

学 位 審 査 報 告 書

(ふ り が な) 氏 名	ほそき あやか 細木 彩夏
学位 (専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学位授与の日付	平成 年 月 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	理学研究科 生物科学 専攻
(学位論文題目) 放射線によるミトコンドリア機能不全およびゲノム不安定性に対する ミトコンドリア局在型抗酸化酵素 SOD2、Grx2a による抑制効果	
論 文 調 査 委 員	(主査) 秋山 秋梅 准教授 渡邊 正己 教授 沼田 英治 教授

理 学 研 究 科

京都大学	博士（理 学）	氏名	細木 彩夏
論文題目	放射線によるミトコンドリア機能不全およびゲノム不安定性に対するミトコンドリア局在型抗酸化酵素 SOD2、Grx2a による抑制効果		
(論文内容の要旨)			
活性酸素種（ROS）は好氣的代謝の副産物として細胞内で常に生じている。また、電離放射線の照射や多くの環境化学物質によっても、多くの ROS が生じることが知られている。生じた ROS は細胞構成成分である DNA や脂質、タンパク質を酸化し損傷を与える。その結果、細胞死や細胞がん化あるいは突然変異などが引き起こされる。このような酸化障害から防御するために、細胞には ROS の消去や損傷を受けた分子の修復といった複数の機構が備わっている。この防御には、細胞内に存在する抗酸化酵素（群）やビタミン E、グルタチオンなどの低分子化合物が関与している。 最近になって、細胞に対する放射線や酸化ストレスの作用は細胞核の障害だけでなく、ミトコンドリアの障害も重要であることが示唆されている。しかし、その分子機構はまだ十分に解明されていない。そこで、本研究で、申請者は、ミトコンドリアに局在する抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ（SOD2）あるいはグルタレドキシシン（Grx2a）をヒト細胞中で高発現させたヒト細胞株を樹立し、放射線照射によるミトコンドリアでの酸化的損傷およびゲノムの損傷に対するそれらの抗酸化酵素の高発現の効果を解析して、ミトコンドリアの酸化ストレスの重要性を解明しようとした。得られた結果は次の通りである。（１）樹立した SOD 高発現株の放射線の致死作用に対する感受性を調べたところ、細胞質に局在する SOD である SOD1 では効果は現れなかったが、ミトコンドリアに局在する SOD2 の高発現によって細胞は放射線に抵抗性を獲得した。この結果は、細胞の生存において、細胞質や核に存在する SOD よりもミトコンドリアで働く SOD が重要であることを示している。（２）SOD2 の高発現によって、ミトコンドリアで生じる ROS のレベルだけでなく、細胞質、核を含む細胞全体での ROS レベルも抑制された。（３）ミトコンドリアは酸化ストレスによって断片化されるが、その結果として機能不全を生じる。申請者は、放射線照射によってミトコンドリアの断片化が誘導されること、その要因としてミトコンドリアの形態維持に関与するタンパク質の一種である Drp1 が照射後、ミトコンドリアに集積することを見いだした。Drp1 はミトコンドリアの分裂に働くタンパク質であり、その集積が放射線で誘導されることは興味ある結果である。さらに、放射線で起こるミトコンドリアの断片化も Drp1 の集積も SOD2、Grx2a の高発現で顕著に抑制を受けた。その抑制の程度はミトコンドリアでの ROS 生成の抑制の程度に対応した。さらに、（４）核に存在するゲノム DNA の二重鎖切断を γH2AX レベルで解析した結果、ミトコンドリアでの SOD2 や Grx2a の高発現によってゲノム DNA の損傷が抑制されることが分かった。また、（５）酸化ストレス防御タンパク質 OXR1 の発現が放射線で誘導されることを見い出したが、この発現誘導も SOD2、Grx2a の高発現細胞では著しく抑制を受けた。 これらの事実から、ミトコンドリアで高発現された抗酸化酵素は、ミトコンドリアでの放射線障害を防御するだけでなく、ゲノム DNA の損傷を抑制することによってゲノム不安定性から細胞を護ること、さらに、OXR1 の誘導のような放射線に対する細胞応答にも抑制的に働くことが明らかになった。そのことは、ミトコンドリアの放射線によって引き起こされる酸化ストレスが細胞質、核にまで及び、その結果、細胞に重篤な障害をもたらすことを示している。			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

放射線の電離作用により細胞内のあらゆる部位で種々の酸化的損傷が起こる。それらの損傷のうち、細胞障害の発生に重要なものは DNA の損傷である。DNA の損傷は、細胞死をもたらすか、あるいは不完全な修復により DNA の構造や遺伝情報が変わるゲノム不安定性を生じさせることがある。このような細胞障害の発生は過剰の活性酸素が細胞内で生成した場合にも当てはまると考えられている。細胞内には核だけでなく細胞質および多くの細胞内小器官が存在する。例えば、ミトコンドリアは解糖系および電子伝達系による酸化的リン酸化を経て ATP を産生する細胞のエネルギー工場の役割を担っている小器官である。ミトコンドリアの放射線障害を解析した研究はこれまでも多いが、ほとんどはミトコンドリアの機能障害を扱うような研究が多かった。1990 年代になって、ミトコンドリアの電子伝達系の一部であるチトクローム C がアポトーシスを起こす直接因子であることが報告され、ミトコンドリアが細胞の生存だけでなくその死をも制御することが理解されるようになってきた。しかしながら、ミトコンドリアの障害が細胞死やゲノム安定性の破綻にどう関与するのかどうかはまだ明らかにされていなかった。

申請者の研究は、ミトコンドリアに局在する抗酸化酵素 SOD2 や Grx2a をミトコンドリアで高発現（過剰発現）させる細胞株を樹立して、この問題の解明を志したものである。申請者が SOD2 の欠損変異株を使わなかった理由として、活性酸素消去という酵素活性の欠失だけでなく、その欠損によって細胞の生理的な状態に大きな影響が現れる可能性を考慮して、高発現させる方法論をとったのは妥当な選択であった。申請者は、細胞に酸化ストレスを負荷させる要因に放射線を用いて、ミトコンドリアでの活性酸素の増産が予測どおり SOD2 など抑制できることを実証した。そのうえで、放射線によって引き起こされるミトコンドリアの形態異常、細胞質全体で高まる酸化ストレス、ゲノム DNA の損傷のいずれもが、ミトコンドリアでの SOD2 や Grx2a の高発現で抑制されることを証明した。これらの事実から、申請者の考察のとおり、ミトコンドリアで発生した活性酸素が細胞全体に拡散し、その結果、その影響が核に及んでゲノム安定性を失わせていくという経路が、これまでのゲノムへの直接障害に加えて存在することが確かになったと言える。ゲノム DNA にコードされている遺伝子の発現誘導という細胞応答もミトコンドリアの SOD2 で抑制されたという申請者の発見は今後きわめて重要な問題を提起している。

申請者の研究はミトコンドリアの酸化障害と、放射線や酸化ストレスによる細胞障害およびゲノム不安定性の発生とその制御との関連の解明に大きな貢献をするものである。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。平成 24 年 1 月 18 日、本論文および参考論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した研究分野について口頭試問した結果、合格と認めた。

要旨公開可能日： 年 月 日以降