



Reconstitution of GTP- γ -S-dependent phospholipase D activity with ARF, RhoA, and a soluble 36-kDa protein

下奥, 靖

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1997-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1628

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001628>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	しも おく きよし 下 奥 靖	（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第1083号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成9年3月31日	
学位論文題目	Reconstitution of GTP- γ -S-dependent phospholipase D activity with ARF, RhoA, and a soluble 36-kDa protein （ARF, RhoA, 可溶性36-kDa蛋白質によるGTP- γ -S依存性ホス フォリパーゼD活性の再構築について）	
審査委員	主査 教授 中 村 俊 一 教授 水 野 耕 作 教授 尾 原 秀 史	

論文内容の要旨

【緒言】

ホスホリパーゼD（以下PLDと略す）はホスファチジルコリンを加水分解し、ホスファチジン酸とコリンを産生するリン脂質分解酵素である。細胞外からの様々な刺激に反応してPLDが活性化されること、またホスファチジン酸がセカンドメッセンジャーとしての役割をはたしている可能性があることから、PLDの活性調節機構を調べることは、細胞内情報伝達機構の解析において重要な意味があると考えられる。

現在哺乳類では少なくとも二種類のPLDが確認されている。一つはオレイン酸に依存性のもので、他の一つはADP-ribosylation factor（以下ARFと略す）、RhoA等の低分子量型G蛋白質により活性化されるものである。最近では、低分子量型G蛋白質依存性PLDの活性化に、G蛋白質以外の因子が必要であることがいくつかの実験系で報告されているが、その本体は明らかにされていない。

我々の講座ではこれまでに、低分子量型G蛋白質依存性PLDは硫酸アンモニウムと細胞質因子により著明に活性化されることを報告した。今回の研究ではこの系を用いて、腎臓細胞膜のPLDの最大活性化にARF, RhoA, さらに熱に安定な可溶性蛋白質の三種類の因子が必要であることを見出した。これらの因子によるPLDの活性化機構および、熱に安定な可溶性蛋白質の生化学的性質について報告する。

【実験材料および方法】

1) PLDの精製

PLDは牛腎臓の細胞膜から部分精製した。1%デオキシコール酸で細胞膜を可溶化し、可溶化蛋白質をハイドロキシアパタイトカラムにかけ、0～0.6Mリン酸カリウムの濃度勾配でPLDを溶出した。酵素溶液を透析し、更にTSK heparin 5PW カラムにかけて0～1.5MNaClの濃度勾配でPLDを溶出した。この段階でのPLDの精製率は最初の細胞膜画分と比較して約1000倍となっており、以下の実験の酵素源として使用した。なおこの酵素標品中にはARF, RhoA, および熱に安定な可溶

性蛋白質は存在しないことが確かめられた。

2) その他

細胞質因子は中村らの報告に従い、ラット腎臓の可溶性画分より調整した。ARFはTaylorらの報告により牛の脳から精製した。RhoA, プロテイン・キナーゼCの α 分子種に対する抗体, およびプロテイン・キナーゼCはそれぞれ, 奈良先端科学技術大学院大学の貝淵先生, 神戸大学バイオシグナルリサーチセンターの斎藤先生, 神戸大学バイオシグナルリサーチセンターの吉川先生より頂いた。蛋白質の定量はBradfordの方法を用いた。PLD活性測定は中村らの報告に従い, エタノールの存在下に, [14 C] ホスファチジルコリンから生成される [14 C] ホスファチジルエタノールを定量し(ホスファチジル基転移反応), PLD活性とした。

【結果】

1) PLD活性の再構築

牛腎臓の細胞膜から部分精製されたPLDは単独では活性を示さなかったが, 細胞質分画とGTP- γ -Sの存在下で著明な活性化が認められた。細胞質分画のかわりに精製ARFを加えると, 部分的活性は認められたが完全活性は得られなかった。今回の研究から, この細胞質分画には少なくとも二種類の低分子量型G蛋白質, 即ちARFおよびRhoA, さらにG蛋白質以外の熱に安定な因子が含まれることが明らかとなった。また熱に安定な因子それ自体には活性化能はなかったが, ARF存在下にPLD活性を増強した。ARF, RhoA, 熱に安定な因子の三因子が同時に存在すると, 未精製の細胞質分画を用いた場合と同程度のPLD活性化を再構築できた。

2) 熱に安定な因子の生化学的性質

熱に安定な因子は60℃で10分間熱処理しても活性を失わなかったが, 80℃で10分間処理すると完全に失活した。ラット腎臓細胞質成分を60℃で10分間加熱処理し, 10,000gで10分間遠心し, 変性蛋白質を除去した後に, 上清をSuperose12ゲルろ過カラムを用いて精製した。PLD活性を増強する画分はほぼ36-kDaの位置にsingle peakとして分離された。この画分をトリプシンで処理すると, 完全に活性が消失した。このことから36-kDa因子は蛋白質であると考えられた。36-kDa蛋白質の臓器別の分布を調べると, 多い順に腎臓, 肝臓, 脾臓, 脳, 肺となり, この様子は, おおむねPLDの臓器局在と一致した。またこの熱耐性因子は [35 S] GTP- γ -SのARFへの結合には影響を与えなかった。

【考察】

哺乳類のPLDの活性化と低分子量型G蛋白質の関係についていくつかの報告がある。脳の細胞膜結合型PLDはRhoAとARFにより相乗的に活性化されることが示された。肝臓の細胞膜結合型PLDはRhoAにより活性化される事が報告されている。HL-60細胞では, 細胞膜結合型PLDはARFとRhoAにより相乗的に活性化される一方, 細胞質PLDはARFによって活性化される。種々の低分子量型G蛋白質に対するPLDの感受性の違いが, 酵素のアイソザイムの存在を示すのか, 酵素標品中の各因子の混入を反映しているのかは明らかでない。

今回の結果では, 低分子量型G蛋白質依存性PLDはRhoA, ARF, 36-kDa蛋白質により相乗的に活性化されることが示された。またPLDを最大に活性化するために, これらの3因子が同時に存在する必要があった。36-kDa蛋白質は, 造血幹細胞系でPLDを活性化すると報告されている50-kDa蛋白質とは分子量の点で異なる。また36-kDa蛋白質は免疫学的に, プロテイン・キナーゼCの α 分子種の抗体に対して反応性を示さなかった。今後は36-kDa蛋白質の構造や機能の解析を行うことが,

刺激に連動したコリンリン脂質代謝の分子機構解明に重要と考えられた。

【結語】

- 1) 腎臓の低分子量型G蛋白質依存性PLDの活性化には、細胞質成分としてARF, RhoA, 36-kDa蛋白質が必要であった。
- 2) これらのどの二つの組み合わせでもPLDを相乗的に活性化したが、三つがそろってPLDは最大の活性を示した。
- 3) 36-kDa蛋白質は60℃の熱処理では安定であったが、80℃10分間の処理で失活した。この蛋白質の臓器局在はほぼPLDと一致したので、生理的にPLDの活性調節に関連があると考えられた。

論文審査の結果の要旨

ホスホリパーゼD (PLD) はホスファチジルコリンを加水分解し、ホスファチジン酸とコリンを産生するリン脂質分解酵素である。細胞外からの様々な刺激に反応してPLDが活性化されること、またホスファチジン酸がセカンドメッセンジャーとしての役割をはたしている可能性があることから、PLDの活性調節機構を調べることは、細胞内情報伝達機構の解析において重要な意味があると考えられる。PLDの活性化にはARFやRhoAなどの低分子量型G蛋白質が関与することが知られているが、分子レベルでの活性化機構に関しては詳細は不明である。

申請者は可溶性画分に存在するPLDの活性化因子を分離精製する際に、ARFやRhoAとは異なる第三の因子の存在を確認し、この因子がPLDの活性化に重要な役割を演じていることを報告した。以下に実験結果を要約する。

1) PLD活性の再構築

牛腎臓の膜から部分精製されたPLDは単独では活性を示さなかったが、細胞質分画とGTP- γ -Sの存在下で著明な活性化が認められた。細胞質分画のかわりに精製ARFを加えると、部分的活性は認められたが完全活性は得られなかった。今回の研究から、この細胞質分画には少なくとも二種類のG蛋白質、即ちARFとRhoAとG蛋白質以外の熱に安定な因子が含まれることが明らかとなった。また熱に安定な因子それ自体には活性化能はなかったが、ARF存在下にPLD活性を増強した。ARF, RhoA, 熱に安定な因子の三因子が同時に存在すると、未精製の細胞質分画を用いた場合と同程度のPLD活性化を再構成できた。

2) 熱に安定な因子の生化学的性質

熱に安定な因子は60℃で10分間熱処理しても活性を失わなかったが、80℃で10分間処理すると完全に失活した。ラット腎臓細胞質成分を60℃で10分間加熱処理し、10,000 g で10分間遠心し、変性蛋白質を除去した後に、上清をSuperose12ゲルろ過カラムを用いて精製した。PLD活性を増強する分画はほぼ36-kDaの位置にsingle peakとして分離された。この画分をトリプシンで処理すると、完全に活性が消失した。このことから36-kDa因子は蛋白質であると考えられた。36-kDa蛋白質の臓器別の分布を調べると、多い順に腎臓、肝臓、脾臓、脳、肺となり、この様子はおおむねPLDの臓器局在と一致した。またこの熱耐性因子は $[^{35}\text{S}]$ GTP- γ -SのARFへの結合には影響を与えなかった。

本研究は、刺激に連動したPLDの活性化機構を分子レベルで解明する際の重要な手掛かりとなるものであり、細胞増殖とコリン磷脂質代謝との関連を知る上で重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究を、医学博士の学位を得る資格があるものと認める。