



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 (ハンガリー)

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単一に精製された。

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 とミリスチル転移酵素を大腸菌内で発現させ、ミリスチ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 [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た。

また、HL60 を用いた細胞実験においては、まず HL60 細胞を [14 C] リン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、次にストレプトリジン-D 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 GTP γ S 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 [14 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GTP γ S存在下で調べたところ、G_{M2}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った。一方、G_{M2}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_{M2}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_{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ARFがPLD2と共沈することが明らかとなった。このことからG_{M2}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-Qによる細胞膜透過性HL60細胞に於けるG_{M2}アクチベーターによるPLDの活性化

ストレプトリジン-Q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_{M2}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_{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PLDの活性化作用を有することが明らかにされた。

【考察】

G_{M2}アクチベーターは、今まで、 β -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_{M2}ガングリオシドーシスを引き起こすことが知られる。G_{M2}アクチベーターによる、 β -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、 β -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_{M2}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_{M2}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 啓三 副査 吉川 潮		
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。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与する 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。ミリスチル化されたリコンビナントARFは、ヒューマンARF1とミリスチ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】

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。従来の報告通りPLD2はARF単独では活性に影響を与えなかったが、 G_{M2} 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。更に、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_{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ARFがPLD2と共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_{M2} 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_{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PLD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、 β -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、 β -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PLD2に結合し酵素を活性するとともに、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示された。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_{M2} 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。

本研究は、これまで活性化機構が不明であったPLD2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。