

学位論文の内容の要旨

専攻	分子情報制御医学	部門	分子細胞医学
学籍番号	11D736	氏名	田井 達也
論文題目	Endogenous molecules stimulating <i>N</i> -acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA)		
<p>(論文要旨)</p> <p><研究の背景および目的></p> <p><i>N</i>-アシルエタノールアミンは種々の長鎖脂肪酸とエタノールアミンが縮合した構造を持つ脂質分子群であり、動物組織に微量ではあるが広く分布する脂質メディエーターの一種である。これらの分子には、アラキドノイルエタノールアミド (アナンダミド) やパルミトイルエタノールアミド、オレオイルエタノールアミド等が含まれ、それぞれカンナビノイド様生物作用、抗炎症・鎮痛作用、食欲抑制作用といった生物活性を示す。<i>N</i>-アシルエタノールアミンは体内で遊離脂肪酸とエタノールアミンに加水分解されて生物活性を失うが、この分解反応を担う酵素については、中性からアルカリ性で働き、膜に存在する脂肪酸アミド加水分解酵素(FAAH)が古くから知られており研究が進んでいる。一方、同一の分解反応を触媒するアイソザイムとして、リソソームに存在する <i>N</i>-アシルエタノールアミン水解酸性アミダーゼ(NAAA)も知られている。本酵素はもっぱら酸性条件で機能し、特にパルミドイルエタノールアミドと高い反応性を示すことから、NAAA の特異的阻害剤は抗炎症・鎮痛薬としての応用が期待されている。本酵素の酵素活性を <i>in vitro</i> で促進する物質として、非イオン性界面活性剤である Triton X-100 や Nonidet P-40、および SH 還元剤のジチオトレイトールが知られている。しかし、これらの化合物は天然には存在せず、生体内で活性の促進に関わる物質はこれまで不明であった。そこで我々は内因性のリン脂質やチオール化合物について、組み換えラット NAAA に対する活性促進効果を検討した。</p> <p><方法></p> <p><u>組み換えタンパク質の調製</u></p> <p>ラット NAAA を強制発現させた HEK293 細胞の顆粒画分を凍結融解し、可溶化された画分を用いた。組み換えタンパク質の発現は抗 NAAA 抗体を用いたウェスタン・ブロッティング法により確認した。</p>			

NAAA活性の測定

NAAA活性の測定は、種々の活性促進候補分子の存在下で脂肪酸鎖を¹⁴Cで放射標識したパルミトイルエタノールアミドを基質として用い、37°C、pH4.5で30分間行った。反応終了後に、基質と反応生成物である[¹⁴C]パルミチン酸をクロロホルム-メタノール-28%アンモニア水溶液 混液(80:20:2, v/v)によって抽出した。次に、薄層クロマトグラフィーを用いて両者を分離し、バイオイメーjingアナライザー BAS1500でこれらの放射活性を定量した。

FAAH欠損マウスにおけるNAAAの発現レベルの検討

FAAH欠損マウスの体内で、同一の反応を触媒するNAAAが代償的に誘導されるか検討する目的で、本変異マウスの種々の臓器におけるNAAAの発現レベルを検討した。すなわち、種々の臓器から総RNAを抽出し、逆転写反応によりcDNAを調製し、NAAA特異的プライマーを用いたリアルタイムPCR法によってNAAA mRNAの発現レベルについて検討を行った。

<結果・考察>

種々のリン脂質のうち、コリンやエタノールアミンを含有するリン脂質（ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン）が強くNAAA活性を促進し、PCでは3 μM~1 mMの範囲で濃度依存的に活性を6.6倍まで上昇させた。次に種々の内因性チオール化合物を比較検討したところ、ジヒドロリポ酸（還元型α-リポ酸）が最も強力な促進効果を示し、0.1~1 mMで活性を8.5~9.0倍に上昇させた。以上の結果から、内因性のリン脂質やジヒドロリポ酸がリソソームに局在するNAAAの活性化に貢献している可能性が考えられた。さらにFAAH欠損マウスの種々の臓器におけるNAAA mRNAの発現レベルを検討したが、解析した全ての臓器において野生型マウスと比べて有意な差は見られなかった。

<結論>

内因性のリン脂質やジヒドロリポ酸が、リソソームに局在するNAAAの活性化に貢献している可能性が考えられた。また、FAAH欠損マウスでは、検討した全ての臓器において代償的なNAAAの誘導は認められなかった。

掲載誌名	ACS Chemical Neuroscience			第 3 巻, 第 5 号
(公表予定) 掲載年月	平成24年 3月	出版社(等)名	ACS Publications	
Peer Review	有			無

(備考) 論文要旨は、日本語で1, 500字以内にまとめてください。