

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 ラットロイコトリエン B4 受容体のクローニングと解析

指導教官 後藤淳郎助教授

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

内科学専攻

氏名 戸田晶子

ロイコトリエン B4 (LTB4) は 5-リポキシゲナーゼと LTA4 水解酵素により、アラキドン酸より合成される生理活性脂質であり、白血球を刺激し、血管内細胞への接着、走化、ライソソーム酵素の放出を促進する。感染や外来異物の侵入に対する生体防御に重要な役割を担っている一方で、気管支喘息、炎症性腸疾患、関節リウマチ等の炎症性疾患の進行にも増悪因子として関与している。また、LTB4 が核内レセプターである PPAR α のリガンドであることが知られており、LTB4 が PPAR α に結合することにより、主として β 、 ω 酸化を行う諸酵素の発現を上昇させ、この結果 LTB4 の肝臓での代謝分解が促進され、炎症反応の消退につながる。LTB4 の細胞膜受容体であるヒトロイコトリエン B4 受容体 (BLT1) は、352 アミノ酸残基からなる 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体である。なお、ラットをモデル動物とした高脂血症による腎障害、急性虚血再灌流による腎障害、免疫複合体による肺障害において、LTB4 は病態進行に関与していることが報告されている。高脂血症のモデルラットでは BLT 拮抗薬を投与することにより、腎機能の悪化が認められなくなり、組織学

的な障害も軽度となっている。また、腎移植後の急性腎不全のモデルである虚血再灌流腎では、BLT1 を発現させた CHO 細胞が、障害の高度な腎皮髄境界領域に集積することが観察されている。これらのモデルより、LTB4 が腎障害の進行に関与することが示されていたが、ラット BLT1 の一次構造は不明であった。ラットを用いた動物モデルにおける解析を容易にする目的でラット BLT1 をクローニングし、解析を行った。

ラット BLT1 をラットゲノムライブラリーよりクローニングした。G タンパク質共役型受容体では第 2,7 細胞膜貫通領域の相同性が高いため、ヒト BLT の第 2,7 細胞膜貫通領域に相当する部分をもとにプライマーをデザインし、ラット腹腔内多核白血球 cDNA を鋳型とした PCR を行い、ラット BLT1 部分 cDNA を単離した。このラット BLT1 部分 cDNA (671bps) をプローブとしたプライクハイブリダイゼーションにより、ラットゲノムライブラリーからラット BLT1 全長をクローニングした。ラット BLT1 は 351 アミノ酸よりなる 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体と推定され、ヒト、マウス、モルモットの受容体と各々、80.2、93.2、71.6% の高いアミノ酸同一性を有していた。特に、リガンドの認識に重要であると推定されている第 2、7 細胞膜貫通領域のアミノ酸の配列は高度に保存されていた。また他の G タンパク質共役型受容体でも保存されており、細胞内情報伝達に重要と考えられている第 3 細胞内領域は、ラット、ヒト、マウスの間で完全に保存されていた。また、細胞膜外のジスルフィド結合を形成すると考えられる細胞外の 2 つのシステイン残基、DRY モチーフに相当すると考えられる DRS 配列や、NPXXY モチーフ、プロテインキナーゼ C のリン酸化ターゲットとなりうるセリン、スレオニン残基も存在した。

クローニングした受容体がラット BLT1 であることを確認するために、LTB4 結合解析を行った。ラット BLT1 ORF をサブクローニングした発現ベクターを HEK293 細胞にリポフェクション法にて強制発現させた。その膜画分を分離して、 $[^3\text{H}]$ LTB4 結合解析を行ったところ、有意な結合を認めた。スキッチャード解析にて、ラット BLT1 は LTB4 に対して解離定数 0.68 nM と特異的結合を示した。

ラットの臓器における BLT1 の発現をノーザンブロット法により検討した。カ

ゼインで誘導した腹腔内多型核白血球には BLT1 の発現を認めたが、脳、胸腺、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、小腸では発現が全く認められなかった。これらの正常臓器では BLT1 の発現を認めなかったが、BLT1 拮抗薬が有効であるラット病態モデルが報告されていることから、定常状態では発現していない BLT1 が、刺激により発現してくることが推測された。そこで、BLT1 発現誘導の有無を検討することとした。ラットの常在腹腔内マクロファージと、プロテオースペプトンの腹腔内投与により腹腔内に誘導されてきたマクロファージで BLT1 の発現をノーザンブロット解析で観察した。常在マクロファージでは BLT1 の発現がほとんど認められなかったのに対して、プロテオースペプトン誘導マクロファージでは著明な発現の増加を認めた。これらの結果より、BLT1 の発現は刺激により誘導されることが示唆され、他のインターロイキン-8 (IL-8)受容体やアンギオテンシン II 受容体と同様に転写レベルでの制御が行われていると想定された。

近年、BLT1 のプロモーター領域の解析により、基本転写因子が Sp1 であることが報告された。さらに、BLT1 転写領域のメチル化が BLT1 の発現を抑制しており、このメチル化が BLT1 発現の組織特異性に関係していると考えられている。しかしながら BLT1 の発現誘導のメカニズムは不明であったため、刺激誘導時の BLT1 転写制御の解析を行うこととした。培養細胞に様々な刺激を加えた時の BLT1 の発現量の変化をノーザンブロットにより検討した。マクロファージにザイモザン、リポポリサッカライド (LPS)、インターロイキン- $IL-1\beta$ (IL-1 β)、インターロイキン-5 (IL-5)、腫瘍壊死因子 (TNF- α)の刺激を加えると、好中球の走化性が増大するという報告があることより、マクロファージに同様の刺激を加えて、BLT1 の発現が誘導されるかを検討した。

まず、食刺激による BLT1 発現の変化を観察した。マクロファージ系である培養細胞 THP-1 細胞にザイモザンを食させ、食していることを蛍光顕微鏡、フローサイトメトリーで確認した。ザイモザンをオプソニン化することにより、THP-1 細胞の食能は約 10 倍に増加した。そこで、オプソニン化したザイモザンを THP-1 細胞に食させ、BLT1 の発現量の変化を時間を追ってノーザンブロットで解析したが、BLT1 の発現量に変化は認められなかった。次いで、THP-1

細胞に LPS 10 ng/ml、IL-1 β 10 ng/ml、IL-5 10 ng/ml、TNF- α 10 ng/ml を加え、同様に時間を追って、BLT1 の発現量の変化をノーザンブロット解析にて観察した。その結果、LPS、TNF- α で刺激した時に BLT1 の発現の増加が認められた。LPS、TNF- α 刺激による受容体発現誘導に関与している転写因子として Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) が知られており、ヒト BLT1 プロモーター領域に NF- κ B 結合部位と推定される塩基配列を認めることから、BLT1 の発現誘導に NF- κ B が関与している可能性が考えられた。NF- κ B については、最近のノックアウトマウスの研究により、免疫細胞の活性化、アポトーシスのコントロール、癌化に関与していることがしめされている。また、NF- κ B を阻害することにより、これらの病態が改善することが確認された動物モデルも報告されており、今後は NF- κ B 阻害による抗炎症作用を利用した治療法が期待されている。炎症時における BLT1 の誘導発現や、誘導発現時の転写における NF- κ B の関与は興味深い点である。

そこで、LPS 刺激による BLT1 の発現誘導に NF- κ B が関与しているかどうかを検討する目的で、NF- κ B 結合部位と推定される配列を欠失させたベクターを複製し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、NF- κ B が BLT1 の発現に関与していることを示唆する結果は得られなかった。今後も BLT1 の発現誘導に関しては更なる検討が必要と考えられる。