

学位論文題名

Glutathione Reductase 遺伝子の
アンチセンス発現ベクターを用いた発現抑制細胞株の
樹立と酸化ストレスに対する感受性の評価

学位論文内容の要旨

Glutathione (GSH) は細胞内の重要なアンチオキシダントの一つであり、glutathione peroxidase (GPX) の基質として過酸化水素や有機的過酸化物を還元する一方、自らは酸化されてglutathione disulfide (GSSG) となる。Glutathione reductase (GR) はGSSGをGSHに還元する酵素で、glutathione synthetaseと共に細胞内GSHレベルを維持するのに重要な酵素と考えられており、この酵素の活性の低下は、細胞や組織の酸化ストレスに対する抵抗性を減弱させ、未熟児においては気管支肺異形成症(BPD)などの酸素性組織障害の合併と無関係ではないと推測される。本研究ではGR活性低下と組織障害の関係を検証するためアンチセンスRNA発現ベクターによる遺伝子の発現抑制効果を利用してGRの発現が抑制された細胞株を樹立し、GR活性低下を評価するため以下の実験を行ない結果を分析した。

1. ヒトGRcDNAのクローニング 1990年に発表されたヒトGRcDNAの遺伝子配列をもとにRT-PCR(reverse transcription PCR)法により約1.4kbのcDNAを増幅し、発現ベクターpRc/CMVに組み込んだ。これを大腸菌株JM109にトランスフェクション後、クローンを単離し、CHO (Chinese hamster ovary) K-1細胞に導入しGRの一過性の過剰発現をもたらしたクローンについて塩基配列を解析した。その結果、塩基置換のないクローンpRc/CMVHGR135を得た。

2. アンチセンスGR発現ベクター導入によるCHO安定細胞株の樹立 pRc/CMVHGR135のインサート(HGR135)を発現ベクターMEP4(ハイグロマイシン耐性)に組み込んで得られたアンチセンスクローンMEPRGH135(metallothionein IIaプロモーターに対して逆方向に接続)をCHO細胞にpolybreneを用いて濃度比1/10のpRc/CMVNeo(ネオマイシン耐性)と同時にトランスフェクションし、G418(ネオマイシンアナログ)により選択を行った。得られた11の細胞

株のうちG17でGR活性は正常CHO細胞コントロールの48%に低下していた。ゲノムDNAサザンブロットについて、MEPRGH135のプロモーター/cDNA部分をプローブとして行ったハイブリダイゼーションで、この外来DNA相応の2.4kbのXbaI/XhoI断片、EcoRI断片(6.3kb, 0.78kb)及びPstI断片(0.85kb, 0.8kb)を検出した。また11.7kbのHindIII断片は検出されず、このベクターがゲノムに挿入されていることを示唆した。ノーザンハイブリダイゼーションではGRメッセージは減弱を認めたが、アンチセンスGRメッセージは検出しなかった。その他GR活性の低下を認めた4つの細胞株でサザン法、PCR法、もしくはハイグロマイシン耐性能によりこのベクター由来のDNAの存在を確認した。

3. GR活性低下細胞に対する酸化ストレステスト

1) t-butyl hydroperoxide (t-BuOOH) 投与の影響 G17とコントロールのCHO細胞を、プレートに播種し、0、1、5、10mMの最終濃度となるようt-BuOOHを添加した培養液で4時間インキュベートしその影響を調べた。10mMおよび5mMのt-BuOOH負荷でG17ではコントロールに比べLDH逸脱比(%)の有意な増大(10mM: 57.3 ± 4.7 vs 32.1 ± 1.9 %, $P < 0.05$, 5mM: 3.7 ± 1.1 vs 0.8 ± 0.6 %, $P < 0.05$)を認めた。細胞内GSH濃度はt-BuOOH無負荷状態においてG17で有意に減少(25.7 ± 2.5 vs 36.1 ± 1.9 nmol/mg protein, $P < 0.05$)しており、1-10mMの範囲で負荷量の増大に従ってG17では漸減した。コントロール細胞では10mM負荷で減少を認めたが、G17に比較すると高値であった。細胞内GSSG濃度はコントロール細胞でt-BuOOH負荷量の増大に伴い増加した。一方G17では、0-1mMのt-BuOOH負荷ではコントロールに比し有意に高値であるが(0mM: 0.61 ± 0.19 vs 0.36 ± 0.09 , 1mM: 1.77 ± 0.17 vs 1.15 ± 0.23 nmol/mg protein, $P < 0.05$)、5mM、10mMとt-BuOOHの負荷増に伴うGSSG濃度の上昇はみられず、コントロールのそれに比較して低値となった。

2) 高濃度酸素投与の影響 G17およびコントロールCHO細胞を通常濃度酸素投与条件下で72時間培養した結果、培養液中LDH濃度に有意差は認められなかったが、95%酸素投与条件下では有意にLDHの逸脱の増大を認め、G17のそれはコントロール細胞のそれを有意に上まわった。

以上の結果のうち、LDH逸脱比の増大はG17がこれらのオキシラディカルの刺激に対してより脆弱であることを意味する。これらの実験の経過を通してG17のGR活性は概してコントロールの50%以下であり、t-BuOOH暴露時測定したGPX活性は、高濃度(10mM)暴露時においてやや上昇したものの、それ以外の濃度では差はなかったので、t-BuOOHまたは酸素の摂取が、両者に差がなく、NADPHの供給が同様であったとするならば、GRの活性低下がG17の脆弱性の原因であるとする事ができる。また、オキシラディカルによるストレスのない状

態で、G17がコントロールに比べ、GSHの低下およびGSSGの増大をみせたことは、通常の培養条件下で細胞が自ら産成するオキシラディカルの処理の過程でG17ではGR活性低下によりGSSGからGSHへの還元が滞った結果と考えられる。この実験でG17についてみられた現象、すなわち、コントロールと異なり5mM以上のt-BuOOH負荷時に1mMのt-BuOOHに暴露した時以上のGSSGレベルの上昇をみないことは、G17のGSH基礎値がコントロール細胞より低いことにより説明がつくように思われる。培養液中に放出されるGSSGの量（部分的に細胞のGSSGポンプの機能を表す）は、2つの細胞群で差異はないので、他のGSSG代謝経路（タンパクの酸化などによる）の働きに差がなければ、GPXの基質となるGSH初期レベルが低ければ、相応にGSSG産生が減少し、同濃度のt-BuOOH暴露時においてはコントロール細胞でのGSSG生成はG17に比べ増大する。1mMのt-BuOOH負荷では、GSSGの産生が比較的少ないためGR活性の差により、コントロールではより多くのGSSG分子がGSHに還元され、結果的にG17に比較してGSSGの低値およびGSHの高値を現出すると考えられる。しかし、t-BuOOHを負荷した際の時間的推移をみた実験によると、G17では高濃度t-BuOOH負荷時によりすみやかにGSHがより低いレベルでの平衡状態に達する傾向があり、GSH濃度が低いためにt-BuOOHの濃度が高くても、G17における4時間後のGSSGの増加をもたらさない結果となったと考えられる。以上より、GSHの濃度の低下はt-BuOOHの中和能に影響し、GSSGレベルの上昇ではなく、GSHのレベルの低下がLDHの逸脱比増に相関していることから、これがオキシラディカルによるストレスが細胞・組織障害を引き起こす際の重要なパラメーターであることが示された。以上より、GR活性の減少は、CHO細胞においてはGSHレベルの低下を介して、オキシラディカルに対する細胞の抵抗性を減弱させていると結論でき、アンチセンス発現ベクターを用いたGR発現抑制系はGRの生理作用ならびに活性低下の影響を解析するのに有用であると思われた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 葛 巻 暹
副 査 教 授 細 川 真澄男

学位論文題名

Establishment of Chinese hamster ovary cell lines with reduced expression of glutathione reductase after antisense-oriented gene transfection and assesment of the sensitivity to oxydant injury.

(Glutathione Reductase 遺伝子のアンチセンス発現ベクターを用いた発現細胞株の樹立と酸化的ストレスに対する感受性の評価)

Glutathione reductase (GR) はGSSG(酸化型グルタチオン) をGSH (還元型グルタチオン) に還元する酵素で、細胞内GSHレベルを維持し、酸化的ストレスに対する防御機構の1つとなっている。本研究ではGR活性低下と組織障害の関係を検証するため、アンチセンスGR発現ベクター導入によりGRの発現が抑制された細胞株を樹立しGR活性低下を評価する事を目的とし、以下の実験を行い結果を分析した。[ヒトGRcDNAのクローニング] 既知のヒトGRcDNAの塩基配列をもとに作成したプライマーを用いてRT-PCR(reverse trascription PCR)法により約1.4kbのcDNAを増幅し、発現ベクターに組み込み、大腸菌株にトランスフェクション後、クローンを単離し、CHO(Chinese hamster ovary)細胞に導入しGRの一過性の過剰発現をもたらしたクローンについて塩基配列を解析した。その結果、塩基置換のないクローンpRc/CMVHGR135を得た。[アンチセンスGR発現ベクター導入によるCHO安定細胞株の樹立] pRc/CMVHGR135のインサート(HGR135)を発現ベクターMEP4に組み込んで得られたアンチセンスクローンMEPRGH135をCHO細胞にpolybreneを用いてモル濃度比1/10のpRc/CMVNeoと同時にトランスフェクションし、ネオマイシンアナログG418により選択を行った。得られた11の細胞株のうちG17でGR活性は正常CHO細胞コントロールの48%と低下していた。G17のゲノムDNAサザンロットについて、MEPRGH135のプロモーター/cDNA部分をプローブとして行ったハイブリダイゼーションの結果はこのベクターがゲノムに挿入されていることを示唆した。ノーザンハイブリダイゼーションの結果、GRメッセージは減弱していたが、アンチセンスGRメッセージは検出しなかった。[GR活性低下細胞に対する酸化的

ストレステスト] 1) t-butyl hydroperoxide (t-BuOOH) 投与の影響 G17とコントロールのCHO細胞に対して、0, 1, 5, 10mMの t-BuOOHに4時間暴露しその影響を調べた。10mMおよび5mMのt-BuOOH負荷でG17ではコントロールに比べ細胞障害の指標となるLDH逸脱比の有意な増大を認めた。細胞内GSH濃度はt-BuOOH無負荷状態においてG17で有意に減少しており、1-10mMの範囲で負荷量の増大に従ってG17では漸減した。コントロール細胞では10mM負荷で減少を認めたが、G17のそれに比較すると高値であった。細胞内GSSG濃度はコントロール細胞でt-BuOOH負荷量の増大に伴い増加した。一方G17では、0-1mMのt-BuOOH負荷ではコントロールに比し有意に高値であるが5-10mMとt-BuOOHの負荷増に伴うGSSG濃度の上昇はみられず、コントロールのそれに比較して低値となった。2) 高濃度酸素投与の影響 G17およびコントロールCHO細胞で95%酸素投与条件下で72時間培養した結果、コントロール条件時に比し有意にLDH逸脱比の増大を認め、G17のそれはコントロール細胞のそれを有意に上まわった。[結論] 以上の結果はG17がこれらのオキシラディカルの刺激に対してより脆弱であることを意味する。また、t-BuOOH 0mM負荷で、G17がコントロールに比し、GSHの低下およびGSSGの増大をみせたことは、通常の培養条件下でG17ではGR活性低下によりGSSGからGSHへの還元が滞った結果と考えられる。GSHの濃度の低下はt-BuOOHの中和能に影響し、GSSGレベルの上昇ではなく、GSHのレベルの低下がLDHの逸脱比増に相関していることから、これがオキシラディカルによるストレスが細胞・組織障害を引き起こす際の重要なパラメーターであることが示された。また、本研究で行ったアンチセンス鎖導入によってGRの活性低下細胞株を作成しそのオキシダントストレスにたいする抵抗性を解析する手法は、従来のBCNU (1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea)などを用いてGRの活性低下の影響を分析する方法に比較して、薬剤そのものの細胞毒性がない点で優れていると言える。

本研究は、アンチセンスRNAによる遺伝子発現の抑制効果を利用することで、BCNUなどの薬剤を用いた実験系の欠点を克服したGR活性低下細胞の実験系をCHO細胞において作成し、これを用いて、オキシダントストレスに対するGR活性低下の影響を分析したものである。この結果、CHO細胞においては、GR活性の約50%の低下により、GSHの有意な低下及びGSSGの有意な増大を認め、さらにある程度のオキシダントの負荷により細胞が傷害されやすくなることが示された。細胞における活性酸素の処理に関わる問題は、未熟児の酸素治療に伴う各種の障害の原因・治療に関わるばかりでなく、癌化の機構、癌の治療、老化等の諸問題とも関わっており、その処理機構の1つであるglutathione redox cycleを維持する酵素であるGRについて従来より優れた分析系を作成し、その活性低下の影響について新しい知見を加えたことは、意義のあることと言える。本研究は、ヒトGRcDNAのクローニングに始まり、アンチセンスベクターの作成、GR活性低下安定CHO細胞株の選択およびその遺伝型の解析をふまえて上記の問題を議論したもので、論文内容はオリジナリティがありかつ一般的で普遍的な評価に耐えるもので、博士(医学)に値すると判定いたしました。