

## 審査の結果の要旨

氏名 後藤（梅津）牧子

リゾホスファチジン酸（LPA）は、非常に単純な構造をもつ生理活性脂質であり、その生理活性は細胞増殖促進、血小板凝集、平滑筋収縮をはじめ、多岐に渡ることが知られている。また最近では LPA がガンや動脈硬化症といった病態に関与している可能性が指摘されている。

近年、LPA 特異的受容体として G 蛋白質共役型受容体（GPCR）である Endothelial cell Differentiation Gene (EDG) 2、4、7 が次々と同定されてきた。LPA のもつさまざまな生理活性は、これらの受容体とそれぞれ異なる G 蛋白質を介して発揮されることが明らかになっており、LPA の作用機序は徐々に明らかになりつつある。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 の産生には、大きく分けて 2 つの機構（細胞由来および体液系由来）が存在すると考えられている。1 つは血小板や繊維芽細胞、脂肪細胞などの細胞膜上で産生されたホスファチジン酸が、ホスホリパーゼ A1 (PLA1) あるいは PLA2 の作用により LPA に変換され、細胞外に放出される系であり、もう 1 つは細胞外で血液中のリゾホスファチジルコリン (LPC) が LPA に変換される系である。血液中には肝臓やリポ蛋白質、活性化血小板に由来する LPC が常に数 100  $\mu$ M という高濃度で存在している。これらの LPC は血液中に存在するリゾホスホリパーゼ D (lysoPLD) と呼ばれる酵素により、LPA に変換されると考えられている。

lysoPLD は、LPC の極性頭部のコリンを遊離させ、LPC を LPA に変換する酵素である。本酵素は LPA 産生においてキー・エンザイムであると考えられており、いくつかの性状解析はなされてきたが、これまでその同定には至っていなかった。「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」と題した本論文においては、ウシ胎児血清中からの lysoPLD の精製を行い、本酵素の実体を明らかにし、その性状について検討を行っている。

## 1. lysoPLD の精製および cDNA クローニング

本論文ではまず、ウシ胎児血清を出発材料としてポリエチレングリコール沈殿の後、Blue Sepharose、Con A Sepharose、BioAssist Q (イオン交換)、Heparin Sepharose、RESOURCE PHE (疎水性カラム)、Hydroxyapatite カラムの順に6本のカラムクロマトグラフィーを用いて lysoPLD の精製を行っている。その結果、最終的に約 4,400 倍の精製標品が得られた。

精製標品を用いて、lysoPLD の候補と思われるバンドのアミノ酸配列を決定したところ、既知のヌクレオチド代謝酵素である Autotaxin (ATX) であることが明らかとなった。

## 2. lysoPLD / ATX の基質特異性

次にラットの lysoPLD / ATX の cDNA クローニングを行い、CHO-K1 細胞に一過的に過剰発現させ、その培養上清を用いて lysoPLD / ATX の基質特異性について検討している。その結果 lysoPLD / ATX は1本の脂肪酸鎖のみをもつ LPC は、検討した全ての脂肪酸についてその種によらず基質としたが、2本の脂肪酸鎖を有するジアシル型のホスファチジルコリン (PC) は基質としないことがわかった。また、本酵素は LPC 以外のホスホコリン含有脂質であるスフィンゴシルホスホリルコリン、血小板活性化因子 (PAF)、lysoPAF も基質とすることがわかった。

さらに、lysoPLD / ATX には2つのホモログ分子 (NPP-1 および NPP-3) が存在し、5'-ヌクレオチドピロホスファターゼ / ホスホジエステラーゼファミリー (NPP ファミリー) を形成することが知られているが、これらホモログ分子は lysoPLD 活性を持たないことがわかった。

以上を要するに、本研究は細胞外の LPA 産生機構において重要と考えられてきた酵素 lysoPLD の実体を初めて明らかにし、生理的基質が不明なままであったヌクレオチド代謝酵素 ATX において脂質性分子という新たな生理的基質の候補を示している。本研究は、血液中の LPA 産生機構解明に大きな前進をもたらすだけでなく、LPA の生体内における存在意義やその調節機構の解明、さらには LPA が関与すると考えられる病態の研究においても大変重要な意味をもつと考えられ、博士 (薬学) の学位論文として十分な価値があるものと認められる。