

論文名

ヒマ種子毒タンパク質リシンのアポトーシス誘導における細胞内生化学的変化の解析

長崎大学大学院生産科学研究科海洋生産科学専攻 田村忠士

ヒマ種子中に存在する毒タンパク質リシンは、A 鎖と B 鎖の二つのサブユニットから構成される AB-Toxin の一つである。これまでの研究により、リシンの真核細胞に対するタンパク質合成阻害活性は、以下のような経路で発現される。まず B 鎖のレクチン機能により、細胞表層の糖鎖に結合する。その後、エンドサイトーシスによって細胞内に侵入し、ゴルジ体、小胞体を経由した膜輸送により、リシン A 鎖が細胞質へ移行する。その後、リシン A 鎖が、細胞質のリボソーム中の 28S RNA の、特定の一アデニン塩基を酵素的に解離し、リボソームの機能を不活化することによって、タンパク質合成阻害を誘導し、最終的にはアポトーシス様の細胞死を誘導する。実際に、リシンはアフリカミドリザル腎臓由来 Vero 細胞等の培養細胞に、濃度依存的にアポトーシス様の細胞死を誘導する。しかし、その誘導機構は未だ多くの点で不明である。そこで、リシンの毒性機構の検討のため、種々の検討を行った。

まず、Vero 細胞と Vero 細胞の変異株である BER-40 細胞を用いて各種実験を行った。BER-40 細胞は変異誘導剤により、ゴルジ体可逆的機能阻害剤 Brefeldin A (BFA) への耐性を獲得した細胞であり、Vero 細胞に比べ、BFA の細胞毒性に対して 40 倍程度の耐性を持つ。その一方で、BER-40 細胞は、リシンのアポトーシス誘導に対しても、Vero 細胞に比べ耐性があることが見いだされたため、種々の検討を行った。リシンのタンパク質合成阻害活性については、Vero 細胞と BER-40 細胞はほぼ同等の感受性を示したが、リシンのアポトーシス誘導に伴う細胞溶解、アポトーシスに特徴的な DNA の断片化、アポトーシス誘導の実行因子である caspase 群の活性化のレベルはいずれも Vero 細胞に比べ、BER-40 細胞では低値であった。さらに、リシン処理によって、細胞内の遊離亜鉛イオンの上昇やグルタチオン濃度の低下などの生化学的変化は Vero 細胞では顕著に見られたものの、BER-40 細胞ではあまり見られなかった。さらに、アポトーシス誘導のシグナル伝達に関わるとされる cytochrome *c* の放出誘導や、Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) ファミリーの活性化は BER-40 細胞では低いという結果が得られたことから、Vero 細胞と BER-40 細胞は、細胞へのリシンの結合および侵入から、リボソームの不活化に至る過程は、同等に起

こっているが、アポトーシスに伴うシグナル伝達は Vero 細胞に比べ BER-40 細胞は弱いということがわかった。BER-40 細胞の BFA に対する耐性はゴルジ体の変異に起因すると推定されていることから、このゴルジ体の変異が、リシンのアポトーシス誘導に対する BER-40 細胞の耐性と関係していると推察された。

次に、リシンのアポトーシス誘導のシグナル伝達について検討するために、作用機構の異なるタンパク質合成阻害剤（リシン、ジフテリア毒素、アニソマイシン、シクロヘキシミド）のヒトリンパ腫由来 U937 細胞に対する毒性発現の違いについて検討した。その結果、リシンと同じ 28S rRNA に作用するアニソマイシンは強力にアポトーシスを誘導した。一方、60S ribosomal subunit を標的とするシクロヘキシミドは、タンパク質合成阻害を誘導する濃度であっても、アポトーシス誘導はほとんど誘導されなかった。ジフテリアトキシシンも若干アポトーシスを誘導したが、リシンに比べ弱かった。以上のことから、リシンのアポトーシス誘導は、28S rRNA を標的にすることが、強力なアポトーシス誘導の原因であることが推定された。

一方、リシンはマクロファージに作用し、Tumor Necrosis Factor (TNF)- α の放出を誘導することが明らかになった。マウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞はリシンによってタンパク質合成阻害、アポトーシス様細胞毒性を誘導される一方で、TNF- α の放出が誘導された。ウェスタンブロット法と、抗体標識ビーズによる検出システムにより、リシンは RAW264.7 細胞に対し、MAPK ファミリーの活性化を誘導していることが確認された。さらに、MAPK インヒビターにより、TNF- α 放出が阻害されたことから、リシンの RAW264.7 細胞に対する TNF- α 放出誘導は、MAPK ファミリーが重要であることが示唆された。

以上の検討の結果、リシンは 28S rRNA を標的とした強いリボトキシックストレスを引き起こし、アポトーシスを誘導した。また、RAW264.7 細胞に対しては、アポトーシスの他と TNF- α 放出誘導を発現するなどの MAPK ファミリーの活性が推察された。