



# ホスホリパーゼD活性化能に対する、GM2 activator 翻訳後修飾の影響について

小南, 裕明

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-07-31

(Date of Publication)

2013-07-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2633

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002633>

※ 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。



# ホスホリパーゼ D 活性化能に対する, $G_{M2}$ activator

## 翻訳後修飾の影響について

小南裕明, 三輪教子

神戸大学大学院医学系研究科  
分子細胞生物学講座 生化学分野  
連絡先: 三輪教子  
神戸大学大学院医学系研究科  
分子細胞生物学講座 生化学分野  
〒650-0017 神戸市中央区楠町 7-5-1  
Tel: 078-382-5421, Fax: 078-382-5439  
E-mail: miwanori@med.kobe-u.ac.jp

(平成14年4月26日受付)

### (要約)

### 緒言

$G_{M2}$  activator は,  $G_{M2}$  ガングリオシドの代謝酵素である,  $\beta$ -Hexosaminidase A の活性化因子であり, その欠損は  $G_{M2}$  gangliosidosis を引き起こす。近年, 当研究室では,  $G_{M2}$  activator が, リン脂質の分解酵素であるホスホリパーゼ D を活性化することを明らかにした。本研究では,  $G_{M2}$  activator の翻訳後修飾が, ホスホリパーゼ D の活性化能に及ぼす影響を調べた。翻訳後修飾として, リン酸化および糖鎖の付加を取り上げた。

まず, ウェスタンブロッティングによって, ラット腎臓より精製した  $G_{M2}$  activator がリン酸化チロシンを有することを明らかにした。アルカリホスファターゼで処理した  $G_{M2}$  activator は, 処理前のもと同等のホスホリパーゼ D 活性化能を有しており,  $G_{M2}$  activator のリン酸化がホスホリパーゼ D 活性化能に寄与しないことが明らかになった。

さらに, ラット  $G_{M2}$  activator を糖鎖付加抑制剤であるツニカマイシン存在下に昆虫細胞で発現させると, 野生型に比べ, 約 1.5-2.0kDa 分子量の小さいタンパク質が得られた。しかし, 糖鎖を欠損した  $G_{M2}$  activator は野生型のもと同等のホスホリパーゼ D 活性化能を示した。

以上のことから,  $G_{M2}$  activator の翻訳後修飾は, ホスホリパーゼ D の活性化能には寄与しないことが示唆された。(593 字)

ホスホリパーゼ D は, リン脂質の分解酵素であり, その代謝産物であるホスファチジン酸を介して, 細胞内小胞輸送, ファゴサイトーシスや活性酸素産生, 細胞増殖や分化等の重要な生理作用に寄与している<sup>(1~3)</sup>。その活性調節機構については多くの報告がなされており, 種々の活性化因子が発見されている<sup>(1~3)</sup>。

近年, 当研究室において, 新たなホスホリパーゼ D 活性化因子として,  $G_{M2}$  activator を見出した<sup>(4)</sup>。 $G_{M2}$  activator は, ガングリオシド代謝酵素である,  $\beta$ -Hexosaminidase A の活性に必須の耐熱性タンパク質であり, その欠損は  $G_{M2}$  ガングリオシドーシスの原因となる<sup>(5~7)</sup>。 $G_{M2}$  activator および  $\beta$ -Hexosaminidase A の組織分布が必ずしも一致しないことから本因子の新たな作用が推測されていた<sup>(8)</sup>。

リン酸化や糖鎖付加は, 代表的な翻訳後修飾であり, 前者は, 酵素の活性制御やタンパク質-タンパク質相互作用の調節等に, 後者は, 免疫細胞による個体識別, タンパク質の細胞内局在や輸送等に重要な役割を果たしている。大腸菌で発現させた  $G_{M2}$  activator は一般に翻訳後修飾を受けないが,  $\beta$ -Hexosaminidase A を野生型のもと同等に活性化した<sup>(9, 10)</sup>。このことは,  $G_{M2}$  activator の  $\beta$ -Hexosaminidase A 活性化には翻訳後修飾が必要でないことを示すものである。本研究では, ラット  $G_{M2}$  activator のリン酸化および糖鎖付加のホスホリパーゼ D 活性化能への影響を明らかにすることを目的とする。

キーワード:  $G_{M2}$  activator, ホスホリパーゼ D, 翻訳後修飾, リン酸化, 糖鎖付加

## 方 法

### 1) $G_{M2}$ activator の精製

ラット腎臓より、前報に従って精製した<sup>(11)</sup>。

### 2) ウェスタンブロッティング

試料を12.5% SDS-PAGE (sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) にかけて後、タンパク質のバンドをPVDF (polyvinylidene difluoride) 膜に転写し、 $G_{M2}$  activator をラット  $G_{M2}$  activator に対するポリクローナル抗体で、リン酸化チロシンを4G10 (Upstate biotechnology, Lake Placid, NY) で検出した。

### 3) アルカリホスファターゼ処理

ラット腎臓由来の  $G_{M2}$  activator を以下の組成の反応液中で 37°C, 一晚, アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase, New England BioLab, Beverly, MA) 処理した; 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH7.0), 50mM  $MgCl_2$ , 1mM DTT, and 11.4U アルカリホスファターゼ。水中につけることで反応を停止し、反応液を用いて、ホスホリパーゼ D 活性の測定および、 $G_{M2}$  activator とリン酸化チロシンの検出をウェスタンブロッティングによって行った。

### 4) グリコシダーゼ処理

ラット腎臓由来の  $G_{M2}$  activator を Exton らの方法<sup>(12)</sup>に従って、endoglycosidase F (New England Biolabs) で処理した。処理後の  $G_{M2}$  activator を、12.5% SDS-PAGE につけ、抗  $G_{M2}$  activator 抗体を用いてウェスタンブロッティングした。

### 5) ホスホリパーゼ D 活性の測定

ホスホリパーゼ活性の測定は前報に従って行った<sup>(4)</sup>。簡単に記すと、<sup>14</sup>C 標識のホスファチジルコリンを基質とし、ホスホリパーゼ源としては、Exton らの方法<sup>(12)</sup>によって得た rat recombinant PLD1 を用い、エタノール存在下で生成したホスファチジルエタノール (PEt) の放射活性を定量し、反応液中の総放射活性に対するパーセンテージでホスホリパーゼ活性を示した。

### 6) ラット $G_{M2}$ activator の昆虫細胞発現用ベクターの構築およびウィルスの取得、およびラット $G_{M2}$ activator の発現

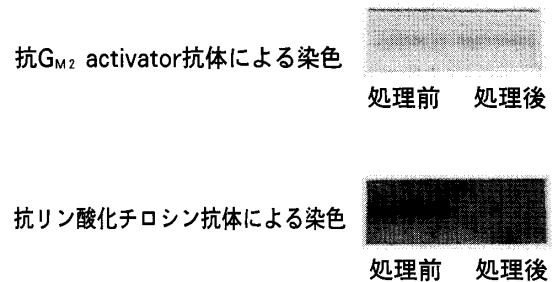
ベクターの構築およびウィルスの取得は前報に従っ

て行った<sup>(13)</sup>。ウィルスを Sf9 細胞に感染させ、5, 10, 20  $\mu$ g/ml のツニカマイシン (Nacalai Tesque, Kyoto) の存在下でラット  $G_{M2}$  activator を発現させた。72 時間後に細胞および培養液を回収して、その各々についてラット  $G_{M2}$  activator の発現をウェスタンブロッティングで確認するとともに、組織からの  $G_{M2}$  activator の精製の手順に従って、発現したラット  $G_{M2}$  activator を精製し、ホスホリパーゼ D の測定に供した。

## 結 果

### 1) ラット $G_{M2}$ activator におけるリン酸化チロシンの検出

図 1 に示すように、ラット  $G_{M2}$  activator においてリン酸化チロシンが検出された。 $G_{M2}$  activator 中のリン酸化チロシンが、実際に抗体によって検出されたのはこれが初めてである。これをホスファターゼ処理すると、このバンドは検出できなくなった(図 1)。



### 図 1 ラット $G_{M2}$ activator におけるリン酸化チロシンの検出

ラット腎臓より精製した  $G_{M2}$  activator を抗  $G_{M2}$  activator 抗体(A)および抗リン酸化チロシン抗体(B)を用いてウェスタンブロッティングした。それぞれ、同量のタンパク量をのせた。

### 2) ラット $G_{M2}$ activator のホスファターゼ処理によるホスホリパーゼ D 活性化能への影響

ラット  $G_{M2}$  activator は、従来からホスホリパーゼ D 活性化因子として知られている ARF (ADP-ribosylation factor) と相乗的にホスホリパーゼ D を活性化するので<sup>(4)</sup>、ここでも ARF との相乗効果を見た。図 2 に示すように、ホスファターゼ処理前後においてホスホリパーゼ D 活性化能には違いが見られなかった。

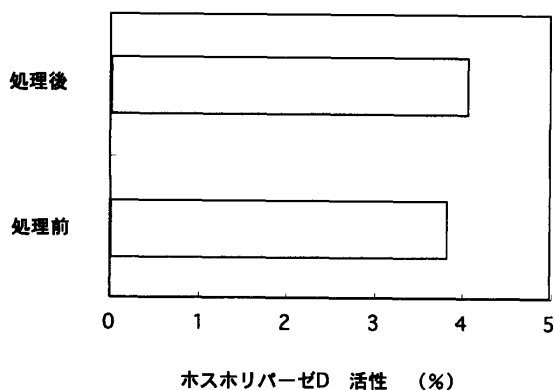


図2 ラットG<sub>M2</sub> activator のホスファターゼ処理によるホスホリパーゼD活性化能への影響

ホスホリパーゼD活性は、反応液中の総放射活性に占める、ホスファチジルエタノールの放射活性の割合で示した。

### 3) ラットG<sub>M2</sub> activator のグリコシダーゼ処理

グリコシダーゼ処理前後に約 1.5-2.0kDa の分子量の差が見られ、これは、ラットG<sub>M2</sub> activator にその大きさの糖鎖があったことを示した(図3)。

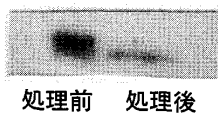


図3 ラットG<sub>M2</sub> activator のグリコシダーゼ処理  
グリコシダーゼ処理前後の電気泳動像を示す。

### 4) ツニカマイシンによるラットG<sub>M2</sub> activator の発現への影響

図4に示すように、ツニカマイシン存在下でもラットG<sub>M2</sub> activator の良好な発現が見られた。プロットパターンより、ツニカマイシン 5 μg/ml 以上で糖鎖の無いラットG<sub>M2</sub> activator が発現されたことが示され、その分子量の差は約 1.5-2.0kDa であった。

また、ツニカマイシンなしで発現させた、糖鎖のあるG<sub>M2</sub> activator は培地中への分泌も見られたが、糖鎖のないものでは、分泌はほとんど見られなかった(図4)。

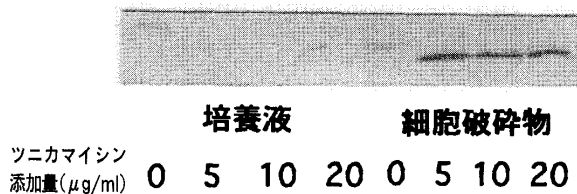


図4 ツニカマイシンによるラットG<sub>M2</sub> activator の発現への影響

種々の濃度のツニカマイシンとともにラットG<sub>M2</sub> activator を発現させた後、培養液および Sf9 細胞破砕物をプロットした。それぞれ、同量のタンパク量をのせた。

### 5) ラットG<sub>M2</sub> activator の糖鎖の有無のホスホリパーゼD活性化能への影響

ラットG<sub>M2</sub> activator を発現した Sf9 細胞を回収し、ラットG<sub>M2</sub> activator を精製した後、ホスホリパーゼD活性化能を測定した。

図5に示すように、ラットG<sub>M2</sub> activator の糖鎖の有無はホスホリパーゼD活性化能に寄与しなかった。

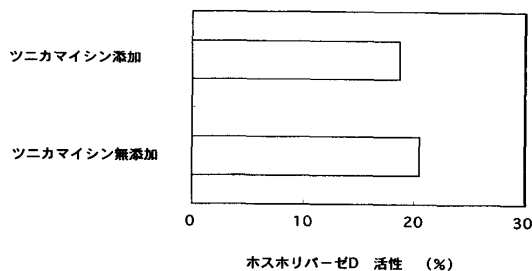


図5 ラットG<sub>M2</sub> activator の糖鎖の有無のホスホリパーゼD活性化能への影響

図2と同様にホスホリパーゼD活性を測定した。それぞれツニカマイシン無添加および添加(5 μg/ml)して発現させたラットG<sub>M2</sub> activator の精製物を用いた。

## 考 察

G<sub>M2</sub> activator は従来、G<sub>M2</sub> の加水分解酵素である、β-Hexosaminidase A の活性化因子として知られ、その欠損はG<sub>M2</sub> gangliosidosis の原因となる<sup>(5)</sup>。G<sub>M2</sub> activator の分布がかならずしもβ-Hexosaminidase A の分布と一致しないため、新たな生理作用が予想されていた。近年、G<sub>M2</sub> activator は、ホスホリパーゼDの活性化因子であることが報告されたが、その生理的意義は不明である<sup>(4)</sup>。

ヒトのG<sub>M2</sub> activator を大腸菌中で発現させたものは、ヒト胎盤より精製したものと同等のβ-Hexosaminidase A 活性化能を有していた<sup>(9, 10)</sup>。細菌においては通常、翻訳後修飾は起きないため、この知見はβ-Hexosaminidase A 活性化には翻訳後修飾は必要でないことを示すものである。

G<sub>M2</sub> activator のリン酸化については、これまで報告がないが、そのアミノ酸配列から、数カ所のリン酸化部位が予想され<sup>(14, 15)</sup>、実際に本報告でリン酸化クロシンが検出された。また、図には示さないが、抗リン酸化セリン抗体および、抗リン酸化スレオニン抗体によってもラットG<sub>M2</sub> activator は染色された。G<sub>M2</sub> activator を代表的なセリンスレオニンリン酸化酵素である、プロテインキナーゼCで処理したところ、G<sub>M2</sub> activator のリン酸化は見られず、ホスホリパーゼD活性化能への影響もみられなかった(data not

shown)。

ここではリン酸化チロシン, リン酸化セリン, リン酸化スレオニンのすべてに特異性を有するアルカリホスファターゼでG<sub>M2</sub> activator を処理した後, ホスホリパーゼDの活性化能との関係を見た。しかし, 処理前後で, ホスホリパーゼD活性化能に変化はなかった。以上のことから, G<sub>M2</sub> activator のリン酸化はホスホリパーゼD活性化能に寄与しないことが示された。

糖鎖付加抑制剤ツニカマイシン処理, およびグリコシダーゼ処理によってラットG<sub>M2</sub> activator が糖鎖を持つことが明らかとなり, 野生型のもとの糖鎖のないもので, ホスホリパーゼD活性化能に差が見られなかった。G<sub>M2</sub> activator の糖鎖もホスホリパーゼDの活性化能に寄与しないことが明らかになった。G<sub>M2</sub> activator は, 分子量約22kDaの耐熱性タンパク質であり, そのアミノ酸配列中に1ヶ所, N-glycosylation site を有し, 生体内で種々の糖鎖を持つ分子種が見出されている<sup>(18)</sup>。他のリソソームタンパク質と同様, マンノース-6-リン酸経路によってリソソームに局在すると考えられている<sup>(17)</sup>。また, 存在形態としてはマイナーであるが, 糖鎖を持たないものも存在し, これらは, 小胞体外部に存在するようであるが, 詳細は不明である<sup>(5)</sup>。

さらに, 他のリソソームタンパク質と同様にG<sub>M2</sub> activator は分泌されることが知られており, 血中および尿中にG<sub>M2</sub> activator が検出される<sup>(5, 18)</sup>。また, 分泌されたG<sub>M2</sub> activator が細胞内に再取込みされる<sup>(19, 20)</sup>。本報告でも, 糖鎖を有するものは細胞外に分泌され, 糖鎖のないものは細胞内に留まることが示された。本報告でG<sub>M2</sub> activator が糖鎖を持たなくてもホスホリパーゼDを活性化することが明らかとなったので, 糖鎖を持たないG<sub>M2</sub> activator が細胞質に存在し, 細胞刺激に応じてホスホリパーゼDのところに移動する可能性は否定できない。また, G<sub>M2</sub> activator によるホスホリパーゼD活性化の生理的意義は未だ不明であるが, 糖鎖の有無によりG<sub>M2</sub> activator の細胞内局在が決まり, それぞれの部位に存在するホスホリパーゼDを活性化することで, それぞれの部位に特異的な生理作用に関与していることが予想される。

以上のことから, G<sub>M2</sub> activator の翻訳後修飾は*in vitro*でのホスホリパーゼD活性化には関与していないことが明らかとなった。しかし, 翻訳後修飾を持つ, *in vivo*でのホスホリパーゼD活性化への意義については今後検討が必要である。

## 謝 辞

終始, 懇切な指導を賜りました, 生化学教室教授, 中村俊一先生を始め, 生化学教室の皆様には深謝の意を表します。

## 文 献

1. Liscovitch, M., Czrny, M., Fiucci, G., Tang, X.: Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem. J.* 345: 401-415, 2000.
2. Wait, M.: The PLD superfamily: insights into cataplysis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1439: 187-197, 1999.
3. Exton, J. H.: New Development in Phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 272: 15579-15582, 1997.
4. Nakamura, S., Akisue, T., Jinnai, H., Hitomi, T., Sarkar, S., Miwa, N., Okada, T., Yoshida, K., Kuroda, S., Kikkawa, U., Nishizuka, Y.: Requirement of G<sub>M2</sub> ganglioside activator for phospholipase D activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 12249-12253, 1998.
5. Fürst, W., Sandhoff, K.: Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1126: 1-16, 1992.
6. Mahuran, D.J.: The GM2 activator protein, its roles as a co-factor in GM2 hydrolysis and as a general glycolipid transport protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1393: 1-18, 1998.
7. Mahuran, D.J.: Biochemical consequences of mutations causing the G<sub>M2</sub> gangliosidosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1455: 105-138, 1999.
8. Beccari, T., Palmerini, C.A., Servillo, G., Della Fazio, M.A., Viola Magni, M.P., Orlicchio, A.: G<sub>M2</sub> activator protein expression in mouse tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204: 741-745, 1994.
9. Klima, H., Klein, A., van Echten, G., Schwarzmann, G., Suzuki, K., and Sandhoff, K.: Over-expression of a functionally active human G<sub>M2</sub>-activator protein in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 292: 571-576, 1993.
10. Wu, Y.Y., Lockyer, J.M., Sugiyama, E., Pavlova, N.V., Li, Y.-T., Li, S.-C.: Expression and specificity of human G<sub>M2</sub> activator protein.

- J. Biol. Chem. 269: 16276-16283, 1994.
11. Conzelmann, E. Sandhoff, K.: Purification and characterization of an activator protein for the degradation of glycolipids GM2 and GA2 by hexosaminidase A. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 360: 1837-1849, 1979.
  12. Min, S.D., Park, S.-K., Exton, J.H.: Characterization of a rat brain phospholipase D isozyme. J. Biol. Chem. 273: 7044-7051, 1998.
  13. Sarkar, S., Miwa, N., Kominami, H., Igarashi, N., Hayashi, S., Okada, T., Jahangeer, S., Nakamura, S.: Regulation of mammalian phospholipase D2: interaction with and stimulation by G<sub>M2</sub> activator. Biochem. J. 359: 599-604, 2001.
  14. Furlong, M.T., Mahrenholz, A.M., Kim, K.H., Ashendel, C.L., Harrison, M.L., Geahlen, R.L.: Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk. Biochim. Biophys. Acta. 1355: 177-190, 1997.
  15. Hardie, D.G.: Protein phosphorylation A practical approach. Oxford University Press. 1993.
  16. Novak, A., Lowden, J.A.: G<sub>M2</sub> ganglioside activator occurs in multiple form. Biochim. Biophys. Acta. 1199: 209-214, 1993.
  17. Banerjee, A., Burg, J., Conzelmann, E., Carroll, M., Sandhoff, K.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the ganglioside GM2-activator protein A screening of normal human tissues and body fluids, of tissues of GM2 gangliosidosis, and for its subcellular localization. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 365: 347-356, 1984.
  18. Li, Y.T., Muhiudeen, I.A., DeGasperi, R., Hirabayashi, Y., Li, S.C.: Presence of activator proteins for the enzymic hydrolysis of GM1 and GM2 gangliosides in normal human urine. Am. J. Hum. Genet. 35: 629-34, 1983.
  19. Sonderfeld, S., Conzelmann, E., Schwarzmann, G., Burg, J., Hinrichs, U., Sandhoff, K.: Incorporation and metabolism of ganglioside G<sub>M2</sub> in skin fibroblasts from normal and G<sub>M2</sub> gangliosidosis subjects. Eur. J. Biochem. 149: 247-255, 1985.
  20. Rigat, B., Wang, W., Leung, A., Mahuran, D.J.: Two mechanisms for the recapture of extracellular G<sub>M2</sub> activator protein: evidence for a major secretory form of protein. Biochemistry. 36: 8325-8331, 1997.

## Effect of post-translational modifications of $G_{M2}$ activator on phospholipase D activation

Hiroaki Kominami and Noriko Miwa

Division of Biochemistry, Department of Molecular and Cellular Biology,  
Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe  
650-0017, Japan

(Abstract)

$G_{M2}$  activator activates  $\beta$ -Hexosaminidase A which contributes to the metabolism of ganglioside  $G_{M2}$ . Defect in the activator causes  $G_{M2}$  gangliosidosis. Recently our laboratory has reported that  $G_{M2}$  activator activates phospholipase D which catalyses phospholipid hydrolysis. In the present study, we studied the effect of post-translational modifications of  $G_{M2}$  activator on phospholipase D activation. The effects of phosphorylation and glycosylation of the activator were investigated.

Tyrosine phosphorylation was detected in the  $G_{M2}$  activator by Western blotting, however, alkaliphosphatase treatment did not affect the phospholipase D-activating activity of the activator. These results suggest that phosphorylation of the activator has no effect on the activation of phospholipase D.

Glycosylation may account for the loss of molecular mass about 1.5-2.0 kDa compared with wild-type  $G_{M2}$  activator. The smaller form of the protein obtained by the treatment of cells with tunicamycin, which inhibits glycosylation of proteins, activated phospholipase D to similar extent as wild type, which suggested that glycosylation of the activator did not contribute to phospholipase D activation.

Taken together, these post-translational modifications of  $G_{M2}$  activator did not affect the phospholipase D-activating activity of the activator.