



Requirement of Phospholipase D for Ilimaquinone-induced Golgi Membrane Fragmentation

園田, 洋史

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-06-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3065

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003065>

※ 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。



氏 名 園田 洋史
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博ろ第 3065 号
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与の 日 付 平成 21 年 6 月 9 日

【 学位論文題目 】

Requirement of Phospholipase D for Ilimaquinone-induced Golgi Membrane Fragmentation （イ
リマキノンによるゴルジ体の小胞化におけるホスホリパーゼ D の重要性）

審 査 委 員

主 査 教 授 匂坂 敏明
教 授 平田 健一
准教授 伊藤 俊樹

(論文博士関係)

学位論文の内容要旨

Requirement of Phospholipase D for Ilimaquinone-
induced Golgi Membrane Fragmentation

イリマキノンによるゴルジ体の小胞化における
ホスホリパーゼDの重要性

(指導教員：神戸大学大学院医学系研究科生化学分野専攻 中村 俊一 教授)

園田 洋史

【序】

ゴルジ体や小胞体といった細胞内オルガネラの生成・分解の動的バランスは、細胞内小胞輸送のネットワークの中で厳密に制御されており、蛋白質・脂質の輸送、シグナル伝達において重要な機能を担っている。海綿動物由来の化合物であるイリマキノン(IQ)は、ゴルジ体を小胞化させることが知られており、小胞輸送の研究において広く用いられている。これまでIQによるゴルジ体の小胞化作用は、IQが三量体G蛋白質の $\beta\gamma$ サブユニットを乖離させ、乖離した $\beta\gamma$ サブユニットがプロテインキナーゼD(PKD)を活性化することにより引き起こされると説明されていたが、その詳細は依然不明な点が多かった。

一方、ゴルジ体の小胞化といった膜構造が大きく変化する現象には、膜構成脂質成分の組成の変化及び、脂質加水分解酵素であるホスホリパーゼ活性の変化も重要な機能を担うことが報告されてきている。これらホスホリパーゼの中でホスホリパーゼD(PLD)は、生体膜リン脂質であるホスファチジルコリンの極性頭部を加水分解し、ホスファチジン酸(PA)およびコリンを産生する酵素である。PLDは増殖因子など、細胞外からの様々な刺激により活性化され、細胞内局所での一過的なPA産生に関与することが知られる。産生されたPAは、細胞内において速やかに代謝され、リソホスファチジン酸やジアシルグリセロールといった他の脂質性メディエーターに変換され機能することも知られている。またPAは、細胞内標的分子に直接作用し、細胞内シグナリングを制御するとも考えられている。さらにPLDの活性化は、膜リン脂質のダイナミズムにおいても重要な役割を有すると考えられている。

こういった背景から申請者は、IQによるゴルジ体の小胞化という膜がダイナミックに変化する現象に注目し、この現象におけるPLDの関与について詳細に解析を行い、新たな分子機構を明らかにしたので報告する。

【方法と結果】

1. IQ依存的なゴルジ体の小胞化にPLDが関与する。

まず申請者はIQ依存的なゴルジ体の小胞化にPLD活性が関与するかについて解析を行った。評価方法としては、PLDの加水分解阻害剤である1-ブタノール(1-BuOH)存在下にIQ依存的なゴルジ体の小胞化が惹起されるか検討を行った。ゴルジ体のマーカーにはGFP標識した温度感受性ウイルス蛋白VSVGを用いた。VSVGを温度依存的にゴルジ体へ集積させ、細胞外からIQを添加し経時的に蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、ゴルジ体へ集積したVSVGは、IQ添加により細胞質に小胞化して分散した。しかし、0.5% 1-BuOH存在下では、この小胞化が抑制され、PLDの加水分解阻害作用を持たない0.5% 2-BuOH存在下では、この抑制作用は認められなかった。これらの結果から、IQによるゴルジ体の小胞化に、PLD活性が関与することが初めて示唆された。

2. IQはPLDを活性化する。

次に、実際にIQがPLDを活性化しているかについて、細胞レベルでの解析を行った。実験にはIQによるゴルジ体の小胞化が報告されているHeLa細胞、及びラット腎由来のNRK細胞を用

いた。放射標識した脂肪酸で膜リン脂質をラベルした後、0.5% 1-BuOH存在下にIQを添加し、ホスファチジルブタノールの産生を指標としてPLD活性を測定した。その結果、HeLa、NRK、どちらの細胞でも30 μ MのIQ刺激時に著しくPLD活性が上昇した。

3. IQはPLD1を特異的に活性化する。

哺乳類のPLDには、PLD1、PLD2という二つのアイソフォームが存在する。そこで、HeLa細胞においてIQ依存的に増加したPLD活性が、PLD1、PLD2のどちらの活性に由来するか、それぞれに特異的なsiRNAにより発現抑制することで評価した。PLD1、PLD2に対するsiRNAの効果は定量PCRにより評価した。siRNA処理したHeLa細胞に対して、放射標識した脂肪酸で膜リン脂質のラベルをした後、同様にPLD活性を測定した。その結果、コントロール細胞で認められるIQ依存性のPLD活性化は、PLD1のsiRNAにより顕著に抑制された。一方、PLD2のsiRNAではPLDの活性化が抑制されなかったことから、IQにより活性化されるPLDはPLD1であることが示された。

4. PLDノックアウト細胞ではIQ依存的なゴルジ体の小胞化は阻害される。

以上の結果から、PLD1がIQ依存的なゴルジ体の小胞化に関与していることが明らかとなった。そこで次に、PLD発現抑制細胞を用いて、IQ依存的なゴルジ体の小胞化に及ぼす影響について評価した。PLD発現抑制細胞に関しては、siRNAを用いた評価は、遺伝子導入試薬の細胞毒性が強く困難であったため、当教室で新たに樹立したニワトリB-cell由来のDT40細胞PLDノックアウト株を用いた。ゴルジ体のマーカーとしてGOS-R1を用い、IQ依存的なゴルジ体の小胞化を形態学的に評価した。野生株、PLDノックアウト細胞株それぞれをIQ処理した後、パラホルムアルデヒド固定を行いGOS-R1に対する抗体で染色し、この局在を指標に形態学的解析を行った。その結果、野生株ではIQ依存的なゴルジ体の小胞化を認めたが、PLDノックアウト細胞株では顕著にこの小胞化が阻害された。これらの結果から、PLD活性がIQ依存的なゴルジ体の小胞化に必須であることが示された。

5. IQ依存的なPLD活性化にPKD活性は影響しない。

一方、これまでIQのターゲットとしてPKDが報告されておりゴルジ体の小胞化との関連が示唆されているが、その詳細なメカニズムは不明であった。そこで、IQ依存的なPLD活性化とPKD活性化の関連について解析を行った。まず、PKD活性のPLD活性に与える影響について評価を行った。FLAGタグ付きPLDとHAタグ付きPKDをCOS-7細胞に発現させ、それぞれの特異的抗体で精製し酵素源とし、PKDがPLD活性に影響を及ぼすかについて*in vitro*で評価を行った。その結果、PKDおよび活性化型PKDはPLD活性に影響を与えなかった。次に一過的にPKDを過剰発現させたHeLa細胞を用いて、IQ依存的なPLD活性化を評価した。その結果、PKDおよび活性化型PKDを過剰発現させても、IQ依存的なPLD活性化は増強されなかった。従って、PKDはIQ依存的なPLD活性化に影響しないことが示された。

6. IQ依存的なPKD活性化はPLD依存的に惹起される。

PLD活性がPKD活性に影響されないことが示されたので、次に、PLD活性のPKD活性化に対する影響を評価した。キナーゼ活性の測定には、基質としてPKDにより特異的にリン酸化され

るペプチドsyntide-2を用い、酵素源として、PLD活性を保つ目的でジギトニン処理したセミインタクトなHeLa細胞を用いた。この酵素源にsyntide-2、および放射標識されたATPを加え放射活性を測定し、PKD活性の指標とした。その結果、コントロールではIQ依存的にPKD活性は増加するが、PLD阻害剤1-BuOHが存在すると、IQ依存的なPKD活性の増加は抑制された。また2-BuOH存在下では抑制されなかった。これらのことから、IQによるPKD活性化にも、PLD活性が必要であることが示唆された。

7. IQ依存的なゴルジ体の小胞化にはPAホスファターゼ活性によるジアシルグリセロール産生、及びPKD活性化が必要である。

これまでの結果から申請者は、IQ依存的なPKD活性化は、PLD活性化により産生されたPAがPAホスファターゼによりDAGに変換されPKDの活性化を引き起こしているのではないかと考えた。そこで、PAホスファターゼ阻害剤であるpropranololを用いて、IQ依存的なPKD活性化、及びゴルジ体の小胞化について評価を行った。その結果、IQ依存的なPKD活性は400 μ M propranololによって著しく阻害された。さらに、IQ依存的なゴルジ体の小胞化に関しても400 μ M propranololによって著しく阻害された。以上の結果から、PLD活性化により産生されたPAがDAGに変換されPKDを活性化し、ゴルジ体の小胞化が引き起こされているという一連の分子機構が初めて明らかとなった。

【まとめと考察】

本研究で申請者は、IQが細胞レベルでPLDを活性化すること、またPLD1を選択的に活性化していることを明らかにした。次にIQ依存的なゴルジ体の小胞化にPLD活性が必要であることを、PLDノックアウトDT40細胞を用いて明らかにした。さらに、IQ依存的に活性化したPLDが産生したPAが、PAホスファターゼによりDAGに変換され、産生されたDAGがPKDを活性化し、IQ依存的なゴルジ体の小胞化を引き起こしているという一連のメカニズムを明らかにした。PLDが産生するPAには生物学的に二つの意義があると考えられ、一つはPAは直接膜に作用し、膜の曲率を変化させることにより物理的に膜の小胞化を惹起しやすい環境をつくることであり、もう一つはPAホスファターゼによりDAGに変換されることによりPKDを活性化するシグナル分子として機能することにあると考えられる。

本研究で明らかにしたメカニズムは、ゴルジ体の小胞化に限らず、細胞内の膜輸送システムにおいて、PAなどの脂質が物理的に膜の構造変化を引き起こす機能と蛋白質活性制御因子としての機能という二つの役割が協調的に機能していることを示唆しており、膜ダイナミズムにおけるメカニズムとして非常に興味深い。

論文要旨

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第2059号	氏名	園田 洋史
論文題目 Title of Dissertation	Requirement of Phospholipase D for Ilimaquinone-induced Golgi Membrane Fragmentation イリマキノンによるゴルジ体の小胞化におけるホスホリパーゼDの重要性		
審査委員 Examiner	主査 匂坂 敏朗 Chief Examiner 副査 伊藤 俊樹 Vice-examiner 副査 平田 健一 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

ゴルジ体や小胞体等の細胞内小器官の生成・分解の動的バランスは、細胞内小胞輸送のネットワークの中で厳密に制御されており、蛋白質・脂質の輸送、シグナル伝達において重要な機能を担っている。海綿動物由来の化合物であるイリマキノン (IQ) は、ゴルジ体を小胞化させることが知られており、小胞輸送の研究において広く用いられている。これまでIQによるゴルジ体の小胞化作用は、IQが三量体G蛋白質のサブユニットを解離させ、プロテインキナーゼD (PKD) を活性化することにより引き起こされると説明されていたが、その詳細は依然不明であった。そこで申請者は、IQによるゴルジ体の小胞化に注目し、この現象に細胞膜磷脂質代謝酵素ホスホリパーゼD (PLD) の関与について詳細に解析を行い、新たな分子機構を明らかにした。

まず申請者はIQによるゴルジ体の小胞化にPLD活性が関与するかについて解析を行った。VSVGを温度依存的にゴルジ体へ集積させ、細胞外からIQを添加し経時的に蛍光顕微鏡下に観察した。その結果、ゴルジ体へ集積したVSVGは、IQ添加により細胞質へ小胞化して分散した。しかし、PLDの加水分解を特異的に阻害する1-BuOH存在下では、この小胞化が抑制され、加水分解阻害作用を持たない2-BuOHでは、この抑制作用は認められなかった。これらの結果から、IQによるゴルジ体の小胞化に、PLD活性が関与することが初めて示唆された。

次に、実際にIQがPLDを活性化しているかについて、細胞レベルでの解析を行った。放射標識した脂肪酸で膜リン脂質をラベルした後、1-BuOH存在下にIQを添加し、ホスファチジルブタノールの産生を指標としてPLD活性を測定した。その結果、HeLa、NRK、どちらの細胞でも30 μ MのIQ刺激時に著しくPLD活性が上昇した。更に、コントロール細胞で認められるIQ依存性のPLD活性化は、PLD1のsiRNAにより顕著に抑制されたが、PLD2のsiRNAでは抑制されなかったことから、IQにより活性化されるPLDはPLD1であることを示した。また、PLDノックアウト細胞株を用いた実験から、PLD活性がIQによるゴルジ体の小胞化に必須であることを証明した。

またこれまでIQの下流にPKDが存在することが報告されていたため、次にPLDとPKDの関係を調べた。PLDのPKD活性化に対する影響を細胞レベルで評価したところ、コントロールではIQ依存的にPKD活性は増加するが、PLD阻害剤1-BuOHが存在すると、IQによるPKD活性化は抑制された。また2-BuOH存在下では抑制されなかった。これらのことから、IQによるPKD活性化にも、PLD活性が必要であることが示唆された。

最後に、IQによるPKD活性化は、PLD活性化により産生されたホスファチジン酸 (PA) がPAホスファターゼによりジアシルグリセロール (DG) に変換され、PKDの活性化を引き起こしている可能性を検討する目的で、PAホスファターゼ阻害剤であるpropranololを用いて、IQ依存的なPKD活性化、及びゴルジ体の小胞化について実験を行った。その結果、PLD活性化により産生されたPAがDGに変換されPKDを活性化し、ゴルジ体の小胞化が引き起こされているという一連の分子機構が明らかとなった。

本研究結果を考察すると、PLDが産生するPAには二つの機能があると考えられ、一つはPAが直接膜に作用し、膜の曲率を変化させることにより物理的に膜の小胞化を惹起しやすい環境を提供することであり、もう一つはPAホスファターゼによりPAがDGに変換されることによりPKDを活性化するシグナル分子として機能することにあると考えられる。今後、本研究で明らかとなった機構が、他の細胞内顆粒輸送の調節に於いても重要であるのか興味深い。

本研究は、イリマキノンの作用機序を明らかにする過程で、ゴルジ体からの小胞輸送にホスホリパーゼD系を介するホスファチジン酸やジアシルグリセロール産生の重要性を明らかにしたもので、細胞内顆粒輸送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。