

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小 石 龍 太

サイトカインを始めとした生体内の重要な制御因子のmRNAの3'非翻訳領域には、mRNA不安定化配列(AUUUA)が存在する例が知られている。従って、このようなAUUUA繰り返し配列をmRNAに有する遺伝子は、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ため、この遺伝子産物(蛋白質)は、生体内の生理機能の調節に重要な役割を担うと考えられる。本研究では、こうしたAUUUA配列に着目することで、新規なサイトカイン様遺伝子の単離を試みた。その結果、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、一過性に発現が誘導される遺伝子群の中から、新規チオレドキシシン還元酵素遺伝子(KDRF)を見出した。更に、組み換え蛋白質を作ることで、その酵素機能を生化学的に解析した。

第1章は、研究の背景と目的を述べた結論から構成されている。

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、lipopolysaccharide、phorbol 12-myristate 13-acetate)と新規サイトカイン誘導剤ロイストログクシンB(LSN-B)を用いて、サイトカインを産生することが知られている間葉系細胞と反応性の比較を行った。更に、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、KM-102細胞と性質を比較した。その結果、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を始めとした各種誘導剤に対し、高い応答性を示し、様々なサイトカインを産生した。以上の結果より、KM-102細胞はin vivoの性質をよく反映した細胞株であると判断し、以後、この細胞株を用いてスクリーニングを行なった。

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い、いくつかの新規遺伝子を同定・解析した。その内、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について、更に解析を進めた。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。更に、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であることから、著者はKDRF (KM-102-derived reductase like factor) と命名した。

その後の解析から、KDRFは、セレン含有蛋白として単離されたヒト・チオレドキシン還元酵素 (Thioredoxin reductase ; TR) と同一のものであることが明らかになった。

第4章では、大腸菌で組換え蛋白を作製し、KDRF/TR蛋白の生化学的解析を行った。大腸菌の蟻酸脱水素酵素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 (KDRF/TR) を作製することを試みた。生化学的解析の結果、活性体、すなわちセレノシステインを保有するKDRF/TR蛋白の作成に成功した。大腸菌でのヒト型のセレン蛋白作成の最初の例となった。

以上、本論文はmRNA不安定化配列 (AUUUA) に着目したクローニングを用いることで、骨髓間質細胞から新規サイトカイン様チオレドキシン還元酵素 (KDRF) を単離し、更に、その性質を遺伝子工学的、生化学的手法により明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。