

アラキドン酸高親和性を示す新規誘導型ホスホリパーゼA₂
に関する研究

高山喜好

①

アラキドン酸高親和性を示す新規誘導型ホスホリパーゼA2
に関する研究

平成3年度進学 高山喜好

指導教官 井上圭三

目次

第1章	はじめに	3
第2章	60 kDa ホスホリパーゼA ₂ の発見	10
	2-1	はじめに
	2-2	材料と方法
	2-3	実験結果
	2-4	考察
第3章	60 kDa ホスホリパーゼA ₂ の精製と性状解析	34
	3-1	はじめに
	3-2	材料と方法
	3-3	実験結果
	3-4	考察
第4章	生体内での60 kDa ホスホリパーゼA ₂ 様酵素の発現	52
	4-1	はじめに
	4-2	材料と方法
	4-3	実験結果
	4-4	考察

5-1 はじめに

5-2 材料と方法

5-3 実験結果

5-4 考察

第6章 まとめ

78

参考文献

80

謝辞

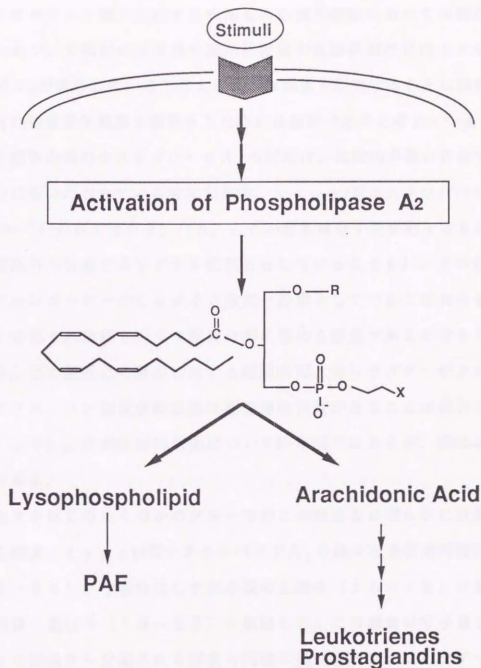
第1章 はじめに

プロスタグランジンは1930年、アメリカの産婦人科医クルツクによって偶然発見された物質である。その本体がエイコサポリエン酸に由来する5員環をもつ化合物であることが明らかにされて以来、同じエイコサポリエン酸に由来する生理活性物質が次々と発見され構造が解明され、トロンボキサン、ロイコトリエン、プロスタサイクリン、リボキシン、ロイコトキシシン等と命名された。一方、1972年、ベンベニストらはIgEで感作したウサギの好塩基球細胞を抗原で刺激した培養上清中に血小板を活性化する因子、血小板活性化因子(PAF)を発見した。その後、1980年にこの因子が1- α -アルキル-2-アセチル-グリセロホスホコリンであることが明らかになった1)。

これら“脂質性生理活性物質”は、生体内においてはホルモン等の生理活性物質と比較して極めて微量で生体に様々な反応を及ぼすことが知られている。またこれらの物質は、恒常的に産生されるのではなく、生体の様々な生理的状况に応じて産生され、その産生機構は極めて複雑に制御されていると考えられている。一方でこれら脂質性生理活性物質の産生異常(産生増加、産生低下)と様々な疾患との関連が報告されており、医薬品等の開発という点に於ても脂質性生理活性物質は、注目されている2)。

ところでこれら脂質性生理活性物質の前駆体であるリゾリン脂質やエイコサポリエン酸(アラキドン酸)は細胞内に於て遊離型では殆ど存在せず、生体膜構成成分の一つであるグリセロリン脂質の2位のエステル結合をホスホリパーゼA₂が加水分解することにより遊離される

Generation of Lipid Mediator in Variety of Cells and Tissues by Extracellular Stimuli



(図1)。また、ホスホリパーゼCの作用によりリン脂質から生成したジアシルグリセロールからジアシルグリセロールリパーゼによって、エイコサポリエン酸が生成する経路もある種の細胞においては報告されているが、大部分の脂質性生理活性物質の前駆体産生にはホスホリパーゼA₂が関与していると考えられ、本酵素を研究することは脂質性生理活性物質産生機構を解明するためには重要であると考えている。

高等動物由来のホスホリパーゼA₂の研究は、比較的少量に存在する脾液に見いだされている分泌型酵素、type I型ホスホリパーゼA₂について行われてきた(3) - (5)。この酵素は分子量が約14 kDaで、細胞外へ分泌するシグナル配列を有していること(6)、その活性発現にmMオーダーのCa²⁺イオン濃度を必要としていることから細胞外に分泌され食餌中のリン脂質分解に関わる酵素であると考えられている。ごく最近この酵素に対する細胞表面上のレセプターがクローニングされ、リン脂質分解以外に細胞増殖活性があることが報告された(7) - (9)。その生理的意義については不明ではあるが、興味ある知見である。

当教室をはじめいくつかのグループがこの酵素とは明らかに性質の異なる酵素、type II型ホスホリパーゼA₂を様々な炎症局所浸出液(10 - 15)、や活性化した血小板の上清中(16 - 18)に見出し精製、遺伝子(19 - 22)を単離した。この酵素は分子量14 kDaで脾液から分泌される酵素と同様に活性発現にmMオーダーのCa²⁺イオン濃度を必要とする。血小板に於いては本酵素は分泌顆粒のひとつである α 顆粒に貯留されておりPAF、トロンビン、コラーゲン等の細胞外刺激により分泌される(16)。また炎症性サイトカインであるTNF(腫瘍壊死因子)(23 - 28)、インターロイキン

1 (29-30)、インターロイキン6 (25) あるいはLPS (リポポリサッカライド) (31) 等の細胞外の刺激により遺伝子発現が誘導され細胞外への分泌が促進されていることが報告されており、本酵素が炎症局所に於いて炎症反応増悪化や脂質性生理活性物質の産生に関与していると考えられている。また村上らは、肥満細胞に細胞外からII型PLA₂を添加すると脱顆粒反応が惹起されることを見出した。

I型、II型ホスホリパーゼA₂はアミノ酸の1次構造約30%程度の類似性があるが(19-21)、これらとは全く構造上、相同性を認められない分子量85kDaの酵素、細胞質ホスホリパーゼA₂ (cytosolic PLA₂; cPLA₂)が発見された。私は修士課程に於いてこの酵素をヒトの血小板から精製しその性状を明らかにした。その後この酵素は様々な動物の血小板(33-34)ほか、単球系白血病株U937細胞(34-35)、マクロファージ(36-37)、様々な臓器中(38-39)に発現していることが明らかになった。cPLA₂にはいくつかの特徴的酵素学的性質がある。第一の性質として本酵素がアラキドン酸含有基質を極めて選択的に加水分解することである。これは、14kDaホスホリパーゼA₂には無い性質である。第二の性質として活性発現には μ MオーダーのCaイオンで活性化できることである。これは血小板をはじめとする多くの細胞で細胞外の刺激により本酵素が細胞内で活性化できることを示している。さらにその一次構造の解析(34-35)からcPLA₂には、protein Kinase C γ 等が持っているCALBドメインをそのN末端付近に有しておりCa依存的に細胞質から細胞膜上へと移行することが報告されている。さらにcPLA₂はMAPキナーゼによるセ

リン残基のリン酸化のコンセンサス配列を有しており、リン酸化され活性調節されることが報告されている(40-41)。これらの結果よりcPLA2が細胞外の刺激に応答したアラキドン酸代謝物産生反応に関わる酵素としてにわかに注目されるようになった。

脂質性生理活性物質産生にかわりうるホスホリパーゼA2について酵素学的、遺伝生化学的知見の蓄積がなされているが、実際のところ様々な状況に於いていずれのホスホリパーゼA2が関わるのかについての明確な証明がなされていないのが現状である。血小板をはじめ多くの細胞においてはさきに述べた2種類のホスホリパーゼA2(II型、cPLA2)が共存している。ごく最近Dennisらは、マウスマクロファージ様細胞株P388細胞にLPSで刺激した時のプロスタグランジン産生が、14kDaII型ホスホリパーゼA2のアンチセンスDNAを共存させたときに抑制することを報告し、LPS刺激によるプロスタグランジン産生にはII型ホスホリパーゼA2が関与することを示したが(42)、こうした報告は極めて少ないのがホスホリパーゼA2研究の現状である。

私は、こうした状況の中でサイトカイン刺激によるプロスタグランジン産生に関心を持って研究を始めた。ホスホリパーゼA2の詳細な酵素学的研究がなされる以前よりTNF, IL-1, IL-6をはじめとするサイトカインは、様々な細胞に対してプロスタグランジン産生を促すことが知られており(43)(表2)、サイトカインによるホスホリパーゼA2、シクロオキシゲナーゼ等の活性化が予想されてきた。またTNFが細胞傷害活性を発揮するときホスホリパーゼA2の活性化が必要であることが古くから報告されていた(44-47)。私はサイトカインのうちTNFに注目して、いかなるホスホリパーゼ

高等動物由来ホスホリパーゼA₂の性状

性状	精製ホスホリパーゼA ₂		
	14kDa type I PLA ₂	14kDa type II PLA ₂	85kDa cPLA ₂
基質特異性	PE, PC	PE, PS	アラキドン酸含有PE, PC
Ca ²⁺ 要求性	mM	mM	< μM
主な存在部位	唾液	炎症渗出液	血小板等の細胞質
主な生理的役割	消化	炎症反応の増悪化 肥満細胞の脱顆粒反応	刺激関連反応での アラキドン酸カスケード作動

サイトカインによるプロスタグランジンの産生

	細胞	プロスタグランジン
TNF	ヒト皮膚繊維芽細胞	PGE ₂
	ヒト肺繊維芽細胞	PGE ₂
	ヒト滑膜細胞	PGE ₂
	ヒト血管内皮細胞	PGI ₂
	ヒト腎糸球体尿管膜細胞	PGE ₂
	イヌ腎上皮細胞 (MDCK)	PGI ₂
	マウス腹腔マクロファージ	PGE ₂
	マウス骨芽細胞 (MC3T3-E1)	PGE ₂
	ラット尿管膜細胞	PGE ₂
		PGI ₂
IL-1	ヒト皮膚繊維芽細胞	PGE ₂
	ヒト肺繊維芽細胞	PGE ₂
	ヒト滑膜細胞	PGE ₂
	ヒト血管内皮細胞	PGI ₂
	ヒト血管平滑筋細胞	PGE ₂
	ヒト腎糸球体尿管膜細胞	PGE ₂
	イヌ腎上皮細胞 (MDCK)	PGI ₂
	マウス繊維芽細胞 (Swiss3T3)	PGE ₂
	ウサギ軟骨細胞	PGE ₂

A2が活性化するか、またその活性化機構を明らかにするために研究を始めた。その過程で私は、既知の酵素とは異なる酵素を発見した。以下の章では、その発見の経緯、精製、性状解析について報告する。

第2章 TNF刺激による85 kDa cPLA2の低下と新規60 kDaホスホリパーゼA2の発現

2-1 序

本章ではラット胎児由来繊維芽細胞株由来3Y1細胞(図2)を用いてTNF刺激による細胞内ホスホリパーゼA2の変化について酵素学、遺伝生化学的手法を用いて調べた。3Y1細胞は九州大学木村らが樹立した細胞株(85)であり、様々な因子の形質転換能を調べるのに汎用される細胞です。本研究で3Y1細胞を用いた理由は、(1)この細胞がきわめて正常細胞に近く、接着阻止、血清依存的である。(2)当研究室では、ラット由来の既知のホスホリパーゼA2に対する抗体、遺伝子を有している。(3)他の繊維芽細胞と比較してホスホリパーゼA2活性が高い。(4)本細胞株には、多彩な形質転換細胞(癌遺伝子過剰発現細胞、温度感受性細胞)株が樹立されている等があげられる。私が研究を始めた当初、繊維芽細胞中のホスホリパーゼA2に関する酵素学的(どんなアイソザイムが存在するかなど)検討については、殆どなされていないのが現状であった。

(図2)

2-2 材料と方法

2-2-1 材料

ラット胎児由来繊維芽細胞株3Y1細胞は、国立予防衛生研究所上原博士より御供与して頂いた。DMEMは、日水製薬（東京）より購入した。ウシ胎児血清（fetal calf serum）はCell Culture Laboratories（Ohio, USA）より購入した。ヒトリコンビナントTNF α は、大日本製薬（大阪）より御供与して頂いた。1-palmitoyl-2-[¹⁴C]-arachidonoyl-glycerophosphoethanolamineは、NENより購入した。抗マウスイムノビーズはバイオラド（USA）より購入した。

2-2-2 細胞培養

fisherラット胎児由来繊維芽細胞株3Y1細胞並びに3Y1癌遺伝子過剰発現細胞株の培養は10%（v/v）FCS-DMEM培養液中で5%CO₂下で行った。通常の培養は0.2x10⁴-2x10⁴ cells/cm²で行った。継代は、0.25% trypsin-5mM EDTA溶液で細胞を剥し、新鮮な培養液を添加してトリプシンを不活性化した。TNF等で刺激する場合はさらに飽和状態（5x10⁴ cells/cm²）まで培養した。

2-2-3 TNFによる細胞の刺激

飽和状態まで培養した細胞をPBS（-）で洗浄のちヒトリコンビ

ナントTNF α を特に指定しない場合以外は1000u/ml濃度で添加しさらに14時間培養した。

2-2-4 ホスホリパーゼA₂活性測定のための酵素源の調製
刺激細胞をトリプシン-EDTA溶液で回収し、250mM sucrose, 10mM Tris-HCl (pH7.4), 1mM EDTA (SET溶液)に懸濁して4℃で3000rpm、5分間遠心して洗浄した。最終濃度が10⁷ cells/ml程度になるようSET溶液に再懸濁した。細胞懸濁液をBransone社製のソニケターで強度20で10秒x6回超音波処理した。超音波処理した溶液を4℃で3000rpm、5分間遠心した上清を酵素源とした。

2-2-5 ホスホリパーゼA₂の活性測定法
ホスホリパーゼA₂活性は100mM Tris-HCl緩衝液 pH 9.0, 4mM Ca₂Cl, 0.1% Bovine serum albumin (essential fatty acids free), 2 μ M 1-palmitoyl-2-[¹⁴C]-arachidonoyl-glycerophosphoethanolamine (52mCi/nmol)を含む反応液250 μ l中で測定した。37℃で25分間測定した後、Dole試薬(isopropanole:heptane:1N H₂SO₄=78:20:2)1.25mlを加えて反応を停止した。Doleの変法に従い溶媒分画により遊離放射標識脂肪酸を抽出して、液体シンチレーション溶液と混合してBeckmanカウンターで放射活性を測定した(86)。

2-2-6 蛋白質定量

蛋白質定量はBCAキット (Pierce社製、USA) を用いて測定した。スタンダードとしてBovine serum albuminを用いた。

2-2-8 ノーザンプロット解析

(1) total RNAとpolyA (+) RNAの調製 RNAの調製にはAGPC法を用いて回収した。細胞を回収して無菌PBS (-) で1回洗浄した後、Solution D液*¹に500 μ l / 10⁷ cellsの割合で懸濁した。細胞懸濁液をポリトロンで強度5で約1分間処理をした。本液に50 μ lの2Mの酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4)、500 μ lのDEPC (diethylpercarbonate) 処理フェノール、クロロホルム：イソアミルアルコール (49:1) 溶液を順次添加した後、30秒間激しく混合した。

*1 Solution D液の組成 (調製後1ヶ月以内に使用)

Stock solution*² 50 ml
2-メルカプトエタノール 0.36 ml

*2 Stock solutionの組成

DEPC-treated Water 58.6 ml
Guanidinium thiocyanate 50 g
0.75M Sodium citrate (pH7.0)
3.52 ml
10% sarcosyl 5.28 ml

を混合して、65℃、30分反応させ遮光保存した。

氷上で15分間静置後、4℃、8000 x gで15分間遠心した。2相に分離した上清を回収して等量のイソプロピルアルコールを加えて-20℃で5時間放置した4℃、8000 x gで15分間遠心した。沈澱物を回収してSol. D液200 μ lに溶かして等量のイソプロピルアルコールを加えて-20℃で1時間放置した。4℃、8000 x gで15分間遠心した。沈澱物を回収しDEPC処理H₂Oに200 μ lに溶かしこれをtotal RNA画分とした。濃度は、OD₂₆₀より算出した。total RNA画分をエタノール沈澱したのち10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.1% SDS溶液(以下elution溶液)にRNA500 μ g当り100 μ lの割合で溶解した。RNA溶液にoligo t e x d T 30 (第一化学)懸濁液500 μ lを添加し混合した。この混合液を65℃で5分間処理した後、氷上で急冷した。本液に66 μ lの5M NaCl溶液を加え37℃で15分間処理した。室温、卓上遠心機で8000 x gで5分間遠心して上清を除去した。沈澱物を300 μ lのelution溶液に再懸濁した。65℃で5分間処理した後、室温、8000 x gで5分間遠心して上清を回収した。上清を再度遠心した後エタノール沈澱して適量のDEPC未処理オートクレーブH₂OにRNAを溶解し、これをpoly A (+) RNA画分とした。

(2)ラット85 kDacPLA₂ プロープの作成

4 μ l、5x逆転写反応緩衝液(BRL、USA)、2 μ l、1

0 mM dNTP混合液 (ファルマシア)、 $2 \mu\text{l}$ 、1% BSA (BRL)、 $2 \mu\text{l}$ 、1.6 mg/ml dT primer (ファルマシア)、 $1 \mu\text{l}$ 、RNasin (Promega, USA)、 $2 \mu\text{l}$ 、DTT (BRL) を含むRNA逆転写反応液中に 65°C 、5分間、 0°C 、2分間で処理をしたpolyA (+) RNA、 $1 (\mu\text{g} / 7 \mu\text{l})$ 、MOMLV由来RNA逆転写酵素 (BRL)、 $200 (\text{unit} / \mu\text{l})$ を加えて 37°C 、1時間反応させ、1本鎖cDNAを作成した。逆転写反応液は、 $4 \mu\text{l}$ ずつ分注して -80°C に保存した。

$4 \mu\text{l}$ 、逆転写反応液、 $10 \mu\text{l}$ 、 $10 \times$ PCR用緩衝液 (宝酒造)、 $2 \mu\text{l}$ 、10 mM dNTP (dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、 $7 \mu\text{l}$ の85 kDacPLA₂ 用PCRプライマー (センス; atggctcccgaacttatttgga (humam cPLA2: 1087-1107 アンチセンス; caaaggagacagtgga taaga (humam cPLA2: 1521-1501)) $1 \mu\text{l}$ 、Taqポリメラーゼ (ロッシュ、スイス)、 $76 \mu\text{l}$ 、dH₂Oを含むPCR溶液を、 92°C 、5分間処理後、(92°C 、1分、 51°C 、2分、 72°C 、3分) のサイクルを40回行って、 72°C 、10分反応させて徐冷した。PCR反応物を1.0%低融点アガロース (宝酒造) にて電気泳動を行い回収した。回収したPCR産物をbluntingキット (宝酒造) により平滑末端化した。平滑末端化断片をT4 kinase (ファルマシア) で処理をした。このPCR産物をPTZ 19R-Sma I消化に組替え大腸菌JM109に組み込みクローニングした。本ベクターからEcoRI、BamHIにより切り出した断片をラット85 kDacPLA₂の遺伝子プローブとした。

(3)ラット14 kDa II型PLA₂ プロープの作成 当教室、駒田らがラット巨核球のcDNAライブラリーより単離したcDNA (21)を用いた。

(4)遺伝子プロープの放射標識化

放射標識化プロープの作成には、ニックトランスレーションキット(宝酒造)を用いて行った。25 μ l、cDNA溶液、4 μ l、10x反応緩衝液、10 μ l、dCTP (111TBq/mM)、1 μ l、酵素溶液(DNase I、DNA polymerase)を含む反応液を15 $^{\circ}$ C、2時間処理をした後、5 μ lの反応停止液を添加して70 $^{\circ}$ C、5分間で酵素を失活させた。反応液をSephadex G50 (ファルマシア、スエーデン) 3mlのゲル濾過カラムクロマトグラフィーで未反応dCTPと放射標識プロープを分離した。この方法での比活性は 1×10^8 cpm/ μ g DNA以上であった。

(5)電気泳動とノーザンブロット解析

total RNA,あるいはpoly A (+) RNA、4.5 μ l (total RNAで20-30 μ g、poly A (+) RNAで5-10 μ g)とsample buffer (2 μ l、10xMOPS緩衝液、10 μ l、ホルムアミド、3.5 μ l、ホルムアルデヒド、3 μ l、dye)を混合して65 $^{\circ}$ C、5分間、0 $^{\circ}$ C、2分間処理をした。このサンプルをMOPS緩衝液(10 mM MOPS、pH 7.0、1 mM EDTA)、2% (v/v)ホルムアルデヒドを含む0.8%アガロース中で電気泳動を行った。電気泳動終了後、0.5 μ g

／mlのエチジウムブロミド溶液でゲルを5分間、染色したのち、2 x SSC (20 x SSC; 3M NaCl, 0.3M クエン酸3ナトリウム2水和物)で15分間ずつ、3回処理した。20 x SSCによりキャピラリートランス法でBIODINE B (PAL L社製, USA) メムブレンに10時間程度かけてトランスファーした。トランスファー後のメンブレンを2 x SSCで3分間洗浄の後、UVクロスリンカーにてクロスリンクした。メンブレンを予め65℃で30分間処理をしたプレハイブリダイゼーション液 (組成: 6 x SSC、50% ホルムアミド、5 x デンハルト溶液 (100 x デンハルト溶液: 2% <w/v> ficol, 2% <w/v> BSA, 2% <w/v> ポリビニルピロリドン-40)、25 mM リン酸緩衝液 pH7.0、0.1% SDS、0.2 mg/ml サケ精子DNA) 中で42℃で4時間以上放置した。その後、予め65℃で30分間処理をしたハイブリダイゼーション液 (組成: 6 x SSC、50% ホルムアミド、5 x デンハルト溶液 (100 x デンハルト溶液: 2% <w/v> ficol, 2% <w/v> BSA, 2% <w/v> ポリビニルピロリドン-40)、20 mM リン酸緩衝液 pH7.0、0.1% SDS、0.1 mg/ml サケ精子DNA、10 ng/ml、放射線標識プローブ) 中で42℃で12時間以上放置した。メンブレンの洗浄は、2 x SSC-0.1% SDS溶液で65℃、30分 x 2回、0.1 x SSC-0.1% SDS溶液で65℃、30分間行った。メンブレンは、イメージアナライザーBAS2000 (富士写真、東京)、あるいはオートラジオグラフィーにより解析した。

2-2-9 未刺激3Y1細胞とTNF刺激3Y1細胞のSuper

ose 12 FPLCカラムクロマトグラフィー

10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTAで平衡化したSuperose 12 FPLCに未刺激3Y1細胞、800 μ gとTNF刺激3Y1細胞、400 μ gの細胞質可溶性画分を300 μ lの容量でアプライした。流速0.3 ml/minで溶出した。カラムクロマトグラフィーからの溶出液を0.3 ml/fraction (1分/fraction)の割合で分画した。各フラクションについて2-1-5に示した方法でホスホリパーゼA₂活性を測定した。溶出位置については、バイオラド社製の分子量マーカー(670 kDa、150 kDa、44 kDa、17 kDa、1.7 kDa;)を同一条件下でアプライして決定した。

2-2-11 各種抗体との反応性

(1)抗85 kDa cPLA₂抗体による活性吸収実験: 500 μ lのサンプルチューブでpTBS-0.1% BSA存在下で3Y1細胞、TNF刺激細胞の可溶性画分(100 pmol/hr)と抗ウサギ血小板由来85 kDa cPLA₂抗体RHY4(87)0~30 μ gと2時間、4℃で反応させた。反応液は50 μ lとした。反応後あらかじめTBSで膨潤した抗マウスイムノグロブリンビーズ30 μ lと混合して30分間室温で反応させた。反応後3000 rpm、5分、4℃で遠心して上清60 μ lを酵素源としてホスホリパーゼA₂活性を測定した。表示は抗体0 μ gのときの活性を100%ととして残存活性を示している。

(2) 抗14 kDa II型ホスホリパーゼA₂抗体による活性吸収実験: 500 μ lのサンプルチューブでpTBS-0.1% BSA存在下で3

Y1細胞、TNF刺激細胞の可溶性画分(100 pmol/hr)と抗ラット14 kDa II型ホスホリパーゼA2抗体R377(88)0~60 μgと2時間、4℃で反応させた。反応液は50 μlとした。反応後3000 rpm、5分、4℃で遠心して上清30 μlを酵素源としてホスホリパーゼA2活性を測定した。表示は抗体0 μgのときの活性を100%ととして残存活性を示している。

2-2-12 TNF刺激後のイオノファ刺激によるアラキドン酸代謝物遊離反応

コーニング社製24wellプレートに3y1細胞を飽和状態まで培養の後、2-2-3の方法に従いTNF刺激を行った。刺激終了6時間前に³Hアラキドン酸(Amersham, USA)を0.5 μCi添加してさらに培養した。細胞をPBS-0.1%BSAで洗浄後、1%FCS-DMEM溶液にA23187を最終濃度が2 μM(あるいは0M)になるよう添加して、10分間、37℃で培養した。培養後、培養液と細胞を回収してそれぞれの放射活性を測定した。表示は、取り込まれた放射活性に対する遊離活性の割合(%)で示した。

2-3 結果

2-3-1 TNF, IL-1 刺激による繊維芽細胞株 3Y1 細胞中のホスホリパーゼ A₂ 活性の変動

TNF (1000 u/ml)、でラット胎児由来繊維芽細胞株 3Y1 細胞を 12 時間刺激したところ、それぞれの刺激により細胞内の酵素活性が約 10 倍程度に上昇することが観察された。一方、細胞外の酵素活性は、検出出来なかった。本酵素活性は、その大部分が細胞質可溶性中に回収された。また IL-1 で刺激した場合も同程度の酵素活性上昇が観察された。

2-3-2 TNF 刺激による細胞内のホスホリパーゼ A₂ 活性の経時的変動

3Y1 細胞を 1000 u/ml の TNF で刺激すると図 3 に示すように、刺激後 3 時間目より細胞中のホスホリパーゼ A₂ 活性が上昇することが観察され、14 時間目程度まで酵素活性は上昇した。刺激後 14 時間後のホスホリパーゼ A₂ 活性は未刺激細胞の酵素活性の約 10 倍程度だった。

2-3-3 TNF の用量依存性

刺激時間を 14 時間に固定して、TNF の用量依存性について検討した。その結果、3Y1 細胞中のホスホリパーゼ A₂ を活性化するためには、 10^2 u/ml 以上必要であることが分かった (図 4)。

Fig 3 Effect of TNF-Treatment on Cell-Associated Phospholipase A₂ Activity in Rat 3Y1 Fibroblasts

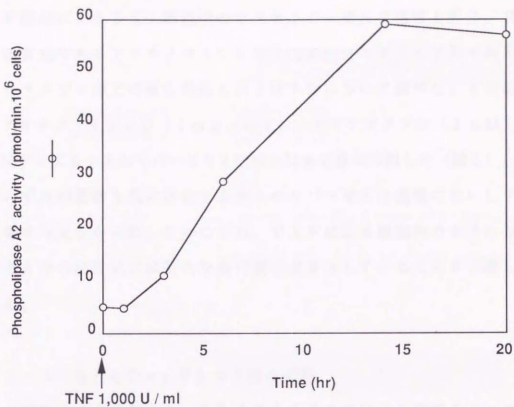
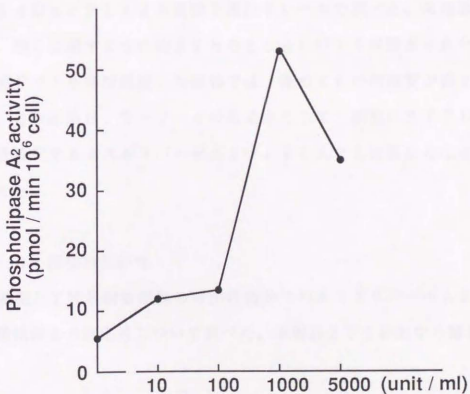


Fig 4 Dose-dependency of TNF



2-3-4 アクチノマイシンDとデキサメタゾンの効果

TNF刺激による3Y1細胞中のホスホリパーゼA2活性上昇に、RNA阻害剤であるアクチノマイシンDと抗炎症性ステロイド剤であるデキサメタゾンがどのような効果をおよぼすかについて調べた。その結果、アクチノマイシンD (1 mg/ml)、デキサメタゾン (1 μ M) でTNFによるホスホリパーゼA2活性上昇を有意に抑制した (図5)。なおいずれの薬物も既に存在するホスホリパーゼA2活性にたいしては影響を与えなかった。このことは、TNFによる細胞内のホスホリパーゼA2の活性化には新たな蛋白質合成を介していることを示唆している。

2-3-5 85 kDacPLA2量の変動

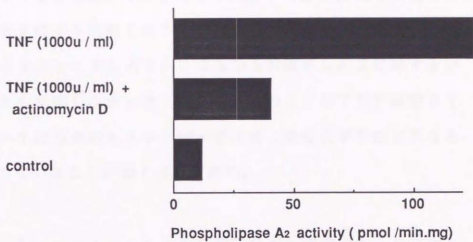
3Y1細胞とラット脳からcPLA2をPCR法により増幅クローニングした。その結果、今回ノーザンプロット解析に用いた断片は、ヒト、マウスとも90%以上の相同性があった。がTNF刺激による85 kDacPLA2の変動を遺伝子レベルで調べた。未刺激細胞では、図6に示すように約3 kbのところにバンドが検出された。一方TNFで10時間刺激した細胞では、極めてその発現量が低下していた。この結果は、2-3-4の結果から3Y1細胞に於てTNFにより活性化するホスホリパーゼA2はcPLA2とは異なることが示唆された。

2-3-6 抗体の反応性

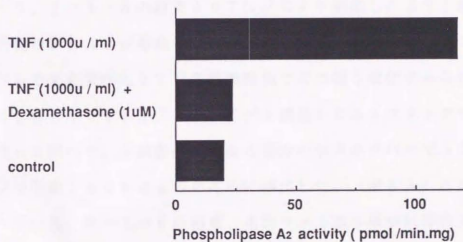
3Y1細胞とTNF刺激細胞の可溶性画分中のホスホリパーゼA2活性の各種抗体との反応性について調べた。未刺激3Y1細胞中の酵素

5 Effect of Actinomycin D and Dexamethasone on Induction of 3Y1 Phospholipase A₂

(A) Actinomycin D

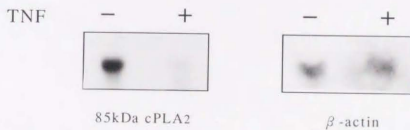


(B) Dexamethasone



6

Decrease in cPLA₂ of TNF-Treated 3Y1 Cells

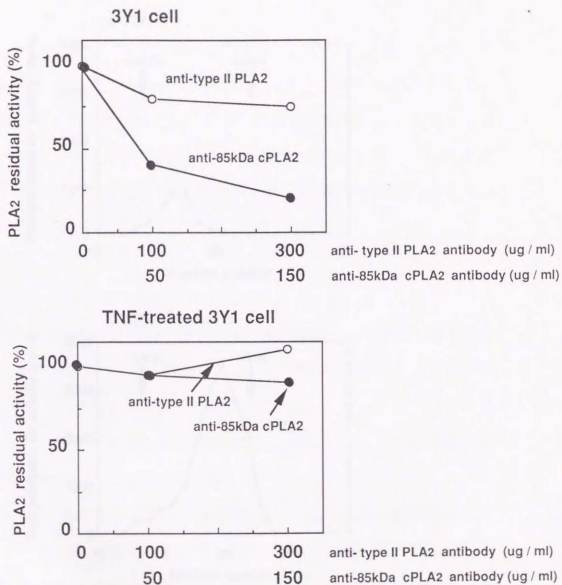


活性のおよそ80%が抗85kDa cPLA2抗体により吸収した。さらに抗14kDa II型PLA2抗体と反応する酵素活性も検出された。一方TNFにより刺激した3Y1細胞可溶性画分の大部分の酵素活性は、85kDa cPLA2、14kDa II型PLA2に対するいずれの抗体とも反応しなかった(図7)。このことはTNF刺激3Y1細胞に於いては既知のホスホリパーゼA2と免疫化学的に異なる酵素が発現していることが強く示唆された。

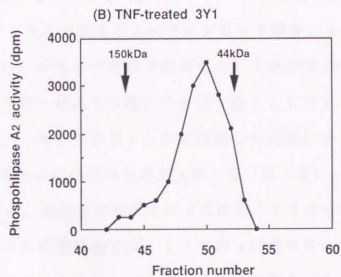
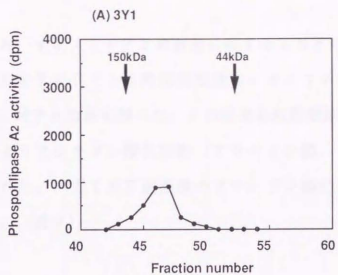
2-3-7 Superose 12 FPLCゲル濾過カラムクロマトグラフィー上における変化

2-3-5、2-3-6の結果よりTNFにより刺激した3Y1細胞中には新規のPLA2が存在する可能性が予想された。そこでタンパク質レベルで未刺激細胞とTNF刺激細胞でどの様な変化がみられるかについてSuperose 12 FPLCゲル濾過カラムクロマトグラフィーを使って調べた。未刺激細胞では大部分のホスホリパーゼA2活性が推定分子量100kDaのところに溶出した。(図8A)この活性は2-3-5、2-3-6の結果、またラット血小板中に存在する85kDa cPLA2の溶出位置とも一致することから、cPLA2由来の酵素活性と結論した。一方TNFで刺激した細胞については、大部分の酵素活性が推定分子量60kDaのところに溶出(図8B)。従って3Y1細胞に於いてTNFにより活性化するホスホリパーゼA2はこの分子量60kDaの酵素であることが予想された。またSuperose 12 FPLCカラムクロマトグラフィーにおいて今回用いた溶出液では、14kDa II型ホスホリパーゼA2は分子量14kDaのところに溶出されず、非常に低分子量のところにきわめて低

7 Immunoreactivity of Phospholipase A2 Activities in 3Y1 and TNF-Treated 3Y1 Cells to Anti-Type II PLA2 Antibody or Anti-85kDa cPLA2 Antibody



8 Superose 12 Column Chromatography of Phospholipase A2 in 3Y1 Cells and TNF-Treated 3Y1 Cells



い回収率で回収されて来るため本実験では検出出来なかった。

2-3-8 イオノフォア2次刺激に対するTNFの効果

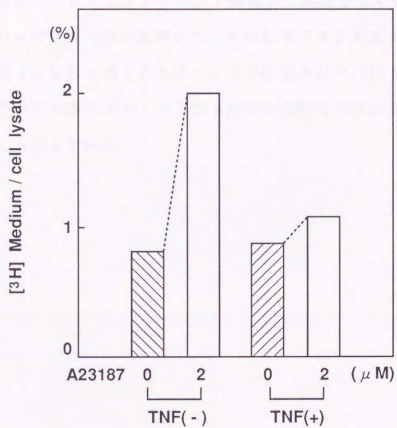
3Y1細胞をTNFで14時間刺激後のイオノフォアA23187、2次刺激に対する効果を調べた。その結果未刺激細胞では、イオノフォア刺激によりアラキドン酸代謝物（アラキドン酸、PGE2）の遊離が観察された。一方TNF刺激後のアラキドン酸代謝物遊離が有為に低下した。（図9）

2-3-9 14kDaII型ホスホリパーゼA2の検出

(1)遺伝子レベルの検出：ノーザンブロット解析により14kDaII型ホスホリパーゼA2の発現を検討した。未刺激細胞では14kDaII型ホスホリパーゼA2の遺伝子を示す約1kbのところにバンドが検出された。一方TNFで10時間刺激した細胞に於いては未刺激細胞と比較して約5倍程度発現量が上昇した（図10）。

(2)酵素学的、免疫化学的手法による検出：10万g細胞質可溶性画分については未刺激細胞では、14kDaII型ホスホリパーゼA2特異抗体に反応するホスホリパーゼA2活性が存在することを示した（図7）。また可溶性画分についてMONOQFPLCカラムクロマトグラフィーを行った結果、100mM NaCl存在下で溶出する画分に酵素活性を確認した（89）。この活性が14kDaII型ホスホリパーゼA2であると予想している。TNF刺激細胞に於いては、遺伝子レベルでは、発現量が上昇しているにも関わらず、ホスホリパーゼA2活性として14kDaホスホリパーゼA2を検出出来なかった。一方細胞培養上清、10万g沈澱画分（膜画分）中には今回用いた酵

图9



素活性測定法ではホスホリパーゼA2活性が検出出来なかった。そこで抗体を用いてウエスタンブロット解析で、膜画分14kDaII型ホスホリパーゼA2の検出を試みた。その結果TNF刺激細胞に於いては分子量14kDaのところにバンドが検出された(図11)。このことはTNF刺激により14kDaII型は細胞内の局在性が変化していることを示している。



图 10

Effect of TNF-treatment on RNA level
of 14kDa β PLA₂ in 3Y1 cell

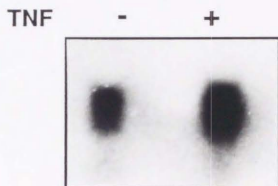
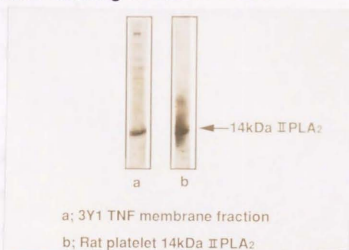


图 11

Western blotting of 14kDa β PLA₂



a; 3Y1 TNF membrane fraction

b; Rat platelet 14kDa β PLA₂

2-4 考察

ラット繊維芽細胞株3Y1細胞中には、85kDa cPLA2が発現していることを酵素化学的、免疫化学的、遺伝生化学的手法を用いて証明した。最近繊維芽細胞に関しては、ヒト肺繊維芽細胞株WI-38細胞(34)、ラット繊維芽細胞株Rat-2細胞中(46)に85kDa cPLA2が遺伝生化学的手法を用いて存在することが報告されている。3Y1細胞をイオノフォア刺激するとアラキドン酸代謝物産生がこう進化した(図9 TNF未刺激細胞)。おそらくこれは、Linらの報告(47)から、cPLA2が活性化(リン酸化、細胞内局在性の変化)することによるものであると予想している。繊維芽細胞中の85kDa cPLA2は、PDGF、ATP、EGFといった蛋白合成を介さない比較的短時間(分単位)の脂質性生理活性物質産生に関わっていると考えている。

一方、3Y1細胞をTNFで刺激すると、時間オーダーで細胞内のホスホリパーゼA2活性が蛋白合成を介して上昇した。おそらくTNF刺激によりホスホリパーゼA2の発現誘導されていると予想している。しかも興味深いことに85kDa cPLA2はTNF刺激により発現抑制されることとがわかった。当初、恒常的に発現していると考えられていた85kDa cPLA2が実は様々な細胞外刺激により遺伝子発現制御されることが他のグループから相次いで報告されるようになった。WI-38細胞(48)、ヒト滑膜由来繊維芽細胞(49)をIL-1で刺激するとcPLA2が発現誘導されることが報告されている。またヒト単球をGM-CSF刺激するとcPLA2の発現

に2相性が見られることが報告されている(50)。さらにTNFで刺激によりHeLa細胞(51)、上皮細胞(52)においてはcPLA₂が遺伝子誘導されることが報告され、これは私の結果と反対のものであった。TNFレセプターを過剰発現した細胞においてはTNF刺激により、cPLA₂の変動は見られないと報告もされている(90)。TNFは、細胞によって全く正反対の性質(細胞障害性、細胞増殖活性)を示すサイトカインであり(53)細胞種によるcPLA₂の発現の違いはそうした状況を反映していると考えている。私はこの細胞種によるcPLA₂の発現の違いをc-mycの発現と結び付けて5章で考察したのでそちらを参照していただきたい。

3Y1細胞をTNFで刺激した場合に活性化するホスホリパーゼA₂は既知のホスホリパーゼA₂とは免疫化学的、酵素化学的に異なる分子量60kDaのホスホリパーゼA₂であることを示した。85kDa cPLA₂の遺伝子が減少することから、60kDaホスホリパーゼA₂は85kDa cPLA₂の蛋白分解酵素や、同一遺伝子からのスプライシングの違いによる産物ではないと予想している。しかもTNF刺激によりイオノフォア刺激に対する反応が低下していることが、60kDaホスホリパーゼA₂は85kDa cPLA₂と異なる酵素の活性制御を受けている可能性を示している。

さらに3Y1細胞では、この2つのホスホリパーゼA₂に加えて14kDa II型ホスホリパーゼA₂が発現していた。II型ホスホリパーゼA₂はTNF刺激により発現が誘導された。この結果は、平滑筋細胞、アストログリア細胞、等の結果と一致した。しかもTNF刺激により発現した酵素は膜画分へと移行擦る可能性を示した(23-28)。村上らは、血管内皮細胞(30)、肝細胞由来BRL細胞(54)を

TNFで刺激した場合のプロスタグランジン産生はこの14kDa II型ホスホリパーゼA2が関与することを特異的阻害を用いて示しており、3Y1細胞においてもその可能性が予想されるが、さらに特異的阻害剤、アンチセンスを用いた実験を行って確かめる必要があると考えている。

第3章 60kDaホスホリパーゼA2の精製と性状解析

3-1 序

第2章で既知のホスホリパーゼA2とは異なる酵素が存在することが明らかになった。そこで本章では、この新規60kDaホスホリパーゼA2の性状と構造を明らかにするために3Y1細胞を大量に培養して精製を試みた。さらに精製品で性状解析を行った。また精製品を用いて一部アミノ酸配列を決定した。

3-2 材料と方法

3-2-1 材料 DEAE-Sephacelイオンカラムクロマトグラフィー、Superose12、MONOQ、CNBr活性化Sephacel、FPLCカラムクロマトグラフィーシステムはファルマシア（スウェーデン）より購入した。Poly プロリン（MW3000）は、シグマより購入した。Phenyl-Toyopearlカラムクロマトグラフィーは東ソー（東京）より購入した。1-palmitoyl-2-[¹⁴C]-linoleoyl-phosphatidylcholine、1-palmitoyl-2-[¹⁴C]-linoleoyl-phosphatidylethanolamineはNENより購入した。1-[¹⁴C]-palmitoyl-2-1

lysophosphatidylcholineはAmershamより購入した。1-palmitoyl-2-lysophosphatidylcholine はフナコシより購入した。その他の試薬は生化学用、特級試薬を用いた。

3-2-2 TNF刺激3Y1細胞からの60kDaPLA₂の精製

(1)酵素源の調製 コーニングT225 (cm²)カルチャーデッシュで90枚分(1×10⁹ cells)のTNF刺激細胞から精製を行った。TNF刺激3Y1細胞を2-2-4の方法で細胞を破壊した。超音波破壊画分を超速心機70-P(日立、東京)で100,000×g、4℃、1時間遠心してえられた可溶性画分を酵素源とした。

(2)DEAE-Sephacelカラムクロマトグラフィー DEAE-Sephacel、75mlをφ2.5cm×20cmのカラム管(バイオラド、USA)に充填した。カラムを20mM Tris-HCl、pH7.4、150mM NaCl、1mM EDTA溶液でカラム容量の5倍量で平衡化した。平衡化後、細胞質可溶性画分を流速30ml/時間でアプライした。全量をアプライ後、平衡化溶液で280nmの吸光度が0.005以下になるまでカラムを洗浄したのち、20mM Tris-HCl、pH7.4、300mM NaCl、1mM EDTA溶液で溶出した。溶出は、280nmの吸光度が0.005以下になるまで行った。なおカラムクロマトグラフィーはすべて4℃で行った。使用後のカラムクロマトグラフィーは、2M NaCl溶液で洗浄の後、30%エタノール溶液で保存し再利用した。非吸着画分、

吸着画分いずれも、5 ml / fraction の割合で分取し、各 fraction の一部分を 280 nm の吸光度測定と、ホスホリパーゼ A₂ 活性測定に用いた。なおホスホリパーゼ A₂ 活性には各 fraction から 10 μ l を酵素源として、測定は 2-2-5 の方法に従った。

(3) ポリプロリンアフィニティーカラムクロマトグラフィーの作成 CN Br 活性化 Sepharose 4B、4 g を 1 mM HCl 中に膨潤して 4℃ で 15 分間静置した。静置後 4℃、750 rpm (クボタ製遠心機) で 30 秒遠心して上清を除去して新たに 1 mM HCl を加えて洗浄、遠心を 3 回行った。洗浄後のゲルに 0.1 M NaHCO₃-0.25 M NaCl 溶液に膨潤した。再度同溶液で洗浄後、ポリプロリン 10 mg/ml を含む 10 ml の 0.1 M NaHCO₃-0.25 M NaCl 溶液にゲルを再膨潤した。これを 4℃ で回転しながら 12 時間以上ゲルとポリプロリンとを反応させた。反応後、遠心して上清を除去して 1 M エタノールアミン (pH 8.0) 10 ml に再膨潤して、室温で回転させながらゲルを 2 時間かけてブロッキングした。遠心後して上清を除去して 0.1 M Tris-HCl、pH 8.0-0.25 M NaCl 溶液にゲルを膨潤した。ゲルを ϕ 1.5 cm x 20 cm のカラム管 (バイオラド) に充填した。充填後、カラムを 0.1 M 酢酸緩衝液、pH 4.0-0.25 M NaCl 溶液と 0.1 M Tris-HCl、pH 8.0-0.25 M NaCl 溶液とで交互に洗浄し、最後に 10 mM Tris-HCl、pH 7.4、150 mM NaCl 溶液で平衡化して保存した。

(4) フェニルルートヨバールカラムクロマトグラフィー フェニルルートヨ

パール、50 ml を $\phi 2.5 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$ のカラム管 (バイオラド、USA) に充填した。さらにプレカラムとして(3)で作製した、ポリプロリンカラムクロマトグラフィーを接続した。カラムを 20 mM Tris-HCl、pH 7.4、800 mM NaCl、1 mM EDTA 溶液でカラム容量の5倍量で平衡化した。平衡化後、20 mM Tris-HCl (pH 7.4) - 2 M NaCl 溶液で DEAE-Sephacel カラムホスホリパーゼ A₂ 活性画分を最終 NaCl 濃度が 0.8 M になるように調製した後、カラムに流速 30 ml/時間でアブライした。全量をアブライ後、平衡化溶液で 280 nm の吸光度が 0.005 以下になるまでカラムを洗浄した。プレカラムを離脱後、20 mM Tris-HCl、pH 7.4、50 mM NaCl、1 mM EDTA 溶液で溶出した。溶出は、280 nm の吸光度が 0.005 以下になるまで行った。使用後のカラムクロマトグラフィーは、蒸留水で洗浄の後、30% エタノール溶液で保存し再利用した。非吸着画分、吸着画分いずれも、5 ml / fraction の割合で分取し、各 fraction の一部分を 280 nm の吸光度測定と、ホスホリパーゼ A₂ 活性測定に用いた。なおホスホリパーゼ A₂ 活性には各 fraction から 10 μ l を酵素源として、測定は 2-2-5 の方法に従った。

(5) Superose 12 FPLC カラムクロマトグラフィー フェニルトヨパールカラムクロマトグラフィーホスホリパーゼ A₂ 活性画分をセントリコン 10 (アミコン、USA) により最終容量が 300 μ l になるまで濃縮した。Superose 12 FPLC を 20 mM Tris-HCl、pH 7.4、100 mM NaCl 溶液で平衡化後、濃縮ホスホリパーゼ A₂ 活性画分をアブライして流速 0.3 ml/m

inで溶出した。0.3 ml/fraction で分取した。なおホスホリパーゼA₂活性には各fractionから3 μlを酵素源として、測定は2-2-5の方法に従った。

(6) MONO Q FPLCカラムクロマトグラフィー MONO Q FPLCを20 mM Tris-HCl、pH 7.4、150 mM NaCl溶液で平衡化した。Superose 12 FPLCホスホリパーゼA₂活性画分をアプライして流速0.5 ml/minで平衡化溶液で洗浄した。溶出は、NaCl濃度を150 mMから500 mMまでのリニアグラジエント（50分間）で行った。分取は0.5 ml/fractionで行った。なおホスホリパーゼA₂活性には各fractionから3 μlを酵素源として、測定は2-2-5の方法に従った。

3-2-4 SDSポリアクリルアミド電気泳動

Laemmliの方法（55）に従って行った。泳動終了後の染色は銀染色法いた。

3-2-5 性状解析

(1) 基質特異性 精製60 kDaホスホリパーゼA₂を酵素源に2-2-5の方法にしたがい、基質で酵素活性を測定した。いずれの基質も2 μMとした。

(2) Ca要求性 精製60 kDaホスホリパーゼA₂を酵素源にCa-EGTA液（pCa 7~3）（34）、Tris-HCl（pH 7.4）の条件で2-2-5の方法に従い測定した。

(3) リゾホスホリパーゼ活性 精製60 kDaホスホリパーゼA₂を用

いて藤守(56)らの方法に従い測定した。基質として1- $[^{14}\text{C}]$ -palmitoyl-lysoPCを反応溶液中で $100\mu\text{M}$ になるように加えた。他の条件対照としてラット血小板由来 85kDaPLA2 の部分精製品を用いた。

3-3 結果

3-3-1 60 kDaホスホリパーゼA2の精製

(1) DEAE-Sephacelカラムクロマトグラフィー TNF刺激3Y1細胞可溶性画分をDEAE-Sephacelイオン交換カラムクロマトグラフィーにアブライした。本条件下では全ての酵素活性が吸着した。吸着した活性の大部分が300 mM NaClにて溶出した画分に回収された(図12a)

。本条件下で未吸着画分に酵素活性が存在しないことは、TNF刺激3Y1細胞可溶性画分中には14 kDaI、II型ホスホリパーゼA2が殆ど存在しないことをしめしている。

(2) Phenyl-Toyopearlカラムクロマトグラフィー DAEA活性画分をPhenyl-Toyopearlカラムクロマトグラフィーにアブライした。本条件下では全ての酵素活性が吸着した。吸着した活性の大部分が50 mM NaClにて溶出した画分に回収された(図12a)。

(3) Superose 12 FPLCカラムクロマトグラフィー Phenyl活性画分をセントリコン10で濃縮してSuperose 12 FPLCカラムクロマトグラフィーにアブライした。本条件下では大部分が推定分子量65 kDaのところに回収された(図12a)。

(4) MONO Q FPLCカラムクロマトグラフィー Superose 12 FPLC活性画分をMONO Q FPLCカラムクロマトグラフィーにアブライした。150 mM NaClから500 mM NaClまでのリニアグラジエントをかけて溶出したところ。NaCl濃度が300 m

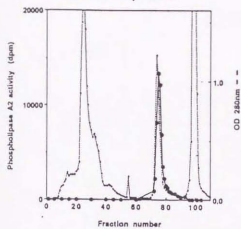
M程度のところにメインのタンパクピークに一致してホスホリパーゼA2活性が溶出した(図12a)。

(5) SDS-PAGE MONO Q FPLCの活性画分について SDS-PAGEを行った。その結果、還元条件下、非還元条件下いずれの場合も分子量約60 kDaのところに単一バンドとして観察された。この分子量サイズは Superose 12 FPLCカラムクロマトグラフィーにおける溶出位置とも一致した。

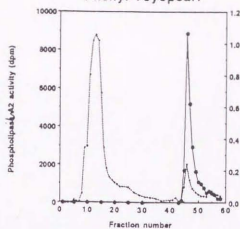
(6) 精製のまとめ (1)から(4)のカラムクロマトグラフィーを行って可溶性画分200 mgより最終精製品約5 μ gを得た。精製倍率は約9700倍で最終比活性は750 nmol/min \cdot mgであった(図12b)。

Purification of TNF-treated 3Y1 Phospholipase A2

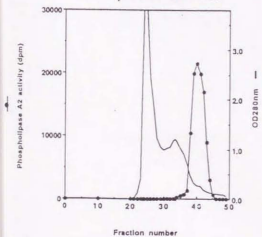
DEAE-Sephacel



Phenyl-Toyopearl



Superose 12 FPLC



Mono Q FPLC

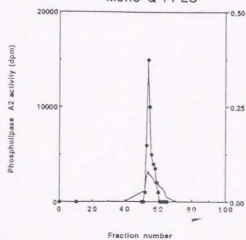
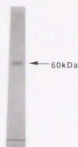


图 12

Purification of 60kDa Phospholipase A₂ from TNF-Treated 3Y1 Cells

Step	Protein (mg)	Activity (pmol/min)	Yield (%)	Specific activity (pmol/min/mg)	Fold
TNF-treated 3Y1 cells cytosol	200	16000	100	80	1
DEAE Sephacel	33	14400	90	436	5
Phenyl Toyopearl	1	11840	74	11840	150
Superose12	0.020	5920	37	296000	3700
MONO Q	0.005	3880	24	776000	9700



3-3-2 60 kDa ホスホリパーゼA2の性状解析

(1) 基質特異性 60 kDa ホスホリパーゼA2の基質の脂肪酸鎖に関する特異性について調べた。その結果、60 kDa ホスホリパーゼA2はリノール酸含有基質よりアラキドン酸含有基質を約20倍効率よく加水分解した。ホスファチジルコリンあるいはホスファチジルエタノールアミンのいずれの場合も同程度加水分解した。(図13) 基質1位の脂肪酸の結合様式の鎖による違いを調べた。1位がアルキル型の場合においてもアシル型の約20%の効率で加水分解した。(図14)

(2) Caの要求性 60 kDa ホスホリパーゼA2のCa要求性について調べた。PEを基質にした場合、1 mM EGTA存在かでは、殆ど活性が検出出来なかった。酵素活性は、 10^{-6} M程度より活性が発現し 10^{-5} Mでほぼ最大活性を示した。(図15)

(3) リゾホスホリパーゼ活性 85 kDa cPLA2は、ホスホリパーゼA2活性と同時にリゾホスホリパーゼ活性を有していることが報告されている(56-57)。そこで1-[14C]-palmitoyl-2-lysophosphatidylcholineを基質にした場合のリゾホスホリパーゼ活性についてラット85 kDa cPLA2と比較をした。その結果、85 kDa cPLA2は、1-palmitoyl-2-[14C]-arachidonoyl-phosphatidylcholineを基質にした場合のホスホリパーゼA2活性の約60%程度の酵素活性を有している。この結果は、ウサギ血小板由来85 kDa cPLA2とほぼ一致している。一方60 kDa ホスホリパ

ーゼA2に関しては、ほとんどリゾホスホリパーゼ活性が検出出来なかった。(図16)

(4) p-BPBに対する効果 p-BPBは14kDaII型ホスホリパーゼA2に対し阻害する物質である。p-BPBを60kDaホスホリパーゼA2に作用させたところ、Caを前処理するしないに関わらず0.5mMでは完全に阻害した。(図17)

(5) 抗体に対する反応性 当教室藤守は、ウサギ血小板由来85kDacPLA2に対するモノクローナル抗体を樹立した。そのうちラット血小板由来cPLA2と交叉性を示すいずれの抗体とも60kDaホスホリパーゼA2は反応しなかった。(図18)

Figure 13 Substrate Specificity of 60 kDa Phospholipase A2

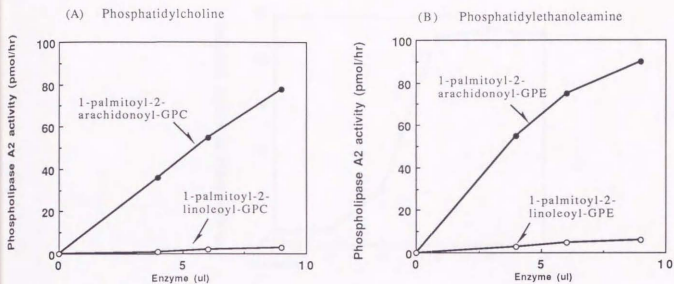


Figure 14

Substrate Specificity of 3Y1 PLA2 and Rat Platelet cPLA2

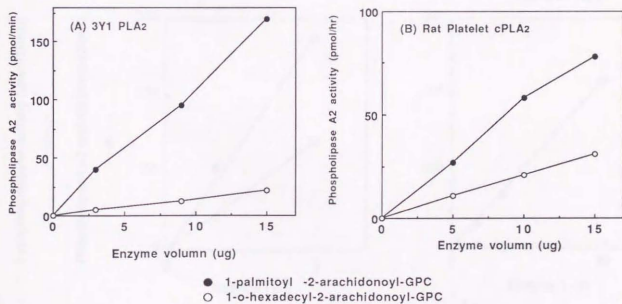


图 15

Ca²⁺ Requirement of 60 kDa Phospholipase A2 Activity

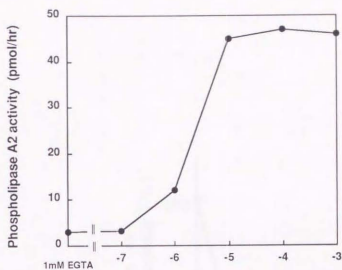
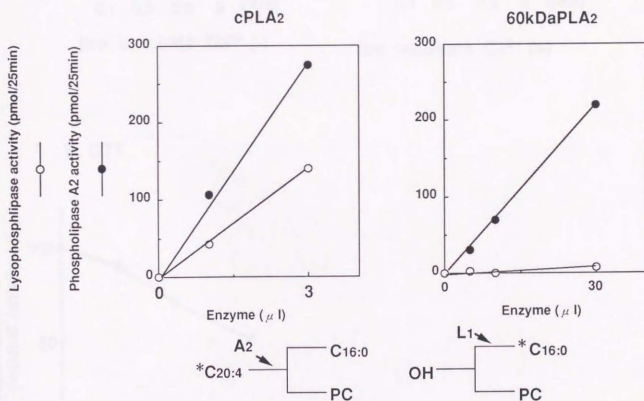


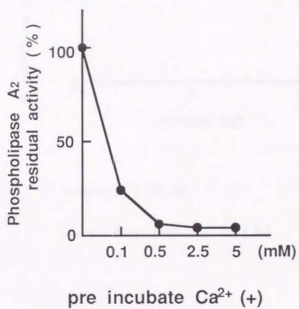
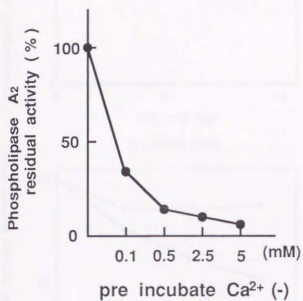
图 16

Lysophospholipase Activity of 60 kDa PLA2

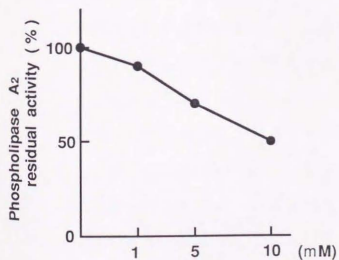


17

A. p-BPB

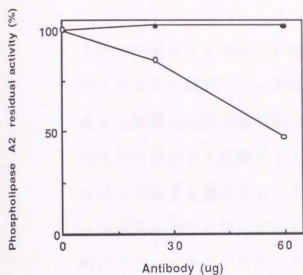


B. DTT

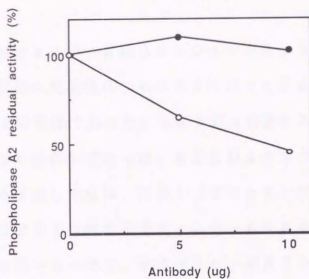


Immunoreactivity of TNF-treated 3Y1 Phospholipase A2 to Anti-Rabbit Platelet cPLA2 Monoclonal

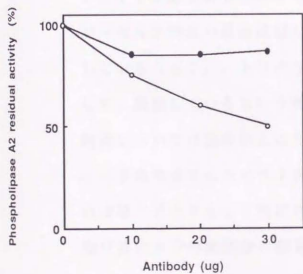
(A) RHY3 (IgM)



(B) RHY4 (IgG)



(C) RHY5 (IgG)



● 3Y1 PLA2
○ Rat platelet cPLA2

3-4 考察

TNF刺激3Y1細胞の可溶性画分より分子量約60kDaのホスホリパーゼA2を精製した。最終精製品の比活性は、ヒト85kDa cPLA2を精製した時の比活性とほぼ同程度であった。14kDa II型ホスホリパーゼA2と比較すると約50分の1であった。60kDaホスホリパーゼA2を精製するにあたり工夫した点は、PDI (プロテインジイソメラーゼ) を除去するためにPDIに対するアフィニティーカラムを用いてことである。このカラムを用いない場合、ホスホリパーゼA2とPDIを除去することは不可能と考えている。多くの実験者がホスホリパーゼA2精製の最終段階においてもなおPDIが混入することを指摘している(57)。トリグリセリドリパーゼは、PDIと複合体を形成して、機能しているという報告があるがホスホリパーゼA2とPDIの関連については現在のところ全く不明である。

いずれのカラムクロマトグラフィーにおいてもホスホリパーゼA2はほぼ単一ピークとして検出された。このことはTNF刺激した3Y1細胞可溶性画分の大部分の酵素がこの60kDaホスホリパーゼA2であることを示している。精製60kDaホスホリパーゼA2のアミノ酸配列ごく一部を決定した。KALYANMはヒト、マウス85kDa cPLA2のアミノ酸配列と70パーセントのホモロジーが観察された。しかしながら現在のところ85kDa cPLA2にとってこの部分がいかなる機能をもったドメインであるかは明確に示されていない。一方、MSSENという配列にはホモロジーは認められなかった。またN末端アミノ酸配列については確認出来なかった。この2つ配列をもちいてPCR反応によりcDNA断片の単離を試みたが、現在のところ成功

していない。さらにアミノ酸配列を調べる必要があると考えている。

60 kDa ホスホリパーゼA2は、Caイオン濃度が約1から10 μ Mで活性化される。これは85 kDa cPLA2が約1 μ Mで最大活性を示すのとは若干異なっていた。さらに60 kDaのホスホリパーゼA2は、きわめて高いアラキドン酸含有基質に対する選択性を示していた。この選択性は85 kDa cPLA2よりも高いと考えている。さらに60 kDa ホスホリパーゼA2はアルキルアシルPCも加水分解するから血小板活性化因子前駆体産生に寄与する可能性も考えられた。60 kDa ホスホリパーゼA2のこれらの性状は85 kDa cPLA2と類似していた。しかしながら60 kDa ホスホリパーゼA2にはリゾホスホリパーゼ活性が検出出来なかった。85 kDa cPLA2には、ホスホリパーゼA2活性の他にリゾホスホリパーゼ活性を有していることが示されているが現在のところその生理的意義について明確な解答は得られていない。60 kDa ホスホリパーゼA2と85 kDa cPLA2の唯一の酵素学的違いといってよい。このリゾホスホリパーゼ活性を有していないことが3Y1細胞において60 kDa ホスホリパーゼA2と85 kDa cPLA2のアイソザイムの変化の生理的意義について調べる糸口になると考えている。

第4章 生体内での60kDaホスホリパーゼA2様酵素の発現

4-1 序

2章、3章でラット胎児由来繊維芽細胞中にTNFで刺激すると分子量60kDaの新規のホスホリパーゼA2が発現することを報告した。本章では60kDaホスホリパーゼA2の生体ラットでの発現について検討を試みた。

グラム陰性菌の細胞壁に存在するリポ多糖 (lipopolysaccharides; LPS) は、ヒトや各種実験動物で内在性のTNFの産生を誘導することが報告されている(58-59)。そこで生体ラットにLPSを投与してホスホリパーゼA2の活性変動を調べそれを手がかりに60kDaホスホリパーゼA2の発現を調べた。

4-2 材料と方法

4-2-1 材料

wister rat (7週令) は日本生物材料より購入した。サルモネラミネソタRe595株由来リポポリサッカライド (LPS) はシグマ (USA) より購入した。その他の試薬は特級を用いた。

4-2-3 LPS処理

LPSを0.22 μ mの無菌的フィルターを通した生理的食塩水に最終濃度1mg/mlになるように懸濁した。懸濁液をチップタイプのソ

ニケーターで強度20で10秒x3回ソニケーションして透明な液にした。本液は使用するまで-20度で保存した。ラットにLPSを投与する場合はLPS原液を生理的食塩水で10倍に希釈した溶液を1.5 ml/kg bodyの濃度で尾静脈より投与した。

4-2-4 LPS処理をしたラットの各臓器中のホスホリパーゼA₂活性の測定 LPS処理24時間後ラットをエーテル麻酔した。断頭して充分しゃ血した後肺、脳、心臓、腎臓、脾臓、肝臓を摘出した。摘出臓器はホモジナイズ用溶液(SET溶液+0.1mMPMSF)で充分洗浄した。解剖用はさみで充分粉碎した各種臓器を湿重量の5倍量のホモジナイズ用溶液に懸濁した。本液をポッター式ホモジナイザーで800~1000rpmでホモジナイズした。ホモジナイズ液をクボタ冷却遠心機で4℃で3500回転で10分間遠心して非破壊画分と核画分を除去。その後超遠心機で4℃、100,000gで1時間遠心し可溶性画分を調製した。これを酵素源として1-palmitoyl-2-[14C]-arachidonyl-phosphatidylcholineを基質に100mM Tris-HCl(pH9.0)、4mM CaCl₂、0.1mM DTT、0.1mg/ml BSA存在下で酵素活性を測定した。

4-2-5 デキサメタゾンの効果

デキサメタゾンを最終濃度7.5mg/mlになるようにエタノールに溶解した。このデキサメタゾン溶液を5%含む生理的食塩水を2ml/kg body背部皮下より投与した。対照として5%エタノールを含む生理的食塩水を投与した。デキサメタゾン処理5時間後4-2-2に

示した方法に従いLPSを投与し、ホスホリパーゼA₂活性を測定した。

4-2-6 ノーザンプロット解析による脳中の85 kDa cPLA₂量の検討

LPS処理、未処理それぞれのラットの脳を摘出後無菌的なPBS(-)で充分洗浄し、湿重量の10倍量のsol. Dを加えた。2-2-#の方法に従いmRNAを調製した。ノーザンプロット解析にはそれぞれmRNA 10 μgを使用した。プローブはラットcPLA₂を用いて、2-2-#の方法に従いノーザンプロット解析を行った。シグナルが非常に弱いので、BAS2000イメージアナライザーでexposeした。

4-2-7 DEAE-Sephacelイオン交換クロマトグラフィー

ゲル容量が20 mlのDEAE-Sephacelイオン交換カラムを20 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.4)、135 mM NaCl、1 mM EDTAを含む平衡化溶液で充分平衡化した。LPS処理および未処理ラットの脳の可溶性画分60 mgを本カラムクロマトグラフィーに流速20 ml/hでアプライした。吸光度280 nmが0.01以下になるまで平衡化溶液で洗浄した後240 mM NaClを含む溶出溶液で吸光度280 nmが0.01以下になるまで溶出した。さらに1 M NaClを含む溶出溶液で溶出した。各フラクションは5 ml/フラクションの割合で回収し、そのうち50 μlをホスホリパーゼA₂活性測定に用いた。

4-2-8 DEAE分画の抗体との反応性

DEAE各分画ホスホリパーゼA₂、約80 pmol/hrを酵素源として14 kDa II型ホスホリパーゼA₂、cPLA₂抗体で活性吸収を行った。方法は2-2-4に従った。

4-2-9 ホスホリパーゼA₂の精製

(1) 酵素源の調製 50匹のラットを4-2-3の方法でLPS処理をした。4-2-4の方法で細胞を破壊した。超音波破壊画分を超速心機70-P (日立、東京)で100,000 x g、4℃、1時間遠心してえられた可溶性画分を酵素源とした。

(2) DEAE-Sephacelカラムクロマトグラフィー DEAE-Sephacel、200 mlをφ5.0 cm x 20 cmのカラム管 (バイオラド、USA)に充填した。カラムを20 mM Tris-HCl、pH 7.4、135 mM NaCl、1 mM EDTA溶液でカラム容量の5倍量で平衡化した。平衡化後、細胞質可溶性画分を流速 40 ml/時間でアブライした。全量をアブライ後、平衡化溶液で280 nmの吸光度が0.005以下になるまでカラムを洗浄したのち、20 mM Tris-HCl、pH 7.4、240 mM NaCl、1 mM EDTA溶液で溶出した。溶出は、280 nmの吸光度が0.005以下になるまで行った。なおカラムクロマトグラフィーはすべて4℃で行った。使用後のカラムクロマトグラフィーは、2 M NaCl溶液で洗浄の後、30%エタノール溶液で保存し再利用した。非吸着画分、吸着画分いずれも、10 ml/fractionの割合で分取し、

各 fraction の一部分を 280 nm の吸光度測定と、ホスホリパーゼ A₂ 活性測定に用いた。なおホスホリパーゼ A₂ 活性には各 fraction から 50 μl を酵素源として、測定は 2-2-5 の方法に従った。

(3) フェニルトヨパールカラムクロマトグラフィー フェニルトヨパール、50 ml を φ 2.5 cm x 15 cm のカラム管 (バイオラド, USA) に充填した。カラムを 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 800 mM NaCl, 1 mM EDTA 溶液でカラム容量の 5 倍量で平衡化した。平衡化後、20 mM Tris-HCl (pH 7.4) - 2 M NaCl 溶液で DEAE-Sephacel カラムホスホリパーゼ A₂ 活性画分を最終 NaCl 濃度が 0.8 M になるように調製した後、カラムに流速 30 ml/時間でアプライした。全量をアプライ後、平衡化溶液で 280 nm の吸光度が 0.005 以下になるまでカラムを洗浄した。20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA 溶液で溶出した。溶出は、280 nm の吸光度が 0.005 以下になるまで行った。さらに 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA 溶液で溶出した。溶出は、280 nm の吸光度が 0.005 以下になるまで行った。使用後のカラムクロマトグラフィーは、蒸留水で洗浄の後、30% エタノール溶液で保存し再利用した。非吸着画分、吸着画分いずれも、5 ml/fraction の割合で分取し、各 fraction の一部分を 280 nm の吸光度測定と、ホスホリパーゼ A₂ 活性測定に用いた。なおホスホリパーゼ A₂ 活性には各 fraction から 50 μl を酵素源として、測定は 2-2-5 の方法に従った。

(4) MONO Q FPLCカラムクロマトグラフィー MONO Q FPLCを20 mM Tris-HCl、pH 8.5、150 mM NaCl溶液で平衡化した。活性画分をアプライして流速0.5 ml/minで平衡化溶液で洗浄した。溶出は、NaCl濃度を150 mMから600 mMまでのリニアグラジエント（50分間）で行った。分取は0.5 ml/fractionで行った。なおホスホリパーゼA₂活性には各fractionから10 μlを酵素源として、測定は2-2-5の方法に従った。

(5) Superose 12 FPLCカラムクロマトグラフィー MONO Q活性画分をセントリコン10（アミコン、USA）により最終容量が300 μlになるまで濃縮した。Superose 12 FPLCを20 mM Tris-HCl、pH 7.4、100 mM NaCl溶液で平衡化後、濃縮ホスホリパーゼA₂活性画分をアプライして流速0.3 ml/minで溶出した。0.3 ml/fractionで分取した。なおホスホリパーゼA₂活性には各fractionから10 μlを酵素源として、測定は2-2-5の方法に従った。

4-2-10 性状解析

フェニルトヨバル活性画分を用いてCa要求性、リゾホスホリパーゼ活性を調べた。方法は、3-2-5に従った。

4-3 結果

4-3-1 LPS処理によるラット各臓器中のホスホリパーゼA₂活性の変動

LPS処理24時間後の各臓器のホスホリパーゼA₂活性を調べたところ図19に示すように肺、脳、腎臓において未処理ラットの臓器と比較して約3倍程度酵素活性が上昇することが観察された。一方、図19に示す他の臓器に於ては有為な酵素活性の上昇は観察されなかった。

4-3-2 デキサメタゾンの効果

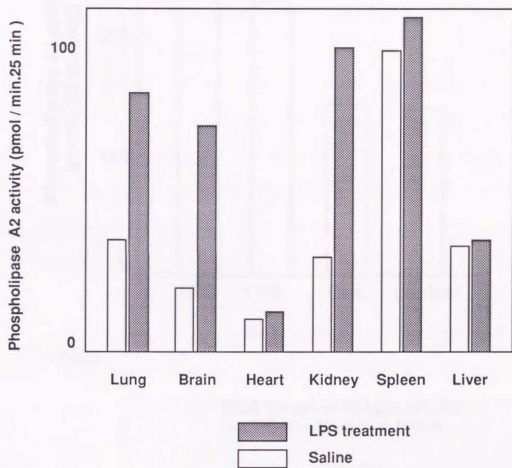
抗炎症ステロイド剤であるデキサメタゾンの、LPS投与によるホスホリパーゼA₂活性の上昇に対する効果を調べた。その結果図20に示すようにデキサメタゾン投与群において有為にLPSによる酵素活性の上昇を抑制した。一方、デキサメタゾン単独では内在性のホスホリパーゼA₂活性には殆ど影響を及ぼさなかった。

4-3-3 LPSによる脳中の85kDcPLA₂の変動

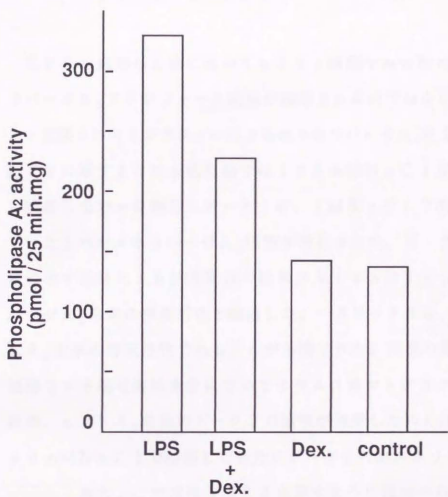
脳に着目しLPS処理による85kDcPLA₂の変動を調べた。その結果、図21に示すように未処理ラット脳中には極めて少ないものの85kDcPLA₂が遺伝子レベルで発現していることを確認した。一方LPS処理した脳では85kDcPLA₂の発現量は未処理脳と比較して5分の1に低下した。これは培養細胞である3Y1細胞をTNFで刺激した結果と一致した。

图 19

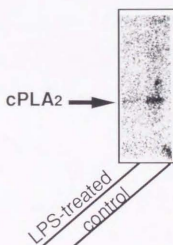
Effect of LPS-Treatment on Phospholipase A₂ Activity in various tissues



Effect of Dexamethasone on Induction of Phospholipase A₂ Activity in LPS-treated Rat Brain Cytosol



RNA Level of 85kDa cPLA₂ in LPS-Treated Rat Brain



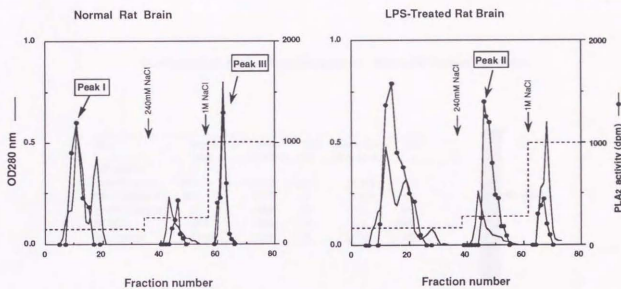
4-3-4 DEAE-SephaCel イオン交換クロマトグラフィー

LPSを処理した脳においても3Y1細胞でみられたようなホスホリパーゼA₂アイソフォーム変動が観察されるのではないかと予想しイオン交換クロマトグラフィーによるホスホリパーゼA₂の分離を試みた。図22に示すように未処理脳では135 mM NaCl存在下でカラムに吸着しなかった画分にピーク1が、1 M NaClで溶出した画分にピーク3のホスホリパーゼA₂活性が検出された。ピーク1の活性は図#に示す抗体による活性吸収の結果から14 kD Type IIホスホリパーゼA₂由来の酵素活性と結論した。一方ピーク3は、85 kD cPLA₂由来の酵素活性であることが示唆された。同様の条件下でLPS処理ラット脳可溶性画分についてカラムクロマトグラフィーを行った結果、cPLA₂由来のピーク3の活性が減少したのと同時に新たに240 mM NaClで溶出した画分にピーク2のホスホリパーゼA₂活性が検出された。この活性は図23に示すように既知の抗体とは全く反応しなかった。先に示した未分画脳可溶性画分に於ける活性上昇はこのピーク2のホスホリパーゼA₂の新たな発現によるものと予想した。

4-3-5 ピーク2の精製

LPS処理したラット50匹の細胞質可溶性画分より精製を試みた。図24はその精製過程をまとめた結果である。MONO QをpH 7.4からpH 8.5に変更したのが効果的であった。最終ステップのSuperose 12 FPLCのホスホリパーゼA₂活性画分についてSDS-PAGEを行った結果図24に示すように分子量60 kDのところに単一のバンドが検出された。またSuperose 12 FPLCカラムクロマトグラフィーにおけるホスホリパーゼA₂活性の

DEAE Sephacel Column Chromatography of Normal Rat Brain PLA2 and LPS-Treatment Rat Brain PLA2



Immunoreactivity of Phospholipase A2 Activities in DEAE-Sephacel Fractions

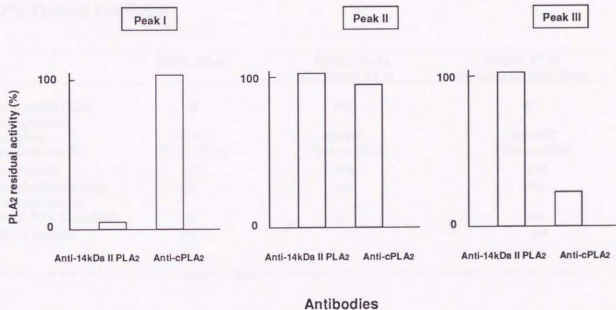


图 24

Purification of 60kDa Phospholipase A₂ from LPS-Treated Rat Brain

Step	Protein (mg)	Activity (pmol/min)	Yield (%)	Specific activity (nmol/min/mg)	Fold
LPS-treated rat brain cytosol	3850	19000	100	0.004	1
DEAE-Sepharcel	300	8550	45	0.028	5.7
Phenyl-Toyopearl	2	3800	20	1.9	385
MONO Q	0.15	1500	8	10.1	2055
Superose12	0.008	833	4	104.1	21120



Characterization of 60kDa Phospholipase A₂ in TNF-Treated 3Y1 Cells and LPS-Treated Rat Brain

	85kDa cPLA ₂	60kDa PLA ₂ (TNF-treated 3Y1)	60kDa PLA ₂ (LPS-treated Rat Brain)
Molecular weight (kDa)	85	60	60
Substrate specificity			
Head group	PE=PC	PE=PC	PE=PC
Acyl Chain (sn-2)	C20:4 > C18:2	C20:4 >> C18:2	C20:4 >> C18:2
Ca ²⁺ requirement	μM	μM	μM
Lysophospholipase activity	yes	no	no
Immunocrossreactivity			
anti-Group II PLA ₂ antibody	no	no	no
anti-cPLA ₂ antibody	yes	no	no

位置も分子量60kDの溶出位置と一致した。

4-3-6 脳から精製した60kDa酵素の性状

(1)Ca要求性 脳由来60kDa酵素は、 10^{-6} Mより活性が発現しほぼ 10^{-5} M程度で最大活性を示した。

(2)リゾホスホリパーゼ活性 脳由来60kDa酵素は、リゾ活性が検出出来なかった。これら二つの結果は3Y1細胞から精製した酵素の性質と一致していた。

4-4 考察

LPSは、生体に対し様々な影響を及ぼすことが報告されている。マクロファージからのTNF、IFN産生、血栓形成(DIC)、血管内皮細胞損傷、発熱反応等が報告されている(61-62)。脳内においては、血液脳関門の透過性を亢進させること(63-64)、ミクログリア細胞に対してTNFをはじめとして、IL-1, IL-6といったサイトカイン産生を促すことが報告されている(65-66)。

LPSを全身に投与したときの酵素活性の変動について。本実験では、顕著な酵素活性の変動は、脳、肺、腎臓において観察された。他の臓器が全くLPSに対し反応しないとは考えられず、脳以外の細胞においてもイオン交換カラムクロマトグラフィー等の分析が必要であると考えている。中野らはラットにLPSを投与したときの14kDaII型ホスホリパーゼA2が脳、動脈、脾臓、肺、胸腺で誘導されることを報告している(31)。今回脾臓で殆ど変化がみられないのは、酵素測定条件によるものと考えている。本条件では、DTT、BSAを含みPCを基質にしているので14kDaホスホリパーゼA2の関与を極力抑えている。さらに脳について細かく調べた。肺についてもほぼ同様の結果を得ている。85kDa cPLA2の変動について遺伝生化学的手法を用いて調べたが、未処理脳中での85kDa cPLA2の発現量は非常に少なかった。これはClarkらの結果と一致していた(34)。85kDa cPLA2遺伝子は一般にその臓器中での発現量が低いといわれている(67)。LPSによりこの85kDa cPLA2が非常に低下した。生体内での85kDa cPLA2の

遺伝子発現に関する知見は今のところこれをはじめてである。

イオン交換カラムの結果から未処理脳中には14 k d a II型ホスホリパーゼA 2、85 k D a c P L A 2が存在することが分かった。L P S処理によりこれらに加えて60 k D aホスホリパーゼA 2ときわめて類似の酵素が発現していた。14 k D a II型ホスホリパーゼA 2もL P S処理により酵素量が増大していた。これは中野らの結果と一致するもの、未処理脳中にも14 k d a II型ホスホリパーゼA 2がかなり多く存在する点では一致しなかった。当教室松沢らは脳中では、II型ホスホリパーゼA 2が分泌顆粒中に存在することを示している(69)。

L P S処理脳中より60 k d aホスホリパーゼA 2様の酵素を精製した。3 Y 1細胞からの60 k d aホスホリパーゼA 2とカラム上の挙動が一致した。またリゾホスホリパーゼ活性がない点や抗体の反応性からおそらく脳中の60 k d aホスホリパーゼA 2と3 Y 1細胞60 k d aホスホリパーゼA 2は同一のものであろうと考えている。これらの反応はL P Sにより脳ミクログリア細胞からT N Fが産生され脳中のいずれかの細胞に作用して起きていると考えている。さらに詳細な検討が必要と考えている。

第5章癌原遺伝子c-mycと85kDa cPLA₂

5-1 序

私は、第2章から第4章において、TNF刺激によりある種の条件下では、cPLA₂が減少して、新規60kDaホスホリパーゼA₂が発現誘導することを示した。一方私は、当教室池本守学士と共同で癌化に伴うアラキドン酸代謝異常について研究を行ってきた。その結果c-myc癌原遺伝子と85kDa cPLA₂の低下と関連について明らかにしたので本章ではその点について報告する。

5-2-2 材料

ヒト単球系白血病細胞株U937細胞は理化学研究所の細胞バンクより購入した。ラットc-mycプロンプは、築地国立癌センターの杉山晶規博士より御供与していただいた。

5-2-3 細胞培養

U937細胞は、10%FCSをふくむRPMI1640（日水製薬、東京）を基本培地として5%CO₂下、37℃で培養した。継代は、 5×10^5 cell/mlでおこなった。

5-2-4 TNFによるU937細胞の刺激

U937細胞、 1×10^6 cell/mlの濃度で1000u/mlの

濃度のTNFを含む培地でさらに培養し、刺激後0、2、6、14時間後の細胞を回収した。回収した細胞は、PBS (-)で洗浄の後2-2-2に示す方法でmRNAを回収した。

5-2-5 TNFによる3Y1細胞の刺激

3Y1細胞を刺激する方法は2-2-1に準じて行い細胞を回収し、RNAを調製した。

5-2-6 ノーザンプロット解析によるc-myc量の定量

(1)ラットc-myc遺伝子プローブの作成：ラットc-mycの染色体遺伝子のexon3を含む断片(HindIII-BglII断片、)をPTZ19R(BamHI、HindIII制限酵素処理)に2-2-8に示した方法でライゲーションした。この遺伝子をJM109細胞で増やし、2-2-2に示す方法でプラスミドを回収した。回収したプラスミドをHindIIIとEcoRIで制限酵素処理したc-myc遺伝子断片を含む遺伝子を低融点アガロースで回収しこれをプローブとした。

(2)プローブの放射標識化：2-2-8の方法にしたがった。

(3)ノーザンプロット解析：U937細胞のノーザンプロット解析には各サンプル5 μ gのmRNAを用いて行った。3y1細胞については、各サンプル30 μ gのtotalRNAを用いて行った。ノーザンプロット解析の方法については2-2-2の方法にしたがった。ただしU937細胞については、ラットc-mycプローブを用いたので、プレ

ハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションの温度を、40℃にさげておこなった。ハイブリダイゼーション後の洗浄も2 x s s c - 0.1% SDS 溶液で55℃で2回、0.2 x s s c - 0.1% SDS 溶液で55℃で1回行った。

5-2-7 85 kD cPLA₂の定量

(1)プローブの作製：85 kD cPLA₂のオープンリーディングフレームをすべて含むプラスミド（旭化成（株）より供与）をEcoRIとBglIIで制限酵素処理した断片を2-2-8の方法に従い低融点アガロースで回収した断片をプローブとした。

5-3 結果

5-3-1 各種癌遺伝子導入3Y1細胞株中のホスホリパーゼA₂ 活性

各種癌遺伝子導入細胞に於ける細胞内のホスホリパーゼA₂活性について測定したところmyc遺伝子導入細胞株が有意に酵素活性の低下が観察された(図25)。

5-3-2 3Y1-myc、3Y1細胞のSuperose12FPLC

5-3-1で示したmyc細胞の細胞内酵素活性の低下が酵素量の低下によるものかを調べるために3Y1と3Y1-myc細胞についてSuperose12FPLCゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行った。その結果図26に示すように分子量約100kDa付近のホスホリパーゼA₂活性が低下していることが観察された。この活性はさきに示したようにcPLA₂由来の酵素活性と結論している。

5-3-3 TNF刺激による3Y1細胞の内在性c-myc遺伝子変動

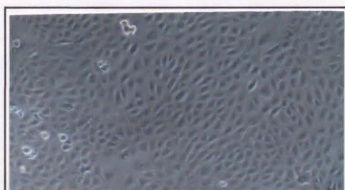
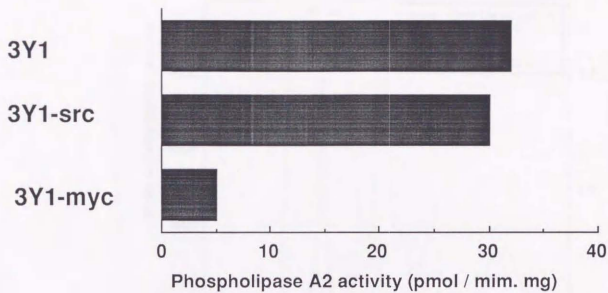
3Y1細胞をTNFで刺激すると、図27に示すように、未刺激飽和状態3Y1細胞では、c-myc遺伝子が発現していなかったものの刺激後2時間でc-myc量は、最大発現を示し、その後持続的に発現していた。一方cPLA₂の発現量は、c-myc発現にともない

急速に減少した。

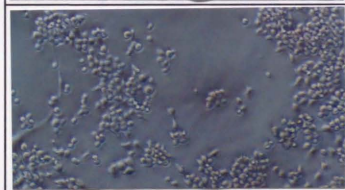
5-3-4 TNF刺激によるU937細胞のc-myc量とcPLA2量の関連

U937細胞をTNFで刺激すると未刺激細胞で発現していたc-mycが2時間目では、減少しその後再び未刺激細胞以上に発現していることが分かった。一方cPLA2量は、はじめ発現していたもののTNF刺激によるc-myc量の増加にともない急速に減少した(図28)。

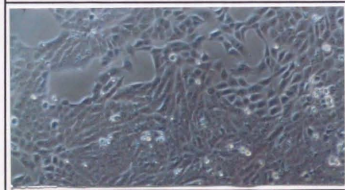
25 Cytosolic Phospholipase A₂ Activity in 3Y1, 3Y1-src, and 3Y1-myc



3Y1



3Y1-src



3Y1-myc

图 26 Superose 12 Column Chromatography of 3Y1 PLA₂ and 3Y1-myc R4H PLA₂

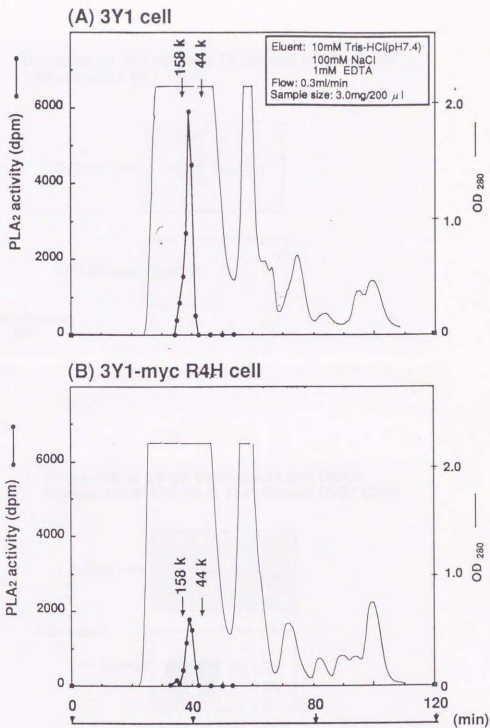


图 27

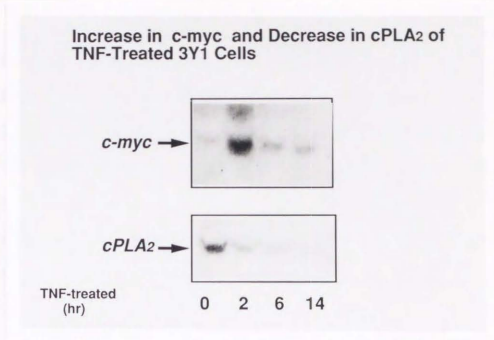
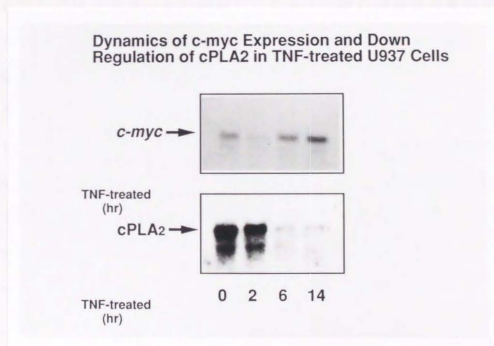


图 28



様々な細胞株に於て細胞を癌遺伝子を導入して細胞を形質転換時のアラキドン酸代謝の変動について報告している。src 遺伝子を導入したトリ胎児由来繊維芽細胞でアラキドン酸代謝物産生反応が亢進ことを報告している(70)。またras 遺伝子導入細胞でアラキドン酸代謝物産生反応の低下を報告している(71)。これらの報告においてこれらの遺伝子産物がアラキドン酸代謝のいずれのところに作用するかについては明確な結果を得ていない。おそらくアラキドン酸代謝異常を起こす原因として考えられることは、(1)ホスホリパーゼA2、シクロオキシゲナーゼ、その他PG産生酵素の低下(2)細胞外刺激のホスホリパーゼA2への情報伝達異常等が考えられる。今回私は、c-myc 癌原遺伝子を導入した細胞でアラキドン酸代謝物産生反応の低下が85kdacPLA2の低下であることを明らかにした。おそらく生体内においてもc-MYCタンパク質が過剰発現している様な癌(リンパ腫等)で同様な現象が見られることを期待している。ある種のプロスタグランジンははじめとするアラキドン酸代謝物が細胞増殖抑制や転移抑制が報告されており(90)、アラキドン酸代謝物産生の低下は癌の増悪化と関連があるのではないかと考えている。さらにPGE2は、c-myc 遺伝子そのものの発現を抑制することが報告されている(91)。

従って、c-myc 遺伝子によるcPLA2の低下は、オートクライン的に働くPGE2産生を低下させ、c-myc 遺伝子の持続的発現を促す可能性を示し、細胞の持続的増殖を起こす可能性も考えられる。正常細胞においても内在性のc-myc 遺伝子発現と85kdacPL

A2の低下を示すことが出来た。TNF刺激によりc-mycの発現パターンは細胞種によって異なるといわれている。3Y1細胞の様に増加する細胞（おもにTNFにより細胞増殖が見られる細胞）（73-74）、HeLa細胞のようにc-myc遺伝子が急速に減少する細胞とに分けられる（75-76）。HeLa細胞でTNF刺激により85kDa cPLA2が増加するのはc-myc遺伝子の発現の違いによるのではないかと予想している。

U937細胞では、未刺激細胞においてc-mycが発現しているにもかかわらず、cPLA2が発現していた。これは、今までの結果と矛盾する様に考えられるが、c-mycに関する最近の知見から以下のように説明できる。c-mycは、その活性発現のためには、ある種の複合体の形成を必要とする。その複合体は、数種存在し、max, mad, mix1と呼ばれている（92-93）。

maxはほぼ様々な細胞に普遍的に存在していると考えられている。一方、mad, mix1は、細胞種や細胞の刺激により変動することが報告されており（92-93）、これらの因子の変動がc-mycの作用を調節していると考えられる。このc-mycを制御する因子の変動が未刺激時のc-mycとTNF刺激時のc-MYC蛋白質の働きを変えていると考えられる。このことを証明するためにはさらに詳細な検討が必要と考えている。

c-myc遺伝子産物は、現在のところ転写調節因子として作用すると考えられており（77）、c-MYC蛋白質が直接、あるいは別の転写因子を調節して、85kDa cPLA2の発現制御していると考えているがさらに詳細な検討が必要であると考えている。

第6章 まとめ

私は本実験で、ラット胎児由来繊維芽細胞株3Y1細胞株をTNFで刺激すると、細胞内の酵素活性が約10倍に上昇することを見いだした。この酵素活性上昇は既知のホスホリパーゼA2の活性上昇によるものではなく分子量60kDの新規のホスホリパーゼA2の新たな発現によるものであることを明らかにした。さらに、85kDcPLA2がTNF刺激により減少することを見いだした。この減少は培養細胞による特殊な系ばかりでなくラットをLPSで刺激したときの脳に於いても同様なアイソフォーム変化が観察されることから生体内に於いてもTNFが誘導される状況に於いては充分起こりうる反応であると考えている。果して、85kDcPLA2と60kDホスホリパーゼA2のアイソフォームパターン変化は生理的にどのような意味があるのか。

同一細胞内である種の刺激により酵素のアイソザイムが変化する例としてプロテインカイネースC(PKC)があげられる。PKCは数種のアイソザイムが存在することが報告されている(80)。HL-60をTPAで刺激するとPKCのアイソフォームのパターン変化が観察されることが報告されている(81)。しかしながら生理的意義については不明である。

60kDホスホリパーゼA2が85kDcPLA2と酵素学的に違う点は、現在のところリゾホスホリパーゼ活性を有していない点である。これは60kDホスホリパーゼA2が積極的にリゾリン脂質産生に寄

与していると予想される。最近、Lys oPA、Lys oPC、といったリゾリン脂質の生理的機能について注目されている。Lys oPAは様々な成長因子やサイトカインにより産生され細胞表面上のある種のレセプターを介して細胞増殖活性を有していることが報告されている。Lys oPCについては、細胞傷害活性の他に細胞内のPKCを活性化する働きを有していることが明らかになっている。60 kDホスホリパーゼA2は、こうした働きを持つリゾリン脂質産生に関わってTNFがもつ細胞増殖活性を表現している可能性も考えられる。さらにTNFのある種の活性発現にたいし、ホスホリパーゼA2が活性化するにも関わらずシクロオキシゲナーゼ、リボキシゲナーゼの特異的阻害剤では無効であり、

アラキドン酸、あるいはリゾリン脂質の関与を指摘する報告もある。85 kD cPLA2がc-myc遺伝子が高発現しているときは低くその発現は抑えられている。細胞内に於いてc-mycが高発現しているときは細胞内MAPカインースがきわめて高い状況にあると考えられている。従って、MAPカインースによって85 kD cPLA2が制御されていることを考えると85 kD cPLA2の細胞増殖時の発現量低下は必要量以上に脂質性生理活性物質を産生しないという点で合目的であると考えられる。

今後60 kDaホスホリパーゼA2の構造や活性制御機構が明らかになった暁にはこれらの疑問にたいしても答えることが出来るだろう。

参考文献

- 1) Polonsky, J., Tence, M., Varenne, P., Das, B.C., Funel, J. and benveniste, J. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77,7019
- 2) 室田誠逸、山本尚三編 (1988) "講座プロスタグランジン" シリーズ
- 3) de Haas, G.H., Postema, N.M., Nieuwenhuizen, W., van Deenen, L.L.M. (1968) Biochim. Biophys. Acta. 159, 103-117
- 4) Nishijima, J., Okamoto, M., Ogawa, M., Kosaki, G., Yamamoto, T. (1983) J. Biochem. (Tokyo) 94, 137-147
- 5) Ono, T., Tojo, H., Inoue, K., Kagamiyama, H., Yamamoto, T., and Okamoto, M. (1984) J. Biochem., 96, 785-792
- 6) de Haas, G.H., Slotboom, A.J., Bensen, P.P.M., van Desnuelle, P. (1970) Biochim. Biophys. Acta 221, 31-53
- 7) Arita, H., Hanasaki, K., Nakano, T. Oka, S., Teraoka, H & Matsumoto, K. (1991) J. Biol. Chem. 266, 19139-19141
- 8) Kanemasa, T., Hanasaki, K. & Arita, H. (1992) Biochim. Biophys. Acta 1125, 210-214
- 9) Hanasaki, K., & Arita, H. (1992) J. Biol. Chem. 267, 6414-6420
- 10) Vadas, P., Stefanski, E., & Puruzanski, W. (1985) Life Sci. 36,579- 583
- 11) Chang ,H.W., Kudo, I., Tomita, M., & Inoue, K. (1987) J. Biochem.102, 147-154
- 12) Forst, S., Weiss, J., Elsbach, P., Maraganore, J.M., Reardon, I. and Heinson, R.L. (1986) Biochemistry 25, 8381-8385.
- 13) Hara, S., Kudo, I., Matsuta, K., Miyamoto, T. and Inoue, K. (1998) J. Biochem. 104, 326-328.
- 14) Hara, S., Kudo, I., Chang, H.W., Matsuta, K., Miyamoto, T. and Inoue, K. (1989) J. Biochem. 105, 395-399.
- 15) Back, S.H., Takayama, K., Kudo, I., Inoue, K., Lee, H.W., Do, J.Y. and Chang, H.W. (1991) Life Sci. 49, 1095-1102.
- 16) Horigome, K., Hayakawa, M., Inoue, K., Nojima, S. (1987) J. Biochem.101, 5

3-61.

17)Horigome, K., Hayakawa, M., Inoue, K.,Nojima, S. (1987) *J.Biochem.* 101,62
5-631.

18)Hayakawa, M., Kudo, I., Tomita, M.,Nojima, S.,Inoue,K. (1988)*J.Biochem.* 1
04, 767-772.

19)Kramer, R.M., Hession, C., Johansen, B., Hayes, G., Macgray, P.,

Chow, E.P., Tizard, R. & Pepinsky, R.B. (1989) *J. Biol. Chem.* 264,
5768-5775

20)Seihamaer, J.J., Pruzanski, W., Vadas, P., Plant, s., Miller, J.A., Kloss, J. &
Johnson, L.K. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 5335-5338

21)Komada, M., Kudo, I., Mizushima, H., Kitamura, N., & Inoue, K. (1989)*J.*
biochem. 106, 545-547

22)Lai, C. and Wada, K. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 488-493.

23)Nakazato, Y., Simonson, M.S., Herman, W.H., Konieczkowski, M. and Sedor,
J.R. (1991) *J. Biol. Chem.* 266,14119-14127.

24)Schalkwijk, C., Pfeilschifter, J., Marki, F. and van den Bosch, H. (1991) *Bio*
chem. Biophys. Res. Commun. 174, 268-275.

25)Crowl, R.M., Stoller, T.J., Conroy, R.R. and Stoner, C.R. (1991) *J. Biol.*
Chem. 266, 2647-2651.

26)Oka, S. and Arita, H. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 9956-9960.

27)Nakano, T., Ohara, O., Teraoka, H. and Arita, H. (1990) *FEBS Lett.* 261, 171
-174.

28)Murakami, M., Kudo, I. and Inoue, K.(1993) *J. Biol. Chem.* 268, 839-844.

29)Lyons-Giordano, Davis, G.L., Galbraith, W., Pratta, M.A. and Arner, E.C. (19
89) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 488-495.

30)Kerr, J.S., Stevens, T.M., Davis, G.L., McLaughlin, J.A. and Harris, R.R. (1
989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165, 1079-1084.

31)Nakano, T. and Arita, H. (1990) *FEBS Lett.* 273, 23-26.

32)Kim, D-K., Kudo, I. and Inoue, K. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1083, 8
0-88.

- 33) Takayama, K., Kudo, I., Kim, D.-K., Nagata, K., Nozawa, Y. and Inoue, K. (1991) *FEBS Lett.* 282, 326-330.
- 34) Clark, J.D., Lin, L.-L., Kriz, R.W., Ramesha, C.S., Sultzman, L.A., Lin, A.Y., Milona, N. and Knopf, J.L. (1991) *Cell* 65, 1043-1051.
- 35) Sharp, J.D., White, D.L., Chiou, X.G., Goodson, T., Gamboa, G.C., McClurce, D., Burgett, S., Hoskins, J., Skatrud, P.L., Sportsman, J.R., Becker, P.L., Kang, L.H., Roberts, E.F., and Kramer, R.M. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 14850-14853.
- 36) Leslie, C.C., Voelker, D.R., Channon, J.Y., Wall, M.M. and Zelarney, P.T. (1988) *Biochim. Biophys. Acta.* 963, 476-492.
- 37) Wijkander, J., & Sundler, R. (1991) *Eur. J. Biochem.* 202, 873-880
- 38) Fujimori, Y., Murakami, M., Kim, D.-K., Hara, S., Takayama, K., Kudo, I. and Inoue, K. (1992) *J. Biochem.* 111, 54-60.
- 39) Gronich, J.H., Bonventre, J., V. & Nemenoff, R.A. (1990) *Biochem. J.* 271, 47-43
- 40) Lin, L.-L., Lin, A.Y., & Knopf, J.L. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6147-6151
- 41) Lin, L.-L., Wartmann, M., Lin, A.Y., Knopf, J.L., Seth, A. and Davis, R. J. (1993) *Cell* 72, 269-278.
- 42) Suzanne E. Barbour and Edward A. Dennis (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 21875-21882.
- 43) 辻本雅文、堀隆光 (1991) *蛋白質核酸酵素* 36, 643-649
- 44) Yagisawa, H., Osawa, T. (1982) *Immunology* 47, 437-447
- 45) Neale, M.L., Fiera, R.A., Matthews, N. (1982) *Immunology* 64, 81-85.
- 46) Suffys, P., Beyaert, R., van Roy, F., Fiers, W. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149, 735-743.
- 47a) Fitzgerald-Knauer, M., Longmuir, K.J., Yamamoto, R.S., Fitzgerald, T.P., Granger, G.A. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 469-479
- 47b) Lin, L.-L., Lin, A.Y. and Knopf, J.L. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6147-6151.

- 48)Lin, L.-L., Lin, A.Y. and DeWitt, D.L. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 23451-23454.
- 49)Hulkower, K.I., Hope, W.C., Chen, T., Anderson, C.M. Colley, J.W. and Morgan, D.W. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 712-718.
- 50)Nakamura, T., Lin, L.-L., Kharbanda, S., Knopf, J. and Kufe, D. (1992) *E MBO J.* 11, 4917-4922.
- 51)Wolfgang G. Hoeck, Chakkodabyly S. Ramesha, David J. Chang, Nancy Fan and Renu A. Heller (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4475-4479
- 52)Goppelt-Strube, M. and Rehfeldt, W. (1992) *Biochem. Biophys. Acta* 1127, 163-167.
- 53)Sugarman, B.J., Aggarwal, B.B., Hass, P.E., Figari, I.S., Palladino, M.A. and Shepard, H.M.Jr. (1985) *Science* 230, 943-945.
- 54)Suga, H., Murakami, M., Kudo, I., & Inoue, K. (1994) *Eur. J. Biochem.* in press
- 56)藤守由美 修士論文
- 58)Nathan CF.(1987) *J. Clin. Invest.* 79, 319-326
- 59)Bruce Beutler etc (1992) " TUMOR NECROSIS FACTORS " RAVEN PRESS, Ltd. NEW YORK61)Morrison, D.C. and J.L. Ryan (1987) *Annu. Rev. Med.* 38, 417-432.
- 62)Morrison, D.C. and R.J. Ulevitch (1978) A review. *Am. J. Pathol.* 93, 526-617.
- 63)Lustig, S., Danenberg, H.D., Kafri, Y., Kobiler, D. and Ben-Nathan, D. (1992) *J. Exp. Med.* 176, 707-712
- 64)Maxon, E.R. (1992) *J. Infect. Dis.* 165, 77-81.
- 65)Lieberman, A.P., Pitha, P.M., Shin, H.S. and Shin, M.L. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6348-6352.
- 66)Lee, S.C., Liu, W., Dickson, D.W., Brosnan, C.F. and Barman, J.W. (1993) *J. Immunol.* 150, 2659-2667.
- 67)Kramer 私信
- 69)松沢厚、工藤一郎、井上圭三 (1993) 日本生化学会大会

- 74) Lin, J.X., Vilcek, J. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 11908-11911
- 75) Yaden, A., Kimchi, A. (1986) *Science* 234, 1419-1421
- 76) Kronke, M., Schluter, C., Pfizenmaier, K., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U SA* 84, 467-473
- 77) Roy, A.L., Carruthers, C., Gutjahr, T. and Roeder, R.G. (1993) *Nature* 365, 359-361.
- 80) Clemens, M.J., Trayner, I. and Menaya, J. (1992) *J. Cell Sci.* 103, 881-887.
- 81) Tanaka, Y., Yoshihara, K., Tsuyuki, M., Hironaka, I.A., Inada, Y. and Kamiya, T. (1992) *J. Biochem.* 111, 265-271.
- 85) Kimura, G., Itagaki, A., & Summers, J. (1975) *Int. J. Cancer* 15 694-706
- 86) 高山喜好、工藤一郎、井上圭三 (1993) *実験医学*、11, 307-316
- 88) Murakami, M., kudo, I., Natori, Y., Inoue, K., (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, 1043, 34-42
- 89) 池本守 私信
- 90) 竹永啓三 (1987) *現代医療*, 19, 3047-3051
- 91) Seregí, A., Keller, M., Hertting, G., (1987) *Brain Res.*, 404 113-12 0
- 92) Ayer, D.E., Kretner, L., & Eisenman, R.N. (1993) *Cell*, 72, 211-222
- 93) Zervos, A.S., Gyuris, J., & Brent, R. (1993) *Cell*, 72, 223-232

