

論文審査の結果の要旨

報告番号	博（生）甲第84号	氏名	田村 忠士
学位審査委員会	主査 副査	小田 達也 原 研 治 荒川 修	
・ 論文審査の結果の要旨 田村忠士氏は、平成13年3月に長崎大学水産学部を卒業後、長崎大学大学院生産科学研究科（博士前期課程）海洋生産科学専攻を経て、平成15年4月に長崎大学大学院生産科学研究科（博士後期課程）海洋生産科学専攻へ入学し、現在に至っている。同氏は、本研究科に入学以降、ヒマ種子毒タンパク質リシンの毒性機構解明を目的として、培養細胞を用いた試験を行ってきた。その成果を、平成17年12月に主論文「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」を完成させ、印刷公表論文5編（査読付5編）を添えて長崎大学大学院生産科学研究科教授会に博士（学術）の学位を申請した。 長崎大学大学院生産科学研究科教授会は、平成17年12月21日の定例教授会において論文内容の要旨を検討した結果、学位申請の提出資格ありと判定し、上記の委員会を選定した。委員は主査を中心として、その論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会を行わせるとともに、口頭による専門分野に関する質疑を行って最終試験とし、審査結果及び最終試験結果を平成18年2月15日の研究科教授会に報告した。 提出された論文は、ヒマ種子毒タンパク質リシンの毒性機構解明を目的として、様々な処理や分析によって、リシンの細胞に及ぼす生化学的影響を明らかにしたものである。 第I章では、本研究の背景及び目的を述べ、研究の意義を明確にするとともに論文の構成を記述した。 第II章ではリシンのVero細胞とBER-40細胞に対する毒性発現の違いについて検討を行った。ゴルジ体特異的阻害剤Brefeldin A（BFA）に対し、BER-40細胞はVero細胞に比べ40倍程度の耐性を持つ。一方でBER-40細胞は、リシンのタンパク質合成阻害活性に対してはVero細胞と同程度の感受性を示すが、細胞毒性に対して耐性を有していることが見いだされたため、これについて検討を行った。その結果、リシンによるリボソームの不活化はVero細胞とBER-40細胞で同等に誘導されるが、リシンのアポトーシス誘導はBER-40細胞では弱く、MAP kinaseの活性化を介したシグナル伝達の段階で差が見られた。さらに、BFA処理したVero細胞ではリシンのアポトーシス誘導がほぼ完全に阻害されたのに対し、BFA処理したBER-40細胞ではリシンのアポトーシス誘導は阻害されなかった。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、リシンのアポトーシス誘導には、ゴルジ体の関与が示唆された。			

第 III 章ではリシンの Vero 細胞に対する毒性発現への酪酸の影響についての検討を行った。酪酸は、細胞の分化や遺伝子発現等に影響を及ぼす物質であり、アポトーシス誘導との関わりについては種々の報告がなされている。そこで、リシンの酪酸処理 Vero 細胞に対する毒性発現について検討を行ったところ、酪酸処理によってリシンによる細胞毒性やアポトーシス誘導を強力に促進しており、p38 MAP kinase の活性化においても促進が見られた。しかしながら、リシンの結合量及び侵入量には影響がなかったことから、酪酸は細胞内のアポトーシスのシグナル伝達を促進することにより、リシンのアポトーシス様毒性を促進していると推察された。

第 IV 章では、リシンのアポトーシス誘導とタンパク質合成阻害活性との関係について、種々のタンパク質合成阻害剤を用いて検討した。その結果、28S rRNA のリシン・サルシンループと呼ばれる特異的部位を標的とするリシンとアニソマイシンがタンパク質合成阻害を誘導する濃度において、強力にアポトーシスを誘導し、リシンとは標的の異なるジフテリアトキシンやシクロヘキシミドは、タンパク質合成を阻害する濃度であっても、アポトーシスの誘導はほとんど見られなかった。このことから、リシンは 28S rRNA のリシン・サルシンループを標的にすることによる Ribotoxic stress のシグナルの伝達によって強力なアポトーシスを誘導することが推察された。

第 V 章では、U937 細胞に対するリシンのアポトーシス誘導における亜鉛の役割についての検討を行った。亜鉛は、アポトーシスに伴う細胞内の酸化還元状態やアポトーシス誘導の調節等の細胞内の代謝に関与する金属イオンである。そこで、リシンによる細胞内の亜鉛の挙動について検討したところ、リシンによるアポトーシス誘導は亜鉛を添加することにより阻害された。一方、リシンのアポトーシス誘導時に、細胞内の亜鉛の遊離化に伴い、細胞内グルタチオン濃度の減少が確認された。また、カスパーゼファミリー阻害剤の添加により、リシンのアポトーシス誘導が阻害され、アポトーシス誘導に伴う亜鉛の遊離化も阻害されたことから、細胞内の亜鉛はリシン誘導アポトーシスにおいて、細胞内グルタチオン濃度や DNA の断片化の誘導に影響を与える因子であることが推察された。

第 VI 章では、リシンによる RAW264.7 細胞の Tumor Necrosis Factor (TNF)- α の放出誘導機構についての検討を行った。リシンは動物実験により、血小板の凝集や肝臓機能の障害、腎不全等の症状を誘導することが見出されており、これらの症状は免疫細胞の炎症性免疫応答によるものと考えられている。実際に HPBMC 細胞でリシンにより TNF- α や IL-1 の放出を誘導することが見出されている。そこで、リシンの TNF- α 放出誘導とアポトーシスとの関連について検討を行った。その結果、リシン処理 RAW264.7 細胞において、タンパク質合成阻害やアポトーシスの誘導とともに TNF- α の放出が検出された。さらに、MAP kinase 及びカスパーゼの活性化が見られ、カスパーゼや KAP kinase の阻害剤によりリシンによるアポトーシス及び TNF- α 放出の誘導が強力に阻害されたことから、TNF- α の分泌の経路とアポトーシス誘導経路の間にクロストークあることが示唆された。

第 VII 章では、本研究で得られた多くの知見に基づき、リシンの培養細胞に対する毒性発現、特にアポトーシス誘導に伴う細胞内生化学的变化に関して総括した。

本論文はリシンのアポトーシス誘導における細胞内生化学的变化に関する詳細な解析を行い、細胞生化学的、分子生物学的分野において有益な知見が得られたことを認め博士（学術）の学位に値するものとして合格とした。