



## Regulation of mammalian phospholipase D2 : interaction with and stimulation by G\_m2 activator

Sarkar, Sukumar

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2003-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2739

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002739>

※ 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。



【 91 】

氏名・(本籍) SARKAR SUKUMAR (ハングラデシュ)  
博士の専攻分野の名称 博士(医学)  
学位記番号 博い第1486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15年3月31日

【 学位論文題目 】

Regulation of mammalian phospholipase D2  
:interaction with and stimulation by  $G_{M2}$  activator  
(哺乳類ホスホリパーゼD2の活性調節  
: $G_{M2}$ アクチベーターとの結合および活性化について)

審査委員

主査教授 中村俊一  
教授 山村博平  
教授 吉川潮

## 【緒言】

ホスホリパーゼ D(PLD) は増殖因子等様々な外的因子により活性化され、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。PLD は、小胞輸送、細胞運動、細胞増殖、癌化、スーパーオキシドの産生、炎症といった生理的あるいは病理的な様々な過程において、重要な役割を演じていることが知られている。現在、哺乳類では二種類のサブタイプ PLD1 と PLD2 が同定されている。PLD1 は ADP-リボシル化因子 (ARF)、RhoA 等の低分子量型 G タンパク質、プロテイン・キナーゼ C (PKC) や  $G_{M2}$  アクチベーターにより活性化され細胞刺激依存性に調節される酵素として広く研究されている。一方、PLD2 に関しては PLD1 と同様に PDGF などの増殖因子や PMA などの PKC 活性化剤により活性化されることは知られるが、その分子レベルでの調節機構に関しては明らかにされていなかった。

今回の研究では、PLD2 が  $G_{M2}$  アクチベーターと結合し、同酵素の活性化を引き起こすことが明らかにされたので、その活性化のメカニズムを生化学的手法を用いて解析した。

## 【実験材料および方法】

### PLD の活性化因子の精製

$G_{M2}$  アクチベーターは、秋末らの報告に従い、ラット腎臓の可溶性画分より熱処理、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルろ過、陰イオン交換樹脂、オクチルセファロースを用いて電気泳動上單一に精製された。

### PLD の調整

ラットの PLD1 および PLD2 の N 末にヒスチジン・タグと融合させ、ヴァキュロ・ウィルスを用いて昆虫の Sf9 細胞に発現させ、ニッケル・カラムを用いて精製したも

のを用いた。また、免疫沈降実験においては PLD2 の N 末に FLAG・タグを融合させ、アデノ・ウィルスを用いて COS7 細胞に発現させて実験に供した。

### ARF の調整

リコンビナント・ヒューマン ARF1 とミリストイル転移酵素を大腸菌内で発現させ、ミリストイル化されたヒューマン ARF1 を陰イオン交換樹脂とゲル濾過カラムを用いて単一に精製した。

### PLD の活性測定

PLD 活性測定はエタノールの存在下に、*in vitro* の条件で [<sup>14</sup>C] ホスファチジルコリンから生成される [<sup>14</sup>C] ホスファチジルエタノールを定量した。

また、HL60 を用いた細胞実験においては、まず HL60 細胞を [<sup>14</sup>C] リゾホスファチジルコリンを用いて細胞膜のホスファチジルコリンを標識し、次に streptavidin を用いて細胞膜透過性処理を行い、可溶性タンパク質の枯渇化細胞を調整した。この細胞を用いて反応液に GTPγS やエタノールなど反応に必要な物質を加え、細胞内で生成された [<sup>14</sup>C] ホスファチジルエタノールを定量し PLD 活性とした。

## 【結果】

### $G_{M2}$ アクチベーターによる PLD2 の活性化

PLD2 の活性に及ぼす  $G_{M2}$  アクチベーターの影響を精製系を用いて調べたところ、17 nM の  $G_{M2}$  アクチベーターにより約 8 倍の活性化が観察された。この活性化状態で反応は約 20 分間直線的に進行した。一方、 $G_{M2}$  アクチベーターによる PLD2 の活性化はアクチベーターの用量依存性に観察され、17 nM で最大の活性化が見られそれより高濃度ではやや活性化の程度が減弱した。

### $G_{M2}$ アクチベーター存在下での PLD2 の ARF による活性化

ARFのPLD2活性に及ぼす影響をGタンパク質の活性化剤であるGTPγS存在下で調べたところ、G<sub>M2</sub>アクチベーター非存在下では従来の報告通り影響が見られなかつた。一方、G<sub>M2</sub>アクチベーター存在下でARFの影響を調べたところ、予測に反しPLD2の活性はARFにより更に2.3倍高められた。

#### G<sub>M2</sub>アクチベーター存在下でPLD2のARFに対する結合の増強効果

免疫沈降されたPLD2に精製された種々の組み合わせのARFとG<sub>M2</sub>アクチベーターを加えて共沈実験を行ったところ、G<sub>M2</sub>アクチベーターを加えたときのみARFがPLD2と共に沈する事が明らかとなった。このことからG<sub>M2</sub>アクチベーターはPLD2のARFに対するカップリング・ファクターとして機能する可能性が強く示唆された。

#### ストレプトリジン-Oによる細胞膜透過性HL60細胞に於けるG<sub>M2</sub>アクチベーターによるPLDの活性化

ストレプトリジン-Oを用いて可溶性タンパク質を枯渇させたHL60細胞を用いてPLD活性の再構築実験を行ったところ、PMA依存性PLD活性はARFにより約2倍活性化されたが、G<sub>M2</sub>アクチベーターによりこのARFによる活性化は更に2倍増強した。この細胞にはPLD1およびPLD2が存在することが知られるが、G<sub>M2</sub>アクチベーターはin vitroの条件のみならず、細胞においてもPLDの活性化作用を有することが明らかにされた。

#### 【考察】

G<sub>M2</sub>アクチベーターは、今まで、 $\beta$ -hexosaminidase Aに対する、基質特異性のco-factorとして作用し、その欠損により、リソゾーム蓄積病として知られる、G<sub>M2</sub>ガングリオシドーシスを引き起こすことが知られる。G<sub>M2</sub>アクチベーターによる、 $\beta$ -hexosaminidase Aに対する活性化機構は、この蛋白質とG<sub>M2</sub>ガングリオシドにより水溶性の複合体が形成され、その結果、 $\beta$ -hexosaminidase Aに対する親和性が増す

ことにより酵素反応が促進することが知られていた。

今回の研究結果よりG<sub>M2</sub>アクチベーターが直接PLD2に結合し、ARFに対する親和性を増強させるカップリング・ファクターとしての作用を有することが強く示唆された。今後更にRNAiやドミナントネガティブ変異体等を用いた系により、生理的にG<sub>M2</sub>アクチベーターがPLDの活性調節因子であることを証明することが重要である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1490号	氏名	Sarkar Sukumar.
論文題目	Regulation of mammalian phospholipase D2: interaction with and stimulation by $G_{M2}$ activator 哺乳類ホスホリパーゼD2の活性調節： $G_{M2}$ アクチベーターとの結合および活性化について		
審査委員	主査 中村俊一 副査 山本アキラ 副査 吉田清		
審査終了日	平成15年 2月17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OK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。哺乳類にはPLD1とPLD2の2つのアイソザイムが存在することが知られる。PLD1は低分子量Gタンパク質ARF、プロテイン・キナーゼC等により活性化されることが知られるが、PLD2に関してはその活性調節機構は不明であった。最近我々は、ガングリオシド代謝に関する $G_{M2}$ アクチベーターがPLD1を強力に活性化することをin vitroの系を用いて証明した。本研究では、PLD2もまた $G_{M2}$ アクチベーターにより強力に活性化を受けることを見出し、その活性化機構について検討を加えた。

### 【方法】

#### ＜サンプルの調整＞

リコンビナント $G_{M2}$ アクチベーターはラット脳のcDNAライブラリーよりクローニングし、大腸菌に発現させたものを溶菌後、熱処理、DEAE-セルロース、Octyl-セルロースを用いて単離した。リコンビナントPLD1およびPLD2はラット脳のcDNAライブラリーよりそれぞれクローニングし、(His6)を付けてバキュロ・ウィルスに組み入れ、Sf9細胞を用いて発現させ、その細胞抽出液をニッケル・カラムを用いて精製したものを使用した。ミリストイル化されたリコンビナントARFは、ヒューマンARF1とミリストイル転移酵素を大腸菌内で大量発現させR.Kahnらの方法により単一に精製した。

#### ＜PLD活性測定＞

Brownらの方法に従って、 $[^{14}C]$ 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 $[^{14}C]$ フォスファチジルエタノールの産生を定量した。

### 【結果】

P L D 2 の活性に及ぼす  $G_{M2}$  アクチベーターの影響を精製系を用いて調べたところ、17 nM の  $G_{M2}$  アクチベーターにより約8倍の活性化が観察された。従来の報告通り P L D 2 は A R F 単独では活性に影響を与えたかったが、 $G_{M2}$  アクチベーター存在下で A R F の影響を調べたところ、予測に反し P L D 2 の活性は A R F により更に2.3倍高められた。更に、免疫沈降された P L D 2 に精製された種々の組み合わせの A R F と  $G_{M2}$  アクチベーターを加えて共沈実験を行ったところ、 $G_{M2}$  アクチベーターを加えたときのみ A R F が P L D 2 と共に沈することが明らかとなった。

一方、ストレプトリジン-O を用いて可溶性タンパク質を枯渇させた H L 60 細胞を用いて P L D 活性の再構築実験を行ったところ、P M A 依存性 P L D 活性は A R F により約2倍活性化されたが、 $G_{M2}$  アクチベーターによりこの A R F による活性化は更に2倍増強した。この細胞には P L D 1 および P L D 2 が存在することが知られるが、 $G_{M2}$  アクチベーターは *in vitro* の条件のみならず、細胞においても P L D の活性化作用を有することが明らかにされた。

### 【考察】

$G_{M2}$  アクチベーターによる、 $\beta$ -hexosaminidase A に対する活性化機構は、この蛋白質と  $G_{M2}$  ガングリオシドにより水溶性の複合体が形成され、その結果、 $\beta$ -hexosaminidase A に対する親和性が増すことにより反応が促進されることによる。

今回の研究結果より  $G_{M2}$  アクチベーターが直接 P L D 2 に結合し酵素を活性化するとともに、A R F に対する親和性を増強させるカップリング・ファクターとしての作用を有することが示された。今後更に R N A 1 やドミナントネガティブ変異体等を用いた系により、生理的に  $G_{M2}$  アクチベーターが P L D の活性調節因子であることを証明することが重要である。

本研究は、これまで活性化機構が不明であった P L D 2 が  $G_{M2}$  アクチベーターと直接結合し、活性化を受けることを初めて報告したものであり、細胞刺激に連動した細胞膜ホスファチジルコリン代謝を介する細胞内情報伝達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。