

Title	メタロチオネインの細胞周期依存局在性の変化とその機能に関する研究
Author(s)	鈴木, 信孝
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39721">https://hdl.handle.net/11094/39721</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名	鈴木 木 信 孝
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 12451 号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用薬学専攻
学位論文名	メタロチオネインの細胞周期依存局在性の変化とその機能に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 三村 務  (副査) 教授 真弓 忠範 教授 馬場 明道 教授 田中 慶一

#### 論文内容の要旨

メタロチオネイン (Metallothionein, MT) は、原核生物をはじめとして真核生物、哺乳類に至るまで広くその存在が確認されたことから、MTは生命活動に必須の機能を演じていることが推測されている。哺乳類由来のMTは、分子量約6500で61個のアミノ酸から構成され、そのうちの20個がシステインで占められ、芳香族アミノ酸やヒスチンを全く含有しないという極めて特徴的な構造を有している。我々は増殖活発な培養胃粘膜上皮細胞において、細胞質以外に核にもMTが存在する事を免疫染色により明らかにした。この事実は、MTがこれまで報告されてきた細胞質内タンパク質としてではなく核タンパク質として機能していることを推測させた。そこで本研究は、核内MTの機能を解明する事によりMTの生理的役割を明らかにすることを目的とした。

肝臓はMTレベルが高く、かつ再生肝では細胞増殖が活発に行われ、増殖開始を制御できる点で有用である。そこで、再生肝を用いてMTの細胞内局在性と細胞周期の関係を検討した。まずラット肝切除後の残存肝におけるMTの誘導合成は、肝切除3時間後には認められ、12時間後にはピークに達していた。よって、MTは肝再生に伴い誘導合成されることが明らかとなった。70%肝切除後のラット残存肝の肝細胞核1万個中のMTとDNAレベルをフローサイトメーターを用いて調べると、肝細胞は休止期において2n、4n体のDNAのポピュレーションが存在したが、肝切除後24時間以降では新たに8n体のポピュレーションが出現した。これはcell cycleが回転し細胞増殖が活発に起こっていることを示すものである。この時cell cycleの回転に伴い核内MTレベルが上昇し、肝切除後24時間目にピークに達した。また、この強いFITC蛍光強度を示した肝切除後24時間目の核を正常ウサギ血清を用いて染色したところ、FITC蛍光強度が明らかに低いことからMTに対する特異性が示された。肝切除後24時間目の再生肝細胞の核内DNAの4n、8n体には、FITC蛍光強度の強弱によりほぼ2つのポピュレーションが存在していた。更に、cell cycleのS期に相当するPI染色のピークの谷間に強いFITCの蛍光が観察されたが、無処置肝や再生肝細胞2n体のポピュレーションの蛍光強度は弱いものであった。以上の結果よりMTは増殖中の肝細胞のS期に核局在することが明らかとなった。

MTの核移行シグナルについて、各種シグナル伝達因子阻害剤を用いて初代培養肝細胞で検討した。チロシンキナーゼ阻害剤であるgenistein添加によりEGF、insulin刺激後のMTの核移行が完全に抑えられた。EGF、insulinによるMTの核移行が、チロシンキナーゼの活性化により引き起こされることが解明された。更に、シクロオキシゲナーゼ阻害剤のindomethacin、Cキナーゼ阻害剤のH7、Caチャンネル阻害剤のverapamil、蛋白合成阻害剤の

cycloheximideを用いてEGF, insulin 刺激後のDNA合成への影響及びMTの核局在化について調べた。genistein, H7, verapamilによって増殖因子刺激後のDNA合成及びMTの核局在化が顕著に抑制されたが, indomethacin 処理ではDNA合成は抑制されたがMTの核局在化は全く抑制されなかった。この結果より増殖因子刺激によるMTの核内移行は, Ca流入やCキナーゼの活性化により制御されている事が示唆された。そこで, Cキナーゼ活性化物質であるTPAとCaイオノフォアA23187を用いてMTの核内移行について検討した。TPA刺激によりMTの核局在が誘導され, さらにCaイオノフォアA23187の併用により相乗的に核内へ移行することが明らかとなった。肝細胞において増殖因子刺激によりそのレセプターのチロシンキナーゼ活性が上昇し, 引き続きホスホリパーゼCの活性化, Ca流入やCキナーゼの活性化が惹起されDNA合成が開始することが知られている。よって, 増殖因子刺激によるMTの核移行が, Ca依存性Cキナーゼを介したシグナルにより制御されていることが明らかとなった。

細胞周期のS期にある肝細胞の核内MTの局在性を抗MT抗体とPIで2重染色して調べた結果, MT染色像とPI染色像が一致していた。この事はMTがDNAと何らかの相互作用をして存在している可能性を示すものであった。MTの核局在化が認められるS期は他の周期に比べてフリーラジカルや放射線によるDNA障害を受けやすい事が知られている。そこで, 単離精製したラット肝細胞核をMTで前処理後洗浄し, NOフリーラジカルによるDNA切断が軽減されるかをNO産生物質を用いて検討した。その結果, 無処理の肝細胞核ではNO産生物質を添加することによりDNA断片化が観察されたが, MTで前処理した肝細胞核では, NOフリーラジカルによるDNA断片化が顕著に抑制された。この結果より, MTは核内においてフリーラジカルによるDNAの切断を防御する生理的機能を演じていることが示された。

以上本研究により, 1) MTは肝細胞増殖時に誘導合成され, 細胞周期のS期に核に局在化する細胞周期依存核移行蛋白質である。2) 肝細胞増殖因子刺激によるMTの核局在化は, 増殖因子レセプターが有する tyrosine kinase 活性やそれに引き続き活性化されるCa依存性 protein kinase Cにより制御されている。3) 核内においてMTは, ラジカルスカベンジャーとしてフリーラジカルによるDNAの切断を防御する生理的機能を発現している。ことが解明された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究はメタロチオネイン (MT) が単に重金属と結合して生体に対する重金属の毒性を緩和するという従来の知見に加えて, 新しい生理作用を解明する目的でMTの機能を検討したもので以下の知見を得ている。

- 1) MTは肝細胞増殖時に誘導合成され, 細胞周期のS期に核に局在化する細胞周期依存核移行蛋白質である。
- 2) 肝細胞増殖因子刺激によるMTの核局在化は, 増殖因子レセプターが有する tyrosine kinase 活性やそれに引き続き活性化されるCa依存性 protein kinase Cにより制御されている。
- 3) MTは核内においてラジカルスカベンジャーとしてラジカルによるDNAの切断を防御する生理的機能を発現している。

以上のように本論文は, MTの真の生理作用に迫る重要な新知見を得たもので, 博士論文として価値あるものと認める。