

氏 名	おおはし ともこ 大 橋 智 子
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 乙 第 1 6 4 号
学位授与の日付	平成 20 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 4 項該当
学 位 論 文 題 目	環境ストレスに対する細胞の応答制御機構と評価に関する研究
審 査 委 員	(主査)教授 竹谷 茂 教授 山口政光 教授 村上 章

論文内容の要旨

本研究では、ストレスと Heme oxygenase (HO-1)の誘導の関係、ならびに Reactive Oxygen Species (ROS) の検出試薬として広く使われている 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) の HO-1 の発現への影響について検討した。また、これまで得られた知見を基に、環境汚染物質の検出方法の開発への応用を試みた。HO-1 を含むストレス誘導蛋白質として多くの研究がなされている蛋白質の遺伝子プロモーターを用いて、環境汚染物質によるストレス応答遺伝子群の発現活性を視覚的に観察して、汚染物質を検出する方法の開発について検討した。

第 1 章. DCFH は ROS と反応して酸化されて、蛍光物質に変換されることが知られている。ヘムおよびヘム蛋白質と細胞内の酸化ストレス測定試薬である DCFH との反応について調べた。HO-1 遺伝子の転写制御を調べる中で、ROS の生成と Hemin による HO-1 誘導との関連性を見出し、さらにヘミン処理細胞における DCFH の酸化を発見した。高濃度の SOD および catalase 処理により DCFH の酸化は低下したのに対し、ヘミン処理細胞における HO-1 の誘導は変化なかった。ヘモグロビン合成細胞である erythroleukemia K562 細胞をヘムの前駆体 α -アミノレブリン酸で処理すると、DCFH の酸化は細胞内のヘム合成量の増加量に伴って増加した。さらに蛍光物質 DCFH-DA は直接ヘム、ヘモグロビン、ミオグロビンおよびチトクロム c を酸化させることが分かった。これらの結果から、DCFH の酸化は ROS の生成に関係するよりも細胞内のヘム量により強く関係する可能性が示唆された。

第 2 章. DCFH を未処理の培養細胞に添加すると、不均一に酸化されることが分かったので、細胞非誘導条件下における DCFH の不均一な酸化と HO-1 の発現の関係について調べた。非誘導条件下のマウス繊維芽細胞 Balb3T3、マウス胚肝臓細胞 BNL-CL2 およびチャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO 細胞において HO-1 高発現の細胞の存在を明らかにした。Stress-activated protein kinase および Cyclooxygenase-2 (Cox-2) が HO-1 の発現パターンと一致した。プロスタグランジンの前駆体であるアラキドン酸による処理を行うことによって、HO-1 を高発現している細胞においてのみさらなる HO-1 の発現の増加が確認された。HO-1 の発現は indomethacin や dexamethasone など Cox 阻害剤によって抑制された。しかし、Cox-2 を経た産物である PGE₂、PGF_{2α}、PGH₂ および PGD₂ は HO-1 の発現を誘導しなかった。以上の結果から、未処理の細胞においてプロスタグランジンの生合成が行われる際の中間生成物が内在性のストレスとして働き、その結果 HO-1 が発現する

のではないかと推測された。

第 3 章. ストレス誘導蛋白質遺伝子群の数種類を用いて遺伝子プロモーター活性を可視化することによる環境汚染物質の検出システムへの応用を検討した。H0-1、ARE、c-fos と MT A 遺伝子のエンハンサーやプロモーター部位と GFP を融合したレポータープラスミドを用いて重金属や有機化合物に対する細胞のストレス応答を統合的に観察した。c-fos プロモーター、H0-1 エンハンサーおよび ARE と GFP を融合したプラスミドを導入した COS7 細胞では、低濃度の NaAsO₂ を処理することで蛍光細胞を検出できた。また、農薬であるパラコートに対しては ARE および H0-1 エンハンサーを導入した細胞の蛍光が増加した。MT2A 遺伝子プロモーター (-764/+76) を導入したプラスミドは、CdCl₂、ZnSO₄ および CuCl₂ 処理により高い GFP の発現が観察された。Metal-responsive elements(MRE)が 7 回繰り返された領域(-595/+76)のみを導入すると、CdCl₂、ZnSO₄ および CuCl₂ に対する蛍光強度が増加した。以上の結果から、ストレス応答遺伝子プロモーターおよびエンハンサーと GFP の融合プラスミドを利用することで、汚染物質応答細胞の可視化につながり、これらのプロモーターを用いる事で、環境汚染物質のバイオモニタリングの可視化に応用できることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は環境ストレス物質を評価するためにストレス誘導蛋白質群の遺伝子発現応答の評価およびこれに関連した結果をまとめたものである。

2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) は細胞で発生するストレス物質 Reactive Oxygen Species (ROS) と反応して酸化されて、蛍光物質に変換されることが知られている。本研究ではストレス誘導蛋白質であるヘム分解酵素 (H0-1) 遺伝子の転写制御を調べる中で、DCFH 検出の ROS の生成とヘムによる H0-1 誘導との違いを見い出して、ヘムおよびヘム蛋白質と細胞内の酸化ストレス測定試薬である DCFH との反応について調べた。ヘモグロビン合成細胞である K562 細胞をヘムの前駆体 - アミノレブリン酸で処理すると、DCFH の酸化は細胞内のヘム合成量の増加量に伴って増加した。さらに蛍光物質 DCFH-DA は直接ヘム、ヘモグロビン、ミオグロビンおよびチトクロム c を酸化させることが分かった。これらの結果は、DCFH の酸化は ROS の生成よりもヘムに依存することを初めて証明した。

DCFH の培養細胞との不均一反応性について詳細に検討して、細胞非誘導条件下における DCFH の不均一な酸化と H0-1 の発現の関係について調べた。非誘導条件下のマウス繊維芽細胞 Balb/3T3 を始めとする 3 種類の細胞において H0-1 高発現の細胞の存在を明らかにした。種々の情報伝達系酵素群の活性化を調べた所 Stress-activated protein kinase および Cyclooxygenase-2 (Cox-2) が H0-1 の発現パターンと一致した。プロスタグランジンの前駆体であるアラキドン酸による処理を行うことによって、H0-1 を高発現している細胞においてのみ、さらなる H0-1 の発現の増加が確認された。H0-1 の発現は indomethacin や dexamethasone などの Cox 阻害剤によって抑制された。しかし、Cox-2 を経た産物である PGE₂、PGF_{2α}、PGH₂ および PGD₂ は H0-1 の発現を誘導しなかった。以上の結果から、未処理の細胞においてプロスタグランジンの生合成が行われる際の間生成物が内在性のストレスとして働き、その結果 H0-1 の高発現は内在的な細胞ストレスの発生に一因があることを明らかにした。

ストレス蛋白質遺伝子群の数種類を用いて遺伝子プロモーター活性を可視化することによる環境汚染物質の検出システムの開発応用を試みている。H0-1、ARE、c-fos と MT A の4種類の遺伝子のエンハンサーやプロモーター部位と GFP を融合したレポータープラスミドを用いて重金属や有機化合物に対する細胞のストレス応答を統合的に検討した。c-fos プロモーター、H0-1 エンハンサーおよび ARE 活性部位導入プラスミドの COS7 細胞導入では、低濃度の亜ヒ酸を処理することで蛍光細胞を検出した。また、農薬であるパラコートに対しては ARE および H0-1 エンハンサーを導入した細胞の蛍光が増加した。MT2A 遺伝子プロモーターを導入したプラスミドは、カドミウム、亜鉛および銅イオン処理により高い GFP の発現が観察された。Metal-responsive elements (MRE) が 7 回繰り返された領域のみを導入してもカドミウム、亜鉛および銅イオンに対する蛍光強度が増加した。これらの結果は、ストレス応答遺伝子プロモーターおよびエンハンサーと GFP の融合プラスミドを利用することで、汚染物質応答細胞の可視化を可能にして、これらのプロモーターをもちいる事で、環境汚染物質のバイオモニタリングの可視化に応用できることを明確に示した。

これらの研究の成果は、下記の国際科学雑誌 5 編および査読審査制度を有する学術論文誌 1 編に掲載されている。

「公表論文」

1. T. Ohashi, T. Sato, M. Kuwata, T. Fujimura, T., and S. Taketani. Visualization and Evaluation of the Promoter Activities of Genes for Stress-inducible Proteins in Response to Environmental Pollutants. Yakugaku Zasshi. (2007) 127(4): 757-764.
2. Y. Andoh, A. Mizutani, T. Ohashi, S. Kojo, T. Ishii, Y. Adachi, S. Ikehara and S. Taketani. An Antioxidant Role of a Reagent, 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Detecting Reactive-oxygen Species, Blocking the Induction of Heme Oxygenase-1 and Protecting Cytotoxicity J. Biochem. (2006) 40(4): 483-489.
3. Y. Andoh, H. Suzuki, M. Araki, A. Mizutani, T. Ohashi, T. Okumura, Y. Adachi, S. Ikehara and S. Taketani. Low- and High-levels Expressions of Heme Oxygenase-1 in Cultured Cells under Uninduced Conditions. (2004) Biochem. Biophys. Res. Commun. 320, 722-729.
4. T. Ohashi, K. Kakimoto, Y. Sokawa and S. Taketani. Semi-quantitative Estimation of Heme/hemoprotein with Dichlorofluorescein Diacetate (2002) Anal. Biochem. 308, 392-395.
5. L. Warnich, M. Kimberg, M. J. Kotze, T. Ohashi, S. Taketani and B. J. Louw. Haplotype Analysis Excludes the Functional Protoporphyrinogen Oxidase Promoter Polymorphism -1081G>A as a Modifying Factor in the Clinical Expression of Variegate Porphyria. (2002) Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand).48(1), 57-60.
6. T. Ohashi, A. Mizutani, A. Murakami, S. Kojo, T. Ishii & S. Taketani. Rapid Oxidation of Dichlorodihydrofluorescein with Heme and Hemoproteins: Formation of the Fluorescein is Independent of the Generation of Reactive Oxygen Species. (2002) FEBS Lett. 511, 21-27.