



Localization and functional interrelationships among cytosolic Group IV, secreted Group V, and Ca independent Group VI phospholipase A in Localization and functional interrelationships...

白井, 康仁

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-12-14

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2845

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002845>

※ 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。



【 1 6 0 】

氏 名・（本 籍） 白井 康仁 （ 兵庫県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博ろ第1959号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成17年12月14日

【 学位論文題目 】

Localization and functional interrelationships among cytosolic Group
IV, secreted Group V, and Ca^{2+} -independent Group VI phospholipase
 A^{2s} in P388D1 macrophages using GFP/RFP constructs
(GFP/RFP を用いた細胞質型IV フォスホリパーゼ A^2 、
分泌型V フォスホリパーゼ A^2 及びカルシウム非依存性VI
フォスホリパーゼ A^2 のマクロファージ P388D¹ 細胞における
局在と相互関係に関する研究)

審 査 委 員

主 査 教 授 吉川 潮
教 授 山村 博平
教 授 中村 俊一

1、緒言

マスト細胞やマクロファージなどの炎症系エイコサノイド産生細胞において、アラキドン酸及びプロスタグランジンの産生及び分泌経路は2つ存在する。即時型と遅延型である。即時型はカルシウムの急激な上昇を伴い数分で起こるのに対し、遅延型では蛋白質合成を介するため数時間を要する。例えば、マクロファージ様培養細胞 (P388D₁) をリボポリサッカライド(LPS)に 1 時間暴露させたのち (priming)、血小板活性化因子(PAF)で処置すると、5-10 分でアラキドン酸の産生・分泌が起こるのに対して、LPS のみで長時間(12-18 時間) 処置することによって、シクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2)の合成を伴うアラキドン酸及びプロスタグランジンの産生・分泌が認められる。

プロスタグランジンの前駆体であるアラキドン酸は主にフォスホリパーゼ A₂(PLA₂)によって産生される。この PLA₂には少なくとも 16 のサブタイプが存在し、大きく cytosolic PLA₂ (cPLA₂)、secreted PLA₂ (sPLA₂)、Ca²⁺-independent PLA₂ (iPLA₂) に大別されている。前述の P388D₁ 細胞には GIV-cPLA₂、GV-sPLA₂、GVI-iPLA₂ が存在し、即時型と遅延型アラキドン酸・プロスタグランジン分泌経路において Group IV (GIV)-cPLA₂ が必須であること、さらに GIV-cPLA₂ 活性に依存した Group V (GV)-sPLA₂ の誘導及び活性化が重要な働きをしていることも明らかになっている。一方、Group GVI (GVI)-iPLA₂ は膜リン脂質のリモデリングに重要であり、アラキドン酸及びプロスタグランジンの産生には関与していないと考えられている。

このように生化学的な知見が蓄積されてきている一方で、各 PLA₂ サブタイプが、アラキドン酸産生時に細胞内のいつ、どこで機能するかについては殆ど知られていない。そこで、本研究では、「即時型」及び「遅延型」アラキドン酸分泌時における GIV-cPLA₂、GV-sPLA₂、GVI-iPLA₂ の細胞内動態を調べた。

2、方法

Green Fluorescent Protein (GFP) を融合させた GV-sPLA₂ 及び GVI-iPLA₂、さらに Red Fluorescent Protein (RFP) 融合 GIV-cPLA₂ を作製し、融合蛋白質が十分な PLA₂ 活性を有していることを確認した。ついで、作製した融合蛋白質をコードするプラスミドをリポフェクションにより P388D₁ にトランスフェクションし、Genestin(G418)存在下で培養することにより、2つの GFP-GV-sPLA₂ stable cell line と 1つの GFP-GVI-iPLA₂ stable cell line を得た。しかし、cPLA₂ を恒常的に発現している stable cell line は得られなかった。従って、GV-sPLA₂ と GVI-iPLA₂ の実験には stable cell line を、cPLA₂ の実験には一過性に RFP-GIV-cPLA₂ を発現させた P388D₁ 細胞を用いた。また、コントロールとして GFP の stable cell line も作製した。尚、蛍光の観察には共焦点コンフォーカルレー

ザー顕微鏡を用い、GFP の蛍光は 488 nm アルゴンレーザーで励起し、515-530nm band pass フィルターで検出した。一方、RFP の蛍光は 543nm で励起し、590nm long pass フィルターを用いた。

3、結果

3-1. 即時型分泌時における動態

無刺激の細胞において RFP-GIV-cPLA₂ は細胞質に一様に存在していた。LPS1 時間処置では RFP-GIV-cPLA₂ の局在に変化は認められなかったが、PAF 刺激直後に核周辺及びゴルジ体ヘトランクロケーションし、1 分以内に元の状態に戻った。一方、GV-sPLA₂ と GVI-iPLA₂ の局在に変化は認められなかった。

3-2. 遅延型分泌における動態

LPS 処置 1 時間までは細胞質に一様に存在した RFP-GIV-cPLA₂ は、処置後 2-3 時間刺激すると細胞室内にドット状に集積し、このドットは核周辺に集まる傾向があった。しかし、さらにインキュベーションを続けると (6-12 時間後)、もとの状態に戻っていた。この LPS 刺激 3 時間後に認められる局在変化は内在性の cPLA₂ でも確認され、ゴルジ体マーカーである GM130 抗体との 2 重染色により、cPLA₂ はゴルジ体周辺に集積していることが明らかになった。

一方、GFP-GV-sPLA₂ は刺激前には主に細胞質に存在していたが、LPS 刺激 2-3 時間後ゴルジ体周辺に集積が認められた。また、LPS 3 時間刺激により GFP-GV-sPLA₂ 蛋白質量が増加したことから、このゴルジ体での蛍光の増加は LPS による GFP-GV-sPLA₂ 蛋白質合成を反映していると考えられた。LPS 刺激 6-12 時間後には、核周辺から細胞質にかけて GV-sPLA₂ の顆粒が認められ、この顆粒はゴルジ体のマーカーである WGA と一致した。しかし、18 時間後には WGA と GFP 蛍光は一致しなかった。また LPS 刺激に伴い、GFP-GV-sPLA₂ stable cell line は、コントロールの GFP-stable cell line よりも早いタイミングでアラキドン酸を分泌することも明らかになった。この LPS による早いアラキドン酸分泌と GFP-GV-sPLA₂ の蛋白質合成は、cPLA₂ 阻害剤により抑制された。一方、GVI-iPLA₂ の局在は変化しなかった。

4、考察及び結語

4-1. LPS 刺激により 2,3 時間後に GIV-cPLA₂ が活性化されゴルジ体にトランクロケーションすることが初めて明らかになった。

4-2. GFP-GV-sPLA₂ stable cell line は、コントロールの GFP-stable cell line よりも早いタイミングでアラキドン酸を分泌したことから、LPS による遅延型

アラキドン酸分泌における GV-sPLA₂ の重要性が確認された。

4-3. また、早期に認められるアラキドン酸分泌と LPS による GFP-GV-sPLA₂ 合成は、cPLA₂ 阻害剤で抑制されたことから、マクロファージにおける遅延型アラキドン酸分泌及び GV-sPLA₂ 蛋白質合成における GIV-cPLA₂ の関与及び GV-sPLA₂ 機能協関が確認された。

4-4. LPS 刺激 6-12 時間後に核周辺及び細胞質に認められる GFP-GV-sPLA₂ の顆粒は WGA と一致したこと。また、18 時間後に核周辺に認められる内在性 GV-sPLA₂ の大きな顆粒はもはや WGA とは一致せず、caveolin-2 と一致したこと(参考論文参照)。さらに、この大きな顆粒は GV-sPLA₂ の細胞質膜への結合を阻害するヘパリン処置で消滅したことから(参考論文参照)、新しく合成された GV-sPLA₂ は一旦分泌された後、再度 caveolin-rich な顆粒によって取り込まれ、最終的に核周辺へ集積することが明らかになった。

4-5. 即時型及び遅延型分泌においても、GVI-iPLA₂ の局在が変化しなかったことから、アラキドン酸及びプロスタグランジンの産生における GVI-iPLA₂ の寄与が低いことが確認された。

論文審査の結果の要旨

受付番号	乙 第 1961 号	氏 名	白井 康仁
論文題目 Title of Dissertation	Localization and functional interrelationships among cytosolic Group IV, secreted Group V, and Ca ²⁺ -independent Group VI phospholipase A ₂ in P388D1 macrophages using GFP/RFP constructs GFP/RFP を用いた細胞質型 IV フォスホリパーゼ A ₂ 、分泌型 V フォスホリパーゼ A ₂ 及びカルシウム非依存性 VI フォスホリパーゼ A ₂ のマクロファージ P388D ₁ 細胞における局在と相互関係に関する研究		
審査委員 Examiner	主 査 吉川 潮 Chief Examiner 副 査 山本 裕子 Vice-examiner 副 査 中村 俊一 Vice-examiner		
審査終了日	平成 17 年 11 月 16 日		

(要旨は 1, 0 0 0 字～2, 0 0 0 字程度)

多くの炎症反応に関与するエイコサノイドは、アラキドン酸を前駆体として産生される。本論分で取り扱われたフォスホリパーゼ A₂(PLA₂)は膜リン脂質より、アラキドン酸を産生する酵素である。従って、本研究は炎症系及び免疫系において重要な知見を得るものと期待できる。

PLA₂には少なくとも 16 のサブタイプが存在し、大きく cytosolic PLA₂ (cPLA₂)、secreted PLA₂ (sPLA₂)、Ca²⁺-independent PLA₂ (iPLA₂)に大別されている。また、本研究に用いられたマクロファージ P388D₁細胞には GIV-cPLA₂、GV-sPLA₂、GVI-iPLA₂が存在し、経時的に異なる 2つのアラキドン酸産生・分泌経路が存在する。即ち、即時型と遅延型である。即時型はカルシウムの急激な上昇を伴い数分で起こるのに対し、遅延型では蛋白質合成を介するため数時間を要する。例えば、マクロファージ様培養細胞 (P388D₁) をリポポリサッカライド (LPS) に 1 時間暴露させたのち (priming)、血小板活性化因子 (PAF) で処置すると、5・10 分でアラキドン酸の産生・分泌が起こるのに対して、LPS のみで長時間 (12・18 時間) 処置することによって、シクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) の合成を伴うアラキドン酸及びプロスタグランジンの産生・分泌が認められる。これまでに両経路において Group IV (GIV)-cPLA₂ が必須であること、さらに GIV-cPLA₂ 活性に依存した Group V (GV)-sPLA₂ の誘導及び活性化が重要な働きをしていることが明らかになっている。一方、Group GVI (GVI)-iPLA₂ は膜リン脂質のリモデリングに重要であり、アラキドン酸及びプロスタグランジンの産生には関与していないと考えられている。このように生化学的な知見が蓄積されてきている一方で、各 PLA₂ サブタイプが、アラキドン酸産生時に細胞内のいつ、どこで機能するかについては殆ど知られていない。そこで、申請者は、蛍光蛋白質を融合させた各 PLA₂ を用いることにより、「即時型」及び「遅延型」アラキドン酸分泌時における GIV-cPLA₂、GV-sPLA₂、GVI-iPLA₂ の細胞内動態を解析した。

その結果、無刺激の細胞において細胞質に一樣に存在していた RFP-GIV-cPLA₂ が、即時型アラキドン酸分泌時に一過性に核周辺及びゴルジ体へトランスロケーションすること、しかし GV-sPLA₂ と GVI-iPLA₂ の局在に変化は認められなかったことが明らかになった。一方、遅延型アラキドン酸分泌においては、RFP-GIV-cPLA₂ は、処置後 1.5・3 時間刺激すると細胞質内及びゴルジ体にドット状に集積し、この間活性化されていることが明らかになった。さらに、この cPLA₂ の活性化と時期を同じくして、GV-sPLA₂ 蛋白質が合成されること、新しく合成された GV-sPLA₂ は分泌顆粒にのって一旦細胞外に分泌されたのち、カベオラを介して再び細胞内に取り込まれ、核周辺に顆粒として蓄積されることも明らかされた。これらの結果は、マクロファージにおける遅

延型アラキドン酸分泌における GV-sPLA₂ の重要性や GIV-cPLA₂ と GV-sPLA₂ の機能協働を再確認しただけでなく、遅延型アラキドン酸産生時には、(1) GIV-cPLA₂ が比較的長時間活性化されゴルジ体にトランスロケーションすること、(2) 新しく合成された GV-sPLA₂ は一旦分泌された後、再度 caveoline-rich な顆粒によって取り込まれ、最終的に核周辺へ集積すること、(3) 即時型と遅延型アラキドン酸産生時における GIV-cPLA₂ と GV-sPLA₂ の細胞内動態の差、などを初めて明らかにしている。また、即時型及び遅延型分泌においても、GVI-iPLA₂ の局在が変化しなかったことから、アラキドン酸及びプロスタグランジンの産生における GVI-iPLA₂ の寄与が低いことも確認された。

以上のように本研究は炎症系細胞における 2つのアラキドン酸産生経路において、各 PLA₂ の細胞内動態を時・空間解析したものであり、従来ほとんど行われていなかった、アラキドン酸産生・分泌時における各 PLA₂ サブタイプが「いつ」「どこで」機能しているかについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。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。