

アポトーシスに関する研究(3)

ビタミンB6とアポトーシス作用機構

Study on apoptosis(3) vitamin B6 and the apoptotic pathway.

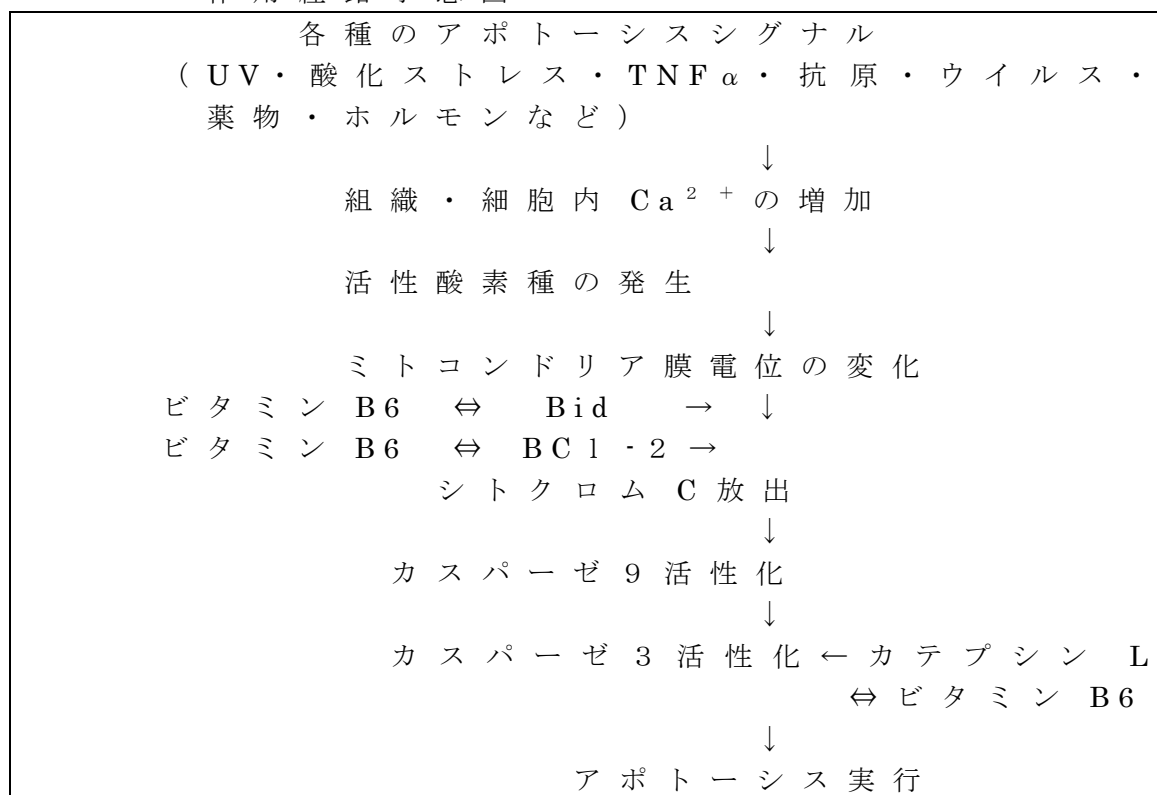
道家晶子

Shoko Doke

## Abstract

Vitamin B6 consists of 3 closely related pyrimidine derivatives: pyridoxine, pyridoxal and pyridoxamine and their phosphate esters. The tumor-specific compound, antioxidants and DNA binding inhibitor have been recently found to be as some new Vitamin B6 derivatives. The purpose of the present research was to investigate the relation between vitamin B6 and the apoptotic pathway. This study provides further evidence for the new mechanism of vitamin B6 except for the functions as the coenzymes of many enzymes which catalyze biochemical reaction on the apoptotic pathway.

図1 ビタミンB6が関与すると考えられるアポトーシス作用経路予想図



## 緒 言

生命科学には今や欠く事の出来ないアポトーシスの分子機構の解明が急速に進展している。今年のノーベル医学生理学賞は、このアポトーシスの仕組みを解明した研究に贈られた。体が単純で細胞数が少ない線虫を材料に発生の遺伝的制御の全体像を洗いだす網羅的研究手法で、細胞分裂のパターンは一定であり、その過程で必ず死ぬ細胞があることを発見し、それが遺伝的に制御されていることを明らかにしてその遺伝子を特定した。

これまでビタミン B6 の免疫現象への影響を検討し、ビタミン B6 欠乏によるすべての免疫学的変化は胸腺萎縮に起因することが判明した。<sup>1)</sup> しかし、胸腺萎縮の原因をさぐるうち、胸腺における T 細胞のアポトーシス現象を知りアポトーシスとビタミン B6 の間に何らかの関係があるのではないかとこの着想に至った。アポトーシスの誘導因子は多種多様であり、その誘導経路も複数のものが知られているが、これらの経路は最終的にカスパーゼの活性化というシグナルに結びつく。この細胞死の実行過程に働くプロテアーゼとも言うべきカスパーゼは、基質タンパク質をその P1 位のアスパラギン酸のところで切断するシステインプロテアーゼであり、システインを含むアミノ酸 5 個よりなるペプチド構造を活性部位に持っていて 10 種類以上が同定されている。システインプロテアーゼは、細胞内タンパク質・アミノ酸の代謝に大きく寄与していることはよく知られている。タンパク質・アミノ酸代謝には、ビタミン B6 酵素といわれるピリドキサル 5' リン酸を補酵素とする各種酵素があり、これに基質アミノ酸が加わるとアミノ酸はその  $\alpha$ -アミノ基を介してピリドキサルリン酸の 4-アルデヒド基と Schiff 塩基を形成し触媒反応によって酵素に特異的な生成物を与えることが知られている。しかし、アポトーシス作用機構におけるビタミン B6 の分子細胞生物学的側面からのアプローチはほとんどなされていない。ともにタンパク質分解酵素が関与しているにもかかわらず、接点が明らかでない。アポトーシス、ビタミン B6 とも、それぞれ優れた研究が多くあるにもかかわらず両者を結びつけた研究報告は見当たらない。

最近のビタミン B6 研究は新展開をみせている。ビタミン B6 による抗腫瘍作用と血管新生抑制作用などである。<sup>2)</sup> ビタミン B6 の摂取で大腸腫瘍の発現が抑制されることがマウスを使った実験によって明らかになった。その作用はアポトーシスによる解明ではなく、大腸の細胞増殖や酸化ストレス、一酸化窒素産生の抑制によるものであることが示唆されている。また、同グループは、癌細胞の成長や転移に重要な役割を果たす血管新生を抑制する作用があることも見いだしている。また、ビタミン B6 が癌細胞の増殖を抑制することを培養細胞や担癌モデル動物を用いた研究報告がある。<sup>3)</sup> その作用機構はアポトーシスのカスパーゼからの検討ではなく、ビタミン B6 による DNA ポリメラーゼ活性の抑制、RNA ポリメラーゼ活性の抑制、癌遺伝子

発現の抑制などを示唆しており、抗腫瘍効果には、もっと複雑な機構の関与の可能性が述べられている。さらに、ビタミン B6 の抗酸化性を示す報告もある。<sup>4)</sup>

そこで、ビタミン B6 作用に新たな細胞間相互作用の調節因子としての作用があるのではないかと考え、アポトーシス、ビタミン B6 をキーワードに集めた文献から両者の密接な関係を探るべく検討したところ興味ある結果が得られたので以下に報告する。

## 方 法

2002 年夏までに報告されたアポトーシスとビタミン B6 について述べられている文献を国内外から集め比較検討し、ビタミン B6 とアポトーシスの間に何らかのシグナル系が存在するのではないかと予想をたて、その作用機構について考察した。

ビタミン B6 には、ピリドキシン、ピリドキサル、ピリドキサミン、ピリドキシン 5' リン酸、ピリドキサル 5' リン酸、ピリドキサミン 5' リン酸の 6 形態が存在するが、すべての形態について取り上げた。一方、アポトーシスについても誘導機構、実行機構、制御機構など全てのアポトーシス作用機構の形態観察、DNA 断片化、生化学変化、Fas 抗体・抗がん剤・ウイルス・紫外線など誘導法、発生系・胸腺細胞・ミトコンドリアなど多用な細胞・組織系、カスパーゼ活性、関連するタンパク質・遺伝子解析などについて対象とした。

## 結 果 および 考 察

ピリドキサルとアポトーシスについて述べた報告が 7 件と最も多く、次いでピリドキシンおよびピリドキサルリン酸とアポトーシスについて述べた報告がそれぞれ 3 件であった。その他の形態との関係では、1 つもヒットしてこなかった。ビタミン B6 酵素としての作用形態であるピリドキサル 5' リン酸との関わりを示す報告が最も多いと予想したが、意外にもピリドキサルであった。ピリドキサルは、2-メチル-3-ヒドロキシ-4-ホルミル-5-ヒドロキシメチルピリジンで、水によく溶け、熱や光に対し不安定な物質である。生体内では、ピリドキサルはピリドキサルリン酸のホスファターゼによる脱リン酸反応の結果生じることが知られている。

Bcl-2 は、アポトーシスの作用機構の on/off を決定するシグナルである Bcl-2 ファミリーの 30 種類をこえるタンパク質のうちの代表的なアポトーシス抑制タンパク質である。この抑制タンパク質は、ミトコンドリア膜を安定に維持することにより細胞死を回避すると考えられている。Ishaque A. らのハイブリドマ細胞培養を用いた最近の研究<sup>5)</sup>によれば、培養液中にピリドキサル塩酸塩を含まなくても細胞の成長や生存を阻害することは無くアポトーシスも起こらなかった。これに対し、D-Ca パントテン酸、コリン塩酸塩、リボフラビンのうちどれかが含

## アポトーシスに関する研究 (3)

まれないと細胞死を招く。一方、チアミン塩酸塩や葉酸が無いと抗 Bcl-2 遺伝子を過剰発現し細胞が生育する。これらは、栄養化学では同じ分類のビタミンB群に属するにもかかわらず異なる作用を示している。分子量の小さいビタミンとアポトーシスの生化学的活性化の間で Bcl-2 活性が関与する何らかの反応がおこることが推察される。

S. Jiang らの胸腺アポトーシスに関する研究<sup>6)</sup>によれば、グルココルチコイド処理後に引き起こされる胸腺におけるアポトーシスを賦活する RP-2 遺伝子と相同性のある P2X の mRNA の発現量をアポトーシス誘導剤の合成グルココルチコイド、6  $\alpha$ -methylprednisolone で処理したラット胸腺と未処理のコントロール群で比較したところ、差異が見られなかった。また、P2X レセプターは、アポトーシスを定義づける代表的生化学的変化である DNA のヌクレオソーム単位での断片化に何ら影響を及ぼさなかったため、アポトーシスを誘導も抑制もしていないと言える。また、P2X の拮抗剤であるピリドキサルリン酸-6-アゾフェニル-2',4'-ジスルホン酸は、methylprednisolone によって引き起こされる DNA 断片化に影響を及ぼさなかった。よって、P2X は、グルココルチコイドによるアポトーシス誘導には直接関与していないと言える。

AM. Roch らの BAF3 bcl2 ねずみリンパ細胞を用いた実験<sup>7)</sup>によると、インターロイキン3依存性ねずみリンパ球 BAF3 b0 細胞株培養液に Methional を加えるとアポトーシスを誘導するが、bcl2 遺伝子で置き換えた BAF3 bcl2 株に Methional を加えると活性は抑えられた。Methional の酸化を減じるためアルデヒドデヒドロゲナーゼの阻害剤 disulfiram の添加で BAF3 b0 株のみでアポトーシスは増加した。一方、Methional の還元を減じるためアルデヒドレダクターゼの阻害剤 quercetin の添加で BAF3 b0 と BAF3 bcl2 の両細胞でアポトーシスは増加した。Quercetin の添加で BAF3 bcl2 細胞における Methional の生合成が低下し DNA 断片化の程度が BAF3 b0 細胞と同様に近づいた。ピリドキサルリン酸-L-メチオニエチルエステルによるトランスアミナーゼの阻害は、BAF3 b0 細胞ではアポトーシスを誘導したが、BAF3 bcl2 細胞で誘導しなかった。これより、BAF3 bcl2 細胞におけるアポトーシスの低下は、トランスアミナーゼによるものではなく、Methional からマロンジアルデヒドの合成によるものや、発生した活性酸素種の違いでもなく、 $\beta$ -ヒドロキシラーゼの損失によるものと考えられた。ヒドロキシラーゼは水酸化酵素で、分子状酸素を利用し有機化合物をヒドロキシル化する反応を触媒する酵素である。NAD などの補酵素と基質を同時に酸化するが、フェニルアラニンからチロシンの合成などの反応を行いチロシン残基をリン酸化する共通  $\beta$ 鎖を IL-3 レセプターは有しているがビタミン B6 の直接的関与はないと思われた。

S. Narisawa らのアルカリホスファターゼノックアウトマウスを使ったビタミン B6 代謝異常の研究<sup>8)</sup>からは、コントロールで

用いたビタミン B6 欠乏食で飼育したマウス群が、胸腺における異常なアポトーシスを示している。胸腺は、免疫反応において中心的な役割を担う T リンパ球が分化・成熟する重要な臓器で外来抗原を認識する抗原受容体を発現する T リンパ球のうち、自己の主要組織適合抗原と合致するものが選択されるが、選択されなかった細胞は胸腺を出ることなく死滅すると考えられている。しかし、in vivo と in vitro のデータが一致せず、in vitro における検索結果では胸腺で検出できる細胞死は、ほとんどすべて DNA 断片化を起こしていないため現実的にアポトーシスは見られず、観察されるのはピクノーシス（核濃縮型細胞死）であるという見方も存在する。また、胸腺リンパ球細胞死の異常により自己免疫性疾患が起きるという確かなデータは報告されていない。<sup>9)</sup>

SA. Okasha らのエストロゲンと胸腺に関する報告<sup>10)</sup>によれば、 $\beta$ -エストラジオール-17-吉草酸塩で処置したマウスの胸腺は、in vitro で24時間培養後アポトーシスが増加した。これより、エストロゲンがアポトーシスを導く胸腺萎縮を誘導したかかもしれないと考察している。また、SR. Kuvibidila らの鉄欠乏マウスを用いた実験<sup>11)</sup>によれば、鉄欠乏によるマウス胸腺萎縮の原因は、アポトーシスの増加によるものでなく、胸腺細胞増殖の減少によるものと結論づけている。よって、アポトーシスの代表的特徴である DNA 断片化などを目安に胸腺萎縮の原因を探らなければならず、ビタミン B6 欠乏に伴う胸腺萎縮もアポトーシスによるものか、その他の原因か、正確に見極めなければならない。A. Gennari らのラット胸腺を用いた報告<sup>12)</sup>によれば、細胞内カルシウムイオンの増加が引き金となりミトコンドリアからの活性酸素種やシトクロム C の放出につながり、次いでカスパーゼの活性化を経て最後に DNA 断片化をもたらすという細胞間シグナルを提唱している。

その他のビタミンの影響はどうであろうか。ビタミン E の場合、最も生理活性の高い  $\alpha$ -トコフェロールや、抗酸化活性の高い  $\gamma$ -トコフェロールが、種々の物質によって誘導されるアポトーシスを抑制することが報告されている。<sup>13)</sup> その作用機構はいまだ十分明らかではないが、トコフェロールの抗酸化作用の他に、トコフェロールによるプロテインキナーゼ C 活性の抑制による可能性が示唆されている。プロテインキナーゼはタンパク質リン酸化酵素で、ATP の  $\gamma$ -リン酸基をセリン、トレオニン、チロシンのヒドロキシル基へ転移する反応を触媒する。ビタミン B6 とプロテインキナーゼ C の関連を述べた報告は見当たらなかったが、ビタミン B6 酵素であるホスホリラーゼとしての作用とは異なるようである。また、ビタミン E の場合、同属体による作用機構の違いは細胞内への蓄積の難易がアポトーシス誘導能に反映されることから、ビタミン B6 の場合も細胞膜に入りにくいピリドキサルリン酸よりピリドキシンの方がアポトーシス誘導能は強いことも考えられるだろう。トコフェロール誘導

アポトーシスの際には、ミトコンドリアやリソソームの膜の不安定化が観察され、アポトーシスの発現過程にミトコンドリア機能損失によるシトクロームC放出が関与する機構も考えられている。シトクロームCの細胞質への放出は、ミトコンドリアからBcl-2ファミリーのBid(促進)とBcl-2(抑制)のバランスにより制御されている。細胞質に放出されたシトクロームCは、dATP/ATPとともにカスパーゼ-9を活性化し、カスパーゼ-3へと導くアポトーシスへと向かう。ビタミンB6がミトコンドリアまたはBidとBcl-2のバランスに影響する直接的な報告は見当たらなかったが検討する余地がある。

各種ニコチン酸関連化合物にもアポトーシス誘導作用があることが知られている。<sup>14)</sup> ビタミンであるニコチン酸自体は、誘導も抑制もしないにもかかわらず、最も活性が強かったのは、ニコチン酸の異性体であるピコリン酸で、正常なヒトリンパ球やマウスマクロファージには何ら影響を及ぼさないのに、がん細胞に対し致死効果があった。ピコリン酸をエステル化したピコリン酸エステルでは、最大の誘導効果が得られている。さらに、アミド系化合物群は、アポトーシス細胞への形態変化を抑制した。これらの化合物は、ポリADP-リボースポリメラーゼの阻害剤であることによる。ニコチンアミドでは、強く阻害する結果が得られているのは興味深い。

N. Katunumaらのリソソームのカテプシンの研究<sup>15)</sup>によれば、カテプシンLがカスパーゼ3によるアポトーシスに関与することを示している。カテプシンとは、動物組織細胞のリソソームに局在するプロテアーゼの総称で基質特異性、阻害剤などにより分類され、その性質および細胞内局在に関して十分明らかではないがタンパク質の異化作用に重要であるとされている。

また、T. OkaらのHNF1タンパク質を用いた実験<sup>16)</sup>によれば、ピリドキサルリン酸は、NH<sub>2</sub>末端に5つのアミノ酸残基をもつHNF1と直接反応し、DNAとの結合を阻害する。50%阻害に必要なピリドキサルリン酸濃度は約100 μMとしている。

ストレスやDNA損傷で誘導される癌抑制遺伝子p53は、転写活性化因子として機能しアポトーシスを誘導することで注目されている。今回、p53による標的遺伝子の転写活性化とビタミンB6の関わりを検討した報告は見当たらなかったが、p53によるアポトーシスの実行因子であるNoxaはミトコンドリアに局在し、シトクロームCの放出やカスパーゼ-9の活性化を誘導するためこれらの変化と連動して考えるべきであろう。さらに、デスリガンドやデスレセプターの関与するアポトーシス、サイトカイン欠乏による誘導、キナーゼによる制御との関連も見出すことができなかった。

以上の結果より、推察されるアポトーシス作用機構に及ぼすビタミンB6の関与を図1に示した。予想以上に、ビタミンB6が関与するであろう作用点を見出すことは難しかった。作用機構が複雑なため、すべての経路に共通するシトクロームC放出、

カスパーゼ9または3活性、ミトコンドリア膜状の変化、DNA断片化を伴っていること、に絞って検討することが大切であると感じた。そこから細部の反応系が見直せるよう、モデルとなる系を早く見つけたい。

ビタミンB6の新たな作用の解明は、癌を始めとする疾患の原因解明につながるアポトーシスの作用機構に細胞間相互作用のシグナルに影響を及ぼすビタミンB6作用として重要であろう。おそらくアポトーシスに関係するプロテアーゼのうち幾つかは、ビタミンB6依存性酵素も関与していると考えられるので、細胞死の抑制と増加をビタミンB6の直接または間接的影響を見出すことは、ビタミンB6の補充によりアポトーシスの多くの作用機構のうち特定経路を調節可能にするかもしれない。経路の調節は、癌細胞などの細胞死を促進させ、正常細胞の減少を防ぐ治療に役立つであろう。将来、ビタミンB6の栄養生化学側面から食生活での摂取法の提案やサプリメントとしての活用、薬理学的側面から副作用の少ない新たな薬剤治療としての展開が期待できる。

本研究の一部は、平成14年度岐阜市立女子短期大学研究交付金助成を受けて行ったものである。

#### 参 考 文 献

- 1) S. Doke, N. Inagaki, T. Hayakawa, H. Tsuge, *Biosci., Modulation of cytokine production by vitamin B6 supplementation in mice. Biosci. Biotech. Biochem.*, 62(5)1008-1010, 1998
- 2) 松原主典、小松俊一郎、加藤範久「ビタミンB6研究の新展開：抗腫瘍作用と血管新生抑制作用」『日本栄養・食糧学会誌』第55巻(5)287-290、2002
- 3) Oka, N. Komori, M. Kuwahara, Y. Hiroi, T. Shimoda, Y.; *Pyridoxal 5-phosphate modulates expression of cytosolic aspartate aminotransferase gene by inactivation of glucocorticoid receptor. J. Nutri. Sci, Vitaminol.*, 41, 363-375, 1995
- 4) 八木年春「ビタミンB6の新たな機能」『ビタミン』第74巻第1号2000年17-18ページ
- 5) A. Ishaque, M. Al-Rubeai; Role of vitamins in determining apoptosis and extent of suppression by bcl-2 during hybridoma cell culture. *Apoptosis*, 7(3)231-239, 2002
- 6) S. Jiang, B. Kull, B.B. Fredholm, S. Orrenius; P2X purinoceptor is not important in thymocyte apoptosis. *Immunol. Lett.*, 49(3)197-201, 1996
- 7) AM. Roch, G. Quash, Y. Michal, J. Chantepia, B. Chantegrel, C. Deshayes, A. Doutheau, J. Marvel; Altered methional homeostasis is associated with decreased apoptosis in BAF3 bcl2 murine lymphoid cells. *Biochem. J.*, 313, 973-981, 1996
- 8) S. Narisawa, C. Wennberg, J.L. Millan ; Abnormal vitamin B6

## アポトーシスに関する研究 (3)

metabolism in alkaline phosphatase knock-out mice causes multiple abnormalities, but not the impaired bone mineralization. *J. Pathol.*, 193(1)125-133, 2001

9)大槻勝紀、小路武彦、渡辺慶一『臓器別アポトーシス証明法』南江堂2000年105ページ

10)SA. Okasha, S. Ryu, Y. Do, R.J. Mckallip, M. Nagarkatti, PS. Nagarkatti ; Evidence for estradiol-induced apoptosis and dysregulated T cell maturation in the thymus. *Toxicology* 163 (1) 49-62, 2001

11)SR. Kuvibidila, C. Porretta, B. Surendra Baliga, LE. Leivia ; Reduced thymocyte proliferation but not increased apoptosis as a possible cause of thymus atrophy in iron-deficient mice. *Br. J. Nutr.*, 86 (2) 157-162, 2001

12)A. Gennari, B. Viviani, C. Lodovico Galli, M. Marinovich, R. Pieters, E. Corsini ; Organotins induce apoptosis by disturbance of Ca<sup>2+</sup> and mitochondrial activity, causing oxidative stress and activation of caspases in rat thymocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 169 (2) 185-190, 2000

13)小暮健太郎、福澤健治『ビタミン E とアポトーシス』「ビタミン」9号481-483, 2000

14)S. Ogata, M. Takeuchi, K. Okumura, H. Taguchi ; Apoptosis induced by nicotin-related compounds in HL-60 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62 (12) 2351-2356, 1998

15)N. Katunuma, A. Matsui, T. Kakegawa, E. Murata, T. Asao, Y. Ohba ; Study of the functional share of lysosomal cathepsins by the development of specific inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.*, 39, 247-260, 1999

16)T. Oka, H. Sugitatsu, H. Nordin, MK. Thakur, M. Aoyama, T. Sasagawa, I. Suzuki, H. Tsuji ; Pyridoxal 5'-phosphate inhibits DNA binding of HNF1. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1568(3) 189-196, 2001

(提出期日 2003年3月5日)