

論文の内容の要旨

論文題目 新規に同定されたマクロファージコレステロールエステル水解酵素 (M-CEH) の特性と泡沫化改善における役割

指導教官 門脇 孝 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 五十嵐正樹

マクロファージの中性コレステロールエステル水解酵素(NCEH)活性を担う遺伝子は、これまでホルモン感受性リパーゼ(HSL)であると考えられていたが、HSL ノックアウトマウスの NCEH 活性はほとんどすべて残存しており、マクロファージでの NCEH 活性を担う他の酵素の存在が示唆された。当研究室では、マクロファージの主要な NCEH 活性を担う候補遺伝子としてマクロファージコレステロールエステル水解酵素(M-CEH)を同定した。

M-CEH は、マウスでは、マウス腹腔マクロファージ(MPM)で発現レベルが高い。しかし、RAW264.7 などの不死化細胞株では発現レベルは低く、むしろ HSL が優位である。M-CEH と HSL のタンパク発現量の比は MPM で 11:1、RAW264.7 で 1:1 であった。また、動脈硬化モデルマウスであるアポ E ノックアウトマウスの大動脈で免疫染色をおこなうと内膜に高い発現を認めた。ヒトでは、ヒト単球由来マクロファージで発現レベルが高く、単球から分化するに従い発現レベルは上昇する。

M-CEH が MPM の NCEH 活性の多くを担うことを確かめるために、MPM に M-CEH に対する siRNA を発現させて M-CEH のノックダウンをおこない、50%程度の NCEH 活性の低下を認めた。

また、アセチル化 LDL(acLDL)で泡沫化させた THP-1 マクロファージに、アデノウイルスを用いて M-CEH 遺伝子を過剰発現させ、泡沫化改善への寄与を検討した。300moi ではコントロールに比べて 9.8 倍 NCEH 活性の上昇を認めしたが、HSL アデノウイルスを感染させた場合に比べて活性は 14%であった。NCEH 活性の上昇に応じて、 $[^{14}\text{C}]$ oleate からのコレステロールエステル(CE)の合成は低下し、細胞内の CE 含量も低下を認めた。また、 $[^3\text{H}]$ cholesterol をとりこませた細胞からのコレステロール排出の増加を認めた。

HSL と M-CEH とはアミノ酸配列の相同性は 22.1%程度だが、機能ドメインは類似している。しかし、M-CEH では HSL でのリン酸化領域に対応する部位が存在しない。また、M-CEH は N 末に疎水性の 23 の連続するアミノ酸配列をもつ。HSL でのリン酸化領域に対応する領域が存在しないことは、M-CEH が

HSL と異なり、cyclic AMP による制御を受けないことに矛盾しない。疎水性の N 末端は、各種プログラム上、膜貫通領域ないしシグナルシーケンスとして機能するものと考えられる。

M-CEH は膜分画に局在する蛋白であるが、活性中心を含む領域が膜の内外いずれに存在するかについて検討した。低濃度の digitonin ないし saponin で MPM を処理した後に蛍光免疫染色を施行した場合に、saponin 処理では活性中心部を認識する M-CEH 抗体で M-CEH が認識され、低濃度 digitonin 処理では認識されなかった。このことは、M-CEH が膜の内腔に存在することを示唆した。また、M-CEH には N 結合型糖鎖が付加する可能性のある部位が 3 箇所あり、そのいずれも N 結合型糖鎖修飾を受けていることが脱糖鎖酵素やアミノ酸変異導入の実験により示された。このことも、M-CEH が膜の内腔に存在することを示唆した。

さらに、MPM での蛍光免疫染色で、M-CEH は小胞体(ER)に局在する PDI や ACAT1 と同様なパターンを示し、M-CEH が ER に局在することが確かめられた。

以上から、M-CEH は NCEH 活性をもち、マクロファージ泡沫化改善に関わることが示された。また、MPM およびヒト単球由来マクロファージで発現が高く、MPM では NCEH 活性を担う主要な酵素であることが示された。さらに、局在が ER の内腔であることから、主に細胞質で CE を分解する HSL とは異なる CE 分解のメカニズムとコレステロールの動態の存在が示唆された。