

論文の内容の要旨

論文題目

リゾホスファチジン酸産生酵素リゾホスホリパーゼ D の精製および性状解析

後藤 (梅津) 牧子

【序】

リゾホスファチジン酸(LPA)はグリセロール骨格のsn-1位あるいは2位にアシル基、3位にリン酸基をもつ生理活性脂質である。その単純な構造にも関わらず、LPAが示す生理的機能は細胞増殖促進、血小板凝集、血圧変動など多岐に渡り、最近では癌や動脈硬化といった病態への関与も指摘されている。近年、LPA特異的受容体 Endothelial cell Differentiation Gene(EDG)2、4、7が同定された。EDG受容体はG蛋白質共役型受容体(GPCR)である。LPAが示すさまざまな生理活性はこれらEDG受容体と、それぞれ異なるG蛋白質を介して起こると考えられており、LPAの作用機序については序々に明らかにされつつある。しかし、その一方でLPAの産生機構についてはいまだ不明な点が多く残されている。

LPAには大別して①細胞が合成・分泌する系と②体液中で産生される系の2つの経路が想定されている。①は活性化血小板や繊維芽細胞などの細胞膜上に存在するホスファチジン酸(PA)にホスホリパーゼA1あるいはA2が働いてLPAを産生する系であり、②は血小板が活性化した際に生じたリゾホスファチジルコリン(LPC)、あるいは血中に存在するLPC(肝臓やリポ蛋白質由来で数100mMという高濃度で存在する)に血中のリゾホスホリパーゼD(lysoPLD)が作用することにより産生される系である(Fig.1)。lysoPLDは血中LPA産生のkey enzymeであると考えられるが、現在までその同定には至っていなかった。本研究において私はlysoPLDの精製およびcDNAクローニングを行い、本酵素の性状解析を行った。

2. lysoPLDのcDNAクローニング

最終精製標品をTCA沈殿した後、SDS-PAGE、CBB染色を行い、約100kDaの位置のバンドを切り出した。リジルエアドペプチダーゼ処理を施した後、3つのペプチドについてMALDI TOF MASSで分子量を測定し、エドマン分解で部分アミノ酸配列を決定した。その結果、3つのペプチド配列を得た。この配列をもとにデータベースサーチを行い、RT-PCR法により本酵素をコードすると考えられるcDNAをクローニングした。cDNAから予想されるlysoPLDのアミノ酸配列のN末側には疎水性配列が見いだされ(12~30番アミノ酸)、本酵素は分子量約100kDaのII型膜蛋白質であると予想された(Fig.4)。

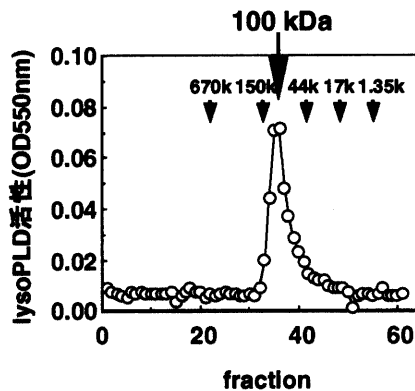


Fig.3 最終精製標品を用いたゲル濾過 (Superdex 200)のカラムパターン

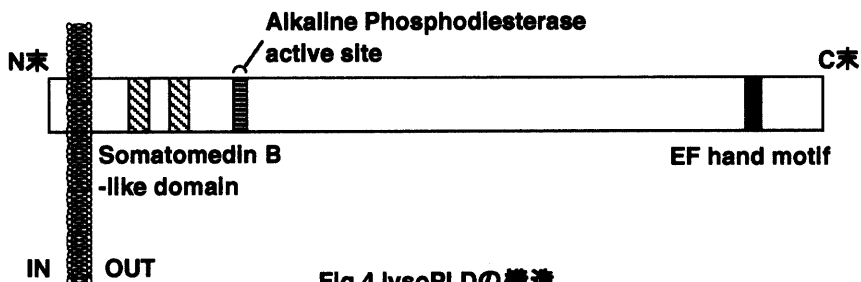


Fig.4 lysoPLDの構造

しかし、C末にmyc-tagを付けたコンストラクトを作成し、CHO-K1細胞に一過的にトランスフェクトすると、C末側約800アミノ酸に相当する部分が効率よく培養上清中に放出されることがわかった。そこで培養上清を用いてlysoPLD活性を調べた。その結果、一過的にトランスフェクトしたCHO-K1細胞の培養上清中のlysoPLD活性が上昇していることが確認され、得られたcDNAがlysoPLDをコードしていることが示された (Fig.5)。

3. lysoPLDの性状解析

次に、lysoPLDの性質について検討した。lysoPLDの至適pHは約9.0であり、カルシウムイオン存在下で酵素活性が上昇することがわかった。基質特異性について検討したところ、LPCは分解したが2本のアシル鎖をもつPCはほとんど分解しなかった(Fig.6A)。LPCの脂肪酸種による違いをみると、14:0-LPCが最もよい基質となり、次いで12:0、18:2-LPCの順に分解した。20:0-LPCはあまり分解しないが、20:4-LPCはegg-LPCと同程度分解することがわかった (Fig.6B)。

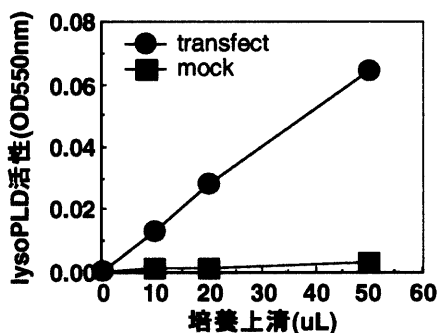


Fig.5 lysoPLDの活性確認

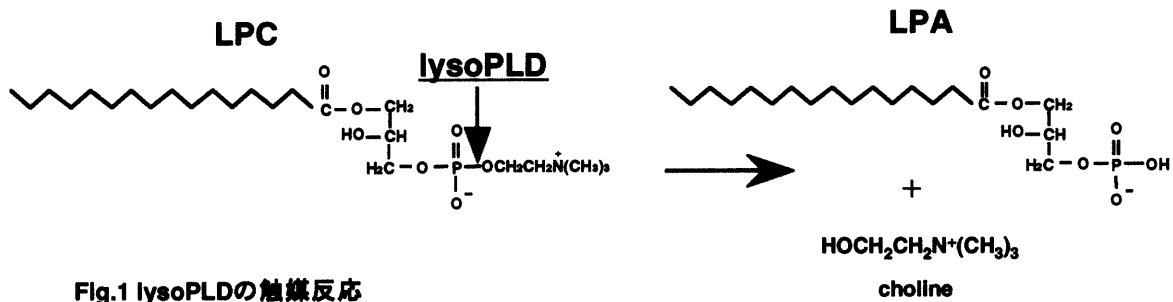


Fig.1 lysoPLDの触媒反応

【方法と結果】

1.lysoPLDの精製

lysoPLD活性測定は、LPCを基質とし、遊離してくるコリンをコリンオキシダーゼで処理し、産生される過酸化水素を定量する方法を改良して行った。

各種動物由来の血漿や血清中の活性を測定した結果、検討した全ての動物種でlysoPLD活性が検出された。中でも最も比活性が高かったウシ胎児血清 (FCS) を出発材料としてlysoPLDの精製を行うことにした。精製は5~10%ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿、Blue Sepharose、Con A Sepharose、Bio-Assist Q (イオン交換)、Heparin Sepharose、RESOURCE PHE (疎水性カラム)、Hydroxyapatiteカラムの順に計6本のカラムクロマトグラフィーにかけて行った。カラムクロマトグラフィーの各段階において、

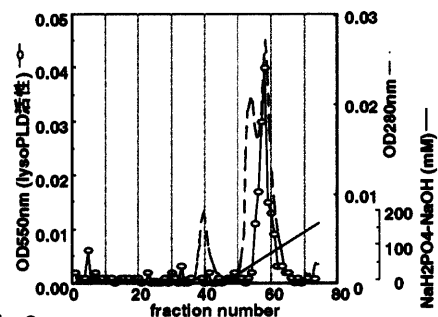


Fig.2 最終段階Hydroxyapatiteカラムクロマトグラフィーのカラムパターン

活性は単一のピークとして検出されたため、FCS中のlysoPLD活性を担っている酵素は1種類であると考えられた (Fig.2)。最終的に約4,400倍の精製標品が得られ (Table 1)、SDS-PAGEの結果、約100kDaの位置に活性と挙動を共にするバンドが検出された。最終段階のHydroxyapatiteカラムの活性フラクシあるいはFCSをゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Superdex 200) にかけた場合にも、共に活性は単一のピークとして検出され、その分子量は約100kDa

であると算出された (Fig.3)。これらの結果から、約100kDaのバンドがlysoPLDの候補と考えられたので、次に部分アミノ酸配列を決定を行っ

	Total Activity (nmol/min)	Total protein (mg) [%]	Specific Activity (nmol/min/mg)	Purification (-fold)	Recovery (%)
FCS	7921.7	68300	0.116	1	100
PEG	1132.1	3720	0.3	2.6	14.3
Blue con A	1184.1	310.8	3.8	32.6	14.9
BioAssist Q	803.8	40.3	19.9	171.6	10.4
Heparin	297.5	9.25	32.2	277.6	3.8
RESOURCE PHE	151	3.6	41.9	361.6	1.9
HAT	134.3	0.2	371.5	3202.6	1.7
	34.1	0.0668	510.5	4400.9	0.43

Table 1 精製Table

LPC以外にsn-3位にホスホコリンをもつ脂質(血小板活性化因子(PAF)やLyso PAF、スフィンゴシルホスホリルコリン(SPC))についても、LPCと比較すると低めではあるが分解活性を示した(Fig.6C)。

【まとめと考察】

私はLPA産生酵素である血清中lysoPLDの精製、クローニングに初めて成功した。興味深いことに本酵素はII型膜蛋白質として発現したものが、切り出され血中に放出されて機能すると考えられた。CHO-K1細胞では形質膜に発現した本蛋白質のほとんどが切り出されていたが、その切り出されるメカニズムについては今後の課題である。

血中には数100 μ Mという高濃度のLPCが存在する。本酵素は生体内においてこのLPCを主な基質とし、LPAを産生しているものと考えられる。LPAは血清中の主要な増殖因子であり、血漿中にも1 μ M以下の濃度で常に存在している。lysoPLDはこの血漿中LPAレベルを維持することにおいて、重要な役割を果たしていると考えられるが、今回、lysoPLDの実体が明らかになったことで、血中に存在するLPAの生理的意義やその調節機構の解明が期待される。さらに、LPAの関与が示唆されている病態(癌や動脈硬化など)と本酵素との関係などについても今後の興味深い課題である。

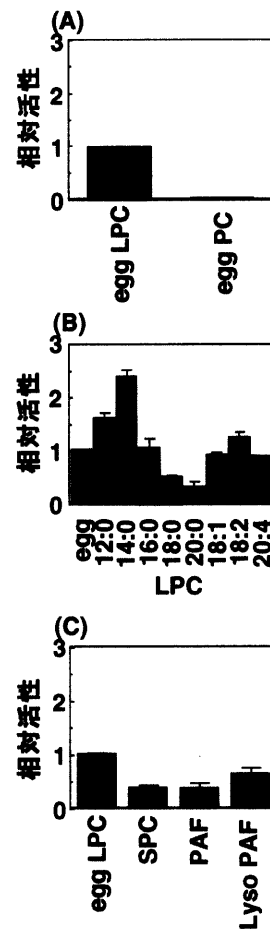


Fig.6 lysoPLDの基質特異性