

氏名・(本籍)	しん じ 進 士 ひとみ
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 第 9 4 4 号
学位授与年月日	平 成 2 年 3 月 9 日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
最終学歴	昭和57年3月 東北大学大学院理学研究科 (前期2年の課程)生物学専攻修了
学位論文題目	脂質多糖体活性化刺激によるマクロファージ微小繊維系の動態に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 小 西 和 彦 教 授 竹 内 拓 司 助 教 授 四 釜 慶 治

論 文 目 次

第1章 序 論

第2章 マクロファージ刺激応答時の微小繊維系構造変化を検討するための実験系の確立 - 特にマクロファージ微小繊維系の構造安定性に対する環境要因の影響およびマクロ ファージのヘテロ性について-

第1節 序

第2節 材料と方法

第3節 結 果

第4節 考 察

第3章 脂質多糖体によるマクロファージ微小繊維系の動態およびシグナル伝達過程に対する 関与の可能性

第1節 序

第2節 材料と方法

第3節 結果

第4節 考察

第4章 総合考察

要約

謝辞

参考文献

論文内容要旨

第1章 序論

細胞骨格の機能は細胞の形態を維持するだけでなく、増殖因子等の刺激伝達においても重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。このような細胞骨格研究の進歩はその構成成分を標識して、視覚化あるいは定量化する技術的な進歩に支えられている。微小繊維系(MF)の動態については、rhodamine-phalloidinによる蛍光染色によって検討されることが多い。この方法は相対的な変化を知ることはできるが、細胞内で行われているMF全体の挙動を把握することはできない。本研究では、マクロファージ(M ϕ)をその強力な活性化物質である脂質多糖体(LPS)で刺激した後、rhodamine-phalloidin染色による繊維性アクチン量の定量とTritonによる細胞内遊離アクチンの抽出・定量を並行して行うことによって、MF全体の挙動を捕らえることを試みた。更に、観察されたMFの変化のM ϕ 活性化機能発現における役割についても検討した。

第2章 マクロファージ刺激応答時の微小繊維系構造変化を検討するための実験系の確立 -特にマクロファージ微小繊維系の構造安定性に対する環境要因の影響およびマクロファージのヘテロ性について-

第1節 序

M ϕ 刺激応答時のMFの変化を捕らえるためには、目的とする刺激以外への応答を排除することが必要である。本章ではM ϕ 培養時の温度変化、pH変化について検討し、未刺激状態で安定した結果が得られる系をまず確立した。また、刺激によるMFの変化を捕らえるための抽出溶液組成、およびLPS刺激時間についての検討も併せて行った。

第2節 材料と方法

M ϕ は、マウス腹腔に起炎剤を投与して得られる炎症性初代培養M ϕ を用いた。DNase I阻害法はHeacockらの方法を基に、多検体測定用に改良した。LPSのM ϕ への結合は、FITCラベルLPSを用いて蛍光法により観察した。

第3節 結果

M ϕ 培養液のpH上昇は、MFの解離を招くことが明らかになった。また、M ϕ MFは $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の培養温度変化によって構造を変えること、および 37°C 付近の培養温度を境にして温度に対する構造安定性が逆転することが示唆された。更に、LPSによる30秒間の刺激でもインターロイキン-1(IL-1)は産生されること、LPS刺激応答時のMFの構造変化はEGTA非添加の100mM NaClを含むTriton溶液で抽出することで捕らえ得ることも示唆された。

第4節 考察

培養液のpH変化は、細胞内のpHを変化させることによってMF構造を不安定化させるものと考えられる。一方、温度変化によるMFの構造変化については、温度感知タンパク質がMFに存在していることを伺わせる。また、LPS刺激後のMF構造においては、100mM NaClに

よって解離するカルシウム感受性 MF 画分が増加しているものと考えられた。更に、LPS の継続的刺激による MF の構造変化を Triton 抽出法により追跡した結果が、定量的には再現性に乏しかった理由の主なものとして M ϕ の多様性が考えられた。

第3章 脂質多糖体によるマクロファージの動態

およびシグナル伝達過程に対する関与の可能性

第1節 序

LPS 活性化刺激によって誘導されるシグナル伝達経路として、ホスファチジルイノシトール (PI) 代謝の促進が明らかになっている。PI 代謝により産生されるホスファチジルイノシトール 3 リン酸 (IP₃) は、細胞内カルシウム貯蔵部位からのカルシウム遊離を引き起こすことが知られているが、また M ϕ に存在が確認されている MF 調節タンパク質因子である profilin と gelsolin がともにホスファチジルイノシトール 1 リン酸 (PIP) やホスファチジルイノシトール 2 リン酸 (PIP₂) によって制御されることが明らかになっている。これらの知見から、LPS の刺激によって細胞内カルシウム濃度の上昇と MF の構造変化が誘導されることが予想される。本章では LPS 応答性および不応答性マウス由来の M ϕ において、LPS 刺激による MF 構造変化が認められるか否かについて検討した。また、カルシウム濃度変化についても併せて検討を行った。

第2節 材料と方法

第1章で確立した条件に従って検討した。rhodamine-phalloidin により染色した繊維性アクチンの定量は、蛍光顕微測光装置によって行った。細胞内カルシウム濃度は Fura-2 AM を M ϕ に負荷し、蛍光顕微測光装置および蛍光分光光度計により蛍光強度の変化を測定して検討した。

第3節 結果

LPS 刺激直後から誘導される MF の構造変化が観察された。この変化は LPS 不応答性マウス由来の M ϕ では観察されなかったが、LPS の結合は応答性マウス由来の M ϕ と相違が認められないことから、LPS 受容体を介した変化であることが示唆された。また、基質に接着した M ϕ においては、LPS による細胞内カルシウム濃度の上昇が認められたが、浮遊培養 M ϕ ではこの応答は認められなかった。LPS と同時に MF の阻害剤である cytochalasin D を添加しておく、M ϕ の IL-1 産生は抑制された。

第4節 考察

抽出法によって得られた結果と蛍光法によって得られた結果には高い相関が認められたが、LPS 刺激に伴って増加するアクチン繊維量は蛍光法による結果でより変化が大きかった。これは、LPS 刺激に伴って形成されるアクチン繊維が、細胞内で比較的不安定な状態にあることを示唆するものと思われる。また、LPS 刺激によって誘導されるカルシウム濃度の上昇が、観察された MF の構造変化の trigger になるものと予想されるが、カルシウム濃度の上昇は接着性 M ϕ においてのみ観察される変化であることから、M ϕ 活性化機能発現における接着の重要性

が伺われる。

第4章 総合考察

第3章において観察されたMFの構造変化はStosselらのモデルによって説明され得る。細胞を増殖因子で刺激すると、ラッフル膜の形成を伴う一過性のMFの構造変化が誘導されることは数多く報告されており、MF阻害剤が細胞増殖を抑制することが知られている。M ϕ をLPS刺激した場合の細胞内応答は、本研究で明らかになったMFの構造変化過程も含めて、増殖因子による細胞内応答と類似点が多い。本研究においてもcytochalasin DによってIL-1産生が抑制されることを確認しており、観察されたMFの構造変化過程がM ϕ の活性化機能発現において重要な役割を有するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文は刺激伝達における細胞骨格の役割を明らかにする目的で、マクロファージ (M ϕ) をその活性化物質である脂質多糖体 (LPS) で刺激した後、繊維性アクチン量と細胞内遊離アクチン量を同時に定量して微小繊維系 (MF) の変化を追跡し、さらにこの MF の変化と M ϕ 活性化機構発現との関係について検討したものである。

実験に用いた M ϕ はマウス腹腔に起炎剤を投与してえられる炎症性初代培養のものである。また、活性化の指標としては IL-1 の産生量を用いている。繊維性アクチン定量は rhodamine-phalloidin 染色による蛍光顕微測光法により、細胞内遊離アクチン定量は triton で抽出し、DNase I 阻害法を多検体測定用に改良して行なっている。

まず、目的とする刺激以外の刺激に対する応答を出来るだけ排除した実験条件を確立するための詳細な検討を行なっているが、その過程で M ϕ MF の新しい重要な性質を発見している。すなわち、培養温度の $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の変化で M ϕ の MF の構造が変化すること、さらに、 37°C 付近を境としてこの構造の温度に対する安定性が逆転することである。この性質について著者は温度感知機能を持つタンパク質が存在する可能性を指摘している。著者はこの温度変動巾を $\pm 0.025^{\circ}\text{C}$ に抑えうる加温培養装置を作製し、本論文の研究に用いている。また、LPS による刺激時間、培養液の pH や組成などについても詳細な検討を行ない、目的とする実験条件の確立に成功している。

次に、LPS による M ϕ MF の動態変化およびそのシグナル伝導過程への関与の可能性の検討を行なっている。その結果 LPS 刺激直後から MF の構造変化が認められた。一方、この変化は LPS 不応答性マウス由来の M ϕ では観察されなかったが、LPS はこの M ϕ にも結合することを明らかにした。この結果から、この構造変化は、細胞内でのシグナル伝達過程に関与するものであろうと示唆している。

また、M ϕ 内のカルシウムイオンが LPS 刺激後 1 分以内に一過性の増加を示すことを観察している。

著者は以上の実験結果にもとづき、LPS 刺激による MF の構造変化と増殖因子の刺激による細胞内応答と比較して考察し、両者の類似性を指摘している。

以上、本論文は M ϕ MF の新しい性質の発見をはじめ、この分野の研究に重要な知見を与えるものであり、本人が自立して研究活動を行なうに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。よって進士ひとみ提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。