



Title	アポトーシスにおけるリソソームカテプシン群の細胞内輸送と機能の解析
Author(s)	金森, 市朗
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41869
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	金森市朗
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第15336号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	アポトーシスにおけるリソソームカテプシン群の細胞内輸送と機能の解析
論文審査委員	(主査) 教授 恵比須繁之
	(副査) 教授 上崎 善規 助教授 脇坂 聰 講師 中澤 光博

論文内容の要旨

【緒言】

個体の発生、恒常性の維持に重要な役割を担っているアポトーシスの実行因子として、カスパーーゼが知られている。いったん活性化されたカスパーーゼは、下流の酵素を活性化し、最終的に染色体DNAをヌクレオソーム単位へ切断し、アポトーシスを引き起こす。しかし、全てのアポトーシスが上述の経路によって惹起されるのか、あるいは、全く別の経路が存在するのかは現在でも未解決の問題である。

一方、細胞が死に至る過程ではリソソームの活性化を伴うが、PC12細胞の細胞死を経時にみると、核の変化に先行して、オートファジー小体の形成が活発となる。この変化は代表的な酵素であるリソソームカテプシンBとDの変化としてとらえることができ、これにはリソソームカテプシン群の選別輸送を担うマンノース6-リン酸レセプター(MPR)が関与している。そこで、本研究ではリソソームカテプシン群の細胞内輸送ならびにアポトーシスの制御の詳細について解析した。

【材料と方法】

細胞とその培養：ラット褐色細胞腫由来のPC12細胞は大分子のCation independent Mannose 6-phosphate Receptor/insulin-like growth factor receptor(CI-MPR)を効率的に発現しているが、小分子のCation dependent Mannose 6-phosphate Receptor(CD-MPR)の発現は低い。また、PC12細胞は血清非存在下で培養すると典型的なアポトーシスに陥る。この細胞を培養し、実験に用いた。

cDNAクローニングと遺伝子導入：ラットのCD-MPR cDNAを、PC12細胞のcDNAライブラリーを用いて型のごとく単離した。このcDNAのC末端にFLAG標識を付加後、リン酸カルシウム沈殿法にてPC12細胞に導入し、CD-MPR遺伝子導入PC12細胞株を樹立した。

Cell Death Assay：野生型および遺伝子導入PC12細胞を無血清培地、CA074(200μM)添加無血清培地、ペプスタチンA(100μM)添加無血清培地、CA074およびペプスタチンA添加無血清培地で24時間培養し、その生存率を測定した。なお、CA074はリソソームカテプシンBの特異的阻害剤であり、ペプスタチンAはアスパラギン酸プロテアーゼ(カテプシンDを含む)の阻害剤である。各実験群の生存率を算出するために、PC12細胞を無血清培地に100ng/mlのNGFを添加した培地で培養し、その生存細胞数を100%としてそれぞれの生存率を算出した。

免疫組織化学的解析：野生型ならびにCD-MPR遺伝子導入PC12細胞株におけるCI-、CD-MPR、カテプシン

B、D の局在を、免疫染色後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

イムノプロット法による解析：野生型ならびに CD-MPR 遺伝子導入 PC12細胞株を血清存在下、血清非存在下で 24 時間培養し、それぞれ蛋白を抽出した。電気泳動し、PVDF 膜に転写後、抗カテプシン B、D 抗体にて免疫染色を行い、Scanning Imager (Molecular Dynamics) にて、免疫反応量を測定した。

細胞分画法による解析：野生型ならびに CD-MPR 遺伝子導入 PC12細胞株から細胞質分画を採取後、12 の分画に分離し、イムノプロット法を用いてカテプシン B と D の局在を調べた。

ノーザンブロッティング：野生型ならびに CD-MPR 遺伝子導入 PC12細胞株から RNA を抽出し、 $[^{32}\text{P}]$ で標識した CD-MPR cDNA プローブを用いて、Autoradiography で CD-MPR の mRNA を検出した。

【結果】

野生型 PC12細胞の CI-MPR は共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、核周囲に強い発現がみられたが、CD-MPR の陽性反応は弱かった。CD-MPR 遺伝子導入 PC12細胞株では、CD-MPR の陽性反応は CI-MPR のそれと同様の陽性反応を呈した。

CD-MPR 遺伝子導入 PC12細胞株におけるカテプシン B と D の局在を検討した結果、野生型 PC12細胞と比較検討して、カテプシン D の免疫反応性には変化が見られなかったが、カテプシン B の陽性反応は粗大化し、より明瞭な顆粒として細胞周囲に認められた。また、細胞分画法による検索の結果、カテプシン D の局在には変化が見られなかつたが、カテプシン B の局在は最も重い分画に移動していた。

野生型 PC12細胞を無血清培地で 24 時間培養し、活性型カテプシン B と D の蛋白量の変化をみると、カテプシン B は激減するが、D は約 3 倍に上昇した。同様に、CD-MPR 発現株で検討した結果、カテプシン B の蛋白量は減少せず、培養開始前と同レベルの蛋白量を有することが分かった。

遺伝子導入細胞を無血清培地で培養したところ、野生型 PC12細胞に比べ有意に生存率が上昇した。また、カテプシン B の阻害剤である CA074 を無血清培地に添加すると、CD-MPR 過剰発現株は野生型 PC12細胞と同様の生存率まで低下し、更にペプスタチン A を添加すると元の生存率に復した。

【考察】

本研究結果は、PC12細胞において、トランスゴルジ網からのカテプシン B の選別輸送に CD-MPR が深く関与していることを示唆している。通常、無血清培地で野生型 PC12細胞を培養するとカスパーゼ 3 が活性化されてアポトーシスで死に至るが、CD-MPR 遺伝子導入 PC12細胞株ではこの死が回避された。さらに、カテプシン B の特異的阻害剤である CA074 を添加すると細胞死が促進され、D の阻害剤であるペプスタチン A の添加で生存率は正常に復した。これらの事実は、PC12細胞の細胞死には、カスパーゼを利用する経路以外にリソソームカテプシン B と D で制御される経路も存在することを示している。この経路ではカテプシン D が細胞死惹起因子として働き、その活性をカテプシン B が抑制するものと思われる。すなわち、本研究では CD-MPR によるカテプシン B の効率のよい輸送が、細胞死を抑制する方向に作用した結果、本遺伝子導入 PC12細胞の生存率が上昇したと考えられる。

【結論】

PC12細胞の細胞死には、カスパーゼ非依存性の細胞死の経路としてリソソームカテプシン B と D によって制御される経路が存在することがわかった。また、CD-MPR は同細胞においてカテプシン B をより効率的にリソソーム系に輸送することを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本論文は、アポトーシスにおけるリソソームの活性化に注目し、リソソーム酵素の輸送経路と細胞内局在、さらにその果たす役割について検討したものである。その結果、アポトーシスには、細胞死実行因子と考えられているカスパーゼを介する経路とは別に、リソソームカテプシン群によって制御される経路が存在することを明らかにした。

以上の業績は、未だ解明されていないアポトーシスの機序を明らかにしていく上で貴重な知見を提供するものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。