OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ラット発生期脳ではprocaspase-3は複合体を形成する
Author(s)	黒須, 和英
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45169
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

【1】

氏名	黒須和英（くろすかずひで）
博士の専攻分野の名称	博士（学術）
学位記番号	第 18626 号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	ラット発生期脳ではprocaspase-3は複合体を形成する
論文審査委員	（主査） 教授 上﨑 善規 （副査） 教授 米田 俊之　講師 飯田 征二　講師 小林 真之

論文内容の要旨

【目的】

発生期の神経系における apoptosis の分子的メカニズムについては未知の部分が多い。本研究はラット脳における cytochrome *c* による caspase-3 活性化メカニズムの加齢変化、およびその加齢変化に関わる分子機構の解明を目的として行った。

【方法】

ラット（Wistar 系）の大脳皮質を 250 mM の sucrose を含む緩衝液中で homogenize し、100,000 g 遠心分離上清をラット脳抽出標品とした。ラット脳抽出標品、dATP、cytochrome *c* を用いて、caspase-3 の活性化を検討した。caspase-3 活性は蛍光法を用いて測定した。

cytochrome *c* で刺激したラット脳抽出標品をゲル濾過クロマトグラフィーにより分離し、抗 procaspase-3 抗体、抗 caspase-9 抗体、抗 Apaf-1 抗体、抗 XIAP 抗体により Western blotting を行った。また、procaspase-3 に結合している蛋白質を調べるために DSS を用いてラット脳抽出標品を架橋後、電気泳動し、抗 procaspase-3 抗体によりその分子量を検討した。

procaspase-3 結合蛋白質は、ラット脳抽出標品を陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより分析し、部分精製した。精製は抗 procaspase-3 抗体との反応性を指標とした。この部分精製サンプルを2次元電気泳動で分離し、recombinant procaspase-3 をプローブとして、Western blotting を行った。この結果と、銀染色後のゲルを比較し、両方に共通する陽性シグナルを LC/MS/MS により分析し、得られたペプチド断片を蛋白質データベースで相同性検索した。

【結果および考察】

ラット脳抽出標品に dATP、cytochrome *c* の両方を加えて反応を行った場合は caspase-3 の活性化がみられた。この実験系に対する caspase-3 阻害剤および caspase-9 阻害剤の効果を調べた実験ではいずれの場合も caspase-3 の活性およびその活性化が抑制された。caspase-3 活性は生後1週齢までは高く、2週齢を越えると低下がみられ、4週齢では胎生17日齢の約20%まで低下していた。

1週齢のラット脳抽出標品をゲル濾過クロマトグラフィーにより分離した。cytochrome *c* 刺激時には apoptosome の構成分子として知られている caspase-9、Apaf-1、XIAP などは apoptosome の分子量（約 700～1400 kDa）に一

致して溶出した。一方、procaspase-3 は apoptosome よりもやや小さい分子量（～約 170 kDa）の位置に溶出した。cytochrome *c* 非刺激の場合においても、procaspase-3 は cytochrome *c* 刺激時と同様の位置に溶出した。この溶出位置は、通常は 2 量体を形成していると考えられている procaspase-3 の分子量（64 kDa）よりも大きいことから apoptosome とは異なる複合体を形成している可能性が示唆された。

1 週齢のラット脳抽出標品を DSS により架橋すると、32 kDa の procaspase-3 以外にも約 64 kDa とさらに約 20 kDa 大きい位置に検出された。したがって、1 週齢のラット脳では procaspase-3 は約 20 kDa の蛋白質と複合体を形成している可態性が示唆された。8 過齢の親ラットの脳抽出標品では 32 kDa の procaspase-3 のみ存在し、この複合体は認められなかった。

20 kDa の蛋白質をゲルから切り出し、LC/MS/MS により分析したところ、16 アミノ酸からなるペプチドを検出した。このペプチドのアミノ酸配列を蛋白質データベースで相同性検索した結果、ラット calcineurin B に完全に一致した。calmodulin beads を用いて、recombinant procaspase-3 と recombinant calcineurin が *in vitro* において結合することが明らかになった。

Western blotting を行ったところ、calcineurin A、B の発現量は加齢に伴って増加したが、procaspase-3 は加齢に伴って減少した。calcineurin は、生後はカルシウム依存性ホスファターゼとして種々の生理機能に関与していることが知られていることを考え合わせると、発生期は calcineurin は少量であっても procaspase-3 と結合し、複合体を形成して細胞死に対して促進的に働くが、生後は procaspase-3 の発現の低下と共に複合体形成への関与は減少し、calcineurin はホスファターゼ活性を伴う生理機能のために増加していくと考えられた。

【結語】

ラット脳抽出標品は、生後 1 週齢までは高い caspase-3 活性がみられ、2 週齢以降では、その活性が減少した。また、生後 1 週齢でのラット脳では、procaspase-3 は apoptosome とは異なる複合体を形成していた。この procaspase-3 と結合している蛋白質の分子量は約 20 kDa と推定された。ラット脳抽出標品を精製し、2 次元電気泳動、West-western blotting、LC/MS/MS により分析することにより、この分子量約 20 kDa の蛋白質がラット calcineurin B であることを明らかにした。以上より、calcineurin は発生期では procaspase-3 と複合体を形成することにより細胞死に対して促進的に働くと考えられ、生後はカルシウム依存性ホスファターゼとして種々の生理機能に関与していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

近年、アポトーシスの分子機構の詳細が明らかになり、神経細胞死の分子レベルでの研究が進みつつある。しかしながら、caspase-3 活性化の分子的メカニズムはいまだ明らかではない。本研究はラット大脳皮質を用い、cytochrome *c* による caspase-3 活性化メカニズムの加齢変化、およびその加齢変化に関わる分子機構について検討したものである。

生後 1 週齢でのラット脳では高い caspase-3 活性がみられ、procaspase-3 は apoptosome とは異なる複合体を形成していることが明らかとなった。ラット脳抽出標品を精製し、2 次元電気泳動、West-western blotting、LC/MS/MS により分析することにより、procaspase-3 と複合体を形成している因子として calcineurin B が同定された。

本研究により、ラット脳における procaspase-3 に関する新しい知見が得られたことにより、神経系の細胞死に関する新しい分子機構の存在が示唆された。よって、博士（学術）の学位授与に値するものである。