

氏 名	ワン 王	ドン 冬	メイ 梅
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	医 博 第 2975 号		
学位授与の日付	平 成 18 年 3 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	Control of mitochondrial outer membrane permeabilization and Bcl-xL levels by thioredoxin 2 in DT40 cells (DT40 細胞におけるチオレドキシン 2 によるミトコンドリア外膜透過性と Bcl-xL 発現の制御) (主 査)		
論文調査委員	教 授 武 田 俊 一	教 授 永 田 和 宏	教 授 宮 地 良 樹

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

ミトコンドリアは ATP 産生, 活性酸素の発生, 酸化還元状態, 膜透過性などの制御によりアポトーシスの実行に中心的な役割を果たしている。チオレドキシン 2 (TRX2) はミトコンドリアに特異的に局在するレドックス制御タンパク質である。以前, TRX2 をトリ DT40 細胞で欠失させると, 細胞がアポトーシスに陥ることを報告した。今回このアポトーシスの機構を明らかにする目的で, トリ Trx2 の遺伝子を欠失させ, さらにドキシサイクリン (Dox) によりトリ Trx2 の発現が抑制できる発現ベクターを導入した細胞 (DT40-Trx2-/-細胞) を用い, さらにその細胞に野生型ヒト TRX2 を導入した細胞 (DT40-hTRX2 細胞) あるいは, 活性部位の Cys を Ser に置換し, TRX2 の還元活性を失わせた変異型のヒト TRX2CS を導入した細胞 (DT40-hTRX2CS 細胞) を用いて, これらの細胞を比較検討することにより, アポトーシス機構の解析を行った。

【結果】

Dox 投与 5 日目に DT40-Trx2-/-細胞では細胞死が増加し, また, Annexin V の染色性が増加し, カスパーゼ 3 の活性化が見られ, アポトーシスが起きていると考えられた。これらの活性化は DT40-hTRX2 細胞および DT40-hTRX2CS 細胞では見られなかった。ATP 産生はこれらの細胞株で低下を認めなかった。また, DT40-Trx2-/-細胞では Dox 投与により活性酸素の発生が見られたが, DT40-hTRX2 細胞および DT40-hTRX2CS 細胞では見られなかった。Dox 投与により DT40-Trx2-/-細胞ではミトコンドリア膜電位が低下していたが, DT40-hTRX2 細胞および DT40-hTRX2CS 細胞では見られなかった。さらに, Dox 投与 3 日目に DT40-Trx2-/-細胞ではチトクロム c, AIF (apoptosis-inducing factor) の細胞質への漏出が観察されたが, DT40-hTRX2 細胞および DT40-hTRX2CS 細胞では見られなかった。ミトコンドリアの膜透過性の制御には Bcl-2 ファミリーが深く関与することから Bcl-2 ファミリーの発現の検討を行った。DT40-Trx2-/-細胞では Dox 投与後 3 日目に Bcl-xL 蛋白の発現の減少が観察された。DT40-hTRX2 細胞および DT40-hTRX2CS 細胞ではみられなかった。Bcl-xL の mRNA のレベルには変化を認めなかった。また, カスパーゼの阻害剤は Bcl-xL 発現の変化に影響を与えなかった。一方, Bcl-2 蛋白の発現の減少は, Dox 投与後 4 日目まで観察出来なかった。さらに, このアポトーシスにおける Bcl-xL の役割をさらに検討するため, Bcl-xL の siRNA を用いて検討を行った。Bcl-xL の siRNA の投与は DT40-hTRX2 細胞および DT40-hTRX2CS 細胞において Bcl-xL 発現の減少と, Dox 投与による細胞数の減少を起こした。

【考察】

これらの結果より, DT40 細胞の生存において, ヒト TRX2 はトリ Trx2 の欠失を代償できることが明らかになった。また, Trx2 の発現低下は, Bcl-xL の蛋白レベルでの発現減少を起こし, ミトコンドリア外膜の透過性を亢進させることにより, アポトーシスを引き起こす機構を明らかにした。さらに, TRX2 は活性中心のシステイン残基非依存性にミトコンド

リアにおいてアポトーシスを制御している機構が存在することが示唆される。

論文審査の結果の要旨

ミトコンドリアはアポトーシスの制御に重要な役割を果たすことが知られている。申請者らはこれまでに、ミトコンドリア特異的に発現するレドックス制御タンパクであるチオレドキシシン2 (Trx2) を欠失したトリ DT40細胞を樹立し、Trx2 欠失がミトコンドリア依存性アポトーシスを起こす報告を行い、更に TRX2 によるアポトーシス制御機構について研究を行ってきた。

本研究では、DT40 細胞での Trx2 の発現の低下が、ミトコンドリア外膜の透過性を亢進してアポトーシスを誘導することを確認した。逆にヒト TRX2 を過剰発現させると、その透過性亢進とアポトーシスの亢進が抑制された。しかし予想に反して、還元活性が欠失した変異型 TRX2 (hTRX2CS) を高発現させても、野生型 TRX2 と同様に外膜の透過性の亢進、アポトーシスが抑制された。また、Trx2 の発現低下は、Bcl-xL の蛋白レベルでの発現の減少を誘導することが証明された。以上のことから、TRX2 は、ミトコンドリアにおいて外膜の透過性を制御することにより、ミトコンドリア依存的なアポトーシス機構を制御することが示唆された。また、この制御は、TRX2 の活性中心であるシステイン残基非依存的な新しい機構であることが明らかになった。

以上の研究は、TRX2によるミトコンドリア外膜透過性と Bcl-xL 発現の調節を介したアポトーシス制御の分子機構を明らかにした。ミトコンドリア依存性のアポトーシスは発癌や神経変性疾患などの病態において重要であり、本研究で得られた知見はこれらの疾患の分子機構の解明に貢献すると考えられる。

本研究は博士（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18年2月21日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められる。