

氏 名	ふく はら りょう じ 福 原 亮 史
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2935 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Molecular Cloning, Gene Expression, and Evolution of Enzymes That Scavenge Reactive Oxygen Species in Primates (霊長類での活性酸素消去酵素のクローニング, 遺伝子発現, および分子進化)
論文調査委員	(主 査) 教 授 景 山 節 教 授 三 上 章 允 教 授 林 基 治

論 文 内 容 の 要 旨

活性酸素は生体内で呼吸により取り込まれた酸素から派生し、生体内に侵入する微生物などに対する防御機能を果たす。しかし一方で、非常に反応性に富むため、過剰に生じた場合は生体内分子に損傷を与え、それまで保たれていた生体の恒常性が維持されなくなる。生体内では活性酸素生成系酵素として NADH/NADPH oxidase および xanthine oxidase, 活性酸素消去系酵素として superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), catalase, および ascorbate peroxidase が知られる。本研究では各種霊長類で活性酸素生成・消去酵素群について以下のことを明らかにした。

1) ニホンザルの種々の組織を用いて活性酸素生成・消去系酵素の組織分布と各酵素のアイソザイム構成を調べ、各酵素の活性及びアイソザイム多型が組織特異的であることを明らかにした。

2) SOD のアイソザイム Mn-SOD と Cu,Zn-SOD について8種類の霊長類で塩基配列を決定し、分子進化学的解析を行い、Cu,Zn-SOD について大型類人猿の分岐の際にアミノ酸置換に正の自然淘汰 (positive Darwinian selection) がかかっていることを明らかにした。ニホンザルでは両酵素とも肝臓、副腎、腎臓、腸で高い遺伝子発現が見られた。

3) GPX のアイソザイム GPX-1~4 について4種類の霊長類の塩基配列を決定して分子進化学的解析を行った。これらは共通祖先を持ち、GPX-4 が最初に分岐した後、GPX-3, GPX-2, GPX-1 の順に分岐したことを明らかにした。ニホンザルでは GPX-1 は肝臓、副腎、腎臓、腸、GPX-2 は胃腸、GPX-3 は腎臓と副腎、GPX-4 は精巣でそれぞれ強い遺伝子発現が見られた。GPX アイソザイムは各組織の活性酸素消去機能に適応して進化し、組織特異的に発現が制御されていると考えられた。

4) 各霊長類の Cu,Zn-SOD を精製し、性質を調べた。大型類人猿の酵素は比活性は低かったが熱、pH 安定性が増加し、更に H₂O₂ 阻害に対する感受性が低下していた。このことから大型類人猿の酵素でより安定な活性酸素消去能力を得たことが示唆された。

5) copper chaperone SOD (CCS) の塩基配列を6種類の霊長類で決定した。CCS と Cu,Zn-SOD の分子進化学的解析では、これらのタンパク質は共通祖先を持ち真核生物の極めて初期に分岐したと推測された。ニホンザルでは Cu,Zn-SOD と同様に肝臓、腎臓、副腎、腸で高い遺伝子発現がみられた。これは生体内で Cu,Zn-SOD と CCS が細胞内で協調した遺伝子発現調節を受けているためと考えられた。

以上、本研究では活性酸素生成・消去酵素についてタンパク質の構造、遺伝子発現、分子進化など基礎的側面を中心に解析を行った。この中で霊長類 Cu,Zn-SOD の遺伝子進化で正の自然淘汰が起こったこと、GPX および CCS の分子系統樹は本研究ではじめて明らかになったものであり、霊長類の活性酸素消去系を解明していく上で重要な成果である。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

酸素呼吸をおこなう生物では生体内で酸素の派生物として活性酸素を生じるため、その消去が生体恒常性維持にとって不

可欠である。霊長類ではヒトを除いて活性酸素消去機能について殆ど研究がおこなわれていなかった。申請者は広範な霊長類種を対象に活性酸素消去の酵素系の解析、および各酵素の遺伝子クローニングと分子進化解析を進め、霊長類での活性酸素消去系について分子生物学的側面を中心に研究をおこなった。

第1章では、ニホンザルで活性酸素生成と消去の酵素系について組織での活性分布とアイソザイム構成を報告した。酵素により組織での活性やアイソザイムの構成が異なることは、生成・消去の両方の系で組織多様性があることを示したものとして評価できる。

第2章では、superoxide dismutase (SOD) について遺伝子クローニング、分子進化解析、組織での遺伝子発現を報告した。Mn と Cu,Zn 両タイプの SOD を 8 種の霊長類でクローニングし、Cu,Zn-SOD 遺伝子が類人猿の分岐にともない正の自然淘汰を受けたことを明らかにしたことは大きな成果である。

第3、4章では glutathione peroxidase (GPX) について遺伝子クローニング、分子進化解析、組織での遺伝子発現を報告した。GPX は 4 アイソザイムが知られるが、本報告ではすべてのアイソザイムについて 4 種の霊長類でクローニングをおこない、各アイソザイムの進化的な関係を初めて明らかにしたもので価値あるものである。遺伝子発現はニホンザルを用いておこなっているが、マウスなどで断片的に報告されていたものを、組織を広げて網羅的に解析したところが評価できる。

第5章では SOD をチンパンジーなど代表的霊長類で精製し、性質を比較した。第2章で報告した SOD の正の自然淘汰の実体を明らかにしようと試みたものである。この中でチンパンジーなど類人猿 SOD の酵素活性はニホンザルに比べて低い、pH や熱に対する安定性が高いとの結果を得ている。このことは類人猿での SOD 遺伝子進化が酵素の安定化の方向に進んだことを示しており、興味深い結果と言える。

第6章では、SOD に銅イオンの受け渡しをおこなうタンパク質 (CCS) のクローニングと分子進化解析、組織での遺伝子発現を報告した。6 種の霊長類で CCS の配列解析と他の動物、酵母、細菌配列との比較から、SOD と CCS は同一起源で真核生物進化の初期に分岐したことを明らかにした点は価値あるものである。

以上、本申請論文は活性酸素消去酵素の遺伝子クローニングを数種の霊長類で進め、特に分子進化解析で大きな成果を得ている。また組織での遺伝子発現、酵素活性分布などの解析から、消去系の多様性を明らかにしている。これらの成果は霊長類の活性酸素消去系について初めての知見として高く評価できるものである。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。