

氏 名 上 田 修 吾
 学位(専攻分野) 博 士 (医 学)
 学 位 記 番 号 医 博 第 2197 号
 学位授与の日付 平 成 12 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 外 科 系 専 攻
 学位論文題目 Redox Regulation of Caspase-3(-like) Protease Activity : Regulatory Roles
 of Thioredoxin and Cytochrome c
 (カスパーゼ3(様)蛋白分解酵素活性のレドックス制御機構, チオレドキシンと
 シトクロムcによる制御機構に関する研究)

論文調査委員 (主 査)
 教 授 日 合 弘 教 授 伊 藤 和 彦 教 授 山 岡 義 生

論 文 内 容 の 要 旨

活性酸素は、感染、炎症、虚血などによる細胞組織障害に深く関与するが、軽度の酸化ストレスは細胞内シグナル伝達分子として生体にポジティブシグナルを伝えることが明らかになってきた。グルタチオンやチオレドキシン等は、細胞内外のチオール基を有する蛋白の還元および活性酸素の消去分子として、細胞内外の酸化・還元(レドックス)環境を制御している。一方、アポトーシスシグナル伝達において重要な役割を演じている蛋白分解酵素カスパーゼは、その活性中心にシステイン残基を有しているため、その活性が細胞内のレドックス環境により制御される可能性が示唆された。そこで本研究では、チオール基酸化剤 diamide による細胞死誘導における、カスパーゼ活性およびアポトーシス誘導に対する細胞内レドックス制御機構について解析した。

ヒト白血病 T 細胞株 Jurkat 細胞を diamide 添加培養し電子顕微鏡で観察したところ、200 μ M ではアポトーシス、500 μ M ではネクローシスが誘導された。200 μ M diamide では、細胞内活性酸素量はわずかに増加し、細胞内チオレドキシン量は維持され、ミトコンドリアからシトクロム c の細胞質への放出およびカスパーゼ-3 の活性化を認めた。一方、500 μ M diamide では、細胞内活性酸素の著明な増加とミトコンドリアからシトクロム c の細胞質への放出を認めたが、カスパーゼ-3 は活性化されなかった。

また、抗 Fas 抗体添加により活性化した Jurkat 細胞のカスパーゼ-3 は、細胞抽出液への diamide 処理により失活し、還元剤 dithiothreitol (DIT) やチオレドキシン処理により活性を回復した。すなわち、カスパーゼ-3 活性はチオール基のレドックス状態により制御され、酸化状態で失活し還元状態で活性を有することが明らかになった。

したがって、酸化ストレスによる細胞死の形態はシトクロム c 放出以降の段階で制御され、細胞内還元環境が保たれている時のみカスパーゼ-3 が活性化しアポトーシスが誘導され、細胞内が酸化状態になるとカスパーゼ-3 は活性化されずネクローシスに陥ることが示された。

さらに、Buthionine sulfoximine (BSO) の前培養により細胞内グルタチオンを枯渇させた Jurkat 細胞では、20 μ M diamide 添加培養でシトクロム c 放出およびカスパーゼ-3 活性化を認め、アポトーシスが誘導された。この際にも、細胞内チオレドキシン量と細胞内還元環境は維持されていた。

以上の結果より、(1) in vitro と in vivo においてカスパーゼ-3 は還元状態で活性を有すること (2) diamide によるアポトーシス誘導には、細胞内活性酸素産生とミトコンドリアからシトクロム c の細胞質内放出が関与すること (3) 酸化ストレスによるカスパーゼ-3 活性化とアポトーシス誘導には、ミトコンドリアからのシトクロム c の細胞質内放出以降の段階で、チオレドキシンやグルタチオン等の還元因子による細胞内還元環境維持が重要であることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

活性酸素は細胞組織障害に深く関与するほか、細胞内シグナル伝達分子としても機能することが知られている。グルタチオンやチオレドキシン等は、細胞内の酸化・還元（レドックス）環境を制御する分子である。これらの分子が種々の刺激による細胞死を抑制することは以前に報告されていたが、その制御機構の詳細は明らかでなかった。

アポトーシスのシグナル伝達に重要な蛋白分解酵素カスパーゼ3は、活性中心にシステイン残基を有するため、レドックス環境がカスパーゼ3活性を制御する可能性を考えた。従って、本研究では、カスパーゼ3活性に着目し、細胞死シグナルにおけるレドックス制御機構の解明を目的とした。

以下に本研究で明らかにした点を述べる。

- 1) カスパーゼ3は還元状態で活性を有するが、酸化状態で失活する
- 2) チオール基酸化剤 diamide による細胞死には、細胞内における活性酸素産生とミトコンドリアからのシトクロム c 放出が関与する
- 3) 酸化ストレスによる細胞死の形態はシトクロム c 放出以降の段階で制御され、細胞内の還元環境維持がカスパーゼ3活性化とアポトーシス誘導に必要である
- 4) 強い酸化ストレスでは細胞内が酸化状態になるため、カスパーゼ3が活性化されずネクローシスに陥る

以上の研究は、アポトーシスシグナル伝達におけるレドックス制御機構の解明に貢献し、レドックス制御による癌治療の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12年1月18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。