

# 超分子化合物[2]Rotaxaneのカスパーゼシグナル伝達を介した アポトーシス誘導性細胞死に関する研究

原 一樹

福岡大学薬学部医薬品情報学教室, 福岡市城南区七隈8丁目19-1

## Research on apoptotic cell death through the caspase signaling pathway of the supramolecular substance, [2] rotaxane

Kazuki Hara

Medicinal Informatics and Research Unit, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

### Abstract

We studied the influence of novel supramolecular substance, [2] rotaxane (TRO-A0001), on caspase signaling and cell viability in melanoma and colon cancer cell lines. TRO-A0001 suppressed concentration-dependently in the proliferation of cancer cells. The morphological analysis demonstrated that TRO-A0001 increased the levels of apoptotic cells. The expression of cleaved-form caspase-3 and PARP was significantly increased in cells exposed to TRO-A0001. The expression of Bax was increased by TRO-A0001. Furthermore, the downregulation of Bax by siRNA resulted in growth activation. These results suggest that TRO-A0001 induces apoptosis in cancer cells and holds potential as a new anti-tumor medicine.

**Keywords:** [2] rotaxane, supramolecular substance, apoptosis, caspase

### 【緒言】

ロタキサンは、環状分子を棒状分子が貫通したものの両端に、嵩高い構造を結合させることで立体障害を持たせ、環状構造が軸から抜けないように合成した化合物である。ロタキサンの名称は、ラテン語の *rota* と *axis* に由来し<sup>1)</sup>、環状分子にはクラウンエーテルやシクロデキストリンなどが、また棒状分子にはポリエチレングリコールやアルキル鎖が用いられることが多い。一般的に、環状分子1個、軸状分子1個で構成されるロタキサンは [2]rotaxane と呼ばれ、環状分子を貫通する環状分子数が増えるに従い名称前の数字が増加していくが、多数の環状分子で構成される場合はポリロタキサン (poly-rotaxane) と称される。ロタキサンは1967年に Harrison らが初めて合成し、多数の繰り返し反応を行う方法で6%の収率を得られることが報告されてから、近年までに収率の高いロタキサン合成法が報告されてきた<sup>2)</sup>。

ロタキサンやポリロタキサンは、細胞への薬物や遺伝子の送達にも応用されている。シクロデキストリン環とポリエチレングリコールで合成されたポリロタキサンを用いて、薬剤やDNAなどの遺伝子を細胞内に導入するドラッグデリバリーへの応用研究が報告されている<sup>3-5)</sup>。このように、医療分野への有用性が期待されている中で、ロタキサン化合物が生体へ及ぼす作用は、未だ明らかになっていないことが課題である。

これまでの研究で、dibenzo-24-crown 8-ether と呼ばれる24員環クラウンエーテル環状分子と、bis(2-

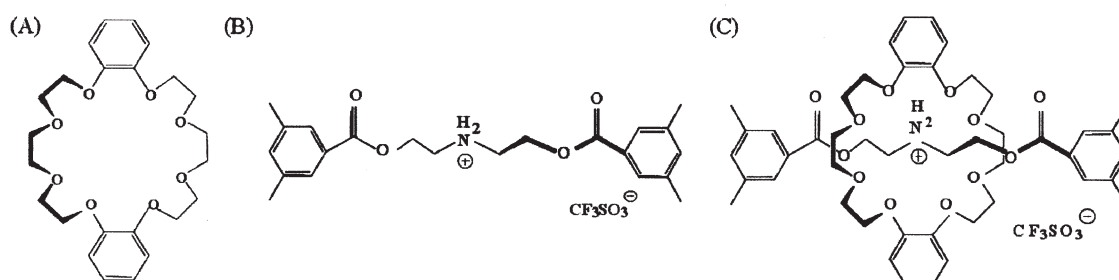
(3,5-dimethylphenylcarbonyloxy)-ethyl) ammonium trifluoromethanesulfonate (NK 7-40-2) と呼ばれる軸状分子を含む, Fig. 1 に示すような新規 [2]rotaxane (TRO-A0001) を合成し<sup>6)</sup>, ロタキサン化合物が腫瘍細胞に及ぼす効果について研究を行ってきた。その結果, TRO-A0001 がマウス由来メラノーマ B16/BL6 細胞と直腸がん Colon-26 細胞に細胞死を引き起こすことが明らかとなり, さらに, エレクトロポレーション法, ソノポレーション法を用いた細胞内導入法により, 低用量の TRO-A0001 で効果を発現することを報告した。これらの結果をもとに, がん細胞から排出されにくく, 局所的治療に好適な, 新たな抗がん剤の開発を目的とした。

抗がん剤の多くは相対的に低分子量で安定な構造であるため, 比較的容易に細胞内へ吸収されるが, 細胞外への排泄も容易に行われ, 比較的早期に薬剤耐性を獲得することが化学療法においての問題となっている<sup>7)</sup>。さらに, 薬物の中でも抗がん剤は重篤な副作用を有するものが多く, 薬物治療上困難を極める場合がある。

これらの臨床における薬剤治療での問題に対して, ロタキサンのような分子量が大きくかつ強い結合を介さない構成分子からなる構造は, 構成単位間の分子形状が定まりにくく, またそれぞれの構成分子自体も分子運動を行うため, 一度細胞内に取り込まれると容易に排出されにくいことが考えられる。さらに, 局所的に細胞内導入を行う方法が確立できれば, 正常な細胞に与える副作用が低減される抗がん剤になり得ることが考えられる。

しかし, これらを実現するための課題には, これまでの研究で明らかとなったマウス由来のメラノーマ細胞や大腸がん細胞に引き起こした細胞死の作用機構を解明することが必要である。

これらの背景から, 本研究ではヒト由来大腸がん DLD-1 細胞とヒト由来メラノーマ G361 細胞を新たに加え, メラノーマおよび大腸がん細胞に対して有効な抗がん剤となり得るかを目的として検討を行った。さらに, 薬物として未だ検討されていないロタキサン構造を持つ, TRO-A0001 の作用機構解明を目的とした。



**Fig.1** Chemical structure of dibenzo-24-crown 8-ether (A), NK 7-40-2 (B) and [2] rotaxane (TRO-A0001) (C)

## 第1章 TRO-A0001の腫瘍細胞増殖に及ぼす効果

本章では, マウス由来のメラノーマ B16/BL6, 直腸がん Colon-26 細胞, およびヒト由来のメラノーマ G361, 結腸腺がん DLD-1 細胞に対して, TRO-A0001 が細胞増殖へ及ぼす効果について検討を行った。

### 【実験方法】

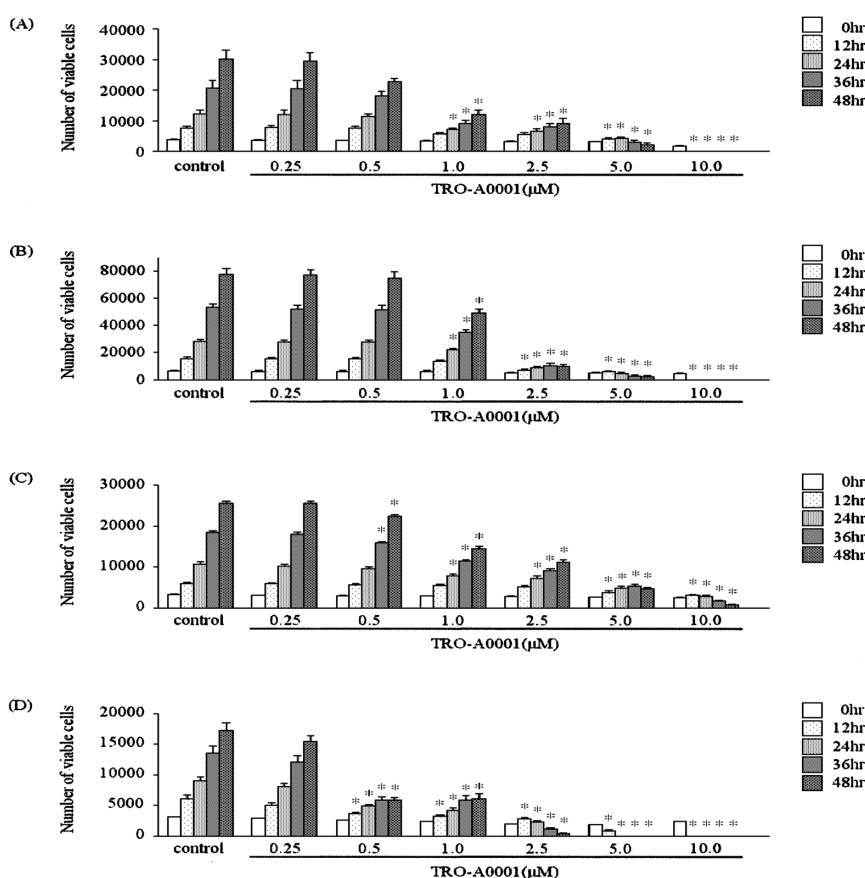
生細胞の測定は, PrestoBlue<sup>®</sup> Cell Viability Reagent を使用して行った。TRO-A0001 を暴露した後, 12 時間毎に生細胞数を測定した。DMSO (0.1%) を暴露した細胞を control 群とし, TRO-A0001 暴露群 (0.25 - 10.0 μM) の生細胞数と比較した。

## 【結果】

Fig. 2(A), (B) に示すように、B 16/BL6 および Colon-26 では、control 群と比較すると、TRO-A0001 濃度 1.0  $\mu\text{M}$  より高濃度で生細胞数の有意な減少が認められた。また、Fig. 2(C), (D) に示すように、DLD-1 および G361 でも同様に比較すると、TRO-A0001 濃度 0.5  $\mu\text{M}$  より高濃度で生細胞数の有意な減少が認められた。

## 【考察】

TRO-A0001 暴露により、マウス由来のメラノーマ、大腸がん細胞だけではなく、ヒト由来の細胞でも細胞死や増殖抑制を引き起こすことが明らかとなり、抗腫瘍作用を有することが示唆された。TRO-A0001 の効果は用量依存性を示し、暴露時間の経過に伴い増殖率が低下する性質を持つことが考えられた。また、細胞種によって効果が異なることが示唆された。



**Fig. 2** Effects of TRO-A0001 on the growth in melanoma and colon cancer cell lines. (A) B 16/BL6 (B) Colon-26 (C) DLD-1 (D) G361 Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M of three independent experiments performed in triplicate. \* $P < 0.01$ , compared with control group incubated for each time.

## 第2章 TRO-A0001を暴露した腫瘍細胞の形態学的変化についての検討

本章では、TRO-A0001が引き起こす細胞死の形態学的特徴を検討することを目的とし、アポトーシスであるか否かを検討した。

## (1) 細胞核, 細胞骨格染色

### 【実験方法】

TRO-A0001 (5.0 $\mu$ M)を暴露した細胞と, DMSO(0.1%)を暴露した細胞, およびカンプトテシン(10.0 $\mu$ M)を暴露した細胞と比較した。F-アクチンは, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488で蛍光標識したファロイジンを使用して, また細胞核はHoechst33342試薬を使用して蛍光顕微鏡で撮影した。

### 【結果】

Fig. 3; (H) に示すように, TRO-A0001を添加したB16/BL6細胞は, DMSOやカンプトテシンを添加した細胞と比べて, 細胞骨格の外環が細長く縮小し, それに伴う細胞間接着の減少や細胞間隙が広く観察された。Fig. 3; (E) に示すように, TRO-A0001を添加したB16/BL6細胞に濃染された核凝縮様の状態が見られる細胞種があるものの, 小球状の断片化核小体集合像は観察されなかった。また, Fig. 3; (B) に示すように, 非染色像においてもこれらの結果を示唆する細胞質の凝縮や空泡化, 並びに球状化した現象が認められた。

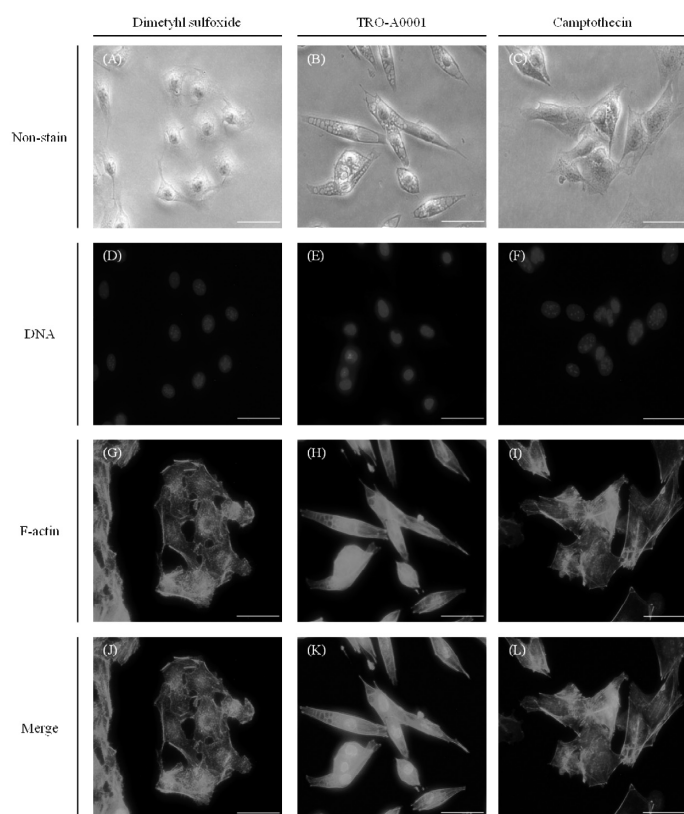
## (2) Terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色

### 【実験方法】

TRO-A0001 (10.0 $\mu$ M)とDMSO (0.1%)を, それぞれ12時間暴露した細胞を比較した。また, TUNEL陽性コントロールには, DNase I 試薬を反応させたDMSO(0.1%)を暴露した細胞を用意した。細胞核はHoechst33342試薬により青色に呈色し, さらにTUNEL陽性細胞のDNAはAlexa Fluor<sup>®</sup> 594試薬により赤色に呈色した。

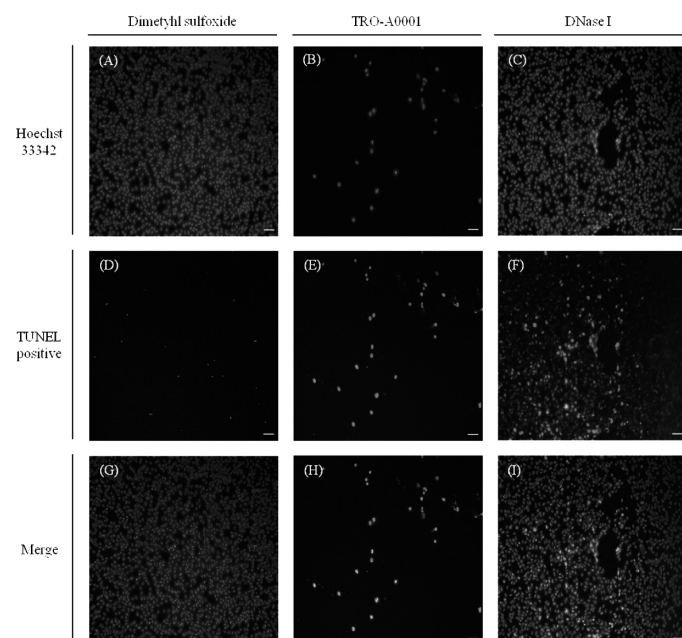
### 【結果】

Fig. 4; (C), (F), (I) に示すように, DNase I 試薬を反応させたTUNEL陽性コントロール細胞は, Hoechst33342試薬とAlexa Fluor<sup>®</sup> 594試薬の両方で染色されたため, これをTUNEL陽性と判断した。Fig. 4; (A), (D), (G) に示すように, DMSO (0.1%)を暴露したB16/BL6細胞は, Hoechst33342試薬



**Fig. 3** Effects of TRO-A0001 on the cell nucleus and cytoskeleton in B16/BL6 cells. B16/BL6 cells were treated with 0.1% dimethyl sulfoxide (A, D, G, J), 5.0 $\mu$ M of TRO-A0001 (B, E, H, K) and 10.0 $\mu$ M of camptothecin (C, F, I, L) in RPMI. After 24 hr of culture, cells were fixed and immunostained with Hoechst33342 (blue), and Alexa Fluor<sup>®</sup> 594-conjugated phalloidin (green). Scale bar = 50 $\mu$ m.

で染色されるが、TUNEL陽性細胞はほとんど検出されなかった。一方でFig. 4; (B), (E), (H)に示すように、TRO-A0001 (10.0 $\mu$ M)を暴露したB16/BL6細胞は、TUNEL陽性細胞が明らかに増加しており、ほとんどの細胞でHoechst33342試薬とTUNEL染色の両方呈色したことから、TRO-A0001暴露によりDNA断片化された細胞であることが示唆された。



**Fig. 4** Effects of TRO-A0001 on B16/BL6 cell apoptosis as assessed by TUNEL assay and fluorescent microscopy. B16/BL6 cells were treated with 0.1% dimethyl sulfoxide (A, D, G), 10.0 $\mu$ M of TRO-A0001 (B, E, H) in RPMI for 12hr. To provide a positive TUNEL group, we added DNase I to another control group (C, F, I). TUNEL-positive cells stained red and nuclei stained blue with Hoechst 33342. Scale bar = 50 $\mu$ m.

### 【考察】

細胞骨格の縮小に伴う細胞質の収縮や空泡化は、アポトーシスに特徴的な形態学的変化の一つであり<sup>(8)</sup>、TRO-A0001が引き起こす細胞骨格への特徴がアポトーシス様であることが示唆された。細胞核では、TRO-A0001で処理した細胞に濃染された核凝縮様の状態が見られる細胞種があるものの、クロマチン凝集体や小球状の断片化された核小体集合像は観察されなかった。

そこで、断片化DNAについて検討を行うためTUNEL染色法を利用し、Hoechst33342試薬とともに二重染色を行った。TUNEL陽性コントロールで使用したDNase I試薬を添加した細胞は、Hoechst33342試薬とともに染色されており、断片化されたDNAが検出されていることがわかる。これと同様の結果がTRO-A0001 (10.0 $\mu$ M)で処理した細胞で示されており、TRO-A0001が引き起こす細胞死の特徴に、DNAの断片化が関与していることが示唆された。以上の結果より、TRO-A0001が引き起こす細胞死は、細胞内構造の形態学的な知見からアポトーシスである可能性が示唆された。

### 第3章 TRO-A0001がアポトーシス関連タンパク質発現に及ぼす変化

TRO-A0001が引き起こす細胞死が、形態学的にアポトーシス性細胞死であることから、本章では、カスパーゼシグナル伝達の活性化を検討するため、エフェクターカスパーゼであるcaspase-3、-7についてタンパク質発現を測定した。さらに、前章でのTUNEL染色でDNA断片化を引き起こしていることが示唆されたため、DNA修復に関与するpoly (ADP-ribose) polymerase (PARP) タンパク質発現について検討した。また、ミトコンドリアに関与するアポトーシスシグナル伝達におけるBcl-2-associated X protein (Bax) タンパク質発現を検討した。さらに、Baxタンパク質の発現を低下させることで、アポトーシスの進行を抑制することが考えられるため、RNA干渉法を使用してBaxタンパク質発現を低下させた

細胞では、アポトーシス性細胞死が抑制されるかを検討した。

#### 【実験方法】

Caspase-3、-7、PARP、Baxタンパク質発現は、ウェスタンブロット法を使用して検出した。DMSO (0.1%) で暴露した細胞を control (0 $\mu$ M) とし、TRO-A0001 (2.5 $\mu$ M, 5.0 $\mu$ M, 10.0 $\mu$ M) で暴露した細胞とのタンパク質発現を比較した。サンプル毎の総タンパク質量を2.5 $\mu$ gに設定し、サンプル間の目的タンパク質のローディングコントロールには $\beta$ -actinを利用した。

また、トランスフェクション試薬を使用して、Bax siRNAとControl siRNAを細胞に導入した。導入後24時間経過した細胞を回収し、トリパンブルー染色で生細胞数を計算した後96マイクロウェルプレートに播種し、12時間接着させた細胞にTRO-A0001 (0.5 - 10.0 $\mu$ M)、DMSO (0.1%) を暴露し36時間経過した細胞における生細胞数を測定した。

#### 【結果】

Caspase-3タンパク質発現は、Fig. 5; (A), (C) に示すように、メラノーマ細胞株であるB16/BL6, G361では、control群と比較してTRO-A0001で暴露した細胞で減少する傾向がみられた。Fig. 5; (B), (D) に示すように、大腸がん細胞株であるColon-26, DLD-1では、TRO-A0001暴露群とcontrol群で、発現の差はみられなかった。一方、Fig. 5; (A) - (D) に示すように、全ての細胞でのcleaved caspase-3タンパク質発現は、control群でほとんど発現がみられなかったことに対し、TRO-A0001暴露群での発現増加がみられた。

Caspase-7タンパク質発現は、Fig. 5; (A) - (D) に示すように、TRO-A0001暴露群とcontrol群を比較すると、B16/BL6細胞で変化がみられず、Colon-26細胞とG361細胞では発現の減少がみられ、DLD-1細胞では発現の増加がみられた。一方、ヒト由来のG361細胞、DLD-1細胞におけるcleaved caspase-7発現はcontrol群と比較すると、TRO-A0001暴露群に発現の増加がみられた。

PARPタンパク質発現は、Fig. 6; (A) - (D) に示すように、TRO-A0001を暴露したB16/BL6, Colon-26, DLD-1細胞では、control群と比較して減少する傾向がみられたが、G361細胞では発現の増加がみられた。一方、全ての細胞におけるcleaved PARPタンパク質は、control群ではほとんど発現がみられなかったことに対し、TRO-A0001暴露群の発現増加がみられた。

Baxタンパク質発現は、Fig. 7; (B), (C), (D) に示すように、TRO-A0001を暴露したColon-26, G361, DLD-1細胞では、control群と比較して増加する傾向がみられた。一方、Fig. 7; (A) に示すように、B16/BL6細胞のBaxタンパク質発現はcontrol群と比較して同等であった。

Fig. 8; (A), (B), (C) に示すように、B16/BL6, Colon-26, およびDLD-1細胞では、Bax siRNA処理を行った細胞はControl siRNAで処理した細胞と比較して、TRO-A0001暴露による細胞生存率を改善する傾向がみられた。

一方、Fig. 8; (D) に示すように、G361細胞は同様の条件下でTRO-A0001暴露による細胞生存率を改善する傾向はみられたものの、統計的に有意な差はみられなかった。

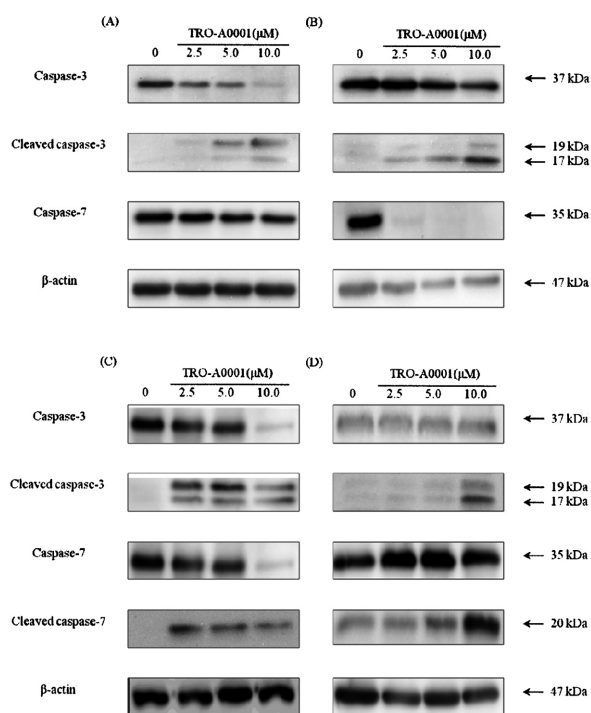
#### 【考察】

エフェクターカスパーゼは、その上流に存在するイニシエーターカスパーゼから切断されることで活性化し、その結果アポトーシスが実行されると考えられている。アポトーシスはプログラム化された細胞死であり、デスレセプターやミトコンドリアを経由するアポトーシスシグナル伝達は、caspase-3の活性化に集約されることも報告されている<sup>9, 10)</sup>。エフェクターカスパーゼの中でもcaspase-3とcaspase-7に着目し、TRO-A0001暴露後のタンパク質発現について検討を行った。不活性化状態で内在しているcaspase-3 (37kDa) は、TRO-A0001による発現低下もしくは発現に変化がみられないなど、細胞種間での相異も認められたが、cleaved caspase-3 (17, 19kDa) に関してはタンパク質発現の上昇がみられた。

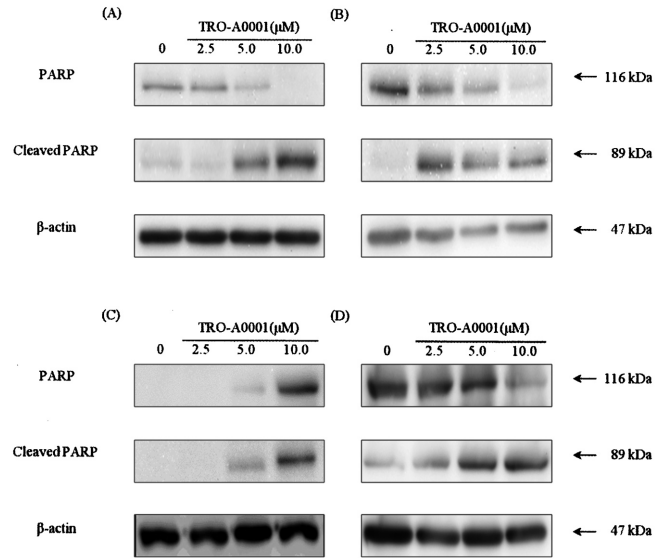
さらに、caspase-3によって活性化されるcaspase-7においても、ヒト由来の細胞種においてTRO-A0001暴露によるcleaved caspase-7(20kDa)タンパク質発現の上昇が認められた。つまり、これらの結果はその下流に存在するPARPタンパク質に、シグナル活性化が伝達されたことを示唆している。

通常、PARPタンパク質はDNA修復や安定化など細胞生存の調節に関与しているが<sup>11, 12)</sup>、caspase-3に切断されて生じる分解産物(Cleaved PARP)は、初期アポトーシスの指標とされる<sup>13, 14 - 16)</sup>。これは、核内DNAへの損傷が開始されていることを示唆しており、結果としてDNAフラグメントの増加などアポトーシスの特徴的な現象の一つとして検出される。TRO-A0001処理後のcleaved PARP(89kDa)の発現上昇が認められた結果と、前章におけるTUNEL陽性細胞の増加から、DNAフラグメントを特徴としたアポトーシスが実行されていることが推測される。以上の結果より、TRO-A0001によって引き起こされるシグナル伝達はcaspase-3活性化を伴う一連のカスケードを進行させ、最終的にアポトーシスの形態を特徴とする細胞死を実行していることが示唆された。

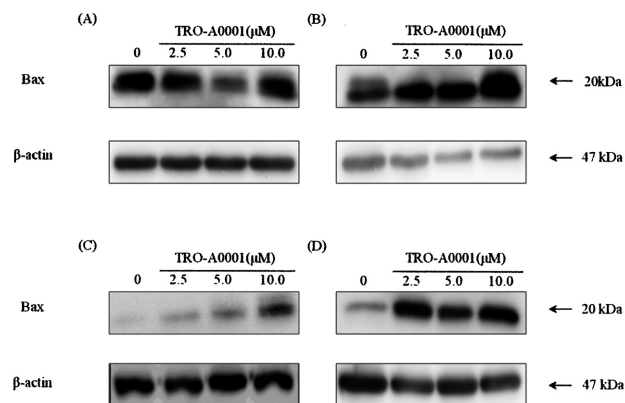
さらに、アポトーシスを調節するBcl-2ファミリーの一つである、Baxタンパク質に着目した。アポトーシスを誘導する経路の中でミトコンドリアを経由する経路において、Baxはアポトーシスを誘導するタンパク質の一つである<sup>17, 18)</sup>。TRO-A0001を処理したColon-26細胞、G361細胞、DLD-1細胞におけるBaxタンパク質発現は、control群と比較して増加する傾向がみられたが、B16/BL6細胞のBaxタンパク質発現にはあまり変化がみられていない。一方でBax siRNAでタンパク質発現を低下させると、Control siRNAで処理した細胞と比較して、TRO-A0001処理による細胞生存率を改善する傾向がみられた。この結果より、TRO-A0001処理で認められたアポトーシスはミトコンドリア経路の関与が示唆されたが、Bax発現低下による細胞生存率がcontrol群と同等まで改善していない結果を踏まえると、他のBcl-2ファミリーによるアポトーシスの調節についても検討する必要性が考えられた。



**Fig. 5** Expression levels of caspase-3 and -7 in B16/BL6 (A), Colon-26 (B), G361 (C) and DLD-1 (D) cells by western blotting. Cells were exposed to TRO-A0001 (2.5, 5.0, 10.0 μM), and control (0 μM) cultures were treated with 0.1% DMSO in RPMI for 24 h. β-actin was used as the internal control for protein loading and transfer efficiency.

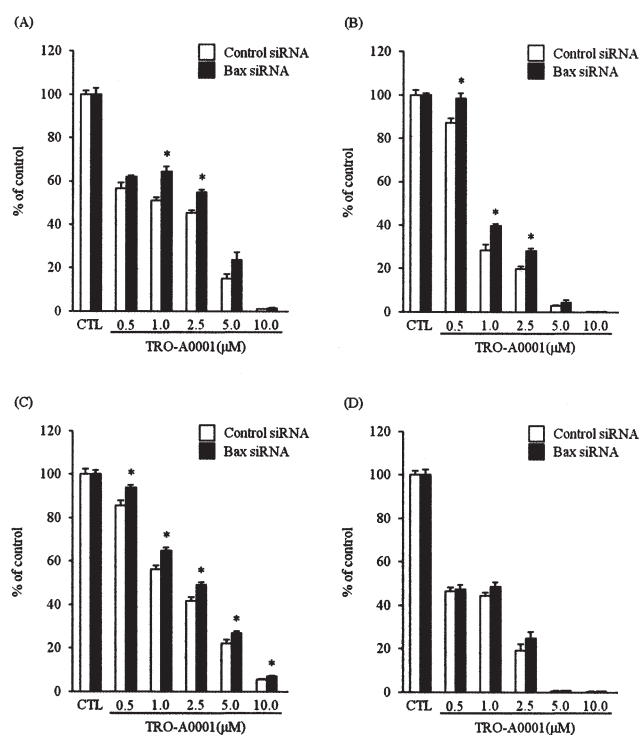


**Fig. 6** Expression levels of PARP in B16/BL6 (A), Colon-26 (B), G361 (C) and DLD-1 (D) cells by western blotting. Cells were exposed to TRO-A0001 (2.5, 5.0, 10.0 μM), and control (0 μM) cultures were treated with 0.1% DMSO in RPMI for 24 h. β-actin was used as the internal control for protein loading and transfer efficiency.



**Fig. 7** Expression levels of Bax in B16/BL6 (A), Colon-26 (B), G361 (C) and DLD-1 (D) cells by western blotting. Cells were exposed to TRO-A0001 (2.5, 5.0, 10.0 μM), and control (0 μM) cultures were treated with 0.1% DMSO in RPMI for 24 h. β-actin was used as the internal control for protein loading and transfer efficiency.





**Fig. 8** Effects of Bax knockdown on apoptosis. (A) B16/BL6 (B) Colon-26 (C) DLD-1 (D) G361 Cells were transfected with siRNA (100 nM) for 24 h. After transfection, cells were treated with TRO-A0001 on various concentrations (0.5 – 10.0  $\mu\text{M}$ ), and control (CTL) cultures were treated with 0.1 % DMSO in RPMI for 36 h. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M of three independent experiments performed in triplicate. \* $P < 0.05$ , between the control siRNA group and the Bax siRNA group.

#### 【参考文献】

1. Gibson HW, Marand H. Polyrotaxanes: Molecular composites derived by physical linkage of cyclic and linear species. *Adv Mater.* 1993 Jan;5(1):11-2.
2. Harrison IT, Harrison S. Synthesis of a stable complex of a macrocycle and a threaded chain. *J Am Chem Soc.* 1967;89(22):5723-4.
3. Kolchinski AG, Busch DH, Alcock NW. Gaining control over molecular threading: benefits of second coordination sites and aqueous-organic interfaces in rotaxane synthesis. *J Chem Soc Chem Commun.* 1995: (12):1289-91.
4. Ashton PR, Campbell PJ, Glink PT, Philp D, Spencer N, Stoddart JF, Chrystal EJT, Menzer S, Williams DJ, Tasker PA. Dialkylammonium Ion/Crown Ether Complexes: The Forerunners of a New Family of Interlocked Molecules. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1995 Sep 15;34(17):1865-9
5. Harrison IT. Preparation of rotaxanes by the statistical method. *J Chem Soc Perkin Trans 1.* 1974;(0):301-4.
6. Yamada Y, Nomura T, Harashima H, Yamashita A, Katoono R, Yui N. Intranuclear DNA release is a determinant of transfection activity for a non-viral vector: biocleavable polyrotaxane as a supramolecularly dissociative condenser for efficient intranuclear DNA release. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(7):1218-22.
7. Jabir NR, Tabrez S, Ashraf GM, Shakil S, Damanhoury GA, Kamal MA. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:4391-408.

8. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009 Jan;16(1):3-11.
9. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1305-8.
10. Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell.* 1998 Sep 18;94(6):695-8.
11. Satoh MS, Lindahl T. Role of poly (ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature.* 1992 Mar 26;356(6367):356-8.
12. Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Murcia JM. Importance of poly (ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem.* 1998 Dec 11;273(50):33533-9.
13. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997 Aug 15;326 ( Pt 1):1-16.
14. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature.* 1994 Sep 22;371(6495):346-7.
15. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature.* 1995 Jul 6;376(6535):37-43.
16. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. *Cell.* 1995 Jun 2;81(5):801-9.
17. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001 Apr 27;292(5517):727-30.
18. Jürgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 28;95(9):4997-5002.

## 【謝辞】

本研究の機会を与您頂き、終始懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜りました福岡大学薬学部医薬品情報学教室 小野 信文 教授に深甚なる謝意を表します。

本論文を査読していただき、貴重な御意見と御校閲を賜りました福岡大学薬学部生体機能制御学教室 高野 行夫 教授、福岡大学薬学部微生物薬品化学教室 見明 史雄 教授、ならびに福岡大学薬学部衛生化学教室 山野 茂 教授に謹んで感謝致します。

本研究を行うにあたり、多大なる御協力と御助言を賜りました、福岡大学薬学部医薬品情報学教室 木村 公彦 助教、ならびに福岡大学薬学部生化学教室 小迫 知弘 准教授に謹んで感謝致します。

最後に、筆者の研究活動に際し、御支援頂きました全ての方々から心からの謝意を申し上げます。