

Title	Lens Epithelium-Derived Growth Factor (LEDGF) Increased Resistance to Thermal and Oxidative Stressed
Author(s)	大黒, 伸行
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42993
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	おお ぐろ のぶ ゆき 大 黒 伸 行
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 9 6 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 9 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	Lens Epithelium-Derived Growth Factor (LEDGF) Increased Resistance to Thermal and Oxidative Stressed (水晶体上皮細胞由来成長因子 (LEDGF) は熱や酸化ストレスに対する耐性を増大させた)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 田 野 保 雄 (副査) 教 授 遠 山 正 彌 教 授 不 二 門 尚

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

近年、白内障の原因として自己抗体が関与している可能性が示唆されている。我々は白内障患者の血清を用いて水晶体に対する自己抗体を同定していく過程で1つの蛋白を発見した。この蛋白はN末端がhepatoma-derived growth factor (HDGF) と高い相同性を有していることと、水晶体上皮細胞から同定したことより我々はこの蛋白を Lens Epithelium-Derived Growth Factor (LEDGF: 推定分子量60 kDa) と命名した。本研究において我々は、LEDGF を水晶体上皮細胞に transfect することにより、その生物学的機能を検討した。

[方法ならびに成績]

① LEDGF は培養液中に分泌される

LEDGF の N 末端に green fluorescent protein (GFP: 推定分子量29 kDa) をつなげた融合蛋白 (GFP-LEDGF: 推定分子量89 kDa) を作成するため LEDGF の cDNA を green fluorescent protein の発現プラスミドベクターである pEGFP に組み込んだ新しい遺伝子を構築し (pEGFP-LEDGF) これを水晶体上皮細胞 (LEC) に transfect した。transfection は CaCl₂ 法を用い、抗生物質 (geneticin) による選択を行った (LEC/GFP-LEDGF)。コントロールとしてプラスミドベクター pEGFP のみを transfect した水晶体上皮細胞 (LEC/V) を用いた。

それぞれの細胞を無血清状態で3日間培養したのち、各培養液を Centricon 30 concentrator を用いて濃縮した後、ウエスタンブロッティングを施行した。1次抗体として LEDGF の C 末端20合成アミノ酸を用いて作成したウサギポリクローナル抗体 (LEDGF-Ab) と GFP に対するモノクローナル抗体 (GFP-Ab) を用いた。LEC/GFP-LEDGF の培養液中にはこれらの抗体と交叉する分子量約90 kDa の蛋白が認められたが、LEC/V の培養液中には交叉する蛋白は認められなかった。この結果より LEDGF は培養液中に分泌される蛋白であると考えられた。

② 外因性 LEDGF は細胞内に取り込まれ、最終的に核に移行する

濃縮した LEC/GFP-LEDGF 培養液を、正常の水晶体上皮細胞 (LEC/N) の培養液中に添加し蛍光顕微鏡にて観察したところ、12時間後に細胞質に蛍光色素が観察され、2日後には細胞質と核に蛍光色素が認められ、3日目には核の

みに色素の貯溜が認められた。この結果より、外因性 LEDGF は細胞内に取り込まれ、最終的に核に移行すると考えられた。

③ LEDGF-Ab は LEC/N の細胞死を誘導する

LEDGF-Ab を LEC/GFP-LEDGF の培養液中に投与すると、核および細胞質に貯溜していた蛍光色素が著明に減少することが観察された。この現象の機序は依然不明であるが、おそらく培養液中に分泌された GFP-LEDGF が抗体と結合することにより、直接的もしくは間接的に細胞内への取り込みが抑制されたためと考えられる。また、LEDGF-Ab を LEC/N に投与すると投与後約 5 日で、LEC/N の劇的な細胞死が誘導される。これらのことより、LEDGF がある一定の濃度核内に存在することが、LEC/N の生存に不可欠であると推定される。

④ LEDGF の細胞内分布は温度によって変化する

LEC/GFP-LEDGF を温度を変えて培養し蛍光顕微鏡にて観察したところ、低温下 (28°C) では蛍光色素は細胞質にのみ観察されたが、常温下 (37°C) では核と細胞質の両方に蛍光色素の貯溜が認められた。高温下 (41°C) では蛍光色素の核への貯溜がより顕著となった。一方、LEC/V では温度如何に関わらず、蛍光色素は常に細胞質に止まっていた。このことは、LEDGF の核内移行が温度変化となんらかの相関があることを示唆した。

⑤ LEC/GFP-LEDGF は熱ストレスに対する耐性を獲得する

LEC/GFP-LEDGF と LEC/V を高温下 (41°C) で培養し続けると、LEC/V は経時的に細胞が減少し、生きている細胞の割合も減少していくのに対し、LEC/GFP-LEDGF ではほとんど細胞が死なないという現象を観察した。そこで我々は LEC/GFP-LEDGF において heat shock protein (HSP) の発現が誘導されているか否かを検討した。

LEC/GFP-LEDGF、LEC/V、LEC/N をホモジュネイトして蛋白濃度を定量した後、各 1 ug/10 ul を SDS-PAGE ゲルに流したのち、種々の HSP に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを施行した。その結果 LEC/GFP-LEDGF では他の 2 つの細胞に比較して有意に HSP27 の発現が誘導されているのが観察された。また α B クリスタリンも誘導されているようであった。以上より LEDGF は HSP27 等の発現誘導を通して熱ストレスに対する LEC の耐性を増大させるものと推測された。

[総括]

今回の研究から、LEDGF が水晶体上皮細胞の生存に重要な働きをしており、また、heat shock protein の発現誘導を通じて、水晶体上皮細胞を熱などのストレスから保護する役割も果たしていることが推測された。今後さらに生物学的機能を解明していくことにより、この蛋白と白内障の発生との関係が明らかになるものと考えている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、水晶体上皮細胞より新たに同定された蛋白である Lens Epithelium-Derived Growth Factor (以下、LEDGF) の生物学的機能を、水晶体上皮細胞に LEDGF と green fluorescent protein (GFP) の融合蛋白 (GFP-LEDGF) の遺伝子を導入することにより検討したものである。

遺伝子導入された水晶体上皮細胞 (LEC/GFP-LEDGF) の培養液を、GFP および LEDGF に対するそれぞれの抗体を用いて Western blotting 法にて解析し、GFP-LEDGF が培養液中に分泌されていることを見出した。次に、前述の培養液を正常の水晶体上皮細胞の培養液中に添加し、経時的に蛍光顕微鏡で観察した結果、外因性の GFP-LEDGF は水晶体上皮細胞に取り込まれ、最終的に核に集積することを見出した。また、培養液中に LEDGF に対する抗体を投与すると GFP-LEDGF が核から消失していき、ついには細胞死に至ることが観察された。これらの結果は、この蛋白が水晶体上皮細胞の生存に極めて重要な働きをしていることを示すものであった。

LEC/GFP-LEDGF の培養温度を変えて培養したところ、GFP-LEDGF の細胞内局在は温度依存性であることを見出した。この現象の生物学的意味を検討するため、LEC/GFP-LEDGF を 41°C にて長期培養したところ、LEDGF は熱ストレスに対する耐性を増大させていた。そこで、LEC/GFP-LEDGF における heat shock protein (HSP) の発現

を検討するために、細胞から抽出した蛋白と種々の HSP の抗体を用いて Western blotting 法を施行したところ、LEC/GFP-LEDGF において HSP27 の発現が有意に誘導されていることを見出した。HSP27 は酸化ストレスに対する耐性も増大させるとの報告があるため過酸化水素を LEC/GFP-LEDGF の培養液中に投与したところ、LEDGF は酸化ストレスに対する耐性を増大させていた。

眼は常に種々の環境ストレスにさらされており、環境ストレスの水晶体上皮細胞に対する障害が白内障の一因であるとされている。今回の結果は、この蛋白が白内障の発生と密接に関連している可能性を示しており、白内障の原因解明に新たな道筋をつけたものとして、本論文は学位に値するものとする。