

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580074

研究課題名（和文）ホスホリパーゼ A 2 の生理機能の解析

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

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

研究成果の概要（和文）：PC12 細胞において神経成長因子 NGF は MAPK を活性化させ細胞を分化誘導するが、それはリゾホスファチジルコリン（LPC）によって顕著に亢進される。リゾリン脂質の中では LPC のみがこうした作用を有しており、また他の増殖因子による MAPK リン酸化は LPC による作用を受けなかった。NGF によるその受容体 TrkA の自己リン酸化も LPC で亢進していたことから、LPC の効果が NGF-TrkA 経路に特異的であることがわかった。麹菌 *AoPlaA* は N 末端にミトコンドリア局在化シグナルを持つ。分画実験を行い、*AoPlaA* がミトコンドリア内膜と外膜の間の膜間スペースに局在することを明らかにした。*AoPlaA* 高発現株・破壊株を用いた実験から、高発現株ではホスファチジルエタノールアミンが減少、一方破壊株においてはカルジオリピンが増加していることが確認された。

研究成果の概要（英文）：In PC12 cells, nerve growth factor (NGF) activates MAPK phosphorylation and induces neuronal differentiation, which is potently enhanced by lysophosphatidylcholine (LPC). No other lysophospholipids tested displayed similar activity. MAPK activation/phosphorylation that occurs downstream of other growth factors, such as epidermal and fibroblast growth factors, was not affected by LPC. TrkA autophosphorylation elicited by NGF was markedly enhanced by LPC, suggesting that the effect of LPC was specific to NGF-TrkA signaling pathway. *AoPlaA* in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* localizes to mitochondria. Subcellular fractionation experiment showed that *AoPlaA* localized to the intramembrane space of mitochondria. Phospholipid analysis demonstrated that phosphatidylethanolamine and cardiolipin was decreased and increased in *AoPlaA*-overexpressing and -deleted strains, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |
| 2009年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 2010年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

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：微生物代謝、ホスホリパーゼ A 2、リゾリン脂質

1. 研究開始当初の背景

ホスホリパーゼ A2 (PLA2) はリン脂質の

sn-2 位のエステル結合を切断し脂肪酸とリゾリン脂質を遊離する酵素である。従来、

PLA2 はアラキドン酸カスケードの初発酵素として、主としてプロスタグランジンやロイコトリエン等の脂質メディエーター（エイコサノイド）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、申請者らはこれとは全く独立に、分泌型の PLA2 (secretory PLA2; sPLA2) が神経栄養因子としてのユニークな作用を示すことを明らかにしてきた。その概略は以下の通りである。申請者らは、自然界に存在する多様な化合物の中から神経栄養因子と類似の活性を示す物質を見出すことを目的に、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、ある種の糸状菌の生産する sPLA2 が、神経細胞のモデルである PC12 細胞に対して神経栄養因子の一種である Nerve Growth Factor (NGF) と同様の作用を示すことを見出した。sPLA2 のこうした作用は従来知られておらず、申請者ら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 が後根神経節細胞や小脳顆粒細胞などの初代培養神経細胞に対してもそのアポトーシスを抑制するなど、既知神経栄養因子と同様の生存維持作用を示すことがわかった。

哺乳類においては 11 個の sPLA2 アイソザイム遺伝子の存在が知られている。それらについて調べたところ、神経系に発現するグループ X sPLA2 が高い神経栄養因子活性を示すのに対し、膵消化液中のグループ IB や炎症応答に關与するグループ IIA は強い触媒活性を持つにもかかわらず、全く神経栄養因子作用を示さなかった。また、エイコサノイド産生と sPLA2 の神経栄養因子作用との間に相関関係は認められなかった。そこで sPLA2 によるリン脂質分解のもう一方の産物であるリゾリン脂質の關与を調べたところ、リゾホスファチジルコリン (LPC) が sPLA2 と同様の作用を示すことを見出した。興味深いことに、このような作用が見られるのは LPC のみであり、リゾホスファチジン酸を含む他のリゾリン脂質は全く神経栄養因子活性を示さなかった。LPC のみが神経栄養因子作用を示すことは、上に述べた sPLA2 アイソザイム間での神経栄養因子活性の違い (X>>IB, IIA) もよく説明した。即ち、グループ X sPLA2 はホスファチジルコリン (PC) をよく分解できるのに対し、IB や IIA は PC をほとんど分解できない。従って、神経栄養因子活性と PC 分解能=LPC 産生能とは密接に相関しており、sPLA2 の持つ神経栄養因子活性が LPC の産生を介したものであるとの仮説が強く支持された。

次に LPC がどのような作用機序により神経栄養因子活性を発揮するのかを調べた。その結果、RNA 干渉や過剰発現実験から、LPC に対する応答に關与することが報告されている G タンパク質共役型受容体 (GPCR) で

ある G2A が sPLA2 や LPC の示す神経栄養因子作用に關与することがわかった。

一方、微生物においては PLA2 に關する知見は従来ほとんど得られていなかった。申請者らは、ホモロジー検索から糸状菌の一種である麴菌 *Aspergillus oryzae* のゲノム中に sPLA2 遺伝子が 2 個 (*splaA*, *splaB*)、細胞質型 PLA2 (cytosolic PLA2; cPLA2) 遺伝子が 1 個 (*AoplaA*) 存在することを見出した。また、どちらも酵母には存在しなかった。麴菌 sPLA2 である *splaA*, *splaB* に関して解析を進めた結果、両者が異なる局在部位、酵素的性質および発現条件を持つことから、互いに独立した機能を持つことが示唆された。また、遺伝子破壊株の表現型解析から、おのおのが菌糸および分生子の酸化ストレス耐性に關与することがわかった。

2. 研究の目的

以上のように、申請者らは sPLA2 の持つ新規生理機能として神経栄養因子活性を発見し、それが従来知られていたエイコサノイド産生を介したのではなく、LPC およびその応答に關与する GPCR を介したものであることを明らかにした。本研究は、その過程で新たに見出された「神経栄養因子とリゾリン脂質の協調的作用」についてさらに解析を進めようとするものである。NGF や LPC はそれぞれ単独でも MAP キナーゼ (MAPK) を活性化し細胞分化を誘導するが、申請者らは最近、両者の共存によりそれが顕著に亢進することを見出した。MAPK の下流で誘導される遺伝子群の発現や形態分化等の細胞応答においても NGF と LPC との間で相乗的増強作用が認められた。従って、両者のシグナル伝達経路が細胞内で cross-talk しているものと考えられた。本研究では、これがどのような機構によるものであるかを明らかにし、神経栄養因子とリゾリン脂質の併用によってより効果的に神経細胞死を抑制する手法を確立することを目指す。

一方、麴菌の持つもう一つの PLA2 (cPLA2) である *AoplaA* の機能解析についても研究を進める。sPLA2 と同様、動物 cPLA2 (特に cPLA2 α) もエイコサノイド産生に關与することが知られているが、興味深いことに *AoplaA*-EGFP はミトコンドリアに局在することがわかった。これは動物 cPLA2 α で報告されている局在 (細胞質 (刺激前) →核膜・ゴルジ膜 (刺激後)) とは大きく異なることから、*AoplaA* がこれまで全く知られていない新規生理機能を持つことが予想される

3. 研究の方法

課題 1 「神経栄養因子とリゾリン脂質の協調的作用」

「研究目的」の項で述べたように、申請者

らは最近、「神経栄養因子とリゾリン脂質の協調的作用」を見出した。即ち、PC12細胞に対して、通常分化誘導に用いる濃度(100 ng/ml)の半分の濃度のNGF存在下、LPCを添加したところ、LPC無添加の場合に比べMAPKのリン酸化(=活性化)が顕著に亢進することがわかった。LPC単独ではごく弱いリン酸化が認められるのみであり、両者共存下でのリン酸化はおおの単独の処理で見られるリン酸化の和よりも明らかに強いものであった。こうした現象は申請者の知る限り新規な知見であり、NGFとLPCによるシグナルが細胞内においてcross-talkし、相互に増強しあうものと考えられた。本研究期間内では、このcross-talkの機構の解明を目指して検討を行った。

課題2「麴菌におけるPLA2の生理機能の解析」

本研究期間内では、麴菌AoPlaAの機能解析を中心に行う。AoPlaAは動物由来のcPLA2 α と類似の構造を持つが、Ca²⁺依存的にリン脂質に結合するC2ドメインを持たないなどの相違点も有する。また、ヒトcPLA2 α がアラキドン酸を特異的に遊離するのに対し、麴菌(及び多くの糸状菌)はアラキドン酸を持たず、多価不飽和脂肪酸としてはリノール酸、リノレン酸を持つ。そこで本研究では、AoPlaAの基質特異性やCa²⁺依存性を調べる。一方、AoPlaAの局在を調べるため、AoPlaA-EGFPを麴菌に発現させたところ、予想外にも蛍光はミトコンドリアに確認された。これは、動物cPLA2 α が細胞質に遊離して存在し、刺激に伴ってC2ドメインを介して核膜、ゴルジ膜等に移行するのは異なっており、糸状菌と動物ではcPLA2の機能が大きく異なることを示唆している。局在についてさらに検証するため、(1)細胞分画を行ってAoPlaAがミトコンドリア画分に存在するかを別の角度から検証する；(2)ミトコンドリアのどのサブコンパートメントに局在するかをより詳細な分画およびプロテアーゼ感受性実験等により調べる；(3)局在予測プログラムによって推定されたN末端のミトコンドリア局在化シグナルが機能的かを、EGFPをレポーターに用いて調べる、等を行う。

4. 研究成果

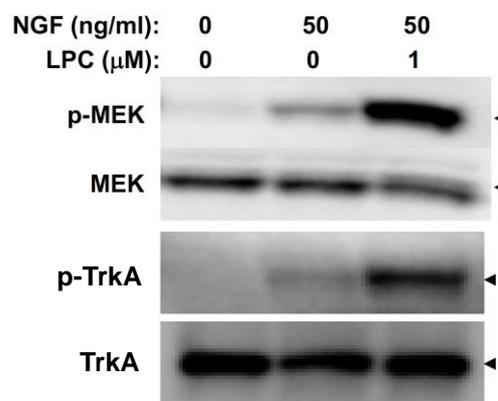
課題1

PC12細胞においてNGFはMAPKを活性化させるが、それがLPCによって顕著に亢進されることはすでに述べた。同様の実験を種々のリゾリン脂質を用いて調べたところ、リゾホスファチジン酸等他のリゾリン脂質では効果が見られず、LPCのみが顕著な作用を有していた。また、NGF処理に伴って速

やかに発現が誘導される最初期遺伝子 *c-fos*, *NGF-IA*, *NGF-IB* 等の発現をRT-PCRにより解析したところ、同様にLPC添加による亢進が認められた。さらに、NGFによるPC12細胞の分化誘導(突起伸長)もLPC共存下では顕著な亢進が認められた。

MAPKのリン酸化は上皮増殖因子(EGF)によるその受容体(EGFR)の活性化によっても引き起こされるが、興味深いことにこの系ではLPCによる亢進作用は認められなかった。また、同様に繊維芽細胞増殖因子(FGF)-同受容体(FGFR)経路によるMAPKリン酸化も亢進されなかった。

LPCの作用がMAPKの上流のどの段階で起こっているかを調べるため、MAPKの上流因子であるMEKのリン酸化を調べた。その結果、NGF処理によるMEKのリン酸化がLPCによって亢進されることがわかった(下図)。そこでNGFの受容体であるTrkAの自己リン酸化を調べたところ、LPCによる亢進が認められた(同)。これと一致して、NGF-TrkAのシグナルの下流でMAPK経路とは別経路で起こるホスファチジルイノシトール3-キナーゼAktの活性化を調べたところ、LPCによる亢進が認められた。以上の結果から、LPCの効果がNGF-TrkA経路に特異的であることがわかった。



課題2

AoPlaAがミトコンドリアに局在化することが明らかになったことから、より詳細な検討を行った。N末端アミノ酸配列分析からAoPlaAがN末端にミトコンドリア局在化シグナルを持つことが示唆された。そこでAoPlaAのN末端65アミノ酸をEGFPに連結させその局在を調べたところ、ミトコンドリアへの局在が認められた。

続いてAoPlaAのミトコンドリア内部への局在およびsublocalizationをより詳細に調べた。麴菌ではミトコンドリア精製の実験系が確立されていないため、ミトコンドリア分画法が確立されている出芽酵母を用いることとした。ミトコンドリア染色試薬MitoTrackerとの共染色実験から、酵母にお

いても AoPlaA-EGFP がミトコンドリアに局在することを確認した。続いてその酵母株からショ糖密度勾配遠心により精製ミトコンドリア画分を取得した。この精製ミトコンドリア画分を用いて、①インタクトなミトコンドリア、②低浸透圧ショックによって外膜を破裂させ、内膜とマトリクスで構成されるマイトプラストと呼ばれる構造体が露出した状態のミトコンドリア、および③Triton X-100 処理によって全ての膜が可溶化されたミトコンドリア、の3つのサンプルを調製し、それらをプロテアーゼ処理実験に供した。その結果、AoPlaA-EGFP は①のプロテアーゼ処理では分解されず、②と③のプロテアーゼ処理では分解された。この結果から、AoPlaA がミトコンドリア内膜と外膜の間の膜間スペースに局在することが示唆された。

次に麹菌ミトコンドリア膜のリン脂質組成を質量分析により調べた。この実験のため、まず麹菌からミトコンドリアを粗精製するための実験系の構築を行った。ER マーカーであるカルネキシンに EGFP を融合させたタンパク質、液胞マーカーである CPY に EGFP を融合させたタンパク質、AoPlaA に EGFP を融合させたタンパク質をそれぞれ発現する株を破碎し、遠心分画を行った。各画分について抗 EGFP 抗体およびミトコンドリアマーカーである Hsp60 の抗体を用いたウェスタンブロットを行ったところ、P1 と命名した画分にはカルネキシンや CPY のシグナルは認められず、一方で AoPlaA と Hsp60 のシグナルが検出されたことから、P1 がミトコンドリアリッチなフラクションであることが分かった。次にコントロール株、*AoplaA* 高発現株、および *AoplaA* 破壊株について同様の遠心分画を行い、得られた P1 画分に対して MS/MS 解析および LC/MS 解析を行い、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、およびカルジオリピン (CL) の分析を行った。その結果、コントロール株に比べ、*AoplaA* 高発現株では PE が減少していることがわかった。一方、*AoplaA* 破壊株においては CL の増加が確認された。これらの結果から、AoPlaA が PE や CL の代謝に関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Nakahama, T., Nakanishi, Y., Viscomi, A. R., Takaya, K., Kitamoto, K., Ottonello, S., and Arioka, M.
Distinct enzymatic and cellular characteristics of two secretory phospholipases A₂ in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*, *Fungal Genet.*

Biol. **47**, 318-331 (2009) 査読有

2. Takaya, K., Higuchi, Y., Kitamoto, K., and Arioka, M.
A cytosolic phospholipase A₂-like protein in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* localizes to the intramembrane space of the mitochondria, *FEMS Microbiol. Lett.* **301**, 201-219 (2009) 査読有

3. Ikeno, Y., Cheon, S. H., Konno, N., Nakamura, A., Kitamoto, K., and Arioka, M.
Lysophosphatidylcholine protects cerebellar granule neurons from apoptotic cell death, *J. Neurosci. Res.* **87**, 190-199 (2009) 査読有

〔学会発表〕(計5件)

1. Wuhanqimuge, Kitamoto, K., Arioka, M.
Lysophosphatidylcholine enhances NGF-induced TrkA signaling in PC12 cells
日本農芸化学会 2011 年度大会 平成 23 年 3 月 27 日 京都女子大学
2. 小谷 昌平、高谷 康平、北本 勝ひこ、有岡 学
麹菌 *A. oryzae* の持つ細胞質型ホスホリパーゼ A₂ の局在および機能解析
日本農芸化学会 2010 年度大会 平成 22 年 3 月 29 日 東京大学教養学部
3. Itakura, A., Matsuki, Y., and Arioka, M.
Enhanced neurotrophic effect of nerve growth factor by lysophosphatidylcholine
4th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators, May 25-28, 2009, Tokyo
4. 板倉 亜沙子、北本 勝ひこ、有岡 学
リゾリン脂質と NGF の協調的な神経栄養因子作用のメカニズム
日本農芸化学会関東支部 2008 年度大会 平成 20 年 10 月 11 日 山梨大学
5. 高谷 康平、北本 勝ひこ、有岡 学
麹菌 *A. oryzae* における細胞質型ホスホリパーゼ A₂ の局在と機能の解析
日本農芸化学会関東支部 2008 年度大会 平成 20 年 10 月 11 日 山梨大学

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・応用生命工学専攻

研究者番号：20242159