

論文内容要旨

論文題目

Suppression of the pro-apoptotic function of cytochrome c by singlet oxygen via a heme redox state-independent mechanism

所属部門： 分子疫学 部門

所属講座： 生体分子機能学 講座

氏名： 須藤大輔

【内容要旨】(1,200字以内)

【背景と目的】一重項酸素は活性酸素の中でも傷害性が強く、光老化やがんの光化学療法では、生成した一重項酸素が主要な役割を果たしていると考えられている。これまでに、一重項酸素が細胞を傷害する過程でカスパーゼの活性化や Bid のミトコンドリア移行を誘導し、アポトーシスを引き起こすと報告されている。一重項酸素の産生系として多くの場合、光増感反応が用いられているが、副産物である他の活性種の関与が否定できないように、定量的な評価が難しい。一方、常温で自然分解して一重項酸素のみを純粋に生成するナフタレン誘導体エンドペルオキシドを用いた検討から、一重項酸素はミトコンドリアを傷害してチトクローム c を放出させるが、カスパーゼ活性化や DNA の切斷・核の断片化といったアポトーシスで典型的に見られる変化は誘導しないことが分かっている。このことから、一重項酸素はカスパーゼ経路の活性化を抑制する可能性が考えられる。今回この分子機構を解明するために、チトクローム c のもつヘムの酸化還元状態とアポトーシス誘導能の関係を明らかにしたうえで、チトクローム c に対する一重項酸素の作用を解析した。

【方法】チトクローム c のもつヘムの酸化還元状態を分光学的に測定した。アポトーシスの実行に関わるカスパーゼ経路については、その活性化能を細胞抽出液を用いた *in vitro* 再構成系で検討した。一重項酸素処理したチトクローム c を用いて同様の検討を行い、カスパーゼ経路への影響について調べた。チトクローム c に対する一重項酸素の直接効果については、タンパク質の酸化状態をカルボニルプロット法で、またヘムの酸化還元状態については EPR により測定した。

【結果と考察】チトクローム c の酸化還元状態とアポトーシス誘導能の関係について検討した結果、チトクローム c は酸化型のみがカスパーゼ経路を活性化することが分かった。一重項酸素処理により、酸化型ならびに還元型のいずれのチトクローム c もカスパーゼ経路活性化能を失い、酸化剤や還元剤で処理してもその機能は回復しなかった。一重項酸素処理したチトクローム c の吸収波長の測定からは、ヘムの状態が還元型に近いことが示唆された。しかし、EPR でスピン状態を測定したところ、一重項酸素処理によりチトクローム c のヘムの配位が傷害されており、一重項酸素の影響はヘムの酸化還元状態とは関係がないことが分かった。一重項酸素処理したチトクローム c ではカルボニル含量が増加していたことから、チトクローム c タンパク質が酸化されたことが原因と考えられる。以上の結果は、一重項酸素はチトクローム c タンパク質を酸化し、カスパーゼ経路の活性化を阻害するため、細胞はアポトーシスに特徴的な経過をたどることなく死に至る事が示唆された。アポトーシスの抑制は炎症を激化させるため、この機構が日焼けによる皮膚炎の劇症化などに関わる可能性がある。

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 須藤 大輔

論文題目：Suppression of the pro-apoptotic function of cytochrome c by singlet oxygen via a heme redox state-independent mechanism
(酸化型チトクローム-c が惹起するカスパーゼ経路活性化の一重項酸素による阻害機構)

審査委員：主審査委員

藤井 順 逸 (印)

副審査委員

中村 孝夫 (印)

副審査委員

大門 真 (印)

審査終了日：平成 19年 1 月 12日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

活性酸素による生体傷害に関する研究は進み、今日では様々な疾患の増悪因子と認識されている。最も研究されている活性酸素種は、ヒドロキシラジカルに代表される不対電子をもつ酸素ラジカルやその前駆物質の過酸化水素である。ラジカルではないが同じく酸素分子に由来する活性酸素種に一重項酸素がある。生体内で産生される一重項酸素のほとんどは、ヘムやフラビンといった色素分子が紫外線により励起され、基底状態に戻る際にエネルギーを酸素分子に移し電子のスピン状態を変えることで生じる。このような光化学反応による生成の際には他の活性種も同時に生じるうえに、産生量の制御が困難であるため、一重項酸素の作用に特定して検討することは難しい。こうした副産物の影響を排除し純粋に一重項酸素の効果を調べる目的で、ナフタレン誘導体エンドペルキシドが開発され利用されて来た。この化合物を一重項酸素ドナーとして用いた解析から、それまではアポトーシスを誘導すると報告されていた一重項酸素が、条件によってはカスパーゼ経路の活性化を抑制し、アポトーシスシグナルを中断させる可能性が指摘されている。

本研究では、ミトコンドリアから遊離してアポトーシス経路活性化の引き金となるチトクロームcに対して一重項酸素がどのような影響を与えるか、ナフタレン誘導体エンドペルキシドを用いて検討を行った。まず、酸化状態と還元状態のいずれのチトクロームcがアポトーシス経路を活性化するかといった点について、酸化もしくは還元した精製チトクロームcによるカスパーゼ経路の活性化能を無細胞系で検討した。その結果、酸化型チトクロームcのみがカスパーゼ経路を活性化した。酸化型もしくは還元型のチトクロームcを一重項酸素処理すると、いずれの場合にもカスパーゼ経路活性化能は認められず、その効果は不可逆的であった。ヘムの吸収波長から、一重項酸素処理したチトクロームcのヘムは還元型に近い状態にあることが示唆されたが、EPRによる電子スピンの解析結果は、ヘムの酸化還元状態とは無関係なことを示していた。タンパクカルボニル含量が増加したことから、一重項酸素処理によるチトクロームcタンパク質の酸化が、カスパーゼ経路活性化能消失の原因と考えられた。一重項酸素がチトクロームcのカスパーゼ経路活性化能を消失させることを明らかにした本研究と、これまでに報告されているカスパーゼの直接阻害効果は、いずれも一重項酸素がアポトーシスの抑制にはたらくことを示している。アポトーシスには死細胞をすみやかに除去し炎症を回避するはたらきがあるため、一重項酸素によるアポトーシスの抑制は炎症を劇症化させる可能性がある。本論文は、一重項酸素がチトクロームcを酸化し、アポトーシス経路活性化を抑制することで炎症の劇症化に関わる可能性を示しており、博士(生命環境医科学)の学位論文にふさわしいと判断した。

(1, 200字以内)