

氏名	キム 金 勇 激
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2609号
学位授与の日付	平成15年3月24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	医学研究科病理系専攻
学位論文題目	Hemin-induced activation of the thioredoxin gene by Nrf2: A differential regulation of the antioxidant responsive element by a switch of its binding factors (ヘミンによる thioredoxin 遺伝子活性化の Nrf2 による調節: Antioxidant responsive element (ARE) 結合因子のスイッチによる ARE 制御機構)
論文調査委員	(主査) 教授 内山 卓 教授 松岡雅雄 教授 淀井淳司

論文内容の要旨

【目的】

チオレドキシン (Thioredoxin; TRX) は様々なストレスにより誘導され、細胞死、細胞周期、遺伝子発現制御などの細胞機能を酸化・還元 (Redox) 制御により調節する生体防御に重要な蛋白である。ヘモグロビン代謝産物のヘミン (ferriprotoporphyrin IX) は分化誘導作用を持ち、酸化ストレスを惹起することが知られているがヘミンにより TRX 発現が転写レベルで誘導され、これに HSP (Heat Shock Protein) 蛋白一般の誘導に必要とされる Heat Shock Factor (HSF) が関与することを示唆する報告がなされた (Leppa *et al. J. Biol. Chem.* 1997)。そこで、ヘミンによる TRX 遺伝子の活性化機構を解明し、TRX と HSP 蛋白の誘導機構の異同を明らかにする目的で以下の解析を行った。

【結果】

- (1) 赤白血病細胞株 K562 細胞において Western blotting によりヘミンが TRX 蛋白の発現を誘導することを観察した。
- (2) TRX プロモーターの解析により、ヘミンに対する反応を伝える配列は TRX 遺伝子上流の -452 から -420 までの 33bp の領域であることを明らかにした。その 33bp の配列は Heat Shock Element (HSE) を含まず、AP-1 結合配列に類似した Antioxidant Responsive Element (ARE) を含んでいた。この領域の配列に変異を入れた解析により、この ARE がヘミンに対する反応に必須であることを証明した。
- (3) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) および DNA affinity assay により TRX 遺伝子の ARE 結合蛋白を解析したところ、このヘミンに対する反応に必要な領域には HSF は結合しなかった。無刺激時には NF-E2p45 と small MafK の complex が stable に ARE 配列に結合していたがヘミン刺激により Nrf2 と small MafK の complex の ARE 配列への結合の誘導がみられた。一方、K562 細胞を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で刺激した際にはこの ARE 配列に Nrf2/small MafK complex ではなく AP-1 結合配列に結合する Jun/Fos 蛋白の結合が誘導された。
- (4) ヘミンは Nrf2 の核移行を誘導したが Jun/Fos 蛋白の核移行には影響を与えなかった。一方、PMA は Jun/Fos 蛋白の核移行を誘導したが Nrf2 の核移行には影響を与えなかった。
- (5) また Nrf2 発現ベクターの過剰発現ではヘミン刺激による ARE 依存性活性化が濃度依存的に促進されたが Nrf2 の dominant negative mutant ベクターの過剰発現はその活性化を抑制した。

これらの結果より K562 細胞においてヘミンによる TRX 遺伝子の活性化には HSE や HSF は関与せず、ARE を介した Nrf2 の活性化が重要であることが明らかになった。また、刺激の種類に応じて ARE に結合する転写因子がスイッチする新たな転写制御調節機構の存在を明らかにすることができた。

【考察】

ヘミンによる TRX の誘導は赤血球系の分化における TRX のヘモグロビン酸化防止などの役割を示唆する。また、ヘミン

酸化ストレスを誘導し、虚血再灌流障害の進行に関与するとされているので TRX はヘム鉄による酸化ストレスに対する防御に重要な役割を果たすと考えられる。本研究結果は虚血再灌流障害などの酸化ストレスに関連した病態に対する防御の分子機構の解明につながると考えられる。

論文審査の結果の要旨

チオレドキシシン (Thioredoxin; TRX) は、生体防御に重要な還元酵素である。ヘミン (Hemin; ferriprotoporphyrin IX) が赤白血病細胞株 K562 で TRX 発現を転写レベルで誘導し、その誘導に転写因子 Heat Shock Factor (HSF) の関与を示唆する報告があった。Hemin は Heme の酸化型であり、分化誘導作用を持ち、酸化ストレスを惹起することが知られているが、Hemin によるシグナル伝達機構は明らかではない。今回、Hemin による TRX 遺伝子の活性化誘導機構を解明することを目的として本研究を行った。

本申請者は TRX プロモーター、結合転写因子および結合転写因子の核局在、活性化機構の解析などによって Hemin に対する TRX 誘導機構には HSF ではなく、TRX 遺伝子上の Antioxidant Responsive Element (ARE) 配列を介した転写因子 Nrf2 の活性化が重要であることを明らかにした。また、刺激の種類に応じて ARE に結合する転写因子がスイッチ (switch) する新たな転写調節制御機構の存在を明らかにした。このような研究は、TRX が赤血球分化の制御や Heme による酸化ストレスに対する生体防御において役割を果たす可能性を示すものである。さらに、Heme によるシグナル伝達機構の分子生物学的な解明につながると考えられる。

従って、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値があるものと認める。

なお、本学位授与申請者は平成15年3月3日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。