

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770153

研究課題名(和文)新規リゾホスホリパーゼDの活性調節機構

研究課題名(英文)The regulation of intracellular lysophospholipase D activity

研究代表者

青山 智英子(Aoyama, Chieko)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：90420778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円、(間接経費) 600,000円

研究成果の概要(和文)：リゾホスホリパーゼD(lysoPLD)はリゾホスファチジルコリンから強力な生理活性脂質であるリゾホスファチジン酸(LPA)とコリンを産生する酵素である。我々はこれまで知られていた細胞外分泌型lysoPLDとは異なる細胞内型lysoPLDをラット脳より精製し、その精製タンパク質が三量体型Gタンパク質のG $\alpha$ qおよびG $\beta$ 1サブユニット複合体であることを同定し報告してきた。今回あらたに別のタイプのG $\alpha$ サブユニットがlysoPLD活性を示すことを明らかにした。さらにFLAGタグ融合G $\alpha$ サブユニットの変異体の解析から、lysoPLD活性には複合体形成が重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Lysophospholipase D (lysoPLD) is a key enzyme to produce bioactive phospholipid lysophosphatidic acid (LPA), which mediates multiple physiological and pathological events. We purified a novel lysoPLD from rat brain microsome and identified heterotrimeric G protein subunits G $\alpha$ q and G $\beta$ 1 in the purified fraction. In the present study, it is demonstrated that the other type of G $\alpha$  subunit, G $\alpha$ 12 also exhibit lysoPLD activity. From the FLAG tagged G $\alpha$  protein mutant study, it is suggested that the G protein requires to form a complex for its lysoPLD activity.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：リゾホスホリパーゼD リゾホスファチジン酸 三量体Gタンパク質

1. 研究開始当初の背景

リゾホスファチジン酸 (LPA) は強力な生理活性脂質であり、特異的な受容体を介して細胞増殖、細胞運動や血小板凝集の促進といった作用を示す。また LPA とがんや動脈硬化といった疾患との関わりも明らかにされつつあり、その産生・代謝機構の解明はこれら疾患の病態の理解、治療法の確立の観点からも重要である。

リゾホスホリパーゼ D (lysoPLD) はリゾホスファチジルコリン (LPC) を加水分解し LPA とコリンを産生する酵素である。ヒトおよびウシ血清から lysoPLD 活性を持つ分子としてオートタキシン (ATX) が同定されたが、細胞内には ATX とは異なる酵素学的性質を持つ lysoPLD 活性が存在することが知られていた。

そこで申請者らはラット脳、核画分より lysoPLD の精製を試み、ATX とは酵素学的、免疫学的に異なる新たな lysoPLD を精製した。またこの最終精製画分に含まれるタンパク質についてペプチド・マス・フィンガープリンティング法により同定を試み、三量体 G タンパク質の G<sub>q</sub> サブユニットと G<sub>1</sub> サブユニットが含まれることを明らかにしてきた。しかし G<sub>q</sub> G<sub>1</sub> 複合型 lysoPLD の活性調節メカニズムや、他の G サブユニットが同様に lysoPLD 活性を持つか否かについては不明であった。

2. 研究の目的

細胞内型 lysoPLD 活性の機能や調節を明らかにするため、lysoPLD 活性と共に精製された G<sub>q</sub> および G<sub>1</sub> サブユニットの他に、異なるサブタイプの G サブユニットが同様に lysoPLD 活性を示すかどうか、さらに G<sub>q</sub> サブユニット由来の活性との比較を行った。G タンパク質の機能と lysoPLD 活性との関係を明らかにする為に G タンパク質の機能に影響を及ぼす変異体についても解析を行った。

3. 研究の方法

G<sub>q</sub> に FLAG タグを付した融合タンパク質を Hepa-1 細胞、あるいは Neuro-2A 細胞に発現させ、タグによる精製を行ったタンパク質について、lysoPLD 活性の測定を行った。また他のサブファミリーに属する G タンパク質や、これらの変異体についても同様に培養細胞での発現、タグによる精製を行い、lysoPLD 活性の測定を行った。

4. 研究成果

G<sub>q</sub> およびこれと同じサブファミリーに属する G<sub>11</sub>、G<sub>14</sub>、G<sub>15</sub>、また別のサブファミリーに属する G<sub>12</sub>、G<sub>s</sub>、G<sub>i</sub> について、タグ融合タンパク質を Hepe-1 細胞に発現、精製の後 lysoPLD 活性を測定したところ、G<sub>q</sub> と同じサブファミリーに属するものおよび G<sub>12</sub> からは lysoPLD 活性が検

出された。(図1)一方 G<sub>s</sub>、G<sub>i</sub> からは活性は検出されず、三量体 G タンパク質の lysoPLD 活性はサブタイプ特異的であることが明らかになった。

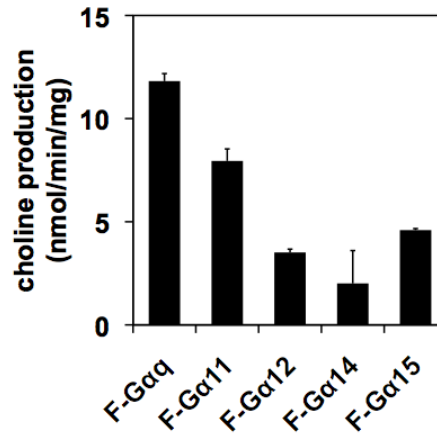


図1: FLAG タグ融合各種 G タンパク質の lysoPLD 活性

新たに lysoPLD 活性が検出された FLAG-G<sub>12</sub> について、FLAG-G<sub>q</sub> と酵素学的特徴を比較するため、lysoPAF を基質として、各基質濃度における Neuro-2A 由来の FLAG-G<sub>q</sub> および FLAG-G<sub>12</sub> の lysoPLD 活性を測定し、ラインウィーバー-バークのプロットより最大反応速度 V<sub>max</sub>、ミカエリス定数 K<sub>m</sub> 値を求めた。その結果、K<sub>m</sub> 値はほぼ同じであったが V<sub>max</sub> は FLAG-G<sub>q</sub>、FLAG-G<sub>12</sub> 間で大きく異なっていた。(図2)

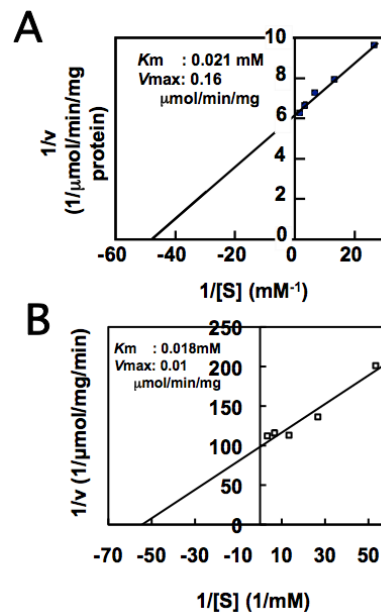


図2: FLAG-G<sub>q</sub>(A)および FLAG-G<sub>12</sub>(B)の基質 lysoPAF に対するラインウィーバー-バークのプロット

また、LPC(16:0), LPC(18:0), PLC(18:1), sphingosylphosphorylcholine (SPC), lysoPAF を基質に lysoPLD 活性の測定を行い基質特異性について調べたところ、FLAG- G<sub>12</sub> は lysoPAF に対して最も高い活性を示し、この傾向は FLAG- G<sub>q</sub> における基質特異性と同様であった。(図3)

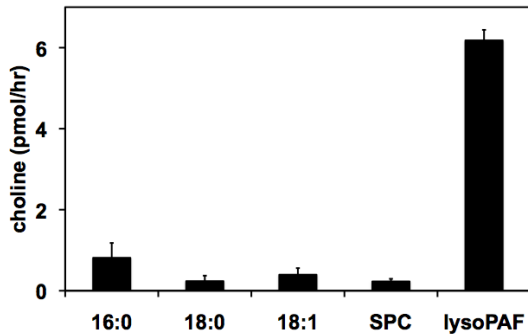


図3：精製 FLAG- G<sub>12</sub> の lysoPLD 活性の基質特異性

G<sub>q</sub> サブユニットはそのパルミトイル化部位及び G<sub>β</sub> サブユニットと相互作用する部位の変異により細胞質画分へと細胞内局在が変化し、シグナル伝達にも影響を与える事が知られている。FLAG タグ G<sub>q</sub> タンパク質にこれらの変異を導入し、サブユニットとの相互作用や膜への局在が lysoPLD 活性に与える影響を調べた。その結果、パルミトイル化部位の変異 (CC9/10SS), サブユニットとの結合部位の変異 (IE25/26AA) は共に G<sub>β</sub> サブユニットとの共精製が見られなくなり、lysoPLD 活性が大きく低下した。(図4) さらに FLAG タグ精製後の G<sub>q</sub> および変異体タンパク質に脱パルミトイル化処理や、精製サブユニットの添加を行っても lysoPLD 活性に影響を与えなかった。

異なるサブファミリーに属する G<sub>12</sub> はパルミトイル化修飾部位を変異 (C11S) させても細胞内における局在の変化は少なく、FLAG タグ精製 G<sub>12</sub> タンパク質の lysoPLD 活性にも変化がなかった。(図5) これらの事から、G<sub>q</sub> タンパク質の lysoPLD 活性の発現には細胞膜への正しい局在と、おそらく膜における何らかの活性調節因子との相互作用が活性発現に必須である可能性が考えられた。

FLAG タグ精製を行った G<sub>q</sub> タンパク質について、さらにゲル濾過クロマトグラフィー等でサイズ分画を行ったところ、活性のある G<sub>q</sub> タンパク質は単量体ではなくサブユニットと、おそらくそれ以外も含む複合体を形成していることが示唆された。

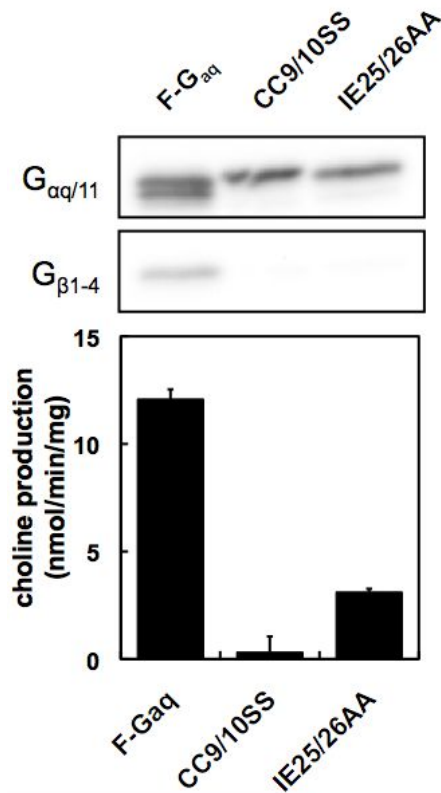


図4：G<sub>q</sub> のパルミトイル化、サブユニットとの相互作用が lysoPLD 活性に与える影響

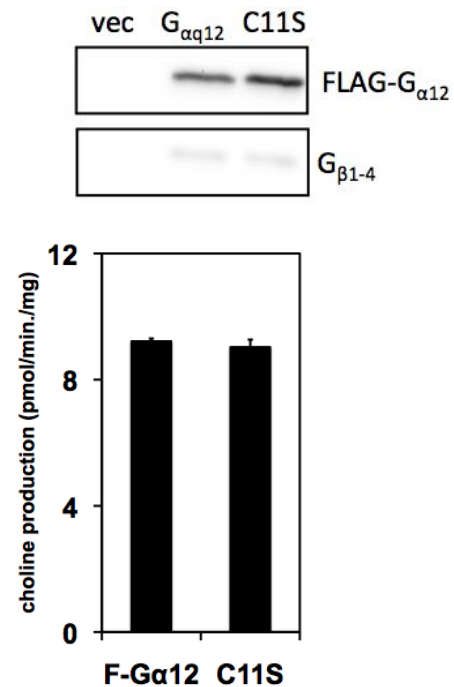


図5：G<sub>12</sub> のパルミトイル化が lysoPLD 活性に与える影響

以上の結果から、G タンパク質型 lysoPLD の活性は G<sub>β</sub> サブユニットのサブタイプ特異的であり、活性の発現には膜への局在化あ

るいは サブユニットや他の因子との複合体形成が必要であることが明らかになった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 2件)

- (1) 青山智英子、三橋里美、山下智子、安戸博美、杉本博之、細胞内型リゾホスホリパーゼDの局在が活性に及ぼす影響、第86回 日本生化学会大会、横浜、2013年9月
- (2) 青山智英子、山下智子、安戸博美、杉本博之細胞内ホスホリパーゼDの活性調節、日本薬学会 第133年会、横浜、2013年3月

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

青山 智英子 (AOYAMA, Chieko)  
獨協医科大学・医学部生化学・助教  
研究者番号：90420778