

リボヌクレアーゼの構造と機能に
関する研究

元吉 尚美

略語

本論文では以下の略語を用いた。

CAS	conserved active site
CD	circular dichroism
CM-cys	carboxymethylation-cysteine
CPP	cell-penetrating peptide
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC50	50 % inhibitory concentration
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
PI	Phenyl Isothiocyanate
PITC	Phenyl Isothiocyanate
RCM	reduced carboxymethylation
RNase	ribonuclease
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TB	Terrific Broth
TEMED	tetramethylethylenediamine
TFA	Trifluoroacetic Acid
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane

また、本論文ではアミノ酸残基を 1 文字記号または 3 文字記号で表記し、残基番号を付する際はアミノ酸残基名 3 文字記号+残基番号で Asn23 のように表記した。

目次	
序論	1
本論	4
第1章 キヒトデ (<i>Asterias amurensis</i>) 由来 RNase T2 ファミリー酵素 RNase Aa の	
精製と一次構造の決定	4
第1節 はじめに	4
第2節 実験方法	5
第3節 結果	13
3-1. RNase Aa の精製法	13
3-2. RNase Aa の諸性質	21
3-3. RNase Aa の蛋白化学的手法による一次構造の決定	24
3-4. RNase Aa の cDNA 塩基配列の決定	26
3-5. アミノ酸組成・糖組成	28
3-6. RNase T2 ファミリー酵素の分子進化の系統樹の作成	29
第4節 考察	30
第5節 小括	34
第2章 ヒラタケ (<i>Pleurotus ostreatus</i>) 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	36
第1節 はじめに	36
第2節 実験方法	37
第3節 結果	43
3-1. RNase Po1 の cDNA 塩基配列の決定	43
3-2. RNase Po1 の発現系の構築と精製	44
3-3. RNase Po1 と RNase T1 の酵素特性の比較	45
3-4. RNase Po1 のヒト腫瘍細胞に対する増殖抑制作用の検討	47
3-5. ヘキスト (Hoechst 33342) 染色	49
3-6. RNase Po1 の HL-60 細胞に対するアポトーシスの検討	50

第4節 考察	52
第5節 小括	55
第3章 RNase Po1 の X 線結晶構造解析と安定性の検討	57
第1節 はじめに	57
第2節 実験方法	58
第3節 結果	61
3-1. RNase Po1 の精製・結晶化・構造決定	61
3-2. RNase Po1 の立体構造	62
3-3. HL-60 細胞内に導入された RNase Po1 の RNA 分解活性の測定	66
3-4. 細胞透過性ペプチドを用いた HL-60 細胞への RNase の導入	66
第4節 考察	67
第5節 小括	72
総括	74
原著論文リスト	77
謝辞	78
引用文献	79

序論

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。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 (Fig. 1)、いわゆる狭義のリボヌクレアーゼ (ribonuclease; RNase) を対象として扱った。

この狭義の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。このタイプのRNaseで代表的な牛膵臓由来のRNase A¹⁾が消化器官に分泌されていることから、単なる消化酵素であると認識されてきた。しかし近年、抗腫瘍作用を持つ onconase^{2,3)}や血管伸長作用を持つ angiogenin⁴⁾、植物の自家不和合性因子⁵⁾や抗生物質 colicin E5⁶⁾などが、いずれもRNase活性を有し一次構造上のホモロジーが高いことから、その生理作用が注目されており、特に抗腫瘍作用についての研究が盛んに行われている。

RNaseはその由来や構造、酵素化学的性質の特徴から3つのタイプに分類されている (Table 1)。

第一のタイプは、分子量13 kDa前後でピリミジン塩基特異的であり、ヒトからカエルにいたる高等脊椎動物に存在している。代表的なものとして前述の牛膵臓由来のRNase A¹⁾があげられ、RNase Aファミリーと呼ばれている。RNase Aについては構造と反応機構について詳細に検討されている^{7,8)}。全一次構造、X線結晶構造解析による三次構造、NMRによるヌクレオチドとの相互作用、活性に関与する官能基のpKa等が詳細に検討されており、触媒活性に2残基のヒスチジン残基、1残基のリジン残基が直接関与していると考えられている。RNase Aファミリー酵素の中には抗腫瘍作用を有するRNaseがいくつか報告されている。これらは、抗腫瘍作用を有さないRNase Aと同様の活性触媒構造を有していることから、抗腫瘍作用と構造との関連についていくつかの知見が得られており、特に優れた安定性によるものが大きい。

第二のタイプは、分子量11 kDa前後でグアニン塩基特異的あるいは優先的であり、細菌、真菌などの下等生物に存在している。代表的なものとして *Aspergillus oryzae* から得られたRNase T1⁹⁾があり、RNase T1ファミリーと呼ばれている。その他に、真菌類由来のRNase Ms (*Aspergillus saitoi*)¹⁰⁾、RNase U1 (*Ustilago sphaerogena*)¹¹⁾、放線菌由来のRNase St (*Streptomyces erythreus*)¹²⁾などの酵素がある。RNase T1¹³⁾、RNase Ms^{14, 15)}、RNase St¹²⁾等についても一次構造とX線結晶構造解析による三次構造が明らかにされている。このタイプの活性中心に関与するアミノ酸残基としてはヒスチジン残基、グルタミン残基およびアルギニン残基が知られており、RNase A¹⁾とは異なった形の活性中心を構成している。

第三のタイプは、分子量が 24-40 kDa で塩基非特異的であり、比較的アデニル酸を優先的に遊離するものが多く、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 T2¹⁶ があげられ、RNase T2 ファミリーと呼ばれている。この他 T2 ファミリー酵素として *A.saitoi* の RNase M¹⁷、*Rhizopus niveus* の RNase Rh¹⁸、*Lentinus edodes* の RNase Le2¹⁹、*Physarum polycephalum* の RNase Phy b²⁰、大腸菌の RNase EC1²¹、植物由来のものではニガウリ (*Momordica charantia*) の RNase MC1²² やトマト (*Lycopersicon esculentum*) の RNase LE²³ などの一次構造が解明されている。また、RNase 活性を有するナス科やバラ科などの植物の自家不和合性因子⁵⁾の一次構造が解明されている。動物由来の RNase としてはマガキ (*Crussostrea gigus*) の RNase Oy²⁴、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の RNase Dm²⁵、ウシ脾臓由来の BSP-1²⁶ などの一次構造が決定されている。*A.oryzae* の RNase T2²⁷、*A.saitoi* の RNase M¹⁷、*R.niveus* の RNase Rh²⁸ などについては速度論的研究など多くの研究が行われている。このタイプの酵素で X 線結晶構造解析が行われているのは RNase Rh²⁸、ニガウリの RNase MC1²⁹、トマトの RNase LE³⁰ で、活性中心に関与するアミノ酸として 3 残基のヒスチジンと 1 残基のグルタミン酸が関与していることが報告されている。

前述の通り、第一のタイプの RNase A ファミリーがカエル以上の高等脊椎動物のみから得られ、第二のタイプの RNase T1 ファミリーは真菌および細菌のみから得られているのに対し、第三のタイプの RNase T2 ファミリーは広く生物界から得られている。この RNase T2 ファミリー酵素についてはその生理作用や生体内での役割についての研究は、植物の自家不和合性因子⁵⁾を除いてはほとんど進んでいない。動物から得られる RNase T2 ファミリー酵素の中にはカエル (*Rana catesbeiana*)³¹ やイカ (*Todarodes pacificus*)³² などの RNase に見られるように N 末端または C 末端側のいずれか一ヶ所が分子内切断を受けている例があり、これは菌類や原生生物由来のものには見られない特徴となっている。そこで第 1 章では比較的脊椎動物に近い棘皮動物であるキヒトデ (*Asterias amurensis*) から RNase を単離、精製し、その一次構造を明らかにするとともに、すでに一次構造が判明している RNase T2 ファミリー酵素とともに分子進化の系統樹の作製を試みた。

一方、RNase T1 ファミリー酵素は、RNase A ファミリー、RNase T2 ファミリー酵素に比べて報告が少なく、生理活性についての報告もほとんどされておらず、*Aspergillus giganteus* の産生する α -sarcin^{33, 34)} のようなリボトキシンのみである。我々は食用キノコの 1 つであるヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) から、RNase T1 ファミリー酵素であるが既存の RNase よりも熱安定性に優れた RNase (RNase Po1) を見いだした。この RNase は RNase T1 と同様に分子量が 10 kDa と小さく一次構造上 40% のホモロジーを有しているが、既存のほとんどの RNase T1 ファミリー酵素が等電点を pH 4.5 付近と弱酸性側に有するのに対して、この RNase Po1 は等電点を弱塩基性側の pH 9.0 に有していた。これは RNase A ファミリーの抗腫瘍性 RNase が持つ等電点、分子量や優れた安定性と同様の性質であることから、RNase Po1 が抗腫瘍性を示すことが期待される。またこの

酵素の三次構造を解析して抗腫瘍性を示さない RNase T1 の三次構造³⁵⁾と比較することで、構造と抗腫瘍性との関連を推測できると考えた。そこで、第2章では、RNase Po1 の抗腫瘍活性についてヒト腫瘍細胞を用いて検討し、第3章では RNase Po1 の X 線結晶構造解析を行い RNase T1 の三次構造³⁵⁾と比較し、その構造と安定性との関連を検討した。

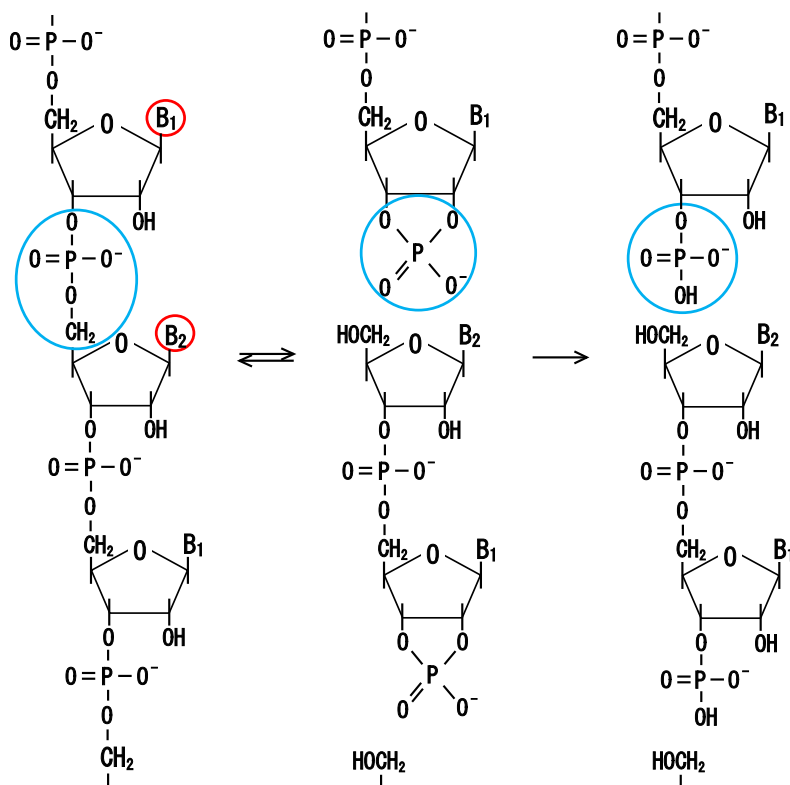


Fig. 1 Mode of action of ribonuclease

Table 1 Classification of ribonucleases

分類	分子量	至適 pH	等電点	基質特異性	分布
A	13 kDa	7.5	9.0	ピリミジン 塩基特異的	脊椎動物
T1	11 kDa	7.5	4.5	グアニン 塩基特異的	細菌、真菌
T2	24-40 kDa	5.0	4.5	塩基非特異的	脊椎動物、植物、 菌類、原核生物

本論

第1章 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

第1節 はじめに

RNase T2 ファミリー酵素は、RNA を塩基非特異的に分解し、分子量 24-40 kDa であり脊椎動物、植物、菌類および原核生物など広く生物界から得られている。RNase A ファミリー酵素や、細菌、真菌などの下等生物からのみ得られている RNase T1 ファミリー酵素とは異なり、生物の生命維持に必要な基礎的な役割を果たしていると考えられる。

RNase T2 ファミリー酵素は8つのCys残基を有しており、クモノスカビ (*Rhizopus niveus*) のRNase Rh³⁶⁾、ニガウリ (*Momordica charantia*) のRNase MC1^{37,38)}、トマト (*Lycopersicon esculentum*) のRNase LE³⁰⁾のX線結晶構造解析から、活性中心には3残基のヒスチジンと1残基のグルタミン酸が関与していると考えられる。活性中心構造は2つのCAS (Conserved active site) 領域で構成されており、塩基認識部位は2つの領域 (B1、B2サイト) からなっていることが報告されている^{1,39,40)}。

動物から得られたRNase T2ファミリー酵素はカエル (*Rana catesbeiana*) のRNase RCL2³¹⁾やイカ (*Todarodes pacificus*) のRNase Tp³²⁾に見られるようにN末端またはC末端側のいずれか1ヶ所が切断を受けている例が多く、これは菌類や原生生物由来のものには見られない特徴となっている。

キヒトデ (*Asterias amurensis*) は棘皮動物の1種で、5つの同じ構造が放射状にのびる五放射相称と呼ばれる独特な形態をしているが、形態学的には脊椎動物と同様に新口 (後口) 動物に分類されている。また18S rDNAによる分類においても脊椎動物と同じグループにおかれているが、ヒトなどの脊椎動物と棘皮動物の関係は未だ明確ではない。

本章ではキヒトデの生殖器からRNase T2ファミリー酵素を単離、精製し、その一次構造を明らかにするとともに、すでに一次構造が判明しているT2ファミリー酵素とともに分子進化の系統樹の作製を試みた。

第2節 実験方法

1. 試薬

[酵素の精製]

各クロマトグラフィー担体は、Sephadex G-50、Heparin-Sepharose CL-6B、2',5'-ADP-Agarose、Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) に使用した Superdex™ 75 カラムは Cytiva (東京) の製品を、DEAE-Cellulofine A-200 は JNC(株) (東京) の製品を、SP-Toyopearl 650M、DEAE-Toyopearl 650M、HPLC に用いた Tsk gel G2000SW カラムは東ソー(株) (東京) の製品を、High Performance Liquid Chromatography (HPLC) に用いた Shodex PROTEIN KW-802.5 は昭和電工(株) (東京) の製品を使用した。透析に使用したセルロースチューブ 36/32 は東京硝子器械(株) (東京) の製品を使用した。

各カラムクロマトグラフィーの緩衝液として用いた酢酸およびトリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris (hydroxymethyl) amino-methane ; Tris) は富士フィルム和光純薬(株) (大阪) の特級を使用した。また HPLC、FPLC の緩衝液として用いた 30%トリメチルアミン溶液は富士フィルム和光純薬(株) (大阪) のものを使用した。

[酵素活性の測定]

基質として用いた RNA は興人ライフサイエンス(株) (東京) の Yeast RNA を使用した。Macfadyen 試薬 (0.25%酢酸ウラニルを含む、0.25%トリクロロ酢酸溶液) ⁴⁾ に用いた酢酸ウラニルは関東化学(株) (東京)、トリクロロ酢酸は富士フィルム和光純薬(株) (大阪) の生化学用を使用した。

[ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動]

ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis ; SDS-PAGE) に用いた過硫酸アンモニウム、N-N-N'-N'-テトラメチルエチレンジアミン (N,N,N',N'-Tetramethylethylene-Diamine ; TEMED)、アクリルアミドは富士フィルム和光純薬(株) (大阪) の電気泳動用を使用した。N-N'-メチレンビスアクリルアミドはナカライテスク(株) (京都) の電気泳動用を使用した。ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium Dodecyl Sulfate ; SDS) は富士フィルム和光純薬(株) (大阪) の生化学用を使用した。Tris およびグリシンは富士フィルム和光純薬(株) (大阪) の試薬特級を使用した。分子量マーカーはオリエンタル酵母工業(株) (東京) の MW-MARKER を使用した。銀染色にはコスモ・バイオ(株) (東京) の電気泳動用 2D-銀染色試薬・II を用いた。メタノール、イソプロパノールは富士フィルム和光純薬(株) (大阪) の試薬特級を使用した。

[一次構造の決定]

還元カルボキシメチル化 (reduced carboxymethylation ; RCM 化)⁴²⁾に用いた Tris、エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid ; EDTA)、モノヨード酢酸およびジチオトレイトール (dithiothreitol ; DTT) は富士フィルム和光純薬(株) (大阪) の試薬特級を、グアニジン塩酸塩は同社の生化学用を使用した。

タンパク質の消化物の分離に用いた Capcell Pak C-18 カラムは(株)大阪ソーダ (大阪) の製品を使用した。アセトニトリルは関東化学(株) (東京) の液体クロマトグラフィー用を使用した。*Achromobacter Lyticus* 由来のリシルエンドペプチダーゼは富士フィルム和光純薬(株) (大阪) の生化学用を使用した。

[ブロッティング]

ブロッティングに使用した Tris、メタノールは富士フィルム和光純薬(株) (大阪) の試薬特級を、6-アミノヘキサン酸は関東化学(株) (東京) の試薬特級を使用した。クマシー染色に用いたクマシーブリリアントブルー-G-25 は MERCK KGaA (Darmstadt, Germany) のものを、メタノール、酢酸は富士フィルム和光純薬(株) (大阪) の試薬特級を使用した。

[エドマン分解]

プロテインシーケンサーに使用したトリフルオロ酢酸 (Trifluoroacetic Acid ; TFA) は富士フィルム和光純薬(株) (大阪) のアミノ酸配列分析用を、メタノールは関東化学(株) (東京) の液体クロマトグラフィー用を、その他の試薬はサーモフィッシャーサイエンティフィック(株) (東京) の Procise Protein Sequencing kit を使用した。ペプチドの脱塩、濃縮に用いた Pro Sorb™ は PERKIN ELMER 社 (MA, USA) のものを使用した。

[アミノ酸分析]

アミノ酸分析で使用したイソチオシアン酸フェニル (Phenyl Isothiocyanate ; PITC) は富士フィルム和光純薬(株) (大阪) のアミノ酸分析用を、トリエチルアミン、ピコタグ用希釈液、酢酸ナトリウム、酢酸は同社のアミノ酸自動分析用を、6M 塩酸は同社の容量分析用を使用した。アミノ酸標準液は味の素(株)バイオ・ファイン研究所 (神奈川) の製品を使用した。Pico Tag™ カラム (0.4×150 mm) は日本ウォーターズ(株) (東京) の製品を使用した。

[DNA 塩基配列の決定]

試薬の調製に用いた Tris は富士フィルム和光純薬(株) (大阪) の生化学用を使用した。酢酸、ホウ酸、EDTA・2Na は同社の試薬特級を使用した。

培地の調製に用いた Tryptone Peptone、Bact Yeast Extract、Bacto Agar は Difco 社 (NJ、USA) のものを使用した。ampicillin は Meiji Seika ファルマ(株) (東京) のものを使用した。

2. 酵素の精製

特に断りのない限り、全精製過程は 4 °Cで行った。

ホモジナイズは、(株)日本精機製作所 (東京) AM10 ホモジナイザーを使用した。遠心分離器は、(株)久保田製作所 (東京) KR-2000 と(株)日立製作所 (東京) himac CR21 を使用した。高速液体クロマトグラフィーは(株)島津製作所 (京都) の HPLC 6A を使用した。

3. タンパク質の定量

タンパク質の定量は 280 nm における吸光度 (A_{280 nm}) の測定により行った。精製した RNase Aa のタンパク質量は 280 nm における吸光度が 2.33 を与える濃度を 1 mg/mL (0.1%) 溶液として換算した。

4. 酵素活性の測定

酵素活性は以下の方法で測定した。2.5 mg の RNA を含む 1 mL 0.05M 酢酸緩衝液 1 mL を 37 °Cで 5 分間予温し、試料 (酵素溶液) 5-100 µL を加え、37 °Cで 5-30 分間反応させる。反応後に Macfadyen 試薬⁴¹⁾ 0.5 mL を加えて反応を停止し、3,000 rpm で 5 分間遠心分離後、上清液 0.3 mL を 2.0 mL の精製水で希釈し、260 nm の吸光度を測定し酸可溶性 RNA 量とした。酵素を加えない対照を空試験値とした。酵素単位は上記条件で 5 分間反応後、遠心上清液の 11 倍希釈溶液の 260 nm における吸光度が 1.0 増加する値を 1 酵素単位 (unit) とした。

5. SDS-PAGE⁴³⁾

電気泳動装置は、アトー(株) (東京) のミニスラブ電気泳動装置を使用した。

SDS-PAGE は 12.5%のポリアクリルアミドゲルを使用してゲル (9×9 cm) あたり 15 mA の電流を流して泳動を行った。添加試料の変性は 1% SDS、10%グリセリンを含む試料を調製し、沸騰水浴中で 3 分間熱処理することにより行った。タンパク質の染色はコスモ・バイオ(株) (東京) の電気泳動用 2D-銀染色試薬・IIにより行った。分子量の測定は標準タンパク質として分子量マーカー (12,400-74,000) を使用した。活性染色は、Blank らの方法⁴⁴⁾によって行った。SDS-PAGE 後ゲルを 6.25%イソプロパノール中で振とうして SDS を除去したのち、0.01 M Tris 緩衝液 pH 7.5 で振とうしてイソプロパノールを除去した。0.1 M 酢酸緩衝液 pH 5.0 で振とう後、pH 5.0 の条件で 1 mg/mL の RNA を基質として 37°Cで 1 時間反応させた後、0.25%トルイジンブルーでゲル中の RNA を染色して行った。

6. 至適 pH

至適 pH を求めるために、pH 3.0-6.0 は 0.1 M 酢酸緩衝液、pH 6.0-8.0 は 0.1 M Tris 緩衝液を用いた。各 pH の 0.25% RNA 溶液を基質として常法により酵素活性を測定し、最大活性を示した活性値を 100 として相対活性を求め pH に対してプロットした。

7. 至適温度

0.25% RNA (pH 5.0) を基質として 20-80 °C の各温度で 5 分間プレインキュベートした基質溶液に酵素を加え常法に従い酵素活性を測定し、最大活性を示した活性値を 100% として相対活性を求め温度に対してプロットした。

8. 2 価金属の影響

各種 2 価金属イオンおよび EDTA を 1 mM 含有する 0.25% RNA (pH 5.0) を調製し、これに酵素を加え常法に従って活性を測定した。金属イオンを加えてないときの RNase 活性を 100% として各々の相対活性を求めた。

9. RNA の加水分解物の定量 (基質特異性)

0.25% RNA を基質としてこれを 37 °C で 5 分間プレインキュベートしたのち、酵素を加え 37 °C で反応を行った。3、6、9、24 時間後に反応液を採取し、ただちに Macfadyen 試薬⁴¹⁾を加え攪拌後、氷冷した。これを 3,000 rpm で 5 分間遠心分離し上清を分取した。これに 0.1 mol/L NaOH を加えて中和し、分析用試料とした。この分解物を、あらかじめ 15% アセトニトリルを含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 5.0) で平衡化した TSK-gel CARBON 500 カラムに吸着させ、50% アセトニトリルを含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 5.0) との濃度勾配により溶出し、260 nm における吸光度で検出した。標準物質として 50 µg/mL 溶液の、2',3'-cGMP、2',3'-cAMP、2',3'-cUMP、2',3'-cCMP、3'-GMP、3'-AMP、3'-UMP、3'-CMP を用いた。

10. 円偏光二色性 (circular dichroism ; CD) スペクトル⁴⁵⁾

RNase Aa の CD スペクトルは日本分光株式会社 (東京) の J-600 スペクトルポラリメーターを使用し、25 °C で測定した。320 nm-250 nm の長波長は 1 cm セルを 250 nm-200 nm の短波長は 0.1 cm セルを使用した。測定に使用したタンパク質濃度は 5.16 µM であった。

11. 一次構造の決定

[還元カルボキシメチル化 (RCM 化)]

RNase Aa の還元カルボキシメチル化は Crestfield らの方法⁴²⁾により行った。試料タンパク 1 mg に 1.5 M Tris-HCl (pH 8.5)、7 M グアニジン塩酸、0.1 M EDTA、40 mM DTT を加え全量 0.8 mL とし 37 °C で 3 時間還元後、0.067 μ mol モノヨード酢酸を加えて遮光下で 30 分間反応させて行った。反応後、Superdex G-75 を用いた FPLC ゲル濾過により脱塩および過剰の試薬を除いた。

[リシルエンドペプチダーゼによる消化]

リシルエンドペプチダーゼによる消化は 0.1 M トリメチルアミン-酢酸緩衝液 (pH 8.0) 中でリシルエンドペプチダーゼを 1:300 になるように加え、37 °C で 4 時間反応させた。

[リシルエンドペプチダーゼ消化ペプチドの逆相 HPLC による分画]

リシルエンドペプチダーゼ消化ペプチドの逆相 HPLC による分画は、Capcell Pak C18 カラム (10×250 mm) を用いた。

Capcell Pak C18 はあらかじめ 40 mM トリメチルアミン-酢酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化したものを用いた。溶出は、0-70 分で 0-30%、70-210 分で 30-60%、210-240 分で 60-80%、240-250 分で 80-100% アセトニトリルの濃度勾配の条件で行った。流速は 2 mL/min で 1 mL ずつ分取した。

12. ブロットニング

ブロットニングにはアトー株 (東京) のセミドライ式のホライズブロット、クリアブロット・P 膜TM、アブソorbentペーパーを使用した。

定電圧 100V で約 2 時間電気泳動後、常法にしたがってブロットニングを行った。ブロットニング後の膜の染色にはコマシー・ブリリアント・ブルー G-250 を用いた。

13. エドマン分解

サーモフィッシャーサイエンティフィック株 (東京) の 490 Procise Protein Sequencing System の Procise492 プロテインシークエンサーを使用した。プロテアーゼ消化によって得られたペプチドを、自動エドマン分解して各ペプチドのアミノ酸配列を決定した。

14. アミノ酸分析

アミノ酸分析には、日本ウォーターズ(株) (東京) の Pico Tag™ アミノ酸分析器を使用した。10 µg のタンパク質を使用して、1%フェノールを含む 6M HCl 中、110 °C で 22 時間加水分解し、その後 Bidlingmeyer らの Pico Tag™ アミノ酸分析システムを用いた方法⁴⁶⁾により行った。フェニルチオカルバモイルアミノ酸は 0.14 M 酢酸緩衝液 (pH 6.4) : アセトニトリル=940 : 60 で平衡化した Pico Tag™ カラム (0.4×150 mm) を用いた逆相 HPLC により分離し、60%アセトニトリル溶液との concave 濃度勾配で溶出した。

15. 糖の定量

中性糖の定量は 4 M トリフルオロ酢酸中で 100 °C、4 時間加水分解後に Shimpack ISA-07/S2506 カラムを用いて行った

16. RNase Aa をコードする cDNA 塩基配列の決定

[試薬および培地の調製]

塩基配列の決定に用いた試薬および培地の調製法 (1 L) を以下に示す。

50×TAE : Tris 242 g、酢酸 57.1 mL、EDTA・2Na 7.43 g

50×TBE : Tris 108 g、ホウ酸 55g EDTA・2Na 7.43g

LB 液体培地 : Tryptone Peptone 10 g、Bact Yeast Extract 5 g、NaCl 10 g

LB 固形培地 : Tryptone Peptone 10 g、Bact Yeast Extract 5 g、NaCl 10 g、
Bacto Agar 10 g

LA 培地 : オートクレーブで高圧蒸気滅菌した LB 固形培地に、ampicillin
(100 µg/mL) を添加して調製した。

2×YT 液体培地 : Tryptone Peptone 16 g、Bact Yeast Extract 10 g、NaCl 5 g

SOC 液体培地 : Tryptone Peptone 20 g、Bact Yeast Extract 5 g、NaCl 0.5 g、
250 mM KCl 10 mL

滅菌後に 2 mM MgCl₂ (5 mL) と 1 M ブドウ糖液 (20 mL) を
添加して調整した。

[オリゴヌクレオチドの塩基配列]

RNase Aa をコードする cDNA の塩基配列は RT-PCR 法、3'-RACE 法および 5'-RACE 法により決定した。使用したオリゴヌクレオチドの配列を Table 2 に示す。

Table 2 PCR primers

Name	Sequence (5' - 3')
AAP	GGCCACGCGTCGACTAAGTACGGGIIGGIIGGGIIG
Aa-79R	CCCAAAAGCTATCATAGGTACTGCCTGA
HIK-18VN	ATGGTAGCCTGCGATTAGACTCTCACGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN
Aa-33F	GAYTGGACNGTNCAYGGNACNTGGCC
Aa-84R	TGYTTRTCCCAYTCRTGNGCCA
Aa-42F	GACAAAGATTGGAAGTGAAGGACCTACC
HIK-ad1	ATGGTAGCCTGAGATTAGACTCTCA
Aa-79F	TCAGGCAGTACCTATGATAGCTTTTGGG

I: inosine ; N: A, C, G, T ; R: A, G ; Y: C, T ; V: C, G, T

[RNA の抽出]

キヒトデ管足の Total RNA は TRIZOL™ Reagent (サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)、東京) を使用して抽出した。粉砕して -80 °C に保存したキヒトデ管足約 0.1 g に TRIZOL 溶液 1 mL を加えて激しく振とうし、室温で 5 分間静置した。これに 0.2 mL のクロロホルムを加え 15 秒間激しく振とうし、15,000 rpm で 15 分間遠心した上清 0.5 mL に 0.5 mL イソプロピルアルコールを加え、室温で 10 分間静置させた後 15,000 rpm で 10 分間遠心した。得られた沈澱を 75%エタノールで洗浄後、ジエチルピロカーボネート (Diethylpyrocarbonate ; DEPC) 処理水 10-20 µL で溶解し、Total RNA 溶液とした。

[RT-PCR 法]

得られた Total RNA を用いて逆転写酵素 M-MuLV Reverse Transcriptase による cDNA 合成反応を行った。Total RNA (1-5 µg) に Oligo dT-Adaptor プライマー (HIK-18VN) を加え、70 °C で 2-10 分インキュベートした後、氷上に 1 分間静置した。軽く遠心した後、付属の RT buffer、dNTP、RNase inhibitor を添加し、逆転写酵素 (M-MuLV Reverse Transcriptase) を 1 µL (約 10 units) 加えて 37 °C で 1 時間反応し 1st strand cDNA を合成した。

合成された 1st strand cDNA を用いて RNase Aa をコードする cDNA のクローニングを行った。RT-PCR には、RNase Aa のエドマン分解により決定した部分配列にしたがって設計した混合塩基を含むプライマー (Aa-33F および Aa-84R) を使用し、Taq ポリメラーゼは Ex Taq™ (タカラバイオ(株)、滋賀) を使用した。合成した 1st strand cDNA を鋳型にして RT-PCR を行った。

[PCR 産物の TA クローニング]

PCR 産物を 1.2-1.4%アガロースゲルで電気泳動し、目的の DNA を切り出して The GENE CLEAN II[®]KIT (株エムピーバイオジャパン、東京) を用いて抽出し、クローニングを行った。cDNA のクローニングはプロメガ株 (東京) の pGEM[®]-T Easy Vector Systems を用いて、マニュアルに従って行った。

[プラスミドの精製]

形質転換した大腸菌 (Top10) を X-gal を塗抹した LA 培地でカラーセレクションによりスクリーニングし、目的のクローンを含む白いコロニーを 2×YT 液体培地に移植して一晩培養し、プラスミドの精製には Quantum Prep[®] (バイオ・ラッド ラボラトリーズ株、東京) を使用して、マニュアルに従って行った。

[cDNA 塩基配列の解析]

cDNA 塩基配列は DNA シークエンサー (dNA Analyzer GENE READ IR 4200、LI-COR 社、NE、USA) を用いて決定した。ゲルの作成は、PAGE-PLUS CONCENTRATE (コスモ・バイオ株、東京)、尿素、APS、TEMED を用いて行った。赤外標識プライマーは M13 Reverse IRD800、T7 Forward IRD800 及び T7 terminator (LI-COR 社、NE、USA) を用い、ラベル反応は Thermo Sequenase cycle sequencing キット (Cytiva、東京) を使用してマニュアルに従って行った。

[3'-RACE 法]

RT-PCR の解析結果より決定した RNase Aa の cDNA の塩基配列の一部をもとにして Aa-42F プライマーを設計し、これとアダプタープライマー (HIK-ad1) により 3'-RACE 法を行った。得られた PCR 産物について前述の方法でシークエンス解析を行い、RNase Aa の 3'側の塩基配列を決定した。

[5'-RACE 法]

RNase Aa の cDNA の 5'側上流の塩基配列は 5'-RACE 法により決定した。5'-RACE 法は 5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (サーモフィッシャーサイエンティフィック株、東京) を用い、マニュアルに従って行った。プライマーは 3'-RACE 法で決定した配列をもとに作成した Aa-79R を使用した。合成した 1st strand cDNA の 3'末端にターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) を用いてヌクレオチドホモポリマー (dC ポリマー) を付加しアンカー配列とした。このアンカー配列に相補的なヌクレオチドポリマーを 3'末端に持つアダプタープライマー (AAP) と Aa-75R プライマーにより PCR を行い 5'側の塩基配列を決定した。

第3節 結果

3-1. RNase Aa の精製法

[RNase Aa の精製]

北海道厚岸産キヒトデの生殖器 1 kg (湿重量) を出発原料として硫酸抽出後、硫酸分画し各種カラムクロマトグラフィーを組み合わせる RNase Aa を精製した。精製法の概略を Fig. 2 に示す。

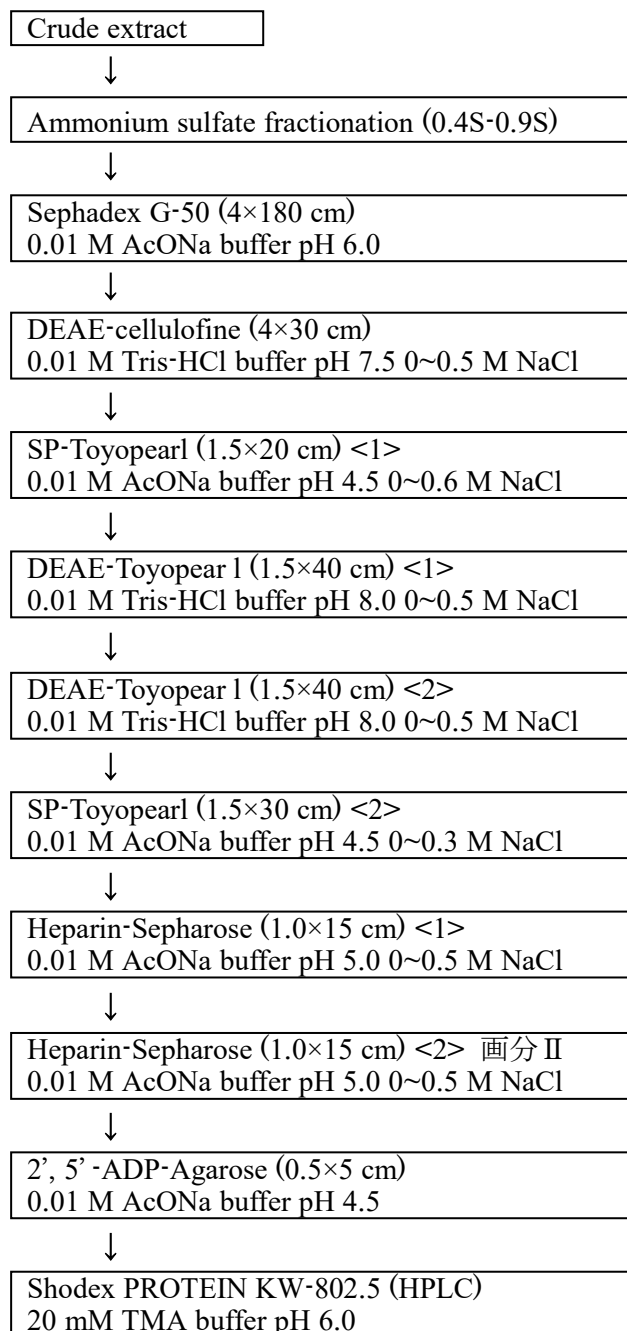


Fig. 2 Schematic diagram of purification of RNase Aa from the gonad of *Asterias amurensis*

(1) 粗抽出

キヒトデの生殖器約 1 kg に当量の 0.25 mol/L-H₂SO₄ を加えてホモジナイズした。この際、全量を 3 回に分けてホモジナイズを行った。ホモジナイズは氷冷しながら 10,000 rpm で 1 分間行った後に 30 秒間間隔をあけるというサイクルを 3 回繰り返した。これを 12,000 rpm で 30 分間遠心分離し、得られた上清を pH 6.0 に合わせて粗抽出液とした。また遠心分離で得られた沈殿約 300 g に当量の 0.25 mol/L-H₂SO₄ を加え、再度ホモジナイズし得られた上清も合わせて粗抽出液とした。

(2) 硫酸分画 (0.4S-0.9S)

粗抽出液を氷冷しながら、最終濃度が 40%飽和になるように硫酸アンモニウムを 30 分かけて加え、さらに 30 分間攪拌した。これを 12,000 rpm で 30 分間遠心分離し、その上清を分取し 0.4S 硫酸分画とした。この上清にさらに最終濃度が 90%飽和になるように硫酸アンモニウムを 30 分間かけて加え、4 °Cで一晩かけて攪拌した。これを 12,000 rpm で 30 分間遠心分離し、沈殿を最少量の 0.01 M 酢酸緩衝液 pH 6.0 に溶解し、これを 0.9S 硫酸分画とした。

(3) Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィー

0.9S 硫酸分画を、あらかじめ 0.01 M 酢酸緩衝液 pH 6.0 で平衡化した Sephadex G-50 カラム (4×180 cm) に添加し、同緩衝液で溶出して、脱塩を行った。溶出液は 19 mL ずつ分取した。溶出パターンを Fig. 3 に示す。pH 5.0 で酵素活性を測定し、活性を有する画分 (No.12-92) を集め、濃縮後、精製水に対して透析を行った。以後の濃縮、透析はすべてこの方法により行った。

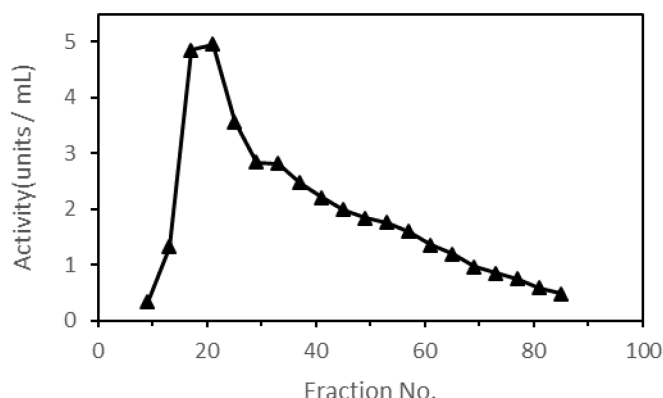


Fig. 3 Sephadex G-50 gel chromatography (pH6.0) of RNase Aa purified from ammonium sulfate fractionation (0.4S-0.9S). RNase Aa fractions (No.12-92) were pooled.

▲ ; activity(pH 5.0)

(4) DEAE-Cellulofine カラムクロマトグラフィー

Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィーで得られた RNase Aa 画分を、あらかじめ 0.01 M Tris 緩衝液 pH 7.5 で平衡化した DEAE-Cellulofine (4×30 cm) に吸着させ、同緩衝液と 0.5 M NaCl を含む同緩衝液それぞれ 1 L の直線濃度勾配で溶出し 19 mL ずつ分取した。クロマトの溶出パターンを Fig. 4 に示す。酵素活性を有する画分 (No.14-68) を集めて濃縮、透析した。

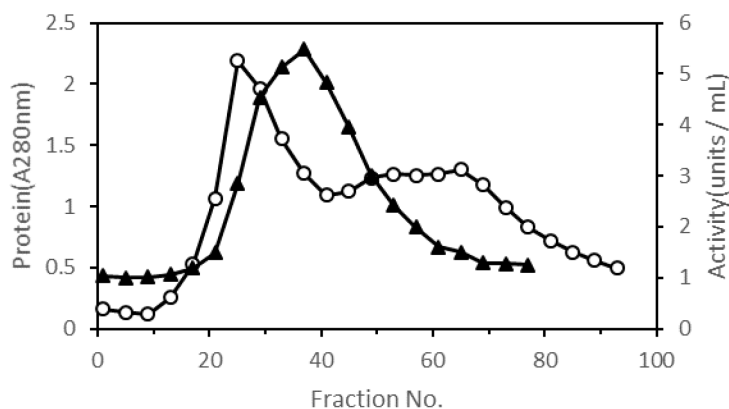


Fig. 4 DEAE-Cellulofine column chromatography (pH 7.5) of RNase Aa purified on Sephadex G-50 gel chromatography (pH 6.0).RNase Aa fractions (No.14-68) were pooled.

○— ; A280 nm , ▲— ; activity (pH 5.0)

(5) SP-Toyopearl カラムクロマトグラフィー < 1 >

DEAE-Cellulofine で得られた RNase Aa 画分を、あらかじめ 0.01 M 酢酸緩衝液 pH 4.5 で平衡化した SP-Toyopearl (1.5×20 cm) に吸着させ、同緩衝液と 0.6 M NaCl を含む同緩衝液それぞれ 0.5 L の直線濃度勾配で溶出し 120 滴ずつ分取した。クロマトの溶出パターンを Fig. 5 に示す。酵素活性を有する画分 (No.42-76) を集めて濃縮、透析した。

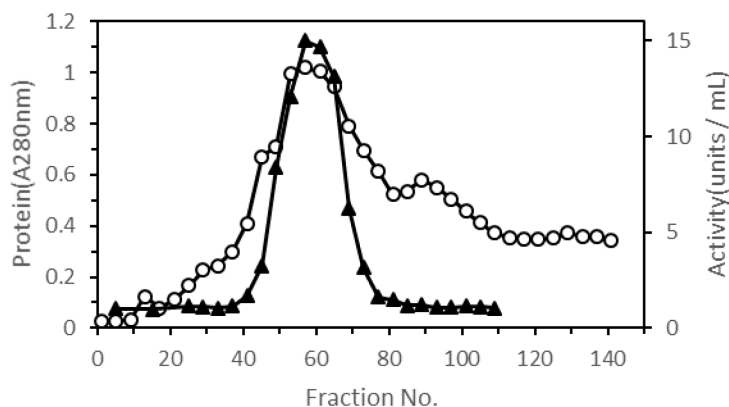


Fig. 5 SP-Toyopearl column chromatography (pH 4.5) <1> of RNase Aa purified on DEAE-Cellulofine column chromatography (pH 7.5).RNase Aa fractions (No.42-76) were pooled.

○— ; A280 nm , ▲— ; activity (pH 5.0)

(6) DEAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィー<1>

SP-Toyopearl カラムクロマト<1>で得られた RNase Aa 画分を、あらかじめ 0.01 M Tris 緩衝液 pH 8.0 で平衡化した DEAE-Toyopearl (1.5×40 cm) に吸着させ、同緩衝液と 0.5 M NaCl を含む同緩衝液それぞれ 0.4 L の直線濃度勾配で溶出し 120 滴ずつ分取した。クロマトの溶出パターンを Fig. 6 に示す。酵素活性を有する画分 (No.30-56) を集めて濃縮、透析した。

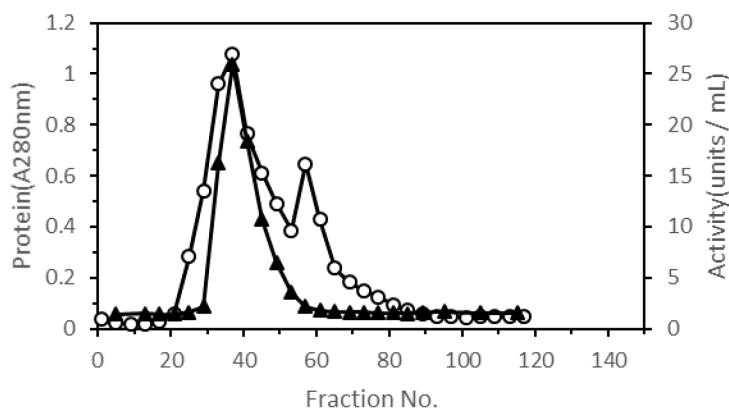


Fig. 6 DEAE-Toyopearl column chromatography (pH 8.0) <1> of RNase Aa purified on SP-Toyopearl column chromatography (pH 4.5) <1>.RNase Aa fractions (No.30-56) were pooled. ○ ; A280 nm , ▲ ; activity (pH 5.0)

(7) DEAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィー<2>

DEAE-Toyopearl カラムクロマト<1>で得た RNase Aa 画分を、あらかじめ 0.01 M Tris 緩衝液 pH 8.0 で平衡化した DEAE-Toyopearl (1.5×40 cm) に吸着させ、同緩衝液と 0.5 M NaCl を含む同緩衝液それぞれ 0.75 L の直線濃度勾配で溶出し 120 滴ずつ分取した。クロマトの溶出パターンを Fig. 7 に示す。酵素活性を pH 5.0 で測定し、活性を有する画分 (No.30-76) を集めて濃縮、透析した。

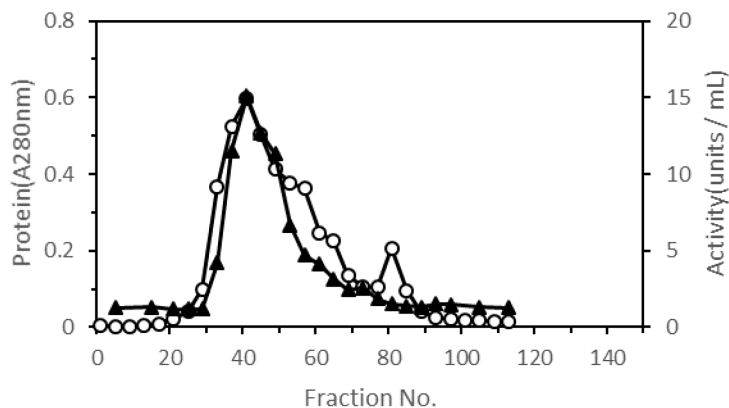


Fig. 7 DEAE-Toyopearl column chromatography (pH 8.0) <2> of RNase Aa purified on DEAE-Toyopearl column chromatography (pH 8.0) <1>.RNase Aa fractions (No.30-76) were pooled. ○ ; A280 nm , ▲ ; activity (pH 5.0)

(8) SP-Toyopearl カラムクロマトグラフィー<2>

DEAE-Toyopearl カラムクロマト<2>で得た RNase Aa 画分を、あらかじめ 0.01 M 酢酸緩衝液 pH 4.5 で平衡化した SP-Toyopearl (1.5×30 cm) に吸着させ、同緩衝液と 0.3 M NaCl を含む同緩衝液それぞれ 0.75 L の直線濃度勾配で溶出し 90 滴ずつ分取した。クロマトの溶出パターンを Fig. 8 に示す。酵素活性を有する画分 (No.122-244) を集めて濃縮、透析した。

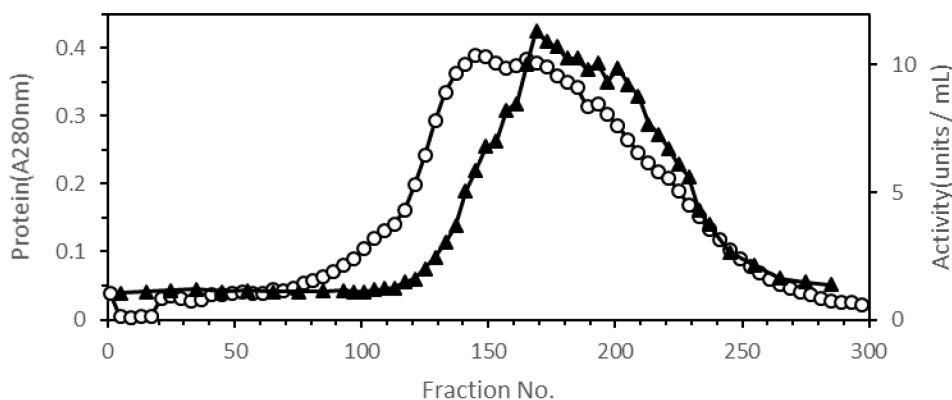


Fig. 8 SP-Toyopearl column chromatography (pH 4.5) <2> of RNase Aa purified on DEAE-Toyopearl column chromatography (pH 8.0) <2>.RNase Aa fractions (No.122-244) were pooled. \circ ; A280 nm , \blacktriangle ; activity (pH 5.0)

(9) Heparin-Sepharose CL-6B アフィニティークロマトグラフィー<1>

SP-Toyopearl カラムクロマト<2>で得た RNase Aa 画分を、あらかじめ 0.01 M 酢酸緩衝液 pH 5.0 で平衡化した Heparin-Sepharose (1.0×15 cm) に吸着させ、同緩衝液と 0.5 M NaCl を含む同緩衝液をそれぞれ 0.35 L の直線濃度勾配で溶出し 90 滴ずつ分取した。クロマトの溶出パターンを Fig. 9 に示す。酵素活性を有する画分は 2 つに分かれて溶出された。画分 I (No.10-42)、画分 II (No.43-108) として別々に集め、画分 I は -20 °C で凍結保存し、画分 II を濃縮、透析した。これ以降の精製は画分 II を用いて行った。

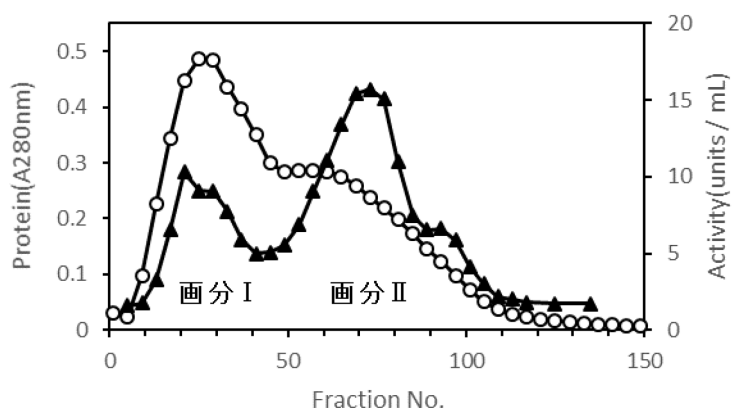


Fig. 9 Heparin-Sepharose affinity chromatography (pH 5.0) <1> of RNase Aa purified on SP-Toyopearl column chromatography (pH 4.5) <2>.RNase Aa- I fractions (No.10-42) were pooled. And RNase Aa- II fractions(No.43-108) were pooled. \circ A280 nm, \blacktriangle activity (pH 5.0)

(10) Heparin-Sepharose CL-6B アフィニティークロマトグラフィー<2>

Heparin-Sepharose<1>で得た活性を有する RNase Aa 画分 II を同条件で再度 Heparin-Sepharose CL-6B によるアフィニティークロマトグラフィーを行った。クロマトの溶出パターンを Fig. 10 に示す。酵素活性を pH 5.0 で測定し、活性を有する画分 (No.50-104) を集めて濃縮、透析した。

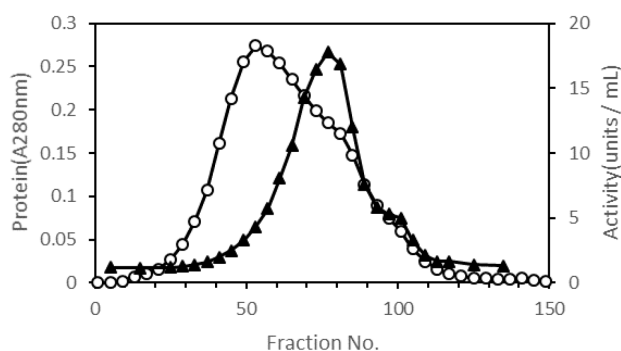


Fig. 10 Heparin-Sepharose affinity chromatography (pH 5.0) <2> of RNase Aa purified on Heparin-Sepharose affinity chromatography (pH 5.0) <1>. RNase Aa fractions (No.50-104) were pooled. \circ ; A280 nm, \blacktriangle ; activity (pH 5.0)

(11) 2',5'-ADP-agarose アフィニティークロマトグラフィー

Heparin-Sepharose カラムクロマトグラフィー<2>で得た RNase Aa 画分をあらかじめ 0.01 M 酢酸緩衝液 pH 4.5 で平衡化した 2',5'-ADP-agarose (0.5×5 cm) に添加し、未吸着画分を 30 滴ずつ分取した。酵素活性を有する画分 (No.4-44) を集めて濃縮、透析した。

(12) Shodex PROTEIN KW-802.5 ゲルクロマトグラフィー (HPLC)

2',5'-ADP-agarose アフィニティークロマトグラフィーで得た RNase Aa 画分を 1 mL 以下になるまで濃縮し、あらかじめ 20 mM トリメチルアミン-酢酸緩衝液 pH 6.0 で平衡化した Shodex カラムに添加した。一回の添加量は 200 μ L、流速 0.5 mL/min でゲルろ過を行い、0.5 mL ずつ分取した。結果を Fig. 11 に示す。

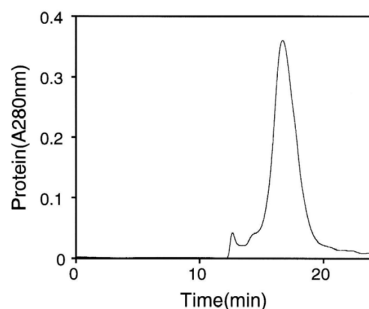


Fig. 11 Shodex gel chromatography of RNase Aa purified on 2',5'-ADP-agarose affinity chromatography (pH 4.5). — ; A280 nm

RNase Aa の精製過程での収率、比活性を Table 3 に示す。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 が得られ、収率は 8.5%であった。本酵素 1 mg 当たりの比活性は 789 units/mg であった。

Table 3 Purification of RNase Aa from starfish ovary (1 kg)

Steps	Total activity (units)	Total Protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)
Crude extract	8,310	5,670	1.5	100
Ammonium sulfate fractionation (0.4S-0.9S)	6,700	4,140	1.6	81
Sephadex G-50 (pH 6.0)	2,110	836	2.5	25
DEAE-cellulofine (pH 7.5)	1,760	613	2.9	21
SP-Toyopearl (pH 4.5) <1>	1,950	123	16	23
DEAE-Toyopearl (pH 8.0) <1>	1,330	79	17	16
DEAE-Toyopearl (pH 8.0) <2>	1,940	49	40	23
SP-Toyopearl (pH 4.5) <2>	1,630	26	63	20
Heparin-Sepharose (pH 5.0) <2>	870	4.3	202	10
2',5'-ADP-Agarose (pH 4.5)	730	1.1	664	8.7
Shodex Protein KW-802.5	710	0.9	789	8.5

[精製標品の均一性]

RNase Aa の精製標品の均一性を SDS-PAGE⁴³⁾により検討した。結果を Fig. 12 に示す。

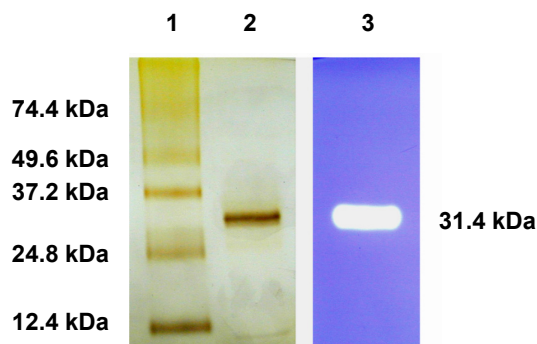


Fig. 12 SDS-PAGE of RNase Aa on slab gel

1. Standard protein (74.4 kDa, 49.6 kDa, 37.2 kDa, 24.8 kDa and 12.4 kDa)
2. Silver staining of purified RNase Aa
3. Activity staining of purified RNase Aa

RNase Aa を非還元条件下で 12.5%ゲルを用いて SDS-PAGE⁴³⁾による電気泳動を行い、銀染色によりタンパク質を検出したところ、単一のバンドを形成した (レーン 2)。同時に SDS-PAGE を行ったゲルを Blank らの方法⁴⁴⁾により、pH 5.0 の条件で RNA を基質として活性染色を行ったところ、単一のバンドを形成し (レーン 3)、その移動度はタンパク質の移動度と一致した。このことから、得られた精製標品は電気泳動的に均一であることが分かった。RNase Aa の見かけの分子量は 31,400 であった。

3-2. RNase Aa の諸性質

[至適 pH]

RNA を基質として pH の活性におよぼす影響を pH 3.0-8.0 にわたり測定した。結果を Fig. 13 に示す。RNase Aa の RNA 分解活性は pH 5.0 で最大活性を示し、pH 7.0 以上および pH 4.0 以下ではほとんど活性を示さなかった。

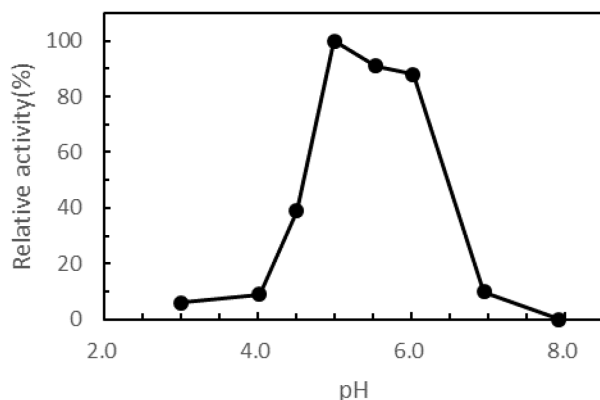


Fig. 13 Optimum pH of RNase Aa

The enzymatic activity was determined as described in the materials methods using RNA as a substrate. The buffers (0.05 M) used were acetate buffer for pH 3.0-6.0, Tris-HCl buffer for pH 6.0-8.0.

[至適温度]

RNA を基質として温度の活性におよぼす影響を 20 °C-80 °C にわたり測定した。結果を Fig. 14 に示す。RNase Aa の RNA 分解活性は 50 °C で最大活性を示し、65 °C 以上および 30 °C 以下ではほとんど活性を示さなかった。

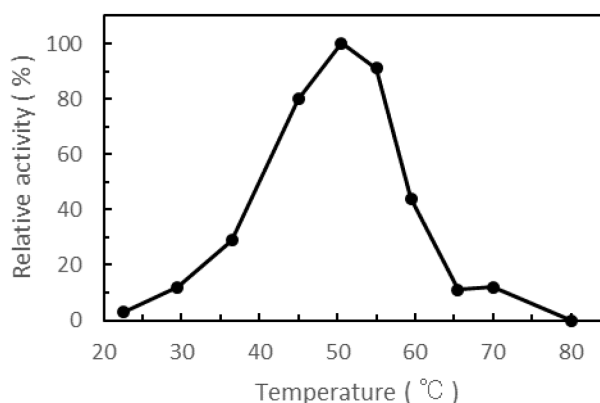


Fig. 14 Optimum temperature of RNase Aa

The enzymatic activity was determined as described in the text using RNA as a substrate at pH 5.0.

[2 価金属による影響]

2 価金属イオンおよび EDTA の活性におよぼす影響について検討するために RNA を基質として各金属または EDTA を 1 mM 共存させて pH 5.0 の条件下で RNA 分解活性を測定した。結果を Table 4 に示す。

RNase Aa は Cu^{2+} で残存活性 11% と最も活性阻害を受け、 Zn^{2+} で若干阻害を受けるがその他の 2 価金属イオンではほとんど阻害も賦活化も受けなかった。また、EDTA が共存しても活性に影響がなかったことから本酵素は金属酵素ではないことが明らかとなった。

Table 4 Effect of divalent cations and EDTA on the enzymatic activity of RNase Aa

Metal	Activity (%)	Metal	Activity (%)
None	100	Fe^{2+}	84
EDTA	94	Ni^{2+}	60
Hg^{2+}	94	Mg^{2+}	99
Zn^{2+}	45	Cd^{2+}	78
Cu^{2+}	11	Sn^{2+}	100
Ca^{2+}	96	Sr^{2+}	100
Ba^{2+}	97	Pb^{2+}	86

[基質特異性]

RNase Aa で RNA を加水分解した時の消化生成物を経時的に TSK-gel CARBON-500 (4.6×10 cm) を用いた HPLC で分析して、遊離するモノヌクレオチドの定量を行った。結果を Fig. 15 に示す。本酵素は RNA を分解して 3'-グアニル酸 (GMP)、3'-アデニル酸 (AMP)、3'-ウリジル酸 (UMP) の順に 3 種の 3'-モノヌクレオチドを遊離した [GMP ≧ AMP > UMP]。また、3'-シチジル酸 (CMP) についてはほとんど遊離しなかった。

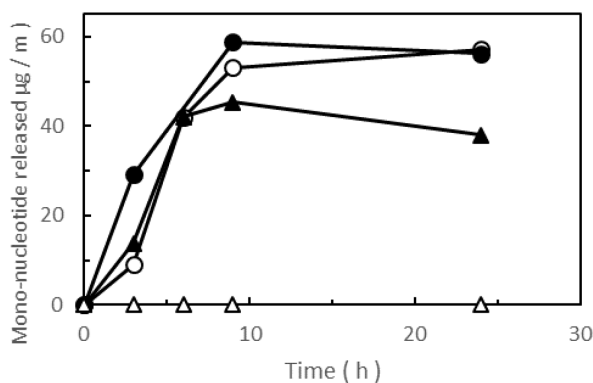


Fig. 15 Base specificity of RNase Aa

Release of nucleotides after the digestion of RNA with RNase Aa. The hydrolysis and separations conditions are described in the materials and methods, section 'Base specificity and amino acid sequence analysis' ○; AMP, ●; GMP, ▲; UMP, △; CMP

[CD スペクトル] ⁴⁵⁾

RNase T2 ファミリーに属する酵素の特徴として、トリプトファン残基の存在により 283 nm、292 nm の各波長で鋭いピークを持つ CD スペクトルを与えることが知られている。また、 α -ヘリックス、 β 構造などの増減により 200-230 nm 付近に三角形や台形などの負のスペクトルを与えることも特徴の一つである。そこで本酵素の高次構造に関する情報を得るために RNase Aa の 5.16 mM 溶液を用い、200-250 nm の短波長領域および 250-320 nm の長波長領域における CD スペクトルを pH 6.0 の条件下で測定し、真正粘菌由来の RNase Phyb ²⁰⁾ と比較した。結果を Fig. 16 に示す。

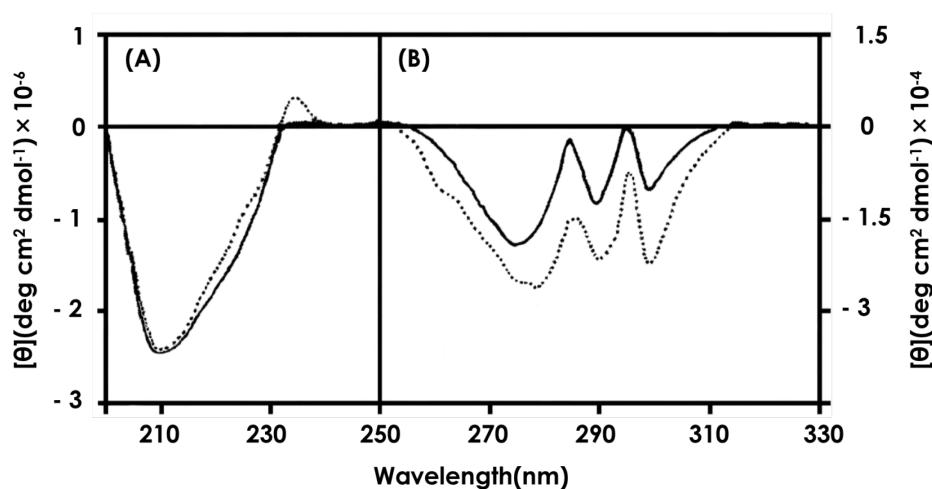


Fig. 16 CD spectra of RNase Aa and RNase Phyb²⁰⁾ at pH 5.0

(A) CD spectra in the short (200-250 nm) and (B) long (250-310 nm) wavelength regions. The solid line shows the CD spectra of RNase Aa and the dashed line shows the CD spectra of RNase Phyb. The experimental conditions are described in the text.

本酵素は他の T2 ファミリー酵素と同様に 285 nm、295 nm に山をもち、275 nm、291 nm、301 nm に谷をもつ T2 ファミリーに特徴的なスペクトルを与えた。したがって本酵素の有する芳香族アミノ酸の立体的環境は他の RNase T2 ファミリー酵素のそれと同じであると推測される。一方、タンパク質の骨格構造に反映する短波長側では本酵素は α -ヘリックスや β 構造などの高次構造が少ない真正粘菌由来の RNase Phyb ²⁰⁾ に近いスペクトルを与えた。

RNase Aa は SDS-PAGE から推定したみかけの分子量は約 31,400、至適 pH は 5.0 である。これは分子量 2-3 万、至適 pH 5.0-6.0 という RNase T2 ファミリー酵素の特徴と一致している。また RNA 加水分解反応において遊離するモノヌクレオチドの順番が GMP \geq AMP > UMP という結果も、プリン塩基性を示す T2 ファミリー酵素の特徴と一致する。一方、RNase Aa は T2 ファミリーに特徴的な CD スペクトルを与える。従って、今回キヒトデの生殖器から精製した RNase Aa は RNase T2 ファミリーに属する酵素の諸性質とよく一致することから T2 ファミリー酵素であると推定された。

3-3. RNase Aa の蛋白化学的手法による一次構造の決定

RNase Aa を直接エドマン分解したところ、2 つの Minor 配列 AIPDWDYLLF VVQWPESF (Native RNase Aa-1)、RTAYYEP (Native RNase Aa-3) と 1 つの Major 配列 GDQKCIIPSG (Native RNase Aa-2) が検出された (Fig. 17)。そこで Native RNase Aa について還元下で SDS-PAGE を行ったところ、非還元下のバンドに比べて低分子側に複数のバンドが検出された (Fig. 18)。また Native RNase Aa を RCM 化⁴²⁾したのち、Superdex 75HR を用いた FPLC でゲルろ過したところ、少なくとも 2 つの画分 (RCM-Aa-1、RCM-Aa-2) が溶出された (Fig. 19)。各画分についてアミノ酸配列を決定したところ、RCM-Aa-1 は Native RNase Aa-2 と、RCM-Aa-2 は Native RNase Aa-3 と同じ配列であった (Fig. 17)。したがって、Native RNase Aa は複数のポリペプチド鎖がジスルフィド結合で結合していると考えられる。RCM-Aa-1 画分をさらにリシルエンドペプチダーゼで消化したところ、L-1~L-6 の 6 つのペプチドが得られたため、この各々のアミノ酸配列を決定した (Fig. 17)。L-1、L-3、L-4 ペプチドのアミノ酸配列の中には T2 ファミリー RNase が共通して保存している 2 つの CAS 領域^{1, 39, 40)}の配列が保存されており、構造面からも RNase Aa が T2 ファミリーに属することが確かめられた。

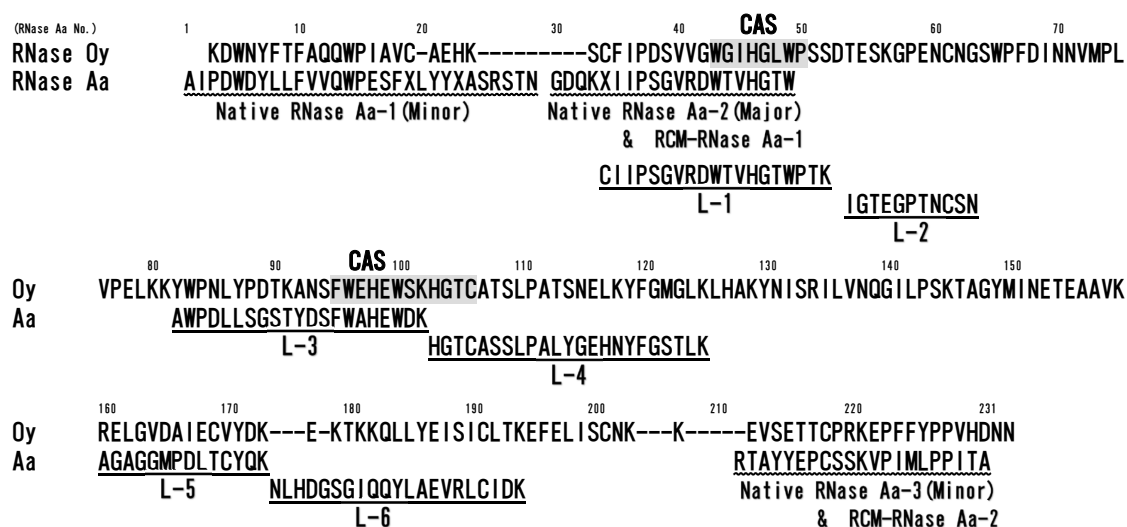


Fig. 17 Partial Amino Acid Sequence of RNase Aa from *Asterias amurens*

Partial amino acid sequence of RNase Aa are arranged according to amino acid sequence of RNase Oy²⁴⁾.

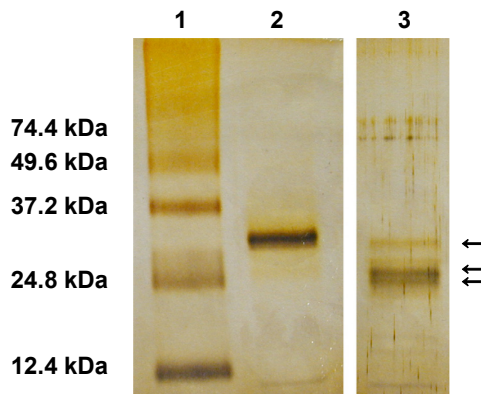


Fig. 18 SDS-PAGE on slab gel of RNase Aa
 1. Standard protein (74.4 kDa, 49.6 kDa, 37.2 kDa, 24.8 kDa and 12.4 kDa)
 2. Silver staining of purified RNase Aa
 3. Silver staining of purified RNase Aa treated with mercaptoethanol

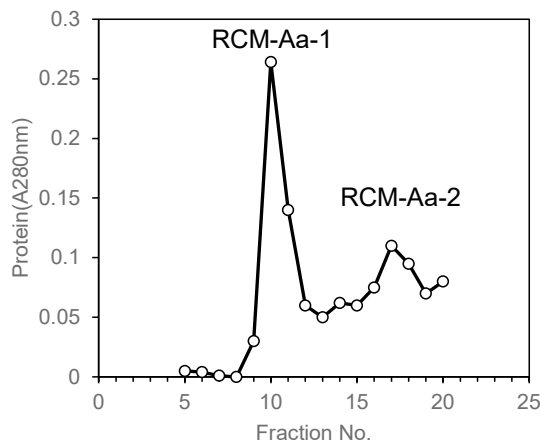


Fig. 19 Gel filtration on Superdex 75 10/30 column of reduced and S-carboxymethylated RNase Aa. —○— ; A280 nm

精製標品の収量が少ないことから蛋白化学的手法で得られた一次構造についての知見は以上であった。そこで全一次構造を決定するために、RNase Aa の cDNA を合成しその塩基配列を決定することにより未知部分のアミノ酸配列に関する知見を得ることとした。

3-4. RNase Aa の cDNA 塩基配列の決定

蛋白化学的手法によって得られた RNase Aa の部分配列を基に混合塩基プライマー (Aa-33F および Aa-84R) を設計し RT-PCR を行った後、3'-RACE 法および 5'-RACE 法を行った。この塩基配列よりコードするアミノ酸配列を推定した (LC034810 ; Fig. 20)。

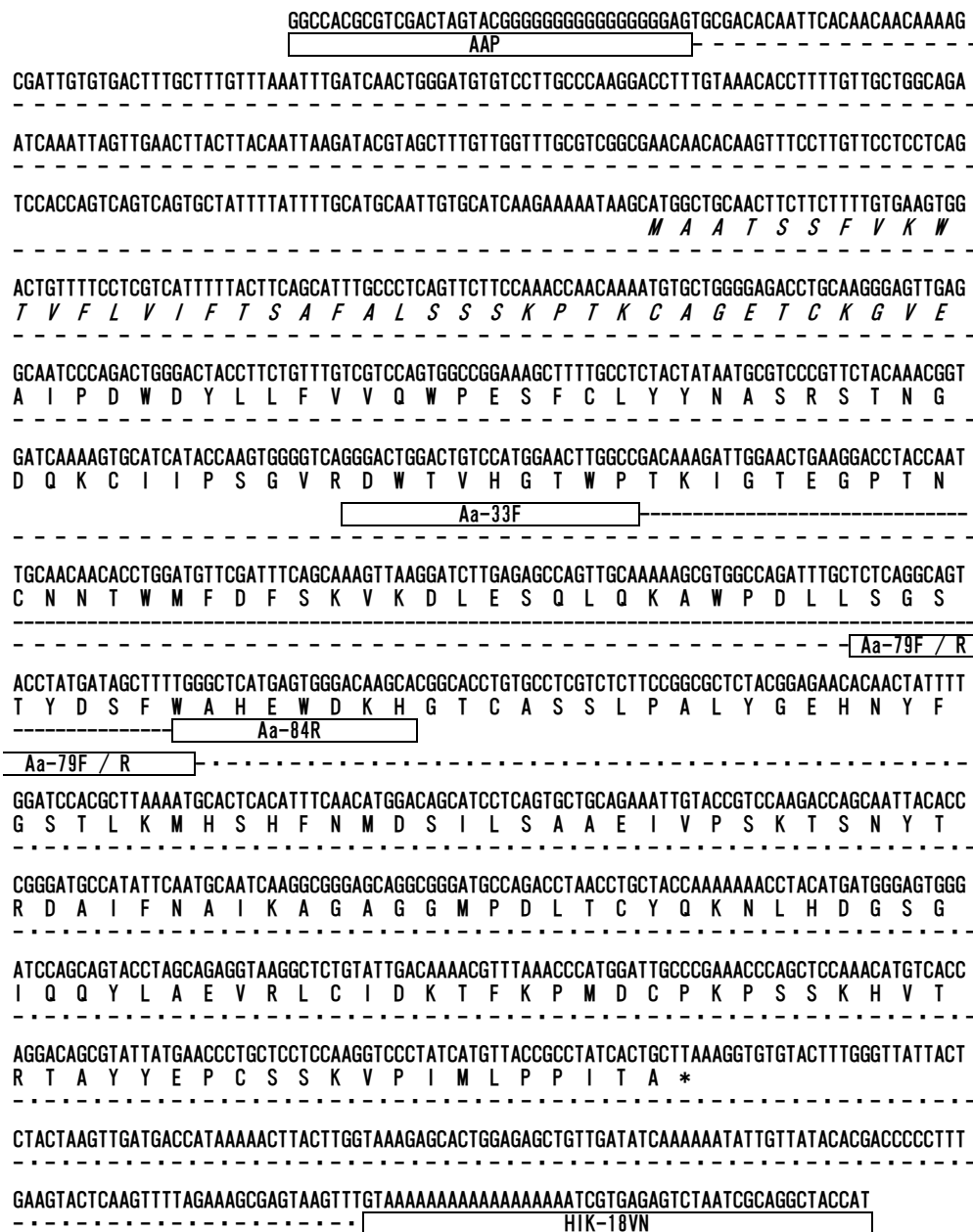


Fig. 20 Nucleotide sequence of the cDNA of RNase Aa and strategy for nucleotides sequence analysis of cDNA encoding RNase Aa

The amino acid sequence deduced from the cDNA sequence is shown under the nucleotide sequence. The amino acid sequence numbering starts with the N-terminus Ala. The primers and adapters are boxed. The sequences found are indicated as follows: space dashed lines: 5'-RACE; dashed lines: RT-PCR; dashed-dotted lines: 3'-RACE.

cDNA の解析から RNase Aa の成熟タンパク質部分は 231 アミノ酸残基からなることが分かった。成熟タンパク質部分の推定アミノ酸配列と蛋白化学的に決定したアミノ酸配列とはよく一致していた。したがって塩基配列を決定した cDNA は RNase Aa をコードしている mRNA の cDNA であると考えられる。また、RNase Aa は 40 残基のシグナルペプチドを有していた。

蛋白化学的手法で決定できなかった N 末から 19 番目、23 番目のアミノ酸は cDNA 解析よりそれぞれ Cys 残基と Asn 残基であることが判明した。Asn23 は、その 2 つ C 末側のアミノ酸が Thr であり N-グリコシド結合する配列 (Asn-X-Thr または Ser) であること、および精製タンパク質で Asn23 が検出できなかったことから Asn23 には糖鎖が結合していると考えられる。また、一次構造より求めた Gly30-Thr210 の分子量は 20,105 であり還元下での電気泳動ではおよそ 25 kDa と少し大きめの分子量に検出されていることから、Gly30-Thr210 の配列中に糖鎖が含まれているためと考えられる。一方、Cys19 は精製タンパク質の分析で検出されなかったことからジスルフィド結合していると考えられ、RNase T2 ファミリーとの比較生化学的検討から結合する相手は Cys34 であると考えられる。このことは Cys34 も精製タンパク質の分析では検出されず、RCM 化してはじめてカルボキシメチル化-システイン (carboxymethylation-cysteine ; CM-Cys) として検出できたこととよく一致する。

蛋白化学的検討からは、RNase Aa は 3 本のポリペプチド鎖からなると考えられたが cDNA の解析結果からは 3 本のペプチドがすべて欠失も挿入もなくつながっていることが分かった。このことから RNase Aa は翻訳後に N 末端側の Asn29-Gly30 および C 末端側の Thr210-Arg211 の間で切断を受けると考えられる。

3-5. アミノ酸組成・糖組成

RNase Aa の推定アミノ酸配列より求めたアミノ酸組成とアミノ酸分析によって得られた測定値を比較した結果を Table 5 に示す。その結果、先にも述べたように推定アミノ酸配列より求めたアミノ酸組成とアミノ酸分析の結果はいずれのアミノ酸についてもよく一致していた。一方、RNase Aa は 231 のアミノ酸残基からなり、タンパク質部分の分子量は 25,924 であった。また、中性糖の定量を行ったところ、RNase Aa は約 31 残基のマノースを含む糖タンパク質であることが分かった。

Table 5 Amino acid composition neutral sugar contents of RNase Aa

Amino acid	Experimental	Calculated from
	value	the sequence
(residues/mol)		
Asp	27.3	25
Glu	14.8	15
Ser	20.8	22
Gly	14.6	14
His	7.3	8
Arg	5.6	5
Thr	17.4	18
Ala	15.2	15
Pro	16.6	16
Tyr	11.2	11
Val	8.6	9
Met	5.4	5
1/2Cys	-	8
Ile	11.5	12
Leu	15.1	16
Phe	8.8	9
Lys	15.3	15
Trp	-	8
Total		231
Mannose	30.6	-

3-6. RNase T2 ファミリー酵素の分子進化の系統樹の作成

一次構造上の比較から得た情報をもとに足立、長谷川らによる最尤法⁴⁷⁾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、結果を Fig. 21 に示す。

棘皮動物であるキヒトデ (RNase Aa) はマガキ (Oy) やイカ (Tp) などの軟体動物やカエル卵 (RCL2)、トリ肝臓 (CL1)、ウシ脾臓 (BSP1) およびブタ脾臓 (PSP1) などの脊椎動物と分子進化上のかなり早い段階で分岐していることが分かった。また、キヒトデ RNase Aa と最も近縁であるのはマガキ由来の RNase Oy であったが、トマト由来の RNase LE とも比較的近縁であった。

棘皮動物であるキヒトデは形態学的に脊椎動物と同じ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。また、下等動物の RNase は脊椎動物よりも植物に近いことなど分類学的知見とは異なっていた。したがって、RNase T2 ファミリー酵素を指標として用いることで新たな分子進化の系統樹が作成できた。

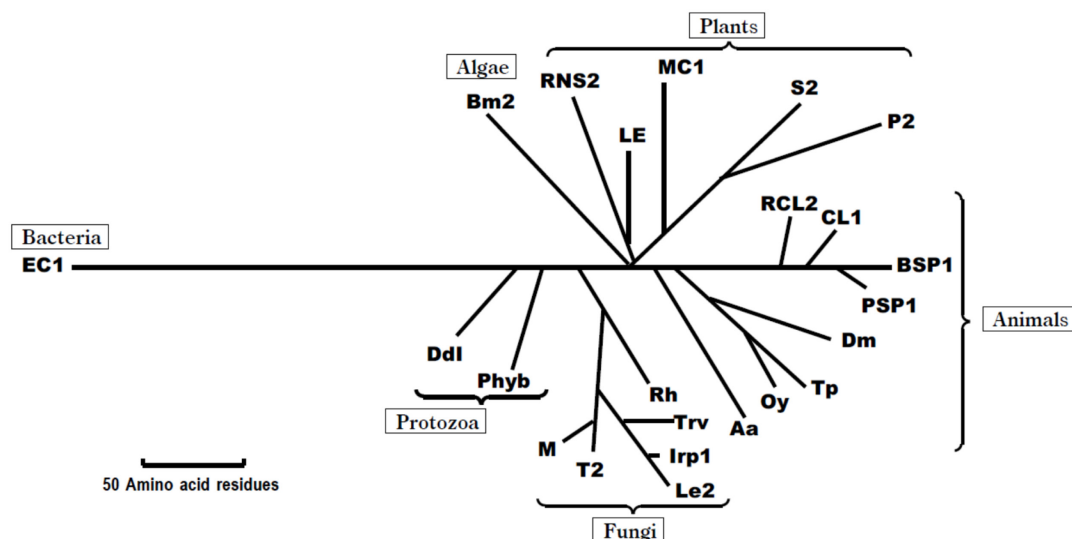


Fig. 21 Phylogenetic tree of the RNase T2 family of enzymes

EC1 : RNase from *Escherichia coli*²¹⁾; T2 : RNase from *Aspergillus oryzae*¹⁶⁾; M : RNase from *Aspergillus saitoi*¹⁷⁾; Trv : RNase from *Trichoderma viride*⁴⁸⁾; Le2 : RNase from *Lentinus edodes*¹⁹⁾; Irp : RNase from *Irpex lacteus*⁴⁹⁾; RNS2 : RNase from *Arabidopsis thaliana*⁵⁰⁾; Rh : RNase from *Rhizopus niveus*²⁸⁾; Phyb : RNase from slime mold (*Physarum polycephalum*)²⁰⁾; Ddl : RNase from slime mold (*Dictyostelium discoideum*)⁵¹⁾; Bm2 : RNase from seaweed (*Bryopsis maxima*)⁵²⁾; S2 : self-incompatibility factor from *Nicotiana glauca*⁵³⁾; P2 : self-incompatibility factor from *Petunia inflata*⁵⁴⁾; LE : RNase from tomato (*Lycopersicon esculentum*)⁵⁵⁾; Os : RNase from rice bran⁵⁶⁾; MC1 : RNase from bitter melon seeds (*Momordica charantia*)²²⁾; Aa : RNase from starfish (*Asterias amurensis*); Oy : RNase from oyster liver (*Crassostrea gigas*)²⁴⁾; Tp : RNase from squid (*Todarodes pacificus*)³²⁾; Dm : RNase from *Drosophila melanogaster*²⁵⁾; RCL2 : RNase from bullfrog liver (*Rana catesbeiana*)³¹⁾; CL1 : chicken liver RNase⁵⁷⁾; BSP1 : bovine spleen RNase²⁶⁾; PSP1 : porcine spleen RNase⁵⁸⁾.

第4節 考察

RNase Aa の精製タンパク質の解析結果と cDNA の塩基配列分析の結果より決定した RNase Aa の全一次構造を他の T2 ファミリー酵素と比較した (Fig. 22)。本酵素は RNase T2 ファミリー酵素のうち、マガキ (*Crussostrea gigus*) 由来の RNase Oy²⁴⁾ と最もホモロジーが高く約 35% が同一配列であった。その他トマト (*Lycopersicon esculentum*) 由来の RNase LE⁵⁵⁾、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) 由来の RNase Dm²⁵⁾、細胞性粘菌 (*Dyctyostelium descoideum*) 由来の RNase Dd I⁵¹⁾ の 3 種の酵素とも比較的ホモロジーが高く約 30% が同一配列であった。特に Cys 残基の局在位置はこれらの酵素と 8 残基ともすべて共通していた。RNase T2 ファミリーの活性中心は 2 つの CAS 領域からなる。RNase Aa では His46、His98、Glu99、Lys102、His103 がこれに相当する。RNase Rh (*Rizopus niveus*)³⁶⁾、RNase LE (*Lycopersicon esculentum*)³⁰⁾、RNase MC1 (*Momordica charantia*)^{37, 38)} の X 線結晶構造解析や修飾実験により、2 つの塩基認識部位 (B1、B2) を有することが明らかになっている。

RNase LE の B1 サイトは Trp42、Asn44、Tyr50 からなり、Asn44 はグアニン塩基認識において最も重要である。しかし、RNase Aa や RNase Dm では Asn44 が Thr に、RNase Tp (*Todarodes pacificus*)³²⁾ や RNase Oy (*Crussostrea gigus*)²⁴⁾ では Ser に置き換わっている。

RNase LE の B2 サイトは Glu12、Pro77、Thr78、Leu79、Ala80、Phe89 であるが、RNase Aa では Thr78 が Asp に、Ala80 が Leu に置き換わっている。Thr が Asp 又は Asn 置き換わることは他の多くの動物由来 RNase にみられる。動物由来の RNase T2 ファミリー酵素はイカ (*Todarodes pacificus*) 由来の RNase Tp³²⁾、牛脾由来の BSP1²⁶⁾、ブタ脾由来 PSP1⁵⁸⁾、ニワトリ肝由来の CL1⁵⁷⁾、カエル肝 (*Rana catesbeiana*) 由来の RCL2³¹⁾ など C 末端側で切断を受けている例が報告されている。これらはいずれも C 末端側に局在する 2 残基の Cys の間で切断を受けており、棘皮動物由来の本酵素も同じ位置で切断を受けていた。一方、N 末端で切断を受けている例は本酵素以外ではブタ脾由来の RNase PSP1⁵⁸⁾ およびニワトリ肝由来の RNase CL1⁵⁷⁾ の 2 つでのみ報告されているが、その切断位置は N 末側に局在する 2 残基の Cys 間で起こっている。本酵素でも N 末端側の切断位置は 2 残基の Cys 間で起こっており、切断を受ける位置は立体構造上かなり限定されていると考えられる。

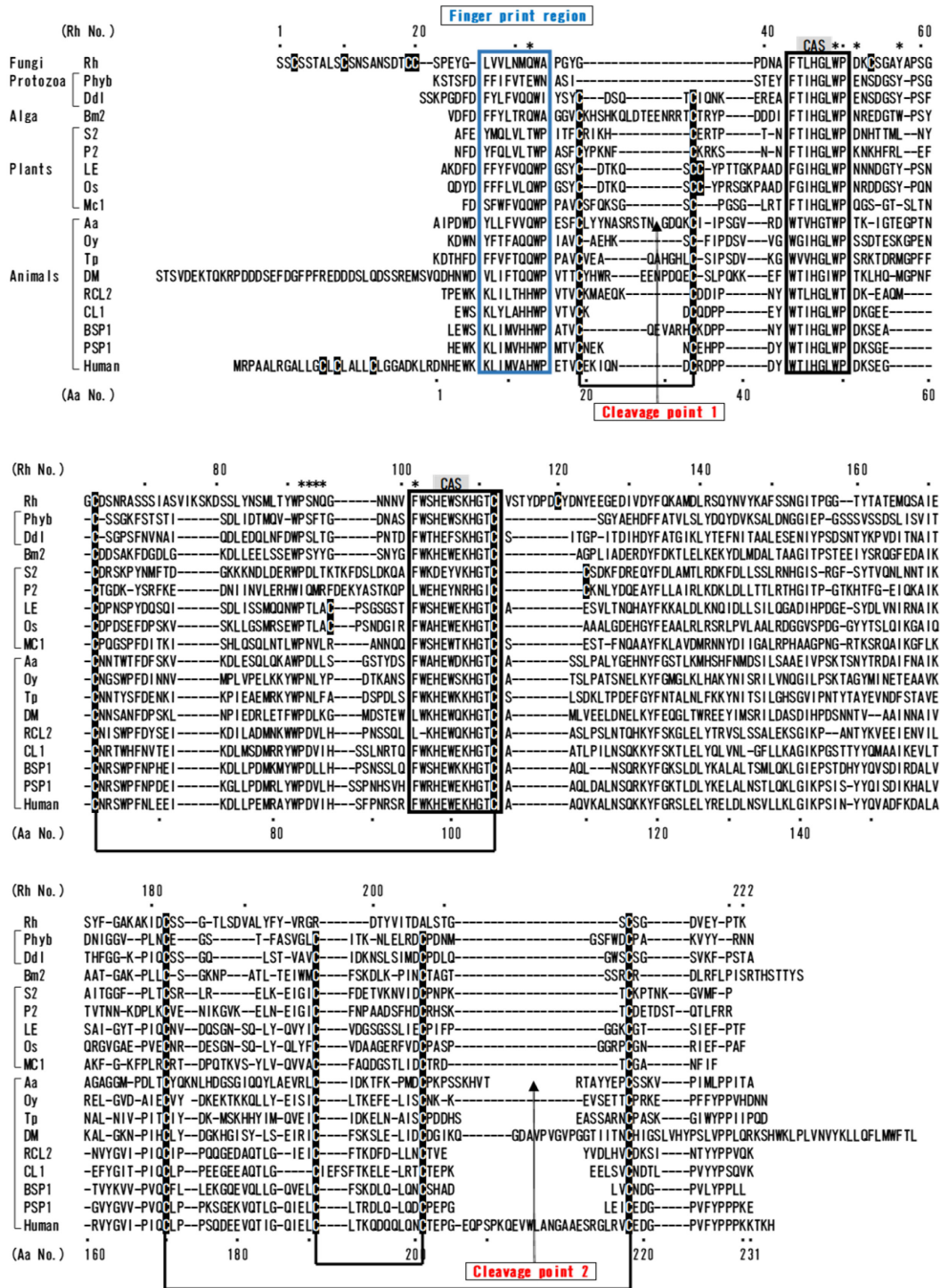


Fig. 22 Comparison of the amino acid sequence of RNase Aa with those of other T2 RNases Human: human RNase located in a region of chromosome 6 (6q27)⁵⁹. Other abbreviations are the same as in Fig. 21. Numbers at the top and bottom of the matrix represent RNase Rh and RNase Aa numbering, respectively. Disulfide bridges are shown as heavy lines and highlighted font indicates cysteine residues forming disulfide bridges. The residues indicated with asterisks contribute to the baserecognition site of T2 family RNases. The two cleavage points of RNase Aa are highlighted using arrows. The fingerprint regions and two CASregions are enclosed in boxes.

結晶構造解析により決定した RNase MC1 の三次構造²⁹⁾をもとにして RNase Aa の切断部位を予測したところ、N 末付近の切断部位 (Cleavage point 1) は分子表面上のループ部分にあり、C 末付近の切断部位 (Cleavage point 2) も分子表面に露出したターン部分にあった。どちらの切断部位もジスルフィド結合でメインのポリペプチドと結合しており固定されていた (Fig. 23)。

前述のとおり、RNase Aa は T2 ファミリー酵素としては中程度の RNA 分解活性を有しており、CD スペクトルも同じ T2 ファミリー酵素である RNase Phyb (真正粘菌)²⁰⁾と同様の波形を示していることから、この RNase Aa 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。

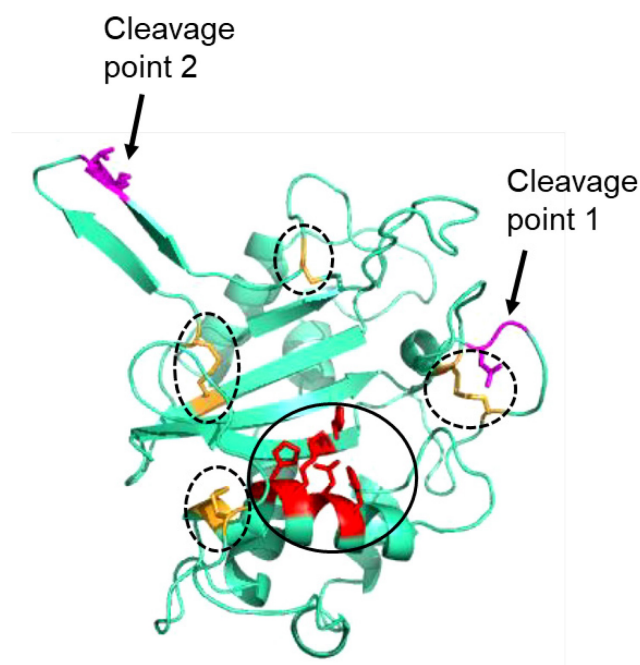


Fig. 23 The cleavage points of RNase Aa over the tertiary structure of RNase MC1

The figure was drawn using PyMOL (<http://pymol.sourceforge.net>). The locations of the cysteine residues in RNase Aa over the structure of RNase MC1 (PDB ID: 1BK7). The catalytic centre is enclosed by a circle. The disulfide bonds are enclosed by dotted circles. The locations of the cleavage points were predicted using the web server SWISS-MODEL by using the crystal structure of RNase MC1 as a template²⁹⁾.

草野らは RNase T2 ファミリー酵素の N 末端付近に 9 残基のアミノ酸からなるフィンガープリント領域があると報告している³²⁾。最後の WP 配列はほとんどの動物、植物由来の RNase で保存されている。棘皮動物由来の RNase Aa は動物由来の RNase よりもトマト (LE)⁵⁵⁾やニガウリ (MC1)²²⁾などの植物由来のものに似ている。しかし 6、7 番目の配列に着目すると、真菌では MQ または QF、植物では LT または QQ、下等動物では QQ、脊椎動物では HH または AH となっているが、RNase Aa では 6、7 番目の配列が VQ で、他の動物や植物の配列とは異なっている (Table 6)。さらに RNase の情報を増やすことで、RNase T2 ファミリー酵素のフィンガープリント領域は生物の分類に寄与すると考えられる。

Table 6 Fingerprint region of RNases from various organisms.

Organism	RNase	Sequence (RNase Rh number 26-34)
Virus	Sfv	A A E N I T <u>Q</u> W N
Bacteria	Ah	Y Y A M A <u>L</u> S W S
	EC	R Y V L A <u>L</u> S W Q
Fungi	Rh	L V V L N <u>M</u> Q W A
	T2	A L L Q T <u>Q</u> F W D
	M	S L L Q T <u>Q</u> F W D
	Trv	Q L L Q T <u>Q</u> F W D
	Irp	L L L Q T <u>Q</u> F W D
	Le2	L I L Q T <u>Q</u> F W D
Protozoa	Phyb	F F I F V <u>T</u> E W N
	Dd1	F Y L F V <u>Q</u> Q W I
Alga	Bm2	F F Y L T <u>R</u> Q W A
Plants	S2	Y M Q L V <u>L</u> T W P
	P2	Y F Q L V <u>L</u> T W P
	LE	F F Y F V <u>Q</u> Q W P
	MC1	S F W F V <u>Q</u> Q W P
Animals	Aa	Y L L F V V <u>Q</u> W P
	Oy	Y F T F A <u>Q</u> Q W P
	Tp	F F V F T <u>Q</u> Q W P
	Dm	V L I F T <u>Q</u> Q W P
Vertebrate	RCI2	K L I L T <u>H</u> H W P
	CL1	K L Y L A <u>H</u> H W P
	PSP1	K L I M V <u>H</u> H W P
	BSP1	K L I M V <u>H</u> H W P
	human	K L I M V <u>A</u> H W P

第5節 小括

1. 棘皮動物であるキヒトデ (*Asterias amurensis*) 生殖器由来のリボヌクレアーゼ (RNase Aa) の精製法を確立した。キヒトデ生殖器 1 kg からは収率 8.5% で 0.9 mg の標品を得た。RNA を基質とした時の比活性は 789 units/mg であり、RNase T2 ファミリーに属する酵素で最も高い比活性をもつクモスカビ由来の RNase Rh の 2,000 units/mg の約 3 分の 1 であり、最も低いカエル由来の RNase RCL2 の比活性が 40 units/mg であるのと比較すると中程度の比活性であった。
2. RNase Aa は分子量がおよそ 31,400 で 31 残基のマノースを含む糖タンパク質であった。RNA を基質とした時の至適 pH は 5.0 で、銅イオンで強い活性阻害を受け、亜鉛イオンでも若干阻害を受ける。EDTA が共存しても活性がほとんど阻害も賦活化も受けず、金属酵素ではないといえる。一方、RNA の最終分解物である 3'-モノヌクレオチドは、 $GMP \geq AMP > UMP$ の順で遊離し、3'-CMP はほとんど検出できなかった。また、CD スペクトルの測定で RNase T2 ファミリー酵素に特徴的なスペクトルを与え、本酵素の有するトリプトファンやチロシンの立体構造上の環境は他の T2 ファミリー酵素と同一であると考えられる。これら RNase Aa の諸性質は本酵素が RNase T2 ファミリーに属する酵素であることを示している。
3. RNase Aa の N 末端アミノ酸配列を検討したところ 3 つのアミノ酸配列を検出し、3 つのポリペプチド鎖からなることが示唆された。RNase Aa を RCM 化後、ゲルろ過で分離したところ、より分子量の小さいペプチドが得られた。これをリシルエンドペプチダーゼで消化し、分離し、6 つのペプチドを得た。そのアミノ酸配列は、RNase T2 ファミリー酵素に共通している 2 つの CAS 領域を有し、本酵素は一次構造上も RNase T2 ファミリーに属することが確認できた。
4. RNase Aa の cDNA 塩基配列を決定したところ、40 残基のシグナルペプチドと 231 アミノ酸残基の成熟タンパク質部分からなり、cDNA の解析結果と蛋白化学的に決定したアミノ酸配列は完全に一致しており、そのアミノ酸組成は精製標品のアミノ酸分析実験値と誤差範囲でよく一致していた。蛋白化学的検討からは RNase Aa は 3 本のポリペプチド鎖からなると考えられたが、cDNA 解析によると 3 本のポリペプチドはすべて欠失も挿入もなくつながっていた。したがって、RNase Aa は翻訳後に酵素的もしくは化学的に切断を受けやすい部分で切断されると考えられ、これらのポリペプチド鎖は、ジスルフィド結合により結合していると考えられる。

5. RNase T2 ファミリー酵素の中で立体構造が報告されているニガウリ (*Momordica charantia*) 由来の RNase MC1²⁹⁾に、RNase Aa の一次構造をあてはめてみると、切断されている部位は N 末端および C 末端部分どちらも、活性中心から離れたループ部分に相当するため、立体構造の形成および維持にはあまり関与しないと考えられる。また、切断を受けた配列が S-S 結合や β 構造で他の領域とかなり強固に結合していることから、この切断により酵素活性には影響が少ないことが推測される。動物由来の RNase T2 ファミリー酵素は C 末端側が切断されているものがいくつか報告されているが、N 末端と C 末端の両方が切断されているのは、本酵素以外ではブタ脾由来の RNase PSP1⁵⁸⁾ とニワトリ肝由来の RNase CL1⁵⁷⁾の 2 つだけである。

6. すでに報告されている細菌、真菌、動物、植物由来 RNase T2 ファミリー酵素の一次構造から最尤法⁴⁷⁾により分子進化の系統樹を作成した。その結果、棘皮動物であるキヒトデは分子進化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わかった。また、キヒトデ (RNase Aa) ともっとも近縁なのはマガキ (RNase Oy)²⁴⁾であるが、トマト (RNase LE)⁵⁵⁾とも比較的近縁であった。

7. 以上のことより、キヒトデ由来 T2 ファミリー酵素 RNase Aa の一次構造を決定し、蛋白化学的および遺伝子工学的アプローチにより、分子内切断されている RNase Aa の構造が決定できた。また、生物界に広く分布している T2 ファミリー酵素の特性を活かして分子進化の系統樹を作成し、キヒトデの RNase が形態的分類とは異なる進化を遂げたことが予想できた。

第2章 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

第1節 はじめに

RNaseの中には、抗腫瘍活性を示すものがいくつか知られているが、ほとんどがRNase Aファミリーに分類されるものである。これらはさらに2つのグループに分けられる。1つはウシ精嚢由来のRNase (BS-RNase)⁶⁰⁾で、RNase Aと一次構造上80%のホモロジーがあるが、RNase Aとは異なり2本鎖のRNAをよく分解するものである。もう1つは*Rana*属のカエルから得られているものであり、よく研究されており強い抗腫瘍活性を示す*Rana pipiens*由来のonconase^{2, 3)}である。onconaseは分子量10kDaの単純タンパク質で、RNase Aと活性中心近傍の構造は類似しているが、その他の全体的なホモロジーは低い⁶¹⁾。一次構造を見ると、C末端側にRNase Aより1組多くのS-S結合を有しているため立体構造が安定化し、100 °CでもRNA分解活性を示し温度安定性が高い。

RNase T1ファミリーで抗腫瘍活性が報告されているのは、*Aspergillus giganteus*由来の α -sarcin^{33, 34)}のようなりボトキシンのみであり、代表的RNase T1ファミリー酵素である*Aspergillus oryzae*由来のRNase T1は抗腫瘍活性を示さない。 α -sarcin^{33, 34)}はRNase T1ファミリー酵素と同様の触媒部位を有しているが、分子量が15 kDaと大きくRNase T1との一次構造上のホモロジーは低い。

食用キノコの1つである*Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ)は、分子量10 kDaのRNase Po1⁶²⁾を産生するが、これはその塩基特異性からRNase T1ファミリーに分類される。RNase T1とは一次構造上、活性中心構造は一致しており、約40%のホモロジーを有している。しかし、RNase T1よりもシステイン残基を2残基多く有しているため、構造的に安定である可能性が考えられる。また、RNase Po1の等電点は、pH 9.0とRNase T1ファミリー酵素のほとんどがpH 4.5付近であるのに比べて高いという特徴がある。RNase Po1は等電点が弱アルカリ側であり、温度に対する安定性が高いなどonconase⁶¹⁾や α -sarcin^{33, 34)}との共通点が見られることから抗腫瘍活性を示す可能性が考えられたため、RNase Po1についてヒト腫瘍細胞に対する増殖抑制作用の検討を行った。

Table 7 Comparison of antitumor RNase with RNase Po1 and RNase T1

分類	RNase	分子量	由来	等電点 pI
T1	Po1	10,773	<i>Pleurotus ostreatus</i>	9.0
T1	T1	10,925	<i>Aspergillus oryzae</i>	2.9
T1	α -sarcin	15,162	<i>Aspergillus giganteus</i>	9.4
A	onconase	12,322	<i>Rana pipiens</i>	9.4

第2節 実験方法

1. 酵素

RNase T1 は MoBiTec GmbH (Goettingen, Germany) の製品を使用した。キモトリプシンとサーモリシンはプロメガ株 (東京) の製品を使用した。RNase Po1 は後述の通りに cDNA 塩基配列を決定し、発現ベクターを構築後に大腸菌で発現し、精製することにより得た。

2. 細胞

ヒト白血病 HL-60 細胞は JCRB 細胞バンク (大阪) より購入したものを、Jurkat 細胞は日本大学薬学部機能形態学研究室の木澤靖夫教授より供与されたものを使用した。

また、ヒト神経芽腫細胞 IMR-32、SK-N-SH および NB-39 は、日本大学薬学部臨床医学研究室内の鈴木孝教授より供与されたものを使用した。

3. 試薬

[発現用大腸菌]

発現用大腸菌 *E.coli* BL21 (DE3) pLysS は MERCK KGaA (Darmstadt, Germany) の製品を使用した。

[大腸菌の培養]

イソプロピル- β -D(-)-チオガラクトピラノシド (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; IPTG) は富士フィルム和光純薬株 (大阪) の製品を使用した。その他、Terrific Broth (TB) 培地の調製に使用した試薬および ampicillin は第1章に準じた。

[カラムクロマトグラフィー担体]

Ultrogel AcA54 は MERCK KGaA (Darmstadt, Germany) の製品を使用し、その他のものは第1章に準じた。

[酵素活性の測定]

第1章に準じた。

[DNA 塩基配列の決定]

第1章に準じた。

[発現ベクターの構築と大腸菌での発現]

pET-11d ベクター、pET22b ベクターおよび E.coli BL21(DE3)pLysS は MERCK KGaA (Darmstadt, Germany) の製品を使用した。制限酵素 Nco I および BamH I はニッポン・ジーン (東京) のものを使用した。

[発現タンパク質の精製]

発現タンパク質の透析に使用した透析チューブ Spectra/Poa[®] (molecular weight cut off: 3,500) は Spectrum[®] Laboratories (CA, USA) を使用し、その他のものは第 1 章に準じた。

[SDS-PAGE]

第 1 章に準じた。

[細胞培養]

PRMI1640 培地はサーモフィッシャーサイエンティフィック(株) (東京) の製品、牛胎仔血清は味の素(株)バイオ・ファイン研究所 (神奈川) の製品を使用した。

生細胞数の測定に使用した Cell counting kit 8 は富士フィルム和光純薬(株) (大阪) の製品を使用した。添加する RNase のろ過滅菌に使用した Millipore filter (Millex-GV) および細胞内への取り込み量の測定に使用した Triton X-100 は MERCK KGaA (Darmstadt, Germany) の製品を使用した。

[細胞増殖抑制作用の測定]

ヘキスト染色に使用した Hoechst33342、フローサイトメトリー分析に使用した propidium iodide (PI) は富士フィルム和光純薬(株) (大阪) の製品を使用した。

4. タンパク質の定量

第 1 章に準じて行った。精製した RNase Po1 のタンパク質量は 280 nm における吸光度が 0.57 を与える濃度を 1 mg/mL (0.1%) 溶液として換算した。

5. 酵素活性の測定

第 1 章に準じた。

6. RNase Po1 をコードする cDNA の TA クローニング

RNase Po1 をコードする cDNA をクローニングし、大腸菌で RNase Po1 の発現を行った。野村らが報告した RNase Po1 タンパク質の一次構造⁶²⁾に基づいて混合塩基プライマー (cPo1-33F、cPo1-87R) を設計し、RT-PCR を行った。RT-PCR で明らかになった配列をもとにして cPo1-45F (SPSCTPTFFE) プライマーを作製し、3'-RACE 法により 3' 側の塩基配列を決定した。得られた塩基配列より cPo1-121R プライマーを作製し、5'-RACE 法により 5' 側の塩基配列を決定した。DNA 配列は sanger 法⁶³⁾により、キャピラリー DNA シークエンサー CRQ8000 (Beckman Coulter, Inc., CA, USA) を使用して決定した。使用したオリゴヌクレオチドの配列を Table 8 に示す。

Table 8 PCR primers

Name	Sequence (5' - 3')
cPo1-33F	AAiTAiCCiCAyGTiTAYAAyAAyTTyGARGGiTT
cPo1-87R	CAyTCiACrAAiCCrTTiGTiswiGGiGCiCCiGTrTG
cPo1-45F	TTCGTTTCAGCTGCACGCCAACTTTCTTCGA
HIK-18VN	ATGGTAGCCTGCGATTAGACTCTCACGATTTTTTTTTTTTTTTTTT TTVN
HIK-ad1	ATGGTAGCCTGAGATTAGACTCTCA
5HIK-16GI	ATGGTAGCCTGCGATTAGACTCTCACGATACGGGiiGGGiiGGGi iG
5HIK-ad1	ATGGTAGCCTGCGATTAGACTCTCACGATAC
cPo1-121R	GGTAAACAGCGACAAACAATGGGACCACAA

I: inosine ; N: A, C, G, T ; W: A, T ; V: C, G, T ; Y: C, T ; S: C, G ; R: A, G

7. 発現ベクターの構築と大腸菌での発現

発現ベクター pET-pelB-Po1 は Hung らの方法⁶⁴⁾により pET-11d ベクターに pET22b の分泌発現用シグナルペプチドを挿入した pET-pelB を作成した。pET-pelB ベクターと 5' 側に Nco I サイト、3' 側に BamH1 の制限酵素部位を付加した RMase Po1 を Nco I と BamH I で切断後、ライゲーションし pET-pelb-Po1 を作製した。これを *E.coli* BL21(DE3)pLysS ヒートショックにより形質転換した。この大腸菌を 100 µg/mL の ampicillin (Meiji Seika ファルマ株、東京) と最終濃度 0.5 mM IPTG を添加した TB 培地中で、25 °C、7 日間培養した。10,000 rpm で 30 分間遠心分離し、培養上清を得た。なお、使用した TB 培地の調製法 (1 L) を以下に示す。

TB 液体培地 : Tryptone Peptone 12 g、Bact Yeast Extract 24 g、100%グリセロール 4 mL
滅菌後に 0.17 M KH₂PO₄+0.72 M K₂HPO₄ (100 mL) を添加して調整した。

8. 発現した RNase Po1 の精製

得られた培養上清を、野村らの方法を改良して以下の方法で精製し、標品を得た。

(1) 硫酸分画 (0.9S)

培養液を 10,000 rpm で 20 分間遠心分離して得られた上清に、最終濃度が 90%飽和になるように硫酸アンモニウムを加えて 4 °C で一晩攪拌した。これを 10,000 rpm で 20 分間遠心分離し、得られた沈殿を最小量の 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解し、セルロースチューブ 36/32 を用いて、精製水に対して 1 晩透析を行った。

(2) Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィー

透析後の試料を濃縮し、あらかじめ 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した Sephadex G-50 カラム (4.0×180 cm) に添加した。同緩衝液で溶出し、RNase 活性画分を回収した。

(3) SP-Toyopearl カラムクロマトグラフィー

Sephadex G-50 で得られた活性画分を、あらかじめ 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で平衡化した SP-Toyopearl カラム (3.0×30 cm) に吸着させ、同緩衝液と 0.3 M NaCl を含む同緩衝液それぞれ 1.0L の直線濃度勾配で溶出し、活性画分を回収し、濃縮を行った。

(4) Ultro gel AcA54 カラムクロマトグラフィー

濃縮した活性画分を 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した Ultro gel AcA54 カラム (3.0×180 cm) に添加し、ゲル濾過を行った。RNase 活性画分を回収し、精製水に対して透析チューブ Spectra/Poa[®] (molecular weight cut off : 3,500) を用いて 1 晩透析を行った。

(5) DEAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィー

透析した画分を、あらかじめ 0.01M Tris 緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した DEAE-Toyopearl (1.5×30 cm) に添加し、活性画分を素通りさせた。

(6) Heparin-Sepharose CL-6B アフィニティークロマトグラフィー

DEAE-Toyopearl を素通りさせた画分を、あらかじめ 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で平衡化した Heparin-Sepharose (1.0×15 cm) に吸着させ、同緩衝液と 0.3 M NaCl を含む同緩衝液をそれぞれ 0.35L の直線濃度勾配で溶出した。RNase 活性を有する画分を回収し、濃縮後、精製水に対して透析チューブ Spectra/Poa[®] (molecular weight cut off : 3,500) を用いて 1 晩透析を行った。

(7) Shodex PROTEIN KW-802.5 ゲルクロマトグラフィー (HPLC)

透析した画分を濃縮後、あらかじめ 20 mM トリメチルアミン-酢酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した Shodex KW-802.5 カラムに添加し、流速 0.5 mL/min でゲルろ過を行った。

9. SDS-PAGE

HPLC より得られた活性画分について、15% Tricine ゲルを用いて前章と同様の方法で SDS-PAGE を行った。泳動後、銀染色法でタンパク質を、RNA を基質とした活性染色で RNase 活性をそれぞれ検出し標品の精製度を確認した。

10. 細胞増殖抑制作用の測定

細胞増殖抑制作用の測定はヒト神経芽腫細胞 (IMR-32、SK-N-SH、NB-39) およびヒト白血病細胞 (HL-60、Jurkat) を用いた。細胞は 10% 牛胎仔血清を加えた PRMI1640 培地で培養し、同培地で懸濁して用いた。ヒト神経芽腫由来細胞は 1×10^5 cells/mL または 5×10^4 cells/mL に希釈し、ヒト白血病細胞は 3×10^5 cells/mL に希釈して、96-well plate の各ウェルに 200 μ L ずつ添加し測定を行った。あらかじめ Millipore filter (Millex-GV) で濾過滅菌した各種濃度の酵素 (RNase T1、RNase Po1) 10 μ L を加え、コントロールには PBS を加えた。5% CO₂ 条件下で 37°C、72 時間培養後、Cell counting kit 8 を加えて生存細胞数を MTT 法にて算出した。細胞生存率はコントロールの生存細胞数に対する RNase 処理生存細胞数のパーセンテージとして算出した。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = \frac{\text{RNase 処理生存細胞数}}{\text{コントロール生存細胞数}} \times 100$$

11. RNase Po1 の RNA 分解活性に対する非特異的プロテアーゼ消化の影響

非特異的プロテアーゼであるキモトリプシン、サーモリシンで RNase Po1 および RNase T1 を消化し RNA 分解活性の残存率を比較した。0.16 mg/mL の RNase Po1 および RNase T1 に 1/17.5 (w/w) のキモトリプシンを加え、10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中 37°C で消化した。サーモリシンは、0.14 mg/mL の RNase Po1、RNase T1 に 1/20 (w/w) 加え、1 mM CaCl₂ を含む 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中 37°C で消化した。消化後、両酵素の RNA 分解活性を常法により測定した。

12. ヘキスト (Hoechst33342) 染色

3×10^5 cells/mL の HL-60 細胞を 200 μ L に 10 μ L の RNase Po1 を加え 5% CO₂ 下、37°C で 48 h 培養する。細胞培養液を遠心分離したのち上清を除き、100 μ L の 1% グルタルアルデヒドを加え 30 分間固定する。遠心分離でグルタルアルデヒドを除き、PBS を 1 mL 加え遠心分離して上清を除く。グルタルアルデヒドを洗浄除去するためこの操作を数回繰り返す。PBS 20 μ L 及び 1 mg/mL の Hoechst33342 を 4 μ L 加えてスライドグラスに滴下し、蛍光顕微鏡 (オリンパス IX70、東京) を用いて 20 倍で観察した。

13. フローサイトメトリー分析

HL-60 細胞 (3×10^5 cells/mL) に 0.1 μ M、0.3 μ M の RNase Po1 を各々加えて 72 時間培養後、Annexin V-FITC、および PI で染色し、フローサイトメトリー分析を BD FACSCalibur™ (Becton, Dickinson and Company, NJ New Jersey, USA) により行った。

14. 細胞周期の観察

0.1 μ M、または 0.3 μ M の RNase Po1 を加えた HL-60 細胞を 48 h、CO₂ 下、37 °C で培養し、エタノールを加えて -20 °C で一晩固定を行った。300G で 5 分間遠心分離後、細胞を PBS で洗浄した。これに DNase-free RNase (0.25 mg/mL) を含む PBS を加え 37 °C、30 分間反応させた。これを PBS で洗浄後、50 μ g/mL の PI を加え、4 °C で 30 分間染色し、同様にフローサイトメトリー分析を行い、細胞周期の各段階内の細胞の割合を検討した。

第3節 結果

3-1. RNase Po1 の cDNA 塩基配列の決定

野村らが決定したアミノ酸配列⁶²⁾を基にして、RNase Po1 の cDNA 塩基配列を決定したところ、101 残基の成熟タンパク質と 25 残基のシグナルペプチドからなっていた (AB429298 ; Fig. 24)。また cDNA 塩基配列により推定されたアミノ酸配列は、蛋白化学的に決定した配列と一致していた。

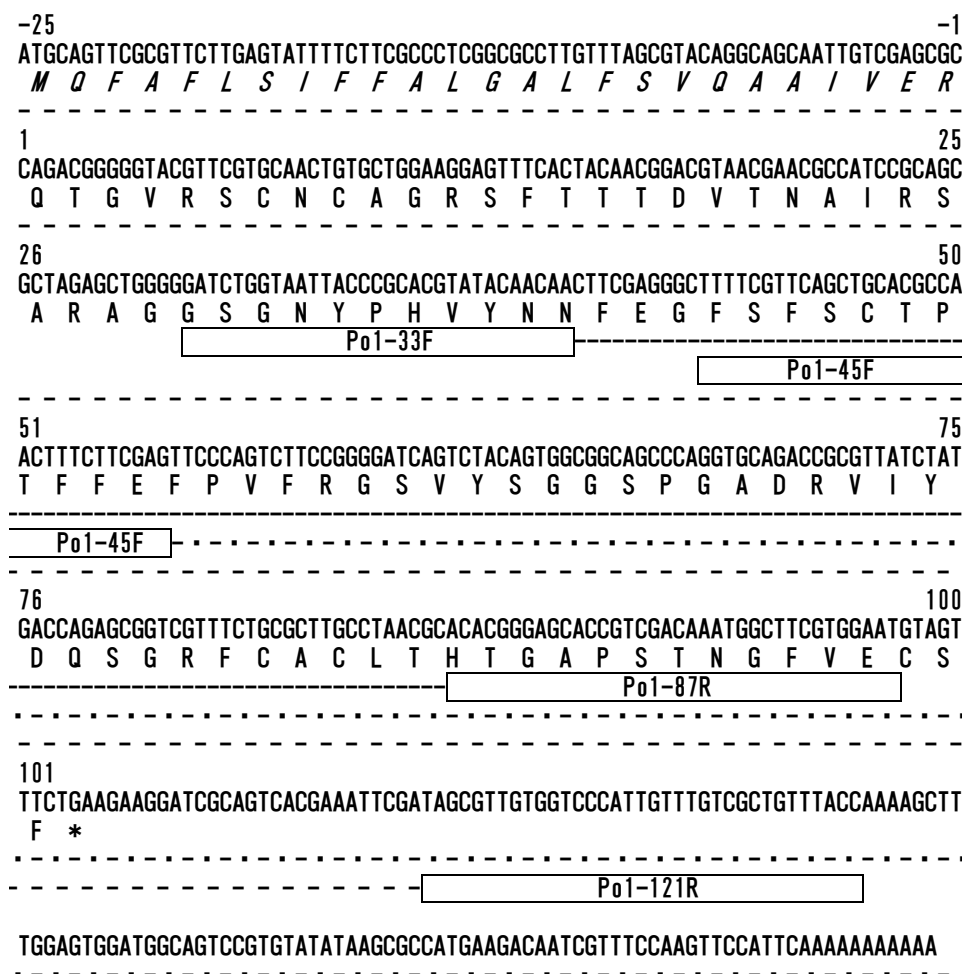


Fig. 24 Nucleotide Sequence of the cDNA Encoding RNase Po1 and Strategy for Nucleotide Sequence Analysis of It.

The amino acid sequence deduced from the cDNA sequence is shown under the nucleotide sequence. Asterisk indicates the position of the stop codon. The nucleotide sequence starts with 1 at the N-terminal Gln, and the nucleotide sequence encoding the putative signal sequence is numbered in the upstream portion and indicated by a minus sign. Primers and adapters are boxed. The sequences found are indicated as follows: -----, RT-PCR; - · - · - ·, 5'-RACE; - - - - - , 3'-RACE. The accession number of the nucleotide sequence of cDNA for RNase Po1 is AB429298.

3-2. RNase Po1 の発現系の構築と精製

RNase Po1 の大腸菌での発現系を構築し、精製を行った。2 L の大腸菌培養液から約 35,000 units の RNase Po1 が得られ、各種カラムクロマトグラフィーを用いた 7 つのステップを経て、収率 34% で約 5 mg の精製標品を得た (Table 9)。また得られた標品が均一であることを SDS-PAGE により確認した (Fig. 25)。

Table 9 Purification of mutant RNase Po1 from culture medium of BL21 (DE3) pLys S transformed with pET-pelB- mutant RNase Po1

Steps	Total Activity (units)	Yield (%)
Crude extract (2 L)	34,700	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ fraction (0.4-0.9 s)	35,400	102
Sephadex G-50 (pH 6.0)	34,600	99
SP-Toyopearl (pH 5.0)	34,000	98
Ulto gel AcA54 (pH 6.0)	22,300	64
DEAE-Toyopearl (pH 7.5)	17,400	50
Heparin-Sepharose (pH 4.5)	19,700	56
Shodex KW-802.5 HPLC (pH 6.0)	12,000	34

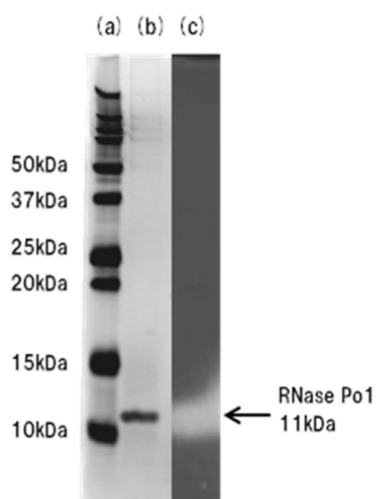


Fig. 25 Tricine-SDS-PAGE (15% Slab-Gel) of RNase Po1

Purified RNase Po1 was homogeneous according to Tricine-SDS-PAGE. (a) Silver staining of the molecular marker proteins. (b) Silver staining of RNase Po1. (c) Active staining of RNase Po1 containing RNA as a substrate

3-3. RNase Po1 と RNase T1 の酵素特性の比較

[至適 pH、pH 安定性、至適温度、温度安定性]

A.oryzae から得られた RNase T1 と *P.ostretus* (ヒラタケ) 由来の RNase Po1 は RNase T1 ファミリー酵素であり、その一次構造上のホモロジーは約 40% である。

RNase T1 と RNase Po1 は至適 pH がともに 7.5 と中性付近にあるが、等電点は、RNase T1 が酸性側の 2.9 であり RNase Po1 は弱アルカリ側の 9.0 にある。RNase Po1 は pH 2.0-11.0 の範囲で安定であり 80% 以上の酵素活性を保持して安定であるのに対し、RNase T1 は pH 5.0 より酸性側で酵素活性が 40% 程度にまで減少した (Fig. 26)。

至適温度は RNase Po1 が 70 °C であり、RNase T1 の 50 °C よりも高かった。温度に対しては両酵素とも、90 °C で 5 分間の暴露後においても約 80% の酵素活性を保持しており安定性が高かった (Fig. 26)。

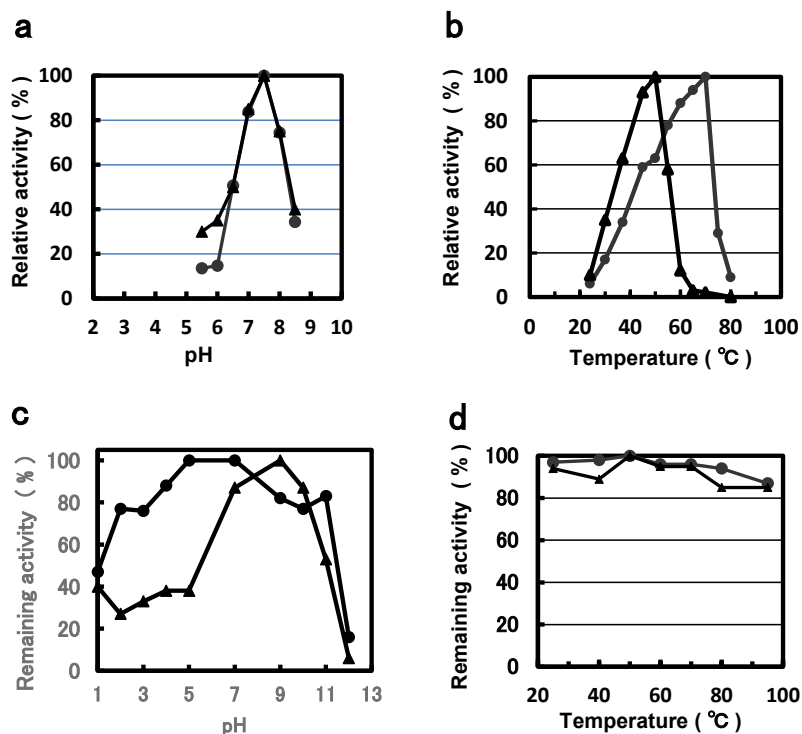


Fig. 26 Some enzymatic properties of RNase Po1 and RNase T1

(a) Effect of pH on the enzymatic activity of RNase Po1 and RNase T1.

Enzyme activity was determined as described in the text using RNA as a substrate. The buffers (0.01 M) used were acetate-NaOH buffer for pH 5.5-6.0 and Tris-HCl buffer for pH 6.5-8.5.

(b) Effect of temperature on the enzymatic activity of RNase Po1 and RNase T1.

The enzyme activity was determined as described in the text using RNA as a substrate at pH 7.5 and incubating for 3 min at various temperatures. The buffers (0.01 M) contained 1 mg/mL BSA and 0.2 M NaCl.

(c) pH stability of RNase Po1 and RNase T1

RNase Po1 or RNase T1 in 0.1 M Tris-HCl buffer (containing 1 mg/mL BSA and 0.2 M NaCl) were incubated for 5 min at various pH values at 37°C for 1 h, then 1/10 volume of 2 M Tris-HCl buffer was added to the reaction mixtures. Enzymatic activity was determined as described in the text using RNA as a substrate.

(d) Heat stability of RNase Po1 and RNase T1

RNase Po1 or RNase T1 in 0.1 M Tris-HCl buffer (containing 1 mg/mL BSA and 0.2 M NaCl) was heated for 5 min at various temperatures and then quickly chilled in ice water. Enzymatic activity was determined with RNA as a substrate at pH 7.5.

[RNase Po1 の RNA 分解活性に対する非特異的プロテアーゼ消化の影響]

RNase Po1 と RNase T1 をキモトリプシン、サーモリシンで消化することにより、両酵素のプロテアーゼ消化に対する安定性を比較した。これらのプロテアーゼは基質特異性が低いため、タンパク質に対する切断活性は基質の 1 次構造よりも、より基質に接近できるか否かによって主に決定される。

RNase Po1 はこれらのプロテアーゼ消化を 20 時間行っても 50-60% の RNA 分解活性を保持していた。しかし RNase T1 の RNA 分解活性が 15% まで減少することから、RNase Po1 は RNase T1 よりもプロテアーゼ消化に対して抵抗性があることがわかった (Fig. 27)。

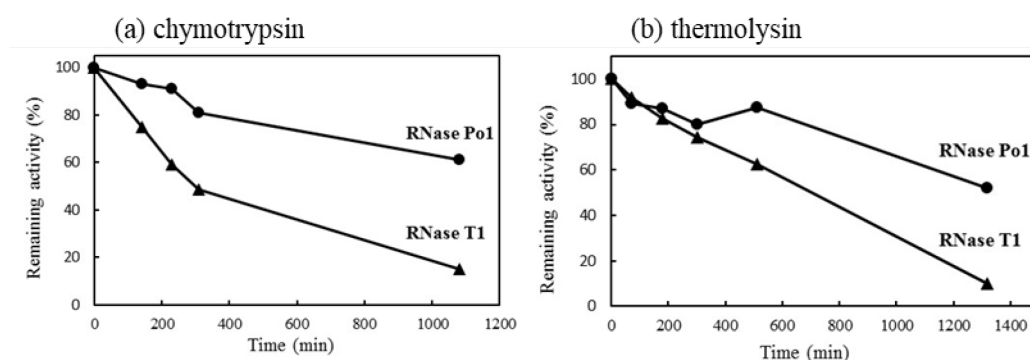


Fig. 27 Effect of chymotrypsin and thermolysin digestion on the activity of RNase Po1 and RNase T1.

Digested RNase Po1 and RNase T1 by chymotrypsin (a) and thermolysin (b) and measured RNase activity with reaction times. RNase activity just after starting the reaction was normalized to 100%. Circles show RNase Po1 and triangles show RNase T1.

3-4. RNase Po1 のヒト腫瘍細胞に対する増殖抑制作用の検討

[ヒト神経芽腫細胞に対する増殖抑制作用]

細胞に対する増殖抑制作用は、細胞種によって異なることが知られている。そこで RNase T1 および RNase Po1 について、ヒト由来細胞での増殖抑制作用を検討するために、両酵素のヒト神経芽腫細胞 IMR-32、NB-39 および SK-N-SH の増殖に対する効果を検討した (Fig. 28)。

10%牛胎仔血清を加えた RPMI 1640 培地に細胞を懸濁して 5×10^3 cells/100 μ L に希釈し 96-well plate の各ウェルに添加した。5% CO₂ 条件下で 37°C、24 時間培養後、それぞれ終濃度 1 μ M、3 μ M、6 μ M、10 μ M の RNase T1 および RNase Po1 を加え、コントロールには PBS を加えた。5% CO₂ 条件下で 37°C、72 時間培養後の生存細胞数を MTT 法にて算定した。細胞生存率はコントロールの生存細胞数に対する RNase 処理をした生存細胞数のパーセンテージとして計算した。

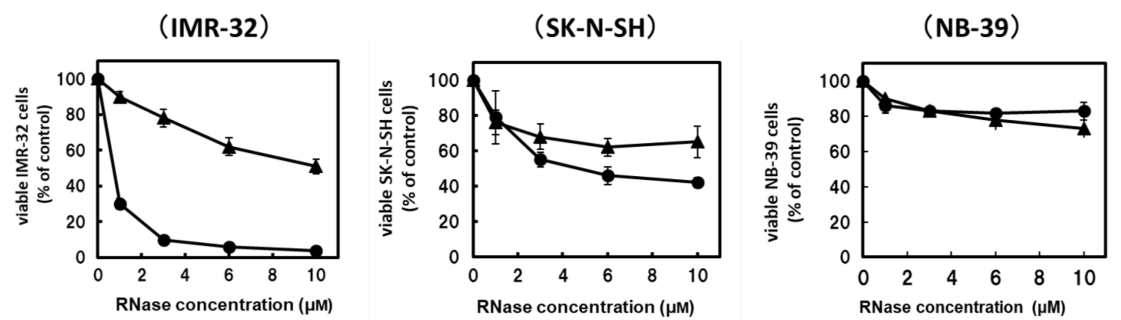


Fig. 28 Effect of RNase Po1 and RNase T1 on the cell proliferation of neuroblastoma (IMR-32, SK-N-SH, NB-39) cell lines as shown by the MTT assay

Each point is the mean of three replicates and is reported as a percentage of the control lacking RNase. Cells were treated with a given concentration of RNase Po1 or RNase T1 for 72 h. Cell proliferation without RNase was normalized to 100%.

Symbols are: ●, RNase Po1; ▲, RNase T1.

MYCN(N-myc) 遺伝子の増幅が認められる IMR-32 細胞株では RNase T1 および RNase Po1 でいずれも添加量に応じて生存細胞数は減少した。特に RNase Po1 では著しい生存細胞の減少がみられ、終濃度 3 μ M の添加で生存細胞数は 10%以下にまで減少した。また、*MYCN(N-myc)* 遺伝子の増幅が見られない SK-N-SH 細胞でも IMR-32 細胞と同様に、RNase T1 および RNase Po1 でいずれも添加量に応じて生存細胞数は減少し、RNase Po1 では終濃度 6 μ M の添加で生存細胞数は約 40%にまで減少した。薬剤耐性株とされる NB-39 細胞株では RNase T1、RNase Po1 とともに 10 μ M の添加でも生存細胞数に大きな変化は見られなかった。

[ヒト白血病細胞に対する増殖抑制作用]

次にヒト白血病細胞に対する増殖抑制作用を検討するために、RNase T1、RNase Po1 についてヒト白血病 HL-60 細胞および Jurkat 細胞の増殖に対する効果を検討した (Fig. 29)。

10%牛胎仔血清を加えた RPMI 1640 培地に細胞を懸濁して $3-4 \times 10^5$ cells/100 μ L に希釈し 96-well plate の各ウェルに添加した。5% CO₂ 条件下で 37°C、24 時間培養後、それぞれ終濃度 1 μ M、3 μ M、6 μ M、10 μ M の RNase T1 および RNase Po1 を加え、コントロールには PBS を加えた。これを 5% CO₂ 条件下で 37°C、72 時間培養後の生存細胞数を MTT 法にて算定した。細胞生存率はコントロールの生存細胞数に対する RNase 処理をした生存細胞数のパーセンテージとして計算した。

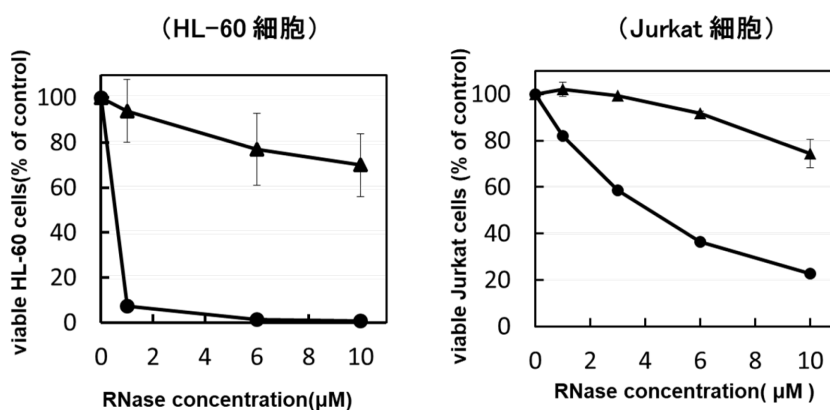


Fig. 29 Effect of RNase Po1 and RNase T1 on the cell proliferation of HL-60 and Jurkat cells as shown by the MTT assay.

Each point is the mean of three replicates and is reported as a percentage of the control lacking RNase. Cells were treated with a given concentration of RNase Po1 or RNase T1 for 72 h. Cell proliferation without RNase was normalized to 100%.

Symbols are: ●, RNase Po1; ▲, RNase T1.

RNase T1 はヒト白血病 HL-60 細胞および Jurkat 細胞のどちらに対しても終濃度 10 μ M の添加で生存細胞が約 80%であり強い増殖抑制作用は示さなかった。RNase Po1 は HL-60 細胞に対して終濃度 1 μ M の添加で生存細胞数が 5%程度と強い増殖抑制作用を示したが、Jurkat 細胞に対しては終濃度 10 μ M の添加でも生存細胞数が 20%程度とそれほど強い作用は示さなかった。

3-5. ヘキスト (Hoechst 33342) 染色

これまでにヒト腫瘍細胞に対し増殖抑制作用を示すことが知られている *onconase*^{2,3)} や *cSBL*^{65,66)} はアポトーシスを誘発することが報告されている。そこで、ヒト白血病細胞 HL-60 に対して強い増殖抑制作用を示した RNase Po1 について、ヘキスト (Hoechst 33342) 染色を用いて形態学的変化を観察し、アポトーシスおよびネクローシスの検出を行った (Fig. 30)。終濃度 0.1 μM の RNase Po1 を HL-60 細胞 (3×10^5 cells/mL) に 72 時間作用後、ヘキスト染色を行ったところ、核の凝縮と DNA の断片化がみられた。この形態学的な変化が観察されたことにより RNase Po1 の添加によってアポトーシスが誘導されている可能性が示唆された。

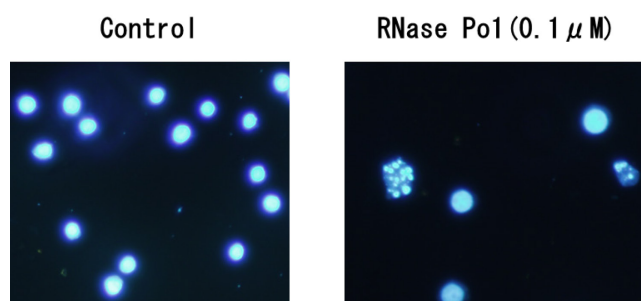


Fig. 30 RNase Po1-induced cell shrinkage and fragmentation in HL-60 cells stained with Hoechst 33342.

3-6. RNase Po1 の HL-60 細胞に対するアポトーシスの検討

[フローサイトメトリー分析]

RNase Po1 の HL-60 細胞に対する作用をより詳細に検討するために、フローサイトメトリー分析をおこなった。HL-60 細胞 (3×10^5 cells/mL) に $0.1 \mu\text{M}$ 、 $0.3 \mu\text{M}$ の RNase Po1 を各々加えて 72 時間培養後、Annexin V-FITC、および PI で染色し、フローサイトメトリー分析をおこなったところ、濃度依存的に細胞質フォスファチジルセリンの露出が観察され RNase Po1 がアポトーシスを誘発していることが分かった (Fig. 31)。

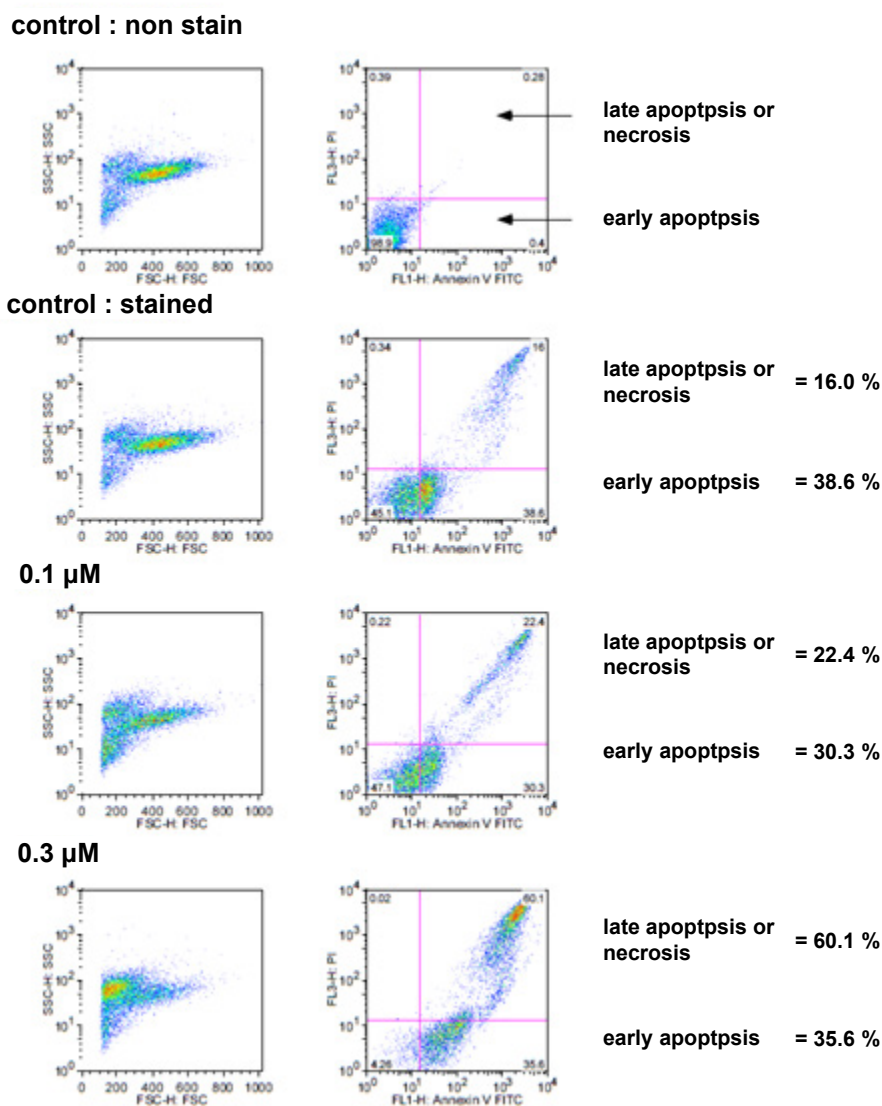
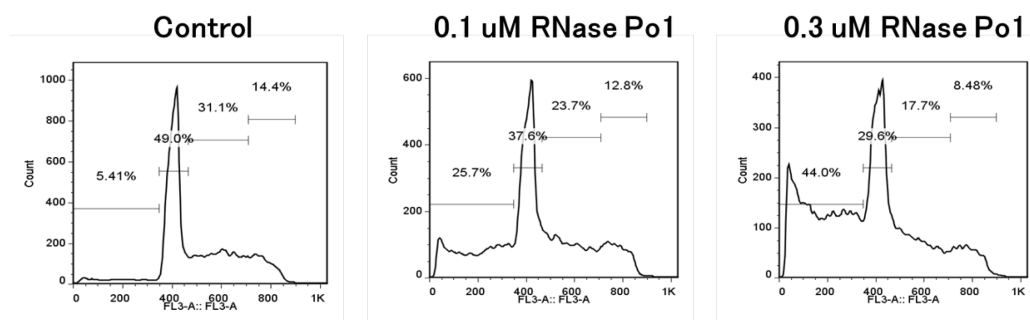


Fig. 31 RNase Po1 induce apoptosis in HL-60 cells after 72 h.

HL-60 cells were treated with different concentrations (0, 0.1, 0.3 μM) of RNase Po1 for 72 h, and were stained with Annexin V-FITC and PI dye for flow cytometric analysis.

[細胞周期の検討]

また細胞周期に対する影響を検討するために、HL-60 細胞 (3×10^5 cells/mL) に $0.1 \mu\text{M}$ および $0.3 \mu\text{M}$ の RNase Po1 を加えて 72 時間培養後、PI で染色し解析をおこない細胞周期の各ステップの細胞数を検討した。その結果、濃度依存的に G0/G1 期、S 期および G2/M 期のシグナルが減少し、Sub-G1 期のシグナルの増加が確認できた。したがって、RNase Po1 が HL-60 細胞の S 期への移行を妨げていると考えられた (Fig. 32)。



Sample	Sub-G1	G0/G1	S	G2/M
Control	5.41%	49.0%	31.1%	14.4%
0.1 μM RNase Po1	25.7%	37.6%	23.7%	12.8%
0.3 μM RNase Po1	44.0%	29.6%	17.7%	8.48%

Fig. 32 Frequency distribution histograms of cellular DNA content for HL-60 cells from RNase Po1-treated culture.

HL-60 cells were treated with different concentrations (0, 0.1, 1.0 μM) of RNase Po1 for 48 h, and were stained with PI dye for flow cytometric analysis.

第4節 考察

RNase Po1 は、ヒト神経芽腫細胞 IMR-32 ($IC_{50} = 0.8 \mu M$) および SK-N-SH ($IC_{50} = 6.0 \mu M$) で増殖抑制作用を示し、ヒト白血病細胞では、HL-60 ($IC_{50} = 0.2 \mu M$) および Jurkat ($IC_{50} = 4.0 \mu M$) で示した。したがって、RNase Po1 は、HL-60 細胞に対する増殖抑制作用が最も強く、3種の神経芽腫細胞株の中では IMR-32 に対して最も高い増殖抑制作用を示した。これに対して RNase T1 は、ヒト神経芽細胞およびヒト白血病細胞のどの細胞に対してもそれほど強い増殖抑制作用は示さなかった。

Rana pipiens 由来 RNase A ファミリー酵素である onconase は代表的な抗腫瘍性 RNase で、ヒト神経芽腫細胞株およびヒト白血病細胞 HL-60 細胞に対して強い抗腫瘍作用を有することが報告されている^{2,3})。RNase Po1 と onconase の増殖抑制作用を比較すると、IMR-32 細胞および HL-60 細胞に対する RNase Po1 の増殖抑制作用は、onconase の約 10 分の 1 程度であった。

Hoechst 33342 染色およびフローサイトメトリー分析の結果から、RNase Po1 は HL-60 細胞に対して onconase と同様に濃度依存的にアポトーシスを誘発し、HL-60 細胞の形態学的変化が検出され、細胞周期上 sub-G1 期の細胞を増加させて S 期への移行を妨げることが明らかとなった。IMR-32 は、他の神経芽腫細胞よりも、転写因子である癌遺伝子 n-myc が高発現されていることが報告されている⁶⁷)。また HL-60 細胞においても、より高いレベルで癌遺伝子 c-myc を増幅および発現されていることが報告されている⁶⁸)。c-myc の発現を阻害すると HL-60 細胞のアポトーシスが誘導されることが報告されており⁶⁹)、RNase Po1 は myc ファミリーの調節に関与している可能性が考えられる。

以上のことから、RNase T1 ファミリーに属する RNase Po1 は、RNase A ファミリーの onconase と同様に、ヒト腫瘍細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することを明らかにした。キノコなどの下等生物から分離された抗腫瘍活性を示す RNase は、ヒトなどの脊椎動物が有する RNase 阻害剤やプロテアーゼに対して耐性がある可能性が考えられ、RNase Po1 によるアポトーシスのメカニズムのさらなる研究は、新しい抗がん剤の開発につながる可能性があると考えられる。

一方、RNase T1 は RNase Po1 と高いホモロジーを有しながら、これらヒト腫瘍細胞に対してほとんど増殖抑制作用を示さない。両者の酵素化学的性質を比較すると、RNase Po1 は至適温度が RNase T1 よりも約 20 °C 高く、pH や非特異的プロテアーゼに対しても RNase Po1 の方が高い安定性を示すことがわかった。これは、RNase T1 には局在しない 4 つの Cys7、Cys48、Cys82 および Cys84 のシステイン残基を有するためである可能性が考えられる (Fig. 33)。また、RNase T1 ($pI = 2.9$)⁹) や他の RNase T1 ファミリー酵素とは異なり、RNase Po1 は onconase⁶¹)、 α -sarcin^{33,34}) と同様に等電点 ($pI = 9.0$) が高い。RNase Po1 と RNase T1 のアミノ酸組成を比較すると、アルギニン残基が RNase T1 には 1 残基のみであるのに対して RNase Po1 は 8 残基有している。また、RNase T1 がグルタミン酸残基とアスパラギン酸残基をそれぞれ 6 残基ずつ有するのに対して、

RNase Po1 は3残基ずつと少ない。つまり、RNase Po1 はRNase T1 に比べて酸性アミノ酸が少なく塩基性アミノ酸が多く弱塩基性タンパク質であると言える (Table 10)。

Johnson et al.は、強い抗腫瘍作用が知られている onconase が、弱塩基性タンパク質であるために細胞膜に静電的に結合し細胞内に導入されることを示唆している⁷⁰⁾。また、Llinskaya et al.は、 α -sarcin も弱塩基性タンパク質であり、onconase と同じメカニズムによって細胞内に導入されることを報告している⁷¹⁾。前述のとおり RNase Po1 は弱塩基性タンパク質であるため、これらと同様に細胞膜に結合する可能性がある。このことは、報告されている RNase T1 ファミリー酵素の pI 値が α -sarcin を除いて pH 4.5 以下の弱酸性側にあり、抗腫瘍性の RNase T1 ファミリー酵素の報告がないことと一致している。



Fig. 33 Comparison of the amino acid sequences of RNase Po1 and T1

The sequences in common are enclosed in boxes. The numbers above and below the matrix show RNase Po1 and RNase T1 numbering, respectively.

The disulfide bonds of RNase T1 are shown by ——— ; The disulfide bonds of RNase Po1 are shown by -----.

Table 10 Amino acid composition of RNase Po1 and RNase T1

Amino acid	RNase Po1	RNase T1
Asp	3	6
Asn	6	9
Glu	3	6
Gln	2	3
Ser	11	15
Gly	14	12
His	2	3
Arg	8	1
Thr	9	6
Ala	7	7
Pro	5	4
Tyr	4	9
Val	7	8
Met	0	0
1/2Cys	6	4
Ile	2	2
Leu	1	3
Phe	11	4
Lys	0	1
Trp	0	1
Total	101	104

第5節 小括

1. RNase Po1 は *P.ostretus* から得られた RNase T1 ファミリー酵素で、RNase T1 と同一の触媒部位を有し、一次構造上 40% のホモロジーを有する。RNase Po1 の cDNA は成熟タンパク質 101 残基とシグナルペプチド 25 残基からなっていた。大腸菌による発現系を構築し精製を行い、培養液 2L から 7 つのステップを経て 34% の収率で約 5 mg の精製標品を得た。
2. RNase Po1 は至適 pH が RNase T1 と同様に pH 7.5 で、90 °C で 5 分間暴露しても約 80% の酵素活性を保持している。しかし RNase Po1 の等電点は pI 9.0 であり、RNase T1 の pI 2.9 より高い。RNase Po1 は pH 2.0-11.0 の範囲で安定であるのに対して、RNase T1 は pH 5.0 より酸性側で酵素活性が 40% 程度にまで減少する。RNase Po1 の至適温度は 70 °C であり、RNase T1 よりも 20 °C 高く、温度に対して安定性が高い。また、非特異的プロテアーゼによる消化に対して、RNase T1 よりも抵抗性が高かった。
3. RNase Po1 のヒト神経芽腫細胞に対する増殖抑制作用は、IMR-32 株で高く終濃度 3 μM の添加で生存細胞数が 10% 以下にまで減少した。同じくヒト神経芽腫細胞である SK-N-SH 株では、終濃度 6 μM の添加で生存細胞数が 40% 程度であった。これに対して、RNase T1 では IMR-32、SK-N-SH 両株に対して終濃度 6 μM 添加しても生存細胞数が 60% 程度に減少するにとどまった。NB-32 株では両酵素ともに 10 μM の添加でも生存細胞数に大きな変化は見られないことが分かった。
4. ヒト白血病細胞である HL-60 細胞および Jurkat 細胞に対しては、RNase T1 はそれほど強い増殖抑制作用は示さなかったが、RNase Po1 は、HL-60 細胞に対して終濃度 1 μM の添加で生存細胞数が 5% 程度にまで減少し強い増殖抑制作用を示した。Jurkat 細胞に対しても終濃度 10 μM の添加で生存細胞数が 20% 程度に減少し、強い増殖抑制作用を示した。
5. RNase Po1 を添加した HL-60 細胞を Hoechst33342 染色したところ、クロマチンの凝縮が観察できた。また、フローサイトメトリー分析によって、HL-60 細胞に対してアポトーシスを誘発していることが観察された。細胞周期への影響を観察すると、RNase Po1 の添加量に応じて G0/G1 期、S 期および G2/M 期のシグナルが減少し、sub-G1 期のシグナルが増加することが分かった。したがって、RNase Po1 が HL-60 細胞の S 期への移行を妨げていると考えられた。

6. 以上のことより、RNase Po1 はヒト白血病細胞、ヒト神経芽腫細胞に対して増殖抑制作用を示し、HL-60 細胞に対してはアポトーシスを誘発していることが分かった。RNase Po1 と一次構造上のホモロジーが高い RNase T1 にはこの作用が見られないため、さらに詳細に RNase Po1 と RNase T1 の構造を比較検討することにより、抗腫瘍作用と構造との関連が推察できると考える。

第3章 RNase Po1 の X 線結晶構造解析と安定性の検討

第1節 はじめに

前章で明らかにしたように、RNase T1 ファミリー酵素の1つであるヒラタケ由来 RNase Po1 はヒト白血病細胞に対し顕著な増殖抑制作用を有する。しかし、RNase Po1 とは一次構造上 40%と比較的高いホモロジーを有し、活性中心も一致している *Aspergillus oryzae* 由来の RNase T1 は抗腫瘍作用を示さない。代表的な抗腫瘍性 RNase として *Rana pipiens* 由来の onconase^{2,3)}があるが、これは RNase A ファミリーに分類され、RNase Po1 と活性中心を含む高次構造が全く異なっている。RNase T1 ファミリーで抗腫瘍作用が報告されているのは、*Aspergillus giganteus* 由来のリボトキシンである α -sarcin^{33,34)}があるが、RNase T1 との一次構造上のホモロジーは低い (Fig. 34)。しかし RNase Po1 も α -sarcin^{33,34)}もどちらも、抗腫瘍作用を示さない RNase に比べて安定な構造を有しており、等電点を弱塩基性に有している。

前章で述べたとおり RNase Po1 の至適温度は RNase T1 よりも高いことから、RNase Po1 は構造的により安定であることが考えられる。これは RNase Po1 の有するシステイン残基が6残基で RNase T1 の4残基よりも多く、両者で一致しているシステイン残基は RNase T1 ファミリーで共通のもののみであることから、RNase Po1 が有するその他のシステイン残基が構成するジスルフィド結合が分子の安定性に関与していることが推測される。また、 α -sarcin^{33,34)}は4残基のシステイン残基を有しているが、いずれも RNase Po1 と一致しており、このうち2残基は RNase T1 ファミリーで共通のものであった。したがって残り2残基のシステイン残基 (Cys76 と Cys132、 α -sarcin No.) が形成するジスルフィド結合が分子の高い安定性に関わっている可能性がある。

一方、RNase Po1 はほとんどの RNase T1 ファミリー酵素と異なり等電点を弱塩基性に有している。Onconase⁶¹⁾や α -sarcin^{33,34)}はいずれも等電点が弱塩基性にあり、ヒト細胞に導入されるときに重要であることも報告されている。

そこで、RNase Po1 の X 線結晶構造解析を行い、RNase Po1 と RNase T1 の高次構造と比較し、構造と抗腫瘍活性との相関を考察する。

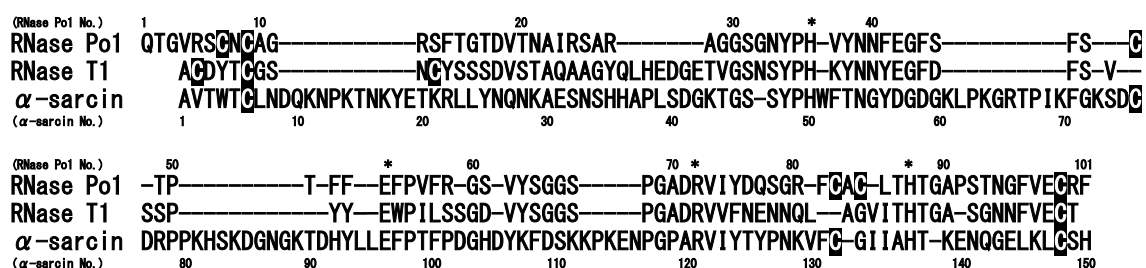


Fig. 34 Amino acid sequence comparison of α -sarcin with RNase T1 and RNase Po1
Po1: *Pleurotus ostreatus* RNase⁶²⁾, T1: *Aspergillus oryzae* RNase⁹⁾, α -sarcin: *Aspergillus giganteus* RNase⁷²⁾. *: Catalytic site. The numbers at the top of the matrix are those of RNase Po1 and the bottom are those of α -sarcin.

第2節 実験方法

1. RNase Po1 の発現、精製

RNase Po1 は前章と同様の方法で発現、精製し標品を得た。

2. RNase Po1 の結晶化

RNase Po1 (10 mg/mL) の結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法により 293K で行った。結晶は 3.5 M sodium formate、0.1 M 1,3-bis[tris(hydroxymethyl)-methylamino] propan-1,3-diol(Bis-Tris propan) (pH 7.0) in SaltRx1 (Hampton Research, Aliso Viejo, Ca, USA) でスクリーニングを行うことで得られた。データ収集に用いた結晶は、0.5 μ L のタンパク質溶液 (10 mg/mL RNase Po1 in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) と 0.5 μ L の母液 (4 M sodium formate、0.1 M Bis-Tris propane、pH 7.0、10% polyethylene glycol (PEG 400)) に 0.3 μ L の 2 M 塩化セシウムを加えて作成した。

3. データ収集と構造決定

Photon Factory (筑波) のビームライン BL-17A を用い ADSC Quantum 270 検出器を使用して、回折データを 100 K、0.9800 \AA の波長で測定した。単一の結晶からのデータは、XDS および SCALA を使用して積分とスケーリングを行った。この結晶は、空間群 P31 に属していた。構造は、BALBES および MOLREP による分子置換によって決定した。非対称ユニット内に RNase Po1 が 3 分子の存在していた。構造は COOT を使用して電子密度マップで分子モデルを手動で修正し、PHENIX.51 を使用して精密化した。最終的な Rwork と Rfree の値は、それぞれ 0.164 と 0.176 だった。PHENIX.51 を使用して MolProbity を使用して計算された構造のラマチャンドラン統計を行ったところ、精密化した構造は妥当であった (Table 11)。

Table 11 Data collection and refinement statistics

Parameter	RNase Po1
Date collection	
Beamline	Photon Factory BL-17A
Wavelength (Å)	0.9800
Space group	$P3_1$
Cell dimension (Å)	$a=b=75.56, c=34.80$
Resolution (Å)	37.78-1.85 (1.95-1.85)
Reflections measured	136098
Unique reflections	18553
Redundancy	7.7 (5.3)
Completeness (%)	99.6 (84.7)
R_{merge} (%) ^a	15.7 (62.7)
Mean I/σ (I)	10.1 (2.5)
Refinement	
Resolution (Å)	32.72-1.85
Number of reflections	18541
$R_{\text{work}}^b/R_{\text{free}}^c$	0.164 / 0.176
R.m.s deviations	
Bond length (Å)	0.0034
Bond angles (°)	0.782
Ramachandran analysis	
Favored/allowed (%)	98.7 / 1.3

Values in parentheses are for the highest-resolution shell.

- a $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_i |I(\text{hkl}; i) - \langle I(\text{hkl}) \rangle|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_i I(\text{hkl}; i)}$, where $I(\text{hkl}; i)$ is the intensity of an individual measurement, and $\langle I(\text{hkl}) \rangle$ is the average intensity from multiple observations.
- b $R_{\text{work}} = \frac{\sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||}{\sum |F_{\text{obs}}|}$, where $|F_{\text{obs}}|$ and $|F_{\text{calc}}|$ are the observed and calculated structure factor amplitudes, respectively.
- c R_{free} is the same as R_{work} , but for a 10.0% subset of all reflections for RNase Po1

4. HL-60 細胞内に導入された RNase Po1 の RNA 分解活性の測定

HL-60 細胞内の RNase Po1 または RNase T1 の量は、マーカーとして RNase 活性を使用して推定した。10%ウシ胎児血清 (Bio West、Nuaille、France) を含む PMI 1640 培地 (サーモフィッシャーサイエンティフィック株、東京) に懸濁した 3×10^5 cells/mL の HL-60 細胞 2 mL に、200 μ L の最終濃度 6 μ M の RNase Po1 または 6 μ M の RNase T1 を加え、5% CO₂ 下、37 °C で 30 分間培養した。これらを 1,500 rpm での遠心分離により細胞を収集し、PBS で 2 回洗浄した。得られた細胞ペレットを 0.1 mL の 0.5% TritonX-100 を含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 0.1 mL に懸濁し、2 回凍結融解した後、再度遠心分離した。上清の RNase 活性を常法により測定した (HL-60 細胞内 RNase 活性)。細胞に加えた各 RNase の総活性に対する HL-60 細胞内 RNase の総活性の比を求め、RNase Po1 と RNase T1 で比較した。

5. 細胞透過性ペプチドを用いた HL-60 細胞への RNase の導入

細胞透過性ペプチド (cell-penetrating peptide ; CPP) はタカラバイオ株 (滋賀) の Xfect Protein Transfection 試薬を使用し、マニュアルにしたがって行った。ヒト白血病細胞株 HL-60 は、JCRB 細胞バンク (大阪) から購入した。HL-60 細胞は、10%ウシ胎児血清を補充した RPMI 1640 で培養したのち、細胞を遠心分離によって収集し、ウシ胎児血清を含まない RPMI 1640 に懸濁し、 1.5×10^6 cells/mL に希釈した。細胞懸濁液 110 μ L を 96 ウェルプレートの各ウェルに加え、Millipore filter (Millex-GV) で事前にろ過した最終濃度 0.1 または 1.0 μ M の RNase Po1 または RNase T1 20 μ L を Xfect Protein Transfection 試薬と混和し 30 分間反応後、細胞に加えた。5% CO₂ 下、37 °C で 18 時間培養した後、10 μ L の 0.5% 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole (MTT) (株同仁化学研究所、熊本) を加え、5% CO₂ 下、37 °C でさらに 2-3 時間反応させた後、630 nm での吸光度を測定した。細胞の増殖抑制作用は、RNase Po1 または RNase T1 を加えないで培養したときの細胞数を 100% として、RNase Po1 または RNase T1 を加えて培養したときの生存細胞数の減少率を算出した。

第3節 結果

3-1. RNase Po1 の精製・結晶化・構造決定

発現用大腸菌の培養上清 2 L を出発原料として精製し、およそ 17 mg (35,000 units) の RNase Po1 を得た。標品は SDS-PAGE で均一性を確認した (Fig. 35)。この精製標品をハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化し、得られた結晶は space group P31、 $a=b=75.56$ (Å)、 $C=34.80$ (Å) であった。X 線結晶構造解析を行った RNase Po1 の構造は分子置換法 (Molecular Replacement method) により解明し、最終的に分解能 1.85 (Å) で Rwork、Rfree 各々 0.164、0.176 で精密化した。

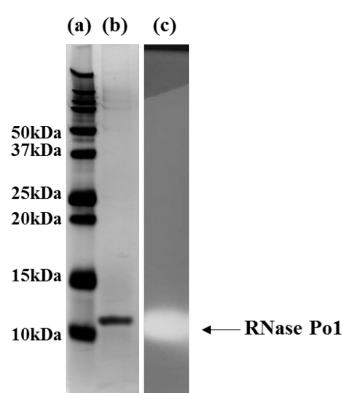


Fig. 35 Tricine-SDS-PAGE (15% Slab-Gel) of RNase Po1

Purified RNase Po1 was homogeneous according to Tricine-SDS-PAGE. Tricine-SDS-PAGE was performed using a 15% polyacrylamide gel. (a) Silver staining of molecular marker proteins. (b) Silver staining of RNase Po1. (c) Activity staining of RNase Po1 using RNA as the substrate.

3-2. RNase Po1 の立体構造

[RNase Po1 の立体構造]

RNase Po1 は卵形の構造をしており、 α -helix (16-27 残基) と 7 つの β -strand (7-9、12-14、36-38、52-56、71-76、82-86、97-98 残基) を有する ($\alpha+\beta$) タイプの構造であった (Fig. 36)。RNase Po1 の精密化モデルでは、 α -helix が 3.5 回転しており、RNase T1 の 4.5 回転より少なかった。RNase Po1 は、RNase T1 と同様に α -helix が背骨のように分子内に横たわり、4 本の β 4-6-strand が逆平行に β -シート構造 (36-38、52-56、71-76、82-86) を形成し、 α -helix を横切る構造となっていた (Fig. 37a)。

RNase T1 の触媒部位とされている 4 つのアミノ酸残基 (His40、Glu58、Arg77) は、 β 3-6strands (His40、Glu58、Arg77) と β 6 strand のとなり (His92) に局在している (Fig. 37c)。また、RNase T1 のホスホジエステル結合の加水分解におけるエステル転位反応のステップにおいて、His40 または Glu58 が ribose 2'-hydroxyl group に対し一般塩基としてはたらき、His92 が一般酸としてはたらき遊離した 5'-hydroxyl group にプロトンを与えることが報告されている⁷³⁾。RNase T1 の触媒部位に相当する RNase Po1 のアミノ酸残基は His36、Glu58、Arg72、His87 であり、RNase T1 と同様に β 3-6-strand (His36、Glu58、Arg72) と β 6-strand のとなり (His87) に局在していた。

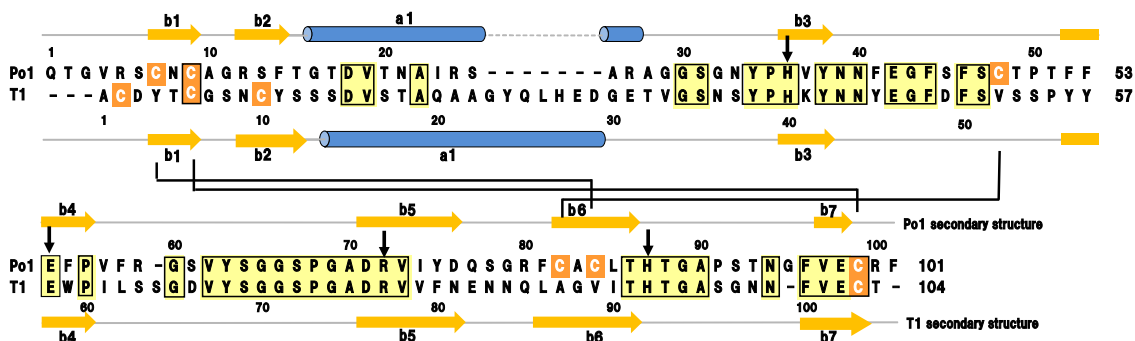


Fig. 36 Primary and Secondary Structures of RNase Po1 and RNase T1

Po1, RNase Po1; T1, RNase T1. Sequences in common are enclosed in boxes. Numbers above and below the matrix show RNase Po1 and RNase T1 numbering, respectively. The cysteine residues are shaded, and the disulfide bonds of RNase Po1 are shown as connected by bold lines. The catalytic site residues are indicated by arrows. Secondary structures are denoted as follows: a1, α -helix; bn, strand of β -sheet structure.

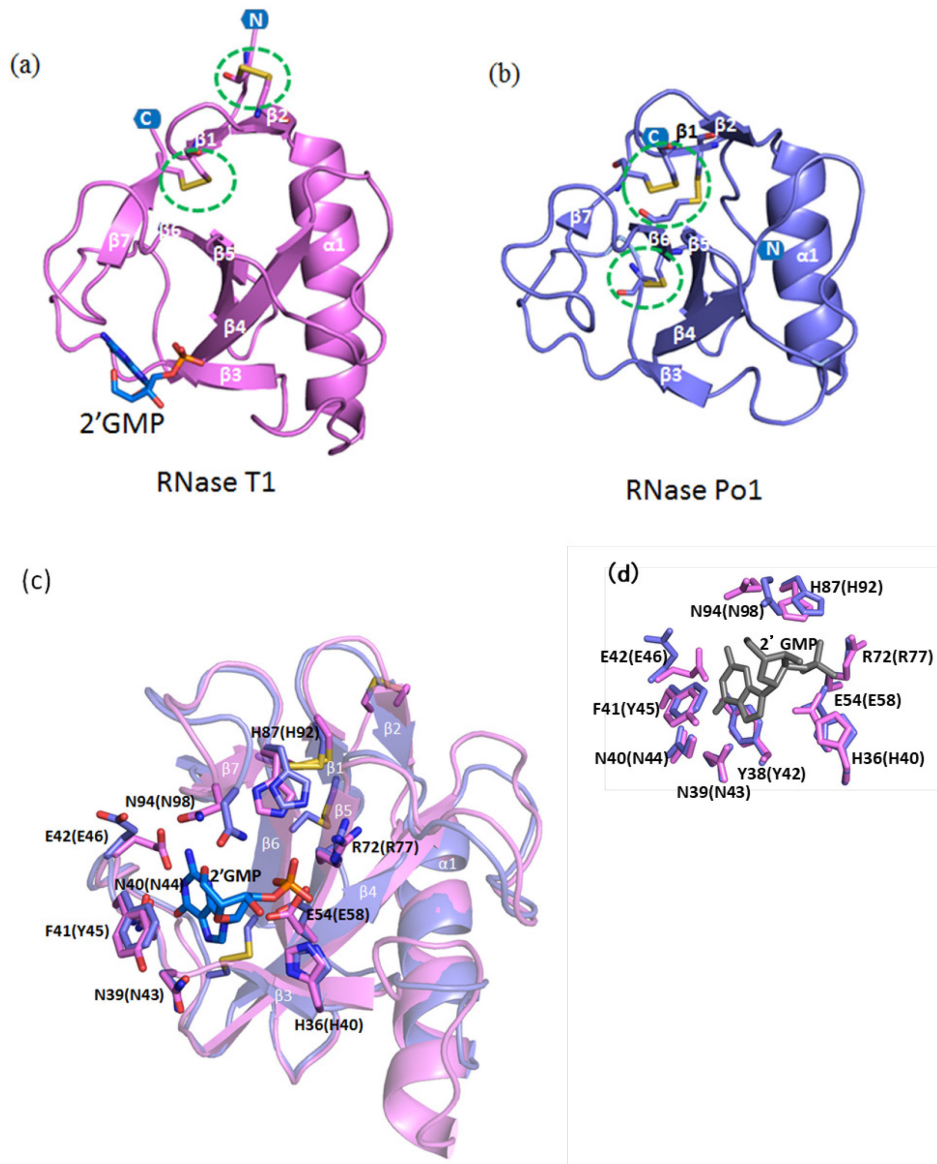


Fig. 37 Tertiary Structures of RNase Po1 and RNase T1

The figure was drawn with PyMOL (<http://pymol.sourceforge.net>). (a), (b) The N- and C-termini are labeled N and C, respectively. The α -helices and β -strands are marked $\alpha 1$ and $\beta 1-7$, respectively. The circles enclose disulfide bonds. (a) RNase T1 is colored pink (PDB ID: 2BU4, Proteins 1999, 36, 117–134), 2GMP is shown as sticks colored blue and red. (b) RNase Po1 is colored blue (PDB ID: 3WH0). (c) Structural overlay of RNase Po1 with that of the RNase T1/2-GMP complex. 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. (d) The active site of RNase Po1 superimposed with that of the RNase T1/2GMP complex from (c). 2GMP is gray. In (c) and (d), the amino acid numbers of RNase Po1 are shown first and those of RNase T1 follow in parentheses.

RNase T1 の塩基認識部位は、Tyr42、Asn43、Asn44、Tyr45、Glu46、Asn98 で構成され、 β 3-strand と β 4-strand の間のループ構造 (Asn43、Asn44、Tyr45、Glu46) と β 6-strand と β 7-strand の間のループ構造 (Asn98) に局在し、Tyr42 と Tyr45 の芳香環でグアニン塩基を挟んでいる (Fig. 37d)。これに相当する RNase Po1 のアミノ酸残基は、Tyr38、Asn39、Asn40、Phe41、Glu42、Asn94 であり、RNase T1 と同様に β 3-strand と β 4-strand の間のループ構造 (Asn39、Asn40、Phe41、Glu42) と β 6-strand と β 7-strand の間のループ構造上 (Asn94) に局在し、Tyr38 (β 3-strand) と Phe45 の芳香環でグアニン塩基を挟んでいると推測される。RNase T1 の Glu58、Arg77、His92 が有する 3 つの親水性の側鎖は、 α -helix と反対側の β -シート上にクラスターを形成するが、RNase Po1 では Glu54 (β 4-strand)、Arg72 (β 5-strand)、His87 (β 6-strand のとなり) がこれに相当する。

また、RNase Po1 の β 4-6 シートは分子内部に存在し 16 残基中 8 残基の疎水性アミノ酸を含んでおり、RNase T1 が 17 残基中 9 残基の疎水性アミノ酸を有しているのと同様であった。RNase Po1 の β 4-6 シート上の疎水性アミノ酸残基がつくるクラスターは RNase T1 と同様に、 α -helix の反対側に有り α -helix を横切るように疎水コアを形成していた (Fig. 38)。

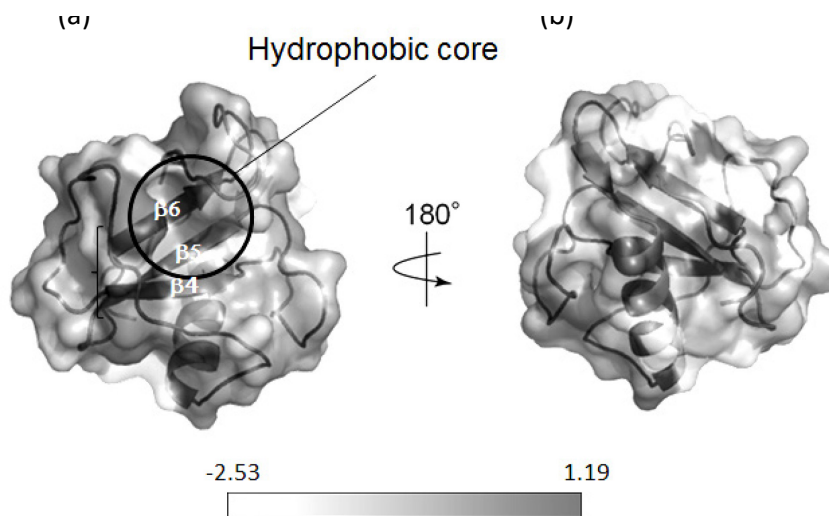


Fig. 38 Hydrophobicity of the RNase Po1 Molecular Surfaces

The figure was drawn with PyMOL (www.pymolwiki.org/index.php/Color_h). The molecules are shown as ribbons and surface models. The figure (b) is rotated horizontally by 180° by the center. β_n , strand of β -sheet structure. The hydrophobic regions are colored gray and the deepness of the dark color shows hydrophobic strength. The circles enclose the hydrophobic core.

[RNase Po1 のジスルフィド結合]

RNase Po1 の有する 6 残基のシステイン残基は、Cys9-Cys99、Cys7-Cys84、Cys48-Cys82 の 3 組のジスルフィド結合を有していた (Fig. 39)。Cys9-Cys99 は RNase T1 の Cys6-Cys103 に相当し細菌を除くすべての RNase T1 ファミリーに共通して存在する。RNase Po1 の他の 2 組のジスルフィド結合 (Cys7-Cys84、Cys48-Cys82) は RNase T1 のどのジスルフィド結合とも一致しない。Cys7-Cys84 は Cys9-Cys99 と平行して存在し、RNase T1 よりも N 末端と C 末端をより強固に結合させている。Cys48-Cys82 は、Cys7-Cys84 の反対側の活性中心の近傍に局在し、 $\beta 6$ -strand と $\beta 3$ strand と $\beta 4$ -strand の間のループ構造を結合している。このループ上には塩基認識部位を構成していると考えられているアミノ酸残基 (Asn39、Asn40、Phe41、Glu42) が局在し、 $\beta 6$ -strand の隣には触媒部位の 1 つである His87 が局在している。したがって、Cys48-Cys82 は塩基認識部位と触媒部位をより安定化していると考えられる。

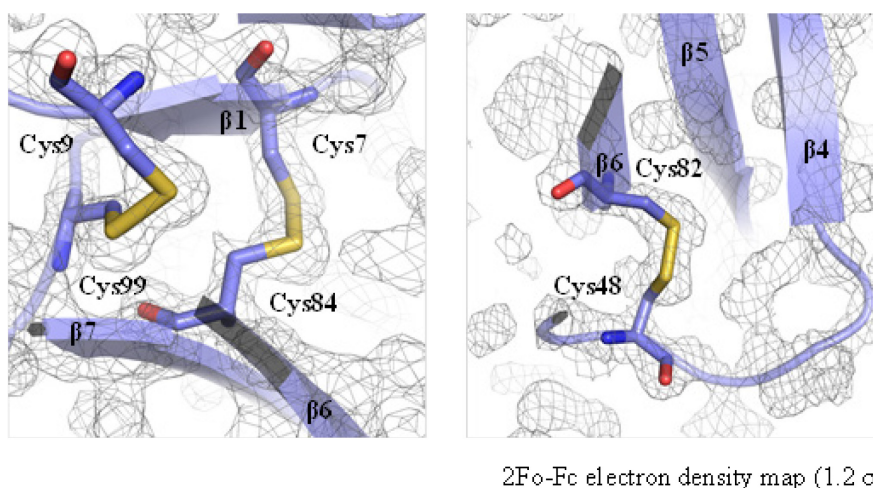


Fig. 39 The Electron Density Associated with the Disulfide Bonds Is Shown

The cysteine residues and disulfide bonds are shown as sticks colored blue and yellow, respectively. The contour level is 1.2 σ . βn , strand of β -sheet structure. (Color images were converted into gray scale.)

3-3. HL-60 細胞内に導入された RNase Po1 の RNA 分解活性の測定

HL-60 細胞内に導入された RNase Po1 と RNase T1 量を比較した (Table 12)。HL-60 細胞内の RNase Po1 と RNase T1 はそれぞれ 17.78×10^{-3} 、および 2.48×10^{-3} units であった。加えた RNase 活性量 (units) に対する細胞内 RNase 活性量 (units) の比を比較すると、RNase Po1 は RNase T1 のおよそ 4 倍高い RNA 分解活性を示した。したがって、RNase Po1 は RNase T1 よりも HL-60 細胞内に導入され易く、また細胞内でも RNA 分解活性を保持していると考えられた。

Table 12 Internalization of RNase Po1 and RNase T1 in HL-60 cells.

RNase	RNase activity in cells (units)	RNase applied to cells (units)	$\frac{\text{RNase activity in cells}}{\text{RNase applied to cells}} \times 100$ (%)
RNase T1	2.49×10^{-3}	11.8	0.021
RNase Po1	17.78×10^{-3}	21.2	0.084

3-4. 細胞透過性ペプチドを用いた HL-60 細胞への RNase の導入

RNase Po1 と RNase T1 に細胞透過性ペプチド (CPP) を用いて HL-60 細胞に導入し 18 時間培養したところ、RNase Po1 では濃度に依存して CPP 未処理のものよりも生存細胞数が減少し、0.1 μM の RNase Po1 の添加で 80%、1.0 μM の添加で 40%弱にまで低下した (Fig. 40)。これに対して RNase T1 では、1.0 μM 添加しても生存細胞数がほとんど減少しなかった。したがって、CPP を用いて HL-60 細胞に導入したとき RNase Po1 は RNase T1 よりも生存細胞数を大きく減少させることがわかった。

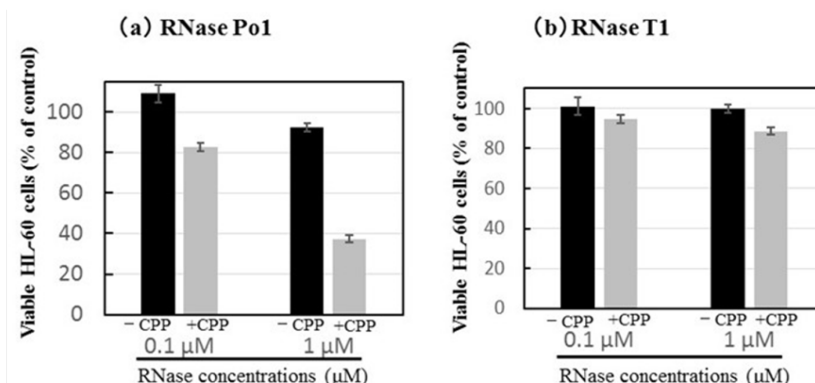


Fig. 40 Effect of RNase Po1 and RNase T1 with Cell-Penetrating Peptide on the Proliferation of HL-60 Cells by MTT Assay

HL-60 cells were treated with a given concentration of RNase Po1 or RNase T1 with or without cell-penetrating peptide (CPP). Viable cells were counted by MTT assay after 18 h of incubation at 37 °C under 5% CO₂. Cell proliferation without RNase was normalized to 100%. The graphs of -CPP show cell proliferation without CPP and are colored black, and those of +CPP show cell proliferation with CPP and are gray. The data represent the means and standard errors of three independent experiments, each performed in triplicate. (a), RNase Po1. (b), RNase T1.

第4節 考察

RNase Po1 と RNase T1 は 40% の高いホモロジーを有し、触媒部位は完全に一致している。両酵素はグアニン塩基特異的で RNA に対する至適 pH を 7.5 に有し、比活性も同程度である。しかし、RNase Po1 はいくつかのヒト腫瘍細胞に対して増殖抑制作用を示すが、RNase T1 はまったく増殖抑制作用を示さない。

RNase Po1 の X 線結晶構造解析を行い RNase T1 と比較したところ、RNase Po1 は α -helix が 3.5 回転しており、4.5 回転している RNase T1 よりも長さが短く球状であった。両者の触媒部位は一致しており、4 つの β -strand (β 3-6) からなっていた。両者の分子表面の荷電状態を比較してみると、触媒部位周辺は同様であるが、他に領域はかなり異なっていた。

両者のアミノ酸配列から疎水精度を比較してみると、RNase Po1 は RNase T1 よりも 50-60 残基の間でより疎水性が高い。これは、RNase T1 では Tyr56、Tyr57 と Trp59 に該当するアミノ酸が、RNase Po1 では 3 つともフェニルアラニン (Phe52、Phe53、Phe55) であるためである。また、この領域には β 4-strand 上の活性触媒部位の 1 つである Glu5 残基 (RNase Po1 では 54 番目、RNase T1 では 58 番目) が局在している (Fig. 41)。

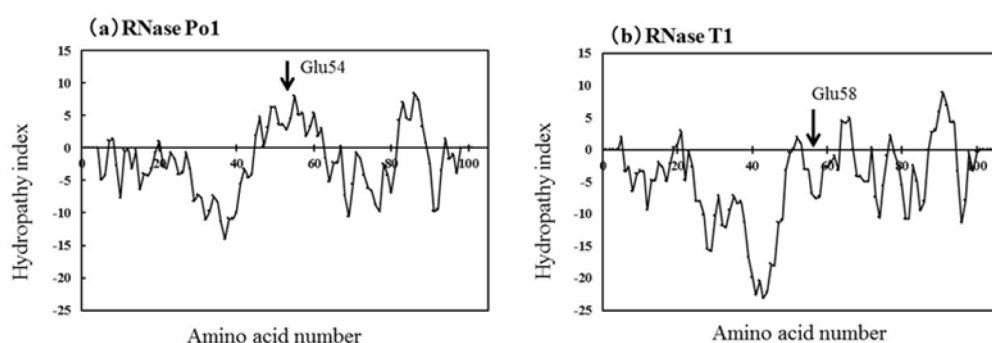


Fig. 41 Hydropathy Profiles of the Amino Acid Sequences of RNase Po1 and RNase T1

The hydropathy profiles were calculated by ExPASy Tools (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>). Glu 54 (RNase Po1) and Glu58 (RNase T1) residues are denoted by arrows.

RNase Po1 と RNase T1 の分子表面の疎水性を比較してみると、RNase Po1 の触媒部位における疎水性領域は RNase T1 よりも大きい、他の領域の疎水性は類似していることが確認された (Fig. 42)。したがって、RNase Po1 の触媒部位は広い疎水性領域を形成することにより、より安定していると考えられる。

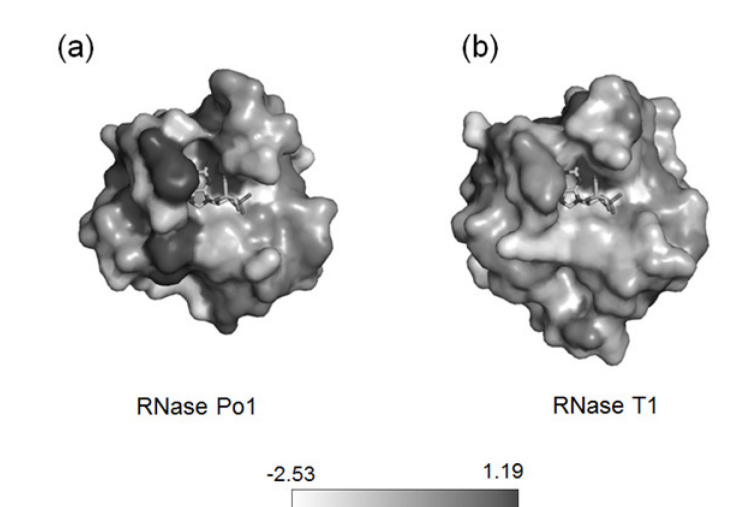


Fig. 42 Hydrophobicity of the RNase Po1 and RNase T1 Molecular Surfaces

The figure was drawn with PyMOL (www.pymolwiki.org/index.php/Color_h). RNase Po1 and RNase T1 are shown as surface models. The figures are viewed from the same direction as Fig. 38. The hydrophobic regions are colored gray and the deepness of the dark color shows hydrophobic strength. 2GMP is shown as sticks.

RNase Po1 と RNase T1 の分子表面の荷電状態を比較したところ、触媒部位の裏側では RNase Po1 はより正に荷電しているのに対して、RNase T1 は負に荷電していた (Fig. 43)。RNase Po1 はアルギニン残基を RNase T1 の 1 残基よりもはるかに多い 8 残基有しており、そのうちの 5 残基が分子表面に局在しているために分子表面を正荷電にしている。抗腫瘍性 RNase が細胞分子内の RNA を攻撃するためには細胞内に導入されなければならない。Johnson らの報告⁷⁰⁾によると、強い抗腫瘍活性を有する *Rana pipiens* 由来 RNase A ファミリー酵素である onconase は、3 つの高密度の正に荷電した領域 (patch) を有しており、onconase の細胞毒性発現に必要な (細胞膜上の) 脂質二重層における転移反応のステップでこの高密度の正に荷電した領域 (patch) が非常に重要であるとされている⁷⁴⁾。したがって、RNase Po1 の分子表面の正荷電領域は、腫瘍細胞の細胞膜に電氣的に結合するのに重要であると推測できる。

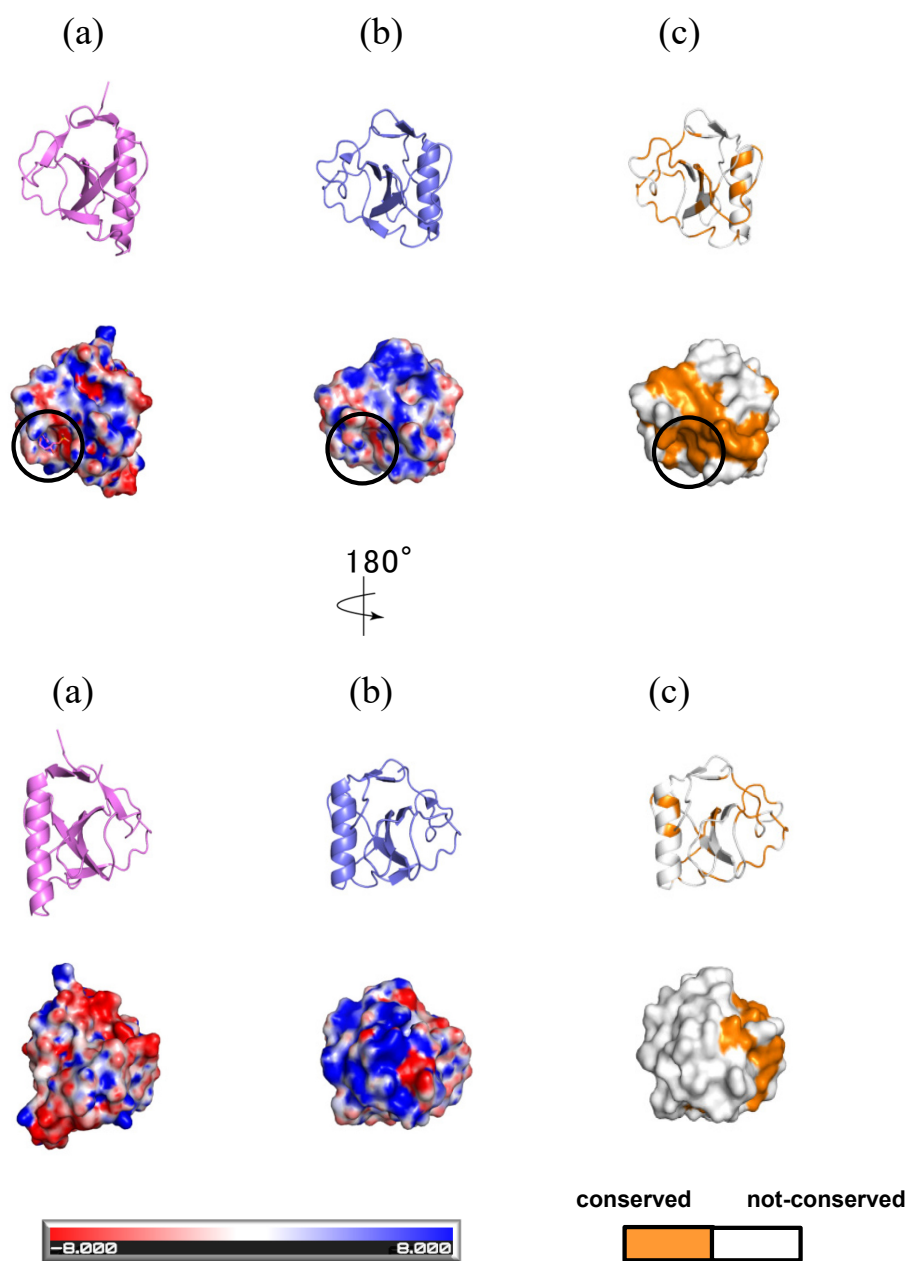


Fig. 43 Electrostatic Potentials of the RNase Po1 and RNase T1

Molecular Surfaces and Conserved Regions between Them The surface potential was calculated and displayed using the PyMOL ABPS tool.⁷⁵⁾ The central figures are viewed from the same direction as Fig. 37. The lower figures are rotated horizontally by 180° by the center. The circles enclose the active site. (a), (b) Electrostatic potentials of the RNase Po1 and RNase T1 molecular surfaces, respectively. The molecules are shown as ribbons and surface models. Negatively charged regions are shown in red, and positively charged regions are shown in blue. RNase T1 (a) is pink and RNase Po1 (b) is blue. (c) Conserved regions between the RNase Po1 and RNase T1 molecular surfaces. RNase Po1 is shown as ribbon and surface models. The conserved regions are colored orange and the others colored white.

Aspergillus giganteus 由来の α -sarcin はリボトキシンとして知られており RNase T1 ファミリーと同様の触媒部位を有していることが報告されている^{33, 34}。 α -sarcin は、 α -ヘリックス (RNase Po1 より小さい) に対して逆平行に β シートが横切っているように構成され、RNase Po1 と同様に、その反対側に触媒部位を有している⁷⁶。しかし、触媒部位以外では α -sarcin と RNase Po1 とのホモロジーは低く、正荷電のアミノ酸残基の挿入がみられる。その1つは N 末端の β ヘアピン構造 (Leu7-Arg22) で、これは細胞膜との相互作用に参与していることを示唆しているが、その他の挿入配列はリボソームと相互作用する非構造化ループである (Fig. 44)⁷⁷。RNase Po1 はこのような構造を有さないことから、 α -sarcin とは異なる手段によって腫瘍細胞の細胞膜に結合する可能性が高い。

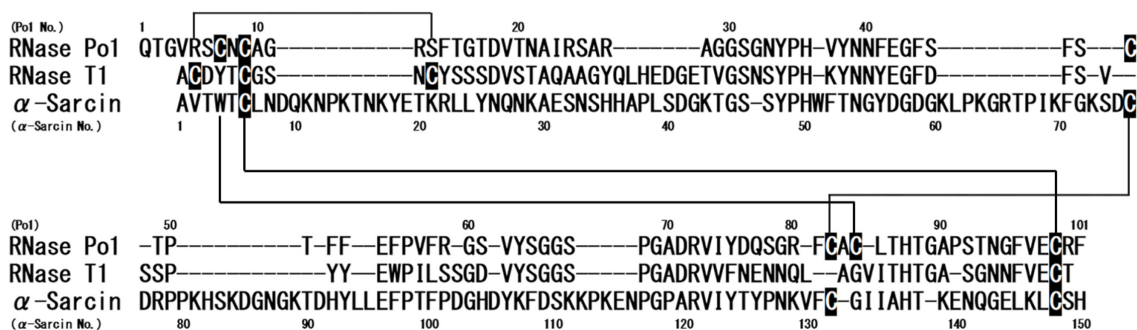


Fig. 44 Comparison of the Amino Acid Sequence of α -sarcin with RNase T1 and RNase Po1
Po1: *Pleurotus ostreatus* RNase⁶², T1: *Aspergillus oryzae* RNase⁹, α -sarcin: *Aspergillus giganteus* RNase⁷². Disulfide bonds of RNases are shown connected by bold lines. The numbers at the top of the matrix are those of RNase Po1 and the bottom are those of α -sarcin.

X線結晶構造解析の結果より、RNase Po1 は RNase T1 よりも1組多い3組のS-S結合を有していることがわかった。RNase Po1 の Cys9-Cys99 ジスルフィド結合は、真菌由来のすべての既知の RNase T1 ファミリー酵素で保存されているが、RNase Po1 が有する他の2組のジスルフィド結合 (Cys7-Cys84 および Cys48-Cys82) に対応する結合は、RNase T1 にはない。RNase Po1 の Cys7-Cys84 結合は、RNase Po1 の C 末端と N 末端がより安定化するのに貢献している。また、RNase Po1 のグアニン塩基認識部位はループ構造にもかかわらず Cys48-Cys82 結合によって触媒部位と結合しているために安定化されている。これに対して、RNase T1 の N 末端を α 2 鎖に接続するジスルフィド結合 Cys2-Cys10 は、RNase Po1 には存在しないが、触媒部位から遠くにあるためタンパク質の安定性にほとんど影響を与えないと考えられ、RNase T1 は RNase Po1 ほど立体構造が安定化していない。

前章でも述べたように RNase Po1 の至適温度は 70 °C であり、RNase T1 の 50 °C よりも高い。また、野村らは、タンパク質のペプチド骨格の立体構造を反映する 210 nm における円二色性 (CD) スペクトルの温度変化を検討した⁶²⁾。その結果 RNase Po1 では $[\theta]_{210\text{ nm}}$ の値は 60 °C まで維持され、その後、温度上昇とともに急速に減少した。これに対し、RNase T1 では二相的に減少し、40 °C と約 60 °C で大きく減少した。40 °C 付近での最初の急激な減少は、RNase T1 の酵素活性の減少に対応していた。おそらく、RNase T1 は温度上昇に伴い RNase T1 ファミリー酵素に共通のジスルフィド結合が最初に熱変性を受け、酵素活性を保持できなくなり失活すると推測できる。これに対して RNase Po1 では、RNase T1 ファミリーに共通のジスルフィド結合 (Cys9-Cys99) が変性を受けづらく、さらに高温にならなければ失活しないのではないかと推測される。

RNase A ファミリー酵素には抗腫瘍作用を有する onconase と有さない RNase A が報告されている。onconase は RNase A より 1 つ多い 4 組のジスルフィド結合を有しており、この RNase A が有さないジスルフィド結合は活性部位を含む C 末端側にあるため、活性部位を非常に安定化させている⁷⁸⁾。α-sarcin は 2 組のジスルフィド結合を含み、1 つはすべての既知の RNase T1 ファミリー酵素に共通であり、もう 1 つは RNase Po1 の Cys48-Cys82 結合に相当している (Fig. 44)。

RNase Po1 および RNase T1 に一定時間暴露したのち HL-60 細胞内 RNase 活性を測定したところ、RNase Po1 は RNase T1 と比べて細胞内での活性が 4 倍ほどの高い値だった。このことから、RNase Po1 は RNase T1 よりも速い速度で細胞内に取り込まれることが分かる。また、非特異的プロテアーゼにより消化してもそれほど酵素活性が低下しないことや細胞透過性ペプチドを用いて細胞内に導入した実験結果から、RNase Po1 は RNase T1 よりも細胞内で高い安定性を示しているといえる。この安定性はジスルフィド結合によるものであると考えられ、このことが抗腫瘍性 RNase の増殖抑制作用に関与している可能性があると考えられる。

第5節 小括

1. RNase Po1 の X 線結晶構造解析に分解能 1.85 (Å) で成功した。
2. RNase Po1 の三次構造は、卵形の構造をしており、 α -helix と 7 つの β -strand を有し、RNase T1 と同様に α -helix が背骨のように分子内に横たわり、4 本の β 4-6-strand が逆平行に β -シート構造を形成していた。
3. RNase T1 の触媒部位とされている 4 つのアミノ酸残基、塩基認識部位はすべて RNase Po1 でも保存されていた。
4. RNase Po1 は、Cys9-Cys99、Cys7-Cys84、Cys48-Cys82 の 3 組のジスルフィド結合を有していた。Cys9-Cys99 は細菌を除くすべての RNase T1 ファミリーに共通して存在する。RNase T1 が有さない 2 組ジスルフィド結合のうち、Cys7-Cys84 は Cys9-Cys99 と平行して存在し、RNase T1 よりも N 末端と C 末端をより強固に結合させ、Cys48-Cys82 は、Cys7-Cys84 の反対側の活性中心の近傍に局在し、触媒部位と塩基認識部位をより安定化している位置にあった。
5. RNase Po1 と RNase T1 の分子表面の疎水性を比較してみると、RNase Po1 の触媒部位における疎水性は RNase T1 よりも大きく、RNase Po1 の触媒部位が広い疎水性領域を形成することで、より安定であると考えられる。
6. RNase Po1 と RNase T1 の分子表面の荷電状態を比較したところ、触媒部位の裏側では RNase Po1 はより正に荷電しているのに対し、RNase T1 は負に荷電していた。
7. 強い抗腫瘍作用を示す *Rana pipiens* 由来 RNase A ファミリー酵素である onconase は高密度の正に荷電した領域 (patch) を有し、抗腫瘍作用を示さない RNase A より 1 組多くジスルフィド結合を有し安定である。また、RNase T1 ファミリー酵素に分類される *Aerillus giganteus* 由来のリボトキシンである α -sarcin でも、N 末端部分に正に荷電したアミノ酸が挿入され、RNase Po1 の Cys48-Cys82 結合に相当するジスルフィド結合を有していた。
8. RNase Po1 の HL-60 細胞内の RNase 活性は RNase T1 よりも高い。CCP を用いて細胞内に導入すると、より生存細胞数が減少することから、RNase Po1 は RNase T1 よりも速やかに細胞内に取り込まれ、細胞内でも安定であると推測された。

9. 以上のことから、抗腫瘍活性を示す RNase Po1 の X 線結晶構造を明らかにすることによって、RNase T1 が有さないジスルフィド結合により構造が安定化していることがわかった。また、RNase Po1 は、RNase T1 とは対照的に分子表面が正に荷電している部分が広範囲であるため、より腫瘍細胞の細胞膜に結合しやすいと考えられた。既知の抗腫瘍性 RNase との比較からも、正に荷電している領域が広範囲であること、ジスルフィド結合により安定化していることが、RNase Po1 のヒト腫瘍細胞に対する抗腫瘍活性に寄与していると思われる。今後、この研究から得られた知見を利用してさらに強い抗腫瘍活性を示す RNase Po1 変異体を作成し、RNase Po1 の構造と抗腫瘍活性の関係をさらに検討することは、新しい抗腫瘍薬の開発につながる可能性があると考えられる。

総括

本研究では、様々な角度からリボヌクレアーゼ研究を行うことでリボヌクレアーゼの多様性を示すことを目的とした。そのために、分子量が大きく塩基非特異的な RNase T2 ファミリー酵素である棘皮動物キヒトデ由来 RNase Aa および担子菌の 1 種であるヒラタケ由来 T1 ファミリー酵素である RNase Po1 を用いて研究を行い、以下の知見を得た。

1. 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、RNA を基質とした際の 1 mg 当たりの比活性は 789 units/mg であった。
2. RNase Aa は RNA を基質とした際の至適 pH が 5.0 で、基質特異性、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。
3. RNase Aa の cDNA の解析から成熟タンパク質部分は 231 アミノ酸残基からなり、40 残基のシグナルペプチドを有していた。蛋白化学的検討では 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 Asn-29-Gly30 と C 末端側の Thr210-Arg211 の間で切断されたと考えられる。RNase T2 ファミリー酵素では Tp (イカ)³²⁾、BSP1 (牛脾)²⁶⁾、PSP1 (ブタ脾)⁵⁸⁾、CL1 (ニワトリ肝)⁵⁷⁾、RCL2 (カエル肝)³¹⁾などが C 末端側で切断を受けているが、この中で N 末端側も切断を受けているのは、PSP1 (ブタ脾)⁵⁸⁾と CL1 (ニワトリ肝)⁵⁷⁾の 2 つだけである。CD スペクトルやニガウリの RNase MC1 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影響していないと考えられる。
4. 一次構造をもとに足立、長谷川らによる最尤法⁴⁷⁾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ところ、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。RNase Aa と最も近縁であるのはマガキ²⁴⁾であり、トマト⁵⁵⁾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じ後口動物に分類されるが、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った。また、下等動物の RNase は脊椎動物よりも植物に近いことなど分類学的には植物は動物とは遠い関係であった。
5. ヒラタケ由来 T1 ファミリー酵素である RNase Po1 の大腸菌による発現系を構築し、各種クロマトを用いて精製を行った。9L の大腸菌培養液より 5 mg の標品が得られ、収率は 34% であった。

6. RNase Po1 は RNase T1 と同様に、至適 pH を 7.5 に有し、温度安定性が高い。しかし RNase Po1 は、RNase T1 と比べて至適温度が 20 °Cほど高く、より広範囲の pH に対して安定性を示した。また、非特異的プロテアーゼ消化に対しても抵抗性が高かった。
7. RNase Po1 をヒト腫瘍細胞に作用させたところ、HL-60 細胞、IMR-32 神経芽腫細胞に対して強い増殖抑制作用を示した。これに対し、RNase T1 は各細胞に対してほとんど増殖抑制作用を示さなかった。また、RNase Po1 は HL-60 細胞に対してアポトーシスを誘発し、細胞周期上 S 期への移行を妨げていることが分かった。
8. 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。
9. 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 を横切るように、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。
10. RNase Po1 は 3 組の S-S 結合を有し RNase T1 よりも 1 組多い。1 組は T1 ファミリーで共通であり両者で一致しているが、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するような位置に局在していた。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。したがって、それにより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だと考えられる。
11. HL-60 細胞内に導入された RNase Po1 の RNase 活性を測定したところ、RNase T1 の約 4 倍の値を示した。また、細胞透過性ペプチド (CPP) を用いて HL-60 細胞に両酵素を導入したところ、RNase Po1 はさらに増殖抑制作用が増強されたのに対して、RNase T1 ではわずかに生存細胞数が減少したのみであり、細胞内でより安定であると考えられた。
12. 強い抗腫瘍作用が報告されている RNase A ファミリーの onconase や RNase T1 ファミリー酵素であるリボトキシンの α -sarcin のどちらも、活性部位近傍のジスルフィド結合が安定化に寄与しており、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、抗腫瘍活性を示す RNase は、構造の安定性と分子表面の荷電状態が重要であると推測できた。

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材料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、新たな抗腫瘍性 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する。

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。

主論文の基礎となる原著論文リスト

本学位論文は、以下の論文を基礎とするものである。

1. Naomi Motoyoshi, Hiroko Kobayashi, Tadashi Itagaki, Norio Inokuchi.

Amino acid Sequence analysis and characterization of a ribonuclease from starfish *Asterias amurensis*.

J Biochem. 2016;160(3),131-139

2. Hiroko Kobayashi, Naomi Motoyoshi, Tadashi Itagaki, Keiichi Tabata, Takashi Suzuki, Norio Inokuchi.

The inhibition of human tumor cell proliferation by RNase Pol, a member of the RNase T1 family, from *Pleurotus ostreatus*.

Biosci Biotechnol Biochem. 2013;77(7):1486-91

3. Hiroko Kobayashi, Takuya Katsutani, Yumiko Hara, Naomi Motoyoshi, Tadashi Itagaki, Fusamichi Akita, Akifumi Higashiura, Yusuke Yamada, Norio Inokuchi, Mamoru Suzuki.

X-Ray crystallographic structure of RNase Pol that exhibits antitumor activity.

Biological Pharmaceutical Bulletin. 2014;37(6), 968-978,

謝辞

本研究の遂行および本論文作成にあたり、終始御懇篤なる御指導御鞭撻を賜りました日本大学名誉教授 小山隆先生、教授 井口法男先生、教授 小林弘子先生に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行および本論文作成にあたり、多大な御協力と御指導を賜りました大阪大学蛋白質研究所准教授 鈴木守先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、有益な御助言と御激励を賜りました日本大学教授 村山琮明先生、准教授 廣瀬大先生、専任講師 板垣正先生に心より感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり御協力と御激励を賜りました日本大学薬学部微生物学研究室、病原微生物学研究室の方々に心から感謝申し上げます。

本論文の作成にあたり多大な御支援と御激励を賜りました日本大学薬学部薬学教育研究センター長ならびに准教授 畑春実先生、専任講師 小山由美先生に深く感謝いたします。

最後に、本研究の遂行および本論文作成にあたり様々な面で支えてくれた同僚や家族に感謝します。

参考文献

- 1) Richards FM, Wyckoff HW. 24 Bovine Pancreatic Ribonuclease. *The Enzymes*. (Boyer PD Vol. 4. Academic Press, p.^pp. 647-806 (1971).
- 2) Michaelis M, Cinatl J, Anand P, Rothweiler F, Kotchetkov R, von Deimling A, Doerr HW, Shogen K, Cinatl J, Jr.: Onconase induces caspase-independent cell death in chemoresistant neuroblastoma cells. *Cancer Lett.*, **250**, 107-116 (2007).
- 3) Darzynkiewicz Z, Carter SP, Mikulski SM, Ardelt WJ, Shogen K: Cytostatic and cytotoxic effects of Pannon (P-30 Protein), a novel anticancer agent. *Cell Tissue Kinet.*, **21**, 169-182 (1988).
- 4) Riordan JF. 14 - Structure and Function of Angiogenin. *Ribonucleases*. (D'Alessio G, Riordan JF ed.)^eds.). Academic Press, New York, p.^pp. 445-489 (1997).
- 5) Parry, Liu Y-H, Clarke, Newbigin. 6 - S-RNases and Other Plant Extracellular Ribonucleases. *Ribonucleases*. (D'Alessio G, Riordan JF ed.)^eds.). Academic Press, New York, p.^pp. 191-211 (1997).
- 6) Masaki H, Ogawa T, Tomita K, Ueda T, Watanabe K, Uozumi T: Colicin E5 as a new type of cytotoxin, which cleaves a specific group of tRNAs. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 287-288 (1997).
- 7) Smyth DG, Stein WH, Moore S: The sequence of amino acid residues in bovine pancreatic ribonuclease: revisions and confirmations. *J. Biol. Chem.*, **238**, 227-234 (1963).
- 8) Wlodawer A, Bott R, Sjolín L: The refined crystal structure of ribonuclease A at 2.0 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, **257**, 1325-1332 (1982).
- 9) Takahashi K: The amino acid sequence of ribonuclease T-1. *J. Biol. Chem.*, **240**, 4117-4119 (1965).
- 10) Watanabe H, Ohgi K, Irie M: Primary structure of a minor ribonuclease from *Aspergillus saitoi*. *J. Biochem.*, **91**, 1495-1509 (1982).
- 11) Takahashi K, Hashimoto J: The amino acid sequence of ribonuclease U1, a guanine-specific ribonuclease from the fungus *Ustilago sphaerogena*. *J. Biochem.*, **103**, 313-320 (1988).
- 12) Yoshida N, Sasaki A, Rashid MA, Otsuka H: The amino acid sequence of ribonuclease St. *FEBS Lett.*, **64**, 122-125 (1976).
- 13) Arni R, Heinemann U, Tokuoka R, Saenger W: Three-dimensional structure of the ribonuclease T1 2'-GMP complex at 1.9-Å resolution. *J. Biol. Chem.*, **263**, 15358-15368 (1988).
- 14) Nonaka T, Mitsui Y, Irie M, Nakamura KT: Three-dimensional structure of ribonuclease Ms*3'-guanylic acid complex at 2.5 Å resolution. *FEBS Lett.*, **283**, 207-209 (1991).

- 15) Nonaka T, Nakamura KT, Uesugi S, Ikehara M, Irie M, Mitsui Y: Crystal structure of ribonuclease Ms (as a ribonuclease T1 homologue) complexed with a guanylyl-3',5'-cytidine analogue. *Biochemistry*, **32**, 11825-11837 (1993).
- 16) Kawata Y, Sakiyama F, Tamaoki H: Amino-acid sequence of ribonuclease T2 from *Aspergillus oryzae*. *Eur. J. Biochem.*, **176**, 683-697 (1988).
- 17) Watanabe H, Naitoh A, Suyama Y, Inokuchi N, Shimada H, Koyama T, Ohgi K, Irie M: Primary structure of a base non-specific and adenylic acid preferential ribonuclease from *Aspergillus saitoi*. *J. Biochem.*, **108**, 303-310 (1990).
- 18) Ohgi K, Horiuchi H, Watanabe H, Iwama M, Takagi M, Irie M: Role of Asp51 and Glu105 in the enzymatic activity of a ribonuclease from *Rhizopus niveus*. *J. Biochem.*, **113**, 219-224 (1993).
- 19) Kobayashi H, Inokuchi N, Koyama T, Watanabe H, Iwama M, Ohgi K, Irie M: Primary structure of a base non-specific and adenylic acid preferential ribonuclease from the fruit bodies of *Lentinus edodes*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 2003-2010 (1992).
- 20) Inokuchi N, Koyama T, Sawada F, Irie M: Purification, some properties, and primary structure of base non-specific ribonucleases from *Physarum polycephalum*. *J. Biochem.*, **113**, 425-432 (1993).
- 21) Meador J, 3rd, Kennell D: Cloning and sequencing the gene encoding *Escherichia coli* ribonuclease I: exact physical mapping using the genome library. *Gene*, **95**, 1-7 (1990).
- 22) Ide H, Kimura M, Arai M, Funatsu G: The complete amino acid sequence of ribonuclease from the seeds of bitter melon (*Momordica charantia*). *FEBS Lett.*, **289**, 126 (1991).
- 23) Ohgi K, Shiratori Y, Nakajima A, Iwama M, Kobayashi H, Inokuchi N, Koyama T, Kock M, Löffler A, Glund K, Irie M: The base specificities of tomato ribonuclease (RNase LE) and its Asp44 mutant enzyme expressed from yeast cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 432-438 (1997).
- 24) Watanabe H, Narumi H, Inaba T, Ohgi K, Irie M: Purification, some properties, and primary structure of a base non-specific ribonuclease from oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Biochem.*, **114**, 800-807 (1993).
- 25) Hime G, Prior L, Saint R: The *Drosophila melanogaster* genome contains a member of the Rh/T2/S-glycoprotein family of ribonuclease-encoding genes. *Gene*, **158**, 203-207 (1995).
- 26) Ohgi K, Sanda A, Takizawa Y, Irie M: Purification of acid ribonucleases from bovine spleen. *J. Biochem.*, **103**, 267-273 (1988).
- 27) MacIntosh GC, Bariola PA, Newbigin E, Green PJ: Characterization of Rny1, the *Saccharomyces cerevisiae* member of the T2 RNase family of RNases: unexpected functions for ancient enzymes? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 1018-1023 (2001).

- 28) Horiuchi H, Yanai K, Takagi M, Yano K, Wakabayashi E, Sanda A, Mine S, Ohgi K, Irie M: Primary structure of a base non-specific ribonuclease from *Rhizopus niveus*. *J. Biochem.*, **103**, 408-418 (1988).
- 29) Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T: The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, **22**, 195-201 (2006).
- 30) Tanaka N, Arai J, Inokuchi N, Koyama T, Ohgi K, Irie M, Nakamura KT: Crystal structure of a plant ribonuclease, RNase LE. *J. Mol. Biol.*, **298**, 859-873 (2000).
- 31) Inokuchi N, Kobayashi H, Miyamoto M, Koyama T, Iwama M, Ohgi K, Irie M: Primary structure of base non-specific and acid ribonuclease from bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 471-478 (1997).
- 32) Kusano A, Iwama M, Ohgi K, Irie M: Primary structure of a squid acid and base non-specific ribonuclease. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 87-94 (1998).
- 33) Endo Y, Huber PW, Wool IG: The ribonuclease activity of the cytotoxin alpha-sarcin. The characteristics of the enzymatic activity of alpha-sarcin with ribosomes and ribonucleic acids as substrates. *J. Biol. Chem.*, **258**, 2662-2667 (1983).
- 34) Sacco G, Drickamer K, Wool IG: The primary structure of the cytotoxin alpha-sarcin. *J. Biol. Chem.*, **258**, 5811-5818 (1983).
- 35) Sugio S, Amisaki T, Ohishi H, Tomita K: Refined X-ray structure of the low pH form of ribonuclease T1-2'-guanylic acid complex at 1.9 A resolution. *J. Biochem.*, **103**, 354-366 (1988).
- 36) Kurihara H, Nonaka T, Mitsui Y, Ohgi K, Irie M, Nakamura KT: The crystal structure of ribonuclease Rh from *Rhizopus niveus* at 2.0 A resolution. *J. Mol. Biol.*, **255**, 310-320 (1996).
- 37) Nakagawa A, Tanaka I, Sakai R, Nakashima T, Funatsu G, Kimura M: Crystal structure of a ribonuclease from the seeds of bitter melon (*Momordica charantia*) at 1.75 A resolution. *Biochim. Biophys. Acta*, **1433**, 253-260 (1999).
- 38) Numata T, Kimura M: Contribution of Gln9 and Phe80 to substrate binding in ribonuclease MC1 from bitter melon seeds. *J. Biochem.*, **130**, 621-626 (2001).
- 39) Irie M. 3 - RNase T1/RNase T2 Family RNases. *Ribonucleases*. (D'Alessio G, Riordan JF ed.)^eds.). Academic Press, New York, p.^pp. 101-130 (1997).
- 40) Irie M: Structure-function relationships of acid ribonucleases: lysosomal, vacuolar, and periplasmic enzymes. *Pharmacol. Ther.*, **81**, 77-89 (1999).
- 41) Macfadyen DA: The nuclease activity of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, **107**, 297-308 (1934).
- 42) Crestfield AM, Moore S, Stein WH: The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins. *J. Biol. Chem.*, **238**, 622-627 (1963).

- 43) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 44) Blank A, Sugiyama RH, Dekker CA: Activity staining of nucleolytic enzymes after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: use of aqueous isopropanol to remove detergent from gels. *Anal. Biochem.*, **120**, 267-275 (1982).
- 45) Mikami H, Ishida Y: Post-column fluorometric detection of reducing sugars in high performance liquid chromatography using arginine. *Bunseki Kagaku*, **32**, E207-E210 (1983).
- 46) Bidlingmeyer BA, Cohen SA, Tarvin TL: Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. Chromatogr.*, **336**, 93-104 (1984).
- 47) Adachi J: MOLPHY version 2.3 : programs for molecular phylogenetics based on maximum likelihood. *Comput Sci Monogr*, **28**, 1-150 (1996).
- 48) Inada Y, Watanabe H, Ohgi K, Irie M: Isolation, characterization, and primary structure of a base non-specific and adenylic acid preferential ribonuclease with higher specific activity from *Trichoderma viride*. *J. Biochem.*, **110**, 896-904 (1991).
- 49) Watanabe H, Fauzi H, Iwama M, Onda T, Ohgi K, Irie M: Base non-specific acid ribonuclease from *Irpex lacteus*, primary structure and phylogenetic relationships in RNase T2 family enzyme. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 2097-2103 (1995).
- 50) Taylor CB, Bariola PA, delCardayre SB, Raines RT, Green PJ: RNS2: a senescence-associated RNase of *Arabidopsis* that diverged from the S-RNases before speciation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 5118-5122 (1993).
- 51) Inokuchi N, Saitoh S, Kobayashi H, Itagaki T, Koyama T, Uchiyama S, Iwama M, Ohgi K, Irie M: Characterization and primary structure of a base non-specific and acid ribonuclease from *Dictyostelium discoideum*. *J. Biochem.*, **124**, 848-856 (1998).
- 52) Itagaki T, Koyama H, Daigo S, Kobayashi H, Koyama T, Iwama M, Ohgi K, Irie M, Inokuchi N: Primary structure and properties of ribonuclease Bm2 (RNase Bm2) from *Bryopsis maxima*. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 875-883 (2006).
- 53) McClure BA, Haring V, Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakiyama F, Clarke AE: Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature*, **342**, 955-957 (1989).
- 54) Ai Y, Tsai DS, Kao TH: Cloning and sequencing of cDNAs encoding two S proteins of a self-compatible cultivar of *Petunia hybrida*. *Plant Mol. Biol.*, **19**, 523-528 (1992).
- 55) Jost W, Bak H, Glund K, Terpstra P, Beintema JJ: Amino acid sequence of an extracellular, phosphate-starvation-induced ribonuclease from cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *Eur. J. Biochem.*, **198**, 1-6 (1991).

- 56) Iwama M, Ogawa Y, Yamagishi M, Itagaki T, Inokuchi N, Koyama T, Imai R, Ohgi K, Tsuji T, Irie M: Amino acid sequence and characterization of a rice bran ribonuclease. *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 760-766 (2001).
- 57) Uchida T, Hayano K, Iwama M, Watanabe H, Sanda A, Ohgi K, Irie M: Base specificity and primary structure of poly U-preferential ribonuclease from chicken liver. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 1982-1988 (1996).
- 58) Kusano A, Iwama M, Sanda A, Suwa K, Nakaizumi E, Nakatani Y, Ohkawa H, Ohgi K, Irie M: Primary structure of porcine spleen ribonuclease: sequence homology. *Acta Biochim. Pol.*, **44**, 689-699 (1997).
- 59) Trubia M, Sessa L, Taramelli R: Mammalian Rh/T2/S-glycoprotein ribonuclease family genes: cloning of a human member located in a region of chromosome 6 (6q27) frequently deleted in human malignancies. *Genomics*, **42**, 342-344 (1997).
- 60) D'Alessio G, Di Donato A, Mazzarella L, Piccoli R. 12 - Seminal Ribonuclease: The Importance of Diversity. *Ribonucleases*. (D'Alessio G, Riordan JF ed.)^eds.). Academic Press, New York, p.^pp. 383-423,VII (1997).
- 61) Ardelit W, Mikulski SM, Shogen K: Amino acid sequence of an anti-tumor protein from *Rana pipiens* oocytes and early embryos. Homology to pancreatic ribonucleases. *J. Biol. Chem.*, **266**, 245-251 (1991).
- 62) Nomura H, Inokuchi N, Kobayashi H, Koyama T, Iwama M, Ohgi K, Irie M: Purification and primary structure of a new guanylic acid specific ribonuclease from *Pleurotus ostreatus*. *J. Biochem.*, **116**, 26-33 (1994).
- 63) Sanger F, Coulson AR: A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **94**, 441-448 (1975).
- 64) Huang HC, Wang SC, Leu YJ, Lu SC, Liao YD: The *Rana catesbeiana rcr* gene encoding a cytotoxic ribonuclease. Tissue distribution, cloning, purification, cytotoxicity, and active residues for RNase activity. *J. Biol. Chem.*, **273**, 6395-6401 (1998).
- 65) Nitta K, Takayanagi G, Kawauchi H, Hakomori S: Isolation and characterization of *Rana catesbeiana* lectin and demonstration of the lectin-binding glycoprotein of rodent and human tumor cell membranes. *Cancer Res.*, **47**, 4877-4883 (1987).
- 66) Okabe Y, Katayama N, Iwama M, Watanabe H, Ohgi K, Irie M, Nitta K, Kawauchi H, Takayanagi Y, Oyama F, et al.: Comparative base specificity, stability, and lectin activity of two lectins from eggs of *Rana catesbeiana* and *R. japonica* and liver ribonuclease from *R. catesbeiana*. *J. Biochem.*, **109**, 786-790 (1991).
- 67) Kanda N, Tsuchida Y, Hata J, Kohl NE, Alt FW, Latt SA, Utakoji T: Amplification of IMR-32 clones 8, G21, and N-myc in human neuroblastoma xenografts. *Cancer Res.*, **47**, 3291-3295 (1987).

- 68) Nowell P, Finan J, Dalla-Favera R, Gallo RC, ar-Rushdi A, Romanczuk H, Selden JR, Emanuel BS, Rovera G, Croce CM: Association of amplified oncogene c-myc with an abnormally banded chromosome 8 in a human leukaemia cell line. *Nature*, **306**, 494-497 (1983).
- 69) Davidoff AN, Mendelow BV: C-myc expression is down-regulated in mafosfamide-treated HL-60 cells undergoing apoptosis. *Anticancer Res.*, **13**, 1167-1170 (1993).
- 70) Johnson RJ, Chao TY, Lavis LD, Raines RT: Cytotoxic ribonucleases: the dichotomy of Coulombic forces. *Biochemistry*, **46**, 10308-10316 (2007).
- 71) Ilinskaya ON, Koschinski A, Mitkevich VA, Repp H, Dreyer F, Pace CN, Makarov AA: Cytotoxicity of RNases is increased by cationization and counteracted by K(Ca) channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **314**, 550-554 (2004).
- 72) Olson BH, Goerner GL: ALPHA SARCIN, A NEW ANTITUMOR AGENT. I. ISOLATION, PURIFICATION, CHEMICAL COMPOSITION, AND THE IDENTITY OF A NEW AMINO ACID. *Appl. Microbiol.*, **13**, 314-321 (1965).
- 73) Steyaert J, Hallenga K, Wyns L, Stanssens P: Histidine-40 of ribonuclease T1 acts as base catalyst when the true catalytic base, glutamic acid-58, is replaced by alanine. *Biochemistry*, **29**, 9064-9072 (1990).
- 74) Turcotte RF, Lavis LD, Raines RT: Onconase cytotoxicity relies on the distribution of its positive charge. *FEBS J.*, **276**, 3846-3857 (2009).
- 75) Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA: Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 10037-10041 (2001).
- 76) Perez-Canadillas JM, Santoro J, Campos-Olivas R, Lacadena J, Martinez del Pozo A, Gavilanes JG, Rico M, Bruix M: The highly refined solution structure of the cytotoxic ribonuclease alpha-sarcin reveals the structural requirements for substrate recognition and ribonucleolytic activity. *J. Mol. Biol.*, **299**, 1061-1073 (2000).
- 77) Garcia-Mayoral F, Garcia-Ortega L, Alvarez-Garcia E, Bruix M, Gavilanes JG, del Pozo AM: Modeling the highly specific ribotoxin recognition of ribosomes. *FEBS Lett.*, **579**, 6859-6864 (2005).
- 78) Leland PA, Staniszewski KE, Kim B, Raines RT: A synapomorphic disulfide bond is critical for the conformational stability and cytotoxicity of an amphibian ribonuclease. *FEBS Lett.*, **477**, 203-207 (2000).