

Title	Identification of μ -, m-Calpains and Calpastatin and Capture of μ -Calpain Activation in Endothelial Cells
Author(s)	藤谷, 和正
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/42924
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏 名	藤 谷 和 正
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 8 8 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 6 月 30 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 of μ -, m-Calpains and Calpastatin and Capture of μ -Calpain Activation in Endothelial cells (ヒト血管内皮細胞におけるカルパイン-カルパスタチン系の存在と μ -カルパイン活性化の同定)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門 田 守 人 (副査) 教 授 堀 正 二 教 授 荻 原 俊 男

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

血管内皮細胞では、種々のメディエーターを介して、細胞内カルシウムの上昇と細胞骨格の再構築が起こり、血管透過性亢進などの病態が招来される。これら病的過程において、細胞内カルシウムの上昇により活性化されるカルシウム依存性中性蛋白分解酵素（カルパイン）の関与が推察されるが、血管内皮細胞におけるその存在および活性化については全く不明である。本研究は、ヒト血管内皮細胞におけるカルパイン-カルパスタチン系の存在を明らかにするとともに、細胞内カルシウム上昇時におけるカルパイン活性化とその細胞骨格再構築への関与を明らかにすることを目的とした。

[方法]

(1) ヒト臍帯から採取・培養した血管内皮細胞 (1.0×10^6) の細胞質画分を、イオン交換クロマトグラフィー (DEAE-5PW) により分画し、カルパインおよびその阻害 (カルパスタチン) 活性を測定した。カルパイン活性のカルシウム依存性を測定した。さらに、カルパインおよびカルパスタチン活性画分のウエスタンブロット解析を、 μ -、m-カルパイン、カルパスタチンに対する各モノクローナル抗体を用いて行った。

(2) 血管内皮細胞より抽出した RNA (20 μ g) について、 μ -、m-カルパイン、カルパスタチン各々の DNA probe を用いて、ノザンブロット解析を行った。

(3) 血管内皮細胞を細胞外カルシウムの存在・非存在下にカルシウムイオノフォア (2 μ M) で刺激した後、タリンおよびフィラミンのウエスタンブロット解析を、各蛋白に対するモノクローナル抗体を用いて行った。さらに、これらの細胞骨格蛋白分解に対する、カルパイン特異的阻害剤であるカルペプチンの影響を検討した。

(4) μ -カルパイン中間活性体 (78 KDa) 特異的モノクローナル抗体を新たに作成した。 μ -カルパイン完全活性体 (76 KDa)、未活性体 (80 KDa) に対する各モノクローナル抗体と合わせて、細胞外カルシウムの存在下にカルシウムイオノフォア (2 μ M) で刺激した血管内皮細胞における、 μ -カルパインの活性化を検討した。

[成績]

(1) 0.30 M NaCl 画分にはカルパイン活性が、0.15-0.25 M NaCl 画分にはカルパスタチン活性が認められた。カルパイン画分は、活性化に mM オーダーのカルシウムを必要とし、m-カルパインと考えられた。さらに、カルパイン活性画分には80 KDa の m-カルパインが、カルパスタチン活性画分には80 KDa の μ -カルパインと110 KDa (筋型) のカルパスタチンが確認された。 μ -カルパイン活性は、カルパスタチン活性に被覆されていた。

(2) μ -、m-カルパインの mRNA は各々3.5 Kb の単一バンドとして、カルパスタチンの mRNA は3.8 Kb と2.6 Kb の2バンドとして、発現していた。

(3) 細胞外カルシウムの存在下でのみ、カルシウムイオノフォア刺激後15分で、タリンおよびフィラミンの水解が認められた。これらの水解は、カルペプチン(0-20 μ M)により濃度依存性に抑制された。このことは、タリンおよびフィラミンの水解には細胞内カルシウムの上昇が必要であり、カルパインを介した反応であることを示すものである。

(4) カルシウムイオノフォア刺激後3分で、 μ -カルパイン中間活性体(78 KDa)が認められ、経時的にその発現は増強した。 μ -カルパイン完全活性体(76 KDa)およびm-カルパイン活性体は、観察期間中認められなかった。上述の細胞骨格蛋白分解に先行する、 μ -カルパインの活性化が確認された。

[総括]

ヒト血管内皮細胞におけるカルパイン-カルパスタチン系の存在を、蛋白レベル・mRNA レベルで初めて明らかにした。細胞内カルシウムの上昇により、 μ -カルパインは中間活性体への自己融解を起こし、細胞骨格蛋白の分解に作用することが明らかとなった。このことは、細胞内カルシウムの上昇を伴う様々な血管内皮細胞機能において、 μ -カルパインが関与している可能性を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

本研究では、ヒト臍帯から採取・培養した血管内皮細胞を用い、ヒト血管内皮細胞におけるカルパイン-カルパスタチン系の存在を、蛋白レベル・mRNA レベルで初めて明らかにした。次に、細胞内カルシウムの上昇により、カルパインは活性化され、細胞骨格蛋白の分解に作用することを明らかにした。さらに、autolytic intermediate form of μ -calpain (78 KDa) 特異的モノクローナル抗体を新たに作成し、カルパイン活性の本体は、fully autolyzed form of μ -calpain (76 KDa) や fully autolyzed form of m-calpain (76 KDa) ではなく、autolytic intermediate form of μ -calpain (78 KDa) であることを明らかにした。このことは、虚血再環流障害や Shear stress 亢進などの細胞内カルシウムの上昇を伴う病的状態において、autolytic intermediate form of μ -calpain が血管内皮細胞障害性に関与している可能性を示唆するものであり、血管内皮細胞機能の解析に、カルパイン-カルパスタチン系という新しい見地を拓いたことは、学位の授与に値すると考えられる。