

氏 名	た 田 中 亨
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2522 号
学位授与の日付	平 成 14 年 7 月 23 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	Thioredoxin-2(TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis. (チオレドキシン 2 は必須遺伝子であり、ミトコンドリア・アポトーシス経路を制御する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 野 田 亮 教 授 内 山 卓 教 授 淀 井 淳 司

論 文 内 容 の 要 旨

チオレドキシン (Trx) は、活性中心に Cys-Gly-Pro-Cys という種族を越えて保存されたペプチド配列を有し、この 2 つのシステインを介した還元作用により標的蛋白分子の S-S 結合を開裂することでシグナル伝達のレドックス制御や酸化ストレスに対する生体防御を行っている。近年この特徴的なペプチド配列と類似の活性部位をもつチオレドキシンスーパーファミリーに属する蛋白が次々と報告されている。チオレドキシン 2 (Trx-2) は、1997年に Spyrou らによって Trx との相同性が約 35% のミトコンドリア局在型 Trx として報告された。

Trx-2 の細胞生物学的機能について検討するため、外来導入 DNA と高頻度に相同組み替えをおこすトリ B 細胞株 DT40 を用い、Trx-2 ノックアウト細胞の作成を試みた。Trx-2 の活性中心をコードした部分に相当する遺伝子をセクションマーカーに置換した 2 種類のノックアウトベクターを作成した。まず標的遺伝子対の一方に遺伝子置換したヘテロノックアウト細胞を作成し、更にもう一方の標的遺伝子対への遺伝子置換を試みたがホモノックアウト細胞は得られなかった。従来の方で相同遺伝子対ノックアウト細胞は得られなかったため、テトラサイクリン (Tet) 存在下では外来導入遺伝子の発現を抑制できる Tet-off システムを用いて Trx-2 を導入し内在性 Trx-2 をノックアウトしたコンディショナル Trx-2 ノックアウト細胞を作成し、導入 Trx-2 発現を抑制したところ細胞死が誘導された。このことより、Trx-2 が細胞生存に必須であることが示唆された。

Trx-2 発現抑制細胞では細胞内活性酸素種の軽度増加を認めた。グルタチオン (GSH) / グルタチオンペルオキシダーゼは活性酸素消去系として知られているが Trx-2 発現抑制細胞では細胞内及びミトコンドリア分画内の GSH レベルはいずれも著明な減少を認めた。これは Trx-2 発現抑制により発生した細胞内活性酸素種を消去したため GSH が減少したと考察された。GSH 産生抑制により GSH 量を減少させるブチオニンスルフォキサミン (BSO) を、培養液中へ添加したところ Trx-2 発現抑制細胞では細胞死の著しい増加を認めた。これらのことから Trx-2 発現抑制により細胞内活性酸素種は過剰産生されることが示唆された。

Trx-2 発現抑制によりカスパーゼ 3 の活性亢進を認めアポトーシスの誘導が示唆された。Trx-2 発現抑制によりチトクローム c の細胞質内への放出とカスパーゼ 9 を活性化を認め、Trx-2 発現抑制によりミトコンドリアを介したアポトーシス経路が活性化されていることが示唆された。

また、還元剤である 2-メルカプトエタノールの培養液中への添加により、Trx-2 発現抑制による細胞死は一部回復したが完全には抑制されなかったことから、Trx-2 発現抑制の結果生じる細胞傷害は活性酸素種の過剰産生に一部依存するものの、それ以外の要因も考えられた。Jurkat 細胞抽出物を抗 Trx-2 抗体と反応させた結果、チトクローム c が免疫沈降され、Trx-2 とチトクローム c との結合が示唆された。今回の研究結果のみでは Trx-2 とチトクローム c 相互作用のミトコンドリア機能における生理的意義やミトコンドリア依存性の細胞死における意義は結論出来ないが、TRX2 を介する新しい細胞死制御機構の存在が示唆された。

これらのことから Trx-2 は細胞生存に必須であることが示され、以下のことが推察された。

1. ミトコンドリアにおける活性酸素種産生を制御している。
2. Trx-2 がチトクローム c の細胞質への放出に関与している可能性がある。

論文審査の結果の要旨

チオレドキシン (Trx) は、活性中心上の 2 つのシステインを介してシグナル伝達のレドックス制御や酸化ストレスに対する生体防御を行っている。チオレドキシン 2 (Trx-2) は Trx スーパーファミリーに属する新たなミトコンドリア局在型 Trx である。本研究では、トリ B 細胞株 DT40 システムを用いてコンディショナル Trx-2 ノックアウト細胞を作成し、Trx-2 の生物学的意義について検討した。その結果、TRX-2 遺伝子の抑制下では DT40 細胞は増殖出来ず、この細胞において必須遺伝子であることが明らかとなった。また、Trx-2 発現抑制細胞では細胞内活性酸素種の増加を認め、ミトコンドリアを介したアポトーシス経路の活性化が確認された。しかし Trx-2 発現抑制による細胞傷害は 活性酸素種の消去で部分的な抑制しか得られず、それ以外の標的分子特異的な要因も検討した。Trx-2 がチトクローム c と直接結合することから、Trx-2 を介する新しい細胞死制御機構の存在が示唆された。今回の研究結果のみでは Trx-2 とチトクローム c 相互作用の生理的意義やチトクローム C の放出機構への関与は結論出来ないが、今後 Trx-2 の機能が解析されることによりミトコンドリア依存性の細胞死におけるレドックス制御機構が解明されるものと期待される。また、新たなアポトーシス制御分子として癌治療のターゲットとして臨床研究への応用も期待される。従って本論文は博士 (医学) の学位論文として価値のあるものと認める。本学位授与申請者は、平成14年 5 月24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。