

## 論文の内容の要旨

論文題目：ヘビ毒由来アポトーシス誘導因子 Apoxin I の分離精製・遺伝子クローニングおよび機能解析

氏名： 鳥居 慎一

はじめに

近年、アポトーシス研究が急速に進展するなかで「細胞死の生物学」が分子レベルで解明されつつあり、従来の概念による「細胞死」を引起こす物質・因子のなかにもアポトーシスを特異的に誘導するものがあることが確認されつつある。そこでタンパク性の毒性物質、特にガラガラヘビ由来の出血毒に注目し、ヘビ毒中に新規アポトーシス誘導物質の存在を作業仮説として、その探索研究を進めた。

### 1. ヘビ粗毒からのアポトーシス誘導因子の精製とアポトーシス誘導活性の解析

ガラガラヘビ (*Crotalus atrox*) の粗毒よりアポトーシス誘導活性を指標にアポトーシスを誘導するタンパクの分離・精製を試みた。ガラガラヘビの粗毒 (Sigma) を Sephadex G-100 ゲル濾過、等電点電気泳動、Superdex 200HR、TSK-Gel G3000PWXL ゲル濾過によって精製を行い、アポトーシスを誘導する画分を順次濃縮した。最終的に SDS-PAGE により 55KDa、ゲル濾過により 100KDa を示す単一のタンパク質に精製し、Apoxin I と命名した (図1)。

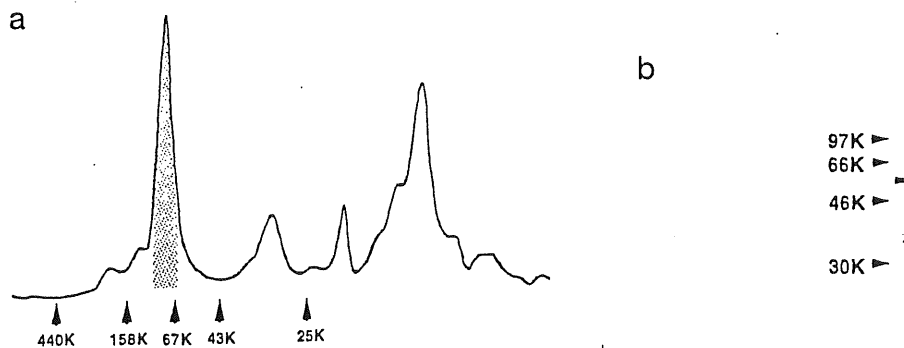


図1. ヘビ粗毒からの Apoxin I の分離・精製 (FPLCゲルろ過チャートと SDS-PAGE)

Apoxin I は HUVEC, HL-60, A2780, KN-3 等の細胞にアポトーシスを誘導することが以下のように確認された。1) 形態学的検討：培養液中で HL-60 細胞に Apoxin I (5  $\mu$ g/ml) を処理すると apoptotic body の形成が観察された。2) 核 DNA 染色：核 DNA を蛍光色素で染色し蛍光顕微鏡で細胞の核を観察するとコントロール細胞では正常な網目状の核組織が認められるのに対し、Apoxin I 処理細胞では核の凝集が確認された。3) DNA fragmentation assay：HL-60 細胞を Apoxin I にて処理後、電気泳動にて各 DNA の断片化を検討したところ用量依存的に、また処理時間依存的にオリゴヌクレオソーム単位の断片化が起こることが確認された (図 2)。また、Caspase ファミリーの阻害剤 (Z-VAD:160  $\mu$ M、Z-Asp:200  $\mu$ M) を前処理すると Apoxin I による HL-60 細胞のアポトーシス誘導は完全に阻害された。

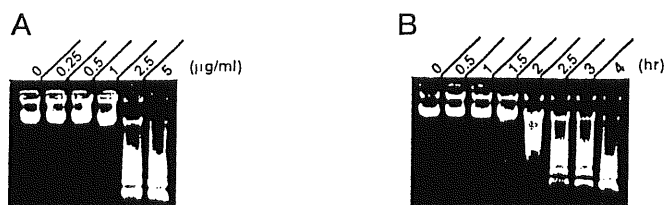


図 2. Apoxin I による HL-60 細胞における DNA fragmentation assay

次に Apoxin I のアミノ酸一次構造を検討するために精製した Apoxin I をアミノ酸シーケンサーにかけることにより、N末端アミノ酸のマイクロシーケンスを行った。得られたアミノ酸シーケンスを蛋白質データベース上でホモロジー検索を行った。すると Malayan pit viper の L-アミノ酸酸化酵素 (以下 LAO) と高いホモロジーを有することが判明した (図 3)。

Apoxin I: **AHDRNPL-EEXFRETDYEEFL-**  
M.pit viper LAO: **ADDRNPLAEE-FQENNYEEFL-**  
King cobra LAO: **HVIN-L-EESFQEPYXNHL-**

図 3. Apoxin I の N 末端アミノ酸 (A1)

そこで Apoxin I が LAO 活性を有するかどうかを検討するために酵素反応液中において L-leucine および D-leucine の酸化を指標にすることにより Apoxin I の LAO 活性を測定した。すると Apoxin I は L-leucine を用量、時間依存的に酸化したのに対し、D-leucine を全く酸化しなかった。このことにより Apoxin I は L-アミノ酸を特異的に酸化する酵素活性を有する物質であることが判明した。

L-アミノ酸酸化酵素はガラガラヘビのみならず、出血毒を有する有毒ヘビに含まれる毒素であり、L-アミノ酸を酸化し、 $\alpha$ ケト酸、 $H_2O_2$ 、 $NH_3$  に変換する酵素である。そこで Apoxin I が L-アミノ酸酸化活性により  $H_2O_2$  を発生することによりアポトーシスを誘導するのではないかと推察し、抗酸化剤による Apoxin I 誘導アポトーシスの阻害効果を検討した。HL-60 を catalase (1000 units/ml)、L-ascorbate (1mM)、trolox (ビタミン E 誘導体:2mM) にて前処理後、Apoxin I または  $H_2O_2$  を処理後アポトーシス抑制を検討したところ、catalase、ビタミン E 誘導体の trolox は Apoxin I 及び  $H_2O_2$  によるアポトーシスを阻害したのに対し、L-ascorbate は阻害しなかった (図 4)。

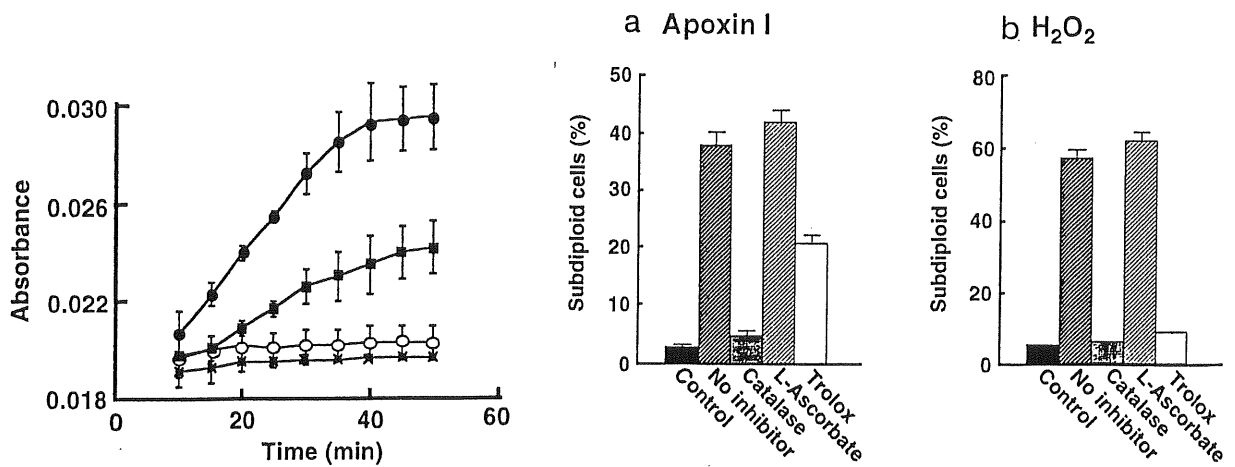


図4. Apoxin I のL-アミノ酸酸化酵素活性と抗酸化剤によるアポトーシス抑制

## 2. Apoxin I の遺伝子クローニングと発現タンパクを用いた機能解析

得られた精製 Apoxin I タンパク質をリジルエンドペプチダーゼを用いて酵素消化することにより得られたペプチド断片をペプチドシークエンサーにかけ、5種類のペプチド断片配列が得られた。この配列より Degenerated-PCR プライマーを作製し、ヘビ毒 (Western diamondback rattlesnake: 学名 *Crotalus atrox*) 毒腺由来の cDNA ライブラリーより Apoxin I 全長 ORF 遺伝子をクローニングした。その Apoxin I 全長 ORF 遺伝子をアミノ酸翻訳し、データベース検索すると Apoxin I は他の L-アミノ酸酸化酵素と高い配列相同性を示し、5' 末端に分泌シグナルと思われるシグナルペプチド配列を有していた。また、同様にホモロジーの高い遺伝子としてモノアミン酸化酵素 (MAO-B) および interleukin 4-induced gene (FIG1) が相同性の高い配列として検索された (図5)。

### A2

APOXIN I	31	SNPKRVVIVGAGMAGLSAAYVLAGAGH-QVTVLEASERVGGVRVITYR-KK-DW-----YANLGPML 89
LAO (Neurospora)	173	AKSKNIAIVGAGMSGLMITYLCLTQAGMTNVSIIIEGGNRLGGVRVHTEY-LS-GGPFDSYQEMGPMRF 237
MAO-B	2	SNKCDVVVVGGGIGMAAAKLLHDSGL-NVVVLEARDRVGGRTYTLRNQK-VKYVD-----LGGSYV 61
FIG1	56	SKPQKVVVVGAGVAGLVAAKMLSDAGH-KVTILEADNRIGGRIFTFRDEKTDG-----IGELGAMRM 116

### A3

APOXIN I	226	GYEKRFDEIV-GGMDQLPTSMYEAIKEKV-----QVHFNARVIEIQNDREATVITYQTSANE-MSSVTADY-VIVCTTS 296
LAO (Neurospora)	405	TFPRRRGAIID-GGLNRLPLSFHPLVDNAT-----TLNRRLERVAFDAETQKVTLHSRNSYKDSFESSEHDYAVI-AAPF 476
MAO-B	193	GGTTRIISTTNGGQERKFVGGSGQVSEIRIMDLLGDRVKLERPVIYIDQT-REN-VLVETLNHE-M--YEAKY-VISAIPP 266
FIG1	253	SDRLYSRIV-GGWDLPLRALLSSLSGAL-----LLNAPVVSITQGRNDVRVHIATSLHS-EKTLTADVLLTAS-GPA 319

APOXIN I	297	RAARRIKFEPPLPP---KKAHALRSVH-YRSGTK-IFLTC-KKKFWE 337
LAO (Neurospora)	477	SIVKKWRFSPALDLTAPTLANAIQNLE-YTSACK--VALEFRTRFW 520
MAO-B	267	TLGMKIHFNPLPM---MRNQMITRVPLGSVI-KCIV-YY-KEFFWR 307
FIG1	320	LQ---RITFSPPLTR---KR-QEALRALHYVAASK-VFLSF-RRPFWH 357

### A4

APOXIN I	419	R-WSLDKYAMGGI-TTFTPYQFQH-FSEAL--TAPFKRIYFAG-EYTA-QFHGWIDSTIKSGLTAA-RDVNRA 483
LAO (Neurospora)	608	RCWALDPLESASWAS-PTVCGHELYLPEYF-QTRNNL--VFGV-EHTS-YTHAWIASALESGIRGSVQLLLEL 674
MAO-B	386	KNWCEEQY-SGGCYTTYFPPGILTQYGRVLRQ--PVDRIYFAGTE-TATHWSGYMEGAVEAGERAA-REILHA 448
FIG1	440	R-WAEDPH-SQGGFVVQ-PPLYGRE-AEDYDWSAPFGRIYFAG-EHTA-LPHGWVETAVKSGLRAAVR-INNN 505

図5. Apoxin I のアミノ酸配列とホモロジーを有するタンパク

次にクローニングされた Apoxin I の ORF 配列を 3' 末端に HA 配列を結合させた pCG 哺乳類発現ベクターに組み込んだ (以下: pCG-Apoxin I)。この pCG-Apoxin I をリン酸カルシウム法によってヒト腎由来 293T 細胞に遺伝子導入し、タンパク発現させ以下の解析を行った。発現ベクターに組み込まれた Apoxin I 遺伝子の哺乳類細胞への遺伝子導入後のタンパク発現を確認するために Western blotting によって Apoxin I タンパク質を確認した。抗体は精製 Apoxin I タンパクをウサギに免疫し、抗血清を作成したものを用いた。また同時に 3' 末端に結合させた HA タンパクに対する抗体を用い Western blotting 解析を行った。Apoxin I タンパクの発現は細胞質 (Cell Lysate) および細胞培養液中 (Conditioned Medium) に認められ、Apoxin I 遺伝子は細胞内にて発現後、細胞培養液中に分泌される (図6)。

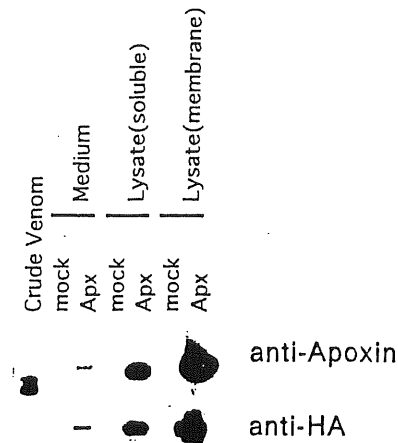


図6. Apoxin I 遺伝子の 293T 細胞への遺伝子導入によるタンパク発現と Western blotting 解析

また Apoxin I 遺伝子は細胞内にて翻訳後細胞外へ輸送・分泌されることを確認するために、Apoxin I 遺伝子を細胞内導入・発現後の細胞質抽出液、および細胞培養液中の L-および D-アミノ酸化酵素 (LAO、DAO) 活性を L-leucine および D-leucine の  $H_2O_2$  の産成を指標に前述の方法に従い測定した。LAO 活性は細胞質よりも細胞培養液中に強く認められ、DAO 活性は認められなかった。

次に4種類の deletion mutant を作成し、それぞれの Apoxin I 遺伝子のタンパク発現・アポトーシス誘導活性を検討した。Apoxin I deletion mutant ではタンパク発現は確認されたがいずれもアポトーシス誘導活性をほとんど有さず、LAO 活性も弱いものであった (図7)。また wild type Apoxin I タンパクは培養液中に分泌されるのに対し、deletion mutant では分泌量は低下していた。

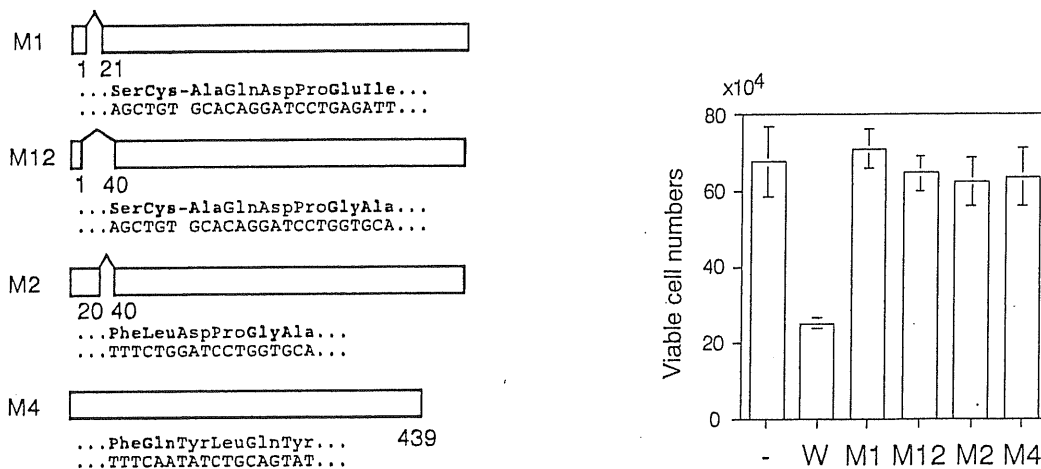


図7. Apoxin I 遺伝子の deletion mutant とアポトーシス誘導活性

Apoxin I のタンパク配列中に N-glycosylation 部位が1ヶ所存在するが、tunicamycin によって糖差付加を阻害すると Apoxin I の LAO 活性は低下した。これらのことより Apoxin I 遺伝子は細胞内で細胞外へ輸送される過程で、mature type になる翻訳後修飾を受け活性型になることが示唆された。また、ゲルろ過にと SDS-PAGE による分子量の検討により、Apoxin I タンパクは2量体として存在することが示唆されるが、deletion mutant では活性型になるいずれかの過程が阻害されることが示唆された。

以上