



Title	Identification and Characterization of Proteins Induced from Cultured Astrocytes Exposed to Hypoxia/Reoxygenation
Author(s)	堀, 修
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41072
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

氏 名	堀 修
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 0 0 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成10年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Identification and Characterization of Proteins Induced from Cultured Astrocytes Exposed to Hypoxia/Reoxygenation 低酸素再酸素化により培養アストロサイトから誘導される蛋白の同定と機能解析
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 堀 正二 (副査) 教 授 木下タロウ 教 授 遠山 正彌

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】虚血は中枢神経系細胞が加齢に伴い高頻度に遭遇する病的ストレスであり、虚血ストレスに対する細胞応答現象の究明は虚血性脳血管障害の基礎病態を解明し、新しい治療法を確立する上で必須の課題となっている。我々はこれまで、虚血ストレスに対する応答が、血管系細胞のみならず脳実質細胞、特に虚血にきわめて脆弱とされていた神経細胞においても認められることを報告してきた。一方、アストロサイトは中枢神経系で最も豊富な存在するグリア細胞であり、神経細胞の生存や機能維持に深く関わっているほか、脳におけるサイトカイン産生及びそのネットワーク形成にも積極的に参加している。そこで本研究ではアストロサイトにおける虚血ストレスへの応答を究明すべく、培養細胞に低酸素再酸素化ストレスを与える系を用いて、アストロサイトから誘導される蛋白の同定を試みた。さらに、それらのうちで最も多量に誘導された蛋白である小胞体ストレス蛋白Glucose Regulated Protein 78(GRP78)について、分子シャペロンとしての機能を神経保護作用を持つサイトカインInterleukin-6(IL-6)の分泌を例にして検討した。

【方法ならびに成績】Ⅰ細胞培養及び低酸素環境 アストロサイトは幼若ラット大脳皮質より McCarthy らの方法により分離培養した。0-48時間にわたり細胞を低酸素に暴露し、その後再酸素化した。

Ⅱ低酸素再酸素化条件での蛋白新生 3H-Leucineあるいは35S-Methionineにて細胞を3時間メタボリックラベルし、そのカウントにより蛋白新生量を測定し、また SDS-PAGE 後の autoradiography により個々の蛋白新生の変化を評価した。低酸素条件では細胞内蛋白新生量は徐々に減少したが再酸素化後急増した。個々の蛋白については、低酸素負荷により約150, 98, 78, 55, 33, 28kDaの蛋白が誘導または増強され、この変化は再酸素化少なくとも4時間まで認められた。また主に再酸素化後を中心に約72kDaの蛋白質が誘導された。MonoQ カラムにより分離精製しN-末端のアミノ酸配列を決定する事により、78kDaの蛋白は小胞体内のストレス蛋白Glucose Regulated Protein 78(GRP78)と同定され、150kDa 蛋白は新規の蛋白であった(その後のcDNAクローニングの結果、やはり小胞体内ストレス蛋白Oxygen Regulated Protein 150,ORP150 であることが明らかになっている)。他の蛋白も様々なストレス下での誘導パターン及びWestern Blottingの結果よりGRP94,Heat Shock Protein 72(HSP72),Hemeoxygenase-1(HO-1),HSP28である事が強く示唆された。

Ⅲ GRP78のIL-6分泌に与える影響 我々はすでに低酸素再酸素化後にアストロサイトより IL-6が分泌されること

を報告しているが、小胞体内にあり、低酸素により最も多量に誘導された蛋白 GRP78について、再酸素化後の IL-6 分泌との関係を検討した。低酸素再酸素化後のアストロサイト細胞抽出液をゲル濾過カラムを用いて分離した後 IL-6 活性と測定した所、約 20kDa の蛋白を含む分画にわずかな活性を認めた他、ATP 添加により大分子量の蛋白を含む分画に強い活性を認めた。GRP78 に対する抗体を用いた Western Blotting により後者には GRP78 が含まれることが明らかになった。GRP78 陽性となった分画を抗 GRP78 抗体を用いた免疫沈降すると、ATP 処理後 IL-6 活性が認められた。これらのことより、GRP78 が低酸素再酸素化時アストロサイトにおいて IL-6 に直接作用し、分子シャペロンとして機能していることが明らかになった。

【総括】(1)低酸素負荷によりアストロサイトにおける蛋白新生は低下したが、再酸素化後、一過性に急増した。

(2)低酸素再酸素化を通じてアストロサイトからは種々の蛋白が誘導された。それらの蛋白の一部は GRP78, ORP150 である事が明らかになり、他のものは GRP94, HSP72, HO-1, HSP28 である事が強く示唆された。

(3)低酸素再酸素化後のアストロサイトからの IL-6 分泌に際して、小胞体内ストレス蛋白 GRP78 が分子シャペロンとして機能していることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

アストロサイトは中枢神経系で最も豊富に存在するグリア細胞であり、虚血に対して極めて強く、虚血後の組織修復にも積極的に参加している細胞であるが、その細胞応答現象の研究、特に分子レベルでの研究はこれまでほとんど進められていなかった。

本研究は、培養アストロサイトを低酸素再酸素化ストレスに暴露するという系を用いて、アストロサイトの虚血ストレスへの応答を初めて分子レベルで解明したものである。低酸素負荷によりアストロサイトからは GRP78, ORP150 をはじめとする種々の蛋白が誘導され、それらは再酸素化後も少なくとも 4 時間まで認められた。さらに、それらのうちで最も多量に誘導された蛋白である GRP78 が、再酸素化後のアストロサイトから分泌されるサイトカイン Interleukin-6 (IL-6) に対して分子シャペロンとして働いていることが証明された。

虚血時におけるアストロサイトの役割をより正確に理解し、今後、虚血性脳血管傷害の治療に結びつける上で、本研究の結果は極めて重要である。また、本研究で用いた系を用いて、さらにアストロサイトから新規の遺伝子が発見されることが期待される。以上、本研究は学位に値すると考えられる。