

京都大学	博士 (理学)	氏名	ZHAO TINGYI
論文題目	Maintenance of intracellular redox homeostasis by an antioxidant enzyme glutaredoxin 1 (Grx1) in human cells (ヒト抗酸化酵素グルタレドキシン1 (Grx1) による細胞内酸化還元恒常性維持の研究)		
<p>【論文内容の要旨】</p> <p>活性酸素種 (Reactive oxygen species; ROS) は、ミトコンドリアの酸化的代謝の際や、電離放射線、熱曝露、酸化剤などへの細胞応答の際に発生し、細胞の代謝に重要なシグナル分子として作用する。一方、細胞内に活性酸素が過剰に蓄積されると酸化ストレスが生じ、タンパク質、脂質、DNAに酸化的なダメージを与え、そのことが多くの疾患に関与していると知られている。特に、タンパク質チオール基の酸化修飾はタンパク質の触媒機能または構造に影響を与える可能性がある。細胞は、これらの酸化チオールを還元することができる特異的な酵素系を有している。グルタレドキシン1 (Grx1) は、グルタレドキシンファミリーに属する抗酸化酵素であり、酸化したタンパク質チオール (タンパク質中のジスルフィドまたはタンパク質とグルタチオンとの混合ジスルフィド) の還元を触媒する。Grx1が<i>in vitro</i>でのsulfhydryl homeostasisの制御に果たす役割については多くの研究が報告されている。しかし、酸化ストレス下で細胞の生理活性を調節するGrx1の役割はまだ十分に理解されていない。本研究では、酸化ストレスに対する細胞の生理的応答を制御するGrx1の役割を理解するために、Grx1欠損のヒトHeLaS3細胞株とGrx1過剰発現のT-REx HeLa細胞株を作製した。</p> <p>Grx1欠損細胞を用いた生存率アッセイにより、Grx1欠損HeLaS3細胞はHeLaS3野生型細胞よりもγ線照射、ヒートショック、またはH₂O₂曝露に対して感受性が高いことを示していた。さらに、酸化ストレス曝露による実験を行い、Grx1欠損 HeLaS3細胞ではHeLaS3野生型細胞に比べて細胞内酸化物質の蓄積量が増加し、酸化タンパク質の総量やROS消去酵素ペルオキシレドキシン (Prx2)の蓄積量が増大することが明らかになった。これらの結果から、Grx1は細胞内の酸化還元恒常性やタンパク質の酸化還元状態の調節に関与していることが分かった。続いて、Grx1欠損のHeLaS3細胞では、酸化ストレス曝露によりHeLaS3野生型細胞よりもミトコンドリア中の活性酸素産生レベル、アポトーシス関連タンパク質であるcytochrome Cレベル及びアポトーシス率が高くなることを明らかにした。これらの結果から、Grx1の欠損は酸化ストレスによるミトコンドリア機能不全やミトコンドリアを介したアポトーシス細胞死に寄与していることが示唆される。ゲノム不安定性を微小核形成アッセイで調べたところ、Grx1欠損HeLaS3細胞とHeLaS3野生型細胞の間では、酸化ストレス曝露後の微小核形成率に差は見られなかった。また、酸化ストレスに曝露したHeLaS3 Grx1欠損細胞とHeLaS3野生型細胞の間では、p38、P-p38、p53、p21のレベルにも差は見られなかった。したがって、Grx1欠損はHeLaS3細胞におけるp38/p53/p21 DNA損傷応答シグナル伝達経路に影響を与えない可能性がある。一方、酸化ストレスへの曝露はGrx1欠損 HeLaS3細胞の増殖を有意に抑制するこ</p>			

とが分かった。さらに、Grx1欠損 HeLaS3細胞ではHeLaS3野生型細胞よりも高い多核細胞形成率が認められたことから、Grx1の欠損は酸化ストレス曝露時の細胞質分裂障害による増殖抑制と関連していることが示唆された。

Grx1過剰発現ヒトT-REx HeLa細胞において、 γ 線照射、ヒートショック、 H_2O_2 曝露により細胞の分裂が抑制されることが示された。次に、酸化ストレスに曝露すると、Grx1過剰発現細胞は野生型細胞よりも多くの細胞内酸化物質を蓄積することを発見した。さらに、Grx1過剰発現細胞では、酸化ストレス曝露下で γ H2AX (DNAの二本鎖切断からH2AXがリン酸化されて γ H2AXを形成する)が高レベルで発現しており、Grx1過剰発現細胞がより多くのDNAの二本鎖切断を産生することがわかった。還元酵素系で重要な調節役割を果たす抗酸化物質であるNADPHの量を測定した結果、Grx1過剰発現細胞では、 γ 線照射によりNADPHの回復が遅れることがわかった。これらの結果から、Grx1の過剰発現は、還元酵素系の安定性を阻害して細胞内の酸化還元バランスを乱し、さらに酸化的DNA損傷を引き起こし、細胞増殖を抑制することが示唆された。

以上のことから、Grx1は細胞内の酸化還元恒常性の調節に重要な役割を果たしていることが分かった。Grx1は、ROS消去酵素の酸化還元状態を制御することで、細胞内の酸化還元恒常性を維持することがあきらかとなった。また、Grx1の欠損または過剰発現は、細胞内の酸化還元恒常性の乱れを引き起こし、細胞内の高分子にダメージを与え、細胞の正常な生理代謝や生理活性に悪影響を及ぼすことが明らかとなった。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

細胞内に活性酸素(ROS)が過剰に蓄積すると、酸化ストレスが生じ、タンパク質、脂質、DNAに酸化的損傷を引き起こし、それがさまざまな疾患に関与していることを示す多くの知見がある。タンパク質チオールの酸化的修飾は、タンパク質の触媒機能または構造機能に影響を与える可能性がある。細胞は、これらの酸化チオールのほとんどを還元することができる特異的な酵素システムを持っている。グルタレドキシニン1(Grx1)は、チオールジスルフィド酸化還元酵素スーパーファミリー(グルタレドキシニンファミリー)に属する還元酵素であり、酸化されたタンパク質チオールの還元を触媒する。Grx1タンパク質の生化学的機能については、これまでに多くの研究が報告されている。しかし、Grx1によるヒト細胞の生理的制御については、まだ十分に理解されていないのが現状である。申請者の研究では、 γ 線照射、ヒートショック、過酸化水素処理を行ったヒト細胞において、Grx1の発現量の変化(欠失または過剰発現)が細胞内の酸化還元状態やその後の生理応答に及ぼす影響を詳しく調べ、ヒト細胞での酸化還元恒常性維持におけるGrx1の役割を明らかにした。

申請者は、Grx1の細胞内抗酸化機能を解明するために、まず、培養ヒト細胞のGrx1欠損株を樹立した。Grx1が欠損している細胞では、酸化ストレスにさらされた際に、時間とともに細胞内のROSが上昇すること、細胞内の酸化タンパク質も上昇し、酸化されたタンパク質の還元ができなくなることで、タンパク質の機能が失われ、細胞の生理活性にさらに悪影響を及ぼすことを見出した。その中で、ROSによって修飾されたROS消去酵素(例えば、ペルオキシレドキシニンPrx2)の還元がGrx1欠損により損なわれ、さらに、ROSが細胞内に過剰に蓄積され、細胞内酸化ストレスの程度が増大することを示した。申請者はGrx1が細胞内タンパク質、とくにROS消去酵素の酸化還元状態を調節することで、細胞内の酸化還元バランスを維持していることを明らかにした。

次に、Grx1発現レベルの上昇が細胞の抗酸化活性を高めるかどうかを調べた。樹立したGrx1の過剰発現培養ヒト細胞を γ 線、ヒートショック、過酸化水素により処理し、DCFHを用いて細胞内酸化物を検出・定量した結果、いずれの処理によってもGrx1過剰発現細胞中で酸化物が増大したことを見出した。また、細胞核中のDNA二本鎖切断の指標である γ H2AXが増大することを確認した。さらに、申請者はGrx1の過剰発現が還元酵素系のNADPHの安定性を阻害することも見出している。還元酵素Grx1の過剰な発現は還元酵素系の安定性を阻害することで、細胞内の酸化還元恒常性に乱れを生じさせ、さらに核内DNAの損傷を促進する事実を明らかにしているのは重要な発見である。

さらに、Grx1発現レベルの減少が細胞に及ぼす潜在的な生理的影響として、Grx1の欠損がミトコンドリアの機能不全とミトコンドリアを媒介とするアポトーシス細胞死に寄与していること、Grx1の欠損は酸化ストレス曝露時の細胞質分裂障害による増殖抑制と関連していることを発見した。

以上の様に、申請者の研究はGrx1がヒト細胞の酸化還元恒常性維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした、学術的に価値の高いものである。

よって本論文は博士(理学)の学位論文として価値のあるものと認める。また、令和3年1月15

日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行なった結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降