The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト骨髄性白血病HL－60細胞の活性酸素に対する適応
Author(s)	春日井, 勲
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36396
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【6】

氏名・(本籍)	春日井　勲（かすがい　いさお）
学位の種類	理学博士
学位記番号	第　8549　号
学位授与の日付	平成元年3月24日
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**ヒト骨髄性白血病HL－60細胞の活性酸素に対する適応**
論文審査委員	(主査) 教授　畠中　寛 (副査) 教授　堀尾　武一　教授　浅野　朗　助教授　山田　道之

論文内容の要旨

すべての好気性細胞は酸素代謝により生じた活性中間体，スーパーオキサイド（O_2－），過酸化水素（H_2O_2），ヒドロキシラジカル（・OH），から自己を防御する機構を保持している。化学療法剤投与，放射線照射により過剰の酸素ラジカルが生成されると，防御機構のバランスを失い，細胞は死滅する。ヒト骨髄性白血病HL－60細胞に酸素ストレスとして過剰の過酸化水素を与え，細胞がこのようなストレスに適応しうるかどうかを検討した。

HL－60細胞を過酸化水素で処理し増殖に対する効果を見た結果，5－200μMの過酸化水素がsublethal level であることが判明した。HL－60細胞を50μM及び100μMの過酸化水素で繰り返し処理したところ，数カ月後に，細胞は過酸化水素に適応し，安定に増殖するようになった。両培養から単離したクローン，HP50－2，HP100－1は親株細胞の40倍および340倍の過酸化水素耐性を示した。また，これらの細胞は液体培養において凝集しながら増殖し，細胞膜の性質の変化を示唆した。

次に，HP50－2及びHP100－1細胞がどのようにして過剰な過酸化水素に対処しているのかを明らかにするため，SDS－PAGE，銀染色により，steady stateの各細胞の蛋白質状態，〔^{35}S〕Metで標識した蛋白のSDS－PAGE，Fluorographyにより，蛋白質合成を調べたところ，56KDaの蛋白の含量，合成が耐性細胞，特にHP100－1において増加し，44KDaの蛋白が同細胞で減少していた。また，44KDaの蛋白のmediumへの分泌が耐性度が高まるにつれて増加していた。二次元電気泳動により，56KDa及び44KDaの蛋白の等電点は，およそ4.9及び5.3であることがわかった。一方，HL－60細胞は，過酸化水素を基質として利用する酵素myeloperoxidaseを特異

的に合成している。各細胞のmyeloperoxidase活性を測定したところ，両耐性細胞にはまったく活性が見られなかった。しかし，過酸化水素分解活性は，ＨＰ５０－２は対照細胞の３倍，ＨＰ１００－１は１８倍であった。さらに，glutathione peroxidase 活性を測定したところ，ＨＰ１００－１は対照細胞とほぼ同じ活性であったが，ＨＰ５０－２は対照細胞の1.6倍の活性を保持していた。ＨＬ－６０細胞は過酸化水素を基質として分解しうる３種類の酵素，myelopeoxidase，catalase，glutathione peroxidase を合成しており，電気泳動の結果から耐性細胞の著しい過酸化水素分解活性はcatalaseの作用によるのではないかと推定された。そこで，〔^{35}S〕Metで標識した細胞のextractのanti－catalase serumによる，immunoprecipitation を行ったところ，耐性度が増加するにつれて，５６ＫＤａのcatalase subunit の合成が著しく増加していた。さらに，耐性細胞の過酸化水素分解活性は抗体処理で完全に除去された。以上の結果から，ＨＰ５０－２及びＨＰ１００－１細胞の過酸化水素に対する耐性の機構が考察された。細胞の周囲に存在する過剰の過酸化水素は，細胞からたえず分泌され細胞を層状に包みこんでいる４４ＫＤａの蛋白のmethionine 残基と反応することによって，一部消費され，膜に対する過酸化水素の直接的効果が緩和される可能性がある。そして，膜を通過し，最終的に細胞内に侵入した過酸化水素は，ＨＰ５０－２細胞においては３倍に増加したcatalase と一部glutathione peroxidaseよって消去され，ＨＰ１００－１細胞においては１８倍にも増加したcatalase によって完全に消去される。

ＨＬ－６０細胞は発癌プロモーターＴＰＡによってmacrophage－like cell に分化誘導され，TPAの作用には一般に活性酸素が関与しているという報告がある。そこで，活性酸素耐性なＨＬ－６０細胞，ＨＰ５０－２及びＨＰ１００－１細胞のＴＰＡに対する分化の応答を見た。１０ng/mlのＴＰＡでＨＰ５０－２及びＨＰ１００－１細胞を４８時間培養したところ，ＨＬ－６０細胞と同様に，両細胞とも器壁への著しい接着性を示し，凝集体を形成し，分化した。また，heat－shock と酸素ストレスは類似した現象であり，heat－shockによって細胞が熱耐性を保持するようになる現象が報告されている。酸素ストレスに耐性なＨＰ５０－２及びＨＰ１００－１細胞の増殖に対する４４℃の熱処理の効果を見たところ，両細胞ともＨＬ－６０細胞に比べ著しい熱耐性を保持していた。

論文の審査結果の要旨

好気性細胞の通常の酸素代謝によって活性酸素スーパーオキサイド（$O_2^{\cdot -}$）や過酸化水素（H_2O_2）が生成される。また薬物投与や放射線照射によっても活性酸素が産生される。これらの活性酸素は反応性の強いヒドロキシラジカル（・OH）に変換され，リピッド，ＤＮＡを修飾し細胞に障害を引き起こす。活性酸素に対する防御機構やその調節機構は，動物細胞ではまだ十分に明らかにされていない。春日井勲君は白血病細胞ＨＬ－６０の過酸化水素耐性変異株を分離し，その耐性機構を研究することにより，これらの問題に取り組んだ。

ＨＬ－６０細胞を５０μＭ過酸化水素存在下で長期に培養し，変異株ＨＰ５０－２を分離した。同様に

１００μM過酸化水素処理で変異株ＨＰ１００－１を得た。ＨＰ５０－２とＨＰ１００－１の過酸化水素に対する耐性度は親細胞のそれに比べ，それぞれ４０倍，３４０倍である。その耐性機構を明らかにするため，まず，過酸化水素の代謝に関与する酵素の活性を調べた。これらの変異株細胞当りのカタラーゼ活性は親細胞に比べそれぞれ3倍，１８倍に増加していた。グルタチオンペルオキシダーゼはＨＰ５０－２で親細胞に比べ1.6倍に増加していた。ミエロペルオキシダーゼは親細胞には存在するが，いずれの耐性細胞にもまったく検出されず，過酸化水素耐性には関与していなかった。カタラーゼ活性は抗ヒトカタラーゼ血清で完全に抑えられ，過酸化水素分解活性がカタラーゼに基づくものであることが明らかになった。これらの耐性細胞の蛋白質を二次元電気泳動法により，親細胞のそれと比較検討した結果，カタラーゼに相当する５６ＫＤａ，ｐＩ 4.9の蛋白質が耐性度に応じて顕著に増加していた。このほかにも未同定の44ＫＤａ，ｐＩ 5.3，４３ＫＤａ，ｐＩ 5.2などの数個の蛋白質スポットの増加が認められた。特にカタラーゼの増加は，^{35}Ｓ－メチオニンでパルス標識した後免疫沈降させた実験により，カタラーゼの合成速度の増加に基づくことを明らかにした。

また過酸化水素耐性細胞は熱耐性も示した。変異株細胞は共に４４℃５分間の熱処理によっても成長速度に変化はないが，親細胞は成長が抑制される。このことは過酸化水素が酸化的ストレスとして細胞に作用し抗ストレス蛋白質を誘導し，これらが熱耐性を与えるものと推定される。ＨＬ－６０細胞の主要な生物的特徴はマクロファージに分化し得ることであるが，どの耐性細胞においてもこの性質は失われていなかった。すなわち耐性細胞ではごく限られた性質のみが変化増幅し，そのほかの大部分の性質は安定に維持されていると考えられる。

以上，春日井勲君はＨＬ－６０細胞の過酸化水素耐性にカタラーゼならびにグルタチオンペルオキシダーゼが関与していることを明らかにした。したがって，春日井勲君の研究業績は理学博士の学位論文として十分価値のあるものと認められる。