

論文の内容の要旨

論文題目

ロイコトリエン A4 水解酵素 –細胞内局在変化とその調節機構について–

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 井出義之

ロイコトリエン B4 (LTB4) は強力な炎症メディエーターであり、感染や生体防御、炎症性疾患に重要な役割を果たしている事が知られ、細胞外からの様々な刺激により以下の経路で産生される。細胞外刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇により細胞質型ホスホリパーゼ A2 α (cPLA2 α) が細胞質から核膜、小胞体膜、ゴルジ体に移行し、リン脂質二重膜からアラキドン酸を切り出す。切り出されたアラキドン酸は 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) を介し、同じく一過性の細胞内カルシウムの上昇により核膜に移行した 5-リポキシゲナーゼ (5-LO) に受け渡され、ロイコトリエン A4 (LTA4) へと変換される。LTA4 はロイコトリエン C4 (LTC4) 合成酵素により LTC4 へ、LTA4 水解酵素 (LTA4H) により LTB4 へと代謝される。cPLA2 α や 5-LO は細胞内局在やその制御機構が詳細に解析され、cPLA2 α は細胞内カルシウムの一過性の上昇と共に ERK1/2 によりリン酸化を受け、核周囲の膜系に移行する事が良く知られ、また非活性化状態の 5-LO は p38-MAPKAPK-2 により活性あるいは細胞内局在が制御されているといわれている。ところが、LTA4H に関しては、細胞内局在やその制御機構についてほとんど報告がない。そこで、本研究では LTA4H の細胞内局在やその制御機構に着目し、以下の結果を得た。

初めにオワンクラゲ蛍光タンパク質 enhanced green fluorescent protein (EGFP) とヒト LTA4H の融合タンパク質を細胞に発現させ、生細胞で EGFP-LTA4H の細胞内局在を観察した。その結果、CHO-K1 細胞、RBL-2H3 細胞では EGFP-LTA4H は細胞質優位に局在していたが、THP-1 細胞では細胞質、核質同等に局在し、EGFP-LTA4H が細胞種により異なる核質-細胞質間局在

比を示す事が分かった。

EGFP-LTA4H が核質あるいは細胞質に輸送される機構を解析するため、LTA4H の C 末端ドメインが連続した 9 個の α -helix からなり、核内移行ドメインとして知られている armadillo repeat と構造類似性がある事に着目し、EGFP と各 α -helix の deletion mutant の融合タンパク質を CHO-K1 細胞に発現させた。その結果、EGFP-LTA4H の細胞質局在には第 9 α -helix が、核内への局在には第 1 α -helix が必要であることが分かった。

更に EGFP-LTA4H の核質への局在は、EGFP-LTA4H を安定発現している CHO-K1 細胞の培地から血清を除去する事で誘導され、この核質-細胞質間局在比の変化はコントロールタンパク質の EGFP-LDH 融合タンパク質や、EGFP 単独では観察されない事から、LTA4H により引き起こされている現象である事が分かった。また、様々な阻害剤を用いた実験の結果から、EGFP-LTA4H の核質-細胞質間局在比は JNK/SAPK を介して制御されていることが示唆された。