

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 戸田 晶子

本研究は、ラットロイコトリエン B4 受容体 (BLT1) をクローニングし、受容体の LTB4 結合能、臓器及びマクロファージにおける発現を検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒト BLT1 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(671 bps) を単離した。このラット BLT1 部分 cDNA 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 BLT1 全長を単離した。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、第 2、7 細胞膜貫通領域のアミノ酸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 細胞内領域も高度に保存されていた。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。

2. この受容体を HEK293 細胞にリポフェクション法にて強制発現させると、その膜画分は LTB4 に対して解離定数 0.68 nM の特異的結合を示した。

3. 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ところ、カゼイン腹腔内投与により浸潤してき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。

4. 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腹腔内投与による浸潤マクロファージで BLT1 の発現をノーザンブロット解析で観察した。常在性の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刺激による浸潤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た。

5. 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。THP-1 細胞に刺激として、ザイモザン食食、リポポリサッカライド (LPS)、インターロイキン- $IL-1\beta$ ($IL-1\beta$)、インターロイキン-5 ($IL-5$)、腫瘍壊死因子 ($TNF-\alpha$)を加え、BLT1 の発現量の変化を観察した。その結果、LPS、 $TNF-\alpha$ で刺激した際に BLT1 の発現の増加が認められた。

6. LPS 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- κB ($NF-\kappa B$)が知られており、ヒト BLT1 プロモーター領域に $NF-\kappa B$ 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 $NF-\kappa B$ が関与している可能性が考えられた。そこで、LPS 刺激による BLT1 の発現誘導に $NF-\kappa B$ が関与しているかどうかを検討するためにルシフェラーゼアッセイを行ったが、 $NF-\kappa B$ 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。

以上、本論文では、ラット BLT1 を単離し、受容体化学的な解析を行い、さらにその臓器分布とマクロファージにおける転写誘導を示した。ラット BLT1 の単離は今後の動物モデルを用いたロイコトリエン B4 の生体内の役割の解明に重要な貢献を成すものと期待され、学位の授与に値するものと考えられる。