ヒマ種子毒蛋白質リシンの構造と機能[†]

(1992 年度日本農芸化学会功績賞受賞)

船 津 軍 喜

(九州大学農学部)

ヒマ (*Ricinus communis*) 種子に熱に不安定な毒素が含まれることは古くから知られていたが、その本格的な研究が着手されたのは 19 世紀末で、1888 年この毒素が蛋白質であることが Stillmark によって初めて立証され、リシン (ricin) と命名された。彼はリシン標品に強い赤血球凝集作用があることを見だし (レクチンの発見)、これが毒性の原因ではないかと考えたが、間もなく、リシンの毒性と赤血球凝集活性が血清との沈降反応に対して異なった挙動を示す (免疫学の始まり) ことから、両活性間には関連性がないことがわかった。一方、Le Bruton と Moulé はリシン標品に独特のプロテアーゼ作用があることを見だし、これが感受性細胞における重要酵素蛋白質を破壊して死に至らしめるという毒性発現機構を提唱した。しかしながら、いずれのリシン標品も純粋とはいいがたく、その本態については明らかでなかった⁽¹⁾。

1959 年、筆者はハイドロキシアパタイト吸着クロマトにより、赤血球凝集活性とプロテアーゼ活性を含みぬリシンを分離することに成功し、同時に強い赤血球凝集作用を有する蛋白質ヘムアグルチニン (castor bean hemagglutinin=CBH) を分離した⁽²⁾。引き続き、われわれは純粋な 2 種のリシン (リシン D⁽³⁾ と E⁽⁴⁾) を分離し、それらが分子量約 3 万の 2 つの異なるサブユニット (A 鎖と B 鎖) から構成され、両鎖は 1 個の S-S で結合していることを見だし⁽⁵⁾、さらにその全アミノ酸配列を決定した。また、CBH についても詳細な研究を行い、CBH はリシンの相同蛋白質であるが、リシンの AB 構造に対し (A'B')₂ 構造をとり、このため高い赤血球凝集

活性を発現し、毒性が発現されないことを明らかにするとともに⁽⁶⁾、リシンにも細胞凝集活性があり、毒性と細胞凝集活性とは不可分の関係があることを明らかにした。

一方、リシンの作用機構に関しては、1971 年 Lin ら⁽⁷⁾ がリシンに腫瘍細胞増殖抑制作用があることを認め、これが蛋白質合成阻害によることを見だした。その後、蛋白合成阻害作用は無細胞系においても立証され⁽⁸⁾、リシンの毒性は真核細胞のリボソームを不活化し、蛋白合成を阻害することによって発現されることが明らかになった。このように、リシンに関する研究は古くから開始され、その構造と作用の両面から進められてきたが、最近、リシンの三次元構造が決定されるとともに、A 鎖によるリボソームの不活化機構が解明され、その構造と機能との関連性が次第に明らかになってきた。

1. リシンの構造

1978 年と 1979 年、われわれは化学的方法によって決定したリシン D の A 鎖と B 鎖の一次構造を報告した^(9,10) が、1985 年、リシンの前駆体をコードする cDNA の塩基配列が Lamb ら⁽¹¹⁾により、また遺伝子の塩基配列が Halling ら⁽¹²⁾により決定された。これにより、リシンは、まず 565 個のアミノ酸残基からなる前駆体プレプロリシンとして生合成され、続いてエンドペプチダーゼの作用により N 末端のシグナル領域 (24 残基) と中央のリンカー領域 (12 残基) が限定水解されて形成されることが明らかになった。また、1987 年、リシンの三次元構造が Montfort ら⁽¹³⁾によって決定され、さらにリシンに結合する糖鎖の構造がわれわれ⁽¹⁴⁾によって決定された。リシン D の一次構造、糖鎖構造および三次元構造を、それぞれ図 1、図 2 および図 3 に示す。

A 鎖は 267 個のアミノ酸残基からなり、分子内に S-S 結合を持たず、Asn-10 にキシロース含有オリゴ糖が結

[†] Structure and Function of Ricin, a Toxic Protein from Castor Bean Seeds.

Gunki FUNATSU (Laboratory of Protein Chemistry and Engineering, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812)

11e-Phe-Pro-Lys-Gln-Tyr-Pro-Ile-Ile-Asn-Phe-Thr-Thr-Ala-Gly-Ala-Thr-Val-Gln-Ser-20
 Tyr-Thr-Asn-Phe-Ile-Arg-Ala-Val-Arg-Gly-Arg-Leu-Thr-Thr-Gly-Ala-Asp-Val-Arg-His-40
 Glu-Ile-Pro-Val-Leu-Pro-Asn-Arg-Val-Gly-Leu-Pro-Ile-Asn-Gln-Arg-Phe-Ile-Leu-Val-60
 Glu-Leu-Ser-Asn-His-Ala-Gly-Leu-Ser-Val-Thr-Leu-Ala-Leu-Asp-Val-Thr-Asn-Ala-Tyr-80
 Val-Val-Gly-Tyr-Arg-Ala-Gly-Asn-Ser-Ala-Tyr-Phe-Phe-His-Pro-Asp-Asn-Gln-Glu-Asp-100
 Ala-Glu-Ala-Ile-Thr-His-Leu-Phe-Thr-Asp-Val-Gln-Asn-Arg-Tyr-Thr-Phe-Ala-Phe-Gly-120
 Gly-Asn-Tyr-Asp-Arg-Leu-Gln-Leu-Ala-Gly-Asn-Leu-Arg-Glu-Asn-Ile-Glu-Leu-Gly-140
 Asn-Gly-Pro-Leu-Glu-Glu-Ala-Ile-Ser-Ala-Leu-Tyr-Tyr-Ser-Thr-Gly-Thr-Gln-160
 Leu-Pro-Thr-Leu-Ala-Arg-Ser-Phe-Ile-Ile-Cys-Ile-Gln-Met-Ile-Ser-Glu-Ala-Ala-Arg-180
 Phe-Gln-Tyr-Ile-Glu-Gly-Glu-Met-Arg-Thr-Arg-Ile-Arg-Tyr-Asn-Arg-Arg-Ser-Ala-Pro-200
 Asp-Pro-Ser-Val-Ile-Thr-Leu-Glu-Asn-Ser-Trp-Gly-Arg-Leu-Ser-Thr-Ala-Ile-Gln-Glu-220
 Ser-Asn-Gln-Gly-Ala-Phe-Ala-Ser-Pro-Ile-Gln-Leu-Gln-Arg-Arg-Asn-Gly-Ser-Lys-Phe-240
 Ser-Val-Tyr-Asp-Val-Ser-Ile-Leu-Ile-Pro-Ile-Ile-Ala-Leu-Met-Val-Tyr-Arg-Cys-Ala-260
 Pro-Pro-Pro-Ser-Ser-Gln-Phe

Ala-Asp-Val-Cys-Met-Asp-Pro-Glu-Pro-Ile-Val-Ile-Val-Gly-Arg-Asn-Gly-Leu-Cys-20
 Val-Asp-Val-Arg-Asp-Gly-Arg-Phe-His-Asn-Gly-Ala-Ile-Gln-Leu-Trp-Pro-Cys-Lys-40
 Ser-Asn-Thr-Asp-Ala-Asn-Gln-Leu-Trp-Thr-Leu-Lys-Arg-Asp-Asn-Thr-Ile-Arg-Ser-Asn-60
 Gly-Lys-Cys-Leu-Thr-Thr-Tyr-Gly-Tyr-Pro-Ser-Gly-Val-Tyr-Val-Met-Ile-Tyr-Asp-Cys-80
 Asn-Thr-Ala-Ala-Thr-Asp-Ala-Thr-Arg-Trp-Gln-Ile-Trp-Asp-Asn-Gly-Thr-Ile-Ile-Asn-100
 Pro-Arg-Ser-Ser-Leu-Val-Leu-Ala-Ala-Thr-Ser-Gly-Asn-Ser-Gly-Thr-Thr-Leu-Thr-Val-120
 Gln-Thr-Asn-Ile-Tyr-Ala-Val-Ser-Gln-Gly-Trp-Leu-Pro-Thr-Asn-Asn-Thr-Gln-Pro-Phe-140
 Val-Thr-Thr-Ile-Val-Gly-Leu-Tyr-Gly-Leu-Cys-Leu-Gln-Ala-Asn-Ser-Gly-Gln-Val-Trp-160
 Ile-Glu-Asp-Cys-Ser-Ser-Glu-Lys-Ala-Gln-Gln-Trp-Ala-Leu-Tyr-Ala-Asp-Gly-Ser-180
 Ile-Arg-Pro-Gln-Gln-Asn-Arg-Asp-Cys-Lys-Leu-Thr-Ser-Ser-Ser-Ile-Arg-Glu-Thr-200
 Val-Val-Lys-Ile-Leu-Ser-Cys-Gly-Pro-Ala-Ser-Ser-Gly-Gln-Arg-Trp-Met-Phe-Lys-Asn-220
 Asp-Gly-Thr-Ile-Leu-Asn-Leu-Tyr-Ser-Gly-Leu-Val-Leu-Asp-Val-Arg-Ala-Ser-Asp-Pro-240
 Ser-Leu-Lys-Gln-Ile-Ile-Leu-Tyr-Pro-Leu-His-Gly-Asp-Pro-Asn-Gln-Ile-Trp-Leu-Pro-260
 Leu-Phe

図 1 リシンDのアミノ酸配列 (左; A鎖, 右; B鎖)

図 2 リシンDの糖鎖構造

合し, ドメイン 1 (1~117), ドメイン 2 (118~210) およびドメイン 3 (211~267) から構成される. 一方, B鎖は 262 個のアミノ酸残基からなり, 分子内に4つの S-S 結合を有し, Asn-95 と Asn-135 に高マンノース型

図 3 リボン式で表わしたリシンの骨格構造⁽¹³⁾ (右上; A鎖, 左下; B鎖)

A鎖とB鎖の間隔は見やすいように実際より少し離してある. B鎖に結合した2個のラクトース分子は1対の円板で表わしてある.

オリゴ糖が結合し, 2つの相同性のドメイン 1 (1~135) とドメイン 2 (136~262) から構成される. 両鎖はA鎖の Cys-259 とB鎖の Cys-4 との間の S-S 結合によって結合し, 両鎖間にはA鎖の Tyr-185, Phe-240, Ile-247, Pro-250, Ile-251 とB鎖の Phe-140, Phe-218, Pro-260, Phe-262 との間の疎水結合およびいくつかの極性基間のイオン結合が形成されている. その接触面は各鎖の約 14% で, 関与する結合が少ないため結合は弱く, 鎖間の

図4 ラット肝リボソームの28S rRNAにおけるリシンA鎖およびリボソーム不活化蛋白質の作用部位(矢印)⁽¹⁵⁾

S-S結合を切断すると両鎖は容易に離れる。リシンは一般の蛋白質に比べ、熱、酸、アルカリおよび変性剤に対して比較的安定であるが、鎖間S-S結合を切断すると安定性は著しく減少し、またプロテアーゼによって容易に加水分解される。

2. リシンA鎖の構造と機能

真核細胞リボソームをリシンA鎖で処理すると、リボソームのEF-2・GTPに対する親和性が著しく低下し蛋白合成が阻害される。1987年、遠藤ら⁽¹⁵⁾はA鎖がラット肝リボソーム28S rRNAの4324番目のヌクレオチドのアデニン(A-4324)とリボースとの間のN-グリコシド結合を特異的に水解することを見だし(図4)、これにRNA N-グリコシダーゼと命名した。一方、近年、多くの植物から毒性はないが真核細胞リボソームを不活化する分子量約3万の蛋白質が分離され、いずれもリシンA鎖と全く同じ作用を有することがわかった⁽¹⁶⁾。われわれは、ヘチマ、ニガウリ、アメリカヤマゴボウの種子からリボソーム不活化蛋白質(ribosome-inactivating protein=RIP)を分離し、そのアミノ酸配列を決定し、これらを含め、これまで決定されたRIPのアミノ酸配列をリシンA鎖と比較した結果、図5に示すように、これらすべてに共通するアミノ酸残基は13個(Tyr-21, Phe-24, Arg-29, Tyr-80, Tyr-123, Gly-140, Ala-165, Glu-177, Ala-178, Arg-180, Glu-208, Asn-209, Trp-211)であることがわかった⁽¹⁷⁾。その他のアミノ酸についても、類似したアミノ酸への変換が多く、とくに疎水性アミノ酸残基の分布は類似しており、これら

RIPは類似した立体構造をとることが類推される。事実、リシンA鎖の骨格構造を基にしてエネルギー・ミニマイゼーション法で作製されたアブリンA鎖(リシンA鎖と41%の相同性)と α -トリコサンチン(33%の相同性)の三次元骨格構造モデルはリシンA鎖と非常によく一致し、分子表面のループの部分がわずかに異なるに過ぎないことがわかった⁽¹⁸⁾。このことは、リシンA鎖を含めこれらRIPの触媒部位はきわめて類似した構造をとり、共通アミノ酸残基のいずれかがその触媒作用に直接関与することを示唆する。結晶リシンとアデニン含有結晶リシンとの電子密度の差からアデニンの結合部位を推定して、7つの共通アミノ酸残基(Tyr-80, Tyr-123, Glu-177, Arg-180, Glu-208, Asn-209, Trp-211)を含む活性部位が提示され(図6)⁽¹⁹⁾、また、それらのアミノ酸の部位特異的変異の研究から、Glu-177が直接触媒作用に関与することが推定された⁽²⁰⁾。Glu-177はA-4324と結合しているリボース環上の正荷電を安定化し、Arg-180はRNAのリン酸基と、Tyr-80, Tyr-123およびTrp-211は基質のリボースやアデニン環に結合するものと思われる⁽²¹⁾。

A鎖のGlu-177を含む活性部位はリシン分子表面に存在するにもかかわらず、リシンにリボソーム不活化作用がないことから、その活性発現にはB鎖との会合に関与するC端領域も含まれることが示唆される。われわれは、リシンA鎖の活性に関与するアミノ酸残基を知るため、化学修飾の活性に及ぼす影響について調べた。リシンのアルギニン残基をフェニルグリオキザールで、チロシン残基をKI₂で修飾してもA鎖の活性はほとんど低

```

      1      10      20      30      40
RIC  IFPKQYPIINFTTAGATVQSYTNFIRAVRCRLTTGADVRHE---IPVLP
RCA  IFPKQYPIINFTTADATVESYTNFIRAVRSHLTGADVRHE---IPVLP
ABR  EDRP-1KFSTEGATSQSYKQFIEALRERLRGG--LIHD---IPVLP
LUFa DVRFSLSGSSSTSYSKFIDGLRKALPSNGTV-YN---LTILL
LUFb ANVSFSLSGADSKSYSKFITAKRKALPSKEKV-SN---IPLLL
MOM  DVSFRLSGADPRSYGMFIKDLRNALPFREKV-YN---IPLLL
TRI  DVSFRLSGATSSSYGVFISNLRKALPNERKL-YD---IPLL
PAP  INTITFDAGNATINKYATFMESURNEAKDPSLKCYG---IPMLP
MAP  APTLETIASLDLNNPTTILSFITNIRTKVADKTEQC-T---IQKIS
SAP  VTSITLDLVNPTAGQYSSSFVDKIRNNVKDPNLK-YGTDIAVIG
BAR  AAKMAKNVDKPLFTATFNV-QASSADYATFIAGIRNNKLRNPAHFSSH--E-PVLP

      50      60      70      80      90      100
NRVGLPINQR-FILVELSNHAELSVTLALDVTNAVYVGYRAGNS----AYFFHPDNQEDA-EAI
NRVGLPISQR-FILVELSNHAELSVTLALDVTNAVYVGCRAAGNS----AYFFHPDNQEDA-EAI
DPTTLQERNR-YITVELSNSDTEIEVGIDVTNAVYVAYRAGTQ----SYFLR---DAPS-SAS
SSASGAS--R-YTLMTLSNYDGKAITVAVDVSQLYIMGYLVNST----SYFFN---ESDAKLAS
PSASGAS--R-YILMQLSNYDAKAITMAIDVTNVYIMGYLVNST----SYFAN---ESDAKLAS
PSVSGAG--R-YLLMHLFNYDGKITVALDLTNVYIMGYLADTT----SYFFN---QPAAEAS
RS-SLPGSQR-YALIHLTNYADETISVAIDVTNVYIMGYRAGDT----SYFFN---EASATEAA
NTNSTI---K-YLLVLKQGASLKITLMLRRNNLYVMGYSDPYD-NKCR-YHIFNDIKGTEYSDV
KTFTQ---R-YSYIDLIVSSTQKITLAIDMADLYVLGYSDIAN-NKGRAFF--KDVTEAVA
PPSKE---K-FLRINFQSSR-GTVSLGLKRDNLVYVAYLAMDNNTNVNRAYFR---SEITSAES
PVEPNVPPSRWFHVVLKASPTSAGLTLAIRADNIMLDGPKS-----SDGTWWEL

      110      120      130      140      150
THLF---TDVQNRYTFAFGGNYDRLEQLA---GNL-RENIELGNCPLFEAISALYYYST---G
THLF---TDVQNSFTFAFGGNYDRLEQL---GGL-RENIELGTGPLEDAISALYYYST---C
DYLFI---T-GTDQHSLPFYGTIGDLERWA---HQSRQQIPLGLQALTHGIS---FFRS---G
QYVF---K-GSTIVTLPSYSGNYEKLQTAA---GKI-REKIPGLGFALDSALTTIFHYDS---
QYVF---K-GSTLVITIPYSGNYERLQNA---GKI-REKIPGLFRALDSALTSIFHYDS---
QYVF---RDA-RKITLPSYSGNYERLQIA---GKP-REKIPGLPAIDSAISTLLHYDS---
KYVF---KDMARKVTLPYSGNYERLQTAA---GKI-RENIPLGLPALDSAITTLFYNA---
ENTLCPSSNPRVAKPINYNGLYPTLEKKA---GVTSRNEVQLGIIQLSSDIKISQCGS---
NNFF-PGATGTNRKIKLFTTGSYGDLKKN---GGL-RKDNPLGIFRLENSIVNIYGKAG---
TALF-PGATTANQKALEYTEDYQSIEKNAQITQGDQSRKELGLGIDLLSTSMEAVNKKR---
TFGLIPGAT---YVGGGGTYRDLGLGTD---KL--TNVALGRQQLEDAVTAL-HGRTKADKA

      160      170      180      190      200      210
GTQLPTLARSFIIC-IQMISEAARFQYIEGEMRTRIIRYNRRSAPDPSVITL-----NS-WGRLS
GTQIPTLARSFMVC-IQMISEAARFQYIEGFMRTIRIRYNRRSAPDPSVITL-----NS-WGRLS
GNDNEEKARTLIVI-IQMVAEARFRYISNRVRVSIQTGTAFQPDAAAMISLE-----NN-WDNL
---TAAAAAFLLVI-LQTTAEASRFKYIEGQIIERI--SKNQVPSLATISLE-----NSLWSALS
---TAAAAAFLLVI-LQTTAEASRFKYIEGQIIERI--PKNEVPSPAALSLE-----NEAWSLLS
---TAAAGALLVL-IQTTAEAAREKYIEGQIQERA--YRDEVPSIATISLE-----NSLWSGLS
---NSAASALMVL-IQSTSEAAARYKFIEQQIGKRV--DKTFLPSLAIISLE-----NSWSALS
-FTEKIEAKFLLVA-IQMVSEAAARFKYIENQVKTNF--NRDFSPNDKVIDLE-----BN-WGKIS
---DVKKQAKFLLA-IQMVSEAAARFKYISDKIPSEK--YEEVTVDGYMTALE-----NN-WAKL
---VVKDEARFLIA-IQMTAEAAARFRIIQNLVIKNF--PNKFNSENKVIQFE-----VN-WKKIS
SGPKQQARAEAVTLLLMVNEATRFQTVSGFVAGLL-HPKAVEKKSIGNEKKAQVNG-WQDLS

      220      230      240      250      260
TAIQESN--QGAFASPIQLQRRNGSKFS-VYDV-S-ILIP---I-IALMVYRCAPPSSSQF
TAIQESN--QGAFASPIQLQRRNGSKFN-VYDV-S-ILIP---I-IALMVYRCAPPSSSQF
RGVQESV--QDTFPNQVTLTNIRNE-PV-IVD--S-LSHPTVAV-LALMLFVNCNPPN
KQIKLAQTNNGTFTKTPVITDDKGRVE-ITNVTSK-VVT-KNIQL-LNLYKQNV
KQIKLAQTNNGAFTPTVVIIDNKGGRVE-ITNLASK-V-QIKDVNSKLLLNKQNV
KQIKLAQNGNGIFRPTIVLVDNKGGRVQ-ITNVTSK-VVTS-NIQ--LLNTRNIAEGD
KQIQIASTNNGQFESPVVLINAQNRVT-ITNV DAG-VVTS-NIA--LLNRRNMA
TAIHNSK--NGALPKPLELNADGK--WIVL---R-VDEIK-PDVGLLNYVNGTCQAT
TAVYNSKPSTTTATK-CQLATSPVTISPWIF---KTVEEIK-LVMGLLKSS
TAIYGDAK-NGVFNKDYDFGFGKVRQVKDLQ-----MGLLMYL-GKPK
AALLKTNVPPPGKSPAKFTPIKMGVRTAEQAAATLGILLFVEVPGGLTVAKALELFHASGGK

```

図 5 種々のリボソーム不活化蛋白質のアミノ酸配列⁽¹⁷⁾

RIC, ricin A鎖; RCA, *Ricinus communis* agglutinin A鎖; ABR, abrin A鎖; LUFa, luffin-a; LUFb, luffin-b; MOM, momordin; TRI, α -trichosanthin; PAP, pokeweed antiviral protein; MAP, *Mirabilis* antiviral protein; SAP, saporin; BAR, barley translation inhibitor. ■, 完全に保存されている残基; *, 保存度の高い疎水性残基; +, 保存度の高い正荷電残基。

図 6 リシンA鎖の活性(触媒)部位⁽¹⁹⁾

下しないが、単離したA鎖を修飾すると、それぞれ Arg-193, Arg-196, Arg-213, Arg-234 および Tyr-243 (または Tyr-257) が修飾されて、活性は著しく低下した。また、アメリカヤマゴボウ種子の RIP である PAP-S は Arg-67 (リシンA鎖の 75 番目) と Arg-240 (A鎖の 246 番目)⁽²²⁾、ヘチマおよびニガウリ種子の RIP である luffin および momordin では、His-140 (A鎖の 153 番目), Tyr-165 (A鎖の 183 番目) または Lys-231 (A鎖の 246 番目) が修飾されて活性が 10% 以下に低下した^(23,24)。いずれの場合も修飾アミノ酸残基は活性部位には位置しないので、これらのアミノ酸残基の修飾は、活性発現時におけるA鎖のリボソームとの結合に何らかの影響を与えているものと考えられる。事実、momordin はラット肝リボソームに2分子結合するが、修飾 momordin はいずれもリボソームに1分子しか結合しないことがわかった⁽²⁴⁾。これらの結果は、リシンA鎖や RIP がその標的である A-4324 を攻撃する前に、その近傍に存在する蛋白質や RNA を認識してこれと結合すること、およびその結合部位がC端領域を含む広い領域にわたっていることを示す。リシンA鎖および RIP は原核細胞リボソームには作用せず、また動物リボソームに対する活性は植物リボソームに対する活性よりはるかに高く、さらに植物リボソームに対する活性はリボソームと RIP の種類によってさまざまであるが⁽²⁵⁾、これらの活性の違いは恐らく、両者間の結合の強さの違いによるものと推察される。

3. リシンB鎖の構造と機能

リシンB鎖はガラクトースおよび N-アセチルガラクトサミンに特異性を有するレクチンで、細胞表面の糖鎖と結合して細胞を凝集する。リシンに対するラクトースの結合を平衡透析法を用いて調べた結果、高親和性

図 7 リシンB鎖の低親和性糖結合部位(上)と高親和性糖結合部位(下)⁽²⁸⁾

($K_a=1.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) と低親和性 ($K_a=0.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) の2つの糖結合部位が存在することがわかった⁽²⁶⁾。リシン溶液にラクトースを加えるとトリプトファン残基に由来する蛍光差スペクトルとチロシン残基に由来する紫外吸収差スペクトルが得られ、それらの値はラクトース濃度に比例し、それらの結合定数はそれぞれ $K_a=4.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ および $K_a=2.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ と算出された⁽²⁷⁾。これらの結果から、B鎖の低親和性および高親和性糖結合部位には、それぞれトリプトファン残基とチロシン残基が存在して糖との結合に関与することが明らかになり、それらはそれぞれ Trp-37 および Tyr-248 と同定された。さらに、ラクトース含有結晶リシンのX線解析から、Trp-37 を含む低親和性糖結合部位におけるガラクトースとの結合には Asp-22, Gln-35, Asn-46 が関与し、一方、Tyr-248 を含む高親和性糖結合部位におけるガラクトースとの結合には Asp-234 と Asn-255 が関与することが明らかになった(図7)⁽²⁸⁾。

カルボキシペプチダーゼYでB鎖のC末端 Phe-262 から Trp-258 までの5個のアミノ酸残基を除去すると、高親和性糖結合部位の糖結合能が消失することから、この領域は糖結合部位の構造形成と安定化に寄与することがわかった⁽²⁹⁾。Trp-37 と Tyr-248 に由来するスペクトル変化により、ガラクトースに対する低親和性および高

親和性糖結合部位の糖結合能の pH 変化を調べた結果、前者は pH 3 以下で、後者は pH 6 以下で糖結合能を失うことがわかった⁽²⁷⁾。

4. リシンの構造と毒作用

リシンの毒性は静脈や腹腔内に直接投与した場合最も強いが、経口投与しても発現される。その中毒症状は投与数時間後に現われ、多量投与した場合でも 10 時間以上経ないと死に至らない。リシンは培養細胞に対しても強い毒性を示し、その毒作用は、(1) リシンの細胞表面受容体との結合、(2) リシン-受容体結合体の再配置とエンドサイトーシスによるリシンの細胞内侵入、(3) A 鎖によるリボソームの不活化の過程を経て発現される。

リシンの細胞への結合は、B 鎖に存在する 2 つの糖結合部位が細胞表面に存在するガラクトースまたは *N*-アセチルガラクトサミン含有糖鎖を認識して起こり、膜の流動性によりパッチ状に集まった後、エンドサイトーシス小胞として細胞内に取り込まれる⁽³⁰⁾。1 つの糖結合部位を失った修飾リシンでは、細胞への結合は起こるが細胞内に取り込まれず毒性が発現されないで、その毒性発現には B 鎖を介しての細胞との 2 価的結合が必須であることがわかった⁽³¹⁾。

リシンを還元して A 鎖と B 鎖間の S-S 結合を切断すると毒性は失われるが、再酸化すると容易に S-S 結合が形成され毒性は完全に回復する。一方、A 鎖と B 鎖を還元的に切断されない架橋試薬 *N*, *N'*-*O*-フェニレンジマレイミドおよび還元的に切断される架橋剤 *N*-スクンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ) プロピオネート (SPDP) を用いて架橋したリシンについて調べた結果、いずれも細胞への結合および侵入は生のリシンと同じであったが、前者では毒性は全く発現されないのに対し、後者では強い毒性が発現された⁽³²⁾。このことは A 鎖と B 鎖との間の架橋には還元的に切断される S-S 結合が必須であり、リシンの毒性発現過程に鎖間 S-S 結合の還元的切断過程が含まれることを示唆している。

細胞内に取り込まれたリシンはエンドソーム内に存在するため、そのままでは毒性を発揮できない。その毒性が発現されるためにはリシン分子または遊離した A 鎖がエンドソームの膜を通過して細胞質へ移行しなければならぬ。われわれはリシンの膜通過機構についての手掛かりを得るため、人工膜リボソームに対するリシンの結合および侵入について調べた。まず、ジパルミトイルホ

スファチジルコリン (DPPC) で調製したリボソームに対する結合を調べた結果、リシンはリボソームの膜脂質とは結合しないが、単離した A 鎖と B 鎖は膜脂質と結合し、とくに A 鎖は脂質二重層内に侵入することがわかった⁽³³⁾。ついで、ヒト赤血球膜脂質に 5% のガングリオシド G_{M1} を加えて調製した G_{M1} -リボソームに対する結合を調べた結果、pH 7 ではリシンは G_{M1} の糖鎖と結合するのみでリボソームの脂質には結合しなかったが、いったん pH 7 で糖鎖と結合させたのち pH を下げると、リシンは G_{M1} -リボソームの脂質部分に結合することが見いだされた⁽³⁴⁾。このリシンの脂質との結合は、図 8 に示すように pH 5.4 以下で起こり、その結合量は pH 4.4~pH 3.4 で最大で全結合量の 85% 以上であった。この結合はラクトース存在下では起こらないことから、ガングリオシド G_{M1} の糖鎖との結合を介して誘導されることがわかる。疎水性蛍光プローブである 8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸 (ANS) を用いて、pH 低下によるリシン分子の疎水性の変化を調べた結果、pH の低下によって蛍光スペクトルの変化を示し、とくに pH 6.4 と pH 5.4 間において顕著な蛍光強度の増大と最大波長の青色移動が観察され、pH 5.4 以下にしても、それ以上の大きな変化はみられなかった (図 9)。これらの結果は、中性付近ではリシン分子表面には疎水領域は存在しないが、pH 6 以下に低下させるとリシンの分子表面に疎水領域が出現することを示す。前述のように、リシンの高親和性糖結合部位は pH 6 以下で糖結合能を失うので、このリシンの糖鎖との結合を介してのリボソーム脂質との結合は、pH 低下によりリシン分子に構造変化が起こり、糖鎖との結合が切れると同時に起こるものと推察される。エンドサイトーシスによって形成

図 8 ラクトース存在下 (○) と非存在下 (●) における ^{125}I -リシン D の G_{M1} -リボソーム脂質への結合に対する pH の影響

図 9 ANS-リシン複合体の蛍光放射スペクトルに対する pH の影響

される小胞内は ATP 依存性 H^+ ポンプの作用で pH 5 に低下するので、小胞内に取り込まれたリシン分子の少なくとも一部は、この機構によって小胞膜脂質と結合し、膜通過へと導かれるものと思われる。

前述のごとく、単離した A 鎖は DPPC-リボソームの膜脂質に結合・侵入するが、その A 鎖-リボソーム複合体をプロテアーゼで消化後、リボソーム内に残存するペプチドを分析した結果、膜脂質に結合・侵入するのは疎水性の高い A 鎖の C 端領域であることがわかった。また、

その C 端領域に高い疎水性を有するトウアズキ種子毒蛋白質アブリンの A 鎖 (リシン A 鎖の相同蛋白質) は DP PC-リボソームに結合したが、C 端領域に疎水性残基が少ない luffin (ヘチマ種子の RIP) や PAP-S (アメリカヤマゴボウ種子の RIP) は DPPC-リボソームに結合しなかった。リシン A 鎖より強いリボソーム不活化活性を有するこれら RIP を、リシン B 鎖と SPDP で架橋したのち、HeLa 細胞に対する毒性を調べた結果、ハイブリッド分子 (アブリン A 鎖/リシン B 鎖) は強い毒性を示したが、ハイブリッド分子 (luffin/リシン B 鎖) および (PAP-S/リシン B 鎖) は全く毒性を示さなかった。これらのことは、リシンの毒性発現に A 鎖の C 端の疎水領域が重要な役割を演じていることを示すと同時に、エンドサイトーシスによって取り込まれたリシン分子は、そのままエンドソーム膜を通過して細胞質へ移行するのではなく、エンドソームまたはその膜内で鎖間 S-S 結合が切断され、遊離した A 鎖がエンドソーム膜を通過して細胞質へ移行するであろうことを示唆している (図 10)。

鎖間 S-S 結合の酵素的切断に関し、われわれはウシ肝臓から分離したチオール:蛋白質ジスルフィド酸化還元酵素を用い、リシンおよび CBH を還元した結果、リシンの鎖間 S-S 結合は容易に切断されたが、リシンの二量体構造をとり毒性がきわめて弱い CBH の鎖間 S-S 結合は切断されなかった。CBH の細胞への取り込みはリシンと全く同じであるので、CBH の毒性が発現されないのは、鎖間 S-S 結合が切断されず、したがって A 鎖が遊離せずエンドソーム膜を通過して細胞質へ移行しないためと考えることもできる。その機構についてはなお研究が

図 10 リシンの膜通過機構に対する仮説

必要である。

以上、リシンの毒性発現機構について、われわれは主にリシン分子の面から研究を進めてきたが、リシンの結合によって起こる細胞膜内変化も著しく、今後は細胞の面からの研究も進めていかねばならない。

- (1) 八木康雄：「有毒性蛋白質」，岩波書店，東京，1951.
- (2) 船津軍喜：農化，**33**，520—524 (1959).
- (3) M. Ishiguro, T. Takahashi, G. Funatsu, K. Hayashi, and M. Funatsu : *J. Biochem.*, **55**, 587—592 (1964).
- (4) T. Mise, G. Funatsu, M. Ishiguro, and M. Funatsu : *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2041—2046 (1977).
- (5) M. Funatsu, G. Funatsu, M. Ishiguro, S. Nanno, and K. Hara : *Proc. Japan Acad.*, **47**, 718—723 (1971).
- (6) G. Funatsu, S. Ueno, and M. Funatsu : *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1737—1743 (1977).
- (7) I. Y. Lin, K. Lin, and C. C. Chen : *Cancer Res.*, **31**, 921—924 (1971).
- (8) S. R. Olsnes, K. Refnes, and A. Phil : *Nature*, **249**, 627—631 (1974).
- (9) G. Funatsu, S. Yoshitake, and M. Funatsu : *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 501—503 (1978).
- (10) G. Funatsu, M. Kimura, and M. Funatsu : *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2221—2224 (1979).
- (11) F. I. Lamb, L. M. Roberts, and J. M. Lord : *Eur. J. Biochem.*, **148**, 265—270 (1985).
- (12) K. C. Halling, A. C. Halling, E. E. Murray, B. F. Ladin, L. L. Houston, and R. F. Weaver : *Nucleic Acids Res.*, **13**, 8019—8033 (1985).
- (13) W. Montfort, J. E. Villafranca, A. F. Monzingo, S. R. Ernst, B. Katzin, E. Rutenber, N. H. Xuong, R. Hamlin, and J. D. Robertus : *J. Biol. Chem.*, **262**, 5398—5403 (1987).
- (14) K. Kimura, S. Hase, Y. Kobayashi, Y. Kyogoku, G. Funatsu, and T. Ikenaka : *J. Biochem.*, **101**, 1051—1054 (1987).
- (15) Y. Endo, K. Mitsui, M. Motizuki, and K. Tsurugi : *J. Biol. Chem.*, **262**, 5908—5912 (1987).
- (16) 遠藤弥重太：化学と生物，**28**，437—444 (1990).
- (17) G. Funatsu, M. R. Islam, Y. Minami, S. S. Kung, and M. Kimura : *Biochimie*, **73**, 1157—1161 (1991).
- (18) T. P. Chow, R. A. Feldman, M. Lovett, and M. Piatak : *J. Biol. Chem.*, **265**, 8670—8674 (1990).
- (19) B. J. Katsin, E. J. Collins, and J. D. Robertus : *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **10**, 251—259 (1991).
- (20) A. Frankel, P. Welsh, J. Richardson, and J. D. Robertus : *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 6257—6263 (1990).
- (21) M. P. Ready, Y. Kim, and J. D. Robertus : *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **10**, 270—278 (1991).
- (22) 浅田典明，船津軍喜：生化学，**63**，625 (1991).
- (23) イスラム・ラフィクル，船津軍喜：生化学，**62**，767 (1990).
- (24) 南 雄二，船津軍喜：農化，**66**，344 (1992).
- (25) M. G. Battelli, E. Lorenzoni, and F. Stirpe : *J. Exp. Bot.*, **35**, 882—889 (1984).
- (26) T. Shimoda and G. Funatsu : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2125—2130 (1985).
- (27) T. Hatakeyama, N. Yamasaki, and G. Funatsu : *J. Biochem.*, **99**, 1049—1056 (1986).
- (28) E. Rutenber and J. D. Robertus : *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **10**, 260—269 (1991).
- (29) G. Funatsu, N. Yamasaki, and S. Kakiuchi : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1225—1226 (1987).
- (30) B. Lan Deurs, L. R. Pedersen, A. Sundan, S. Olsnes, and K. Sandvig : *Exp. Cell Res.*, **159**, 287—304 (1985).
- (31) T. Shimoda and G. Funatsu : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1175—1180 (1985).
- (32) T. Oda and G. Funatsu : *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 547—554 (1979).
- (33) T. Utsumi, Y. Aizono, and G. Funatsu : *Biochim. Biophys. Acta*, **772**, 202—208 (1984).
- (34) T. Utsumi, Y. Aizono, and G. Funatsu : *FEBS Lett.*, **216**, 99—103 (1987).