

論文の内容の要旨

論文題目

哺乳動物細胞のホスファチジルセリン合成酵素の機能発現に関する遺伝生化学的研究

氏名

大澤 智子

生体膜は、細胞が形態・機能を維持する上で極めて重要な構造体であり、リン脂質は、タンパク質とともに主要成分としてその構築に関与する。各生体膜或いはその中の限局された領域におけるリン脂質組成はそれぞれに特有であり、しかも厳密に制御、維持されている。しかし、その背景にある分子機構には、未だ不明確な点が多い。

ホスファチジルセリン (PS) は、哺乳動物細胞の生育に必須なグリセロリン脂質の一つであり、リン脂質全体の約 10% を占める。形質膜においては主に細胞質側に局在し、プロテインキナーゼ C、Raf-1 プロテインキナーゼ、myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS)、血液凝固第 V 因子、シナプトタグミン、NO 合成酵素など、種々のタンパク質と相互作用してその挙動や機能を調節する。また、脂質メディエーターと目されるリゾホスファチジルセリンの前駆体である一方、アポトーシス誘導細胞においてはその表面に露出してマクロファージによる排除のシグナルとなるなど、様々な生理機能を担っている。

PS は、哺乳動物細胞においては既存のリン脂質と遊離セリンを基質とする塩基交換反応により生合成される。チャイニーズハムスターの PS 合成酵素 (PSS) には、PSS1 および PSS2 の少なくとも 2 種があり、前者はホスファチジルコリン (PC) を、後者はホスファチジルエタノールアミン (PE) をそれぞれ基質とする。ともに cDNA が単離されており、両者のアミノ酸

配列上には、約 32%の類似性が認められる。いずれも疎水性が高く、膜を複数回貫通する膜内在性酵素と予測され、この性質がこれら両酵素の精製並びに三次元構造解析を困難なものとしている。一方、これらの酵素には、バクテリア或いは酵母の PS 合成酵素を含め、他の既知タンパク質とのアミノ酸配列上の類似性が認められず、機能が予測されるモチーフ或いはドメイン構造などは見出されていない。

PS 合成は、PS によるフィードバック調節を受けることが明らかとなっている。CHO-K1 細胞を PS 添加培地で培養すると、PS 合成は著しく抑制される。また、膜画分を酵素源とした解析から、両酵素の PS 合成活性は PS により著しく阻害され、その調節は蛋白量や mRNA 量の変化によらないことが判明した。一方、PS によるフィードバック調節の変異株#29 が単離され、その遺伝子解析を基に、PSS1 の Arg-95 及び PSS2 でこの残基に相当する Arg-97 が、PS によるフィードバック調節に極めて重要なアミノ酸残基であることが明らかとなった。しかし、それ以外、活性または PS によるフィードバック調節に重要な残基は全く不明であった。

そこで、私は、PS の生合成及びその調節機構の分子メカニズムをより詳細に解明することを目的に、遺伝生化学的手法を用いて、PSS1 の酵素活性及び PS によるフィードバック調節に重要なアミノ酸残基を同定し、また、精製 PSS2 に対する PS の阻害作用について解析した。

1. PSS1 の酵素活性及び PS によるフィードバック調節に関わるアミノ酸残基の同定

PSS1 と PSS2 はそれぞれ 471、474 アミノ酸残基のタンパク質であるが、うち 138 アミノ酸残基を共有している。私は、これらのうち極性アミノ酸 66 残基を逐一アラニンに置換した変異型 PSS1 の cDNA クローンを作製し、CHO-K1 細胞に一過性に過剰発現させて野生型 PSS1 の cDNA 或いは空ベクターを導入した場合と比較することにより酵素活性或いは活性制御に関わるアミノ酸残基を同定した。各変異の及ぼす影響について、酵素活性に関わるアミノ酸残基に関しては細胞ホモジェネート中のセリン塩基交換活性を指標に、また、活性調節に関わるアミノ酸残基に関しては PS によるフィードバック調節を指標に評価した。

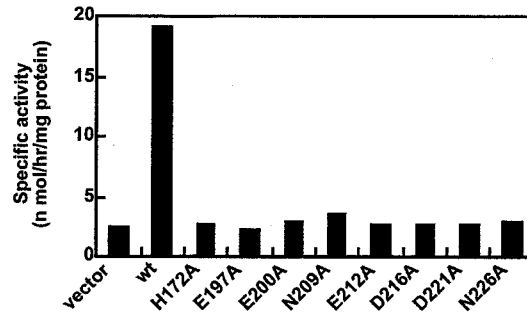
(1) 酵素活性に関わるアミノ酸残基

多くのアラニン置換変異型 PSS1 は、野生型 PSS1 同様、発現させるとその細胞ホモジェネート中のセリン塩基交換活性の上昇をもたらすが、His-172、Glu-197、Glu-200、Asn-209、Glu-212、Asp-216、Asp-221、Asn-226 のアラニン置換変異型 PSS1 は発現させても空ベクター導入時と活性がほぼ同じであった (図 1)。PSS1 は *in vitro* でセリン以外にコリン、エタノールアミンの塩基交換活性も有するが、前述の 8 種の変異型 PSS1 のうち、Asn-209 のアラニン置換型では、セリン塩基交換活性のみが失われ、コリン、エタノールアミン両塩基交換活性は十分に有

していた。他の7種の変異型では、全ての塩基交換活性が失われていた。従って、Asn-209は、セリンの基質認識に関わることが示唆された。これら8アミノ酸残基は、いずれもこの酵素の疎水分析図上、疎水性の高い領域に集中しており、膜の脂質二重層内或いはその近傍に位置している可能性が示唆された。

図1 活性低下型変異 PSS1

野生型(wt)および変異型 PSS1 を発現した細胞ホモジェネート中のセリン塩基交換活性。vector は空ベクター導入時。

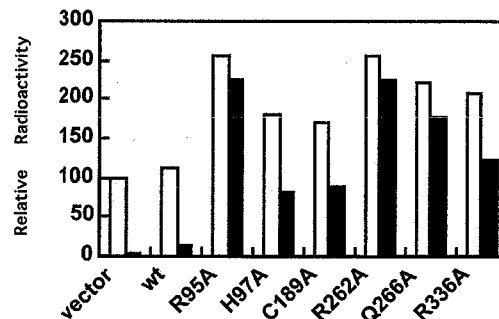


(2) 酵素活性調節に関わるアミノ酸残基

Arg-95、His-97、Cys-189、Arg-262、Gln-266、Arg-336 をアラニン置換した変異型 PSS1 を発現させた細胞では、細胞当たりの PS 合成量が増加すると同時に、培地に添加した PS による PS 合成のフィードバック調節を受けにくくなっていた (図 2)。また、これらの細胞より調製したホモジェネート中のセリン塩基交換活性も、PS により阻害されなかった。従って、これらの6アミノ酸残基はPSによるPSS1の酵素活性調節に関わるものと考えられる。なお、Cys-189を除く5アミノ酸残基は、この蛋白の親水性領域と疎水性領域の境目に存在していた。また、これらの変異が活性には影響を及ぼさなかったことより、本酵素の活性調節部位は活性中心とは別に存在することが示唆された。

図2 調節異常型変異 PSS1

PS 非添加培地 (□)、添加培地 (■) における細胞あたりの PS 合成量を、空ベクター導入細胞の PS 非添加培地における PS 合成量を 100% として相対的に示した。



(3) PSS1 の発現或いはその安定性に関わるアミノ酸残基

Tyr-111、Asp-166、Arg-184、Arg-323、Glu-364 の5アミノ酸残基のアラニン置換変異型 PSS1

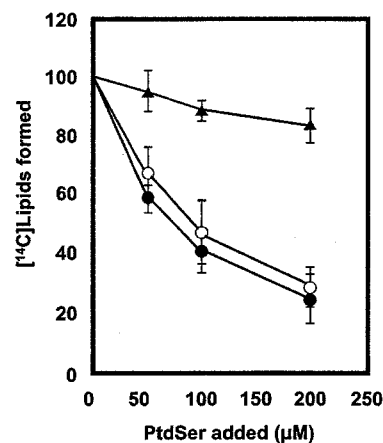
を発現させた細胞においても、細胞のホモジェネート中のセリン塩基交換活性は空ベクター導入細胞の場合とほとんど変わらなかった。しかしながら、これらの細胞においては変異型 PSS1 の発現量が顕著に低くなっていた。従って、置換したアミノ酸残基がこの蛋白の発現或いは安定性に関わっている可能性が考えられる。

2. 精製 PSS2 による解析

PS による PS 合成阻害作用のメカニズムを明らかにする上で、精製酵素を酵素源とする解析が望ましいと考えられる。FLAG および HA ペプチド標識したチャイニーズハムスター-PSS1 (FH-PSS1) 及び PSS2 (FH-PSS2) の精製を試みた結果、後者が SDS-PAGE 上ほぼ単一の標品として得られたことから、その性状を解析した。精製 PSS2 の PS 合成活性は、細胞の膜画分中の未精製酵素の活性同様に PS により阻害された。この時、PS 添加培地において PS 合成が阻害されない細胞より調製した膜画分中の PS 合成活性は、PS で阻害されなかった (図 3)。また、PC、PE は精製酵素の活性を阻害しなかった。これらの結果から、PS が PS 合成酵素に特異的に直接相互作用してその活性を調節することが示唆された。

図 3 PS の酵素活性阻害作用

PS 各濃度存在下の精製 FH-PSS2 (●)、FH-PSS2 を発現した細胞の膜画分 (○) 及び R97K 変異 PSS2 を発現した細胞の膜画分 (▲) による脂質への標識セリンの取り込みを、PS 非存在時をそれぞれ 100% として示した。



3. まとめ

本研究により、チャイニーズハムスター-PSS1 の活性中心は、PS による活性調節部位とは別に存在していることが示唆された。また、Asn-209 はセリン基質特異性に関わるアミノ酸残基であることが示唆された。また、PSS1 と PSS2 は同様な調節機構により制御されるものと考えられることより、PS 合成酵素は PS の直接作用によりその活性が制御され、この機構が細胞内の PS 量を維持する上で、極めて重要であることが示唆された。これらの知見は細胞において PS をはじめとするリン脂質の組成が厳密に保たれる分子機構を解明する上で重要な手掛かりになるものと考えられる。