

審査の結果の要旨

氏名 大嶋紀安

本研究では生体内での PAF の代謝における PAF 受容体の役割を明らかにする一端として、PAF 受容体欠損マウスの腹腔マクロファージを用いて PAF 代謝について検討した。さらにその受容体依存的な PAF 分解のメカニズムについて論じた。本研究により下記の結果を得ている。

1. PAF 受容体欠損マウスの PAF 分解能

マウスの腹腔マクロファージを調製し、トリチウムラベルされた PAF を用いることによりマクロファージによる PAF 分解を測定した。PAF 受容体ノックアウトマウスのマクロファージは野生型マウスに比べて PAF 分解能が大きく減少していた。PAF 受容体アンタゴニストを用いると野生型のマクロファージの PAF 分解能はノックアウトマウスと同程度まで減少した。これらの結果からマクロファージによる PAF 分解は PAF 受容体の存在によって促進される事が明らかとなった。

2. PAF と PAF 受容体のインターナリゼーション

受容体に結合した後の PAF の動態について検討を行った。マクロファージ上の受容体に結合した PAF が受容体とともに PAF がインターナリゼーションを起こし、その速度は、半減期約 1 分であることが分かった。細胞を受容体のインターナリゼーションを阻害するためにコンカナ

バリシン A、0.45 M ショ糖による高浸透圧ショック、あるいは phenylarsinoxyde で処理したところ PAF のインターナリゼーションの速度は著明に減少した。ショ糖処理によってほとんど完全に阻害されたことから、PAF 受容体はマクロファージにおいてクラスリン被覆小胞とともにインターナライズすると思われた。

3. 受容体に結合した後の PAF 代謝

受容体に結合した後の PAF の代謝を解析した。PAF のマクロファージによる代謝産物を抽出し、薄層クロマトグラフィー (TLC) によって分離、それぞれの代謝産物を定量した。マクロファージの細胞内へインターナライズした PAF は分解されて lyso-PAF を生じ、その後再アシル化されて 1-alkyl-2-acyl-PC に代謝されることがわかった。PAF 受容体のインターナリゼーションを ConA 処理によって阻害した。このとき PAF は時間が経つと分解されるが、その速度は処理しないものに比べて顕著に減少していた。それ故、受容体に結合した PAF が細胞内に素早く取り込まれることで分解が促進されるという機構の存在が示唆された。

4. PAF のアセチル基の行方

マクロファージの細胞内へ PAF がインターナライズした後、生じた lyso-PAF はマクロファージの外には放出されないが PAF のアセチル基 (酢酸など) はマクロファージから放出されることが示された。

5. PAF 分解酵素活性のマクロファージからの放出

PAF 受容体野生型と欠損型のマクロファージを PAF によって刺激したときの培養液中に放出される PAF アセチルヒドロラーゼ (PAF-AH) 活性を調べた。培養液中の PAF 分解酵素活性は PAF 刺激によって上昇することか分かった。受容体欠損型では PAF による酵素活性の増加は見られなかった。これらの結果は PAF 受容体の活性化によってマクロファージから PAF-AH が放出されることを示している。

6. PAF 分解酵素の検出

血漿型 PAF-AH および細胞質型 PAF-AH II のマクロファージでの発現をウェスタンブロットで検出した。この2つの PAF 分解酵素の発現は受容体野生型と欠損型の間で違いがなかった。それ故、野生型と欠損型のマクロファージの PAF 分解能の差は PAF-AH の発現量の違いが原因ではないと考えられた。

以上、本論文は PAF 受容体がマクロファージにおいて PAF 受容体が PAF と結合してインターナライズすることによって、また下流のシグナル伝達を介し PAF-AH の放出を促進することによって、PAF 分解を亢進することに関与していることを明らかにした。本研究は PAF 受容体の PAF 代謝における役割について重要な知見が得られたものであり、PAF 代謝のメカニズムの研究に重要な貢献をなすものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。