

## [課程一 2]

### 審査の結果の要旨

氏 名 東 知 宏

本研究では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の基礎的知見を明らかにするため、マウス cPLA2 $\gamma$  (mcPLA2 $\gamma$ ) の cDNA をクローニングを行い、精製酵素を調整し酵素学的解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 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 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。したがってヒト cPLA2 $\gamma$  (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た。
2. 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。
3. 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。
4. 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 $\times$ g 上清画分で活性が認められた。反応系中に Triton X-100 を加えることで活性が上昇し、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。
5. 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。またリゾホスホリパーゼ (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。
6. 16:0, 20:4-PC (PAPC) と 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。したがって、mcPLA2 $\gamma$  にはリン脂質の sn-1 位からのトランスアシラーゼ (TA) 活性、sn-2 からの TA 活性、またリゾリン脂質からリゾリン脂質への TA 活性が存在することが示された。さらに mcPLA2 $\gamma$  の反応後、代謝物としてリゾリン脂質の 16:0-LPC、20:4-LPC が検出された。したがって、PLA2 活性、PLA1 活性も存在することが示された。

7. これらの6つの酵素活性の特性について PAPC、14:0-LPC を基質として与えて異なる反応時間での生成物量を検討したところ、mcPLA2 $\gamma$  はリゾリン脂質、グリセロリン脂質が存在する場合、グリセロリン脂質の sn-1 位、sn-2 位からの TA 活性よりも LPL 活性、リゾリン脂質同士の TA 活性が優位であり、リゾリン脂質を優位に代謝することが示された。
8. TA 活性について アシル CoA から 14:0-LPC への転移反応を検討したが、反応生成物は検出されなかった。リゾリン脂質同士による TA 活性の結果 14:0, 14:0-PC の生成は検出されたことから、mcPLA2 $\gamma$  は CoA 非依存的に TA 活性を有することが示された。

以上、本論文は精製酵素を用いた酵素学的解析から、mcPLA2 $\gamma$  は 6 つの酵素反応で様々なグリセロリン脂質、リゾ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。本研究はこれまで未知に等しかった、mcPLA2 $\gamma$  の生体における機能解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。