

論文の内容の要旨

論文題目

昆虫由来細胞増殖因子 Insect-Derived Growth Factor, IDGF の持つ
アデノシンデアミナーゼ活性について

氏名

田中 康弘

細胞増殖因子とは、もともと細胞の増殖や分化を促進する活性を持つ分子として同定されてきた分子である。細胞増殖因子が細胞の増殖や分化を促進する分子機構は細胞膜上に存在する受容体と呼ばれる膜蛋白に直接結合し、その結果として細胞内に情報が伝達されることで最終的に増殖や分化のみならず、現在では様々な現象を引き起こすことが明らかにされている。これまで様々な細胞増殖因子が同定されており、それらの細胞増殖の分子機構の解明および生体内における機能解析により、細胞増殖のみならず多岐にわたる現象が細胞増殖因子を通じて明らかになってきている。このことから、細胞増殖因子の生体内における重要性が示されてきている。したがって、細胞増殖因子の同定、およびその作用の分子機構の解明や機能解析は発生、分化を始め様々な生命現象を細胞生物学的な観点から明らかにし、理解する上で大変重要である。

IDGF はセンチニクバエ胚由来細胞 NIH-Sape-4 の培養上清から、この細胞自身に対する増殖促進活性を指標に精製された分泌蛋白であり、構造上、新規な細胞増殖因子である。このことから既知の細胞増殖因子とは異なる新しい細胞増殖の分子機構の存在が考えられたが、その細胞増殖の分子機構や生体内での機能はこれまで全く不明であった。

そこで、本研究において私は、IDGF の細胞増殖促進の分子機構を明らかにするため、

まずはその一次構造に注目した結果、IDGF のアミノ酸配列中に ADA 活性部位のアミノ酸が保存されていることを見出し、実際に IDGF が ADA 活性を持つことを示した。さらに、IDGF の細胞増殖促進活性に ADA 活性が必須であることを明らかにしたので以下に述べる。

IDGF のアミノ酸配列中における ADA 活性部位の保存性

これまで IDGF の細胞増殖における増殖促進活性の分子機構は全く不明であった。そこで私は IDGF その分子機構を明らかにするための手がかりを得るため、まずその一次構造に注目した。その結果、IDGF のアミノ酸配列中に細胞内酵素である ADA のアミノ酸配列と比較的相同性が高い領域が存在することを見出した。さらに、ADA の活性部位に存在し、その活性に関与するアミノ酸残基すべてが IDGF のアミノ酸配列中にも保存されていることを見出した。このことから IDGF は一次構造上、ADA 活性を持つ可能性が考えられた。そこで IDGF が ADA 活性を持つか否かを調べることにした。

IDGF の ADA 活性の検出

そこでまずは IDGF の ADA 活性を測定するにあたり、十分な量の IDGF 蛋白を得るため、そのリコンビナント蛋白の調製した。次に、このリコンビナント IDGF が NIH-Sape-4 に対し、増殖促進活性を持つかを確認した。その結果、リコンビナント IDGF は NIH-Sape-4 培養上清から精製した authentic IDGF とほぼ同程度の増殖促進活性を持つことが確認できた。このことから、リコンビナント IDGF が調製できたと判断した。そこで次に、このリコンビナント IDGF の ADA 活性を測定した。その結果、IDGF は既知の細胞内酵素である ADA とほぼ同程度の ADA 活性を持つことが分かった。

以上の結果より、IDGF は既知の細胞内酵素である ADA とは明確に異なる、細胞外に分泌される構造的にも全く新しい ADA であることが分かった。

IDGF の細胞増殖活性の ADA 活性の関与の検討

ところで、IDGF は細胞増殖因子であることを考えると、IDGF の持つ ADA 活性がその細胞増殖活性に関与する可能性が考えられる。そこで、IDGF の持つ ADA 活性の細胞増殖促進活性への関与の検討を行った。

まずはじめに、ADA の特異的な阻害剤である 2'-deoxycoformycin (DCF)を用いて IDGF の ADA 活性を失活させたとき、その細胞増殖活性に与える影響を調べた。その結果、

DCF の濃度依存に IDGF の ADA 活性が阻害されるとき、同様に増殖促進活性も阻害された。さらに、ADA 活性が完全に阻害される DCF 濃度では増殖促進活性も完全に阻害されることが分かった。以上の結果から、IDGF の ADA 活性はその増殖促進活性に必須であることが強く示唆された。

さらに上記の結論を確かめるため、site-directed mutagenesis により ADA 活性部位のアミノ酸残基を改変した、ADA 活性を持たない変異体 IDGF のリコンビナント蛋白を調製し、その増殖促進活性を測定した。その結果、ADA 活性を持たないどの変異体 IDGF も増殖促進活性は全く検出されなかった。このことから、変異体 IDGF を用いた実験からも、IDGF の持つ ADA 活性はその増殖促進活性に必須であることが示された。

以上の2つの実験の結果より、IDGF の持つ ADA 活性がその増殖促進活性に必須であると判断した。これまで数多くの細胞増殖因子が同定され、その細胞増殖の分子機構が明らかにされているが、細胞増殖因子が ADA 活性を持ち、その活性が増殖促進活性に必須であることが示された例は IDGF が初めてである。また、このことから、既知の細胞増殖因子とは異なる、ADA 活性を介した全く新しい細胞増殖促進の分子機構の存在が示唆された。

IDGF の NIH-Sape-4 に対する作用の検討

IDGF はもともと NIH-Sape-4 に対する増殖促進活性を指標に精製された細胞増殖因子であるが、実際に NIH-Sape-4 から分泌された IDGF は細胞に対しどのような役割を担っているのだろうか。そこで、このことを確かめる目的で、RNA 干渉法により、NIH-Sape-4 において IDGF 蛋白の発現を抑制した結果、その培地中への分泌を抑制したとき、細胞に与える影響を調べた。その結果、RNA 干渉法を行う条件は低栄養条件下であるので培養するに従って、細胞数は減少してゆくがそのとき、IDGF 蛋白の培地中への分泌が抑制されると、抑制されないときに比べ、生存する細胞数は半分になっていた。このことから、NIH-Sape-4 から分泌された IDGF 蛋白は細胞の生存にも関与していることが示唆された。IDGF が細胞の生存にも関与していることは、IDGF が細胞死に対し抑制的に働いている可能性がある。今回の実験では細胞は低栄養条件下で培養したが、一般にそのような条件下では細胞はアポトーシスを起こすことが知られていることから、IDGF はアポトーシスの抑制に働いている可能性が考えられる。

IDGD の発現組織の同定

IDGF の機能解析を行うにあたり、その遺伝子の発現時期、また発現組織を知るこ

とは重要である。これまで、ノザンプロット解析により、IDGF は蛹を除く全ての発生段階において発現していることが分かっている。そこで各発生段階での IDGF の発現の様子をさらに詳しく知るため、各発生段階における組織別発現を調べることにした。まずは、その組織学的解析が比較的進んでいる最終齢幼虫での組織別の発現を RT-PCR 法により調べた。その結果、IDGF は脂肪体、気管以外の中樞神経系、唾腺、消化管、筋肉、体液細胞に発現していることが分かった。IDGF は NIH-sape-4 において autocrine もしくは paracrine 的に作用していることを考えると、IDGF は今回、同定した組織自身、もしくはその組織から他の組織へと、何らかの情報を伝達している可能性がある。

総括及び今後の展望

本研究において私は以下のことを示してきた。

- 1、IDGF のアミノ酸配列中に ADA の活性部位が保存されていることを見出した。
- 2、IDGF が ADA 活性を持つことを示した。
- 3、IDGF の持つ ADA 活性が細胞増殖促進活性に必須であることを明らかにした。
- 4、IDGF が NIH-Sape-4 の生存に関与していることを示唆した。
- 5、IDGF はセンチニクバエ最終齢幼虫において中樞神経系、唾腺、消化管、筋肉、体液細胞に発現していることを明らかにした。

まず初めに、分泌蛋白である IDGF が ADA 活性を持つことを示したが、このことは細胞外において既知の細胞内酵素である ADA とは明確に異なる ADA の存在を明らかにした初めての例である。また、ヒトから昆虫類にいたるまで、種を越えて IDGF のホモログ分子が存在し、ADA の活性部位が保存されていることから、今後、細胞外の ADA としての IDGF ファミリーの存在、また、その生物学的意義の解明が期待される。

そして次に、IDGF の ADA 活性が細胞増殖促進活性に必須であることを明らかにしたが、このことは細胞増殖因子として初めての報告であり、今後は IDGF の細胞増殖の分子機構の解明を通して、ADA 活性を介した全く新しい細胞増殖促進の分子機構の解明が期待される。

さらに、IDGF の細胞の生存への関与、また発現組織の同定は今後の機能解析をする上で重要な知見と考えられる。今後はこれらの知見をもとに、IDGF の生体内での機能の解明が期待される。

最後に、IDGF のヒトホモログは猫目症候群の原因遺伝子の候補と考えられている

など、いくつかの病気との関連が考えられる。多くの細胞増殖因子がそうであるように、今後は病気の治療といった臨床応用的な観点から IDGF の研究が進むことが期待される。