

論文内容要旨

論文題目

Specific inactivation of cysteine protease-type cathepsin by singlet oxygen generated from naphthalene endoperoxides

責任講座：器官機能統御学講座 麻酔科学分野

氏名：長岡 由姫

【目的】

一重項酸素は光照射を受けたヘムやフラビンなどや、癌の光化学療法の際に多量に生じる。一重項酸素と不飽和脂肪酸との反応はよく知られているが、タンパク質への作用に関する研究は遅れている。生理的条件下で一重項酸素を生成するエンドペルオキシドを用いた解析から、一重項酸素は細胞を酸化的に傷害する一方でアポトーシスシグナルに関わるカスパーゼ経路を阻害することが明らかになっている。カスパーゼはシステインプロテアーゼであるため、その活性中心のシステインが一重項酸素の標的と考えられる。システインプロテアーゼの活性中心を形成するシステインは、他のアミノ酸残基に比べて反応性が高いため、一重項酸素の影響をより受けやすい可能性がある。本研究ではこの仮説を検証するために、リソソームの蛋白質分解酵素であるカテプシン群に着目した。カテプシン群はシステインプロテアーゼ以外にもアスパラギン酸プロテアーゼに属する酵素を含むため、両群のカテプシンを比較検討することで本仮説を検証し得ると考えた。またカスパーゼやカテプシン以外にもシステインプロテアーゼやシステインを活性中心にもつ酵素が数多く知られており、こうした酵素タンパクに対する一重項酸素の作用の理解へと繋がると考える。

【方法】

ヒト胎児皮膚由来正常線維芽細胞 HFSKF-II を用いて培養系ならびに抽出した細胞質画分に細胞膜透過性エンドペルオキシド 1-methylnaphthalene-4-propionate endoperoxide (MNPE) を作用させてその効果を調べた。カテプシン活性は存在量の多いカテプシン B,L,D/E に対して特異的な蛍光性基質を用いて測定した。また、精製カテプシン B を用いて MNPE の効果について解析した。

【結果と考察】

一重項酸素は、システインプロテアーゼであるカテプシン B,L 活性を選択的かつ用量依存的に阻害した。しかしアスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシン D/E 活性は全く阻害しなかった。阻害されたカテプシン B,L 活性は 5 mM DTT 処理を行ってもほとんど回復しなかった。同様の結果が精製カテプシン B を用いた検討でも確認された。また、一重項酸素によるカテプシン活性阻害からの保護にはシステインが最も有効であった。以上の結果より一重項酸素はシステインプロテアーゼに属するカテプシンを選択的に阻害するが、この時に起るシステインの酸化修飾は、分子内ジスルフィド結合やスルフェン酸(-SOH)形成とは異なると考えられた。

カスパーゼやカテプシンの他にも多くのシステインプロテアーゼが存在するが、一重項酸素は類似の阻害効果を及ぼすと考えられる。したがって、特に光に曝される皮膚などでは従来から知られている脂質過酸化に加えてこうしたシステインプロテアーゼ阻害作用により、一重項酸素が細胞の機能に様々な影響を与える可能性が示唆された。

平成 17 年 1 月 27 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 長岡由姫

論文題目： Specific inactivation of cysteine protease-type cathepsin by singlet oxygen generated from naphthalene endoperoxides.

審査委員： 主審査委員

一瀬白席



副審査委員

吉田 匡



副審査委員

富田 善孝



審査終了日： 平成 16 年 12 月 22 日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

活性酸素は、生体分子の変性や細胞死を惹き起こすので各種の疾患や老化に関与している。その内、一重項酸素の蛋白質修飾における生理学的な機序は今のところ良く分かっていない。一方、リソゾーム蛋白質分解酵素であるカテプシンも細胞死の一型であるアポトーシスに関与していることが知られており、一重項酸素との関連が示唆される。そこで、長岡氏は 37℃ という体温の条件下で定量的に一重項酸素を生成する MNPE (1-methylnaphthalene-4-propionate endoperoxide) という化合物を用いて、カテプシンに対する影響を調べた。

まず、胎児皮膚線維芽細胞の細胞質に含まれる酵素の活性を蛍光合成基質で測定する反応系を構築し、セリン型プロテアーゼ、システイン型プロテアーゼ、アスパラギン酸型プロテアーゼに対する阻害剤での活性変化を調べて特異性を確認した。次に、この細胞質画分を MNPE と混合して、カテプシン B と L/S は活性が阻害されるが、カテプシン D/E は影響を受けないことと、前 2 者の阻害と共に線維芽細胞の生存率が低下することを見出した。同様の実験を培養細胞を用いて行なうと 1/2 最大阻害効果が得られる濃度は 100 倍であったので、MNPE が細胞膜を透過しにくいためであると、長岡氏は考えた。

MNPE 処理により低下した細胞質画分の酵素活性は、還元剤である DTT で回復することはできないが、システインを初めとする SH 化合物によって一重項酸素の阻害作用を予防的に抑制することは可能であった。また、ヒトの肝臓から精製したカテプシン B を用いた実験でも全く同様の結果が得られた。従って、一重項酸素はシステイン型蛋白質分解酵素であるカテプシンを不可逆的に不活性化すると結論した。

以上のように、本研究は、論理的に良く考えられた仮説を、綿密かつ周到な実験により証明し、新しい知見を得ることに成功している。なお、カテプシンの不活性化がアポトーシスにどのように関わっているのか等の幾つかの新しい疑問が生じたが、長岡氏が取り組みつつある予備実験の結果についても審査の中で紹介されており、更なる発展が望まれるところである。

従って、本審査委員会は本研究の論文を学術的に優れていると認め、学位（医学）を授与するに値するものと判定した。

(1,200 字以内)