The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Degradation of nuclear DNA by DNase Ⅱ-like acid DNase in cortical fiber cells of mouse eye lens
Author(s)	中原, 匡咲
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49968
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

【４】

氏　　名	中　原　匡　咲（なかはらまさき）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２２７１３　号
学位授与年月日	平成21年３月24日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科生体生理医学専攻
学　位　論　文　名	Degradation of nuclear DNA by DNase Ⅱ-like acid DNase in cortical fiber cells of mouse eye lens （DNase Ⅱ-like acid DNaseによる水晶体線維細胞の核DNAの分解）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　米田　悦啓 （副査） 教　授　岩井　一宏　　教　授　近藤　寿人

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

水晶体は前嚢下に一層に存在する未分化な上皮細胞とその大部分を占める分化した線維細胞から構成される。水晶体上皮細胞は線維細胞へと分化する過程で、核やミトコンドリアなどの細胞内小器官を消失し、水晶体中心部にOrganelle free zoneと呼ばれる透明性の高い領域を形成することが知られているが、その機構はほとんどわかっていない。DNA分解酵素のひとつであるDLAD（DNase II-Like Acid DNase）は水晶体線維細胞のDNA分解に必須であり、この遺伝子を欠損したマウスは線維細胞にDNAが残存し、核白内障を発症する。

本研究では、DLADの局在を調べることで水晶体分化における核および細胞内小器官消失の機構に関する知見が得られると考え、マウスDLADに対するモノクローナル抗体を作成し、マウス水晶体におけるDLADの局在について解析を行った。

〔　方法ならびに成績　〕

マウスDLADの組み換え体を作成するためにFLAGタグをつけた発現ベクターを構築し、293T細胞にトランスフェクションした。DLADは酸性DNA分解酵素であるDNase IIの相同体として同定されたことから、精製したDLAD組み換え体の至適pHを検討したところ、pH5.6で最大の活性を示した。次に、DLAD組み換え体をハムスターに免疫し、マウスDLADに対するモノクローナル抗体を作成した。HeLa細胞にマウスDLADを発現させた安定発現株を作成し、DLADに対するモノクローナル抗体で染色したところ、ドット状の染色が観察された。この染色パターンとDLADの至適pHが5.6であったことから、DLADはリソソームに存在することが考えられた。そこで、リソソームのマーカーであるLamp-1（lysosomal membrane protein 1）に対する抗体で染色したところ、DLADとLamp-1は共局在しており、DLADは細胞内においてリソソームに存在することが示された。

次いで、水晶体におけるDLADの局在を検討した。水晶体は未分化な上皮細胞と水晶体の大部分を占める分化した線維細胞から構成されている。どちらの細胞がDLADを発現しているのか調べるため、生後13日齢のマウスの水晶体を上皮細胞と繊維細胞に分け、ウエスタンブロットおよびノザンブロットを行った。どちらのアッセイでも、DLADのバンドは線維細胞にのみ検出された。さらに、real time RT-PCRによりDLADのRNA量を定量したところ、DLADは線維細胞において上皮細胞の17倍多く発現していた。これらのことから、DLADは線維細胞に多く発現していることが明らかになった。そこで、マウス水晶体の切片を作成し、DLADモノクローナル抗体で染色した。その結果、DLADはOrganella-free zone近傍の線維細胞にのみ発現が観察され、さらに細胞核を取り囲むような染色像が観察された。水晶体線維細胞は分化の最終段階で自身の細胞内小器官を消失し、以前に形成されたOrganella-free zoneに新たに加わることが知られている。免疫染色の結果から、DLADは分化の最終過程で発現が上昇し、核が分解したあとは速やかに消失することが示された。また、DLADはリソソームに存在していることから、水晶体をDLADとLamp-1で共染色し電子顕微鏡で詳細に解析した。Lamp-1のシグナルは水晶体全体に一様に観察されたのに対し、DLADのシグナルはOrganelle-free zone近傍に限られた。Organelle-free zoneに近づくに従ってDLADのシグナルは増え、最も近傍ではリソソームが核膜に接している像が観察され、核内にDLADのシグナルが検出された。このことからDLADはリソソームから核に輸送され、DNAを分解することが示唆された。そこで、細胞内小器官の消失に他のリソソーム酵素が関与していないか調べるため、マイクロアレイを用いて水晶体上皮細胞および線維細胞の遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、カテプシンG, R, J等のリソソームに関連する酵素の発現が線維細胞では5倍以上増加していることが明らかとなった。

〔　総　　括　〕

DLADはリソソームに発現しており、水晶体においてはOrganelle-free zone近傍の線維細胞の核を取り囲む様に発現していることが明らかとなった。電子顕微鏡で細胞内の様子をより詳細に観察すると、Organelle-free zone近傍に存在する線維細胞では核の周囲をDLADが取り囲んでおり、核膜にリソソームが接している様子が観察された。また、マイクロアレイを用いて水晶体上皮細胞および線維細胞の遺伝子発現を網羅的に解析すると、カテプシン等のリソソームに関連する酵素の発現が線維細胞で増加していることがわかった。以上の結果より、水晶体の細胞内小器官の消失にはリソソームが関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

水晶体は前嚢下に一層に存在する未分化な上皮細胞とその大部分を占める分化した線維細胞から構成される。上皮細胞は線維細胞へと分化する過程で、核などの細胞内小器官を消失し、水晶体中心部にOrganelle free zoneと呼ばれる透明性の高い領域を形成することが知られているが、その機構はわかっていない。DNA分解酵素であるDLAD（DNase II-Like Acid DNase）は線維細胞のDNA分解に必須の酵素である。申請者はマウスDLADに対するモノクローナル抗体を作成し、細胞および水晶体におけるDLADの局在を免疫電子顕微鏡で詳細に解析した。その結果、DLADはリソソームに発現しており、水晶体ではOrganelle free zone近傍の線維細胞の核を取り囲む様にして発現していることが明らかとなった。また、分解直前の線維細胞の核膜にリソソームが接している様子が観察された。マイクロアレイで上皮，線維細胞の遺伝子発現を網羅的に解析すると、線維細胞でリソソーム関連酵素の発現が増加していることがわかった。これらの結果により、水晶体の細胞内小器官の消失にはリソソームが関与している可能性が示唆され、本研究は学位に値すると考える。