

神田宗武 論文内容の要旨  
主論文

Glutaredoxin modulates platelet-derived growth factor-dependent cell signaling by regulating the redox status of low molecular weight protein-tyrosine phosphatase.  
(グルタレドキシンは低分子量蛋白質チロシン脱リン酸化酵素のレドックス状態を調節することにより血小板由来増殖因子による細胞増殖を制御する)

神田宗武、井原義人、村田寛明、浦田芳重、河野貴明、淀井淳司、瀬戸信二、矢野捷介、近藤宇史.

The Journal of Biological Chemistry. 281(39):28518-28528. 2006

長崎大学大学院医学研究科内科系専攻

指導教授；矢野捷介教授

## 緒言

タンパク質の遊離SH基のレドックス（酸化還元）状態は細胞機能を制御するうえで重要であることが知られている。これらの遊離SH基を還元状態に保つために主に2つの機構が知られているが、その一つにGlutathione (GSH)/glutaredoxin (GRX) systemがある。血小板由来増殖因子(Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB)は心筋の発生に重要である事が知られているが、その制御に、GRXによるレドックス機構がいかに関わるかは明らかにされていない。本研究ではGRXを過剰発現させた心筋系培養細胞を用いて、PDGF-BBによる増殖制御に対するGRXの影響について、low molecular weight protein-tyrosine phosphatase (LMW-PTP)を介した新たな分子機構を明らかにした。

## 対象と方法

GRX を定常的に過剰発現するラット心筋芽細胞由来 H9c2 細胞株 (H9c2-GRX)及びコントロール細胞 (Control) を作成し、0.5nM PDGF-BB を投与し細胞増殖を比較した。PDGF シグナルは、PDGF-BB 投与後の PDGF Receptor (PDGFR)  $\beta$  のリン酸化について Western Blot 法により解析した。また、LMW-PTP 及び GRX の RNA double-stranded small interfering RNAs (siRNA) を作製し、LMW-PTP の阻害薬である PTP inhibitor (PTPI-III)や GRX の阻害薬である Cadmium などの PDGF シグナルへの影響を調べた。LMW-PTP の活性は免疫沈降サンプルを用い *p*-nitrophenyl phosphate を基質として測定した。抗酸化剤として Trolox や *N*-acetyl cystein (NAC)の効果も検討した。*In vitro*において、精製した LMW-PTP に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を投与し、遊離 SH 基をブロック

する 4-acetoamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid でラベルした後、還元及び非還元状態の LMW-PTP の構造的変化を Western Blot 法により評価した。同時に LMW-PTP の活性を測定した。さらに、GSH/GRX system の LMW-PTP の酸化還元状態制御への関与について解析した。

## 結果

PDGF-BB 添加後 3 日目において、Control に比して H9c2-GRX の増殖は約 25% 抑制されていた。同様に PDGFR  $\beta$  のリン酸化は Control に比して H9c2-GRX は抑制されていた。LMW-PTP 及び GRX の発現を siRNA により抑制すると PDGF-BB 投与後の PDGFR  $\beta$  のリン酸化は増強された。また、PTPI-III により LMW-PTP の活性は抑制され、PDGFR  $\beta$  のリン酸化が亢進した。Control と比して H9c2-GRX は PDGF-BB 投与後 LMW-PTP の活性は抑制されていたが、Cadmium で処理するといずれも LMW-PTP の活性は抑制され、PDGFR  $\beta$  のリン酸化は亢進した。以上から、PDGFR  $\beta$  のリン酸化抑制には LMW-PTP が関与し、その LMW-PTP の活性亢進に GRX が関与することが示唆された。PDGF-BB 投与後、細胞内の Peroxide は増加したが、Trolox 及び NAC を添加すると PDGF-BB 投与後の PDGFR  $\beta$  のリン酸化は抑制され、LMW-PTP の活性は亢進された。次に *In vitro* で LMW-PTP に  $H_2O_2$  を投与すると、濃度依存性に LMW-PTP の活性が低下し、同時に LMW-PTP のオリゴマーが形成された。一方、 $H_2O_2$  による LMW-PTP の活性の低下は GSH 再合成系により抑制されたが、GRX の追加投与によりさらに抑制され、同様に LMW-PTP のオリゴマーの形成も阻害された。

## 考察

GRX が LMW-PTP のレドックス状態を制御することによりその活性状態を維持し、PDGFR  $\beta$  のリン酸化を抑制し、PDGF 依存性の細胞増殖を制御することが示唆された。また、作用機構として GSH/GRX system が  $H_2O_2$  により誘導される不活化や構造変化から LMW-PTP を保護することが考えられた。

現在、LMW-PTP 以外の PTP がリン酸化された PDGFR の脱リン酸化を酸化還元により制御する事が知られている。本実験系においても、PDGF シグナル制御についてさらに明らかにするうえで、他の PTP の GRX による制御についても検討する事が重要である。