

審査の結果の要旨

氏名 鳥居 慎一

ヘビ毒中の物質がある種の細胞に細胞死を引き起こすことは従来より知られていた。しかし単一の因子がアポトーシスを引き起こすのかあるいは複数の因子が協力して最終的にアポトーシスに至るのか、といったことは全く判っていなかった。ヘビ毒より新しいタンパク性のアポトーシス誘導因子が見つければ、それに対応する生体側の受容体・標的分子等も新たに見つかるのではないかと、という期待もあった。ヘビ毒は出血毒と神経毒に大きく分類されるが、出血毒による毒性発現の機序については現在でもまだ完全には解明されておらず、出血毒によるアポトーシス機構が解明されれば出血のメカニズムを解明する手がかりにもなり、血管の老化・循環器系疾患への新たなアプローチになるのではないかと、といった臨床的期待も考えられる。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探索研究を進めた。

1. ヘビ毒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をゲル濾過、等電点電気泳動等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。

Apoxin I は培養細胞にアポトーシスを誘導することが以下の様に確認された。形態学的検討として培養液中で HL-60 細胞に Apoxin I を処理すると apoptotic body の形成が観察された。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。DNA fragmentation assay によって 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。また Caspase ファミリーの阻害剤を前処理すると Apoxin I によるアポトーシス誘導は完全に阻害され、Apoxin I は単独物質として細胞にアポトーシスを誘導することが判明した。

2. Apoxin I の N 末端アミノ酸配列解析と L-アミノ酸酸化酵素活性の検討

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 をアミノ酸シークエンサーにかけることにより、N末端アミノ酸のシークエンスを行った。得られたアミノ酸シークエ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 (LAO) と高いホモロジーを有することが判明した。

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 L-アミノ酸を酸化し、 α 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 を発生させアポトーシスを誘導するのではないかと推察し、抗酸化剤による阻害効果を検討した。HL-60 を catalase、ビタミン E 誘導体の trolox 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、trolox は Apoxin I 及び H_2O_2 によるアポトーシスを阻害し、 H_2O_2 が Apoxin I によるアポトーシス誘導のメディエーターであることが判明した。

3. 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、ガラガラヘビ毒腺由来の 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。

次にクローニングされた Apoxin I の ORF 配列を 3'末端に HA 配列を結合させた哺乳類発現ベクターに組み込んだ。この Apoxin I 遺伝子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たところ、Apoxin I タンパク

が 293T 細胞において発現したことが Western blotting によって確認された。Apoxin I タンパクの発現は細胞質および細胞培養液中に認められ、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ことが判明した。

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-アミノ酸酸化酵素活性を L-leucine および D-leucine 酸化による H_2O_2 の産成を検討した。LAO 活性は細胞質よりも細胞培養液中に強く認められ、DAO 活性は全く認められなかったことより、遺伝子導入された Apoxin I 遺伝子は細胞外へ分泌され、L-アミノ酸を特異的に酸化することが示された。

4. Apoxin I の deletion mutant を用いた機能解析と翻訳後糖付加修飾の検討

次に 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示さなかった。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。

Apoxin I のタンパク配列中に N-glycosylation 部位が一ヶ所存在するが、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。

本研究によってヘビ毒から単離精製された Apoxin I は LAO 活性を有し、L-アミノ酸の酸化反応によって発生する過酸化水素によって細胞にアポトーシスを誘導する機構が解明された。この成果は生命薬学において興味ある知見と将来の抗癌治療薬の可能性を示したもので、博士（薬学）の学位を受けるに十分値するものと判断した。