

論文の内容の要旨

論文題目 Studies on biosynthetic mechanisms for platelet-activating factor (PAF)

和訳 血小板活性化因子 (PAF) 生合成機構の解析

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12年4月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 進藤英雄

血小板活性化因子 (PAF) は血小板凝集だけでなく白血球の遊走、活性化、平滑筋の収縮など多彩な作用を多くの細胞、組織に及ぼす生理活性リン脂質であり、感染、免疫、アレルギーに大きく影響していると考えられている。生体内での PAF の産生は *de novo* とリモデリングの 2 種類の経路で行われており、PAF 産生細胞における PAF 産生量は定常時には低いが、病態時などに外部からの刺激を受けることによって、主にリモデリングの経路を通して顕著に増加する。リモデリング経路では、ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) により PAF 前駆物質であるリゾ PAF が細胞膜リン脂質から産生され、続いてリゾ PAF アセチル転移酵素によって PAF に変換される。しかし、生体内での PAF 産生経路については未だ不明な点が多く、リゾ PAF アセチル転移酵素は存在が確認されているものの、未だ精製されておらず、活性調節に関する情報も乏しい。今回私は、(1) カルシウム刺激による PAF 産生の調節について PAF 受容体、細胞質型 PLA₂α (cPLA₂α) の関与、(2) グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポポリサッカライド (LPS) 刺激においてリゾ PAF アセチル転移酵素の活性化の調節機構を調べるために実験を行った。

(1) 主に好中球からなるカゼイン誘導腹腔滲出細胞 (PEC) を本研究室で作製した cPLA₂αノックアウトマウス、PAF 受容体ノックアウトマウスから回収し、カルシウムイオノフォア (A23187) 刺激後の PAF 産生量を調べた。試料中の PAF 量の測定は、PAF 受容体と放射ラベルされた PAF 受容体アンタゴニスト [³H]WEB2086 の結合を、PAF が競合阻害する程度をもとに算出した。測定に用いた PAF 受容体を発現している膜画分は PAF 受容体を過剰発現させたトランスジェニックマウスの心臓、骨格筋から調製したものを、新規 PAF 定量法として確立した。好中球からの脂質の抽出には Bligh-Dyer 法を行い、さらに Sep-Pak Silica カラム (Waters) で PAF を含む画分を精製した。野生型 (WT) マウスの PEC では PAF 産生量の時間依存的増加が見られたが、cPLA₂αノックアウトマウスの PEC では、PAF 産生量の増加は全く見られなかった。一方、PAF 受容体ノックアウトマウスの PEC では WT マウスと同様に PAF 産生量が増加した。以上の結果から好中球における PAF 産生に cPLA₂αは必須であると考えられた (図 1)。また、この刺激条件 (A23187) 下での PAF 産生には PAF 受容体欠損はほとんど影響が無いと考えられた。

(2) WT、LPS 受容体 (TLR4) ノックアウトマウス、及び TLR4 の下流分子である MyD88 のノックアウトマウス腹腔マクロファージを用いてリゾ PAF アセチル転移酵素の活性調節機構を調べた。酵素活性の測定には、薬剤で所定の時間刺激したマクロファージを超音波処理し 10,000 x g 遠心後の上清を試料として用いた。試料とトリチウムラベルされたアセチル CoA の混合液に PAF 前駆物質であるリゾ PAF を添加し、37°C、7.5 分間反応した。反応生成物中、55%メタノール存在下で C8 レジンに吸着するものを回収し、その放射活性を測定した。ここからリゾ PAF 非存在下で得られる放射活性をバックグラウンドとして差し引いた値をリゾ PAF アセチル転移酵素活性とした。WT マクロファージを LPS で刺激すると 30 分後に酵素活性はピークに達した。種々の MAP キナーゼ阻害剤を用いた結果、LPS 刺激による酵素活性の上昇は p38 MAP キナーゼの阻害剤で抑制され、LPS 刺激による p38 のリン酸化も 30 分後をピークとしたため、この酵素は LPS 刺激後、p38 を介して活性化されていると考えられた。また、TLR4 ノックアウトマウス、MyD88 ノックアウトマウスのマクロファージでは LPS 刺激後 120 分間まで酵素活性の上昇は認められなかったため、この酵素は TLR4 と MyD88 依存的に LPS によって活性化されること

が示された。一方、この酵素は反応物の PAF によっても活性化され、活性のピークは PAF 受容体刺激後 15~30 秒と極めて短時間に到達した。TLR4 と MyD88 ノックアウトマクロファージも WT の結果と差は無く、また PAF による活性化には p38 MAP キナーゼの阻害剤は影響を与えなかった。続いて、LPS プライミング効果について調べた。マクロファージを LPS で処理し、続いて PAF 受容体を刺激した。LPS で 8 時間と 16 時間処理すると酵素活性が再び上昇したが、更に PAF 受容体を刺激すると酵素活性は数倍に上昇した。TLR4 ノックアウトマクロファージでは、このような活性上昇はみられなかったが、MyD88 ノックアウトマクロファージでは WT と同様に活性は上昇した。これらの結果からマウスマクロファージのリゾ PAF アセチル転移酵素活性は、(1) PAF 受容体刺激による“秒”単位の活性化、(2) LPS 刺激による MyD88、p38 MAPK 依存的な“分”単位の活性化、(3) LPS 刺激による MyD88 非依存的な“時間”単位の活性化 (図 2) の少なくとも 3 種類の経路で調節されていることがわかった。また、LPS 刺激後に続く PAF 受容体刺激による酵素活性の上昇は (3) のみで起きたことから、LPS プライミング効果による、PAF 受容体を介したリゾ PAF アセチル転移酵素活性化の促進は MyD88 非依存経路で調節されていることが明らかとなった (図 3)。

図1

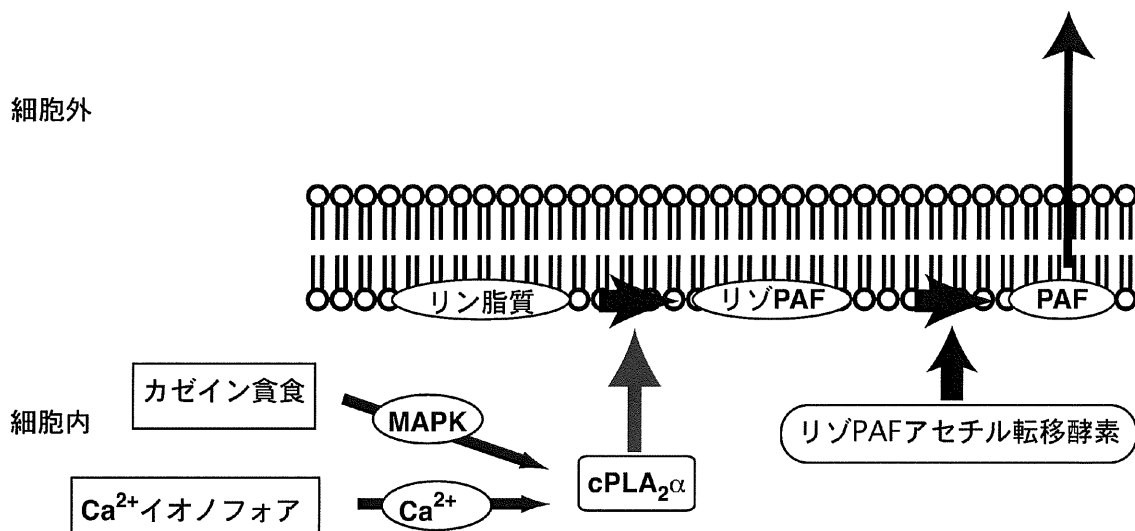


図2

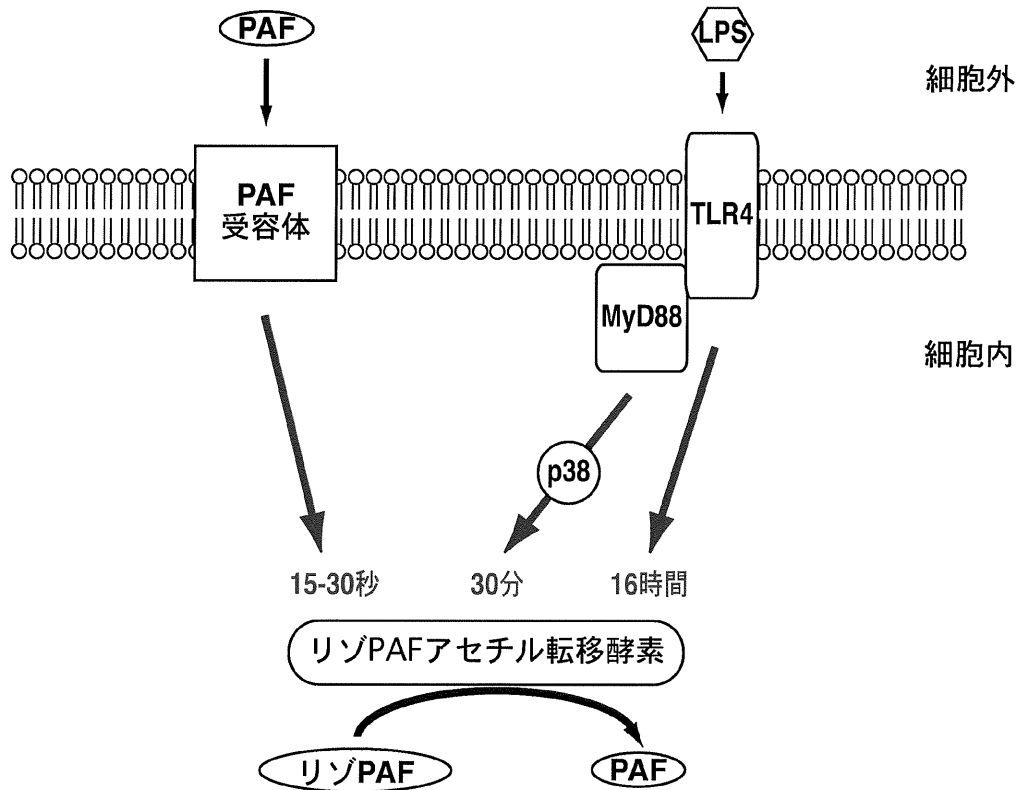


図3

