



Title	150kDa oxygen-regulated protein (ORP150) functions as a novel molecular chaperone in MDCK cells
Author(s)	板東, 良雄
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43732
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	板 東 良 雄
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 7 9 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 14 年 3 月 25 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	150kDa oxygen-regulated protein (ORP150) functions as a novel molecular chaperone in MDCK cells (MDCK 細胞において ORP150は新規分子シャペロンとして機能する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 遠山 正彌
	(副査) 教 授 堀 正二 教 授 谷口 直之

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

虚血性細胞死は様々な疾患に関連しており、その細胞死機序を解明し制御法を確立することは極めて重要である。現在までに我々は低酸素によって誘導される小胞体に局在するストレス蛋白 ORP150のクローニングに成功している (Kuwabara K. et al., J.B.C 279: 5025-5032, 1996)。その構造的特徴から ATP 依存性に分子シャペロンとして機能する可能性が示唆されるが、一般的に小胞体に局在する分子シャペロンは低酸素や細胞内カルシウム攪乱などの小胞体ストレスによって誘導され、細胞生存に働くと考えられている。そこで我々は、ORP150の分子シャペロンとしての機能解析を行い、ORP150が低酸素環境下で細胞内蛋白輸送系にどのような影響を与えるかについて検討した。

【方法ならびに成績】

蛋白輸送経路が既に確立されている犬遠位側尿細管上皮細胞 Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) 細胞を低酸素チャンバー内で培養することにより、低酸素暴露を行った。ORP150は Northen blot、Western blot 解析により、mRNA レベル、蛋白レベルともに低酸素暴露によって強く誘導された。次に ORP150の蛋白輸送系に及ぼす影響を検討するため、MDCK 細胞において分泌経路が概に確立されている分泌蛋白 GP80をマーカー蛋白として ORP150との結合を免疫沈降法にて検討した。その結果、GP80と ORP150との結合は低酸素暴露後、時間経過とともに増強した。このときの GP80の細胞内局在について蛍光抗体を用いた細胞染色を行ったところ、小胞体に局在していた。そこで次に、低酸素環境下における ORP150の機能を検討するために ORP150の恒常発現系細胞を MDCK 細胞で作成し、GP80の蛋白輸送にどのような影響を及ぼすかについて検討した。メタボリックラベリング法、sucrose gradient 法ならびに細胞染色法の解析から ORP150の恒常抑制系では野生株に比べて低酸素暴露によって GP80の分泌は抑制され、小胞体に蓄積していた。さらに ORP150恒常抑制系では細胞死がより早期に惹起されることから小胞体内に不良蛋白が蓄積することが引き金となって細胞死が引き起こされている可能性が示唆された。ATP 親和性については Affinity Chromatography、ATP kinetics 法によって検討した。その結果、ORP150は他の小胞体に存在する GRP78などの分子シャペロンよりも ATP に対する親和性が高いばかりでなく、GP80の解離に必要とする ATP は他の分子シャペロンよりも低濃度でよいことが明らかとなった。

【総括】

今回の解析により、ORP150は低酸素によって強く誘導され、小胞体に局在する分子シャペロンとして機能することが明らかとなった。また、ORP150の発現を抑制した細胞では不良蛋白が小胞体に蓄積し、細胞死がより早期に惹起されたことから、ORP150が細胞生存に働いていることが示唆された。また、他の分子シャペロンよりもATP親和性が高いことから虚血環境の様な厳しい細胞内環境においても最も効率のよい分子シャペロンとして機能していることが示された。

論文審査の結果の要旨

この研究はストレス蛋白ORP150が低酸素環境下でどのように分子シャペロンとして機能するかについて詳細に検討を行ったものである。

ORP150は小胞体内に不良蛋白が蓄積したり、細胞内カルシウムの攪乱（小胞体ストレス）によって誘導され、蛋白を安定化する作用がある。つまり、蛋白の品質管理に関与している。また、ORP150の発現抑制の細胞では不良蛋白がより早期から小胞体内に蓄積し、細胞死が惹起されることから、小胞体を起源とする細胞死が存在し、細胞生存にORP150が関与している事が示唆される。さらに既存の小胞体に局在する他の分子シャペロンよりもATP親和性が高いということは虚血環境などの厳しい環境下においても機能できることを示唆するものであり、ORP150の分子シャペロンとしての機能は非常に興味深いものである。

最近の報告では、多くの神経変性疾患に小胞体における変性蛋白質の蓄積が認められており、蛋白質の品質管理の機構とその制御法については、未だ不明な点が多い。また、細胞死制御および治療法の確立を考えた上でも、今後の発展が期待され、学位の授与に値するものと考えられる。