

838 **Site directed mutagenesis the cholesterol oxidase gene from Streptomyces**

OAndrzej Zaborowski, Mitsutoshi Tojama, Mitsuo Yamashita, Yoshikatsu Murooka
(Dept. Biotechnology., Grad. School of Eng., Osaka Univ.,)

Cholesterol oxidase is a FAD-dependent bifunctional enzyme that catalyzes the oxidation of cholesterol and the isomerization of 5-cholesten-3-one. Site directed mutagenesis was used to change amino acid residue in position of 379 Serine of cholesterol oxidase from Streptomyces sp. Four mutant enzymes with the following substitutions were constructed : S379A, S379D, S379R, S379V. The wild-type and mutant enzymes S370A and S379V were purified and characterized. Obtained results showed that specific activity of cholesterol oxidase S379A mutant decreased in comparison with wild-type of enzyme. Simultaneously estimated specific activity of S379V mutant is higher than specific activity of control wild-type cholesterol oxidase. Further properties of obtained mutants will be reported.

[Key words] cholesterol oxidase, site directed mutagenesis, Streptomyces sp

839 組換え型ヒト好酸球由来ECPの哺乳類株化細胞に対する効果
○前田貴志、北添翠、二見淳一郎、多田宏子、妹尾昌治、山田秀徳
(岡大・工・生物)

【目的】 最近、我々のグループ及びNIHのグループによるイムノトキシンの構築で膵臓由来型 ヒトRNaseが従来の外来性毒素タンパク質の代わりに毒素ドメインとして利用できる可能性が示され、ヒトRNaseの生理的意義の解明と医療への応用への関心が急速に高まっている。本研究では、ヒト膵臓由来型 RNaseのなかでほとんど手のついていないヒト好酸球由来RNase(human ECP,hECP)を制癌剤の毒素部分に利用することを想定し、癌細胞株および正常細胞株に対する効果とその機構の解明を目的とする。

【方法及び結果】 hECPの哺乳類株化細胞の増殖に及ぼす効果は、MTTアッセイを用いて調べた。検討した14種の株化細胞のうち、ヒト扁平上皮癌細胞株A431とヒト白血病細胞株K562に対して、hECPは有為な増殖阻害活性を示した(IC50はそれぞれ4.0 μ Mと1.1 μ M)。しかし細胞死の誘導を示唆する結果は癌細胞および正常細胞株のどちらでも得られなかった。癌細胞に対する増殖阻害効果とは対照的に、ECPはマウス正常線維芽細胞株BALB/c 3T3に対して0.1-1 μ Mで増殖を促進した。癌細胞および正常線維芽細胞に対するECPの効果をさらに検討するために、蛍光標識したECPをA431細胞とBALB/c 3T3細胞に添加し、細胞への取り込みを観察した。その結果、どちらの細胞でもECPが特に細胞内に取り込まれやすく、特異的に細胞質に到達することがわかった。現在、ECPの細胞増殖阻害活性が細胞内RNAの分解によるものか検討するために、触媒部位に化学修飾を施しRNase活性をつぶしたECPを調製している。

Effects of Eosinophil Cationic Protein (ECP) on Mammalian Cell Lines.

○Takashi Maeda, Midori Kitazoe, Junichiro Futami, Hiroko Tada, Masaharu Seno, Hidenori Yamada, (Dept. Biosci and Biotech., Okayama Univ.)

[Key words] eosinophil, immunotoxin, cytotoxicity, ribonuclease, fibroblast