氏名（本籍）	後藤まき
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博第７０７号
学位授与年月日	平成２７年３月２５日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当
研究科・専攻	東北大学大学院歯学研究科（博士課程）歯科学専攻
学位論文題目	Adh3とKeap1-Nrf2システムの機能的相互作用による酸化ストレス防御機構
論文審査委員	（主査）教授　若森　実 教授　本橋　ほづみ　　教授　山本照子

論文内容要旨

Adh3（アルコール脱水素酵素タイプ３）は大腸菌からヒトに至るまで，最も高度に保存されているアルコール脱水素酵素である。Adh3はホルムアルデヒドと一酸化窒素をグルタチオン依存的に解毒することが知られている。Adh3がホルムアルデヒドと一酸化窒素を解毒した結果，グルタチオン（還元型グルタチオンと酸化型グルタチオン）を再生することから，Adh3がグルタチオンの細胞内濃度維持に貢献することで生体防御の一端を担う，ということが予想されるが，詳細は明らかではない。そこで本研究では，Adh3の生体防御における貢献をグルタチオン代謝の側面から明らかにすることを目的とした。まず，不死化したMEF（マウス胎児線維芽細胞）を使って細胞内総グルタチオン（還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオン）を測定した。すると，野生型MEFと*Adh3*欠損MEFでグルタチオン合成に関連する遺伝子の発現に差はみられないにも関わらず，*Adh3*欠損MEFは野生型MEFに比べて細胞内総グルタチオン濃度が低値であった。細胞内総グルタチオンの半減期を求めたところ，野生型MEFに比べて*Adh3*欠損MEFの細胞内総グルタチオンの半減期は短縮していた。これらの結果から，Adh3は細胞内グルタチオンの維持に貢献していることがわかった。そこで，酸化ストレスを負荷したところ，*Adh3*欠損MEFは野生型MEFに比べて酸化ストレスに脆弱であるということがわかった。次に，*Adh3*欠損MEFでみられた酸化ストレスへの抵抗性の低下が，マウス個体でも観察されるかどうかを検証するために，酸化ストレスの蓄積とグルタチオンの減少による肝障害をもたらすとされるメチオニン・コリン欠乏（MCD）食を５日間，野生型マウスと*Adh3*欠損マウスに投与した。すると，野生型マウスでは肝障害が認められなかったのに対し，MCD食を投与した*Adh3*欠損マウスで肝障害の発症が認められ，MCD食を投与した*Adh3*欠損マウスでは，Nrf２の標的遺伝子の発現上昇が認められた。Nrf2は生体防御に関連する遺伝子の発現を誘導する強力な転写活性化因子である。その中でも，生体防御因子であるグルタチオンの合成や還元に関連する遺伝子

の発現を制御することは，Nrf2が担う生体防御システムの中でも重要な位置を占めている。MCD 食を投与した*Adh3* 欠損マウスで，Nrf2の標的遺伝子の発現が上昇していたことから，MCD 食を投与した *Adh3* 欠損マウスで Nrf2が保護的に作用しているのではないかと予想し，*Adh3 : : Nrf2* 二重欠損マウスを作成し同様に MCD 食を 5 日間投与した。すると，MCD 食を投与した *Nrf2* 欠損マウスでは肝障害が認められなかったのに対し，MCD 食を投与した *Adh3 : : Nrf2* 二重欠損マウスでは *Adh3* 欠損マウスと比べて，重篤な肝障害が認められた。さらに，$Adh3^{-/-} : : Keap1^{F/-}$マウスを作成し，*Adh3* 欠損状態で Nrf2を安定化させ，MCD 食を 5 日間投与したところ MCD 食を投与した *Adh3* 欠損マウスで認められた肝障害が緩和した。以上の結果から，Adh3は Nrf2と協調的に酸化ストレスに対する生体防御に貢献することがわかった。Nrf2はグルタチオンの産生と還元を促進し，Adh3がそのリサイクルを通して効率的な使用を可能にしているものと考えられる。

審 査 結 果 要 旨

アルコール脱水素酵素である Adh3（アルコール脱水素酵素タイプ 3）は大腸菌からヒトに至るまで，高度に保存されており，ホルムアルデヒドと一酸化窒素をグルタチオン依存的に解毒する。一方，この解毒過程でグルタチオン（還元型グルタチオンと酸化型グルタチオン）が再生されることから，Adh3がグルタチオンの細胞内濃度維持に貢献することで生体防御の一端を担うことが予想されていた。しかし，詳細は明らかでなかった。本研究では，不死化した MEF（マウス胎児線維芽細胞）を使って細胞内総グルタチオン（還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオン）を測定した。野生型 MEF と *Adh3* 欠損 MEF でグルタチオン合成に関連する遺伝子の発現に差はないにも関わらず，*Adh3* 欠損 MEF は野生型 MEF に比べて細胞内総グルタチオン濃度が低かった。細胞内総グルタチオンの半減期は，野生型 MEF に比べて *Adh3* 欠損 MEF で短縮していた。これらの結果から，Adh3が細胞内グルタチオンの維持に貢献していることを明らかにした。また，*Adh3* 欠損 MEF は野生型 MEF に比べて酸化ストレスに脆弱であることも示した。次に，この様な *in vitro* の実験に引き続き *in vivo* の実験も行っている。マウスに酸化ストレスの蓄積とグルタチオンの減少による肝障害をもたらすメチオニン・コリン欠乏（MCD）食を 5 日間，野生型マウスと *Adh3* 欠損マウスに投与した。野生型マウスでは肝障害が認められなかったが，*Adh3* 欠損マウスで肝障害が認められ，Nrf2の標的遺伝子の発現上昇が認められた。更に，*Adh3 : : Nrf2* 二重欠損マウスを作成し同様に MCD 食を 5 日間投与すると，*Nrf2* 欠損マウスでは肝障害が認められなかったのに対し，*Adh3 : : Nrf2* 二重欠損マウスでは *Adh3* 欠損マウスより重篤な肝障害が認められた。次に，$Adh3^{-/-} : : Keap1^{F/-}$マウスを作成し，*Adh3* 欠損状態で Nrf2を安定化させ，MCD 食を 5 日間投与すると *Adh3* 欠損マウスで認められた肝障害が緩和した。以上の結果から，Adh3はホルムアルデヒドと一酸化窒素をグルタチオン依存的に解毒するとともに，Adh3がグルタチオンを再生することで生体防御に寄与すること，Adh3が働かない条件でも，Nrf2が酸化ストレスから肝細胞を保護することを明らかにした。つまり，Adh 3 は Nrf 2 と協調的に酸化ストレスに対する生体防御に貢献することを明らかにした。

Adh3は口腔内における酸化ストレス関連疾患の予防及び診断における有用な標的分子になる可能性があり，本論文は細胞生物学並びに臨床歯学に有用な知見を提供している。従って，本論文は博士（歯学）の学位論文として相応しいと判断する。