

論文審査の結果の要旨

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

審査委員：(主査) 教授 小 林 弘 子

(副査) 教授 木 澤 靖 夫

教授 小 林 俊 亮

教授 榛 葉 繁 紀

RNA のみを分解するリボヌクレアーゼは生物には必須であり、早くから酵素化学的研究のモデル素材として構造決定、及び、酵素反応様式などの研究が行われてきた。近年、リボヌクレアーゼが単なる消化酵素としての役割だけではなくいくつかの生理活性を有することが報告されているが、いまだ十分に解明されているとはいえない。本論文では、リボヌクレアーゼのうち反応中間体に2', 3'-サイクリック体を形成する狭義の意味でのリボヌクレアーゼから活性中心構造、分子量が異なる二種のリボヌクレアーゼについて1) キヒトデ生殖器から単離、精製した T2 ファミリーリボヌクレアーゼの構造及び分子進化 2) 食用キノコであるヒラタケから T1 ファミリー リボヌクレアーゼの抗腫瘍活性と構造の相関に関する検討を行っている。

第1章では、キヒトデ生殖器から分子量約 31 kDa の塩基非特異的リボヌクレアーゼ RNase Aa の単離、精製を確立し、エドマン分解により本酵素の1次構造を部分的に決定し、さらに、RNase Aa をコードする cDNA の塩基配列を検討し、本酵素の全一次構造を決定した。また、糖分析により 31 残基のマノースが結合した糖タンパク質であることも明らかにした。タンパク質工学手法により 1 次構造を決定する段階において、本酵素が N 末端部分と C 末端部分の 2 か所が分子内切断していることを明らかにし、この切断は分子構造上、活性発現には影響を及ぼさない位置で生じており、ブタ、ニワトリ由来のリボヌクレアーゼにみられることを明らかにした。T2 ファミリーのリボヌクレアーゼは細菌からヒトまで広く生物界に分布して報告されていることから本酵素の分子進化の系統樹を作製したところ、本酵素はマガキ由来のリボヌクレアーゼに最も近縁で、トマト由来のリボヌクレアーゼとも近縁であり形態学的分類とは異なる進化を遂げていると予想した。

第2章では、ヒラタケ由来の T1 ファミリーリボヌクレアーゼ RNase Po1 の生理活性を検討している。初めに、RNase Po1 の1次構造をもとに cDNA の塩基配列を決定し、大腸菌による発現系を確立した。発現タンパク質を精製することにより大量の RNase Po1 を得ることが可能になった。これを用いてヒト白血病細胞、ヒト神経芽腫の生育に対する影響を検討したところ、ヒト白血病細胞の HL-60、ヒト神経芽腫の IMR32 細胞の増殖を顕著に抑制することを明らかにした。さらに、フローサイトメトリー分析等により、ヒト白血病細胞 HL-60 に対シアポトーシスを誘導し、細胞周期上 S 期への移行を妨げていることを明らかにした。典型的 T1 ファミリーリボヌクレアーゼでははじめての知見であった。抗腫瘍活性を有さない T1 ファミリーリボヌクレアーゼである RNase T1 と酵素学的諸性質を比較したところ、至適 pH、金属イオンの影響は同様であったが、RNase Po1 は至適温度がより高くプロテアーゼ抵抗性も優位であった。

第3章では、RNase Po1 の X 線結晶構造解析を行い RNase T1 と比較している。両者とも1本の α -Helix と7つの β -strand を有するなど類似の3次構造を有し、活性中心構造も同一と考えられた。しかし、RNase Po1 はジスルフィド結合を RNase T1 より1組多い3組有する。RNase T1 と異なる位置に局在する2組のジスルフィド結合はちょうど活性中心を構成する β -strand をつなぎとめる位置にあることから、RNase Po1 の活性中心構造をより安定化していると考えられた。至適温度が高くプロテアーゼ抵抗性が高いのはこのためと推測した。膜透過性ペプチド (CPP) を用いて RNase を強制的に HL-60 細胞に導入し18時間後

の生細胞数を測定したところ、RNase T1はCPP無しの場合とほとんど同様の生細胞数であったのに対し、RNase Po1はCPP無しの場合より約40%まで生細胞数が減少した。両酵素のRNAに対する比活性はほぼ同等であることから、細胞内における両酵素の安定性の違いにより細胞増殖抑制作用の違いが生じた可能性がある。一方、両酵素の分子表面の静電ポテンシャルを比較するとRNase T1が負に荷電している領域が広範囲であるのに対し、RNase Po1ではより広範囲の領域が正に荷電していた。腫瘍細胞はより負に荷電している傾向にあることからRNase Po1が腫瘍細胞の細胞膜に電氣的に結合するのに優位であると推測した。

本論文では、T2ファミリーリボヌクレアーゼであるキヒト由来RNase Aaの構造解析をすることによって分子内切断を受けていることを明らかにし、また、今まで報告のあるT2ファミリーリボヌクレアーゼの1次構造からRNase Aaの分子進化について考察した。一方、T1ファミリーリボヌクレアーゼRNase Po1をヒラタケから分離し、ヒト白血病細胞、ヒト神経芽腫にアポトーシスを誘導することで増殖抑制作用を有することを明らかにした。さらに、RNase Po1のX線結晶構造解析を行いRNase T1と比較することで、RNase Po1の構造的特徴と抗腫瘍細胞活性の関連を示唆している。2種のリボヌクレアーゼの特性を生かしてオーソドックスな研究手法を用いて生物学的研究を行い、新たな生理活性発見まで幅広く研究を進めておりリボヌクレアーゼ研究の将来性を示唆するもので評価できる。

よって本論文は、博士（薬学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和3年1月21日