

論文の内容の要旨

論文題目 KM-102-derived reductase like factor (KDRF)/チオレドキシシン還元酵素に関する分子生物学的研究

氏名 小石 龍太

造血機構、細胞性免疫反応、抗体産生、炎症反応、アレルギー反応、あるいは細胞の分化、増殖を制御する重要な遺伝子の多くは、構成的に発現するのではなく、細胞の置かれた状況に応じて一過的な発現調節が行われることにより厳格な制御をうけていると考えられる。サイトカインや癌遺伝子は、その代表的な例である。これらの一過的な発現調節をうける遺伝子の mRNA の 3'非翻訳領域には、mRNA 不安定化配列 (AUUUA) が繰り返して存在していることが知られており、実際にこの AU リッチな配列が mRNA の不安定化に関与していることが *c-myc*、GM-CSF などについて報告されている。このように mRNA の不安定化に関与している AUUUA の繰り返し配列を有する遺伝子は、生体内の生理機能の調節に重要な役割を担っている蛋白質をコードしている可能性が高いと考えられる。したがって、こうした遺伝子を単離することができれば、様々な疾患の発症機構の解明につながる可能性がある。また、医薬品として有用な蛋白質は、近年の遺伝子組換え技術を利用して大量に生産され、疾患に対する治療に直接役立てることも可能である。

著者は、一過的に発現調節が行われる遺伝子が生理的に重要な機能を担う蛋白質をコードしているものと考え、こうした mRNA に共通に存在する AU リッチな配列をプローブとして検索を行うことで新規なサイトカイン様遺伝子を単離することを試みた。

ところで新規遺伝子を単離するためにさらに重要な点として、その遺伝子を提供する側の細胞の問題を挙げるができる。著者は、サイトカイン研究から得られている知見に基づき、造血微小環境を形成する骨髄間質細胞に着目した。骨髄間質細胞は、体内で様々な状況に対応し、造血系コロニー刺激因子などのサイトカインをはじめとした因子を放出することで、骨髄内において多能性造血幹細胞や各種の血球前駆細胞の分化、増殖を制御している。また、近年、ヒトの骨髄間質細胞は、株化がなされ、様々な実験を安定して行うことが可能となった。以上の点から著者は、ヒト由来骨髄間質細胞株 KM-102 を利用して、外部から炎症性の刺激を与えた際、発現が誘導されてくる遺伝子群の中から、mRNA の 3'非翻訳領域に AU リッチな配列を含有する遺伝子をスクリーニングすることを試みた。

第 2 章において、KM-102 細胞の性質を調べる目的で、既知のサイトカイン誘導剤 (IL-1 β 、lipopolysaccharide、phorbol 12-myristate 13-acetate) と新規サイトカイン誘導剤ロイストロダクシン B (LSN-B) を用いて、KM-102 細胞と、これまで CSF の産生が知られている間葉系細胞との反応性の比較を行った。さらに初代培養ヒト骨髄間質細胞を用いて LSN-B に対する反応性を検討し、*in vitro* における KM-102 細胞株と初代培養ヒト骨髄間質細胞との性質を比較した。CSF の産生誘導活性を指標にしてヒト血管内皮細胞、ヒト表皮線維芽細胞、及びヒト末梢血単核球と KM-102 との間でその反応性を比較した結果、KM-102 細胞は、これまでに CSF 産生細胞として知られている種々の細胞に比べてサイトカイン誘導剤に対する反応性が比較的高く、そのプロファイルもユニークであることが示された。一方、KM-102 細胞は、初代培養ヒト骨髄間質細胞とほぼ同様な LSN-B に対する応答性を示し、様々なサイトカインを産生した。上記実験結果に加えて、KM-102 細胞が *in vitro* で血球コロニーの形成能を示すことから、クローン化された KM-102 細胞は、*in vivo* の状態をよく反映した細胞株であることが示唆された。

第 3 章において、炎症性の刺激で発現が誘導されてくるサイトカイン様遺伝子を単離するために、mRNA 不安定化シグナルである AUUUA 配列に対する相補配列をプローブとして、phorbol 12-myristate 13-acetate と A23187 で刺激したヒト骨髄間質細胞株 KM-102 の mRNA から作製した cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、推定 549 個のアミ

ノ酸からなる蛋白質をコードするクローン KM31-7 を得た。塩基配列の解析から、このクローンは、AUUUA 配列を含んだ 3'非翻訳領域を有しており、また、その mRNA 発現量は、種々の炎症性の刺激に対して一過的に応答して変動した。さらに、高発現ベクターを利用して COS-1 細胞へ導入することにより、この遺伝子は、分泌蛋白質をコードしていることが明らかになった。一方、データベースの検索から、クローン KM31-7 のコードする蛋白質は、グルタチオン還元酵素と 30%程度の相同性を有していることが示された。そこで融合蛋白質を作製してその性質を検討したところ、この蛋白質は還元酵素の性質を持つことが判明した。この蛋白質は、還元酵素の性質とサイトカイン様の性質を併せ持つ新しい蛋白質であることから、著者は **KDRF (KM-102-derived reductase like factor)** と命名した。

KDRF は、その後の解析からセレン含有蛋白質として単離されたヒト・チオレドキシシン還元酵素 (Thioredoxin reductase; TR) と同一のものであることが明らかになったことから、第 4 章において、KDRF/TR 蛋白質の生化学的解析を行うために、大腸菌で組換え蛋白質を作製することを試みた。KDRF/TR 蛋白質は、セレノシステインを C 末端から 2 番目の位置に含有し、基質である酸化型チオレドキシシンを還元するためには同蛋白質内のセレノシステインが必須であることが知られている。したがって、活性型の KDRF/TR 蛋白質を入手するためにはセレノシステインを含有する KDRF/TR 体を作製することが必要となる。ところが、真核生物と原核生物とではセレノシステインを蛋白質内へ挿入するメカニズムが異なるため、単純にヒト由来の KDRF/TR cDNA を大腸菌へ導入して発現を試みても、活性型 KDRF/TR 蛋白質を得ることは不可能である。そこで、大腸菌のギ酸デヒドロゲナーゼの解析から明らかにされた、大腸菌におけるセレノシステイン挿入メカニズムを KDRF/TR cDNA へ導入することにより、大腸菌内でヒト由来のセレノシステイン蛋白質 (KDRF/TR) を作製することを試みた。その結果、活性体、すなわちセレノシステインを保有する KDRF/TR 蛋白質を作成することに成功した。本研究は、ヒト型のセレン蛋白質を大腸菌で作成することに成功した最初の例である。

著者が大腸菌で作製することに成功した活性型 KDRF/TR 蛋白質は、活性酸素の発生によって生じる各種の疾患に対する抗酸化剤として利用しうる可能性が示唆される。同時に、これまで不可能であると考えられていたヒトの活性型セレン蛋白質の組換え型蛋白質が大腸菌で作製可能となったことは、他のセレン蛋白質の組換え型蛋白質作製へ応用できるとともに、機能として不明な点が多いこれらの蛋白質の機能を *in vitro* で解析するための重要な手段となりうることを期待される。一方、KDRF は、細胞内外でその還元活性を介して様々な生理機能を有しているこ

と、さらにセレン蛋白としてセレンの貯蔵という生体にとって欠くことのできない生理的機能を有していることが推定されることから、著者の利用したスクリーニング系は、これまでの遺伝子単離法とは異なり、生理的に意義のある遺伝子を単離するためのユニークな手法であることが示された。