



Title	Specific localization of lysosomal aminopeptidases in type II alveolar epithelial cells of rat lung
Author(s)	彌生, 吉広
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42605">https://hdl.handle.net/11094/42605</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">大阪大学の博士論文について</a>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	彌 生 吉 広
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 0 0 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学 位 論 文 名	Specific localization of lysosomal aminopeptidases in type II alveolar epithelial cells of rat lung. (ラット肺のⅡ型肺胞上皮細胞におけるリソゾームのアミノペプチダーゼの局在の検討)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 内 山 安 男  (副査) 教 授 岡 野 栄 之    教 授 青 笹 克 之

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

細胞の構成要素の一つであるリソゾームには様々な種類のプロテアーゼが含まれている。これらプロテアーゼは非特異的な分解を行うことにより、細胞の代謝回転に関与すると考えられてきたが、近年の研究から組織・基質特異性を示すプロテアーゼの存在も知られるようになってきた。リソゾームのシステインプロテアーゼであるカテプシンB、H、Lはそれぞれ肺胞マクロファージに局在するが、カテプシンHのみⅡ型肺胞上皮細胞の層板小体にも局在することが報告されている。Ⅱ型細胞はサーファクタントを産生・分泌し、層板小体にはこの素となるリン脂質や特殊蛋白が含まれる。これまでの研究からサーファクタントの形成にリソゾームが関与すること、またその構成要素である特殊蛋白は、リソゾームの多胞細胞で活性化されることが報告されている。私はカテプシンHがアミノペプチダーゼである点に注目し、本研究ではカテプシンHと同様にリソゾームでアミノペプチダーゼ活性を持つカテプシンCとトリペプチジルペプチダーゼⅠ (TPP-Ⅰ) の肺、特にⅡ型細胞における局在を調べ、層板小体の産生経路との関わりについて検討することを目的とした。

#### 【方法】

実験には成熟8週齢のWistar系雄ラットを用いた。肺におけるカテプシンC、HおよびTPP-Ⅰの発現をイムノブロット法で調べた。また4%パラホルムアルデヒド液で灌流固定し、パラフィン包埋した肺組織を用いて免疫組織化学的手法によりこれら酵素の局在を検討した。直接FITCで標識した抗カテプシンH抗体とED2抗体を用いて二重染色法により、カテプシンCとTPP-Ⅰの局在を検討した。さらに4%パラホルムアルデヒド-0.1%グルタルアルデヒドで灌流固定し、LRホワイトに包埋した組織を用いて、免疫電顕法にてこれらの酵素の局在を同定した。

#### 【成績】

イムノブロット法によりカテプシンCおよびTPP-Ⅰの成熟型に相当する25kDおよび47kDの蛋白の存在が確認された。カテプシンHはsingleおよびheavy chainsに相当する28kDと24kDの蛋白の存在が確認された。TPP-Ⅰの発現量にはカテプシンC、Hに比べて少なかった。免疫組織化学的に観察すると、カテプシンC、H、TPP-Ⅰは気管支上皮細胞および肺胞の細胞に認められた。レーザー顕微鏡を用いて二重染色した結果、カテプシンHはCあるいはTPP-Ⅰと肺胞の細胞で共存すること、さらにCとHはED2陽性のマクロファージとⅡ型細胞に局在することが明らかになった。免疫電顕法においても、カテプシンCとTPP-Ⅰの陽性シグナルはⅡ型細胞の多胞小体、コ

ンボジット小体および成熟層板小体に局在することが明らかとなった。

#### 【総括】

Ⅱ型細胞におけるサーファクタントの生合成経路は、多胞小体、コンボジット小体を介して成熟層板小体にて行われると考えられている。本研究は、リソゾームのプロテアーゼとして特殊なアミノペプチダーゼで、N末端から1個、2個、3個のアミノ酸残基を切断するカテプシンH、C、TPP-Iが、Ⅱ型細胞のサーファクタントの合成経路に局在することを示した。これらプロテアーゼが単に分解に関与するのか、特殊蛋白のプロセッシングに関与するのかは現在不明であるが、その特殊性を考えるとサーファクタントの形成に関与する可能性があるものと思われる。

#### 論文審査の結果の要旨

リソゾームには主にシステインプロテアーゼであるカテプシンB、C、H、K、L、Sや、アスパラギン酸プロテアーゼのカテプシンDに加え、セリンプロテアーゼの tripeptidyl peptidase I (TPP-I) が含まれる。近年、これらプロテアーゼは非特異的な分解に関与するだけでなく、基質・組織特異性を有することが明らかにされてきた。これまで肺においてはカテプシンB、C、H、L、TPP-Iの発現が報告され、その結果は、これらのプロテアーゼは全て肺泡マクロファージに局在し、唯一カテプシンHがⅡ型肺泡上皮細胞の層板小体に局在することを示している。さらにサーファクタントの形成にはリソゾームが関与すること、またその構成要素である特殊蛋白はリソゾームの多胞小体で活性化されることが報告されているが、カテプシンH以外のプロテアーゼの存在にはこれまで全く不明であった。

本論文では、カテプシンHがアミノペプチダーゼである点に注目し、H同様の活性を有するカテプシンCとTPP-Iの局在をラットⅡ型肺泡上皮細胞で調べた。本研究は、レーザー顕微鏡に免疫二重染色法や免疫電子顕微鏡を用いて、カテプシンHとCあるいはTPP-IがマクロファージのみならずⅡ型肺泡上皮細胞に共存すること、さらに、同細胞のサーファクタントの合成経路にあたる多胞小体、コンボジット小体、成熟層板小体に局在することを初めて明らかにした。これらリソゾームのアミノペプチダーゼがⅡ型肺泡上皮細胞における分解系に関与するのか、あるいはサーファクタントの特殊蛋白のプロセッシングに関与するのかは不明である。しかし、これらプロテアーゼの特殊性を考えると、サーファクタントの形成に関与する可能性が示唆される。

以上のことより、Ⅱ型肺泡上皮細胞において今まで報告されなかったアミノペプチダーゼの局在を示したことは、サーファクタントの合成過程を考える上で非常に重要な寄与をするものであり、博士論文として十分に価値のあるものと認める。