

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380047

研究課題名(和文)ホスホリパーゼA2の新規な生理機能の解析

研究課題名(英文)Studies on the novel cellular functions of phospholipases A2

研究代表者

有岡 学 (Arioka, Manabu)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：20242159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 麹菌の持つ2つの分泌型PLA2のうちsPLaBが予想外にもPLA1活性を持つことを明らかにした。
(2) 細胞質型PLA2様タンパク質であるAoPLaAがホスファチジルエタノールアミンを特異的に分解すること、予想活性中心残基のアラニン置換体では活性が失われることを明らかにした。
(3) PC12細胞において神経栄養因子NGFによるMAPKのリン酸化(活性化)がリゾホスファチジルコリンの添加で亢進すること、またグループX PLA2でも同様の作用が認められることを見出した。その原因がNGF受容体TrkAの活性化亢進によるものであること、TrkAの細胞外ドメインが関与することなどを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：(1) One of the secretory phospholipases A2 (PLA2s) in *Aspergillus oryzae*, sPLaB, displayed PLA1, not PLA2, activity.
(2) A cytosolic PLA2-like protein in *A. oryzae*, AoPLaA, displayed phosphatidylethanolamine-specific PLA2 activity. Alanine substitution of putative active-site residues resulted in the loss of PLA2 activity.
(3) Nerve growth factor (NGF)-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation in PC12 cells was found to be potentiated by the addition of lysophosphatidylcholine (LPC). Group X PLA2 displayed an effect similar to LPC. LPC augmented NGF-induced activation of TrkA, the receptor for NGF, thereby potentiating the downstream signaling pathways. By domain-swapping experiments, the extracellular domain of NGF was shown to be responsible for the effect of LPC.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：phospholipase A2 lysophosphatidylcholine *Aspergillus oryzae* nerve growth factor MAPK

1. 研究開始当初の背景

ホスホリパーゼ A₂ (以下 PLA₂) はリン脂質の sn-2 位のエステル結合を加水分解し、脂肪酸とリゾリン脂質を遊離する酵素である。局在や酵素学的性質などから大きく分けて分泌型 (sPLA₂)、細胞質型 (cytosolic PLA₂; cPLA₂)、カルシウム非依存型 (Ca²⁺-independent PLA₂; iPLA₂) の三種類が知られている。PLA₂ は動物ではアラキドン酸カスケードの初発酵素として、エイコサノイド類の産生に關与する役割を中心に研究が行われてきた。一方微生物では、PLA₂ 遺伝子が出芽酵母や分裂酵母には存在しないことは知られていたが、本研究代表者が糸状菌である麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノムを調べたところ、sPLA₂ 相同遺伝子が 2 個 (おのおの *splaA*、*splaB* と命名)、動物 cPLA₂α とアミノ酸レベルで 40% 程度の同一性を示す遺伝子が 1 個 (*AoplaA* と命名) 存在することが分かった。これらについて解析を進めた結果、sPLA₂ と sPLA₂ がそれぞれ異なる局在部位、酵素学的性質および酸化ストレスへの関与などの性質を示し、2 つの sPLA₂ が互いに独立した機能を持つことが示唆された。また、AoPlaA については、予想外にもミトコンドリアの膜間スペースに局在することが分かり、動物の cPLA₂α が細胞質に局在し、刺激によって核膜・ゴルジ膜に移行するのと大きく異なり、AoPlaA が糸状菌特有の機能を有している可能性が考えられた。

一方、本研究代表者は上記とは独立して動物 sPLA₂ についての解析も行ってきた。これは以下に述べる、神経栄養因子に類似の活性を示す生理活性物質のスクリーニングに端を発する。本研究代表者は、神経栄養因子様の活性を示す新規化合物を見出し、それを用いて神経細胞を活性化する方法を開発するとともに、その作用機序の解析から新規な細胞生存シグナルを発見することを目指し、微生物代謝産物からのスクリーニングを行った。その結果、糸状菌の生産する sPLA₂ が神経栄養因子と類似の作用を示すことを見出した。sPLA₂ が神経栄養因子作用を示すことは全く知られておらず、申請者が独自に見出した新規な知見であった。さらに解析を進めた結果、sPLA₂ の神経栄養因子作用はアラキドン酸カスケードには依存せず、リゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルコリン (リゾ PC) の産生を介したものであることがわかった。興味深いことに、このような作用が見られるのはリゾ PC のみであり、他のリゾリン脂質、例えば細胞運動や増殖を強力に誘導するリゾホスファチジン酸等は全く神経栄養因子作用を示さなかった。

2. 研究の目的

本研究では、従来全く研究されてこなかった微生物 PLA₂ の生理機能や酵素学的性質を麹菌を対象として解明し、麹菌の有用菌株の育種に役立てることを目的とした。また、動

物 sPLA₂ やリゾ PC の持つ新規な生理機能の分子機構を解明することも目的とした。

3. 研究の方法

His₆ タグ付き組換え sPlaA、sPlaB、および AoPlaA タンパク質の大腸菌による生産と精製、および [³H]オレイン酸標識した大腸菌を用いた PLA₂ 酵素活性測定、および麹菌の形質転換は中濱らの方法 (Fungal Genet. Biol. 47, 318 (2010)) に従った。質量分析は定法に従って行い、イオン化は ESI 法で行った。培養細胞へのトランスフェクションには LipofectAMINE 2000 を用いた。ウエスタンブロッティングは PVDF 膜を用いて定法に従って行なった。

4. 研究成果

(1) 麹菌の持つ 2 つの sPLA₂:sPlaA と sPlaB の解析

大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 株を用いて sPlaA、sPlaB タンパク質を生産したところ、不溶性画分に生産が認められた。そこで、菌体破砕液を遠心し、その沈殿をグアニジン塩酸塩水溶液で可溶化して Ni²⁺ カラムにかけ精製を行った。続いてグアニジン塩酸塩の濃度を段階的に下げて透析を行うことによりリフォールディングを行い、目的のタンパク質溶液を得た。また、高圧リフォールディング法によるリフォールディングも行った。さらに Origami (DE3) 株を用いた生産も行い、sPlaB については活性型タンパク質の取得に成功した。これらを用い、sn-2 位のみが [¹⁴C]オレイン酸で標識された 1-パルミトイル-2-[¹⁴C]オレオイル-ホスファチジルコリン (PC) を基質に用いた酵素反応を行った。薄層クロマトグラフィー (TLC) による解析の結果、sPlaA では遊離 [¹⁴C]オレイン酸のスポットが検出され、sn-2 位が切断されたこと、即ち sPlaA が PLA₂ 活性を持つことが示された。一方 sPlaB を用いた反応では、[¹⁴C]オレイン酸のスポットはほとんど検出されず、1-アシル型リゾ PC と同じ位置に、おそらく 2-[¹⁴C]オレオイルリゾ PC と考えられるスポットが検出された。このことから、sPlaB は sPLA₂ 様の配列を持つにも関わらず、sn-1 位のアシル鎖を加水分解する PLA₁ 活性を持つことが示唆された。

TLC による解析では、sPlaB を用いた反応で検出されたスポットが 2-[¹⁴C]オレオイルリゾ PC であるとは厳密には言い切れない。そこで、マススペクトロメトリーを用いた解析を行った。1-パルミトイル-2-オレオイル-PC (*m/z* 761) を基質に用いた反応を行ったところ、sPlaA ではオレイン酸を失った 1-パルミトイル-リゾ PC (*m/z* 497) が検出され、PLA₂ 活性が再確認された。一方、sPlaB ではパルミチン酸を失った 2-オレオイル-リゾ PC (*m/z* 523) のピークが検出された。以上より、sPlaB が PLA₁ 活性を持つことが確認された。

(2) 麹菌 cPLA₂ 様タンパク質 AoPlaA の解析

N 末端に存在するミトコンドリア局在化シグナルを除去した成熟型 AoPlaA を大腸菌で生産し、各種リン脂質に対する分解活性を検討した。その結果、PC、ホスファチジルセリン、およびホスファチジルイノシトールに対しては活性が認められなかったが、ホスファチジルエタノールアミン (PE) に対しては PLA₂ 活性を示すことが確認された。この結果は、我々が以前の研究で示していた、AoPlaA 高発現株のミトコンドリアでは PE が減少するという結果とよく一致した。

続いて動物 cPLA₂α において活性中心であることが示されているセリン残基に相当するセリン 266、および基質認識に関与すると考えられるアルギニン 238 をそれぞれアラニンに置換した変異 AoPlaA も同様に大腸菌で生産し、酵素活性を検討した。その結果、これらの変異 AoPlaA は PE に対する酵素活性を示さないことがわかった。この結果から、AoPlaA はその局在において cPLA₂α と大きく異なるにもかかわらず、類似の触媒機構を有することが示唆された。

以前の検討で、AoPlaA 高発現株は低温での生育に若干の遅延が認められることがわかってきた。これが AoPlaA の活性によるものであるかどうかを明らかにするため、上記の変異株を野生型 AoPlaA と同様に高発現させ、その低温での生育を比較した。その結果、セリン残基のアラニン置換体を発現する変異株では低温での生育の遅延が認められないことがわかった。このことから、生育の遅延は AoPlaA の活性によるものであり、その活性には 266 番目のセリン残基が関与している可能性が強く示唆された。

(3) 神経栄養因子シグナルに対するリゾ PC の増強作用に関する研究

本研究代表者は以前、PLA₂ によって PC が分解されて生じる代謝物であるリゾ PC が、0.1 および 1 μM という低濃度で神経成長因子 (Nerve growth factor; NGF) による MAPK の活性化 (リン酸化) を数倍上昇させることを見出していた。また、MAPK の下流で転写誘導される最初期遺伝子 *c-fos* などの発現もリゾ PC によって有意に上昇した。本研究では、この現象の分子メカニズムを解析した。

NGF 刺激から MAPK 活性化に至る過程のどの段階をリゾ PC が増強しているかを明らかにするため、ラット由来の PC12 細胞を用い、MAPK の上流因子である MEK、および NGF 受容体である TrkA の活性化を調べた。その結果、リゾ PC はどちらの活性化も増強することが分かり、リゾ PC が NGF シグナルの最上流に位置する TrkA の活性化を促進することで下流のシグナルも増強することが分かった。一方、リゾ PC は上皮成長因子 (Epidermal growth factor; EGF) 等による MAPK 活性化は促進しなかった。従ってリゾ

PC は NGF-TrkA 経路特異的に作用するものと考えられた。また、NGF と同じくニューロトロフィンファミリーに属する脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor; BDNF) についても調べたところ、BDNF 受容体である TrkB を発現する小脳顆粒細胞において、BDNF による MAPK および TrkB のリン酸化がリゾ PC によって促進されることがわかった。以上の結果から、リゾ PC によるシグナル増強効果はニューロトロフィン - ニューロトロフィン受容体の経路に特異的に認められることが強く示唆された。

次にリゾ PC がどのような機構で NGF-TrkA 経路を活性化するかを解析した。この目的のため、CHO-K1 細胞に TrkA をトランスフェクトし、NGF/リゾ PC による MAPK のリン酸化を調べた。その結果、TrkA 発現細胞では NGF によって MAPK が活性化し、それがリゾ PC によって増強されることが分かった。一方、EGF 受容体発現細胞において EGF は MAPK の活性化を誘導したが、これはリゾ PC によって増強されなかった。このことから、トランスフェクトした両受容体から MAPK に至る情報伝達過程が PC12 細胞におけるそれを再現できることが分かった。

次に TrkA のどの領域がリゾ PC に応答するのかを調べるため、TrkA と EGFR を細胞外・膜貫通・および細胞内領域に分割してそれぞれの領域を交換することでキメラ受容体を作製し、トランスフェクトした細胞の応答を調べた。その結果、TrkA の細胞外領域を持つキメラ受容体を発現させた細胞では NGF による MAPK のリン酸化が誘導され、それはリゾ PC によって増強された。一方、EGFR の細胞外領域と TrkA の膜貫通・細胞内領域のキメラ受容体を発現する細胞では EGF による MAPK のリン酸化は誘導されたものの、リゾ PC による増強は認められなかった。以上の結果から、リゾ PC の作用には TrkA の細胞外領域が関与すること、膜貫通や細胞内領域はリゾ PC による受容体の活性化促進には関与しないことが明らかとなった。

すでに述べたように、リゾ PC は PC が PLA₂ によって分解されて生じる代謝物であることから、PLA₂ もリゾ PC と同様の効果を示す可能性が考えられる。そこでマウス由来の代表的な 4 つの sPLA₂ (グループ IB、IIA、V および X) をリゾ PC の代わりに用いた実験を行った。その結果、グループ X sPLA₂ の培地への添加により PC12 細胞の MAPK リン酸化が増強することがわかった。

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)

[雑誌論文](計 6 件)

Wuhanqimuge and Arioka, M.

Lysophosphatidylcholine potentiates

BDNF-induced TrkB phosphorylation and downstream signals in cerebellar granule neurons
Biosci. Biotechnol. Biochem. 77, 2510-2513 (2013)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/77/12/77_130622/_article

Wuhanqimuge, Itakura, A., Matsuki, Y., Tanaka, M., and Arioka, M. Lysophosphatidylcholine enhances NGF-induced MAPK and Akt signals through the extracellular domain of TrkA in PC12 cells. FEBS Open Bio 3, 243-251 (2013)
doi: 10.1016/j.fob.2013.05.003

Matsuo, K., Higuchi, Y., Kikuma, T., Arioka, M., and Kitamoto, K. Functional analysis of Abp1p-interacting proteins involved in endocytosis of the MCC component in *Aspergillus oryzae*. Fungal Genet. Biol. 56, 125-134 (2013)
doi: 10.1016/j.fgb.2013.03.007

Ohno, A., Maruyama, J., Nemoto, T., Arioka, M., and Kitamoto, K. A carrier fusion significantly induces unfolded protein response in heterologous protein production by *Aspergillus oryzae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 92, 1197-1206 (2011)
doi: 10.1007/s00253-011-3487-9

Higuchi, Y., Arioka, M., and Kitamoto, K. Functional analysis of the putative AAA ATPase AipA localizing at the endocytic sites in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. FEMS Microbiol. Lett. 320, 63-71 (2011)
doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02288.x

Kimura, S., Maruyama, J., Kikuma, T., Arioka, M., and Kitamoto, K. Autophagy delivers misfolded secretory proteins accumulated in endoplasmic reticulum to vacuoles in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 406, 464-470 (2011)
doi: 10.1016/j.bbrc.2011.02.075

〔学会発表〕(計 10 件)

第 14 回東京大学生命科学シンポジウム (平成 26 年 4 月 26 日 東京大学)
麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来分泌型および細胞質型ホスホリパーゼ A₂ の持つユニークな酵素学的性質
高柳 亜由美、駒井 紀之、宮川 拓也、大塚 淳、田之倉 優、北本 勝ひこ、有岡 学

日本農芸化学会大会 (平成 26 年 3 月 27 日 ~ 30 日 東京)
分泌型ホスホリパーゼ A₂ は神経栄養因子からのシグナルを増強する
畢 純、オハanchiメグ、北本 勝ひこ、有岡 学

日本農芸化学会大会 (平成 25 年 3 月 24 日 ~ 28 日 仙台)
麹菌 *A. oryzae* におけるエンドサイトーシス関連タンパク質 *AipB*, *AipC*, *AipD* の解析
松尾 賢人、樋口 裕次郎、菊間 隆志、有岡 学、北本 勝ひこ

53rd International Conference on the Bioscience of Lipids (September 4-9, 2012 Banff, Canada)
Synergistic Effect of Lysophosphatidylcholine on Nerve Growth Factor-induced Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) and Akt Signals through the Extracellular Domain of Receptor TrkA in PC12 Cells
Wuhanqimuge, Katsuhiko Kitamoto, and Manabu Arioka

日本農芸化学会大会 (平成 24 年 3 月 22 ~ 25 日 京都) (一般講演)
麹菌 *A. oryzae* における細胞質型ホスホリパーゼ A₂ 相同遺伝子 *AoplaA* の機能解析
駒井 紀之、小谷 昌平、北本 勝ひこ、有岡 学

Synergistic effect of lysophosphatidylcholine on NGF-induced survival signaling pathways through receptor TrkA in PC12 cells
Wuhanqimuge, Katsuhiko Kitamoto, Manabu Arioka

4th Congress of European Microbiologists, FEMS2011 (June 26-30, 2011 Geneva, Switzerland)
Functional analyses of three endocytosis-related components in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*.
Kento Matsuo, Yujiro Higuchi, Manabu Arioka, Katsuhiko Kitamoto

第 11 回東京大学生命科学シンポジウム (平成 23 年 6 月 4 日 東京大学)
Aspergillus oryzae におけるエンドサイトーシス関連遺伝子 *aipA*, *aipC*, *aipD* の解析
松尾 賢人、樋口 裕次郎、有岡 学、北本 勝ひこ

麹菌 *A. oryzae* はマクロオートファジー依存的に核を液胞に取り込む
菊間 隆志、正路 淳也、有岡 学、北本 勝ひこ

Lysophosphatidylcholine synergistically enhances NGF-induced MAPK and Akt signaling pathways through the NGF receptor TrkA in PC12 cells
Wuhanqimuge, Katsuhiko Kitamoto, Manabu Arioka

6. 研究組織

(1)研究代表者

有岡 学 (ARIOKA, Manabu)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・

准教授

研究者番号：20242159

(2)研究分担者

なし ()

(3)連携研究者

なし ()