

学位論文の内容の要旨

専攻	分子情報制御医学	部門	病態制御医学
学籍番号	13D737	氏名	佐倉 雄馬
論文題目	A quantitative study on splice variants of <i>N</i> -acylethanolamine acid amidase in human prostate cancer cells and other cells.		
<p>(論文要旨)</p> <p>【背景および目的】 <i>N</i>-アシルエタノールアミンは抗炎症・鎮痛・食欲抑制作用を示す脂質メディエーターであり、近年、癌細胞の増殖抑制作用が報告されている。「<i>N</i>-アシルエタノールアミン水解酸性アミダーゼ (NAAA)」は <i>N</i>-アシルエタノールアミンを加水分解するリソソーム酵素であり、前立腺癌細胞株で豊富に発現していてその発現強度が前立腺癌の悪性度と負に相関するという報告もある。ヒト NAAA mRNA には 3' 側が異なる複数のスプライスバリエントが存在するが、その発現解析はほとんど行なわれていない。本研究では NAAA mRNA の各バリエントを個々に測定する定量的 PCR (qPCR) 法を開発し、種々の前立腺癌細胞株を含む多種類の細胞に適用した。また、バリエントから翻訳された蛋白質の翻訳後修飾・酵素活性についても検討した。</p> <p>【方法】</p> <p>1) NAAA mRNA 総量の測定 ヒト前立腺癌細胞株 (PC-3, LNCaP, AI-LNCaP, DU145, VCaP)、正常前立腺上皮細胞 (PrEC)、他のヒト由来細胞株 (THP-1, MCF-7, HeLa, HEK293, CMK) における NAAA mRNA の全スプライスバリエントの総量を qPCR 法で定量した。</p> <p>2) 主要なスプライスバリエントの定量 NAAA mRNA 総量が最も多かった LNCaP 細胞を用いて、conventional PCR で発現量の多かった 4 種類のスプライスバリエントを同定して a1, a2, b2, c2 と名付け、各々に特異的なプライマーを用いた qPCR 法を開発した。本法を用いて前述の細胞株で各バリエントの発現量を定量・比較した。</p> <p>3) バリエントから翻訳された蛋白質の解析 NAAA は前駆体蛋白質 (不活性型) が自己触媒により限定分解を受けて成熟体となる。a1 と a2 から翻訳される同一蛋白質 (アイソフォーム A) と、b2 と c2 から翻訳される蛋白質 (それぞれ B および C) を HEK293 細胞に強制発現させ、Western blotting 法で前駆体と成熟体の発現を解析し、酵素活性も評価した。</p> <p>4) C 末端変異体の解析 アイソフォーム B と C は構造類似蛋白質間で高度に保存されている Leu-325 と Thr-335 を欠いているので、アイソフォーム A の点変異体 L325A, L325T, T335A, T335V を HEK293 細胞に強制発現させ、前項と同様に発現量と酵素活性を解析した。</p>			

【結果】

- 1) NAAA mRNA の総量は LNCaP で最も多く、HeLa が最も少なかった。アンドロゲン感受性前立腺癌細胞である LNCaP, VCaP で発現量が多く、非感受性細胞である AILNCaP, DU145, PC3 では少なかった。
- 2) 4 種のバリエント a1, a2, b2, c2 の発現量を解析すると、いずれの細胞株でも a1 が最も多量に存在していたが、各バリエントの発現割合は細胞株毎に異なっていた。
- 3) アイソフォーム A, B, C の前駆体は全て検出されたが、成熟体は A にしか認められなかった。酵素活性も A のみで検出された。
- 4) 前駆体はすべての点変異体で検出されたが、成熟体は L325A と L325T でわずかしか検出されず、T335A と T335V ではまったく検出されなかった。酵素活性も L325A と L325T でのみわずかに検出された。

【考察】

NAAA mRNA の総量がアンドロゲン感受性細胞株で非感受性細胞より多かったことから、アンドロゲンに対する細胞応答と NAAA の関連が示唆された。4 種類のスプライスバリエントの発現割合には細胞間で多少の差が認められた。NAAA 蛋白質の L325 と T335 が酵素機能に重要であることが判明し、阻害薬の開発に役立つ可能性が考えられた。

掲載誌名	Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids 第 1861 巻, 第 12 号		
(公表予定) 掲載年月	2016 年 10 月	出版社(等)名	ELSEVIER
Peer Review	① . 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。