脾)、PSP1 (ブタ脾) CL1 (ニワトリ肝)、RCL2 (カエル肝) などが C 末端側で切断を受けているが、この中で N 末端側でも切断を受けているのは、PSP1 (ブタ脾) と CL1 (ニワトリ肝) の 2 つだけである。CD スペクトルおよび RNase MCl (ニガウリ) との三次構造のモデリングでは、この分子内切断は高次構造には影響していないと考えられる。

一次構造から得られた情報をもとに、最尤法によってRNase T2ファミリー酵素の分子進化の系統樹を作成した(図1)。棘皮動物由来の本酵素は分子進化上のかなり早い段階で軟体動物や脊椎動物と分岐していることが分かった。また、RNase AaはOy(マガキ)と最も近縁であったが、LE(トマト)とも比較的近縁であった。キヒトデは形態学的には脊椎動物と同様の後口動物に分類されているが、RNaseによる分子系統樹においては前口動物である軟体動物に近縁であることが分かった。

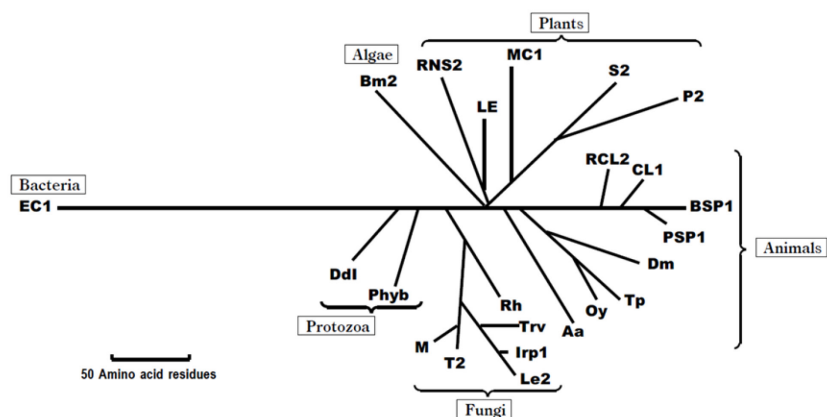


図1 RNase T2ファミリー酵素の分子進化の系統樹

2. ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) 由来RNase T1ファミリー酵素 RNase Po1のヒト腫瘍細胞に対する増殖抑制作用の検討

脊椎動物から得られるRNase Aファミリー酵素から数種の抗腫瘍性RNaseが報告されているが、同じく分子量が小さいRNase T1ファミリー酵素においてはRNase T1をはじめ抗腫瘍性を有するものはないとされてきた。T1ファミリーに属するヒラタケ由来RNase Po1は一般的なT1ファミリー酵素と比較して等電点が高くなっている。onconaseに代表されるRNase Aファミリーに属する抗腫瘍性RNaseは等電点が高いことから、RNase Po1の抗腫瘍性についてヒト腫瘍細胞を用いて検討を行った。

RNase Po1のcDNA塩基配列を決定し、大腸菌による発現系を構築した。発現したタンパク質を各種クロマトグラフィーによって精製し、9 Lの大腸菌培養液から5 mgの標品が得られ、収率は34%であった。

RNase Po1は、RNase T1と同様に至適pHを7.5に有し、温度安定性が高かった。しかし、RNase Po1は、RNase T1に比べて至適温度が20℃ほど高く、より広範囲のpHに対して安定であった。また、非特異的のプロテアーゼ消化に対しても抵抗性があった。

RNase Po1を5種のヒト腫瘍細胞に72時間作用させたところ、HL-60細胞およびIMR-32細胞に対して強い増殖抑制作用を示した。これに対してRNase T1は、どの細胞に対してもほとんど増殖抑制作用を示さなかった(図2、3)。フローサイトメトリーによる分析から、RNase Po1はHL-60細胞に対してアポトーシスを誘発し(図4)、細胞周期上S期への移行を妨げていることが分かった(図5)。

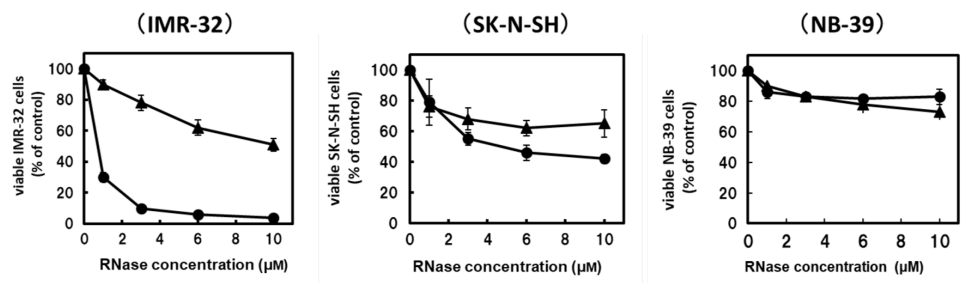


図2 ヒト神経芽腫細胞に対する増殖抑制作用 ▲ RNase T1 ● RNase Po1

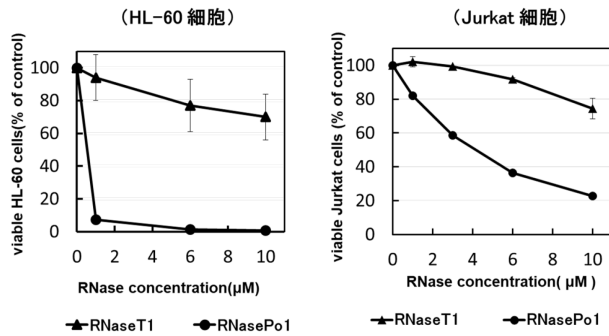


図3 ヒト白血病細胞に対する増殖抑制作用

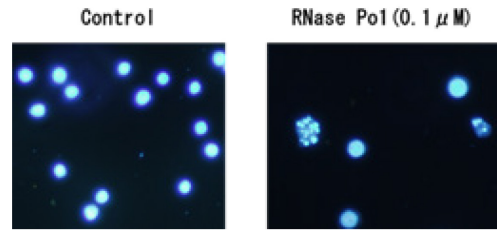


図4 ヘキスト染色 (HL-60 細胞)

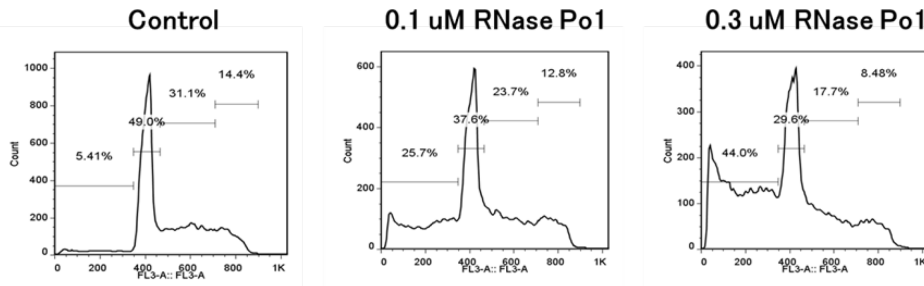


図5 フローサイトメトリーによる細胞周期の検討

3. RNase Po1 の X 線結晶構造解析と安定性の検討

RNase Po1 は RNase T1 と一次構造上 40% のホモロジーを有し、活性中心構造も一致しているにもかかわらず、抗腫瘍活性を有していたため、RNase Po1 の X 線結晶構造解析を行い RNase T1 との比較検討を行った。

RNase Po1 の X 線結晶構造解析を行い、分解能 1.85 (Å) で分子置換法により三次構造を解明し、Rwork、Rfree 各々 0.164、0.176 で精密化した (PDB ID: 3WHO)。

RNase Po1 は、RNase T1 と同様に、1 つの α -helix と 7 つの β -strand を有し、 α -helix を横切ように、4 本の β -strand が逆平行に β -シート構造を形成していた。RNase T1 の触媒部位とされているアミノ酸残基、塩基認識部位は RNase Po1 でも保存されていた。触媒部位を形成する疎水性のアミノ酸残基が形成するクラスターも両者で完全に一致していた (図 6)。

RNase Po1 は 3 組のジスルフィド結合 (S-S 結合) を有しており、RNase T1 よりも 1 組多い。この 3 組の S-S 結合のうち 1 組は T1 ファミリーに共通のものであり RNase T1 と一致しているが、残り 2 組は RNase T1 とは異なり、触媒部位、塩基認識部位を安定化させるような位置に局在しており、高い熱安定性を有するのはこのためであると考えられる (図 6)。また、RNase Po1 の分子表面の荷電状態は RNase T1 とは異なり、特に触媒部位の裏側でより正に荷電している (図 7)。したがって、腫瘍細胞への親和性が増大し、細胞内への取り込み効率の向上に有利であると考えられる。

HL-60 細胞に RNase Po1 と RNase T1 をそれぞれ加え、30 分後に細胞内の RNA 分解活性を測定したところ、RNase Po1 は RNase T1 の約 4 倍高い値を示した。また、細胞透過性ペプチド (CPP) を用いて両酵素を HL-60 細胞に導入し 18 時間反応させたところ、RNase Po1 では生細胞数が大きく減少したのに対し、RNase T1 ではわずかに生細胞数が減少したのみであった (図 8)。このことから、RNase Po1 は RNase T1 よりも細胞内に導入されやすく、また細胞内で安定であると推測される。

強い抗腫瘍作用が知られている RNase A ファミリーの onconase や RNase T1 ファミリーに近縁のリボトキシンである α -sarcin も活性中心近傍の S-S 結合が安定化に寄与しており、また、分子表面が正に荷電している領域が細胞内導入に重要な役割を果たしていることから、抗腫瘍性を示すには構造の安定性と分子表面の荷電状態が重要であり、RNase Po1 は両条件を満たしていたと考えられる。

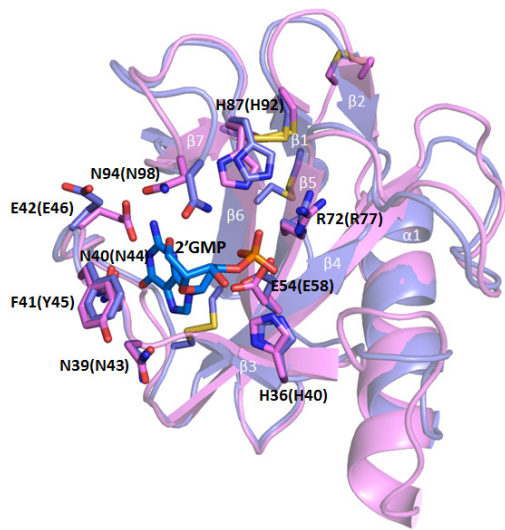


図6 RNase T1 および RNase Po1 の三次構造

Active site residues of RNase Po1 and RNase T1 are colored blue and pink, respectively. The α -helices and β -strands are marked $\alpha 1$ and $\beta 1-7$, respectively. The disulfide bonds of RNase Po1 are shown as sticks colored yellow.

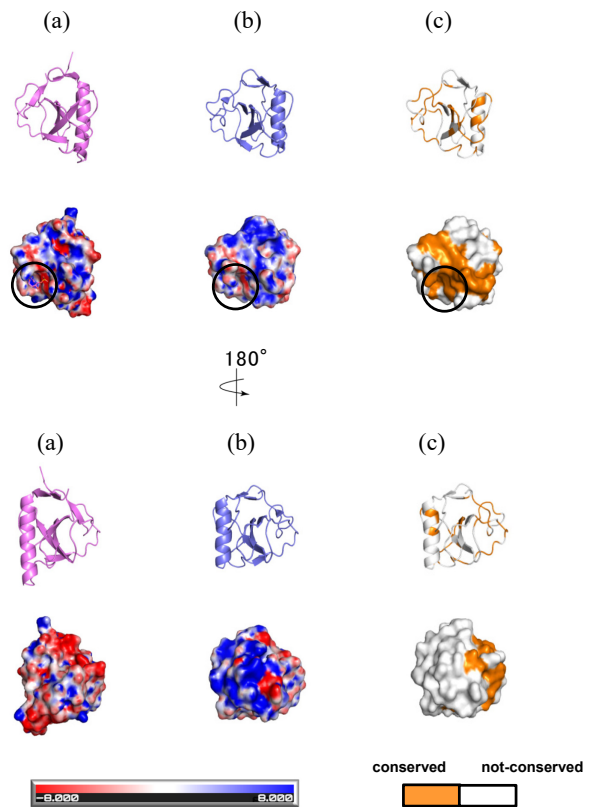


図7 RNase T1 および RNase Po1 の分子表面の荷電状態

- (a) Electrostatic potentials of RNase T1
- (b) Electrostatic potentials of RNase Po1
- (c) Conserved regions of RNase Po1 and RNase T1

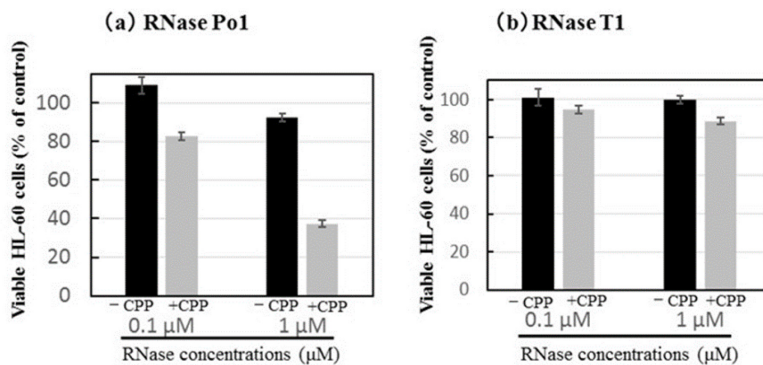


図8 細胞透過性ペプチド (CPP) を用いた HL-60 細胞への RNase Po1 および RNase T1

まとめ

本研究では、生物界に普遍的に存在する RNase T2 ファミリー酵素を研究素材とすることにより分子進化の系統樹を作製し、新たな系統樹を提案することができた。また、種々の生理活性が期待される低分子 RNase から抗腫瘍性 RNase を発見し、構造との相関関係を X 線結晶構造解析により推測することができた。今回得られた知見をもとに、さらに抗腫瘍作用を増強した改変体の作製や、構造上の特徴をマーカーとして新たな抗腫瘍作用を有する RNase の探索も可能となり、今後抗腫瘍剤の開発に供するものと考えられる。

多様な側面を有する RNase の研究は基礎的な生物学的研究から創薬への応用まで広く情報を提供できると考える。