

|          |  |
|----------|--|
| 氏名       | にし やま あきら<br>西 山 晃   |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (医 学)  |
| 学位記番号    | 医 博 第 2164 号   |
| 学位授与の日付  | 平成 11 年 11 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   | Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D <sub>3</sub> up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression.<br>(チオレドキシシン結合タンパク質 (TBP-2/VDUP 1) の同定とその機能に関する研究) |

論文調査委員 (主査) 教授 上田國寛 教授 成宮 周 教授 淀井淳司

### 論 文 内 容 の 要 旨

発癌や放射線障害などの種々の疾病における活性酸素の関与や、細胞死や情報伝達機構などの細胞生物学的現象における活性酸素などを介したレドックス（酸化還元）制御の重要性が明らかにされつつある。

チオレドキシシン (TRX) はグルタチオン系と並ぶ細胞内の主要なチオール還元系を構成するタンパク質の一つであり、細胞増殖、アポトーシス、遺伝子発現などの種々の細胞機能の調節に重要な役割を果たしている。TRX の作用の分子機構を解析するために、酵母 two-hybrid 法を用いて TRX 結合タンパク質のスクリーニングを行った。スクリーニングの結果、陽性クローンの一つ、thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) を同定した。この TBP-2 はヒト前骨髄性白血病細胞株 HL-60 において活性化型ビタミン D により誘導される vitamin D<sub>3</sub> up-regulated protein 1 (VDUP 1) として報告されていた遺伝子と同一であることが明らかとなった。<sup>35</sup>S 標識した TBP-2/VDUP 1 と組み替え TRX を用いた結合実験により、TRX と TBP-2/VDUP 1 の *in vitro* での相互作用が確認された。さらにヒト白血病細胞株 Jurkat の抗 TRX 抗体カラム溶出液より TBP-2/VDUP 1 が検出され、TRX と TBP-2/VDUP 1 の *in vivo* における複合体形成が明らかとなった。

次に、酸化及び還元状態の TRX と TBP-2/VDUP 1 との相互作用への影響を検討した。TRX を還元剤で処理した場合 TRX と TBP-2/VDUP 1 の結合に影響をおよぼさなかったが、過酸化水素、チオール基酸化剤などの酸化剤処理によりその結合は著しく阻害された。さらに活性部位のシステイン残基をセリン残基に置換し、還元活性を欠失した変異型 TRX と TBP-2/VDUP 1 の結合は検出できず、TRX の活性中心が TBP-2/VDUP 1 との結合に重要であることが考えられた。

次に、この TBP-2/VDUP 1 の TRX の還元活性への影響を検討した。TBP-2/VDUP 1 の発現ベクターをサル腎細胞株 COS-7、ヒト胎児腎細胞株 293 に導入し、細胞内の TRX の還元活性を測定した結果、TBP-2/VDUP 1 遺伝子導入細胞内の TRX の還元活性は対照と比較して 30～40% に抑制された。さらに大腸菌で合成した組み替え TBP-2/VDUP 1 は TRX の還元活性を有意に抑制した。

また TBP-2/VDUP 1 遺伝子導入細胞では、対照と比較して n へ発現の減少が認められた。

HL-60 細胞における活性化型ビタミン D 処理による TRX と TBP-2/VDUP 1 の発現、及び細胞内 TRX の還元活性に対する影響を検討した。TBP-2/VDUP 1 mRNA 量は活性化型ビタミン D 処理後 72 時間で約 10 倍に、タンパク質量は約 5 倍に増加した。これに対し TRX mRNA 量は処理後 72 時間で約 20% となり、タンパク量は半減した。さらに、TRX の還元活性は処理後 72 時間で約 50% に減少した。

以上の結果から、1) TBP-2/VDUP 1 は TRX と安定した複合体を形成すること、2) TBP-2/VDUP 1 と TRX の結合は TRX の還元状態に依存すること、3) その結合には TRX の活性部位が重要であること、4) TBP-2/VDUP 1 は TRX の還元活性を阻害すること、5) TBP-2/VDUP 1 の過剰発現により TRX タンパク質量が抑制されることが示された。

TRX の発現と還元活性の減少は活性化型ビタミン D 処理 HL-60 細胞においても検出されることから、TBP-2/VDUP 1 は HL-60 細胞の活性化型ビタミン D による分化誘導におけるレドックス制御に重要な役割を持つことが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

チオレドキシシン (TRX) はチオール還元系を構成する主要な酵素タンパク質の一つであり、細胞増殖、アポトーシス、遺伝子発現などの種々の細胞機能の調節 [レドックス制御] に重要な役割を果たしている。本論文では、ヒト TRX の作用の分子機構を解析するために、酵母 two hybrid 法を用いて TRX 結合蛋白として、thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) を同定した。この TBP-2 は活性化型ビタミン D により誘導される vitamin D<sub>3</sub>up-regulated protein 1 (VDUP 1) 遺伝子と同一であった。さらに、1) TBP-2/VDUP 1 は TRX と安定した複合体を形成する、2) TBP-2/VDUP 1 と TRX の結合には TRX の還元状態とその活性部位が重要である、3) TBP-2/VDUP 1 は TRX の還元活性を阻害する、4) TBP-2/VDUP 1 の過剰発現により TRX タンパク量が減少することを示し、TBP-2/VDUP-1 は TRX の活性および発現の負の調節因子であることを明らかとした。

また TBP-2/VDUP 1 発現の増加、TRX の発現と還元活性の減少は、HL-60 細胞の活性化型ビタミン D 処理によって誘導されることから、TBP-2/VDUP 1 は HL-60 細胞の活性化型ビタミン D による分化誘導現象におけるレドックス制御に重要な役割を持つことが示唆された。

以上の研究は、チオレドキシシンの機能調節機構の解明に貢献し、分化誘導治療等の細胞機能調節の医学応用に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 11 年 10 月 4 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。