

## 論文の内容の要旨

### マウス細胞質型ホスホリパーゼA2 $\gamma$ の酵素学的解析

指導教員 清水 孝雄 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成16年4月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

東 知宏

#### 【目的】

脂質はエネルギー源、生体膜の構成成分として、細胞の固有機能を果たす為に必須の役割を果たしているが、生体膜に外界から刺激が加わると、脂質メディエーターが産生され、生体防御、神経伝達など様々な機能を営んでいる。しかし脂質はゲノムにコードされておらず、安定性に欠けることや取り扱いの難しさにより、その生理機能の解明は十分になされていない。したがって脂質メディエーター研究は重要なこれからの研究分野である。

哺乳動物にはグリセロリン脂質を加水分解し多様な生理活性脂質を産生する多種のホスホリパーゼが存在する。数百種のグリセロリン脂質が細胞膜、細胞内小器官膜を構成し、ホスホリパーゼはこれらグリセロリン脂質の代謝に関わっている

生体膜の主要な成分であるグリセロリン脂質のsn-2のアシル鎖を加水分解するホスホリパーゼA2 (PLA2) には20種類以上の分子種が存在し、構造上の特徴から、分泌型PLA2 (sPLA2)、Ca<sup>2+</sup>非依存性PLA2 (iPLA2)、細胞質型PLA2 (cPLA2)、血小板活性化因子アセチルヒドラーゼ (PAF-AH) に分類される。

ヒトcPLA2 $\gamma$  (hcPLA2 $\gamma$ )はcPLA2 $\alpha$ のリパーゼドメインと相同性が高い遺伝子としてクローニングされた (1)。しかしhcPLA2 $\gamma$ は他のcPLA2分子種に保存されているC2ドメインを持たず、C末端がファルネシル化され (2)、cPLA2分子種の中にあって大きく構造が異なる。またcPLA2 $\alpha$ の酵素活性に関わるMAPKによるセリンリン酸化モチーフも持たない。

In vitroの性状解析の結果、hcPLA2 $\gamma$ はPLA2活性、lysoPLA活性 (LPL活性) を持つことが報告されている。cPLA2 $\alpha$ はCa<sup>2+</sup>が結合するC2ドメインを有し、酵素活性に $\mu$ M濃度のCa<sup>2+</sup>を必要とするが、hcPL

A2 $\gamma$ の酵素活性化にはCa<sup>2+</sup>を必要としない。また基質の脂肪酸選択性は、cPLA2 $\alpha$ とは異なり、アラキドン酸のみならず長鎖脂肪酸であれば加水分解するようである。その後、過酸化水素で細胞を刺激した際、過剰発現させたhcPLA2 $\gamma$ の活性が上昇することが報告された。(3, 4)

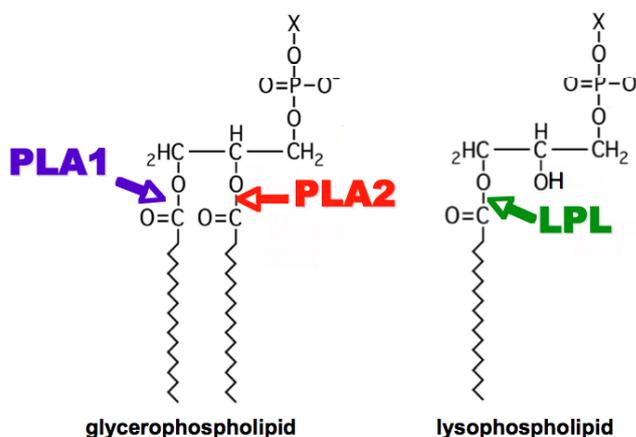


図1. PLA2活性、PLA1活性、LPL活性の模式図

ヒトにおける発現分布はcPLA2 $\alpha$ がほとんどの組織に発現しているのに対し、hcPLA2 $\gamma$ は骨格筋、心筋に比較的高い発現が報告されている。また細胞内局在もcPLA2 $\alpha$ が通常細胞質に存在しているのに対し、hcPLA2 $\gamma$ は常に膜画分に存在するようである。このhcPLA2 $\gamma$ の細胞内局在については、hcPLA2 $\gamma$ の脂質修飾が関与しているという報告がある。このようにcPLA2 $\gamma$ はcPLA2 $\alpha$ とは性質がかなり異なっており、固有の機能を持つことが想定されるが、詳細な活性化機構また生理的役割は不明である。

本研究ではマウスを用いてcPLA2 $\gamma$ の生理機能を解析するのに先立ち、マウスcPLA2 $\gamma$  (mcPLA2 $\gamma$ ) cDNAをクローニングし、酵素レベルでの活性化機構の解析を行うことで、生理活性脂質産生を介したcPLA2 $\gamma$ の生体における機能の解明の為に基礎的知見を得ることを目的とした。

### 【実験方法】

mcPLA2 $\gamma$ はRT-PCR法によりcDNAクローニングした。細胞内局在の観察はmcPLA2 $\gamma$ のN末端にGFPタンパク質を融合し発現させ、共焦点顕微鏡を用いて行った。mcPLA2 $\gamma$ のタンパク質精製はバキュロウイルスを用いてmcPLA2 $\gamma$ のN末端にHis-tag及びPreScissionプロテアーゼ切断部位を挿入したタンパク質をSf-9に発現させ、この100,000 $\times$ g上清画分をHisカラムに通し、保持されたmcPLA2 $\gamma$ をGST融合PreScission酵素で切断、溶出することにより得た。酵素学的解析はこの精製タンパク質を用いて、PLA2活性、リゾホスホリパーゼ (LPL) 活性をDoleの変法により測定した。またLC-MSを用いて、反応生成物を一斉に測定することにより、PLA2活性、LPL活性に加え、PLA1活性、トランスアシラーゼ (TA) 活性を測定した。

### 【結果・考察】

#### 1 mcPLA2 $\gamma$ のクローニング、発現分布、細胞内局在

RT-PCRクローニング法により5'末端部分が異なる2つのORF (Type. A、Type. B) を得ることが出来た。いずれの型もC末端にファルネシル化モチーフ配列を欠いていた。したがってhcPLA2 $\gamma$ と違いC末端で脂質修飾を受けないことが予想される。定量PCR法により組織発現分布を確認したところ、卵巣に高い発現を検出し、ヒトにおける発現パターンと異なっていた。GFP融合タンパク質として発現させたmcPLA2 $\gamma$ は、いずれの型も細胞質に局在していたが、hcPLA2 $\gamma$ は小胞体と思われる部位に局在していた。

#### 2 精製mcPLA2 $\gamma$ を用いた酵素活性の検討

## 2.1 界面活性効果の酵素活性への影響

HEK293細胞に一過性に発現させたmcPLA2  $\gamma$  のPLA2活性を測定したところ、100,000×g上清画分で活性が認められた。反応系中にTriton X-100を加えることで上昇し、0.03% Triton X-100添加で活性が極大となった。hcPLA2  $\gamma$  も同様の傾向を示しTriton X-100添加による活性増強が認められたが、cPLA2  $\alpha$  はTriton X-100添加により活性が抑制された。したがってヒトとマウスのcPLA2  $\gamma$  は構造上の相同性は高くないが、類似した酵素学的特徴を持つと考えられる。

精製mcPLA2  $\gamma$  で酵素学的解析したところ、PLA2活性が確認でき、Triton X-100添加時の酵素活性も未精製のmcPLA2  $\gamma$  と同様に0.03%添加時に極大を示した。PLA2活性の基質選択性はリン脂質クラスについてはPEよりもPCを、sn-2位の脂肪酸についてはアラキドン酸よりもリノール酸を良い基質とした。またLPL活性を測定したところ、PLA2活性よりも高い活性を検出でき、さらにこの活性もTriton X-100添加により上昇が見られた。異なる基質濃度における活性を測定したところ、LPL活性は高濃度の基質存在下ではTriton X-100非添加時においても、活性の上昇が認められたが、PLA2活性に関してはこの現象は認められなかった (図2)。

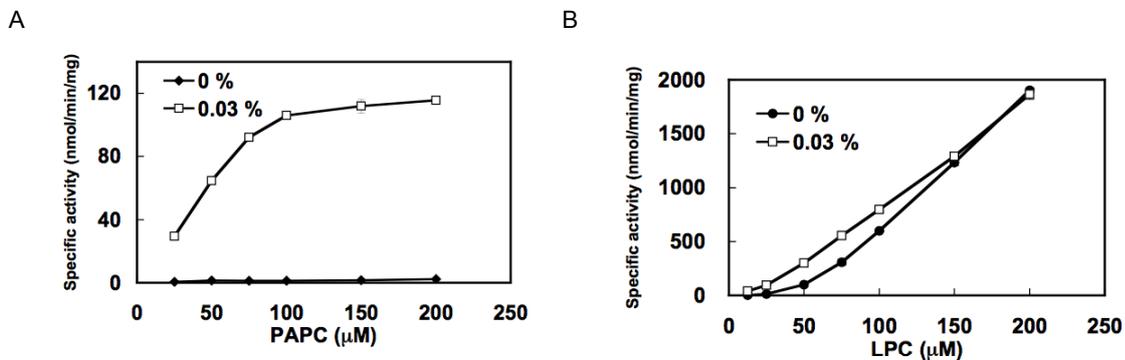


図2. mcPLA2  $\gamma$  のPLA2活性とLPL活性における酵素反応速度論的検討が、Triton X-100の効果、また高いLPL活性を有する各基質濃度におけるPLA2活性(A)と脂質性(B)を異なる活性の測定した。また各基質濃度における0.03% Triton X-100添加による酵素活性への影響を測定した。値は平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。

## 2.2 LC-MSを用いた酵素活性測定—mcPLA2 $\gamma$ は6つの酵素活性を持つ

Dole法によるPLA2活性、LPL活性測定はRIラベルされた基質を合成する必要がある。RIラベルされたリン脂質は入手できる種類に限りがある為、様々な基質に対する酵素学的特徴を解析するのは困難である。また1実験中に検出できる酵素反応は1種類であるので、複数の酵素反応を持つ酵素に対しては、独立した実験から間接的に同時に起こる各反応速度を議論せざる終えない。

そこでLC-MSを用いた新しい酵素反応検出系を構築した。酵素反応で生じる全ての代謝物を同定、定量することにより1つの酵素が持つ複数の反応を評価することを目指した。この実験系はRIラベルされた脂質を用いる必要がなく、様々な脂質を基質として用いることが出来るも利点としてあげられる。

50  $\mu\text{M}$  PAPCと50  $\mu\text{M}$  14:0-LPCの混合ミセルを基質としてmcPLA2  $\gamma$  を反応させ、その代謝物をLC-MSで同定しmcPAL2  $\gamma$  が持つ酵素活性について検討した。mcPLA2  $\gamma$  反応後、代謝物としてリン脂質の14:0、16:0-PC、14:0、20:4-PC、14:0、14:0-PCが検出された。これらそれぞれ mcPLA2  $\gamma$  にはリン脂質の

sn-1位からsn-2位までの位置にリン脂質の脂肪酸鎖が結合していることを示し、その結果として、LPL、PLA1、PLA2、TA (sn-1, sn-2)の6つの酵素活性が検出された。さらにmcPLA2  $\gamma$  反応後、14:0、16:0-PC、14:0、20:4-PC、14:0、14:0-PCが検出された。これらそれぞれ mcPLA2  $\gamma$  にはリン脂質のsn-1位からsn-2位までの位置にリン脂質の脂肪酸鎖が結合していることを示し、その結果として、LPL、PLA1、PLA2、TA (sn-1, sn-2)の6つの酵素活性が検出された。

したがって、mcPLA2  $\gamma$  はLPL、PLA1、PLA2、TA (sn-1, sn-2)の6つの酵素活性を持つことが示された。

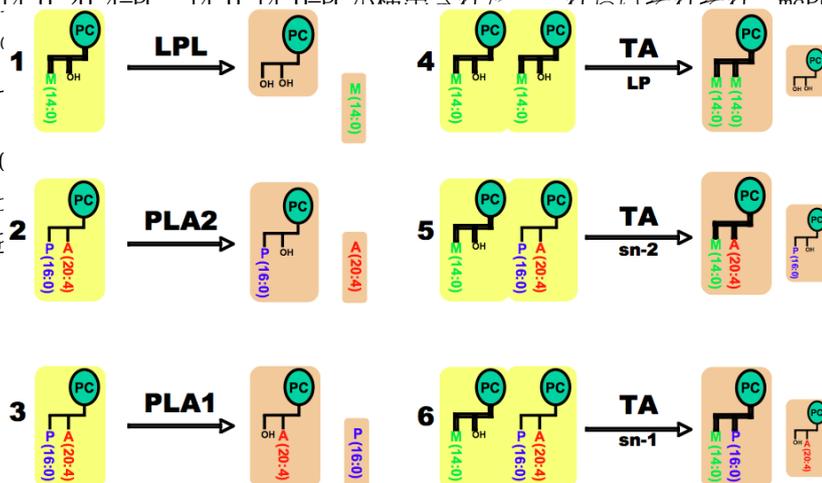


図3 mcPLA2 $\gamma$ が持つ6種類の酵素活性

通常のリソリン脂質は2本の脂肪酸に起因する強い疎水結合のために、特定のタンパク質因子の媒介がないと容易に生体膜から離れることは出来ない。しかし脂肪酸を1本しか持たないリソリン脂質は容易に膜から離れることが出来る。したがって、リソリン脂質は生体膜間や細胞間のシグナル伝達分子として機能することが報告されている。一方リソリン脂質はその物理化学的性質から生体内膜に容易に突き刺さり、特に高濃度では界面活性効果により細胞障害を引き起こすことが報告されている。酸化ストレスや不整脈などでは多量のリソリン脂質が産生され、これが細胞障害を引き起こすことが知られている。mcPLA2 $\gamma$ は高いLPL活性を有すること、また多量に生じたリソリン脂質の界面活性効果を受けて、これら有害なリソリン脂質を除去する生理機能が存在する可能性がある。

さらに脂肪酸を切り出すPLA2活性、PLA1活性、LPL活性に加え、脂肪酸を転移させるTA活性も同時に持つというmcPLA2 $\gamma$ の酵素学的特徴から予想される生理機能として、生体膜のリモデリングへの関与も示唆される。

本研究によりmcPLA2 $\gamma$ は生体内でリソリン脂質の界面活性効果をうけ、6つの酵素反応で様々なグリセリン脂質、リソリン脂質の脂肪酸の代謝に寄与している可能性が示唆された。今後生理条件下などでの詳細な酵素学的検討を行い、この知見を踏まえ生理機能を解析していくことが重要であると考えられる。

#### 【参考文献】

- (1) Underwood, K.W., Song, C., Kriz, R.W., Chang, X.J., Knopf, J.L., and Lin, L.-L. (1998) J. Biol. Chem. 273, 21926-21932
- (2) Pickard, R.T., Striffler, B.A., Kramer, R.M., and Sharp, J.D. (1999) J. Biol. Chem. 274, 8823-8831
- (3) Jenkins, C.M., Han, X., Yang, J., Mancuso, D.J., Sims, H.F., Muslin, A.J., Gross, R.W. (2003) Biochemistry 42, 11798-11807
- (4) Asai, K., Hirabayashi, T., Houjou, T., Uozumi, N., Taguchi, R., and Shimizu, T. (2003) J. Biol. Chem. 278, 8809-8814