

平成24年12月

山下敦 学位論文審査要旨

主 査 清 水 英 治

副主査 林 一 彦

同 松 浦 達 也

主論文

Mechanisms underlying production and externalization of oxidized phosphatidylserine in apoptosis: involvement of mitochondria

(アポトーシスにおける酸化ホスファチジルセリンの産生と露出のメカニズム：ミトコンドリアの関与)

(著者：山下敦、森川仁詞、田島奈緒子、寺岡麻梨、楠本智章、中曾一裕、松浦達也)

平成24年 Yonago Acta medica 55巻 11頁～20頁

参考論文

1. Cytoprotective effect of chlorogenic acid against α -synuclein-related toxicity in catecholaminergic PC12 cells

(カテコールアミン産生性PC12細胞における α -シヌクレイン毒性に対するクロロゲン酸の保護効果)

(著者：寺岡麻梨、中曾一裕、楠本智章、片野諭、田島奈緒子、山下敦、関子哲平、伊藤悟、松浦達也)

平成24年 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 51巻 122頁～127頁

学 位 論 文 要 旨

Mechanisms underlying production and externalization of oxidized phosphatidylserine in apoptosis: involvement of mitochondria

(アポトーシスにおける酸化ホスファチジルセリンの産生と露出のメカニズム：ミトコンドリアの関与)

ホスファチジルセリン (PS) は細胞膜内層に局在しているが、アポトーシス時にはリン脂質の非対称性分布が消失し、PSは細胞表面に露出する。貪食細胞は露出したPSを“eat-me signal”のひとつとして認識し、アポトーシス細胞を除去する。また、活性酸素 (ROS) による酸化ストレスは一般的にアポトーシスの開始と実行に関与していると考えられている。近年、アポトーシス時のミトコンドリア膜透過性遷移とシトクロムc (cyt c) の細胞質への遊離が多量のROS産生に関与している事と、アポトーシス時に負の電荷を持つリン脂質が選択的に酸化されることが明らかにされている。これまでに、 H_2O_2 がこの選択的なリン脂質の酸化とPSの露出に関与していること及び、アポトーシス細胞表面に酸化PS (PSox) が実際に露出していることを直接証明した。本研究ではミトコンドリアの上流及び下流で働くカスパーゼ-8とカスパーゼ-3の選択的阻害剤を用いて、Fasを介したアポトーシスにおけるPSoxの産生と露出のメカニズムにcyt cが関与しているかを検討した。

方 法

実験にはヒト白血病T細胞由来のJurkat細胞を用い、抗Fas抗体処理によりアポトーシスを誘導した。DNAに特異的に結合する蛍光色素のヘキスト33342を用いて細胞核を染色し、蛍光顕微鏡下でアポトーシス細胞数を調べた。カスパーゼ-3の活性はカスパーゼ-3により特異的に分解され蛍光を発するペプチド配列を持った基質(Ac-DEVD-AMC)を用いて蛍光マイクロプレートリーダーでAMCの蛍光を測定することにより評価した。PSの細胞表面への露出はPSに高い親和性を持つAnnexin Vを用いてフローサイトメーターで測定した。細胞表面に露出したPSoxは、膜不透過で第一級アミンに特異的に結合するフルオレスカミンで細胞表面のPSおよびホスファチジルエタノールアミンを標識し、脂質抽出後、薄層クロマトグラフィーにより脂質を展開した後、過酸化脂質と特異的に反応し発色するN,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochlorideを用いて検出した。細胞内に存在するPSの検出には、別の第一級アミン結合試薬のニンヒドリンを用いた。細胞質中

のcyt cはウェスタンブロットにより検出した。

結 果

- (1) アポトーシスとカスパーゼ-3活性化に対するカスパーゼ阻害剤の抑制効果：
Z-IETD-FMK、Z-DEVD-FMKの前処理により、抗Fas抗体によって誘導されるアポトーシスとカスパーゼ-3の活性化は濃度依存的に抑制された。
- (2) PS露出に対するカスパーゼ阻害剤の効果：抗Fas抗体によるPSの細胞表面への露出は、Z-IETD-FMKにより抑制されたが、Z-DEVD-FMKでは抑制されなかった。
- (3) 細胞質へのcyt c遊離に対するカスパーゼ阻害剤の効果：抗Fas抗体によるcyt cの遊離は、Z-IETD-FMKにより抑制されたが、Z-DEVD-FMKでは抑制されなかった。
- (4) PSoxの産生と露出に対するカスパーゼ阻害剤の効果：抗Fas抗体によって細胞表面に露出したPSに対するPSoxの割合は、Z-IETD-FMKにより減少したが、Z-DEVD-FMKでは変化が見られなかった。

考 察

本研究において、カスパーゼ-8選択的阻害剤のZ-IETD-FMK処理により、抗Fas抗体によるミトコンドリアへのシグナルを遮断した場合、cyt cの遊離、PSoxの産生と細胞表面への露出、カスパーゼ-3の活性化、アポトーシスは抑制された。カスパーゼ-3選択的阻害剤のZ-DEVD-FMK処理によりミトコンドリアの下流でアポトーシスシグナルを阻害した場合は、カスパーゼ-3の活性化とアポトーシスは抑制されたが、cyt cの遊離、PSoxの産生と細胞表面への露出は抑制されなかった。以前の報告によると、細胞質中に遊離した正電荷を持つcyt cは細胞膜内層に存在し負電荷を持つPSと電氣的に相互作用し、 H_2O_2 存在下でペルオキシダーゼ活性を発揮することにより、PSを酸化することが示唆されている。本研究結果は、抗Fas抗体によるアポトーシスにおいてミトコンドリアから遊離するcyt cがPSoxの産生のみならず、その後のPSoxの細胞表面への露出にも重要な役割を果たしているということを初めて明らかにしたものである。

結 論

本研究において、カスパーゼ-8とカスパーゼ-3の選択的阻害剤を用いてミトコンドリアの上流と下流でアポトーシスシグナルを遮断することにより、ミトコンドリアがPSoxの産生と細胞表面への露出に重要な役割を果たしていることが示された。