



Activation of calpain precedes morphological alterations during hydrogen peroxide-induced apoptosis in neuronally differentiated mouse embryonal carcinoma P19 cell line

石原, 逸子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-05-17

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2417

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002417>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	石 原 逸 子 (岡山県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博ろ第1735号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成12年5月17日
学位論文題目	Activation of calpain precedes morphological alterations during hydrogen peroxide-induced apoptosis in neuronally differentiated mouse embryonal carcinoma P19 cell line. (神経分化させたマウス胎仔癌細胞由来 P19細胞への過酸化水素刺激後のアポトーシスにおけるカルパインの活性化と形態変化)
審査委員	主査 教授 山 村 博 平 教授 南 康 博 教授 中 村 俊 一

論文内容の要旨

緒言

脳外傷、脳血管障害、神経変性疾患等で起こる神経細胞死の詳細な原因には、未だ不明な所がある。神経細胞死の要因のひとつとして、ミトコンドリア内での酸化的リン酸化における通常あるいは亢進した代謝より放出された酸化的中間物質（スーパーオキシド、ヒドロキシルラジカル、過酸化水素）の異常蓄積、即ち「酸化的ストレス」が考えられる。なかでも酸化的中間物質のひとつである過酸化水素は、鉄イオンと反応することで細胞膜やDNAを損傷する強い毒性を示すことが指摘されている。

酸化的ストレスにより、細胞外カルシウムイオン (Ca^{2+}) が細胞内に流入すると同時に細胞内の小包体からも Ca^{2+} が放出され、細胞内のカルシウムイオン濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) が増加する。さらに、この現象はDNAの断片化との相関が高い。また、脳虚血、痙攣（てんかん）発作、アルツハイマー病においても $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加と細胞小器官への損傷が共通した病態として観察されている。したがって、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加は、酸化的ストレス時の細胞損傷をさらに増強させることが考えられる。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加は Ca^{2+} 依存性プロテアーゼ（カルパイン）やシステインプロテアーゼなどの加水分解酵素を活性化させる。細胞死におけるカルパインの挙動については未だに不明な点が多いが、カルパインの活性化は細胞骨格形成に重要なスペクトリン蛋白を分解し、その結果、不可逆的な細胞骨格の変化やDNA損傷の誘因となる。

本研究の目的は、神経細胞に分化させた胎仔癌細胞由来のP19細胞に過酸化水素を添加し、酸化的ストレスとアポトーシスとの関連を添加直後から細胞変性までの過程において生化学的反応及び細胞骨格構造の変化の点から明らかにするものである。

方法

細胞：マウス胎仔癌細胞由来のP19細胞は、10%FBSを添加した α -MEM培養液で培養し、過酸化水素刺激前に 10^{-7}M のレチノイン酸を4日間培養液に添加し、神経細胞に形態変化した6日間の細胞を実験に用いた。

細胞内 Ca^{2+} 測定：P19細胞は $4\mu\text{M}$ の Fura-2/AM で 37°C 1時間処理し、蛍光顕微鏡下（Nikon

Diaphot 300) に置き340～380の蛍光強度で500ms ごとに変化させながら細胞内 Ca^{2+} 測定を行った。

ウエスタンブロット法：細胞外 Ca^{2+} 存在下、非存在下で過酸化水素刺激後の P19細胞より得られた細胞抽出溶液 (50 μg 相当の蛋白量) を 1 μg の抗チロシンリン酸化抗体 (4 G10) にて免疫沈降し、SDS サンプルバッファーを加え (80℃, 5 min) 反応を止め、12%SDS-PAGE した。SDS-PAGE にて分離した蛋白を PVDF 膜に転写し、4 G10 にて免疫ブロットした。蛋白の免疫反応は蛍光発色法にて X 線フィルム上に現像した。

カルパイン活性測定：カルパインの活性は Cell probe TMLY・カルパインキット (MBL) を用いて測定した。

細胞内の DNA の断片化：細胞内における DNA の断片化は、MEBSTAIN のアポトーシスキット (MBL) を用いてタヌルアッセイ法にて行った。

結果

細胞内の Ca^{2+} の増加：100 μM の過酸化水素を細胞外液中に添加後 1 時間で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が観察され、2 時間でピーク (500 nM) に達した (図 1 A)。高濃度 (500 μM ～1 mM) の過酸化水素も添加してみたところ、添加後10分で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が1.5 μM まで上昇した。細胞外液の Ca^{2+} の挙動との関連で細胞外液の Ca^{2+} を EGTA (3 mM) でキレートさせて $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を測定してみたところ、過酸化水素刺激添加後 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は観察させなかった。この結果より、細胞外液の Ca^{2+} が過酸化水素刺激後の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に必要であることが示唆された。

チロシンのリン酸化：過酸化水素刺激後の細胞内蛋白チロシンリン酸化を試みたところ、100 μM の過酸化水素添加後 5 分で44, 42, 40, 38kD の分子量の蛋白チロシン残基のリン酸化のバンドを検出した (図 1 B)。検出したバンドの44, 24kD の蛋白は ERK (extracellular signal-regulated protein kinases) の分子量に匹敵するもので、抗-ERK 抗体を用いてブロッティングしてみたところ、ERK のバンドとしては検出できなかった。過酸化水素刺激後のチロシンリン酸化と細胞外液の Ca^{2+} との関連で、細胞外液の Ca^{2+} を EGTA でキレートしてみたところ、細胞内蛋白のチロシンリン酸化によるバンドは減衰した。(図 1 B)。この結果より、細胞外液中の Ca^{2+} の存在は、過酸化水素刺激後の細胞内蛋白のチロシン残基のリン酸化には必要であることが分かった。

細胞骨各の形態変化：酸化ストレスによる神経変性過程における細胞の形態変化を調べる為に、過酸化水素添加後、神経細胞の骨格を形成する蛋白質のひとつであるニューロフィラメントに対する免疫抗体染色を行った。その結果、低濃度 (10 μM) の過酸化水素刺激後24時間では、神経細胞の軸索、細胞面積、形態の特徴においてコントロールと比較して顕著な変化は認められなかった。一方、100 μM の過酸化水素刺激では、刺激後 1 時間で形態変化を示し、24時間では細胞体の形態変化が顕著となり、ニューロフィラメントの抗免疫抗体で染色される軸索は、顕著に減少していた (図 2 A)。これらの結果より、酸化ストレスによる神経変性の過程では、形態変化は過酸化水素刺激後の細胞内蛋白のチロシンリン酸化と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇に続いて起こっている現象であると考えられた。

カルパインの活性化： $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に伴うカルパインの活性化は、細胞骨格を形成する蛋白、特にスペクトリンの分解を促すことが指摘されている。そこで、100 μM の過酸化水素刺激後にカルパインの基質を細胞に添加し、経時的にカルパイン活性を蛍光強度として観察した。刺激後約 1 時間でカルパインの活性化を確認できた (図 2 B)。さらに、細胞外液を EGTA でキレートしたところ、蛍光強度は減弱した (図 2 B)。また、細胞のライセートを抗スペクトリン抗体を用いて免疫ブロッティングを行ったところ、 α -spectrin の分子量に相当する150kD のバンドを検出することができた。

DNA の断片化：過酸化水素刺激とアポトーシスとの関連を明らかにするために、*in situ* で DNA の

断片をラベルするタヌル法を試みた。その結果、100 μ M の過酸化水素刺激後 6 時間で断片化した DNA を検出できた (図 2 C)。

考察

細胞外液の Ca^{2+} 非存在下で細胞蛋白のチロシンリン酸化が減衰した結果より、過酸化水素添加後のチロシンキナーゼの活性化には、細胞外の Ca^{2+} が重要な役割を果たしていることが示唆された。PC 12 細胞の過酸化水素刺激後を加えると、Ras-MAPK カスケードが活性化され、細胞をアポトーシスから保護することが報告されている。しかし、我々が検出したリン酸化蛋白は ERK ではなかった。しかし、チロシンのリン酸化と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が過酸化水素刺激後の神経変性過程の早期の反応として観察されたことより、 Ca^{2+} 依存性のプロテインチロシンキナーゼの関与の可能性が考えられる。今後の研究において、過酸化水素に誘発される細胞内のシグナル伝達と Ca^{2+} 依存性のチロシンキナーゼの存在を明らかにしたい。

カルパインに触発される加水分解は不可逆的な細胞の形態変化以前に起こると報告されている。ニューロフィラメントは神経の軸索や細胞体の骨格蛋白であり、本研究結果において、過酸化水素添加後細胞密度の減少や軸索の長さの短縮、抗体染色領域の減少が観察された。しかも、過酸化水素刺激によるカルパインの活性化のピークは 1 ~ 2 時間であり、P19 細胞の形態的变化は 3 時間より観察され 24 時間で顕著となった。これらの結果より、カルパインの活性化は過酸化水素刺激後のストレスシグナル伝達におけるきわめて重要な現象であると思われる。

細胞のアポトーシスの過程における特徴的な変化は、細胞膜の膨満、クロマチンの凝縮、核の断片化等があげられる。本研究結果においても、過酸化水素添加後 2 時間でカルパイン活性がピークに達してはいたものの、*In situ* での DNA の断片化は、添加後 6 時間で観察されている。よって我々は現在の所、過酸化水素で誘発されるアポトーシスにおけるカルパインの活性化は、DNA の断片化が続いて起こるための必須の現象であるか否かの検討を行っているところである。

本研究では、過酸化水素刺激後、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇と細胞外液の Ca^{2+} 細胞内への流入による細胞内蛋白のチロシンリン酸化とが観察された。これらの結果は、神経細胞のアポトーシスにおけるストレスシグナル伝達の活性化とプロテインチロシンキナーゼの活性化の可能性を示唆している。さらに、我々の研究結果は、酸化的ストレスにおいて、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇がカルパインを活性化しその結果ニューロフィラメント蛋白の分解にいたる可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

申請者は、神経細胞に分化させた胎仔癌細胞由来の P19 細胞に過酸化水素を添加し、酸化的ストレスとアポトーシスとの関連を添加直後から細胞変性までの過程において生化学的反応及び細胞骨格構造の変化を明らかにする目的で本研究を行った。

マウス胎仔癌細胞由来の P19 細胞は、10% FBS を添加した α -MEM 培養液で培養し、過酸化水素刺激前に 10^{-7} M のレチノイン酸を 4 日間培養液に添加し、神経細胞に形態変化した 6 日間の細胞を実験に用いている。細胞内 Ca^{2+} 測定は P19 細胞を 4 μ M の Fura-2 / AM で 37 $^{\circ}$ C 1 時間処理し、蛍光顕微鏡下 (Nikon Diaphot 300) で 340 ~ 380 の蛍光強度で 500 ms ごとに測定している。蛋白質チロシン残基リン酸化のリン酸化は SDS-PAGE にて分離した蛋白を PVDF 膜に転写し、抗チロシンリン酸化抗体にて免疫ブロットし、蛍光発色法にて X 線フィルム上に現像している。カルパインの活性は Cell probe TMLY・カルパインキット (MBL) を用いて測定し、細胞内における DNA の断片化は、MEBSTAIN

のアポトーシスキット (MBL) を用いてタヌルアッセイ法にて行っている。

酸化ストレスにより、細胞外のカルシウムイオン (Ca^{2+}) が細胞内に流入すると同時に細胞内の小胞体からも Ca^{2+} が放出され、細胞内の Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) が増加する。また、細胞外液中の Ca^{2+} の存在は、過酸化水素刺激後の細胞内蛋白質のチロシン残基のリン酸化には必要であることを明かした。さらに、この現象は DNA の断片化との相関が高い。また、脳虚血、痙攣 (てんかん) 発作、アルツハイマー病においても $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加と細胞小器官への損傷が共通した病態として観察されている。従って、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加は、酸化ストレス時の細胞損傷をさらに増強させることが考えられる。また過酸化水素刺激では、刺激後 1 時間で神経変性を示す形態変化が起こり、24 時間では細胞体の形態変化が顕著となり、ニューロフィラメントの抗免疫抗体で染色される軸索は、顕著に減少していた。これらの結果から酸化ストレスによる神経変性の過程では、形態変化は過酸化水素刺激後の細胞内蛋白質のチロシンリン酸化と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇に続いて起こっている現象であると考えられた。この $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加は Ca^{2+} 依存性プロテアーゼ (カルパイン) やシステインプロテアーゼなどの加水分解酵素を活性化させる。細胞死におけるカルパインの挙動については未だに不明な点が多いが、カルパインの活性化は細胞骨格形成に重要なスペクトリン蛋白を分解し、その結果、不可逆的な細胞骨格の変化や DNA 損傷の誘因となると推察している。

細胞外液の Ca^{2+} 非存在下で細胞蛋白のチロシンリン酸化が減衰した結果より、過酸化水素添加後のチロシンキナーゼの活性化には、細胞外の Ca^{2+} が重要な役割を果たしていることが示唆された。PC12 細胞の過酸化水素刺激後を加えると、Ras-MAPK カスケードが活性化され、細胞をアポトーシスから保護することが報告されている。しかし、申請者達が検出したリン酸化蛋白質は ERK ではなかった。しかし、チロシンのリン酸化と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が過酸化水素刺激後の神経変性過程の早期の反応して観察されたことより、 Ca^{2+} 依存性のチロシンキナーゼの関与の可能性が考えられる。これまで、カルパインに触発される加水分解は不可逆的な細胞の形態変化以前に起こると報告されている。ニューロフィラメントは神経の軸索や細胞体の骨格蛋白質であり、本研究結果において、過酸化水素添加後細胞密度の減少や軸索の長さの短縮、抗体染色領域の減少が観察された。しかも、過酸化水素刺激によるカルパインの活性化のピークは 1 ~ 2 時間であり、P19 細胞の形態的变化は 3 時間より観察され 24 時間で顕著となった。これらの結果より、カルパインの活性化は過酸化水素刺激後のストレスシグナル伝達におけるきわめて重要な現象であると推察された。

本研究では、P19 細胞を酸化ストレスで刺激したところ、細胞外液 Ca^{2+} の細胞内への流入による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇と、それに伴う細胞内蛋白質のチロシンリン酸化を明かにした。またストレスシグナル伝達の活性化とチロシンキナーゼの活性化が神経細胞のアポトーシスに密接な関係があることを明かにした。さらに、酸化ストレスにおいて、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇がカルパインを活性化し、その結果ニューロフィラメント蛋白質の分解にいたる経路を示した。本論文は、これまでに報告のない重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって本申請者は博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。