

審査の結果の要旨

氏名 大澤 智子

リン脂質は、タンパク質とともに生体膜の主要な構成成分であり、各生体膜におけるリン脂質組成は、それぞれに特有かつ厳密に制御・維持されている。しかしながら、その背景にある分子機構は未だ不明確な点が多い。大澤は、リン脂質全体の約10%を占め、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るホスファチジルセリン(PS)の生合成機構に着目した。PSは、形質膜においては主に細胞質側に局在して種々のタンパク質と相互作用し、その挙動や機能を調節する一方、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うことが知られている。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、触媒酵素としてPS合成酵素(PSS)1及びPSS2があり、いずれによるPS合成反応も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。しかしながら、触媒酵素における活性発現或いはPSによるフィードバック調節に重要なアミノ酸残基など、分子機構の詳細はほとんど知られていない。そこで、大澤は、PSの生合成及びその調節の分子機構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。

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。大澤は、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。

その結果、大澤は、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細胞ホモジェネート中の活性がほぼ同じであることを見出した。また、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ること、他の7種の変異型では、全ての塩

基交換活性が失われることを明らかにし、Asn-209 が PSS1 のセリンの基質認識に関わる可能性を示した。また 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いることに着目し、これらが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を示した。

一方、大澤は、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ること、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 により阻害されないことを示し、これらの 6 アミノ酸残基が PS による PSS1 の酵素活性調節に関与することを明らかにした。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から、本酵素の活性調節部位が活性中心とは別に存在することを示唆した。

さらに、大澤は、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いが、これらの変異型 PSS1 発現細胞においては変異型 PSS1 の発現量が顕著に低下していることを見出した。このことから、置換したアミノ酸残基がこのタンパク質の発現或いは安定性に関わっている可能性を示した。

次に、大澤は 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、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。その結果、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 により阻害されること、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 で阻害されないこと、また、ホスファチジルコリン及びホスファチジルエタノールアミンは精製酵素の活性を阻害しないことを見出し、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可能性を示した。

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おり、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、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。以上のような研究成果により、大澤智子に対して、博士(薬学)の学位を授与するに値するものと認めた。