



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。



【130】

氏名・(本籍) 小南 裕明 (和歌山県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学位記番号 博い第1452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14年7月31日

【学位論文題目】

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

(ホスホリパーゼ D 活性化能に対する G_{M2} activator の
翻訳後修飾の影響について)

審査委員

主査 教授 中村 俊一

教授 山村 博平

教授 丹生 健一

ホスホリパーゼ D 活性化能に対する G_{M2} activator の翻訳後修飾の影響について

序文

ホスホリパーゼ D は、コリンリン脂質の加水分解酵素であり、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。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。

近年、当研究室において、ホスホリパーゼ D の新たな活性化因子として G_{M2} activator を見出した。 G_{M2} activator は、ガングリオシド代謝酵素である、 β -Hexosaminidase A の活性に必須の耐熱性タンパク質であり、その欠損により G_{M2} ガングリオシドーシスが発症することが知られる。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間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、 β -Hexosaminidase A をヒト胎盤から分離精製したものと同等に活性化した。すなわち、 G_{M2} activator の β -Hexosaminidase A 活性化には翻訳後修飾が必要でないことが示された。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。

実験方法

G_{M2} activator は、ラット腎臓より精製した。

ウェスタンブロッティングは、試料を 12.5% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) にかけて後、タンパク質を 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) にて検出した。

アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase, New England BioLab, Beverly, MA) 処理は、ラット腎臓由来の G_{M2} activator を定法により 37°C で一晩行った。反応停止後、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。

グリコシダーゼ処理は、ラット腎臓より精製した G_{M2} activator を endoglycosidase F (New England Biolabs) で処理した。

ホスホリパーゼ D 活性は、酵素源として recombinant rat 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百分率で示した。

ラット G_{M2} activator の Sf9 細胞での発現は BD Baculogold Transfection Kit (BD Pharmingen & Transduction Laboratories,

San diego, CA)を用いて行った。また、糖鎖付加抑制実験に於いてはラット G_{M2} activator の発現の際に、ツニカマイシン(Nacalai Tesque, Kyoto)を用いた。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ト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 の活性測定に供した。

結果

ラット腎臓より精製した G_{M2} activator においてリン酸化チロシンが検出され、これはホスファターゼ処理により、脱リン酸化された。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。

次に、この G_{M2} activator をグリコシダーゼ処理したところ、処理後に約 1.5-2.0kDa の分子量の減少が見られ、ラット G_{M2} activator にそれに相当した糖鎖付加があったことを示した。

糖鎖のないラット G_{M2} activator を大量に得るために、ツニカマイシン存在下で Sf9 細胞を用いてラット G_{M2} activator を発現させたところ、やはり約 1.5-2.0kDa の分子量の糖鎖付加が示された。また、ツニカマイシンなしで発現させた、糖鎖のある G_{M2} 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。ラット G_{M2} activator を発現した Sf9 細胞を回収し、ラット G_{M2} activator を精製した後、ホスホリパーゼ D 活

性化能を測定した結果、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。

考察

G_{M2} activator は従来、 G_{M2} ガングリオシド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_{M2} gangliosidosis を引き起こす。 G_{M2} 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、 G_{M2} activator の新たな生理作用が予想されていた。近年、当研究室において、 G_{M2} activator がホスホリパーゼ D の活性化能を有することが明らかにされたが、その生理的意義は不明である。

ヒトの G_{M2} 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。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_{M2} 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、本研究でリン酸化チロシンが検出された。本研究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反応性を有するアルカリホスファターゼで G_{M2} 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_{M2} 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_{M2} activator が糖鎖を持つことが明らかとなり、野生型のもので糖鎖のないもので、ホスホリパーゼ D 活性化能に差が見られなかった。

G_{M2} 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い出されている。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。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。また、他のリソソームタンパク質と同様に G_{M2} 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_{M2} activator が検出されるとの報告もある。本研究でも、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。

本研究で G_{M2} 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_{M2} 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 の局在部位に移動する可能性がある。また、 G_{M2} 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_{M2} 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。本研究は、 G_{M2} activator によるホスホリパーゼ D 活性化の、生理的意義を探る上で、重要な糸口を与えるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1453号	氏名	小南裕明
論文題目	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		
審査委員	主 査 中村俊一 副 査 山本正平 副 査 丹生健一		
審査終了日	平成14年 6月20日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【はじめに】

ホ乳類のホスホリパーゼD (以下PLD)は、種々の増殖因子やサイトカイン等による細胞刺激の結果活性化され、細胞膜コリン燐脂質を速やかに加水分解し、ホスファチジン酸を産生する酵素である。ホスファチジン酸は細胞増殖や分化、更にスーパーオキシド産生などに関与しており、多岐にわたる生命現象を調節する脂質メディエーターと考えられている。しかしながら、細胞刺激に連動したPLDの活性化機構は不明な点が多かった。我々の教室では最近、PLD1の活性化に、熱に安定な活性化蛋白質が関与することを発見し、その精製並びに構造解析の結果、この物質がG_{M2} ガングリオシドアクチベーター (G_{M2} アクチベーター) であることを報告した。本研究では、G_{M2} アクチベーターの翻訳後修飾の影響、特に燐酸化と糖付加のPLD1の活性化に及ぼす影響について検討を加えた。

【方法】

<サンプルの調整>

G_{M2} アクチベーターはラットの腎臓の可溶性画分より熱処理を行い、更にDEAE-セルロース、Octyl-セルロースを用いて単離した。PLD1はラット脳のcDNAライブラリーよりクローニングし、(His6)を付けてCOS7細胞で発現させ、ニッケル・カラムを用いて精製したものを使用した。

<PLD活性測定>

Nakamuraらの方法に従って、[C¹⁴]フォスファチジルコリンを基質に用い、エタノール存在下にフォスファチジル基転移反応を用いて[C¹⁴]フォスファチジルエタノールの産生を定量した。

【結果】

G_{M2} アクチベーターを抗ホスホチロシン抗体を用いた免疫ブロッティング法で調べた結果、タンパク質に一致したバンドが検出された。このことからG_{M2} アクチベーターはホスホチロシン含有タンパク質であることが明らかとなった。次にG_{M2} アクチベーターをアルカリフォスファターゼを用いてチロシン残基の脱燐酸化処理を行ない、PLD活

活性化能を調べたところ、未処理の G_{M_2} アクチベーターに比べて活性化能に変化は認められなかった。

一方、 G_{M_2} アクチベーターをグリコシダーゼ処理を行い糖鎖除去を行ったところ、SDS-PAGE に於いて分子量が約 1.5 - 2.0 kDa 減少した。この分子量の変化は糖付加の阻害剤ツニカマイシンを用いて G_{M_2} アクチベーターを Sf9 細胞で発現させても認められた。これらの結果から G_{M_2} アクチベーターには糖付加の修飾がされていることを確認した。糖付加の PLD 活性化に及ぼす影響を検討した結果、活性には関与しないことが明らかにされた。

【考察】

本研究結果から G_{M_2} アクチベーターのチロシン残基燐酸化や糖鎖付加の翻訳後修飾は PLD の活性化には試験管内の反応系では影響を与えないことが分かった。しかしながらこれらの修飾の結果、 G_{M_2} アクチベーターの細胞内分布が大きく変化する可能性がある。例えばチロシン残基燐酸化タンパク質は SH2 領域を有するタンパク質に選択的に結合することが知られる。一方、細胞刺激により PLD がチロシン残基燐酸化され細胞内分布が変化することが報告されている。このメカニズムにより刺激依存性に PLD と G_{M_2} アクチベーターの会合が促進することが考えられる。更に、糖鎖付加により G_{M_2} アクチベーターが細胞外に分泌されることが本研究でも確かめられた。更に分泌された G_{M_2} アクチベーターは血流を介し他の細胞に取り込まれることも知られる。糖鎖付加によるこの G_{M_2} アクチベーターのホルモン様の作用の有する生理的意義も今後の興味深い問題である。

本研究は、 G_{M_2} アクチベーターの翻訳後修飾の PLD 活性に及ぼす影響を初めて検討したものであり、細胞刺激に連動した PLD の活性化機構を理解する上で重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。