

氏名	谷口 良久
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	論医博第1596号
学位授与の日付	平成9年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	A novel promotor sequence is involved in the oxidative stress-induced expression of the adult T-cell leukemia-derived factor (ADF)/human thioredoxin (Trx) gene. (新しいプロモーター配列が成人T細胞白血病由来因子(ADF)/ヒトチオレドキシシン(Trx)遺伝子の酸化ストレスによる発現に関与している)
論文調査委員	(主査) 教授 清水 章 教授 内山 卓 教授 森健次郎

論文内容の要旨

生体において、活性酸素は、電子伝達系での電子の逸脱による副産物として、生体防御の場における好中球、マクロファージによる細菌殺菌のために、また紫外線、放射線に照射されることにより産生される。活性酸素は直接、あるいは連鎖反応を介し、生体分子を障害するが、生体はこれら进行处理する一連の防御機構にて対応する。これらにはSOD、カタラーゼ、グルタチオン等の生体物質が関与している。原核生物は活性酸素に対しoxyR, soxRSという転写因子を介して一連の抗酸化酵素を発現することが知られているが、真核細胞においてはこれに対応する機構は未だ見いだされていない。

HTLV-I感染T細胞株が産生する因子として報告された成人T細胞白血病由来因子(ADF)は、チオレドキシシン(Trx)のヒト相同体である。TrxはNADPH, チオレドキシシンレダクターゼとともにジスルフィド還元活性システムを形成し、グルタチオン依存性の還元酵素群とは異なる基質特異性を有し、その活性中心はCys-Gly-Pro-Cys配列からなり、この配列は大腸菌から高等生物に至るまで保存されている。Trxは、そのジスルフィド還元活性により生体内で重要な役割を担っている。チオレドキシシンはDNA合成系に関与するリボヌクレオチドリダクターゼやメチオニンスルホキシドリダクターゼに対して還元作用を有し、f1ファージ複製の主要なサブユニットとなっている。ヒトにおいてADFは細胞増殖作用、抗アポトーシス作用、ラジカル消去能を持つことが知られている。また転写調節因子(NF- κ B, AP-1)やグルココルチコイドレセプターのDNAへの結合がADFのレドックスコントロールを受けていることが知られている。一方Trxは過酸化水素や紫外線により発現が誘導され、酸化ストレス対応する細胞の防御機構の一翼を担っていると考えられる。我々は酸化刺激に対するヒトTrx遺伝子発現の制御機構の解析を行った。

ADF/TrxのmRNAはヒトT細胞リンパ腫由来細胞株Jurkat細胞において、過酸化水素により濃度依存的に誘導され、ダイアミド、メナディオンに対しても発現が誘導される。その発現は100 μ M過酸化

水素に対し、2時間で誘導され、少なくとも12時間そのレベルが維持されるが、24時間後にはもとのレベルまで減少する。また核 run-on アッセイにより、この mRNA の増加は転写レベルで生じていることがわかった。我々はヒト Trx ゲノム遺伝子をクローニングし、その様々な領域の 5' 上流域をレポーター遺伝子 CAT 上流に挿入したベクターを構成し、それらを Jurkat 細胞に導入し過酸化水素に対する発現を測定した。その結果、CAP 部位より-976から-890の領域に過酸化水素に対する遺伝子発現誘導に必要なシスエレメントがあることが示された。次にゲルシフト法、及び DNase I フットプリント法により ADF/Trx 遺伝子の過酸化水素に対する遺伝子発現誘導に必要な DNA 配列が-951から-932の領域にあり、この DNA 配列に結合する DNA 結合蛋白の存在を示し、この領域に変異を導入した 5' 上流域を持つ CAT 発現ベクターを用いることにより、この DNA 結合蛋白が ADF/Trx 遺伝子の過酸化水素に対する遺伝子発現誘導に必要であることを示した。この DNA 配列はデータベースでの検索の結果、相同配列を見いだすことはできなかった。今回の知見はこのシスエレメント、及び DNA 結合蛋白が、活性酸素に対する真核生物の防御反応において重要であることを示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

学位申請者らはヒトチオレドキシン (Trx)/成人 T細胞白血病由来因子 (ADF) のゲノム遺伝子をクローニングし、その 5' 上流域に酸化ストレスに応答するシスエレメント、及びその配列に結合する因子の存在を示した。mRNA 発現、核ランオンの解析により、Trx/ADF 遺伝子は、過酸化水素に対し転写のレベルにて発現が増加し、また 5' 上流域の欠失変異を用いたレポーター遺伝子の発現の解析、ゲルシフト法、及び DNase I フットプリント法を用いることにより、Trx/ADF 遺伝子の過酸化水素に対する発現応答には-951から-932の DNA 配列が関わっており、この領域の DNA 配列に特異的に結合する DNA 結合蛋白が存在することが示された。さらにこの領域に変異を導入したプロモーターを持つレポーター遺伝子の発現を解析することにより、この DNA 結合蛋白が Trx/ADF 遺伝子の過酸化水素に対する発現応答に必要であることを明らかにした。

以上の研究は Trx/ADF が酸化ストレスに対する細胞の防御反応に関与し、このシスエレメント及び DNA 結合蛋白が酸化ストレスに対する遺伝子応答の過程において重要であることを示唆するものである。

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 9 年 1 月 6 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。