

[別紙 1]

論文内容の要旨

論文題目 Intracellular localization and translocation of 5-lipoxygenase

和訳 5-リポキシゲナーゼの細胞内局在と膜移行の解析

指導教官 清水孝雄教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

分子細胞学専攻

学生証番号 77316

氏名 花香 博美

(要旨)

アラキドン酸代謝物の総称であるエイコサノイド(プロスタグランジン、ロイコトリエン等)は必要な時に局所で合成され、それらの合成部位の近くで作用する局所ホルモンである。これらの脂質メディエーターはペプチド性リガンドと異なり、遺伝子によって直接支配を受けるのではなく、その合成と分解をつかさどる酵素により、その量、活性が調節されるという特徴をもつ。

5-リポキシゲナーゼ(5-LO)はロイコトリエン(LT)合成系路における初発酵素であり、その活性化は複雑な制御を受けている。5-LOは細胞によって細胞質と核質における局在の割合が異なることが報告されているが、細胞がカルシウム上昇などの刺激を受けると膜(特に核膜)に移行

することが報告されている。本研究は、5-LO の細胞内局在及び膜移行のメカニズムを明らかにすることを目的として行われた。

5-LO は細胞によって局在が異なることが報告されているが、細胞免疫染色によって RBL 細胞において主として核質に、HL-60 細胞において細胞質に強い局在を示した。細胞内局在の違いは何らかの局在シグナルが 5-LO 中のアミノ酸配列に存在すると考え、オワンクラゲの蛍光タンパク質である GFP との融合タンパク質を用いて細胞内局在における責任部位の同定及び膜移行とそのメカニズムの解析することとした。そのため挿入する 5-LO の cDNA をベクターである pEGFP-C1 の EcoRI サイトに結合し pEGFP-5LO を得、CHO 細胞に安定的に発現させ CHO-GFP-5LO 細胞を得た。同細胞には十分な 5-LO の活性を認めた。

核内局在に關与するシグナルとして、核内移行シグナル (NLS) と核外移行シグナル (NES) が知られている。5-LO の細胞内における局在の違いが NLS や NES と關連しているのではないかと考え、5-LO がこれらのシグナルに依存して細胞内局在を変化するかどうかについて解析した。まず 5-LO 中の NLS の候補として monopartite-NLS (アミノ酸 130-133) と bipartite-NLS (アミノ酸 638-655) を見出した。EGFP と野生型もしくはこれらの NLS に対するの変異型の 5-LO との融合タンパク質 (GFP-5LO) を用いて、各々の局在を觀察した。さらに、bipartite NLS と考えられる部位 (アミノ酸 638-655) との融合タンパク質 (GFP-B-NLS) を作成しその局在を共焦点顕微鏡により觀察した。野生型の GFP-5LO は主に核内に局在したが、変異型の融合タンパク質の中には 5-LO の活性は存在するが細胞質に局在を変化させるものもあった。GFP-B-NLS は核質だけに局在し、5-LO 中のアミノ酸配列 638-655 が機能的な bipartite NLS であることが示唆された。

次に NES 依存的な核外移行が存在するかどうかについて検討した。5-LO のアミノ酸配列中にはっきりとした NES シグナルを同定することは出来なかった。しかし NES の阻害剤であるレプトマイシン B を HL-60 細胞や CHO-GFP-5LO 細胞に作用させると細胞質中の 5-LO は減少し、核質中の 5-LO が増加した。このことは、5-LO の核外移行に CRM1 や RanGTP といった核外移行に介在するタンパク質が關与していることを

示している。

5-LOは細胞がカルシウム上昇などの刺激を受けると膜（特に核膜）に移行することが細胞免疫染色により報告されている。CHO-GFP-5LO細胞をA23187によって刺激すると、経時的なGFP-5LOの膜移行が共焦点顕微鏡を用いて観察された。つぎに、ストレス刺激によりp38 MAP kinase pathwayを介して細胞中の5-LOがリン酸化され、ロイコトリエンの産生量が増加することが最近報告されているが、ストレス刺激による5-LOの動態は不明であった。そこでCHO-GFP-5LO細胞においてアニソマイシンや亜硫酸塩によってストレス刺激を与え共焦点顕微鏡を用いてGFP-5LOの局在の経時的变化を観察した。またウェスタンブロッティング法を用いて、細胞中のストレス刺激によるp38 MAP kinaseのリン酸化について解析した。その結果ストレス刺激により5-LOは膜移行を起こし、この現象はp38 MAP kinaseのリン酸化を伴った。またp38 MAP kinaseの阻害剤であるSB203580の前処理により阻害された。

本研究において5-リポキシゲナーゼのNLSの責任部位及びNES依存的な核外移行の存在が明らかになった。5-LOの細胞内局在はNLSとNESのバランスにより決定されると考えられる。しかし、核質と細胞質に局在する5-LOの役割の違いについては未だ不明な点が多い。産生されるロイコトリエンの場所、種類及び産生量との関連が考えられるが、今後の検討課題である。

カルシウム上昇刺激及び、ストレス刺激により5-LOの膜移行が観察された。カルシウムによる5-LOの膜移行については、機序が明らかにされつつあるが、ストレス刺激による膜移行については、今回が初めての報告である。我々の実験はp38 MAP kinaseのリン酸化がその機序に関与している可能性を示している。カルシウム刺激と、ストレス刺激の意義の違いについては今後の研究課題である。さらに、細胞や臓器においてどのようなストレス刺激でロイコトリエン産生が制御されるかについても検討していきたい。