

審査の結果の要旨

氏名 花香博美

アラキドン酸代謝物の総称であるエイコサノイド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。

1. 5-リポキシゲナーゼは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。今までの報告と、以上の結果から5-LOは細胞によって局在が異なることが示された。
2. EGFPと野生型もしくはbipartite nuclear localization signal (B-NLS) (アミノ酸638-655)に対する変異型の5-LOとの融合タンパク質(GFP-5LO)を用いて、各々の局在を共焦点顕微鏡により観察した。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。また、B-NLSと考えられる部位との融合タンパク質は核質だけに局在した。以上の結果から、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。

3. 5-LOにおいてnuclear export signal (NES)依存的な核外移行が存在する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関与していることを示している。
4. 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の局在の経時的変化を観察した。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は核膜及び細胞内小器官に移行し、この現象はp38 MAP kinaseのリン酸化を伴った。また、これらの現象はp38 MAP kinaseの阻害剤であるSB203580の前処理により阻害された。

以上、本論文は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を明らかとした。また、ストレス刺激による細胞内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。これらの成果は複雑なロイコトリエン合成経路の制御の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位を授与するに値するものと考えられる。