



Title	細胞内Ca ²⁺ およびリン酸化シグナルに対するベルオキシナイトライトの影響
Author(s)	佐伯, 万騎男
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42748
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 >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	佐 伯 万 騎 男
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 6 4 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 12 年 6 月 29 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	細胞内 Ca^{2+} およびリン酸化シグナルに対するペルオキシナイトライトの影響
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 上 崎 善 規 (副査) 教 授 米 田 俊 之 講 師 村 上 伸 也 講 師 藤 原 卓

論 文 内 容 の 要 旨

「研究目的」

一酸化窒素 (NO) とスーパーオキシドの反応により産生されるペルオキシナイトライト (PN) は細胞障害性が強く、神経系において脳虚血などの病態に関与していることが知られている。PN は蛋白質中のチロシン残基をニトロ化することが知られているが、蛋白質のニトロ化と PN の細胞毒性の関係については、現在のところ明らかにされていない。

本研究では、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いて、PN によってニトロ化される蛋白質の検出を試みた。さらに、このニトロ化がチロシンリン酸化シグナルに及ぼす影響を調べ、細胞死との関わりについて検討した。

「研究方法」

- 1.細胞培養：ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞の培養は、5%ウシ胎仔血清、5%新生仔ウシ血清を含む RPMI1640 培養液を用いて行った。
- 2.細胞死の判定：薬物処置後、倒立位相差顕微鏡により細胞の形態変化を観察し、トリパンブルー染色による色素排除試験、およびミトコンドリアの呼吸鎖能をみる MTT 法により行った。
- 3.ウエスタン・ブロッティング：細胞溶解液を調製し、抗ニトロチロシン抗体または接着斑蛋白質である Cas に対する抗体により免疫沈降を行い、7.5%SDS-PAGE により電気泳動後、抗ニトロチロシン抗体、抗ホスホチロシン抗体、抗 Cas 抗体を用いて蛋白質の同定と、ニトロ化、リン酸化を測定した。

「結果および考察」

SIN-1 処置により、SH-SY5Y 細胞に細胞死が誘導されるとともに、130kDa の蛋白質のニトロ化が認められた。抗 Cas 抗体を用いたウエスタン・ブロッティングにより、130kDa の蛋白質は接着斑蛋白質の Cas であると考えられた。SIN-1 処置により、Cas のチロシンリン酸化が抑制された。以上の結果から、PN による細胞死において、Cas のニトロ化によるリン酸化カスケード活性化機構の阻害が深く関与している可能性が示唆された。

「結論」

本研究より、PN による細胞障害機構には、接着斑蛋白 Cas のリン酸化阻害による細胞生存維持機構の破綻が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いて、peroxynitrite の細胞内 Ca^{2+} 濃度およびチロシンリン酸化シグナルに及ぼす影響を調べ、蛋白質チロシンニトロ化と細胞死との関わりについて検討したものである。その結果、peroxynitrite による細胞障害機構には、リン酸化阻害による細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 遊離増強作用と、接着斑蛋白 Cas のリン酸化阻害による細胞生存維持機構の破綻が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。本研究は、peroxynitrite の細胞障害機構と蛋白質チロシンニトロ化の関係の解明に新たな一面を加えたものであり、博士（歯学）の学位に値するものと認める。