

哺乳動物細胞の
ホスファチジルセリン合成酵素ⅠとⅡに関する
遺伝生化学的研究

齊藤 恭子

哺乳動物細胞の
ホスファチジルセリン合成酵素IとIIに関する
遺伝生化学的研究

齊藤 恭子

目次

	頁
略語	4
第1章 緒言	5
1. はじめに	6
2. PS代謝研究の背景	10
2.1. 哺乳動物細胞におけるPS合成経路の生化学的解析	10
2.2. 哺乳動物細胞におけるPS代謝機構の遺伝生化学的解析	13
2.2.1. CHO細胞のPS合成損傷変異株の分離と性状解析	13
(1) 2種類のセリン交換酵素 (PS合成酵素) の存在	13
(2) PEの前駆体としてのPSの重要性	14
(3) PSの前駆体となるリン脂質	17
2.2.2. PS合成損傷変異株を利用したPS代謝関連遺伝子の分離	18
(1) <i>pssC</i> 遺伝子	18
(2) <i>pssA</i> 遺伝子	20
3. 本研究の目的	21
第2章 材料と方法	23
1. 本研究で用いた主な細胞一覧	24
2. 細胞培養法	24
3. 細胞のホモジネート及び膜画分の調製と膜の可溶化	25
4. リン脂質・塩基交換活性測定法	26
5. <i>pssA</i> 部分ペプチドに対する抗体の調製	26
6. イムノプロット解析	27
7. イムノプレシピテーション	27

8. 細胞分画	28
9. セリン交換活性の低下した変異株のスクリーニング	29
10. ノザンプロット解析	30
11. リン脂質の抽出と分離	30
12. [32 P]PEと[32 P]PCの調製	31
13. 細胞への遺伝子導入	31
14. その他の方法	32
第3章 <i>pssA</i> 遺伝子産物はPS合成酵素Iである：免疫化学的解析	33
1. 目的	34
2. 結果	35
2.1. <i>pssA</i> 遺伝子産物の同定	35
2.2. <i>pssA</i> 遺伝子産物がPSSIであることの証明	38
2.2.1. 膜画分のPSSI活性	38
2.2.2. PSSI活性に対する抗peptide (4-18) 抗体の効果	38
2.2.3. PSSI活性と <i>pssA</i> 遺伝子産物の細胞内所在	41
3. 考察	45
第4章 CHO細胞のPS合成酵素II損傷変異株の分離と性状解析	47
1. 目的	48
2. 結果	49
2.1. PSSI損傷変異株PSB-2の分離	49
2.2. PSB-2株の増殖	54
2.3. PSB-2株のリン脂質組成とPS合成速度	54
2.4. PSB-2株のPEをPSに変換する活性	58
2.5. PSSIcDNAを導入したPSB-2株 (PSB-2/ <i>pssB</i>) の増殖とPS合成	61
2.6. PSSIcDNAを導入したPSB-2株 (PSB-2/ <i>pssA</i>) の増殖とPS合成	61

2.7. PSB-2/ <i>pssB</i> 株とPSB-2/ <i>pssA</i> 株のPEをPSに変換する活性	65
2.8. PSB-2/ <i>pssB</i> 株とPSB-2/ <i>pssA</i> 株のPCをPSに変換する活性	65
3. 考察	70
3.1. PSB-2株はPSSII損傷株である	70
3.2. CHO-K1細胞のセリン交換反応の殆どはPSSIとPSSIIによって触媒される	70
3.3. PSSIIはPE存在下におけるPSA-3株の増殖とPS合成に必須である	71
3.4. PSSIはPEからのPS合成を触媒しない	71
3.5. CHO-K1細胞の増殖とPS合成におけるPSSIIの重要性	72
3.6. CHO-K1細胞の増殖にPSが必須である	72
第5章 本研究のまとめと今後の課題	74
1. 本研究のまとめ	75
2. 今後の課題	77
2.1. PS合成酵素の触媒機構	77
2.2. PSSIとPSSIIの基質リン脂質の脂肪酸分子種に対する選択性	77
2.3. PSの機能研究へのPSB-2株の応用	78
2.4. PSSIIのPS代謝及びエタノールアミン代謝における意義	79
参考文献	81
謝辞	87

略語

- PC phosphatidylcholine (ホスファチジルコリン)
PE phosphatidylethanolamine (ホスファチジルエタノールアミン)
PI phosphatidylinositol (ホスファチジレイノシトール)
PS phosphatidylserine (ホスファチジルセリン)
PG phosphatidylglycerol (ホスファチジルグリセロール)
CL cardiolipin (カルジオリピン)
SM sphingomyelin (スフィンゴミエリン)
CHO Chinese hamster ovary (チャイニーズハムスター卵巣)
MARCKS myristoylated alanine-rich C kinase substrate
PSSI PS synthase I (PS合成酵素I)
PSSII PS synthase II (PS合成酵素II)
PSD PS decarboxylase (PS脱炭酸酵素)
Etn ethanolamine (エタノールアミン)
ATP adenosine 5'-triphosphate
ADP adenosine 5'-diphosphate
CTP cytidine 5'-triphosphate
CDP cytidine 5'-diphosphate
CMP cytidine 5'-monophosphate
PPi pyrophosphate
DG diacyl glycerol
HEPES *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*'-2-ethanesulfonic acid
EDTA ethylenediaminetetraacetic acid
PBS phosphate buffered saline
ELISA enzyme-linked immunosorbent assay
IgG immunoglobulin G
SDS sodium dodecyl sulfate
EGTA ethyleneglycol bis(2-aminoethylether)tetraacetic acid
PNS post nuclear supernatant
MAM mitochondria-associated membrane
TLC thin-layer chromatography

第1章 緒言

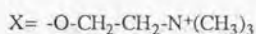
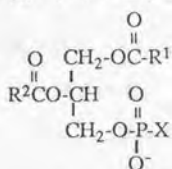
（以下為模糊不清之文字，內容難以辨識）

1. はじめに

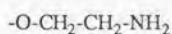
哺乳動物細胞の細胞内構造は、形質膜と種々のオルガネラにより構成される。これらの細胞内構造は、脂質二重層に各種の機能を持った膜蛋白質が存在する生体膜により構築されている。生体膜はオルガネラの代謝活動に必要なコンパートメントを形成している他、蛋白質の合成やエンドサイトーシス、エキソサイトーシスといった細胞活動に直接的、間接的に関与しており、細胞構造と機能の両面において、中心的役割を果たしている。哺乳動物細胞の膜脂質は、主にリン脂質、糖脂質とコレステロールから構成され、このうちリン脂質は最も主要な成分である。リン脂質は、その疎水性部分がグリセロールを基本骨格とするグリセロリン脂質とスフィンゴシンを基本骨格とするスフィンゴリン脂質に大別され、主要なグリセロリン脂質は、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルグリセロール (PG)、カルジオリピン (CL)、そして主要なスフィンゴリン脂質はスフィンゴミエリン (SM) である (図1)。リン脂質にはこのような極性基の多様性のみならず、14から24の炭素数からなる脂肪酸鎖の種類とその結合様式にも多様性が見られるため、生体膜を構成するリン脂質分子種は実に数百種以上に及んでいる。細胞内リン脂質分布が明らかになるにつれ、リン脂質分子種が各オルガネラ膜で固有の組成を示すことが知られるようになった。しかし、その組成の形成の仕組みや、脂質の多様性と各オルガネラ膜固有の機能との関連性については不明な点が多く残されている。

PSは生理的条件下でその極性頭部に負電荷を持つ酸性リン脂質の一つで、膜リン脂質の約5-15%を占める。哺乳動物細胞のPSは主としてジアシル型で、sn-1位にはステアリン酸 (18:0)、sn-2位にはアラキドン酸 (20:4) やドコサヘキサエン酸 (22:6) などの高度不飽和脂肪酸を有する分子種が比較的多いことが知られている (Takamura *et al.* 1980; Patton *et al.* 1982; Jungalwala *et al.* 1984; Nakagawa *et al.* 1985)。動物細胞内での比含量は形質膜で多く、ミトコンドリア膜やリソゾーム膜では少ない (Emmelot 1977; Daum 1985)。チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞では、細胞内の全PS量の約70%が形質膜に存在している (Warnock *et al.* 1993)。PSは形質膜において、PEとともに細胞質側

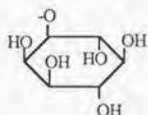
A. グリセロリン脂質



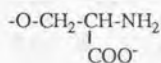
ホスファチジルコリン
phosphatidylcholine (PC)



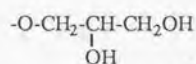
ホスファチジルエタノールアミン
phosphatidylethanolamine (PE)



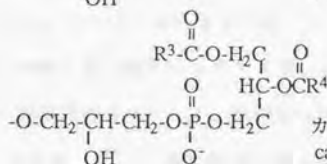
ホスファチジルイノシトール
phosphatidylinositol (PI)



ホスファチジルセリン
phosphatidylserine (PS)

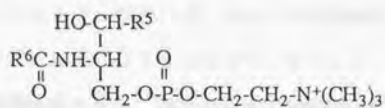


ホスファチジルグリセロール
phosphatidylglycerol (PG)



カルジオリピン
cardiolipin (CL)

B. スフィンゴリン脂質



スフィンゴミエリン
sphingomyelin (SM)

図1 哺乳動物細胞の主要リン脂質

R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ = fatty acid side chain

の膜に局在している (Schroit and Zwaal 1991)。また、動物の組織の中では、脳のPS含量が比較的高い (Ansell *et al.* 1973)。

PSは、その極性頭部の負電荷が膜表面の静電的環境に影響を与えると共に、脂肪酸残基に認められる高い高度不飽和脂肪酸含量が、膜の疎水的环境にも影響を及ぼす。PSは蛋白質に静電的相互作用あるいは疎水相互作用により結合し、膜への結合を促進させるものと考えられ、PSの物性が機能的に重要であると考えられている。例えば、PSはジアシルグリセロールとともに、protein kinase Cの活性化因子として知られており、protein kinase Cが細胞質から膜へと移行して活性化される現象に、膜のPSが重要な役割を果たしていると考えられている (Bell and Burns 1991)。同様に、細胞刺激に応じて細胞質から膜へと移行する蛋白質の中に、PSとの親和性を有するものが知られており、protein kinase Cの基質の一つであるmyristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) (Taniguchi and Manenti 1993)、非受容体型チロシンカイネースのv-src oncoprotein (Sigal *et al.* 1994)、プロトオンコジーンプロダクトであるセリン・スレオニンカイネースのRaf-1 kinase (Ghosh *et al.* 1994)などが挙げられる。一方、PSの形質膜における分布も機能的に重要であると考えられている。例えば、血小板はスロンビンなどで活性化されるとPSを細胞表面に露出し、そのPSが凝固第VIIIa因子を介して第IXa因子と、また凝固第Va因子を介して第Xa因子と結合し、血液凝固カスケードの進行が促進される (Mann *et al.* 1988)。また、細胞がアポトーシスを起こすと、形質膜の内側に局在するPSが細胞表面に移行し、マクロファージに貪食される際の認識分子となることが示唆されている (Savill *et al.* 1993; Platt *et al.* 1998)。このようなPSの機能は、主に試験管内での実験系で明らかにされたものであり、細胞内で、あるいは動物体内でどの程度各現象にPSが寄与しているかについては、実のところ分かっていない。

当然の事ながら、脂質の量的な調節は遺伝子により直接支配されているのではなく、その合成や分解を行う蛋白質、すなわち酵素が担っている。従って、脂質の機能を明らかにする上で、脂質代謝の分子的基盤を明らかにし、個々の酵素の役割を詳細に解明することが必要である。動物細胞におけるPSの代謝については、1950年代の終わりから主に生化学的手法により解析されてきたが、1980年代からは遺伝生化学的手法も加味され、PS代

謝の概要が捉えられつつある。しかし、現状ではなお、不明な点が多く残されている。以下、PS代謝研究の背景を簡単にまとめ、目下の重要課題と本研究の目的について順次述べていきたい。

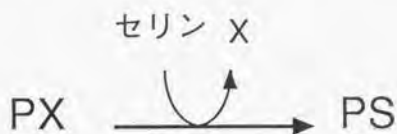
2. PS代謝研究の背景

2.1. 哺乳動物細胞におけるPS合成経路の生化学的解析

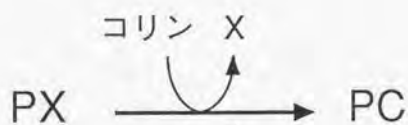
1950年代後半から1960年代初頭にかけて、ラット肝臓の細胞下分画を材料に、放射性L-セリンを用いてPS合成経路の解析が行われた (Hübscher *et al.* 1959; Hübscher 1962)。その結果、L-セリンがCa依存、エネルギー非依存的にPSに取り込まれる反応が見いだされ、この反応が既存のリン脂質の極性基部分とL-セリンとの交換反応(セリン交換反応)であると推定された(図2)。セリン交換反応は、セリンに対するKm値が約0.5 mM、至適pHが8-9の反応であり、その酵素活性は主としてミクロソーム画分に存在していた。また、マウスの細胞を放射性グリセロールや放射性PCとPEでパルスチェイスした実験から、PCとPEがセリン交換反応によるPS合成の前駆体であると推定された (Diringer 1973; Marggraf and Anderer 1974)。バクテリア (Matsumoto 1997) と酵母 (Yamashita and Nikawa 1997) においてPSは、L-セリンとCDP-ジアシルグリセロールから *de novo* 合成されるが、この反応は動物細胞では全く検出されず、逆にセリン交換反応は大腸菌と酵母には認められない反応であった。

一方、コリン (Dils and Hübscher 1959, 1961) とエタノールアミン (Borkenhagen *et al.* 1961) も、セリン交換反応と類似のリン脂質・塩基交換反応でそれぞれPCとPEに取り込まれることが見いだされた(図2)。セリン、コリン、エタノールアミン各交換反応について速度論的解析が加えられた結果 (Porcellati *et al.* 1971; Coracci *et al.* 1973; Gaiti *et al.* 1974)、そのKm値、至適Ca濃度の違い (Gaiti *et al.* 1974) や、至適pH、各交換活性を阻害する薬物、ホスホリパーゼに対する感受性の違い (Kanfer 1972) などから、これら3種のリン脂質塩基交換反応には複数の別個の酵素が触媒するものと推定された。さらにこの可能性を検討するためにリン脂質・塩基交換酵素の精製が試みられ、ラット脳から可溶化剤MiranolH2Mを用いて、PEまたはアゾレクチン存在下にセリン交換反応、エタノールアミン交換反応を触媒し、コリン交換反応を触媒しない酵素が精製された (Suzuki and Kanfer 1985)。精製画分には分子量約100kと推定される単一蛋白質が検出され、酵素活性を担うものと推定された。

A. セリン交換反応



B. コリン交換反応



C. エタノールアミン交換反応



図2 リン脂質・塩基交換反応

哺乳動物細胞に検出される3種のリン脂質・塩基交換反応。図中、PXで示す既存のリン脂質の塩基部分Xと遊離のセリン、コリン、エタノールアミンが交換されてXが遊離し、それぞれPS、PC、PEが産生される。

このように1980年代半ばまでに、セリン交換反応の生化学的な特徴付けが行われたが、セリン交換反応が、実際にPSの生合成に関与するという証拠は得られておらず、この反応の生理的意義は依然として不明のまま残されていた (Kanfer 1980)。

2.2. 哺乳動物細胞におけるPS代謝機構の遺伝生化学的解析

2.2.1. CHO細胞のPS合成損傷変異株の分離と性状解析

大腸菌 (Raetz 1986) や酵母 (Nikoloff and Henry 1991) のリン脂質代謝研究に応用されていた代謝異常変異株を用いた遺伝生化学的手法が、濾紙 (Esko and Raetz 1978) やポリエステル布 (Raetz *et al.* 1982) により動物培養細胞のレプリカを作成する技術 (レプリカ法) 等の発達とともに、1970年代後半からCHO細胞にも応用されるようになり、PCの生合成機構の解明に成果を挙げている (Esko and Raetz 1980; Esko *et al.* 1981)。遺伝生化学的解析は、1) 無細胞系で見いだされたリン脂質代謝経路の生きた細胞での生理的役割について明確な答えを与えうる唯一の方法である、2) 変異株の表現型から、リン脂質の機能についての手がかりが得られる、3) 変異株を利用してリン脂質代謝に関わる酵素の遺伝子を分離し、遺伝子を基にしてその産物である酵素の機能とその調節機構を解析することが可能である、という点で極めて有力な研究手段である。哺乳動物のPS代謝を遺伝生化学的に解析する試みがなされ、CHO細胞からPS合成損傷変異株PSA-3が分離された (Kuge *et al.* 1986a)。この変異株を利用してPS代謝機構に関する重要な発見がなされた。

(1) 2種類のセリン交換酵素 (PS合成酵素) の存在

PSA-3株は、ポリエステル布レプリカ法を利用した細胞増殖にPSを必要とする変異株のスクリーニングによって分離された。PSA-3株はPSの生合成速度が著しく低下しており、PSを添加していない培地で2日培養するとPS含量が1/3に低下することから、同変異株はPS生合成機構に損傷を有することが明らかとなった。PSA-3株のホモジネートのセリン交換活性は、親株CHO-K1の活性の約半分に低下していた。加えて、PSA-3株のエタノールアミン交換活性も親株CHO-K1の活性の約半分に低下、同変異株のコリン交換活性はほぼ完全に欠損していた。このような3種のリン脂質・塩基交換活性の表現型から、以下のよう仮定するとPSA-3株の損傷部位をうまく説明できることがわかった。つまり、CHO細胞にはセリン交換反応を触媒する酵素が少なくとも2種類存在しており、一つの酵素 (PS合成酵素I、以下、PSSI) はエタノールアミン交換反応とコリン交換反応も触媒し、もう一つの酵素 (PS合成酵素II、以下、PSSI) はエタノールアミン交換反応を触媒する

が、コリン交換反応を触媒しない、と仮定すると、PSA-3株の表現型がPSSIの欠損で説明することができた(図3)。実際、この仮説が正しいことは、コリンはCHO-K1細胞のセリン交換活性をはほぼ半分まで阻害するが、PSA-3株のセリン交換活性は全く阻害せず、エタノールアミンは両方の細胞のセリン交換活性を完全に阻害するという事実から示された。従って、PSA-3株がPS合成に損傷を有するという結果は、セリン、エタノールアミン、コリン交換活性を有するPSSIがCHO細胞のPS合成に重要な役割を果たしていることを示唆し、セリン交換反応のPS合成への寄与を示す証拠となった。この結論は、コリン交換活性が高温培養(39.5°C)で著しく低下するCHO-K1細胞温度感受性変異株が、同温度でPS合成に損傷を有することからも(Kuge *et al.* 1985)支持された。

(2) PEの前駆体としてのPSの重要性

哺乳動物細胞のPEの合成経路は、エタノールアミンを前駆体に3段階の酵素反応を経て合成されるCDP-エタノールアミンと、ジアシルグリセロールからPEが合成される経路(CDP-エタノールアミン経路)(Kennedy and Weiss 1956)とPSの脱炭酸反応によりPEが合成される経路(PS脱炭酸経路)(Bremer *et al.* 1960)(図4)がある。どちらの経路がPE合成に寄与しているのかについては細胞によって様々な報告があり、放射性セリンとエタノールアミンのPEへの取り込み速度の違いから、baby hamster kidney細胞やCHO細胞ではPS脱炭酸経路がPEの主要合成経路であると推定されていた(Voelker 1984)。PSA-3株はPS非存在下で2日培養すると、PSのみならず、PEの含量も親株CHO-K1の1/2に低下することから、PEの生合成にも損傷を有することが明らかとなった(Kuge *et al.* 1986a)。細胞における放射性エタノールアミンのPEへの取り込み速度はPSA-3株とCHO-K1株で変わらないことから、PSA-3株のCDP-エタノールアミン経路は正常であると考えられた。一方、同変異株を放射性セリンで代謝標識すると、放射活性のPEへの取り込み速度はPSへの取り込み速度と同様に低下しており、PSA-3株に観察されたPE含量の低下は、PSSI欠損によりPEの前駆体となるPSが減少した結果と考えられた。これらの結果はPS脱炭酸経路がCHO細胞の主要なPE合成経路であるとの報告を支持するものであり、PSSIIはPE合成においても重要であることを示すこととなった。

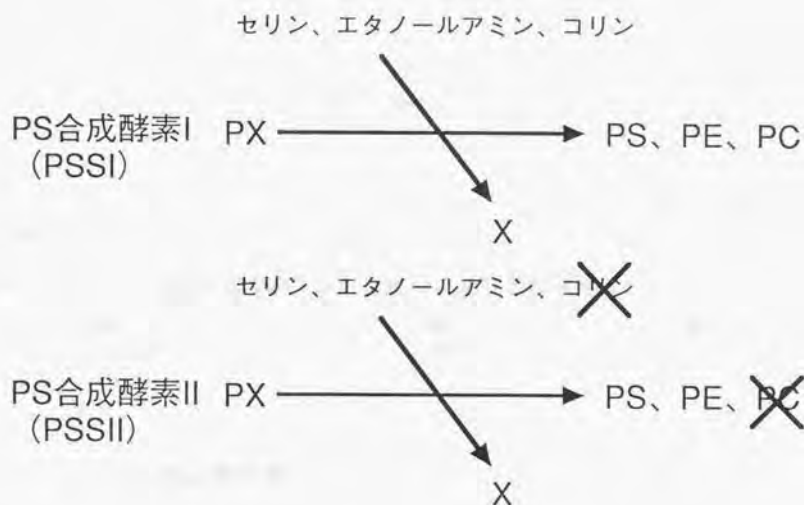
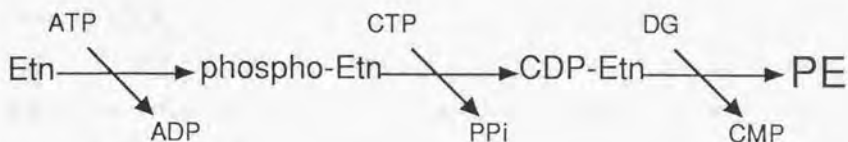


図3 CHO細胞の2種類のPS合成酵素

PSA-3株の性状解析から、CHO細胞に存在すると推定された2種類のPS合成酵素。PSSIは既存のリン脂質(PX)の塩基部分(X)をセリン、エタノールアミン、及びコリンと交換し、それぞれPS、PE、PCを合成する反応を触媒する。PSSIIは既存のリン脂質の塩基部分をセリン、及びエタノールアミンと交換する反応を触媒するが、コリンと交換する反応は触媒しない。

A. CDP-エタノールアミン経路



B. PS脱炭酸経路

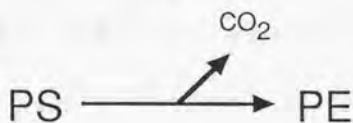


図4 哺乳動物細胞におけるPE合成経路

哺乳動物細胞では、エタノールアミン (Etn) を前駆体として3段階の酵素反応によりPEを合成するCDP-エタノールアミン経路と、PSを脱炭酸してPEを合成するPS脱炭酸経路の2つによりPEが生合成される。Phospho-Etn、ホスホエタノールアミン；CDP-Etn、CDP-エタノールアミン；DG、ジアシルグリセロール。

(3) PSの前駆体となるリン脂質

PSA-3株を利用して、セリン交換反応によるPS合成の前駆体となるリン脂質の解析が行われた (Kuge *et al.* 1986b)。PSA-3株とCHO-K1株を $[^3\text{P}]\text{PC}$ で代謝標識したところ、CHO-K1株では細胞内で $[^3\text{P}]\text{PC}$ が $[^3\text{P}]\text{PS}$ へ変換されたが、PSA-3株ではこの反応が欠損していることが明らかとなった。一方、両株を $[^3\text{P}]\text{PE}$ で代謝標識すると、CHO-K1株と同様にPSA-3株でも、 $[^3\text{P}]\text{PE}$ が $[^3\text{P}]\text{PS}$ へと変換される反応が認められた。これらの結果から、PSA-3株に欠損するPSSIはPCをPSに変換する酵素であり、同変異株に存在すると考えられるPSSIIはPEをPSに変換するがPCをPSに変換できない酵素であると推定された。

PSSIIがPEを基質としてPSを合成するということから、PSA-3株がPSSIIを有しているのにも関わらず、PS合成速度が著しく低下してしまう理由は、PSSIの欠損により、PSSIIの基質となるPEが減少してしまうためであると推察された。実際に、PSA-3株をPEを添加した培地で培養してPEを補うと、PS合成速度、並びにPSとPEの含量が正常に回復して、同時に細胞増殖能も回復したことから (Kuge *et al.* 1986b)、この仮説が支持された。PSA-3株はCDP-エタノールアミン経路によるPE合成能を有しているが、おそらくこの経路はPS産生をまかなうのに十分なPE量を産生できないか、あるいはこの経路によりできるPEがPS合成の基質として利用されにくい仕組みが存在するのではないかと考えられた。

以上の結果から、CHO細胞ではまずPSSIがPCを前駆体としてPSを合成し、次にそのPSが脱炭酸されてPEが合成され、さらにそのPEを前駆体としてPSSIIがPSを合成するものと推定された。

2.2.2. PS合成損傷変異株を利用したPS代謝関連遺伝子の分離

前述したように、リン脂質代謝変異株はその代謝に関わる酵素の遺伝子の分離のための有力なツールとなりうる。遺伝子が分離されると、塩基配列、又はそれから予想されるアミノ酸配列そのものや、遺伝子工学的手法による遺伝子への変異導入解析から、酵素の構造と機能に関する情報が得られる可能性がある。また、酵素が未精製であっても抗体を調製したり、リコンビナントの酵素を作成することも可能である。従って、PS代謝機構とその調節機構を解析するための手段が飛躍的に増加するものと期待される。このような観点から、これまでにPSA-3株を利用して、同変異株のPS要求性を相補する遺伝子が2つ分離された。

(1) *pssC*遺伝子

PSA-3株の細胞増殖のPS要求性を相補するCHO-K1細胞のゲノム断片のスクリーニングから、PSA-3株のPS合成能を正常に回復させる遺伝子が見つかった (Kuge *et al.* 1991a)。ところが、その形質転換株、SSP-1はセリン、エタノールアミン、コリン各交換活性がPSA-3株と同様に低下したままであり、PSSI活性の回復は全く認められなかった。このゲノム断片に相当するcDNA (*pssC*) を分離したところ、大腸菌のPS脱炭酸酵素 (PSD) とアミノ酸レベルで高い相同性を示す蛋白質をコードする読み枠が存在した (Kuge *et al.* 1991a; Kuge *et al.* 1996)。実際、SSP-1株ではPSA-3株に比べ、PSD活性が約2倍に増加しており、また *pssC* cDNA を酵母に導入すると導入株でPSD活性が上昇したことから、*pssC* はPSDをコードすることが明らかとなった。SSP-1株はPEの含量がCHO-K1株の1.5倍程度に増加し、PSの代謝回転速度が上昇していることから、PSDの過剰発現によるPS合成損傷の抑制機構については、次の様に考えられた (Kuge *et al.* 1991a)。PSSIIとPSDによりPSとPEの生合成のサイクルが一回りすると、セリンからエタノールアミンとCO₂が生じることとなるが、エタノールアミンはCDP-エタノールアミン経路によってPEのde novo合成に再利用される (図5)。従って、PSDの過剰発現により、PSがPEに変換される速度が上昇することにより、PSSIIがPEをPSに変換する速度が上昇し、連鎖的にCDP-エタノールアミン経路によるPE生合成量が増加してPE含量が増え、これを基質としてPSSIIによるPS生合成が回復したものと推察された。

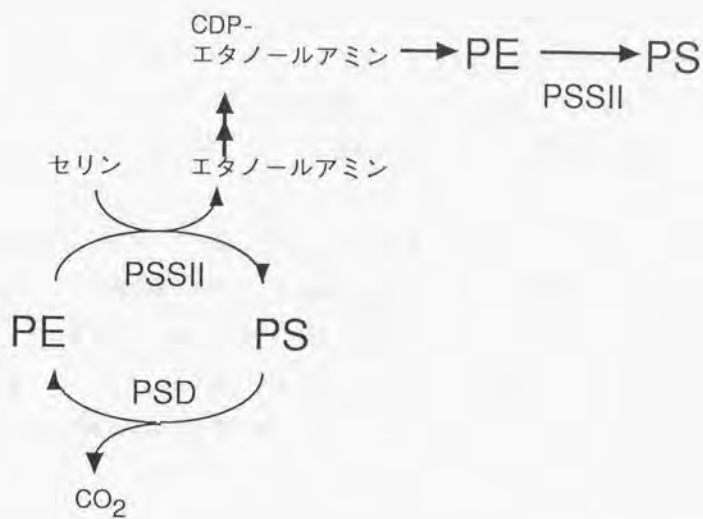


図5 PSとPEの合成サイクルの仮説

PSSIIにより触媒されるPEからのPS合成と、PSDにより触媒するPSからのPE合成のサイクルが一回りすると、セリンからエタノールアミンとCO₂が生じることになる。エタノールアミンはCDP-エタノールアミン経路によってPEのde novo合成に再利用され、PSSIIによるPS合成の基質となる。PSDがPSA-3細胞に過剰発現されると、PSがPEに変換される速度が上昇してPEがPSに変換される速度も上昇し、連鎖的にCDP-エタノールアミン経路によるPE生合成量と、これを基質としたPS合成量が増えるものと推定される。

(2) *pssA*遺伝子

PSA-3株のPS要求性を相補するcDNAのスクリーニングから、PSA-3株のPS合成能を回復させるcDNA、*pssA*が分離された (Kuge *et al.* 1991b)。PSA-3株に*pssA* cDNAを導入した形質転換株、CDT-1のホモジネートのセリン、エタノールアミン、コリン交換活性はそれぞれ、CHO-K1株の活性の約6倍、7倍、15倍に増加しており、PSSI活性が回復していた。*pssAcDNA*断片をプローブにノザンプロット解析を行った結果、CHO-K1細胞では2.8kbのmRNAが検出されたのに対し、PSA-3株ではこのmRNAが全く検出されなかった。*pssA* cDNAには471アミノ酸からなる蛋白質をコードする読み枠が存在し、そのハイドロパシープロットから、この蛋白質は9箇所膜貫通部位を有する膜内在性蛋白質であると予想された。これらの事実から、*pssA*遺伝子はPSSIの活性発現に必須の蛋白質をコードすることが明らかとなったが、*pssA*遺伝子産物がPSSIそのものであるのか、あるいはPSSIの活性発現に必須である制御蛋白質であるのかは、不明な点として残されていた。

3. 本研究の目的

このように、CHO細胞のPS合成損傷変異株の分離によって、PC→PS→PE→PSというPSとPEの生合成の流れが示唆され、それぞれのステップがPSSI、PSD、PSSIIといった酵素により担われることが示唆された(図6)。PS代謝をより明確にするためには、PSSI、PSSIIを分子レベルで同定し、両酵素のPS代謝における役割を明らかにすることが必須である。PSSIIについては、PSSI活性に必須な蛋白質をコードする*pssA*遺伝子がとられており、この遺伝子産物のPS代謝における役割を明確にする必要がある。また、PSSIが細胞内で上記のPC→PSのステップだけを触媒するのか、それともPE→PSも触媒するのかという問題も、未検討のまま残されている。一方、PSSIIは変異株や遺伝子がとられておらず、全く実体が捉えられていない酵素である。PSSIIと称したセリン交換酵素活性が、単一の酵素により触媒されるかはわかっていないし、PEをPSに変換する酵素なのか、またPS合成に寄与している酵素なのかも全くわかっていない。

以上の問題点をふまえ、本研究ではPS代謝をより明確にすることを目的として、以下の解析を行った。第3章においては、*pssA*遺伝子産物のPS合成における機能を明確にするために、同産物に対する抗体を利用して、同産物がPSSIである可能性を検討した。さらに第4章においては、PSSIIのPS合成における寄与を明確にするために、PSSIIの変異株を分離し、その性状解析を行った。

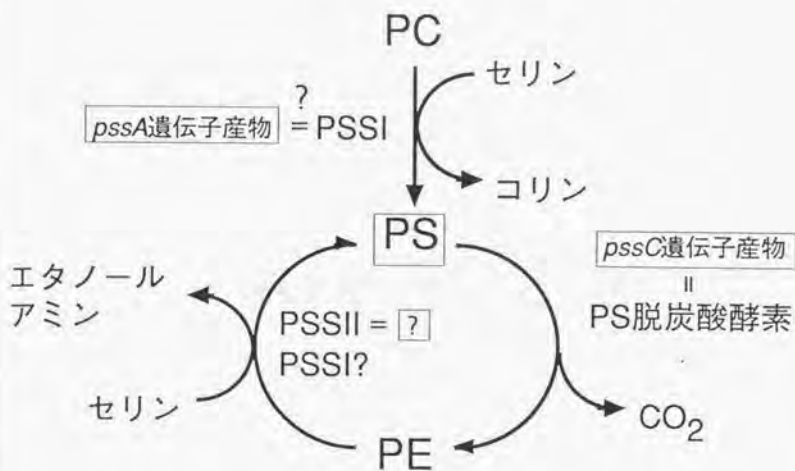


図6 CHO細胞におけるPS代謝経路

CHO細胞ではまず、PSSIによってPCからPSが合成され、次に *pssC* 遺伝子にコードされるPS脱炭酸酵素により、PSからPEが合成され、さらにPSSIIによってPEからPSが合成されるものと推定される。*pssA* 遺伝子はPSSI活性に必須の蛋白質をコードするが、同遺伝子産物がPSSIであるのかは不明である。また、PSSIがPCからのPS合成のみを触媒するのか、それともPEからのPS合成も触媒するのかもわかっていない。一方、PSSIIは実体が全く捉えられていない酵素であり、その遺伝子も不明である。

第2章 材料と方法

1. 本研究で用いた主な細胞一覧

CHO-K1: チャイニーズハムスター卵巣より樹立された21本の染色体をもつ壁付着性の繊維芽状細胞 (Puck *et al.* 1958)。この株の遺伝子座の多くが機能的半接合性の状態にあるとされ、常染色体上にある遺伝子の劣性変異株でも、他の細胞に比べて高い頻度で分離できるといわれている (Siminovich 1976)。

PSA-3: 細胞増殖のPS要求性を指標に、CHO-K1細胞から分離されたPSSI欠損変異株 (Kuge *et al.* 1986a, 1991b)。

CDT-1: PSA-3株に *pssAcDNA* を導入した結果、PSSIの酵素活性が回復し、PS非要求性となった形質転換株 (Kuge *et al.* 1991b)。

PSB-1: セリン交換活性の低下を指標に、PSA-3株から分離されたPSSII (Kuge *et al.* 1997a) 損傷変異株 (本研究第4章)。セリン交換活性がPSA-3株の約半分に低下。

PSB-2: セリン交換活性の低下を指標に、PSB-1株から分離されたPSSII損傷変異株。(本研究第4章)。セリン交換活性がPSA-3株の約10%に低下。

PSB-2/*pssB*: PSB-2株に *pssBcDNA* (Kuge *et al.* 1997a) を導入した結果、PSSII活性が回復した形質転換株 (本研究第4章)。

PSB-2/*pssA*: PSB-2株に *pssAcDNA* を導入した結果、PSSI活性が回復した形質転換株 (本研究第4章)。

2. 細胞培養法

CHO-K1細胞はAmerican Type Culture Collectionから入手し、10% (v/v) newborn calf serum (ICN Biomedicals)、100 units/ml penicillin G、100 μ g/ml streptomycin sulfate、1.176 g/liter NaHCO_3 を添加したHam's F-12 培地 (ICN Biomedicals) を用い、37°C、5% CO_2 、100% humidityの条件で維持した。PSA-3細胞 (Kuge *et al.* 1986a) と本研究で得られたPSB-1細胞、PSB-2細胞とPSB-2/*pssB*細胞は上記の培地に30 μ M PS (from bovine brain; Sigma) を添加した培地 (Nishijima *et al.* 1986) を用い、同様の培養条件で維持した。CDT-1細胞

(Kuge *et al.* 1991b) 並びに本研究で得られたPSB-2/pssA細胞はCHO-K1細胞と同じ培地、培養条件で維持した。細胞膜画分の調製、及び細胞分画のための細胞培養は、10% (v/v) fetal bovine serum (ICN Biomedicals)、2 mM L-glutamine、100 units/ml penicillin G、100 μ g/ml streptomycin sulfate、2.2 mg/ml NaHCO₃を添加したES培地 (Nissui Pharmaceutical) とスピナーフラスコを用いて行った。J774.1細胞はAmerican Type Culture Collectionから入手し、10% (v/v) fetal calf serum (Atlanta Biologicals、非働化したもの)、100 units/ml penicillin G、100 μ g/ml streptomycin sulfate、1.176 g/liter NaHCO₃を添加したHam's F-12 培地を用い、CHO-K1細胞と同様の培養条件で維持した。30 μ M PE (from egg yolk; Sigma) を添加した培地の調製は、Nishijima *et al.* 1986の方法に従った。

3. 細胞のホモジネート及び膜画分の調製と膜の可溶化

細胞をsonication buffer (10 mM HEPES pH 7.5, 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin A) に懸濁し、氷上でUltrasonic disrupter (Heat System Ultrasonics) により、音波破碎した。破碎条件は出力目盛3-4、作動周期20%に設定し、処理時間は3-5分とした。処理後、9割以上の細胞が破碎されていることを光学顕微鏡にて確認した。破碎した細胞液を750 \times g、4 $^{\circ}$ Cで10分間遠心し、上清をホモジネートとして用いた。

ホモジネートを100,000 \times g、4 $^{\circ}$ Cで1時間遠心し、上清を可溶性画分として用いた。沈殿をsonication bufferに懸濁後、Beckman Ti-70 ローターを用いて100,000 \times g、4 $^{\circ}$ Cで1時間遠心し、生じた沈殿をsolubilization buffer (10 mM HEPES pH 7.5, 1 mM dithiothreitol, 20% (v/v) glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin A) に懸濁して、膜画分として用いた。

solubilization bufferを用いて膜画分の蛋白質濃度を4.3 mg/mlに調整後、膜画分7 vol.に対して、50 mg/ml asolectin 2 vol. と10% (w/v) sucrose monolaurate 1 vol.を加えて混合し、氷上で30分間静置して可溶化を行った。なお、この条件で可溶化時の混合液の蛋白質濃度は最終的に3 mg/mlとなる。Beckman TLA100.3ローターを用いて混合液を45,000 rpm (約81,000

× g)、4℃で30分間遠心し、上清を可溶性膜画分として用いた。この条件で、遠心前の混合液中の蛋白質の約80%が、可溶性膜画分に回収された。

4. リン脂質・塩基交換活性測定法

試料のセリン、エタノールアミン、コリン交換活性は、50 mM HEPES (pH 7.5)、5 mM CaCl₂を含むバッファー中、それぞれ、L-[U-¹⁴C]serine (Amersham Pharmacia Biotech), [1,2-¹⁴C]ethanolamine hydrochloride (ICN Biomedicals), [methyl-¹⁴C]choline chloride (American Radiolabeled Chemicals) を基質にして37℃又は39.5℃、20分間で測定した (Kuge *et al.* 1986a)。なお、リン脂質の基質は試料の持ち込みの内在性リン脂質を用いた。

5. pssA部分ペプチドに対する抗体の調製

pssA cDNAの配列から予想されるpssA蛋白質の4残基から18残基に相当する合成ペプチド CysValGlySerArgThrLeuSerLysAspAspValAsnTyrArg (Peptide (4-18)) (Sumitomo Pharmaceuticals Research Center) を、Pierce社のプロトコールに従い、カップリング剤 sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (Pierce) を用いてキャリア蛋白質 SuperCarrier™ (Pierce) にカップリングさせた。また、pssA蛋白質の447残基から463残基に相当する合成ペプチド

AsnAsnGluSerHisSerSerArgAgArgAsnArgHisSerLysSerLys (Peptide (447-463)) (Sumitomo Pharmaceuticals Research Center) を、Sambrook *et al.* 1989 の方法の変法で、*m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide ester (Sigma) を用いて、keyhole limpet hemocyanin (Sigma) にカップリングさせた。peptide (4-18) のコンジュゲート (200-300 μg) を Alum (Pierce) に乳化させ、ウサギに2週間毎に注射した。Peptide (447-463) のコンジュゲート (200-300 μg) は、Freund's adjuvant (Difco Laboratories) に乳化させ、同様

に注射した。各ペプチドに対する抗血清のタイターは、ELISA法 (Harlow *et al.* 1988) にて測定した。各ペプチドに対する抗体は抗血清からアフィニティ精製した (Harlow *et al.* 1988)。peptide (4-18) に対する抗体精製のための担体は、Pierce社のプロトコールに従って同ペプチドをSulfoLink Coupling gel (Pierce) に結合させたものを用い、peptide (447-463) に対する抗体精製のための担体は、Amersham Pharmacia社のプロトコールに従って同ペプチドをCNBr-activated Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) に結合させたものを用いた。精製抗体は、phosphate buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 6.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) で透析してから、実験に用いた。また、protein A Sepharose CL-4B (Amersham Pharmacia) を用いて、各ウサギの免疫前の血清からIgGを精製し (Harlow *et al.* 1988)、PBSで透析後、コントロールの抗体として用いた。

6. イムノプロット解析

蛋白質を含む試料をSDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.7), 1% (w/v) SDS, 2% (w/v) 2-mercaptoethanol, 10% (w/v) glycerol, 0.025% (w/v) bromophenol blue) に溶解し、37°Cで30分間処理後、0.1% SDSを含むpolyacrylamide slab gelで分離した (Laemmli 1970)。そのgelをpolyvinylidene difluoridemembranes (Biorad) に転写した (Towbin *et al.* 1979)。転写したmembraneをpeptide (447-463) に対する抗体と反応させた後、anti-rabbit IgG linked to horseradish peroxidase (Amersham Pharmacia) と反応させ、抗体が結合した蛋白質をAmersham Pharmaciaのプロトコールに従い、同社のenhanced chemiluminescence kitにて検出した。

7. イムノプレシピテーション

細胞を直径100-mmのシャーレにまき、通常の条件で70-80% confluentに達するまで培養した後、培地を4.5 mlのmethionine-free Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco), 580 μ g/ml glutamine, 110 μ g/ml sodium pyruvate, 11% (v/v) dialyzed newborn calf serum (ICN-Flow

社製の newborn calf serum を 100 unit/ml penicillin G と 100 μ g/ml streptomycin sulfate を添加した PBS で透析したもの) に交換した。 [35 S]methionine (ICN Biomedicals) をシャーレあたり 120 μ Ci 添加し、37°C で 8 時間標識した。標識した細胞から、項目 2 の方法に従って、膜画分を調製し、可溶化した。可溶化膜を peptide (4-18) に対する抗体又は、preimmune IgG と混合し、全量で 30-50 μ l になるようにして、氷上で 3 時間インキュベーションした後、PBS に懸濁した 20% (v/v) protein A Sepharose CL-4B を 100 μ l 加え、氷上で 1 時間インキュベーションした。混合液を遠心して上清と沈殿に分け、沈殿を 500 μ l の PBS で 3 回洗浄し、0.1% (w/v) SDS を含む polyacrylamide gel で分離した。沈殿に回収された [35 S]methionine 標識蛋白質は bioimage analyzer (Fujix BAS2000) で検出した。また、放射標識してない細胞から調製した可溶化膜画分を用いて、同様に免疫沈降を行い、得られた沈殿について項目 5 の方法に従って、イムノプロット解析を行った。

8. 細胞分画

CHO-K1 細胞 ($1-2 \times 10^8$ cells) を isolation buffer (250 mM mannitol, 5 mM HEPES (pH 7.4), 0.5 mM EGTA) に懸濁し、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで破碎した後、600 \times g、4°C で 5 分間遠心した。上清を再度遠心し、得られた上清を post-nuclear supernatant (PNS) として用いた。分画は Vance 1990 の方法に従った。まず、PNS を $103,000 \times g_{max}$ 、4°C で 10 分間遠心し、沈殿を粗ミトコンドリア画分として回収した。上清はさらに、Beckman Ti-70 ローターを用いて $100,500 \times g_{av}$ 、4°C で 1 時間遠心し、上清を細胞質画分として回収した。沈殿は isolation buffer に懸濁後、 $100,500 \times g_{av}$ 、4°C で 1 時間遠心し沈殿させ、再度 isolation buffer に懸濁してミクロソーム画分とした。粗ミトコンドリア画分は 225 mM mannitol, 25 mM HEPES (pH 7.4), 1 mM EGTA, 30% (v/v) Percoll に重層し、 $95,000 \times g_{max}$ 、4°C で 30 分間遠心し、ミトコンドリア画分とこれよりも軽い mitochondria-associated membrane (MAM) 画分を回収した。ミトコンドリア画分は isolation buffer に懸濁

し、 $6,300 \times g_{max}$ 、 $4^{\circ}C$ 、10分間の遠心で沈殿させる作業を2回繰り返した後、isolation bufferに再懸濁した。また、MAM画分はisolation bufferに懸濁し、 $6,300 \times g_{max}$ 、 $4^{\circ}C$ 、10分間の遠心で混入しているミトコンドリアを除去した後、 $100,500 \times g_{av}$ 、 $4^{\circ}C$ で1時間で沈殿させ、isolation bufferに再懸濁した。各画分におけるcytochrome c oxidase (Cooperstein and Lazarow 1951) (ミトコンドリアのマーカー)、glucose-6-phosphate phosphatase (Nordlie and Arion 1966) (ミクロソームとMAMのマーカー)、CTP:phosphocholine cytidylyltransferase (Nishijima *et al.* 1984) (ミクロソームと細胞質のマーカー) の酵素活性を測定し、各分画の純度を検定した。

9. セリン交換活性の低下した変異株のスクリーニング

対数増殖期のPSA-3細胞を $300 \mu g/ml$ のethyl methanesulfonate (Sigma) を添加した培地で、 $33^{\circ}C$ で18時間処理した後、培地を通常の培地に交換し、 $33^{\circ}C$ で3日間培養した。変異剤処理したPSA-3細胞を $10 ml$ の培地に接種して、直径 $100 mm$ のシャーレにまき、 $33^{\circ}C$ 培養してシャーレ当たり300コロニー形成させた。7日目にポリエステル布 (Raetz *et al.* 1982) と濾紙 (Whatman No. 50) (Esko and Raetz 1978) とガラスビーズ (Raetz *et al.* 1982) をこの順に重ねて更に細胞を培養した。10日目、15日目と20日目に培地を交換し、20日目にポリエステル布を $7 ml$ の培地が入ったシャーレに移した。マスターシャーレは $33^{\circ}C$ で培養を続けた。ポリエステル布は $33^{\circ}C$ で2日間、 $39.5^{\circ}C$ で1日培養後、PBSの入ったシャーレに移して凍結融解した (Kuge *et al.* 1985)。ポリエステル布を $2 ml$ の反応液 ($50 mM$ HEPES (pH 7.5), $5 mM$ $CaCl_2$, $100 \mu g/ml$ cycloheximide, $40 \mu M$ L-[U- ^{14}C]serine ($20 \mu Ci/\mu mol$) に浸して $39.5^{\circ}C$ で20分間インキュベーションし、レプリカされた各コロニーでセリン交換反応を行った後、ポリエステル布を 10% (w/v) trichloroacetic acidに浸して反応を止めた。ポリエステル布はさらに 5% (w/v) trichloroacetic acidで4回洗浄し、乾燥させてbioimage analyzerで解析し、各コロニーへの $[^{14}C]$ serine の取り込みを検出した。さらに、ポリエステル布上のコロニーをCoomassie Brilliant Blueで染色し (Raetz *et al.* 1982)、

[¹⁴C]serineの取り込み量と染色の強度の対比から、セリン交換活性の低下したクローンを同定した。各クローンはクローニングシリンダーを用いてマスターシャーレから回収し、さらに同様のスクリーニングを2回繰り返した後に、限界希釈法で精製した。なお、セリン交換活性の低下が、細胞の成育に致死的可能性を考え、変異株のスクリーニング方法は、温度感受性変異株を分離できる条件で行ったが、得られた変異株はPS添加培地であれば、高温(39.5℃)でも成育可能であった。故に、第4章に示す変異株の生化学的解析は、全て39.5℃で行った結果を掲載した。

10. ノザンプロット解析

FastTrack™ mRNA isolation kit (Invitrogen) を用いて、 $1-2 \times 10^8$ 細胞からpoly(A)⁺RNAを分離した。2.5 μgのpoly(A)⁺RNAを1% agarose/formaldehyde gelで分離後、Hybond-N membrane (Amersham Pharmacia Biotech) に転写した (Sambrook *et al.* 1989)。プラスミドpSVpssB/neo (Kuge *et al.* 1998) をKpnIとXbaIで消化して (Sambrook *et al.* 1989)、1.8-kilobase pairのpssBcDNA断片を得、pssBプローブとして用いた。プローブはRandom Primed DNA labeling kit (Boehringer Mannheim) を用いて、[α -³²P]dCTP (Amersham Pharmacia Biotech) で標識した。また、 β -actin cDNA fragment (CLONTECH) を同様に放射標識し、コントロールのプローブとして用いた。poly(A)⁺RNAを転写したメンブレンとpssBプローブを50%formamide存在下、42℃で一晩インキュベーションした (Sambrook *et al.* 1989)。メンブレンは最後に65℃で0.1% (w/v) SDSの入った0.1× SSC (1×SSC=0.15 M NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7.0) で洗浄した。pssBプローブがhybridizeしたpoly(A)⁺RNAはbioimage analyzerで検出した。pssBプローブを除去後、同様の方法で、コントロールのプローブを用いて同一メンブレンのreprobingを行った。

11. リン脂質の抽出と分離

細胞からのリン脂質の抽出は、Bligh and Dyer法 (Bligh and Dyer 1959) で行った。1次元thin-layer chromatography (TLC) は $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}=62:25:10$ の展開溶媒で、また、2次元TLCは、1次元目に1次元のTLCと同じ溶媒を用い、2次元目に $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCOOH}=62:25:10$ の展開溶媒で行った (Nishijima *et al.* 1986)。

12. [^{32}P]PEと[^{32}P]PCの調製

J774.1細胞を 2×10^7 cellsを30 mlの培地 (phosphate-free modified Eagle's medium (Life Technologies, Inc.), 10% (v/v) fetal calf serum, 100 units/ml penicillin G, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin sulfate) に接種し、直径150-mmのシャーレにまいた。シャーレ1枚当たり400 μCi の ^{32}P i (日本原子力研究所) を添加し、37°Cで3日間培養した。ラベルした細胞をPBSで洗浄した後回収し、リン脂質を抽出して2次元TLCで分離した。オートラジオグラフィーで、薄層上の[^{32}P]PEと[^{32}P]PCの位置を定めた後、シリカゲルを掻き取り、Bligh and Dyer法で各リン脂質を抽出した。放射標識した各リン脂質は窒素気流下で乾固させ、bath typeのsonicatorを用いて、培地に懸濁させた。

13. 細胞への遺伝子導入

G418 resistant geneと cDNA、又は cDNAを含むプラスミド、pSVとpSV (Kuge *et al.* 1998) をPSB-2変異株にリン酸カルシウム法 (Lewis *et al.* 1980) で導入した。導入した細胞を400 $\mu\text{g/ml}$ のG418 (Geneticin; Life Technologies, Inc) と30 μM PSを含む培地で培養し、G418耐性株を選別した。項目8に記した*in situ* セリン交換活性測定法を利用して、pSVを導入して得られたG418耐性株の中から、PSA-3変異株と同程度のセリン交換活性を有する形質転換株を検索、分離し、限界希釈法で精製した。pSVを導入して得られたG418耐性株は、限界希釈法で精製した。

14. その他の方法

放射性トレーサーによる細胞の代謝標識方法については、第4章で図のlegendに記した。細胞のリン脂質組成を調べるためのリン定量はRouser *et al.* 1966の方法に従った。蛋白質の定量は、bovine serum albuminをスタンダードとし、Lowry *et al.* 1951の方法に従った。

第3章

*pssA*遺伝子産物はPS合成酵素Iである

：免疫化学的解析

1. 目的

*pssA*遺伝子はPSA-3株の増殖のPS要求性、並びにPS合成の損傷とPSSI活性の欠損を相補する遺伝子である。第3章では、*pssA*遺伝子産物のPS代謝における位置づけを行うことを目的に、*pssA*部分ペプチドに対する抗体を利用して、同遺伝子産物がPSSIである可能性を検討した。

2. 結果

2.1. *pssA*遺伝子産物の同定

*pssA*遺伝子の塩基配列から予想される同遺伝子産物の4-18残基 (peptide (4-18)) と 447-463残基 (peptide (447-463)) に相当する部分ペプチドに対する抗体をそれぞれ作成し、CHO細胞の*pssA*遺伝子産物の同定を試みた。CHO-K1株、*pssA* mRNAの発現が認められないPSA-3株、及びPSA-3株に*pssAcDNA*を導入した形質転換株 (CDT-1株) から膜画分と可溶性画分を調製し、イムノプロット解析を行った。抗peptide (447-463) 抗体は、CHO-K1株膜画分のSDS電気泳動上の分子量が42kである蛋白質に結合した (図7A)。42k蛋白質はPSA-3株膜画分には全く検出されなかったが、CDT-1株膜画分では、CHO-K1株の数十倍量発現していた。これら3種の細胞の可溶性画分には、この抗体と交差性を示す蛋白質は認められなかった (図7B)。また、42k蛋白質はコントロールのpreimmune IgGでは検出されなかった (data not shown)。一方、抗peptide (4-18) 抗体は、同様のイムノプロット解析で、結合する蛋白質が検出されなかった (data not shown)。しかし、³⁵S]メチオニンで標識したCDT-1株から膜画分を調製して可溶化し、抗peptide (4-18) 抗体で免疫沈降を行ったところ、SDS電気泳動上、42kに算定される放射標識された蛋白質が抗体とともに沈降した (図8Aレーン2)。抗peptide (4-18) 抗体の代わりにpreimmune IgGを用いた免疫沈降では、42k蛋白質は検出されなかった (図8Aレーン1)。さらに、抗peptide (4-18) 抗体の免疫沈降物について、抗peptide (447-463) 抗体を用いてイムノプロット解析を行ったところ、抗peptide (4-18) 抗体によって沈降した42k蛋白質が抗peptide (447-463) 抗体によって認識された (図8B)。以上の結果から、42k膜蛋白質が、*pssA*遺伝子産物であると結論した。

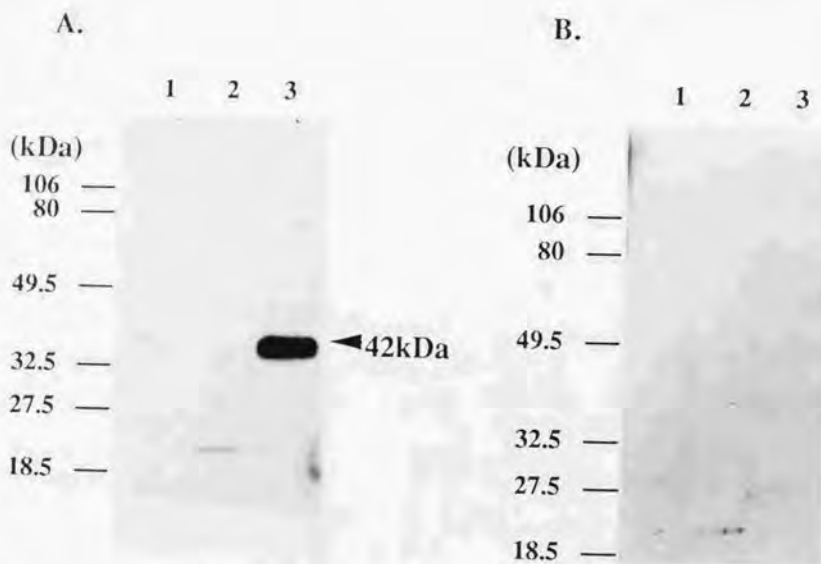


図7 抗peptide (447-476) 抗体によるイムノプロット解析

CHO-K1細胞 (レーン1)、PSA-3細胞 (レーン2)、CDT-1細胞 (レーン3) の膜画分 (パネルA) 及び可溶性画分 (パネルB) 各50 μ gをSDS電気泳動し、抗peptide (447-476) 抗体を用いてイムノプロット解析を行った。矢印は、抗体によって検出された見かけの分子量42kの蛋白質。分子量マーカーの位置は各パネルの左に表示した。

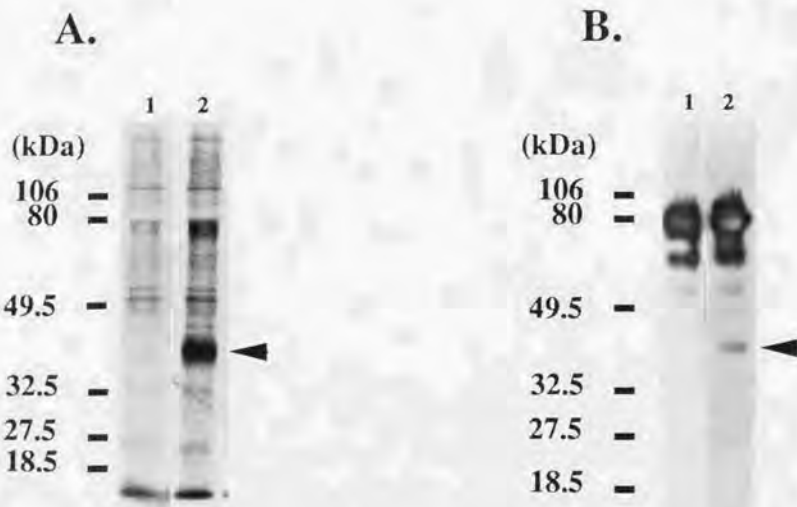


図8 抗peptide (4-18) 抗体によるイムノプレシピテーション

(A) 内径100mmのシャーレ1枚にまいたCDT-1細胞を $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで放射標識した後、膜画分を調製し、 $250\mu\text{l}$ のsolubilization bufferで可溶化した。可溶化膜画分 $45\mu\text{l}$ に対して $18\mu\text{g}$ の抗peptide (4-18) 抗体 (レーン2)、又はpreimmune IgG (レーン1) を用いてイムノプレシピテーションを行い、沈降物の半量をSDS電気泳動で分離した。矢印は、抗体とともに沈降した見かけの分子量42kの蛋白質。分子量マーカーの位置はパネルの左に表示した。

(B) 放射標識していないCDT-1細胞から膜画分を調製し、可溶化後、可溶化膜画分 $15\mu\text{l}$ に対して $15\mu\text{g}$ の抗peptide (4-18) 抗体 (レーン2)、又はpreimmune IgG (レーン1) を用いてイムノプレシピテーションを行った。沈降物の半量をSDS電気泳動で分離し、抗peptide (447-476) 抗体を用いてイムノプロット解析を行った。矢印は、抗体によって検出された見かけの分子量42kの蛋白質。分子量マーカーの位置はパネルの左に表示した。

2.2. *pssA*遺伝子産物がPSSIであることの証明

2.2.1. 膜画分のPSSI活性

CHO細胞の膜画分と可溶性画分のPSSI活性を調べた。PSSIはセリンの他にコリンをリン脂質塩基交換反応の基質とするが、PSSIIはコリンを基質としないことが示唆されている (Kuge *et al.* 1986a) ので、PSSIの活性をコリンを基質として測定した。CDT-1株とCHO-K1株のコリン交換活性は膜画分のみ検出され、両細胞の可溶性画分に活性は認められなかった (data not shown)。CDT-1株膜画分のコリン交換活性 (77.0 nmol/hr/mg protein) は、CHO-K1株膜画分の同活性 (3.89 mol/hr/mg protein) の約20倍に増加していた。また、コリン交換活性はPSA-3株の膜画分と可溶性画分には、全く検出されなかった (data not shown)。従って、CDT-1細胞の膜画分では、*pssA* cDNAの導入による*pssA*遺伝子産物量の増加に伴うPSSI酵素活性の増加が認められた。

2.2.2. PSSI活性に対する抗peptide (4-18) 抗体の効果

CDT-1株膜画分を可溶化した後、抗peptide (4-18) 抗体を添加し、コリン交換活性を測定したところ、同活性は抗体の用量依存に阻害された (図9)。一方、preimmune IgGでは、全く阻害が認められなかった。次に、CDT-1株の可溶化膜を抗peptide (4-18) 抗体で免疫沈降し、上清のコリン交換活性を測定したところ、同活性が抗体の用量依存に最大約50%まで減少した (図10A)。preimmune IgGで同様に免疫沈降を行っても、コリン交換活性の減少は全く認められなかった。抗peptide (4-18) 抗体による免疫沈降後の上清について、抗peptide (447-463) 抗体を用いてイムノプロット解析を行い、*pssA*遺伝子産物を定量した結果、上清の*pssA*遺伝子産物は抗体の用量依存に最大約50%まで減少しており、同産物量とその上清に検出されるコリン交換活性にはよい相関が認められた (図10B)。およそ半分量の*pssA*遺伝子産物が、抗peptide (4-18) 抗体によって沈降しなかった理由については不明であるが、可溶化時の同産物のミセル上での配向によって、抗原部位がミセル表面に露出する場合とそうでない場合があるためではないかと考えられた。

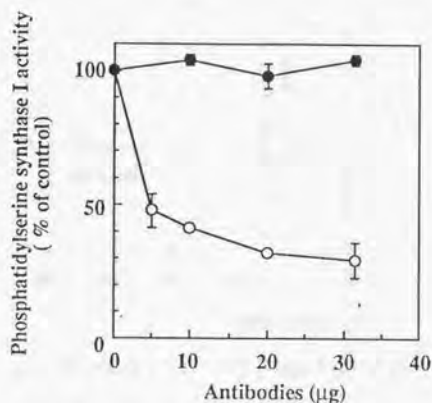


図9 抗peptide (4-18) 抗体のPS合成酵素I活性に対する効果

CDT-1細胞から膜画分を調製し、可溶化後、可溶化膜画分 $7.5 \mu\text{l}$ に対して、最終的に $15 \mu\text{l}$ となるように、様々な量の抗peptide (4-18) 抗体 (○)、又はpreimmune IgG (●) を加え、氷上にて3時間インキュベーションした。反応液のコリン交換活性を、 5mg/ml のアゾレクチン存在下で測定し、PS合成酵素Iの活性を検出した。活性は、抗体を加えずにインキュベーションした反応液の活性を100%として相対活性で表示した。

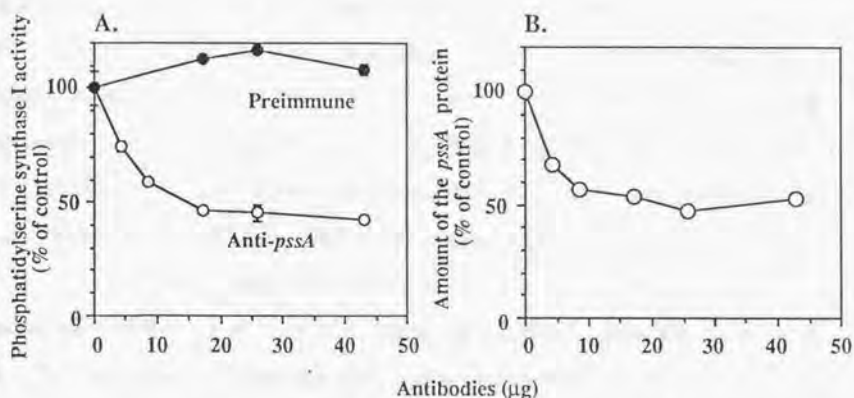


図10 抗peptide (4-18) 抗体によるPS合成酵素I活性 (A) 及び*pssA*遺伝子産物 (B) のイムノデプリーション

CDT-1細胞から膜画分を調製し、可溶化後、可溶化膜画分に対し、様々な量の抗peptide (4-18) 抗体 (○)、又はpreimmune IgG (●) を用いてイムノプレシピテーションを行った (第2章、材料と方法の項を参照)。得られた免疫沈降物の上清40 μ lのコリン交換活性を5mg/mlのアズレクチン存在下測定し、PS合成酵素Iの活性を検出した (A)。各サンプルの活性は、抗体を加えずに同様の操作をした上清の活性を100%として相対活性で表示した。さらに、免疫沈降物の上清15 μ lについて、抗peptide (447-476) 抗体を用いてイムノブロット解析を行い、検出された*pssA*遺伝子産物のバンドの濃さをNIH image (ver.1.57) を用いて定量し、同産物量を求めた (B)。各サンプルの*pssA*遺伝子産物量は、抗体を加えずに同様の操作をした上清の同産物の量を100%として相対量で表示した。

2.2.3. PSS1活性と *pssA* 遺伝子産物の細胞内所在

Vanceはラット肝臓の細胞分画を行い、ミトコンドリアとともに10,000×gで沈降するミクロソーム様の膜画分 (mitochondria-associated membrane, MAM) を分離し、この画分にPS合成酵素活性 (セリン交換活性) が濃縮されることを報告している (Vance 1990)。CHO-K1細胞をVanceの方法に準じて分画し、ミトコンドリア、MAM、ミクロソーム、細胞質画分に分けた (図11)。まず、MAMに相当する画分を分離できたかどうか調べるため、cytochrome c oxidase、glucose-6-phosphate phosphatase、及びCTP:phosphocholine cytidylyltransferaseの活性を各画分で測定した (表1)。ミトコンドリアのマーカー酵素、cytochrome c oxidaseの活性は、ミトコンドリア画分で約5倍の比活性の上昇が認められ、MAMをはじめとしてその他の画分では上昇が認められず、Vanceの結果と一致した。小胞体のマーカー酵素として知られているglucose-6-phosphate phosphataseの活性は、ミクロソームとMAMで比活性の上昇が認められた。Vanceはglucose-6-phosphate phosphataseの活性はミクロソームよりもMAMで高く、膜画分と細胞質画分の両方に存在するCTP:phosphocholine cytidylyltransferaseの活性 (Vance 1996) は、MAMよりもミクロソームで高いという特徴を報告しているが、CHO-K1細胞の分画でも同様の結果が得られた。従って、ラット肝臓で報告されたMAMに相当する画分がCHO-K1細胞から得られたと判断した。

PSS1活性の細胞内分布を調べるために、各画分のコリン交換活性を測定した (表1)。出発材料のpost-nuclear supernatant (PNS) のコリン交換活性に比べて、比活性の上昇はMAMが6.6倍で最も高く、次にミクロソームで2.5倍であった。その他の画分で活性の上昇は認められなかった。PNSの全コリン交換活性の24%がMAMに、50%がミクロソーム画分に回収された。次に、*pssA* 遺伝子産物の分布を調べるために、各画分を抗peptide (447-463) 抗体でイムノプロット解析を行った結果、同産物はMAMとミクロソームにのみ検出された (図12)。比含量の上昇はMAMが最も高く、PNSの5.8倍、次にミクロソームでPNSの2.1倍であり、*pssA* 遺伝子産物はPNSの全含量の21%がMAMに、42%がミクロソーム画分に回収された。これらの結果から、PSS1活性と *pssA* 遺伝子産物の細胞内分布は非常によく一致していることが明らかとなった。

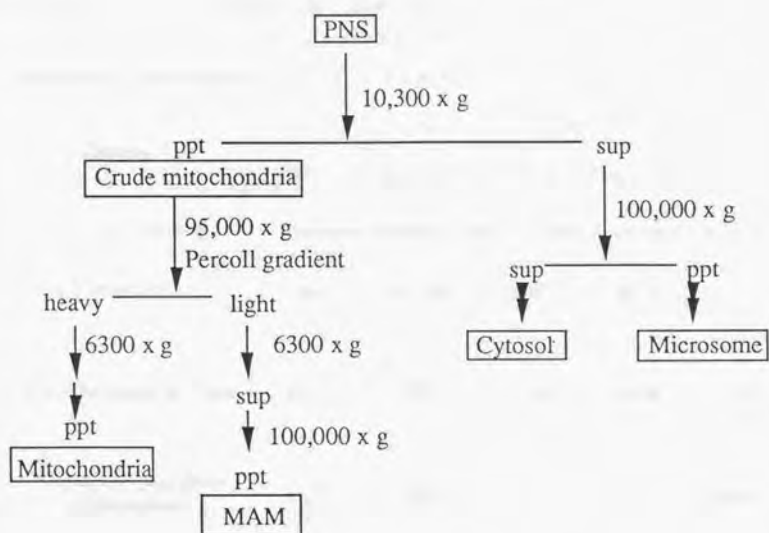


図11 CHO-K1細胞の分画法

PNS, post nuclear supernatant; MAM, mitochondria-associated membranes.

表1 CHO-K1細胞におけるPSSI及びマーカ酵素の細胞内分布

CHO-K1細胞をPNS、ミトコンドリア、MAM、ミクロソーム、細胞質に分画し（第2章、材料と方法の項参照）、各画分（50 μ g蛋白質）について5mg/mlアゾレクチン存在下、PSSI活性をコリン交換活性で測定した。また、各画分はcytochrome c oxidase（ミトコンドリアのマーカ）、glucose-6-phosphate phosphatase（ミクロソームとMAMのマーカ）CTP:phosphocholine cytidylyltransferase（ミクロソームと細胞質のマーカ）の活性も測定した。活性はduplicateで測定し、平均値を示した（誤差は10%未満）。比活性の単位は以下の通り：PSSI、nmol/hr/mg protein；cytochrome c oxidase、nmol of cytochrome c oxidized/min/mg protein；glucose-6-phosphate phosphatase、nmol of Pi formed/min/mg protein；CTP:phosphocholine cytidylyltransferase、nmol of CDP-choline formed/hr/mg protein.

Enzyme	Specific activity in				
	PNS	Mitochondria	MAM	Microsome	Cytosol
PS synthase I	1.43	0.626	9.40	3.53	0
Cytochrome c oxidase	155	791	109	49.0	2.29
Glucose-6-phosphate phosphatase	14.5	12.1	33.5	26.5	6.42
CTP: phosphocholine cytidylyltransferase	122	3.28	7.32	39.4	123



図12 *pssA*遺伝子産物のCHO-K1細胞における分布

CHO-K1細胞を分画し（第2章、材料と方法の項を参照）、各画分の蛋白質 $30\mu\text{g}$ をSDS電気泳動で分離後、抗peptide (447-476)抗体を用いてイムノプロット解析を行った。PNS, post nuclear supernatant; Mic, ミクロソーム画分; Mt, ミトコンドリア画分; MAM, mitochondria-associated membranes 画分。

3. 考察

予想される *pssA* 遺伝子産物の異なる2種の部分ペプチドに対する抗体はいずれも、見かけの分子量が42kの膜蛋白質に結合した。さらに、この42k膜蛋白質は、*pssA* mRNAの発現が認められない PSA-3株では検出されず、PSA-3株に *pssAc* DNAを導入した形質転換株 CDT-1では過剰発現していた。以上の結果から、42kの膜蛋白質が *pssA* 遺伝子産物であると結論した。*pssA* 遺伝子産物の見かけの分子量、42kは、予想されるアミノ酸配列から計算される分子量、55.3kD (Kuge *et al.* 1991b) よりも小さい。一つの可能性は、42kが *pssA* 遺伝子にコードされる55.3kDの前駆体蛋白質から、プロテアーゼなどによる分解をうけて生じるというものである。しかし、42k蛋白質を認識する2種の抗体の抗原ペプチドは、*pssA* 遺伝子産物の全アミノ酸配列471残基の中でも、N末近傍(4-18残基)とC末近傍(447-463残基)に位置することから、N末あるいはC末側が大きく欠けているとは考えにくく、この可能性は低いものと思われた。*pssA* 遺伝子産物はそのハイドロパシープロットから、9カ所の膜貫通領域を有する疎水性の高い蛋白質であると予想されるので (Kuge *et al.* 1991b)、蛋白質当たりの SDS 吸着量が通常の蛋白質より多く、SDS電気泳動での挙動が一般的な挙動と異なるため、見かけの分子量と計算分子量の差が生じたのではないかと考えられた。実際にこのような例が *Escherichia coli* の lactose permease (Büchel *et al.* 1980) や、*Rhodospirillum rubrum* chromatophore 由来の膜蛋白質 (Miyake *et al.* 1978) の例で知られている。

本研究では以下に述べる結果から、*pssA* 遺伝子産物は PSSI であると結論した。(1) PSA-3株に *pssAc* DNAを導入した結果、*pssA* 遺伝子産物の増加に伴って、PSSI活性の増加が認められた。(2) PSSI活性と *pssA* 遺伝子産物はいずれも、膜画分のみ回収された。(3) CHO-K1、PSA-3、CDT-1株の膜画分の PSSI比活性は、各膜画分の *pssA* 遺伝子産物の比含量に相関していた。(4) PSSI活性は、抗peptide (4-18) 抗体により阻害された。(5) 同抗体で免疫沈降を行うことにより、可溶化膜から *pssA* 遺伝子産物を沈殿させると、その量に相関して上清の PSSI活性が減少した。(6) CDT-1株可溶化膜から同抗体特異的に免疫沈降された主要蛋白質は、*pssA* 遺伝子産物のみであった。(7) PSSI活性と

*pssA*遺伝子産物の細胞内分布はよく一致した。PSSIははまだ精製はされておらず、この酵素が単一のペプチドから構成されているのか、複数のペプチドから構成されているのかは、不明のままである。しかし、上記の(6)の結果から、*pssA*遺伝子産物の他に、同産物とジスルフィド結合のような共有結合や、界面活性剤で処理しても壊れない比較的強固な結合で結合している他のサブユニットが存在する可能性は低いものと考えられた。

CDT-1細胞では*pssA*遺伝子産物の増加と共にPSSI活性の上昇が認められるが、CDT-1細胞とCHO-K1細胞の間でPS合成速度とPS含量に差は認められない(Kuge *et al.* 1991b)。このことから、PSSIの発現レベルの調節以外に、PSSIの活性を制御する機構の存在が考えられた。このような機構としては、例えば、基質濃度や酵素活性に必須であるCa濃度による調節や、酵素とは別個の蛋白質による制御が考えられる。site-directed mutagenesisにより*pssA*遺伝子に変異を導入し、mutant 酵素を作成することによって、PSSIの活性制御の機構の手がかりが得られるかもしれない。

第4章

CHO細胞のPS合成酵素II損傷変異株の

分離と性状解析

1. 目的

PSSI欠損株PSA-3の性状解析から、セリン交換酵素PSSIIが、PEからのPS合成を触媒するものと推定された。しかし、PSSIIと称した酵素活性が単一の酵素の活性であるかどうかは不明であるし、実際にPS合成に寄与していることを示す直接的な証拠は得られていない。そこで、PSSIIのPS代謝における役割を明確にすることを目的に、PSSIIの損傷変異株の分離を行った。

2. 結果

2.1. PSSII損傷変異株PSB-2の分離

CHO-K1細胞のPSSI欠損株PSA-3は、ホモジネートのセリン交換活性がCHO-K1株の約半分に低下している (Kuge *et al.* 1986a)。セリン交換活性がさらに低下した変異株を分離するために、PSA-3株を変異剤で処理し、*in situ*セリン交換活性測定法により、同活性が低下した変異株を検索した。約50,000コロニーを検索した結果、セリン交換活性が、親株PSA-3の約50%に低下したPSB-1株を分離した (表2)。PSB-1株ではエタノールアミン交換活性も、PSA-3株の約50%に低下していた。PSB-1株は、PSA-3株と同様にリン脂質無添加の培地では増殖しなかったが、PS、又はPEを添加した培地では増殖した (図13)。また、PSB-1株とPSA-3株を $[^{14}\text{C}]$ セリンで標識し、 $[^{14}\text{C}]$ セリンのPSへの取り込みを調べたところ、PSB-1株とPSA-3株で取り込み速度に大きな差は認められなかった (図14)。従って、セリン、エタノールアミン交換活性の低下に関わらず、PSB-1株は、細胞増殖とPS合成について、親株PSA-3とはほぼ同様の表現型を示した。

PSB-1株よりもさらにセリン交換活性が低下した変異株を分離するために、PSB-1株を変異剤処理し、同様に*in situ*セリン交換活性測定法で、約10,000コロニーを検索した。その結果、セリン交換活性がPSA-3株の約10%、CHO-K1株の約5%に低下した変異株、PSB-2を分離した。(表2)。PSB-2株ではエタノールアミン交換活性もPSA-3株の14%に低下していた。なお、PSB-1、PSB-2株はいずれもPSA-3株と同じく、コリン交換活性を欠損しており、PSSIを欠損する細胞であることが確認された。

最近、PSSIとアミノ酸レベルで高い相同性を示す蛋白質をコードする遺伝子 (*pssB*) のcDNAがCHO-K1細胞から分離された。この遺伝子産物がPSSIとは異なるセリン交換酵素であることが明らかにされ、PS合成酵素II (PSSII) と名付けられた (Kuge *et al.* 1997a、1997b) (表3)。PSSIIは、試験管内ではセリン交換反応の他にエタノールアミン交換反応を触媒するが、コリン交換反応は触媒しないことも明らかとなった。PSB-2株がPSSIIの変異株である可能性を調べるために、CHO-K1細胞、PSA-3株、PSB-1株とともに、PSB-2株におけるPSSIIのmRNAレベルを、*pssB*cDNA断片をプローブにノザンプロット解析で調

表2 CHO-K1株、PSA-3株、PSB-1株、PSB-2株のホモジネートのセリン、エタノールアミン、コリン交換活性

5-10×10⁵ cellsの細胞を内径150mmのシャーレにまき、30 μM PSを添加した培地で33℃にて5日間培養後、39.5℃でさらに1日間培養した。細胞からホモジネートを調製し、ホモジネート100 μg蛋白質のセリン、エタノールアミン、コリン交換活性を39.5℃で測定した（第2章、材料と方法の項参照）。活性はduplicateで測定し、その平均値を示した（誤差10%未満）。

Strain	Substrate		
	Serine	Ethanolamine	Choline
	<i>nmol/hr/mg protein</i>		
CHO-K1	4.2	5.2	1.6
PSA-3	2.0	4.2	<0.05
PSB-1	1.0	2.0	<0.05
PSB-2	0.2	0.6	<0.05

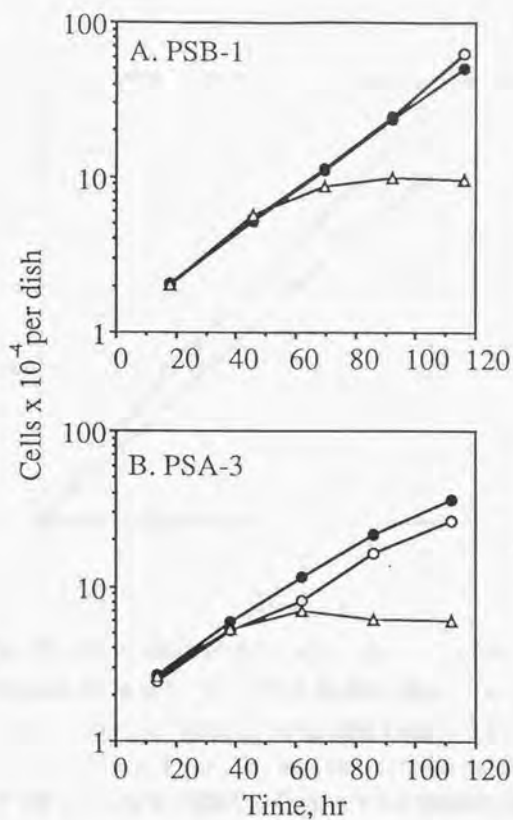


図13 PSB-1株 (A) と PSA-3株 (B) の増殖

2.5×10^4 cellsの細胞を内径60mmのシャーレにまき、リン脂質を加えていない培地 (Δ)、及び30 μM PS (○)、又は30 μM PE (●) を添加した培地で39.5℃にて培養した。表記の各時間において、細胞を0.25%トリプシンではがし、Coulter カウンター (モデルZB1) を用いて細胞数を計測した。

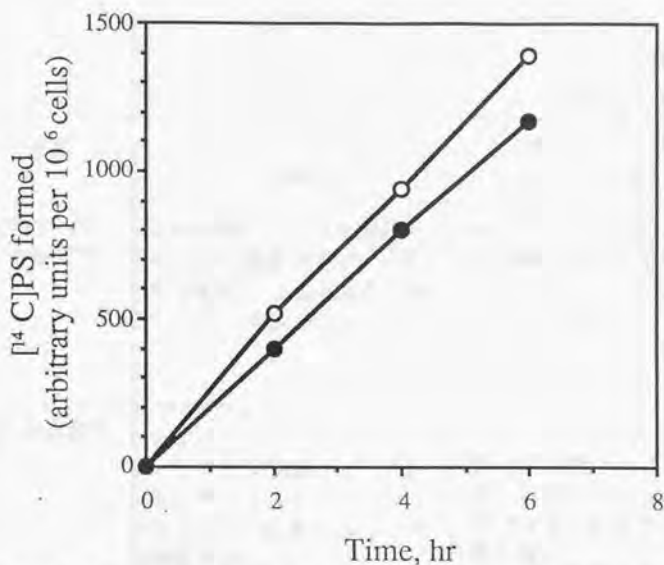


図14 PSB-1株、及びPSA-3株におけるL-[U-¹⁴C]セリンのPSへの取り込み

PSA-3株のPS合成速度が、正常レベルに回復するPE添加培地で (Kuge *et al.* 1986b)、PSA-3株とPSB-1株における L-[U-¹⁴C]セリンのPSへの取り込みを比較した。1×10⁵ cellsの細胞を内径60mmのシャーレにまき、30 μM PSを添加した培地で33℃にて4日間培養後、培地を30 μM PEを添加した培地に交換し、39.5℃でさらに24時間培養した。培地を0.2 μCi/ml L-[U-¹⁴C]セリン (2 μCi/μmol) を含むPE添加培地に交換し (0時間)、39.5℃で2-6時間培養した。細胞からリン脂質を抽出し、1次元TLCで分離後 (第2章、材料と方法の項参照)、PSに取り込まれた放射活性をbioimage analyzer (FUJIX BAS2000) を用いて定量した。PSの放射活性はL-[U-¹⁴C]セリン添加直前の細胞数で標準化した。なお、一点につきduplicateでアッセイし、その平均値を示した。PSB-1、○; PSA-3、●。

表3 CHO細胞のPS合成酵素

	PSSI (<i>pssA</i> 遺伝子産物)	PSSII (<i>pssB</i> 遺伝子産物)
構造	471アミノ酸 (55.3kDa)	474アミノ酸 (55.0kDa)
cDNAの 分離方法	CHO細胞のPSSI欠損株 PSA-3の細胞増殖のPS要求 性を相補するCHOcDNAの スクリーニング。	PSSIとアミノ酸レベルで高 い相同性を示す蛋白質をコードするヒトの expressed sequence tagクローンの CHOホモログのスクリー ニング。
基質特異性	セリン、エタノールアミン、 コリン交換反応を触媒する。 PCをPSに変換する反応を 触媒する。	セリン、エタノールアミン交 換反応を触媒するが、コリン 交換反応は触媒しない。 PCをPSに変換する反応を触 媒しない。
生理的役割	PSとPEの生合成に重要。	遺伝子の分離をきっかけとして 見つかった酵素であり、生 理的役割は不明。
文献	Kuge <i>et al.</i> 1986a,1991b; 本研究第3章	Kuge <i>et al.</i> 1997a

べた。その結果、PSB-1株ではPSA-3株の約半分に、PSB-2株ではPSA-3株の約20%にPSSIIのmRNA発現量が低下していた(図15A)。なお、PSA-3株と野生株CHO-K1の間では、大きな発現量の差は認められなかった。一方、コントロールの β アクチンのmRNAについては、4種類の細胞間で発現量に大きな差は認められなかった(図15B)。従って、PSB-2株はPSSIIに損傷を有することが明らかとなった。

2.2. PSB-2株の増殖

PSB-2株をリン脂質無添加及びPS又はPE添加培地で培養し、細胞増殖を調べた。親株のPSA-3株は、以前報告されているとおり(Kuge *et al.* 1986a, 1986b)、リン脂質を添加していない通常の培地では増殖せず、培地にPS又はPEを添加すると増殖した(図16B)。PSB-2株は親株PSA-3と同様に、リン脂質無添加の培地では増殖せず、PSを添加した培地では増殖した(図16A)。しかし、PSB-2株はPSA-3株と異なり、PEを添加した培地で増殖しなかった。なお、CHO-K1株はPS、PEの添加に関わらず、いずれの培地でも正常に増殖をした(図16C)。以上の結果から、PSB-2株はPSA-3株に認められた外因性PEに依存した増殖が認められないことが明らかとなった。

2.3. PSB-2株のリン脂質組成とPS合成速度

リン脂質無添加、PS添加、及びPE添加培地で3日間培養した時のPSB-2株のリン脂質組成を親株PSA-3、野生株CHO-K1の組成と比較した(表4)。PSA-3株は、リン脂質無添加培地で培養後、PS含量が野生株CHO-K1の約60%に、また、主にPSを前駆体として合成されるPEの含量がCHO-K1株の約70%に低下していたが、PS添加培地及びPE添加培地で培養した場合はPS、PE含量の低下は認められず、CHO-K1株とほぼ同様のリン脂質組成を示した。この結果は、以前報告されている結果(Kuge *et al.* 1986a, 1986b)とほぼ同様の結果であった。PSB-2株はPSA-3株と同様に、リン脂質無添加培地でPS、PE含量の低下を示したが、その度合いは増しており、PS含量はCHO-K1株の約20%に、PE含量は同株の約50%に低下していた。また、PS添加培地でのPSB-2株は、野生株CHO-K1とほぼ同様のリン脂質組成を示し、親株PSA-3と同様のPS、PE含量の回復が観察された。しかし、PE添加

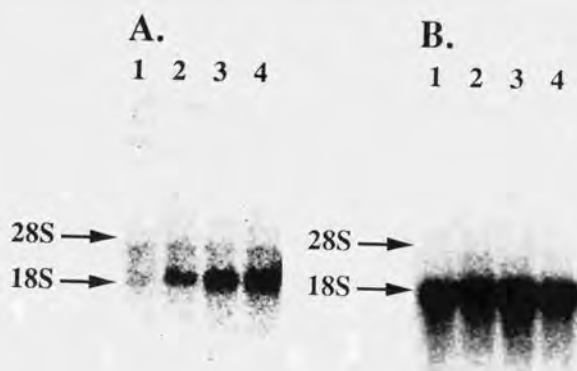


図15 CHO-K1株、PSA-3株、PSB-1株、PSB-2株のノザンプロット解析

細胞を30 μ MPS存在下、39.5°Cで培養し、poly (A) ⁺RNAを調製した。各レーンには2.5 μ gのpoly (A) ⁺RNAを泳動し、*pssB*プローブ (パネルA)、又は β -アクチンプローブ (パネルB) で解析した。矢印は28Sと18Sのribosomal RNAの位置を示す。レーン1、PSB-2；レーン2、PSB-1；レーン3、PSA-3；レーン4、CHO-K1。

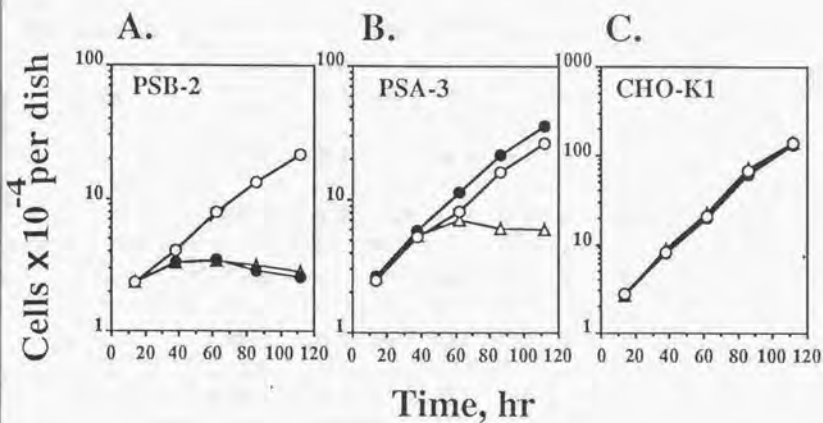


図16 PSB-2株 (A)、PSA-3株 (B)、CHO-K1株 (C) の増殖

2.5×10^4 cellsの細胞を内径60mmのシャーレにまき、リン脂質を加えていない培地 (Δ)、及び $30 \mu\text{M}$ PS (\circ)、又は $30 \mu\text{M}$ PE (\bullet)を添加した培地で 39.5°C にて培養した。表記の各時間において、細胞を0.25%トリブシンではがし、Coulter カウンター (モデルZB1)を用いて細胞数を計測した。

表4 CHO-K1株、PSA-3株、PSB-2株のリン脂質組成

細胞をリン脂質無添加培地、及び30 μ M PS、又は30 μ M PEを添加した培地で、39.5 $^{\circ}$ Cにて5日間培養した。細胞からリン脂質を抽出し、2次元TLCで分離後、各リン脂質を定量した(第2章、材料と方法の項参照)。実験は2回行ったが、2回の実験結果はほぼ一致しており、そのうちの1回の結果を示した。

Phospholipid supplementation	Strain	Phospholipid composition, % total					
		PS	PE	PC	PI	SM	Other ^a
None	CHO-K1	5.9	16.6	52.3	7.2	8.4	9.7
	PSA-3	3.7	11.7	64.3	8.4	7.3	4.6
	PSB-2	1.2	8.5	71.4	8.4	6.2	4.3
PS	CHO-K1	6.1	17.5	58.1	6.4	8.7	3.2
	PSA-3	6.2	18.3	54.8	7.2	8.8	4.7
	PSB-2	6.8	15.8	51.7	8.2	12.6	4.9
PE	CHO-K1	5.3	30.9	45.9	5.8	8.5	3.7
	PSA-3	4.7	29.9	47.3	6.0	9.0	3.2
	PSB-2	1.8	31.5	46.0	8.2	8.7	3.9

^a Other lipids include lysophosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, phosphatidic acid, and cardiolipin.

培地でのPSB-2株は、PSA-3株と異なり、PS含量がCHO-K1株の約30%に低下していた。

この時PSB-2株では、PE含量をはじめとしてその他のリン脂質含量に低下は認められなかった。

リン脂質の組成の結果から、PSB-2株はPSA-3株よりも、さらにPS合成能が低下しているのではないかと考えられたので、PSB-2、PSA-3、CHO-K1各細胞を $[^{14}\text{C}]$ セリンで標識し、 $[^{14}\text{C}]$ セリンのPSへの取り込みから、PS合成速度を調べた。図17Aに示すように、リン脂質無添加培地では、PSA-3株とPSB-2株のいずれもが、CHO-K1株の1/10以下のPS合成速度を示した。PE添加培地でのPSA-3株のPS合成速度は、CHO-K1株とほぼ同じレベルであり(図17B)、以前の報告の通り(Kuge *et al.* 1986b)、PSA-3株はPEに依存してPS合成が回復することが確認された。しかし、PE添加培地でのPSB-2株のPS合成速度は、CHO-K1株とPSA-3株の速度の約1/3であり(図17B)、外因性PEに依存したPS合成能の回復が認められないことが明らかとなった。

2.4. PSB-2株のPEをPSに変換する活性

PSA-3株ではPCをPSに変換する反応が欠損しているが、PEをPSに変換する反応は正常に認められる(Kuge *et al.* 1986b)。PSB-2、PSA-3両細胞を $[^{32}\text{P}]$ PEでラベルして、各細胞のPEをPSへ変換する活性を比較した。図18Aに示すように、PSB-2株ではPSA-3株に比べて、著しく $[^{32}\text{P}]$ PS産生量が低下していた。この時、PSB-2株に取り込まれた $[^{32}\text{P}]$ PEのレベルは、PSA-3株の70%程度で、大きな差は認められなかった(図18B)。以上の結果から、PSB-2株では、PEをPSに変換する活性が、著しく低下していることが示された。

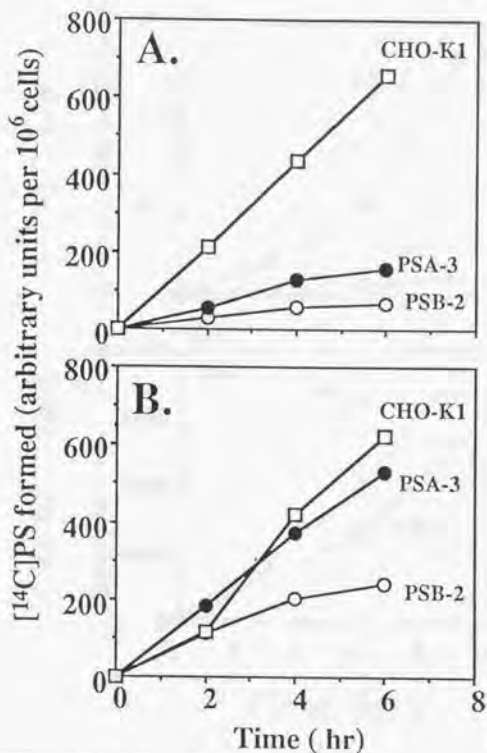


図17 PSB-2株、PSA-3株、CHO-K1株におけるL-[U-¹⁴C]セリンのPSへの取り込み

2-4 × 10⁵ cellsの細胞を内径60mmのシャーレにまき、30 μM PSを添加した培地で33℃にて2日間培養後、培地をリン脂質無添加培地 (A)、又は30 μM PEを添加した培地 (B) に交換し、39.5℃でさらに24時間培養した。培地を0.2 μCi/ml L-[U-¹⁴C]セリン (2 μCi/μmol) を含むリン脂質無添加培地 (A)、又はPE添加培地 (B) に交換し (0時間)、39.5℃で2-6時間培養した。細胞からリン脂質を抽出し、1次元TLCで分離後 (第2章、材料と方法の項参照)、PSに取り込まれた放射活性をbioimage analyzer (FUJIX BAS2000) を用いて定量した。PSの放射活性はL-[U-¹⁴C]セリン添加直前の細胞数で標準化した。なお、一点につきduplicateでアッセイし、その平均値を示した。PSB-2、○；PSA-3、●；CHO-K1、□。

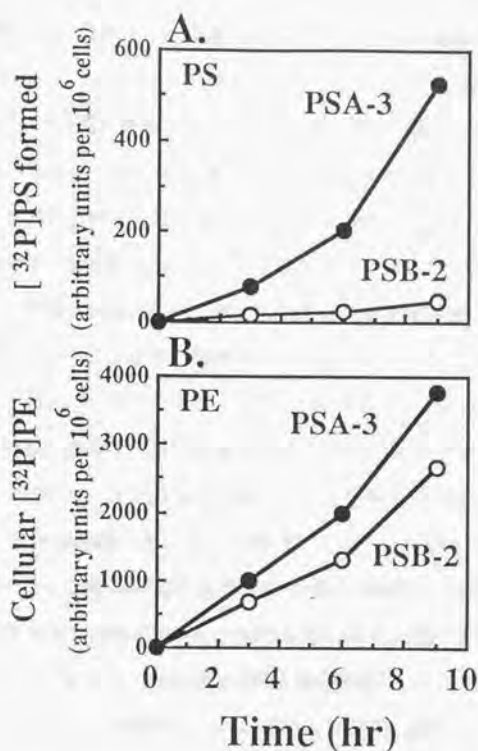


図18 PSB-2株とPSA-3株における外因性PEのPSへの変換

$5 \cdot 10^5$ cellsの細胞を内径100mmのシャーレにまき、 $30 \mu\text{M}$ PSを添加した培地で 39.5°C にて3日間培養した。培地をリン脂質無添加培地に交換し、 39.5°C で2時間培養した後、培地に 10^5cpm/ml となるように $[^{32}\text{P}]\text{PE}$ を加え、 39.5°C で3-9時間培養した。細胞からリン脂質を抽出し、2次元TLCで分離後(第2章、材料と方法の項参照)、PS(A)とPE(B)に取り込まれた放射活性をbioimage analyzer (FUJIX BAS2000)を用いて定量した。PSとPEの放射活性は、 $[^{32}\text{P}]\text{PE}$ を加えずに上記と同様にインキュベーションしたシャーレの細胞数で標準化した。なお、一点につきduplicateでアッセイし、その平均値を示した。PSB-2、○; PSA-3、●。

2.5. PSSII cDNAを導入したPSB-2株 (PSB-2/*pssB*) の増殖とPS合成

PSA-3株とPSB-2株に認められる表現型の違いが、PSSIIの損傷に起因することを確かめるため、PSB-2株にPSSIIのcDNA、*pssB*を導入し、*in situ*セリン交換活性測定法を利用してPSSII活性が回復した形質転換株を検索した。以前、PSA-3株に*pssB*cDNAを導入してPSSII活性を過剰発現させると、PSSIが欠損しているにも関わらず、正常なPS合成能と増殖能を獲得することが明らかになっている (Kuge *et al.* 1997a)。そこで、PSSIIの過剰発現によりPSA-3株と同様の表現型が見えなくなるのを避けるため、PSSII活性を過剰発現している細胞ではなく、親株のPSA-3株のレベルに回復した細胞を選択した。得られた形質転換株PSB-2/*pssB*は、PSA-3株とほぼ同程度のセリン、エタノールアミン交換活性を有し、コリン交換活性は欠損していたことから (表5)、正常レベルのPSSII活性を回復したと考えられた。まず、PSB-2/*pssB*株の細胞増殖をPSB-2、PSA-3株と比較したところ、PSB-2/*pssB*株は、PSB-2株と同様に、リン脂質を添加していない培地では増殖しなかったが、PSB-2株とは異なり、PE添加培地で増殖した (図19)。さらに、PSB-2/*pssB*株のリン脂質組成を調べたところ、リン脂質無添加培地ではPSB-2株と同様に、PSとPEの含量が著しく低下したが、PE添加培地ではPSB-2株のようなPS含量の低下は認められず、正常なリン脂質組成を示した (表6)。従って、PSB-2/*pssB*株の細胞増殖とリン脂質組成は、PSA-3株と同様の表現型であった。以上の結果から、PSSIIは、PSSI欠損株PSA-3に観察されるPE依存の増殖とPSの生合成に必須であることが示された。

2.6. PSSI cDNAを導入したPSB-2株 (PSB-2/*pssA*) の増殖とPS合成

PSB-2株はPSSIの欠損とPSSIIの損傷を有する変異株であるので、PSB-2株にPSSIのcDNAを導入してPSSIの欠損を相補すれば、PSSIIにのみ損傷を有する変異株が得られると考えられる。PSB-2株に*pssAcDNA*を導入し、セリン、エタノールアミン、コリン交換活性がそれぞれCHO-K1株の活性の38%、23%、50%に回復した形質転換株、PSB-2/*pssA*を得た (表5)。コリン交換活性の値から、PSB-2/*pssA*株はCHO-K1株の半分程度のPSSI活性を回復したものと考えられた。PSB-2/*pssA*株の細胞増殖を調べた結果、この細胞はPSやPEの添加の有無に関わらず、リン脂質無添加培地でも、正常に増殖した (図19)。さ

表5 PSB-2/*pssB*、PSB-2/*pssA*株のホモジネートのセリン、エタノールアミン、コリン交換活性

細胞培養、ホモジネートの調製、セリン、エタノールアミン、コリン交換活性の測定は表2と同様の方法で行った。活性はduplicateで測定し、その平均値を示した（誤差10%未満）。

Strain	Substrate		
	Serine	Ethanolamine	Choline
	<i>nmol/hr/mg protein</i>		
PSB-2/ <i>pssB</i>	2.0	4.5	<0.05
PSB-2/ <i>pssA</i>	1.6	1.2	0.8
PSB-2	0.2	0.6	<0.05
PSA-3	2.0	4.2	<0.05
CHO-K1	4.2	5.2	1.6

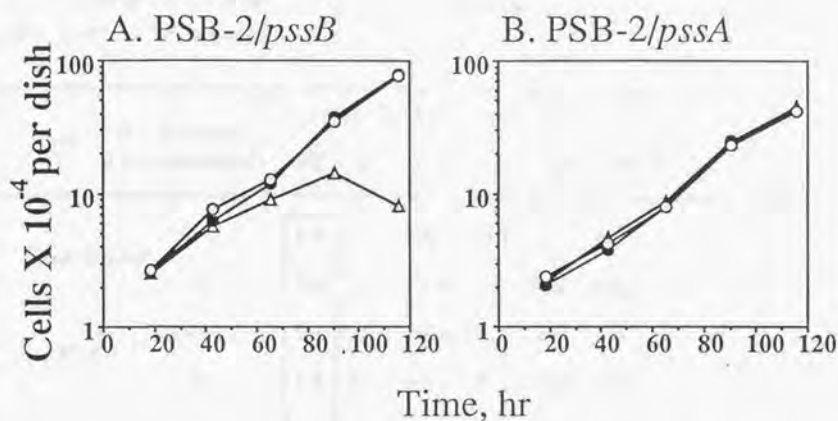


図19 PSB-2/pssB株 (A) と PSB-2/pssA株 (B) の増殖

2.5×10^4 cellsの細胞を内径60mmのシャーレにまき、リン脂質を加えていない培地 (△)、及び $30 \mu\text{M}$ PS (○)、又は $30 \mu\text{M}$ PE (●)を添加した培地で 39.5°C にて培養した。表記の各時間において、細胞を0.25%トリプシンではがし、Coulterカウンター (モデルZB1)を用いて細胞数を計測した。

表6 PSB-2/*pssB*株のリン脂質組成

リン脂質組成は表4と同様の方法で求めた。実験は2回行ったが、2回の実験結果はほぼ一致しており、そのうちの1回の結果を示した。

Strain	Phospholipid supplementation	Phospholipid composition, % total					
		PS	PE	PC	PI	SM	Other ^a
PSB-2/ <i>pssB</i>	None	1.9	9.5	68.6	9.1	6.1	4.7
	PE	5.4	33.7	41.4	7.3	9.3	2.9
PSB-2	None	1.2	8.5	71.4	8.4	6.2	4.3
	PE	1.8	31.5	46.0	8.2	8.7	3.9
PSA-3	None	3.7	11.7	64.3	8.4	7.3	4.6
	PE	4.7	29.9	47.3	6.0	9.0	3.2
CHO-K1	None	5.9	16.6	52.3	7.2	8.4	9.7
	PE	5.3	30.9	45.9	5.8	8.5	3.7

^a Other lipids included lysophosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, phosphatidic acid, and cardiolipin.

らにリン脂質無添加培地でのPSB-2/*pssA*株のリン脂質組成を調べると、PSB-2株に認められたPSとPE含量の低下は認められず、正常なリン脂質組成を示した(表7)。従って、PSB-2株はPSSIのcDNAの導入によって、正常な増殖能とPS合成能を回復することが明らかとなった。

2.7. PSB-2/*pssB*株とPSB-2/*pssA*株のPEをPSに変換する活性

*pssB*cDNA、及び*pssAc*cDNAの導入によって、PSB-2株のPEをPSに変換する活性の低下が回復したかどうかを、図18と同様の方法で調べた。PSB-2株において $[^{32}\text{P}]$ PEから産生された $[^{32}\text{P}]$ PS量は、PSA-3株の10%、CHO-K1株の27%であり、図18と同様に、PEをPSに変換する活性が低下していることが確認された(図20A)。この時、PSSIIのcDNA導入株PSB-2/*pssB*では、PSB-2株の6.3倍に $[^{32}\text{P}]$ PS量が増加し、PSA-3株、CHO-K1株と同程度までPEをPSに変換する活性が回復していた。しかし、PSSIcDNA導入株PSB-2/*pssA*の同活性は、PSB-2株と同様に低下したままであった。なお、細胞に取り込まれた $[^{32}\text{P}]$ PE量は、PSA-3株で高いものの、その他の細胞ではほぼ同程度であり、 $[^{32}\text{P}]$ PS量を説明する差は観察されなかった(図20B)。従って、PSSIIはPEをPSに変換する反応を触媒すること、PSSIはこの反応を触媒しないことが明らかとなった。

2.8. PSB-2/*pssB*株とPSB-2/*pssA*株のPCをPSに変換する活性

細胞を $[^{32}\text{P}]$ PCでラベルし、 $[^{32}\text{P}]$ PCから産生された $[^{32}\text{P}]$ PS量を調べたところ、PSB-2株はPSA-3株と同様に、 $[^{32}\text{P}]$ PS産生量がCHO-K1株の5%以下に低下しており(図21A)、親株のPSA-3株と同様にPSB-2株においても、PSSIの欠損によるPCをPSに変換する活性の欠損が確認された。そこで、この欠損が*pssB*及び*pssAc*cDNAの導入によって回復したかどうかを調べたところ、PSSIIのcDNA導入株PSB-2/*pssB*では、PSB-2株と同様にPS産生量は低下したままであったが、PSSIのcDNA導入株PSB-2/*pssA*のPS産生量はCHO-K1株と同程度まで回復していた(図21A)。なお、細胞に取り込まれた $[^{32}\text{P}]$ PC量は、CHO-K1株で若干低いものの、その他の細胞ではほぼ同程度であり、 $[^{32}\text{P}]$ PS量を説明する差は観察されな

かった (図21B)。従って、PSSIはPCをPSに変換する反応を触媒すること、PSSIIは同反応を触媒しないことが確かめられた。

表7 PSB-2/*pssA*株のリン脂質組成

リン脂質組成は表4と同様の方法で求めた。実験は2回行ったが、2回の実験結果はほぼ一致しており、そのうちの1回の結果を示した。

Phospholipid supplementation	Strain	Phospholipid composition, % total					
		PS	PE	PC	PI	SM	Other ^a
	PSB-2/ <i>pssA</i>	6.5	15.9	54.7	8.2	10.6	4.0
None	PSB-2	1.2	8.5	71.4	8.4	6.2	4.3
	CHO-K1	5.9	16.6	52.3	7.2	8.4	9.7

^a Other lipids included lysophosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, phosphatidic acid, and cardiolipin.

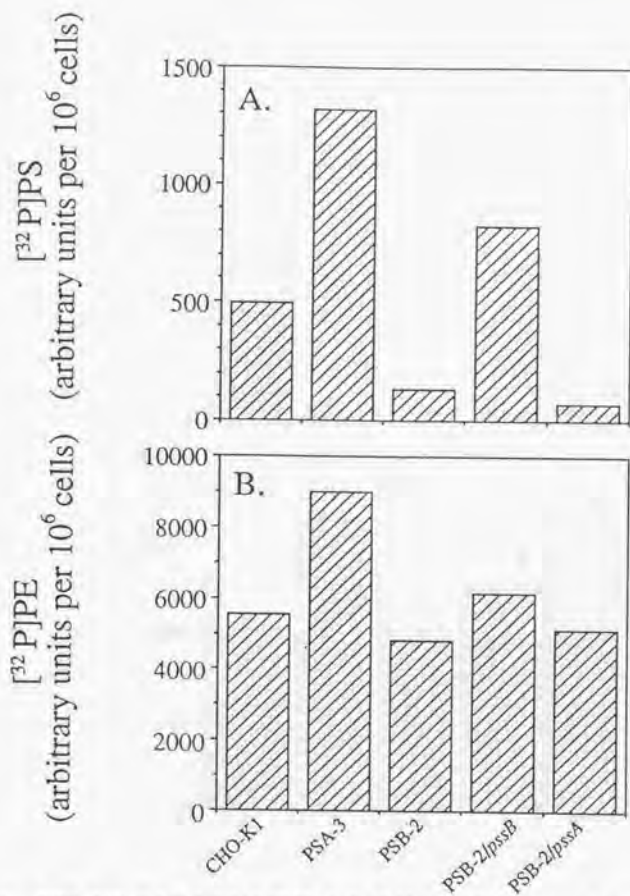


図20 PSB-2株のPEをPSに変換する活性の損傷は、*psbB*cDNAの導入により相補され、*psbA*cDNAの導入では相補されない

$2 \cdot 10^5$ cellsの細胞を内径100mmのシャーレにまき、 $30 \mu\text{M}$ PSを添加した培地で 39.5°C にて3日間培養した。その後、図18と同様の方法で、 $[^{32}\text{P}]\text{PE}$ 存在下 39.5°C で9時間培養した。細胞からリン脂質を抽出し、2次元TLCで分離後（第2章、材料と方法の項参照）、PS (A) とPE (B) に取り込まれた放射活性をbioimage analyzer (FUJIX BAS2000) を用いて定量した。PSとPEの放射活性は、 $[^{32}\text{P}]\text{PE}$ を加えずに上記と同様にインキュベーションしたシャーレの細胞数で標準化した。なお、一点につきduplicateでアッセイし、その平均値を示した。

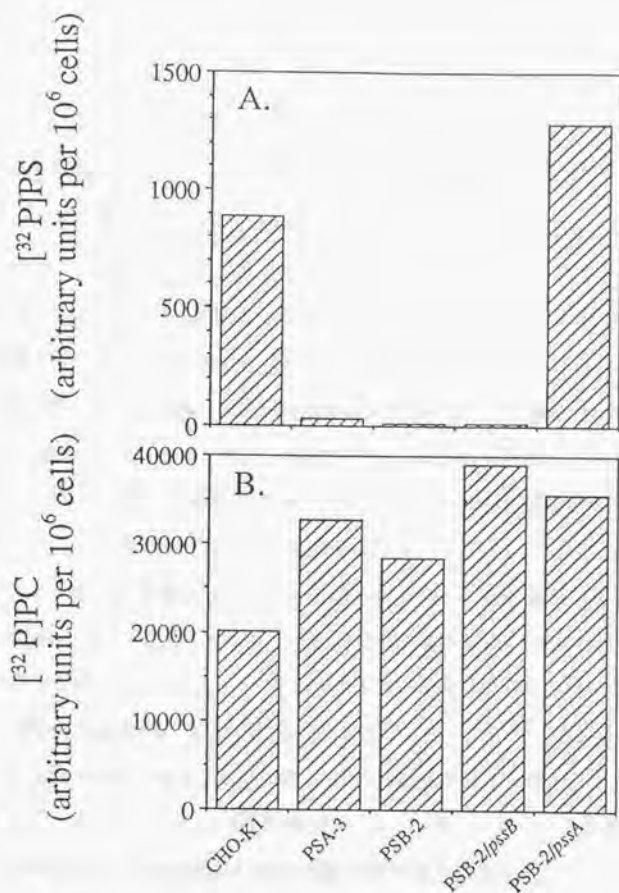


図21 PSB-2株のPCをPSに変換する活性の欠損は、*pssAc*DNAの導入により相補され、*pssBc*DNAの導入では相補されない

$2 \cdot 10^5$ cellsの細胞を内径100mmのシャーレにまき、 $30 \mu\text{M}$ PSを添加した培地で 39.5°C にて2日間培養した。培地をリン脂質無添加培地に交換し、 39.5°C で2時間培養した後、培地に $3 \times 10^5 \text{cpm/ml}$ となるように $[^{32}\text{P}]$ PCを加え、 39.5°C で24時間培養した。細胞からリン脂質を抽出し、2次元TLCで分離後（第2章、材料と方法の項参照）、PS (A) とPC (B) に取り込まれた放射活性をbioimage analyzer (FUJIX BAS2000) を用いて定量した。PSとPCの放射活性は、 $[^{32}\text{P}]$ PCを加えずに上記と同様にインキュベーションしたシャーレの細胞数で標準化した。なお、一点につきduplicateでアッセイし、その平均値を示した。

3. 考察

3.1. PSB-2株はPSSII損傷株である

哺乳動物細胞においてPSは、PC又は、PEの塩基部分（コリン、エタノールアミン）とセリンとの交換反応によって合成される（Dringer 1973; Marggraf and Anderer 1974; Kuge *et al.* 1986b）。CHO-K1細胞におけるセリン交換反応は、少なくとも2種類の酵素、*pssA*遺伝子産物であるPSSI（Kuge *et al.* 1986a, 1991b; 本研究第3章）と*pssB*遺伝子産物であるPSSIIが触媒する（Kuge *et al.* 1997a, 1997b）。PSSIを欠損するCHO-K1細胞変異株、PSA-3の性状解析から、PSSIIはCHO-K1細胞におけるPSとPEの産生に重要であることが明らかとなった（Kuge *et al.* 1986a, 1991b）。本研究では、CHO-K1細胞におけるPSSIIの機能を明らかにするために、PSSIIに損傷を有するCHO細胞変異株の分離を目指した。PSA-3株を元にして、セリン交換活性が低下した変異株を検索することによって分離した変異株PSB-2株は、以下に挙げる特徴を示した。1) PSB-2株のセリン交換活性はPSA-3株の活性の約10%に、CHO-K1株の約5%に低下していた。2) PSSIIはエタノールアミン交換反応も触媒することが知られている（Kuge *et al.* 1997a）が、PSB-2株のエタノールアミン交換活性は、PSA-3株とCHO-K1株の活性の15%以下に低下していた。3) PSB-2株における*pssB*遺伝子のmRNAレベルは、PSA-3株とCHO-K1株の約20%に低下していた。4) *pssBc*DNAをPSB-2株に導入することにより、同変異株のセリン、エタノールアミン交換活性は回復した。これらの結果から、PSB-2株はPSSIIに損傷を有すると結論した。

3.2. CHO-K1細胞のセリン交換反応の殆どはPSSIとPSSIIによって触媒される

PSA-3株は*pssAm*RNA（Kuge *et al.* 1991b）とその遺伝子産物（本研究第3章）が全く検出されないことから、PSSIを完全に欠損するものと示唆された。また、同変異株はCHO-K1株のホモジネートに検出されるセリン交換活性の約50%を有する（Kuge *et al.* 1986a）ことから、PSSIの活性はCHO-K1細胞のセリン交換活性の約50%を占めることが示唆された。一方、PSSII損傷株PSB-2は、PSA-3株のセリン交換活性の約10%に相当する活性を有することから、PSSIIの活性はPSA-3株のセリン交換活性の約90%を占めることが示唆され

た。PSB-2株にはPSA-3株の10%に相当するセリン交換活性が検出されるが、*pssBmRNA*もまた、PSA-3株の10%程度検出されること、PSA-3株、PSB-1株、PSB-2株におけるセリン交換活性と、*pssBmRNA*の発現レベルには比例関係が認められたことを考慮すると、PSB-2株の残りのセリン交換活性もPSSIIの活性であると考えられる。従って、CHO-K1細胞のセリン交換反応は、主にPSSIとPSSIIにより触媒され、それぞれが、CHO-K1細胞のセリン交換活性の約50%を担うものと考えられた。

3.3. PSSIIはPE存在下におけるPSA-3株の増殖とPS合成に必須である

PSB-2株とPSA-3株は、リン脂質無添加培地で増殖せず、正常量のPSを合成できない、という点で共通していた。PSSI欠損株であるPSA-3は、培地にPEを添加すると、増殖能とPS合成能が回復した。しかし、PSSIの欠損とPSSIIの損傷を有するPSB-2株は、PEを添加しても、これらの回復は認められなかった。また、 $[^{32}\text{P}]$ PEラベルの実験から、PSB-2株はPSA-3株と異なり、PEをPSに変換する活性に損傷を有することが明らかとなった。PSB-2株にPSSIIをコードする*pssBcDNA*を導入すると、PEをPSに変換する活性の回復、及びPE存在下における増殖能とPS合成能の回復が認められた。これらの結果から、PSSIIはPEをPSに変換する反応を触媒し、PSA-3株のPE存在下における増殖とPS合成に必須であることが明らかになった。

3.4. PSSIはPEからのPS合成を触媒しない

PSA-3株はPCをPSに変換する活性が欠損している (Kuge *et al.* 1986b) が、この活性はPSA-3株に*pssAcDNA*を導入すると回復する (K.Saito, M. Nishijima, O.Kuge unpublished data)。これらの結果から、PSSIはPCをPSに変換する反応を触媒することが明らかとなった。しかし、この酵素がPCだけをPS合成の基質とするのか、それともPEも基質とするのかは不明であった。今回、PEをPSに変換する反応が損傷したPSB-2株を利用して、PSSIの基質特異性を明確にすることができた。PSSIIをコードする*pssBcDNA*をPSB-2株に導入すると、同変異株のPEをPSに変換する活性の低下は回復したが、PSSIをコードする*pssAcDNA*を導入しても、回復は認められなかった。一方、PSB-2株に欠損するPCをPSに

変換する活性は、*pssBc*DNAでは回復せず、*pssAc*DNAによって回復した。これらの結果から、CHO-K1細胞におけるPEからのPS合成に、PSSIは全く寄与していないことが示唆された。また、以前、PSA-3株に*pssBc*DNAを導入してもPCをPSに変換する活性は回復しないことから、PSSIIはPCからのPS合成に寄与しないことが示唆されているが (Kuge *et al.* 1997a)、今回もこの結論が支持された。

以上の結果を総括すると、本研究では、1) CHO-K1細胞におけるセリン交換反応は、PSSIとPSSIIによって触媒される、2) PSSIIはPE存在下に培養したPSA-3株のPS合成に重要である、3) PSSIIはPEをPSに変換する反応を触媒するが、PSSIは触媒しない、とういうことが示唆された。従って、野生株CHO-K1におけるPEからのPS合成は、殆どがPSSIIによって触媒されると示唆された。

3.5. CHO-K1細胞の増殖とPS合成におけるPSSIIの重要性

PSSIとPSSIIの両方に損傷を有するPSB-2株に*pssAc*DNAを導入すると、リン脂質無添加培地において、正常に増殖するようになった。また、PSB-2/*pssA*株はリン脂質無添加培地で正常なリン脂質組成を示した。PSB-2/*pssA*株はCHO-K1株の約半分のPSSI活性で増殖とリン脂質組成が回復していることから、これらの回復にPSSIの過剰発現は必要ではないことは明らかであった。これらの結果から、PSSIIはPSSIが存在する場合に、細胞の増殖とPS合成に必須ではない可能性が考えられた。しかし、PSB-2株にはPSSIIの活性とPSSIIのmRNAが残存していることを考えると、PSSIIの損傷がleakyであり、表現型として表れなかったという可能性も考えられた。従って、通常の培養条件下のCHO-K1細胞（すなわち、PSSIを有する細胞）におけるPSSIIの重要性は、PSSIIを完全に欠損する変異株の分離によって、明確になるものと思われる。

3.6. CHO-K1細胞の増殖にPSが必須である

PSSI欠損株PSA-3はリン脂質無添加の培地で培養すると、細胞内のPSとPEの脱炭酸反応により合成されるPEのレベルが減少し、増殖出来ない (Kuge *et al.* 1986a)。培地にPS又はPEを添加すると、PSA-3株のPSとPEのレベルは正常となり、増殖も回復する (Kuge *et*

al. 1986a, 1986b)。これらの以前の結果から、リン脂質無添加培地では、PSSIによるPS合成がCHO-K1細胞の増殖に不可欠であることが明らかとなったが、PSSIによって作られたPSそのものと、そのPSから合成されるPEのどちらが、あるいは両方が増殖に重要であるのかは不明のままであった。本研究で得られたPSB-2株は、その増殖の損傷がPSによって回復したが、PEでは回復しなかった。PE存在下に培養したPSB-2株ではPSのレベルが減少していたが、PEをはじめとしてその他のリン脂質に減少は認められなかった。これらの結果から、CHO-K1細胞の増殖にPSそのものが必須であることが示唆された。酵母ではPSが細胞の増殖に必須ではないと示唆されており (Atkinson *et al.* 1980)、哺乳動物細胞の増殖に特有なPSの機能があるものと推察された。

第5章 本研究のまとめと今後の課題

1. 本研究のまとめ

本研究では、*pssA*遺伝子がコードする分子量42-kの膜蛋白質がPSSIであることを示した。さらに、*pssB*遺伝子がコードするPSSIIは、PEをPSに変換する反応を触媒し、PSSI欠損株PSA-3をPE存在下で培養した時に観察される細胞増殖とPS合成に必須であることを明らかにした。また、PSSIIはPEをPSに変換する反応を触媒せず、PCをPSに変換する反応のみを触媒することも明らかとなった。

これまでの知見と今回得られた知見から、CHO細胞におけるPS合成機構は以下のように結論された(図22)。

- 1) CHO細胞ではPCを基質とするセリン交換反応によりPSを合成する経路があり、この反応を*pssA*遺伝子産物であるPSSIが特異的に触媒する。
- 2) PSはさらに*pssC*遺伝子産物であるPSDによって脱炭酸されてPEに変換され、この一連の反応はPSとPEの主要合成経路となっている。
- 3) 一方、CHO細胞にはPEを基質とするセリン交換反応によりPSを合成する経路もあり、この反応は*pssB*遺伝子産物であるPSSIIが特異的に触媒する。

なお、PSSIIのPS合成における重要性は不明であるが、少なくともその基質であるPEが十分にある条件下では、主要なPS合成経路として働きうることが示唆された。

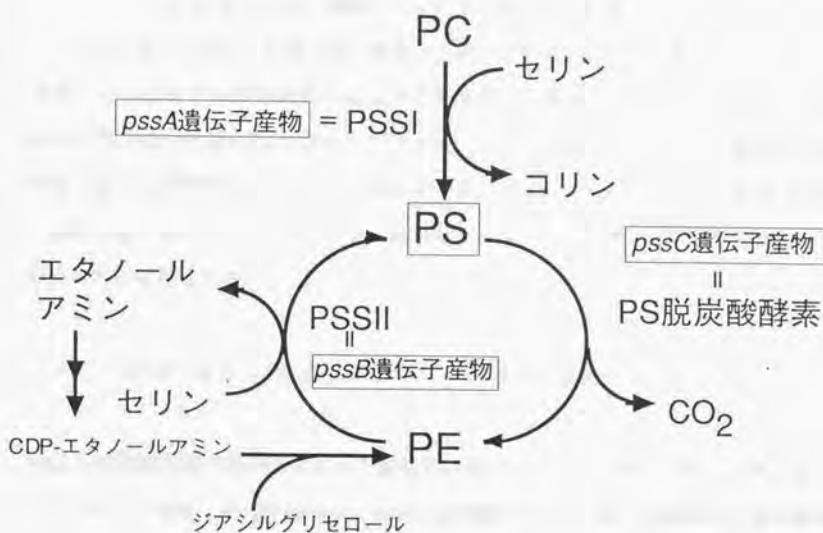


図22 CHO細胞におけるPS代謝経路

CHO細胞ではPCを基質とするセリン交換反応によりPSを合成する経路があり、この反応をpssA遺伝子産物であるPSSIが触媒する。PSはさらにpssC遺伝子産物であるPSDによってPEに変換される。この一連の反応はPSとPEの主要合成経路である。一方、PEを基質とするセリン交換反応によりPSを合成する経路も存在し、pssB遺伝子産物であるPSSIIが触媒する。PSSIIのPS合成における重要性は不明であるが、基質であるPEが十分にある条件下では、主要なPS合成経路として働きうる。

2. 今後の課題

2.1. PS合成酵素の触媒機構

PSSI、PSSIIのアミノ酸配列が明らかとなり、両酵素にはよく似た配列が存在することがわかった (Kuge *et al.* 1997a, 1997b)。この中には、リン脂質塩基を遊離塩基と交換するという両酵素に共通する触媒作用に関与する部位が存在することが期待される。遺伝子工学的手法によりその類似配列に変異や欠失を有する酵素を作成し、内在性のPSSIとPSSIIの活性が極めて低いPSB-2株に発現させることによって、ミュータント酵素由来のリン脂質・塩基交換活性を解析することが可能である。このような方法で、触媒作用に関与する部位を明らかにすれば、リン脂質・塩基交換酵素の触媒機構を解明するための手がかりが得られる可能性がある。

2.2. PSSIとPSSIIの基質リン脂質の脂肪酸分子種に対する選択性

PSはその脂肪酸鎖の分子種によって機能的に異なることがわかってきた。例えば、PSとジアシルグリセロールによるprotein kinase Cの活性化では、PSの脂肪酸の不飽和度が高いほど、活性化能が高いことが報告されている (Snoek *et al.* 1988)。また、PSはsmall GTP-binding proteinであるKi-RasによるB-Raf kinaseの活性化を促進し、また別のsmall GTP-binding proteinであるRap1BによるB-Raf kinaseの活性化を阻害するが、PSの脂肪酸鎖の不飽和度が高いほどその作用が増強されることが報告されている (Kuroda *et al.* 1996)。組織や細胞にもよるが、概してPSはsn-1位にステアリン酸、sn-2位には高度不飽和脂肪酸が豊富であることが知られており、この分子種の組成が機能的に重要である可能性がある。PSはその前駆体であるPC、PEとかなり異なる分子種組成比を示すが (Ellingson and Seeniah 1994)、PSの偏った分子種組成が形成されるメカニズムについては三つ考えられる。第一はPS合成酵素が、特定の分子種の前駆体リン脂質を選択的に基質とする、あるいは選択的に基質として利用しないよう排除している場合、第二は、

PC、PEに複数のプールがあり、特定の分子種が含まれるプールをPS合成酵素が前駆体リン脂質として利用可能である場合、第三は、PS合成酵素には基質分子種の選択性はないが、合成されたPSを特定の分子種にリモデリングする経路がある場合である。ラット肝臓のミクロソームのPSの分子種は18:0/20:4と18:0/22:6が多いが、ミクロソームを放射性セリンでラベルしたときに初期に標識されるPSの分子種も同様であることが報告されており (Ellingson and Seenaiah 1994)、リモデリングの可能性よりも、PS合成酵素にステアリン酸と高度不飽和脂肪酸からなる前駆体リン脂質に対するPS合成酵素の基質選択性、あるいは同酵素が利用可能な基質プールにこれらの分子種が選択的に入ることが、PSの分子種組成形成機構であると思われる。PS合成酵素の基質選択性についてより詳細に解析する目的に、本研究で得たPSB-2株は有力なツールとなると期待される。PSB-2株はPSSIの欠損、PSSIIの損傷を有する変異株であり、この変異株とPSSIとPSSIIのcDNAを利用すれば、本研究のPSB-2/*pssA*株とPSB-2/*pssB*株をはじめとして、PSSIとPSSIIの発現レベルが様々な細胞を作成することが可能である。このような細胞そのものあるいは膜画分を放射性セリンでラベルし、標識されるPS分子種を解析すれば、PSSIとPSSIIを分離して基質選択性を解析できるとと思われる。得られる結果から、PSの分子種組成形成におけるPSSIとPSSIIの寄与を論ずることができるかもしれない。また、PSB-2株はPS合成損傷が著しく、正常なる増殖を維持するためのPSソースは培地に添加したPSに大きく依存しているが、このことは逆に外因性PSの分子種組成を変化させることで細胞膜のPS分子種組成を変化させることができるという可能性を秘めている。もし、このことが可能ならば、特定のPS分子種の増殖における重要性や細胞機能における重要性を解析することができるかもしれない。

2.3. PSの機能研究へのPSB-2株の応用

リン脂質合成酵素の変異株は、そのリン脂質の機能を細胞レベルで解析するための良い実験材料となりうる。PSSI欠損株PSA-3は、リン脂質非存在下に培養するとPSとPEの含量が低下するが、PSA-3株のこの性質を利用して、RNA被膜ウイルスの一つである Sindbis

virus被膜と宿主動物細胞のエンドソーム膜との融合にPSあるいはPE、またはその両者が必要であることが示された (Kuge *et al.* 1989)。また、CHO細胞のPGとCLの生合成損傷変異株を利用して、PGまたはCLがミトコンドリアの形態と機能に重要であることが示唆されている (Ohtsuka *et al.* 1993)。PSの様々な機能に関する報告は主に無細胞系を用いており、実際に細胞レベルでPSが予想される機能をもつのかについては検討の余地がある。PSB-2株はPE存在下に培養するとPSだけが減少するという性質を有するので、PSの機能解析に限定して利用する際には、リン脂質非存在下でPSとPEの両方が減少するPSA-3株よりも適した素材であると思われる。例えば、PSとの親和性をもつことが報告されているシグナル伝達分子の活性化に、実際に細胞膜のPSが関与しているかを調べるのに、PSB-2株は良い実験材料となるだろう。

2.4. PSSIIのPS代謝及びエタノールアミン代謝における意義

CHO細胞はPSSIがなくとも、PSSIIとその基質となるPEが十分にあれば、この酵素だけで増殖に必要なPSを産生することができることが明らかとなった。つまり、PSSIIはPSSIに匹敵するPS合成能を有する酵素であると考えられる。しかし、PSB-2株にPSSIのcDNAを導入して得られたPSB-2/*pssA*株は、PSSIIに損傷を有するにも関わらず、PS非存在下において正常なPS、PE含量を示し、正常に増殖した。PSSIIの損傷がleakyであるために、表現型として現れなかったのか、それとも、PSSIがあればPSSIIはPS合成と増殖に必須ではないのかは不明であり、PSSIIのPS代謝における意義については更なる検討を要している。もし、培養細胞ではPSSIIが必須ではない可能性があったとしても、動物の生理的状況の違いや、動物組織や細胞の種類によっては、PSSIでは代償できないPSSIIの重要な機能がある可能性があり、動物個体におけるPSSIIの意義の解析が今後の重要課題であると思われる。この目的にはPSSIIの欠損マウスの作成が最も有力なアプローチである。そのマウスの組織を材料に、PSSII完全欠損細胞を樹立することも可能であり、PSSIIの生理的意義を個体、細胞両面から解析する手段が広がることが期待される。

一方、PSSIIが触媒するPEからのPS合成は、PSの他にエタノールアミンを産生する反応

でもある。これまでに、エタノールアミン及び水溶性のエタノールアミン誘導体は、ラットの乳癌細胞 (Kano-Sueoka *et al.* 1979) や肝細胞 (Nelson *et al.* 1996, Sasaki *et al.* 1997)、ハイブリドーマ (Murakami *et al.* 1982) の増殖を促進する動物組織抽出液中の因子として同定されている。また、哺乳動物細胞の上皮組織由来の細胞の多くが、繊維芽細胞や神経細胞といった間充組織由来の細胞と異なり、増殖にエタノールアミンを必要とすることも知られており (Kano-Sueoka and Errick 1982)、エタノールアミンがある種の細胞の増殖において重要な機能をもつ可能性が示唆されている。動物血液中には数 μ から数十 μ Mのエタノールアミンが存在するが、ラットでは、部分的に肝臓切除して肝細胞の増殖を誘導した時に、血中のエタノールアミン濃度が約2倍に上昇していることが報告されている (Houweling *et al.* 1992)。このことはエタノールアミンが実際に動物体内で増殖促進因子として働くことを想像させ、興味深い。細胞が増殖する時には、当然、膜の産生も盛んに行われるわけで、エタノールアミンは膜リン脂質であるPEの前駆体として必要なのかもしれないが、エタノールアミンとその誘導体がPE合成を変化させることなく、NIH 3T3細胞のDNA合成を促進することも示唆されており (Kiss and Crilly 1996)、リン脂質の前駆体として以外に、エタノールアミン固有の増殖促進作用が存在する可能性もある。動物細胞において、エタノールアミン及びその水溶性誘導体を生じる反応はPSSIIによるリン脂質・塩基交換反応の他に、1) ホスホリパーゼA₂によってPEからリゾPEが生じ、さらにリゾPEからグリセロホスホエタノールアミンが生じる反応、2) ホスホリパーゼCによって、PEからホスホエタノールアミンが生じる反応、3) ホスホリパーゼDによってPEからエタノールアミンが生じる反応、4) CDP-エタノールアミン経路によるPE合成の逆反応、5) スフィンゴシンからホスホエタノールアミンを生じる反応が挙げられるが、血中のエタノールアミンがどの経路に由来しているのかはわかっていない。PSSII欠損マウスの解析が、動物体内のエタノールアミンの産生経路としてのPSSIIの寄与についても明確な答えを与えてくれるものと期待される。現在、PSSII欠損マウスを作成中であるが、そのようなマウスが得られたならば、成長時にエタノールアミンを要求するかどうか、また、部分的肝臓切除時の肝臓再生等の組織再生現象に変化が認められるかを調べてみたい。

参考文献

- Ansell, G. B., Hawthorne, J. N., and Dawson, R. M. C. (1973) in : BBA Library vol. 3: *Form and function of phospholipids*, pp. 446, Elsevier scientific publishing company, Amsterdam.
- Atkinson, K. D., Jensen, B., Kolat, A. I., Storm, E. M., Henry, S. A., and Fogel, S. (1980) *J. Bacteriol.* **141**, 558-564.
- Bell, R. M., and Burns, D. J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 4661-4664.
- Bremer, J., Figard, R. H., and Greenberg, D. M. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* **43**, 477-488.
- Bühel, D. E., Gronenborn, B., and Müller-Hill, B. (1980) *Nature* **283**, 541-545.
- Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917.
- Borkenhagen, L. F., Kennedy, E. P., and Fielding, L. (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, PC28-PC30.
- Cooperstein, S. J., and Lazarow, A. (1951) *J. Biol. Chem.* **189**, 665-670.
- Coracci, G., Blomstrand, C., Arienti, G., Hamburger, A., and Porcellati, G. (1973) *J. Neurochem.* **20**, 1167-1180.
- Daum G. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **822**, 1-42.
- Dils, R. R., and Hübscher, G. (1959) *Biochim. Biophys. Acta* **32**, 293-294.
- Dils, R. R., and Hübscher, G. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* **46**, 505-513.
- Diringer, H. (1973) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **354**, 577-582.
- Ellingson, J. S., and Seenaiah, B. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1213**, 113-117.
- Emmelot, P. (1977) in: Mammalian cell membranes vol. 2: *The diversity of membranes*, pp. 1-54, Butterworths, London.
- Esko, J. D., and Raetz, C. R. H. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 1190-1193.
- Esko, J. D., and Raetz, C. R. H. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 5192-5196.
- Esko, J. D., Wermuth, M. M., and Raetz, C. R. H. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 7388-7393.
- Gaiti, A., De Medio, G. E., Brunetti, M., Amaducci, L., and Porcellati, G. (1974) *J. Neurochem.* **23**, 1153-1159.

- Ghosh, S., Xie, W. Q., Quest, A. F. G., Mabrouk, G. M., Strum, J. C., and Bell, R. M. (1994) *J. Biol. Chem.* **239**, 10000-10007.
- Harlow, E., and Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Houweling, M., Tijburg, L. B. M., Vaartjes, W. J., and van Golde, L. M. G. (1992) *Biochem. J.* **283**, 55-61.
- Hübscher, G., Dils, R. R., and Pover, W. F. R. (1959) *Biochim. Biophys. Acta* **36**, 518-528.
- Hübscher, G. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 555-561.
- Jungalwara, F. B., Evans, J. E., and McCluer, R. H. (1984) *J. Lipid. Res.* **25**, 738-749.
- Kanfer, J. N. (1972) *J. Lipid. Res.* **13**, 468-476.
- Kanfer, J. N. (1980) *Can. J. Biochem.* **58**, 1370-1380.
- Kano-Sueoka, T., and Errick, J. E. (1982) in: Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation vol. 9: *Growth of Cells in Hormonally Defined Media*, pp. 729-740, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Kennedy, E. P., and Weiss, S. B. (1956) *J. Biol. Chem.* **222**, 193-214.
- Kiss, Z., and Crilly, K. S. (1996) *FEBS Lett.* **381**, 67-70.
- Kuge, O., Nishijima, M., and Akamatsu, Y. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 1926-1930.
- Kuge, O., Nishijima, M., and Akamatsu, Y. (1986a) *J. Biol. Chem.* **261**, 5790-5794.
- Kuge, O., Nishijima, M., and Akamatsu, Y. (1986b) *J. Biol. Chem.* **261**, 5795-5798.
- Kuge, O., Akamatsu, Y., and Nishijima, M. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **986**, 61-69.
- Kuge, O., Nishijima, M., and Akamatsu, Y. (1991a) *J. Biol. Chem.* **266**, 6370-6376.
- Kuge, O., Nishijima, M., and Akamatsu, Y. (1991b) *J. Biol. Chem.* **266**, 24184-24189.
- Kuge, O., K., Saito, K., Kojima, M., and Nishijima, M. (1996) *Biochem. J.* **319**, 33-38.
- Kuge, O., Saito, K., and Nishijima, M. (1997a) *J. Biol. Chem.* **272**, 19133-19139.
- Kuge, O., and Nishijima, M. (1997b) *Biochim. Biophys. Acta* **1348**, 151-156.

- Kuge, O., Hasegawa, K., Saito, K., and Nishijima, M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 4199-4203.
- Kuroda, S., Ohtsuka, T., Yamamori, B., Fukui, K., Shimizu, K., and Takai, Y. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 14680-14683.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
- Lewis, W. H., Srinivasan, P. R., Stokoe, N., and Simonovitch, L. (1980) *Somat. Cell Genet.* **6**, 333-347.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Mann, K. G., Jenny, R. J., and Krishnaswamy, S. (1988) *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 915-956.
- Matsumoto, K. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1348**, 214-227.
- Marggraf, W.-D., and Anderer, F. A. (1974) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **355**, 1299-1304.
- Miyake, J., Ochiai Yanagi, S., Kasumi, T., and Takagi, T. (1978) *J. Biochem.(Tokyo)* **83**, 1679-1686.
- Murakami, H., Masui, H., Sato, G. H., Sueoka, N., Chow, T. P., and Kano-Sueoka, T. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 1158-1162.
- Nakagawa, Y., Sugiura, T., and Waku, K. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **833**, 323-329.
- Nelson, C., Moffat, B., Jacobsen, N., Henzei, W., Stults, J. T., King, K. L., Mcmurtrey, A., Vandlen, R., and Spencer, S. A. (1996) *Exp. Cell Res.* **229**, 20-26.
- Nikoloff, D. M., and Henry, S. A. (1991) *Annu. Rev. Genet.* **25**, 559-583.
- Nishijima, M., Kuge, O., Maeda, M., Nakano, A., and Akamatsu, Y. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 7101-7108.
- Nishijima, M., Kuge, O., and Akamatsu, Y. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 5784-5789.
- Nordlie, R. C., and Arion, W. (1966) *Methods Enzymol.* **9**, 619-625.
- Ohtsuka, T., Nishijima, M., Suzuki, K., and Akamatsu, Y. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22914-22919.

- Patton, G. M., Fasulo, J. M., and Robins, S. J. (1982) *J. Lipid. Res.* **23**, 190-196.
- Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. A., Jahn, R., and Südhof, T. C. (1990) *Nature* **345**, 260-263.
- Platt, N., da Silva, R. P., and Gordon, S. (1998) *Trends Cell Biol.* **8**, 365-372.
- Porcellati, G., Arienti, G., Pirotta, M., and Giorgini, D. (1971) *J. Neurochem.* **18**, 1395-1417.
- Puck, T. T., Cieciura, S. J., and Robinson, A. (1958) *J. Exp. Med.* **108**, 945-955.
- Raetz, C. R. H., Wermuth, M. M., McIntyre, T. M., Esko, J. D., and Wing, D. C. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 3223-3227.
- Raetz, C. R. H. (1986) *Annu. Rev. Genet.* **20**, 253-295.
- Rouser, G., Siakotos, A. N., and Fleischer, S. (1966) *Lipids* **1**, 85-86.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sasaki, H., Kume, H., Nemoto, A., Narisawa, S., and Takahashi, N. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 7320-7325.
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P., and Haslett, C. (1993) *Immunol. Today* **14**, 131-136.
- Schroit, A. J., and Zwaal, R. F. A. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1071**, 313-329.
- Sigal, C. T., Zhou, W., Buser, C. A., McLaughlin, S., and Resh, M. D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 12253-12257.
- Siminovitch, L. (1976) *Cell*, **7**, 1-11.
- Snoek, G. T., Feijen, A., Hage, W. J., van Rotterdam, W., and de Laat, S. W. (1988) *Biochem. J.* **255**, 629-637.
- Suzuki, T. T., and Kanfer, J. N. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 1394-1399.
- Takamura, H., Kasai, H., Arita, H., and Kito, M. (1980) *J. Lipid. Res.* **31**, 709-717.
- Taniguchi, H., and Manenti, S. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 9960-9963.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350-4354.

Vance, D E. (1996) in : New Comprehensive Biochemistry vol. 31: *Biochemistry of lipids, lipoproteins, and membranes*, pp. 153-181, Elsevier scientific publishing company, Amsterdam.

Vance, J. E. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 7248-7256.

Voelker, D. R. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 2669-2673.

Warnock, D. E., Roberts, C., Lutz, M. S., Blackburn, W. A., Young, W. W., Jr., and Baenziger, J. U. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 10145-10153.

Yamashita, S., and Nikawa, J. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1348**, 228-235.

謝辭

李慶遠

李慶遠

稿を終えるに当たり、懇切丁寧なる御指導を賜りました国立感染症研究所細胞化学部長、西島正弘博士、生体膜解析室室長、久下 理博士、並びに前細胞化学部長（現明治製菓株式会社薬品総合研究所所長）、赤松 稔博士に深く感謝致します。西島正弘博士は、私が国立感染症研究所に入所後、PS代謝の研究に取り組むきっかけを与えて下さり、以来今日まで、研究生活を全ての面で支えて下さいました。久下 理博士には、日々の実験の指導とディスカッション、そして論文の執筆に至るまで、細かなご配慮を頂きました。そして、赤松 稔博士は私を感染研に招いて下さり、在職中も退職後の今日も、暖かなご支援、ご助言を下さいました。こうしてPS代謝を学位論文の研究課題とする機会に恵まれましたのも、これら3名の先生方なしにはあり得ず、本当に心より御礼申し上げます。

前国立感染症研究所細胞化学部細胞機能室室長、榎原祥公博士からは研究者としての姿勢について多くのことを学ばせて頂きました。さらに、博士は研究論文執筆に際し、多くの貴重な示唆を与えて下さいました。心より、感謝を申し上げます。

本研究は全て国立感染症研究所細胞化学部で行ったものであり、当部に在籍されます諸先生方のご指導、ご鞭撻を賜りましたことに、深謝致します。当部の細胞機能室長、花田賢太郎博士には研究進行上、並びに論文執筆にあたり、ご助言を頂きました。また、当部の前研究協力員（現大正製薬株式会社創薬研究所）山元久典博士からは実験技術面でご援助を頂きました。

私が生化学の分野に進むきっかけを与えて下さったのは、東京大学薬学部発生細胞化学教室教授、名取俊二博士です。先生には生化学の基本を教わり、さらに感染研での研究の機会、学位取得の機会を与えて頂きました。本当にありがとうございました。

最後に、私の全てを支えてくれた家族に感謝します。

1998年 10月9日

齊藤 恭子

