

学 位 論 文 題 名

Mycoplasma arginini アルギニンデイミナーゼの
分子クローニングとその免疫抑制機序の解析

学位論文内容の要旨

1986年、FujiwaraとEllner はヒト マクロファージ様細胞株、U937の培養上清中にヒト リンパ球の増殖を強く抑制する免疫抑制因子の存在を報告した。当研究室ではこの因子の単一精製を達成し、リンパ球幼若化阻止因子（LBIF）と命名した。本研究ではこの因子の同定、遺伝子の単離とその全構造の決定、そして、LBIFの免疫抑制メカニズムの分子機序を解明することを目的とした。本論文の要旨は以下の 5 点である。

1) ヒト マクロファージ様細胞株、U937の培養上清中に存在する免疫抑制因子、LBIFを単一精製し、ヒト、および、マウスTリンパ球の増殖、さらに、多くの腫瘍細胞株の増殖を抑制することを明らかにした。また、この因子の同定を行った結果、LBIFはヒト培養細胞に感染していた*Mycoplasma arginini* が産生するL-アルギニン分解性酵素、アルギニンデイミナーゼ（EC 3.5.3.6）であることを明らかにした。この酵素は L-アルギニンを加水分解して、L-シトルリンとアンモニアに変換する。

2) *M. arginini* アルギニンデイミナーゼ遺伝子をクローニングし、その全塩基配列を決定した。この結果、オープン リーディング フレームは 1,230 bp で 410個のアミノ酸をコードしていた。また、N 末端アミノ酸の解析から成熟型アルギニンデイミナーゼ分子は開始コドンのMet残基が除かれSer残基から始まる409個のアミノ酸によって構成されていることが明らかになった。これから推定される

分子量は46,372であった。この遺伝子の5'側非翻訳領域には転写開始シグナルの-10、-35様配列、およびリボソーム結合配列のShine-Dalgarno (SD) 配列が認められた。また、3'側非翻訳領域には転写終結シグナルと考えられる2つの逆方向の繰り返し配列が存在していた。さらにこの遺伝子には低GC含量、および、ナンセンスコドンTGAがTrpコドンとして使用されるというマイコプラズマ属特有の特徴が認められた。

3) マイコプラズマ種間におけるアルギニンデイミナーゼの酵素学的性質 - 至適温度、至適pH、金属イオン要求性、ミカエリス定数 - には類似性が認められた。しかしながら、アルギニンデイミナーゼ分子の分子量、等電点、サブユニット構造、さらには遺伝子の制限断片長多型 (RFLP) の解析からその蛋白、遺伝子構造には多形性が存在することが示唆された。

4) アルギニンデイミナーゼによる免疫抑制の分子機序の解明を試みた。この結果、リンパ球ではL-シトルリンをL-アルギニンに変換する尿素サイクル中の律速酵素、アルギニノコハク酸シンテターゼ (ASS) の遺伝子が組織特異的な発現制御を受けており、酵素活性が著しく低いことが明らかになった。このため、L-アルギニンは細胞増殖に必須のアミノ酸であるが、リンパ球はアルギニンデイミナーゼ活性によって生成したL-シトルリンをL-アルギニンに変換できないために免疫抑制が起きることが明らかになった。また、腫瘍細胞株を用いた解析で、アルギニンデイミナーゼにより増殖抑制を受ける腫瘍細胞株の抑制メカニズムもリンパ球の場合と同一であることが明らかになった。一方、アルギニンデイミナーゼによる増殖抑制を受けない細胞株ではASS遺伝子の発現が認められ、この活性が存在するためにL-シトルリンを利用することが可能になり、増殖を行うことが明らかになった。

5) ヒト悪性黒色腫細胞株は調べたかぎりの全てにおいて、*in vitro* でアルギニンデイミナーゼによる増殖抑制を受け、この抑制機序はリンパ球の場合と同一のASS遺伝子の低発現によるものであることが明らかになった。また、*in vivo* においてもアルギニンデイミナーゼ分子の抗腫瘍活性が報告されており、この分子の組織特異的な遺伝子の発現制御メカニズムにもとづいた増殖抑制活性より、癌治療への応用の可能性が考えられた。

また、種々の白血病患者の白血病細胞におけるASS遺伝子の発現を検討した結果、

急性白血病細胞（ALL, AML）ではASS遺伝子の発現亢進が認められたが、慢性白血病細胞（CLL, CML）は正常レベルであった。このことは、ASS遺伝子の発現制御メカニズムと白血病の発症の分子機序との間には何らかの関連性があることを示唆した。さらに、CMLでは慢性期においてはASS遺伝子の発現は低いものの、急性転化すると30倍以上の発現亢進が認められた。CML白血病患者の急性転化はその90%以上が3年以内に死亡するが、今日、臨床的診断でこれを予測することは困難であることから、ASS遺伝子の発現異常をマーカーにすることにより、CMLの急性転化を分子生物学的に予知する方法の可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 東 市 郎

副 査 教 授 杉 本 和 則

副 査 教 授 菊 地 九二三

学 位 論 文 題 名

Mycoplasma arginini アルギニンデイミナーゼの分子クローニングと

その免疫抑制機序の解析

1986 年、Fujiwara と Ellner はヒト マクロファージ様細胞株、U937 の培養上清中にヒト リンパ球の増殖を強く抑制する免疫抑制因子の存在を報告した。当研究室ではこの因子の単一精製を達成し、リンパ球幼若化阻止因子 (LBIF) と命名した。申請者は、この因子の同定、遺伝子の単離とその全構造の決定、そして LBIF の免疫抑制メカニズムの分子機序に関する研究を行なった。

1) ヒト マクロファージ様細胞株、U937 の培養上清中に存在する免疫抑制因子、LBIF を単一精製し、ヒト、およびマウス T リンパ球の増殖、さらに、多くの腫瘍細胞株の増殖を抑制することを明らかにした。また、この因子の同定を行なった結果、LBIF はヒト培養細胞に感染していた *Mycoplasma arginini* が産生する L-アルギニン分解性酵素、アルギニンデイミナーゼ (EC 3.5.3.6) であることを明らかにした。この酵素は L-アルギニンを加水分解して、L-シトルリンとアンモニアに変換する。

2) *M. arginini* アルギニンデイミナーゼ遺伝子をクローニングし、その全塩基配列を決定した。この結果、オープン リーディング フレームは 1,230 bp で 410 個のアミノ酸をコードしていた。また、N 末端アミノ酸の解析から成熟型アルギニンデイミナーゼ分子は開始コドンの Met 残基が除かれ Ser 残基から始まる 409 個のアミノ酸によって構成されていることが明らかになった。これから推定される分子量は 46,372 であった。この遺伝子の 5' 側非翻訳領域には転写開始シグナルの -10、-35 様配列、およびリボゾーム結合配列の Shine-Dalgarno (SD) 配列が認められた。また、3' 側非翻訳領域には転写終結シグナルと考えられる 2 つの逆方向の繰り返し配列が存在していた。さらにこの遺伝子には低 GC 含量、

およびナンセンス コドンTGAがTrpコドンとして使用されるというマイコプラズマ属特有の特徴が認められた。

3) マイコプラズマ種間におけるアルギニンデイミナーゼの酵素学的性質 ―至適温度、至適 pH、金属イオン要求性、ミカエリス定数― には類似性が認められた。しかしながら、アルギニンデイミナーゼ分子の分子量、等電点、サブユニット構造、さらには遺伝子の制限断片長多型 (RFLP) の解析からその蛋白、遺伝子構造には多形性が存在することが示唆された。

4) アルギニンデイミナーゼによる免疫抑制の分子機序について解析を行なった結果、リンパ球では L-シトルリンを L-アルギニンに変換する尿素サイクル中の律速酵素、アルギニノコハク酸シンターゼ (ASS) の遺伝子が組織特異的な発現制御を受けており、酵素活性が著しく低いことが明らかになった。このため、L-アルギニンは細胞増殖に必須のアミノ酸であるが、リンパ球はアルギニンデイミナーゼ活性によって生成した L-シトルリンを L-アルギニンに変換できないために免疫抑制が起きることが明らかになった。また、腫瘍細胞株を用いた解析で、アルギニンデイミナーゼにより増殖抑制を受ける腫瘍細胞株の抑制メカニズムもリンパ球の場合と同一であることが明らかになった。一方、アルギニンデイミナーゼによる増殖抑制を受けない細胞株では ASS 遺伝子の発現が認められ、この活性が存在するために L-シトルリンを利用することが可能になり、増殖を行うことが明らかになった。

5) ヒト悪性黒色腫細胞株は調べたかぎりの全てにおいて、*in vitro* でアルギニンデイミナーゼによる増殖抑制を受け、この抑制機序はリンパ球の場合と同一の ASS 遺伝子の低発現によるものであることが明らかになった。また、*in vivo* においてもアルギニンデイミナーゼ分子の抗腫瘍活性が報告されており、この分子の組織特異的な遺伝子の発現制御メカニズムにもとづいた増殖抑制活性より、治療への応用の可能性が考えられた。

また、種々の白血病患者の白血病細胞における ASS 遺伝子の発現を検討した結果、急性白血病細胞 (ALL, AML) では ASS 遺伝子の発現亢進が認められたが、慢性白血病細胞 (CLL, CML) は正常レベルであった。このことは、ASS 遺伝子の発現制御メカニズムと白血病の発症の分子機序との間には何らかの関連性があることを示唆した。さらに、CML では慢性期においては ASS 遺伝子の発現は低いものの、急性転化すると 30 倍以上の発現亢進が認められた。CML 白血病患者の急性転化はその 90% 以上が 3 年以内に死亡するが、現在臨床的診断でこれを予測することは困難であることから、ASS 遺伝子の発現異常をマーカーにすることにより、CML の急性転化を分子生物学的に予知する方法の可能性が示唆された。

審査員一同は、申請者が博士 (理学) の学位を得るに十分な資格を有するものと認定した。