

審査の結果の要旨

氏名 五十嵐 正樹

本研究は、マクロファージの主要な中性コレステロールエステル水解酵素(NCEH)を担う候補遺伝子としてホルモン感受性リパーゼ(HSL)とは別に同定された、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、およびマクロファージ泡沫化改善における役割についての解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 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。
2. MPM で、アデノウイルスにより 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。
3. 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 活性の上昇を認めたが、HSL アデノウイルスを感染させた場合に比べて NCEH 活性は 14%であった。M-CEH 過剰発現による 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。
4. HSL と M-CEH とのアミノ酸配列の比較から、両者の機能ドメインは類似しているものの、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、という相違点がある。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。
5. M-CEH は膜分画に局在する蛋白であるが、低濃度の digitonin ないし saponin で MPM を処理した後に、活性中心部を認識する M-CEH 抗体による蛍光免疫染色を施行したところ、M-CEH の活性中心が膜構造の内腔に存在することを示唆する結果が得られた。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。

6. 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 と同様な局在パターンを示し、M-CEH が ER に局在することが示唆された。

以上、本論文は M-CEH が NCEH 活性をもち、マクロファージ泡沫化改善に関わることを明らかにした。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 の NCEH 活性を担う主要な酵素であることを明らかにした。さらに、M-CEH の局在が 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。本研究は、これまで未知であったマクロファージの主要な NCEH 活性を担う遺伝子の同定と、その機能の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。