

細胞内Ⅱ型 PAF アセチルヒドロラーゼの構造解析

服部 研之

細胞内Ⅱ型 PAF アセチルヒドロラーゼの構造解析

第一編 序論

1. はじめに

2. PAF アセチルヒドロラーゼ

3. 研究の経緯

4. 研究の目的と意義

5. 研究の計画と方法

細胞内Ⅱ型 PAF アセチルヒドロラーゼの構造解析

6. 研究の進捗と成果

7. おわりに

8. 参考文献

9. 謝辞

10. 索引

11. 補遺

12. 参考文献

13. 謝辞

14. 索引

15. 補遺

服部研之

細胞内Ⅱ型 PAF アセチルヒドロラーゼの構造解析

第一章 序論

1

図

第二章 cDNA クローニング

8

- 1 はじめに
- 2 部分アミノ酸配列
- 3 cDNA クローニング
- 4 ヒトホモログのクローニング
- 5 他のタンパクとのホモロジー
- 6 ノーザンブロッティング
- 7 考察

図表

第三章 変異タンパクの作成と発現

38

- 1 はじめに
- 2 発現コンストラクトの作製
- 3 発現
- 4 細胞染色
- 5 考察

図

第四章 膜結合性 PAF アセチルヒドロラーゼの解析

49

- 1 はじめに
- 2 材料
- 3 活性の測定及びウエスタンブロッティングについて
- 4 分布の検討
- 5 膜結合性酵素の同定
- 6 膜結合機構の検討
- 7 考察

図

第五章 総括

65

図

参考文献

69

謝辞

第一章 序論

血小板活性化因子 (PAF) は、図 1-1 に示したように、リン脂質の構造を持つメディエーターで、極微量で強力かつ多彩な生理機能を持つメディエーターである。(1-5) PAF アセチルヒドロラーゼ (PAF-AH) は PAF のグリセロ骨格 2 位のアセチル基を加水分解することにより、生理的に不活性なリゾ PAF への変換を触媒する酵素である(6-9)。PAF-AH 活性は、血漿中や広く組織中に存在することが知られていたが、特に組織中の酵素について、その実体は全く不明であった。

血漿中の酵素については、2つのグループによって解析が進められ、精製及び遺伝子クローニングがなされている(10-15)。精製の結果から、血漿型の PAF-AH がモノマー構造を持つ酵素であることが明らかにされた。また、遺伝子クローニングの結果から、活性中心にセリン残基を持ち、リパーゼファミリーに属することが明らかにされている。

我々の研究室では、主に組織中の活性について解析を行ってきた。初めに、ウシの脳可溶性画分中の PAF-AH 活性を DEAE Sepharose カラムにかけることにより、活性が二本のピークに溶出されることを見出し、これらをそれぞれ I、II と名付けた (図 1-2)。I の画分を Hydroxylapatite カラムにアブライすると、さらに二本のピークに分離されたことからこれらを I a、I b と名付けた (図 1-2)。これらのアイソフォームについて性状解析を行った結果について図 1-3 にまとめた。

ウシの脳に最も多く存在していた I b 型 PAF-AH について、当教室の服部博士により、完全精製及び cDNA クローニングがなされた(16-19)。組織からの PAF-AH の精製は、この I b 型酵素が初めてであった。精製の結果、I b 型酵素が 45、30、29 kDa のヘテロトリマー構造を持ち、血漿型の酵素とは異なる構造を持つことが明らかとなった。また、遺伝子クローニングの結果から、30、29 kDa の二つのサブユニットが活性サブユニットであること、及び、活性中心はいずれもセリン残基であるがセリン

エステラーゼのコンセンサス配列を持たないユニークな構造を持つことが明らかとなった。さらに、45 kDa サブユニットが滑脳症の一種である Miller-Dieker 症候群の原因遺伝子産物と同一であることが明らかとなった(17)。つまり、このことは、I b 型 PAF-AH が脳の形態形成に関与していることを示している。

ところで、私は修士課程において臓器によって I a、I b、II の三つのピークの活性の強さが異なることを見出した(図 1-2)。さらに、抗体等を用いた性状解析の結果、I a 型が I b 型の活性ユニット(30、29 kDa のヘテロダイマー)と同一であることを明らかにした(20)。また、II 型 PAF-AH の精製を行い、本酵素が 40 kDa のモノマー構造をとることを明らかにした(21)。つまり、ヘテロダイマーまたはヘテロトリマー構造を持つ I 型とは異なる構造を有することを明らかにした。さらに、部分アミノ酸配列から、II 型酵素が新規のタンパクであることも明らかにした。

次に、PAF-AH の生理機能についてこれまでの知見をまとめたい。まず、血漿型の酵素については、リコンビナント酵素を予め投与しておくことで PAF 投与によって誘導される炎症を抑制することが報告されている(12)。しかし、日本人の 4% が血漿型酵素のホモ欠損者(約 25% がヘテロ欠損者)であることが報告されており(22)、血漿型 PAF-AH の欠損によって直ちに重篤な症状を示すことはないと考えられる。これについては、血球細胞が細胞外の PAF を取り込んで分解する活性を持つことが報告されており(2, 5)、細胞内型の酵素によって代償されるのではないかと考えている。

また、血漿型の酵素は、PAF だけでなく酸化リン脂質をも分解する活性があることが報告されている(23-25)。酸化リン脂質はリン脂質の不飽和脂肪酸側鎖が酸化され二重結合部位が開裂して生じるが、酸化リン脂質と PAF はともにグリセロ骨格 2 位の側鎖の疎水性が比較的低いという共通の物性を持ち、酸化リン脂質の中には PAF 受容体に結合し、炎症反応の増悪などの毒性を持つものがあることが知られている(26)。このような毒性を持つ酸化リン脂質の分解は、ホスホリパーゼによって酸化された側鎖が切り出されることで始まると考えられている(27, 28, 29)。PAF-AH 以

外にもリゾレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) にもこの反応を触媒する活性があることが報告されている(30)が、それぞれがどの程度寄与しているかは今のところ不明である。

次に、組織型の酵素についてであるが、まず、PAF は細胞外で働くメデイエーターにもかかわらず、なぜ細胞内に PAF-AH が存在しているのかということが疑問に思われると思う。我々の研究によって細胞内 PAF-AH の実体が明らかになるまでに、その機能について以下の三つの可能性が考えられていた。第一に、先程も述べたように細胞外の PAF を取り込んで細胞内で分解しているという可能性、第二に、PAF の産生量を調節しているという可能性、第三に、血漿型の酵素と同様に PAF だけでなくリン脂質の不飽和脂肪酸側鎖が酸化されて生じる酸化リン脂質の分解に機能しているという三つの可能性である。

第一の可能性については、好中球や血小板などにおいて細胞外の PAF を効率よく加水分解することが調べられている。また、第二の可能性については、1、合成された PAF の大部分が細胞内にとどまること(31-33)、2、血小板をあらかじめ PMSF で処理すると、トロンビン刺激後の PAF 産生量の増加が見られること(34)等の報告から示唆されている。

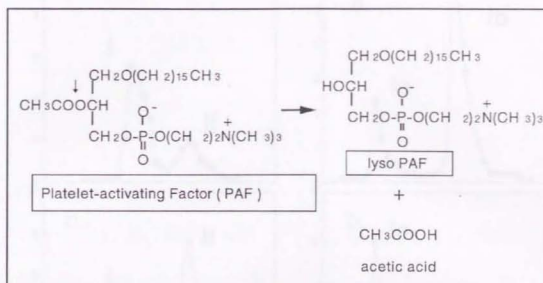
第三の可能性であるが、我々は、当初、酸化リン脂質を基質として組織可溶性画分から酸化リン脂質分解酵素を同定しようとしていたが、カラム上の挙動から、酸化リン脂質分解活性と PAF 分解活性が同一の酵素によって担われていることが示唆された(35)。そこで、基質としてより扱いやすく単一の物質である PAF を用いてその後の解析を行うこととし、細胞内の PAF-AH の実体を明らかにしてきた。細胞内の 2 種の酵素について基質特異性を検討したところ、I 型酵素は PAF のグリセロ骨格 2 位のアセチル基に特異性が高く、II 型酵素は I 型酵素と比べ 2 位の側鎖に対する特異性が低く、酸化リン脂質分解活性が強いことが明らかとなった(21)。したがって、細胞内の酸化リン脂質の代謝は主に II 型 PAF-AH によって担われていると考えている。

遺伝子クローニングの結果、I 型酵素の 45 kDa サブユニットが

Miller-Dieker 症候群の原因遺伝子産物と同一であること、および、活性サブユニットは一次構造上他のタンパクと全く相同性を持たないことが明らかとなった。しかし、X線構造解析の結果から、活性サブユニットがスモール G タンパクの RAS や三量体 G タンパクの α サブユニットとよく似た高次構造を持つことが明らかになった(36)。また、Miller-Dieker 症候群は、神経細胞の移動が阻害され、脳回が形成されなくなることが明らかにされている。現在、我々の研究室では、PAF-AH と神経細胞移動の関連について解析を行っており、PAF を介した新規のシグナル伝達機構を明らかにすることを目指している。

II 型酵素についてもその構造を明らかにすることにより、生理機能解明のための糸口が得られることが期待されたので、私は博士課程において、遺伝子クローニングを含め構造についての解析を中心に研究を行った。また、精製の過程において II 型酵素が常に一本のピークとして挙動したことから、可溶性画分の PAF-AH 活性は I 型酵素と II 型酵素でほぼ説明がつくと考えられた。しかし、様々な動物組織において可溶性画分だけではなく、膜画分にも PAF-AH 活性が存在することが知られていた(37, 38)。そこで、組織中の PAF-AH の全体像を明らかにする目的で膜結合性の PAF-AH 活性についても解析を行った。

図1-1 PAFアセチルヒドロラーゼ



1. 細胞外（血漿）型

分子量 43 kDa

リボタンパクと結合している。

2. 細胞内型

2-1 I型

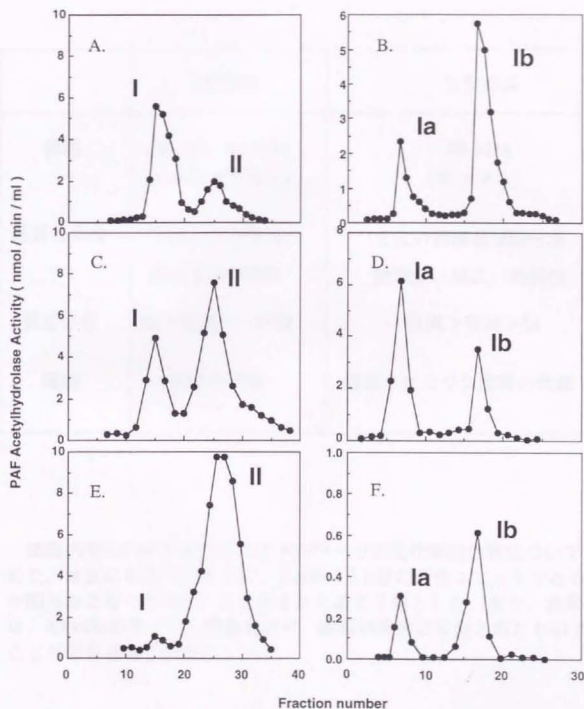
Ia 29、30 kDaサブユニットからなるヘテロダイマー

Ib 29、30、45 kDaサブユニットからなるヘテロトリマー

2-2 II型

40 kDaのモノマー

図1-2 脳、腎臓、肝臓の各アイソフォームのカラムによる分離



A.~F.は、それぞれ A.脳のDEAE、B.脳のHydroxylapatite、C.腎臓のDEAE、D.腎臓のHydroxylapatite、E.肝臓のDEAE、F.肝臓のHydroxylapatiteのカラムパターンを表している。

図1-3 細胞内型PAFアセチルヒドロラーゼの生化学的性状

	I 型酵素	II 型酵素
構造	29-, 30-, 45-kDa (ヘテロトリマー)	40-kDa (モノマー)
基質特異性	2 位のアセチル 基に高い特異性	2 位の短鎖及び酸化脂 肪酸鎖に幅広い特異性
臓器分布	脳>腎臓>肝臓	肝臓>腎臓>脳
機能	PAFの代謝	修飾されたリン脂質の代謝?

細胞内型のPAFアセチルヒドロラーゼの生化学的性状についてまとめた。本文にも述べたように、I a型はI b型の活性ユニットであることが明らかとなったので、これらをまとめてI型とした。また、血漿型は、43 kDaのモノマー構造をとり、基質特異性はII型と似たものであることが報告されている。

2.1.1 cDNA クローニング

2.1.1.1 cDNA の合成とクローニング

まず、mRNA を逆転写酵素 (reverse transcriptase) を用いて cDNA (complementary DNA) とする。mRNA は 5' 末端に帽子 (cap) を持ち、3' 末端に poly(A) 尾 (poly(A) tail) を持つ。逆転写酵素は mRNA の 5' 末端の帽子を認識し、そこにプライマーを結合させる。プライマーは、mRNA の 5' 末端の帽子に結合する。逆転写酵素は、mRNA の 3' 末端の poly(A) 尾を認識し、そこにプライマーを結合させる。逆転写酵素は、mRNA の 5' 末端の帽子と 3' 末端の poly(A) 尾の間を逆転写し、cDNA を合成する。

cDNA は、mRNA のコピーである。cDNA は、mRNA の 5' 末端の帽子と 3' 末端の poly(A) 尾の間を逆転写し、cDNA を合成する。cDNA は、mRNA のコピーである。cDNA は、mRNA の 5' 末端の帽子と 3' 末端の poly(A) 尾の間を逆転写し、cDNA を合成する。

第二章 cDNA クローニング

cDNA クローニングとは、cDNA を DNA ベンチに挿入し、それを複製させることです。

cDNA クローニングには、いくつかの方法があります。最も一般的なのは、cDNA を DNA ベンチに挿入し、それを複製させることです。

cDNA クローニングには、いくつかの方法があります。最も一般的なのは、cDNA を DNA ベンチに挿入し、それを複製させることです。

cDNA クローニングには、いくつかの方法があります。最も一般的なのは、cDNA を DNA ベンチに挿入し、それを複製させることです。

第二章 cDNA クローニング

1 はじめに

私は、修士課程において、II型 PAF アセチルヒドロラーゼ (PAF-AH) の精製及び部分アミノ酸配列の解析を行い、本酵素が新規の酵素であることを明らかにした。すなわち、本酵素が先に精製及び遺伝子クローニングされた I 型 PAF-AH とは異なる酵素であることを明らかにした。また、I 型酵素と II 型酵素は、構造だけでなく、基質特異性や臓器分布も異なることを明らかにしたが、これらの結果から I 型酵素と II 型酵素が異なる生理機能を担っていることが示唆された。

II 型酵素についても遺伝子クローニングを行うことにより、一次構造が明らかになるだけでなく、mRNA レベルでの発現調節機構の解析や、過剰発現及び発現抑制が可能となることが期待できる。そこで、本酵素の生理機能解明の糸口を得ることを目的として、遺伝子クローニングを行った。

2 部分アミノ酸配列

2-1 材料

本酵素は、ウシの肝臓より修士論文に記したような方法を用いて精製した。試薬類は、トリスはシグマ社のものを、尿素は和光純薬工業の生化学用のものを、その他は和光純薬工業の HPLC 用または特級を用いた。

2-1 方法と結果

本酵素の精製法については省略するが、どのくらいの精製標品を得たかなどについては精製表 (表 2-1) に示した。

本酵素の精製標品 50 μ g を逆相 HPLC にてさらに精製した後、還元ビリジルエチル化を行い、CNBr にて分解し、そのペプチド断片のアミノ酸配

列を決定した。その後、4 倍量の精製標品を同様に分解し、アミノ酸配列の確認を行った。

カラムは、Vydac の Protein C4 (ϕ 4.6 X 150 mm) を、HPLC システムは、島津製作所の LC-7A を用いた。逆相 HPLC の条件は、流速 1.2 ml/min で、タンパクの検出は 215 nm の吸光度測定によった。カラムは、あらかじめ 0.1% TFA を含む 20% アセトニトリルで平衡化し、表 2-2 に示すようなプログラムにより、20% から 85% のアセトニトリルの直線濃度勾配で溶出を行った。その結果、アセトニトリル濃度約 55% の位置に溶出された (図 2-1)。

このカラム後のサンプル、約 7.5 μ g (二回目は約 60 μ g) を蒸発乾固させた後、0.1% SDS を含むビリジルエチル化緩衝液 (1 M Tris-HCl (pH 8.0), 8 M Urea, 2 mM EDTA-3Na, 10 mg/ml DTT) を 10 μ l 加え、ボルテックスとソニケーションにより溶解させた後、さらにビリジルエチル化緩衝液 90 μ l を加え、ボルテックスし、室温に 2 時間おき、還元反応を行った。つぎに、4-vinylpyridine 2 μ l を加え、2 時間室温におき、ビリジルエチル化反応を行った。

還元ビリジルエチル化反応後、ゲルろ過カラムによる脱塩と溶液交換を行った。カラムは、ツベルクリン用注射筒 (1ml) に Sephadex G-25 (Pharmacia) のゲルをつめたものを用いた。カラムは 70% のギ酸で平衡化し、サンプルには 100 μ l のギ酸を加え、50% ギ酸溶液としてから、アブライした。脱塩したサンプルを遠心エバポレーターで 80 μ l に濃縮した後、5% CNBr を含む 70% ギ酸溶液を 20 μ l 加え、室温で 16 時間反応させた。

反応後、蒸発乾固させ、7 M 塩酸グアニジン溶液 300 μ l に溶解し、逆相 HPLC にて断片の分離を行った。カラムは、断片化前と同様に Vydac の Protein C4 を用い、表 2-2 に示したように、5-70% アセトニトリルの直線濃度勾配により溶出を行った。その他の条件は、断片化前と同じ条件で行った。その結果、図 2-2 に示したような溶出パターンが得られた。

これらのペプチド断片を自動アミノ酸シーケンサーにアブライシ、表

2-3 に示すような部分アミノ酸配列が得られた。

3 cDNA クローニング

3-1 材料

ウシの肝臓及び腎臓は、東京芝浦臓器にて購入した。これらの臓器は、東京芝浦臓器で受け取りの時点に液体窒素により急速凍結し、そのままドライアイスではさんで輸送した。cDNA ライブラリー合成キット及び Electro Max DH 10 B コンピテントセルは Life Technologies より購入した。シークエンスは ABI 社製の Dye-deoxy Terminator シークエンスキット及び自動シークエンサー 373A を用いて行った。また、ハイブリダイゼーションの検出は、ECLTM labeling and detection system (Amersham) を用いた。遺伝子工学関連キット類はタカラ社製のものを、その他試薬は和光純薬工業の特級を用いた。COS7 細胞は理研細胞バンクから取り寄せた。培養には、10% FCS (Fetal Calf Serum) を含む DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) を用いた。II 型 PAF-AH のモノクローナル抗体は、当教室の松沢博士により樹立された 7F7 ハイブリドーマの培養上清を用いた (この抗体は、ウシ肝臓より精製したタンパクを抗原として作製された) (38)。

3-2 方法と結果

(A) cDNA ライブラリーの作製

凍結した臓器を小槌にてたたいて碎き、その断片約 1 g に対して、Isogen (和光純薬工業) 10ml を加え、ポリトロンを用いてホモジェナイズし、RNA の抽出を行った。total RNA の精製は、常法 (AGPC 法(40)) に従ったので、省略する。この total RNA をさらに BIOMAG キット (PerSeptive Biosystems) により poly A RNA に精製し、cDNA 合成に用いた。

cDNA 合成は、Life Technologies の SUPERSCRIPTM Plasmid System を用いた。ここまでの過程は、肝臓及び腎臓のそれぞれの臓器に対して行ったが、肝臓から抽出した RNA よりも腎臓から抽出した RNA の方がより分解を受けていない状態のものが得られたので、ベクターへの組み込みと大腸菌へのトランスフォーメーションは腎臓の cDNA についてのみ行った。腎臓の cDNA は、Not I アダプター及び Sal I アダプターを付加し、pSPORT 1 ベクターの Not I サイトと Sal I サイトに組み込み、これを Electro Max DH 10B コンピテントセルにエレクトロポレーション法によりトランスフォーメーションした。その結果、約 960,000 clone の組み換え体を得た。

(B) MOPAC

本酵素の部分アミノ酸配列 (図 3-2) を元に様々なプライマーを合成し、MOPAC (mixed oligonucleotide primed amplification cloning) (41)を行った。テンプレートとして、ウシの腎臓と肝臓から抽出した mRNA から合成した cDNA の混合物を用いた。PCR の条件は、94℃で1分、60℃で1分、72℃で2分を35サイクルとした。その結果、100 通り以上の組み合わせの中で表 2-3 に下線で示したプライマーの組み合わせ、QEAEET に対応する forward primer、CARGARGCNGARGARAC と EEWIPH に対応する reverse primer、CKRTGNGGDATCCAYTC の組み合わせでのみ約 380 bp の断片が増幅されてきた。この断片を T ベクター (Pharmacia) に組み込み、シークエンスしたところ、図 2-3 に示すような結果が得られ、部分アミノ酸配列を含んでいたことから、これが本酵素の cDNA に由来することが確認された。そこで、GAATGGATCCCCACCG と CAAGAGGCAGAGGAGAC のプライマー (specific primer) を合成し、PCR を用いて cDNA ライブラリーからのスクリーニングを行うこととした。

(C) cDNA ライブラリーのスクリーニング

本酵素の精製に当たってはもっとも比活性の高い肝臓を材料に行ったが、ライブラリーの作製に当たり、RNA の抽出が腎臓の方が容易であったため、腎臓の方がよいライブラリーを作製できることが期待された。そこで、クローニングは腎臓の cDNA ライブラリーより行った。スクリーニングは以下の通り、PCR (42) とコロニーハイブリダイゼーション法 (43) の二つの方法を使い分け、2 段階で行った。初めに、cDNA ライブラリーを 96 well プレート 5 枚に 2000 clone/well (total 960,000 clones) になるように分注する。一晚静置培養を行った後、菌液を各 well より 0.5 ml ずつ回収する。横 12 列と縦 8 列のそれぞれについて 1 プールとし、これを鋳型とし、PCR (条件は MOPAC のときと同じ、primer は specific primer) を行い、縦と横の組み合わせからポジティブの well を決定した。つぎに、ポジティブの well から菌液を回収し、PCR 断片をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション法によるスクリーニングを行った。検出は、ECL™ labeling and detection system (Amersham) を用いた。

その結果、約 2.5 kbp の cDNA が単離された (図 2-4)。塩基配列から推定される一次構造は 392 残基のアミノ酸からなり、計算上の分子量は 43,864 Da で、精製標品の SDS-PAGE 上の分子量とほぼ一致した。また、図 2-4 に下線で示したように、部分アミノ酸配列をすべて含んでいた。

本酵素の一次構造には 2 つのコンセンサス配列が含まれていた (図 2-5)。アミノ酸 236 番のセリン残基の周辺の配列がセリンエステラーゼの活性中心のコンセンサス配列 (44) Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly と一致しており、N 末端の配列がミリスチン酸修飾のコンセンサス配列 (45) NH₂Met-Gly-Xaa-Xaa-Xaa-Ser と一致していた。

(D) cDNAの動物細胞における発現

クローニングした遺伝子を大腸菌内で発現させたところ、可溶性画分にはほとんど回収されなかったため、動物細胞内での発現を試みた。発現ベクターには、Invitrogen 社の pcDNA3 を用いることとした。このベクターを利用すると、CMV プロモーター支配下に構成的にかつ強力にタンパクを発現させることができる。また、このベクターは SV40 ori を持つので、COS7 細胞内で複製されることにより、トランジェントトランスフェクションにおいて高い発現が期待される。

pcDNA3 ベクターに cDNA の全長を組み込むこととしたが、ベクター側に Sal I サイトがないため、cDNA を Sal I で切断後平滑化し、ベクターの EcoR V サイトとライゲーションさせることとした。すなわち、cDNA を含む pSPORT1 ベクターを Sal I で切断し、平滑化した後、Not I 切断し、1%アガロースゲル電気泳動により精製した。これとあらかじめ EcoR V と Not I で処理した pcDNA3 ベクターをライゲーションさせ、発現コンストラクトを作製した。

この発現ベクターをエレクトロポレーション法を用いて、COS7 細胞にトランジェントトランスフェクションし、本酵素を過剰発現させた。具体的には、COS7 細胞を $1.2-1.5 \times 10^7$ cells 集め、これを 1 ml の K-PBS (NaCl 30.8 mM、KCl 120.7 mM、 Na_2HPO_4 8.1 mM、 KH_2PO_4 1.46 mM、 MgCl_2 5 mM) に懸濁し、二等分する。ここに 30 μg の発現ベクターまたは cDNA を含まない pcDNA3 ベクターをそれぞれ加え、氷冷下 10 分おいた。つぎに、Gene Pulser (BioRad) を用いて、220 V、960 μFD の電気ショックをかけた。氷冷下 10 分おき、血清および抗生物質を含まない DMEM を 1 ml ずつ加えた。さらに室温下 10 分おいた後、150 mm のディッシュにまき、通常通り 10%血清存在下 DMEM で培養した。エレクトロポレーション後 48 時間で細胞を回収し、氷冷下ソニケーション (Branson の sonifier で、目盛り 3、3 秒 3 回でほぼ完全に細胞が壊れる) によりライシスし、1,000 X g、10 分の遠心で核や未破壊の細胞を除いた後、上清を超速心 (100,000 X g、60 分) により可溶性画分と膜画分に分離した。沈殿 (膜

画分)に上清(可溶性画分)と等量のバッファーを加え、ビベッティングによりはぐした後、シリンジを用いて懸濁し、これを膜画分とした。可溶性画分は超遠心後そのまま用いた。

COS7 細胞の親株及びトランスフェクタントについて活性測定及びウエスタンブロッティングを行った。活性測定の方法及びウエスタンブロッティングの方法については、第4章で詳しく述べるので省略する。トランスフェクションしていない親株と Mock トランスフェクタントとでは、PAF-AH 活性にほとんど差がなく、また、ウエスタンブロッティング上ではどちらの細胞においても全くバンドが検出されなかった(図 2-6、2-7)。一方、本酵素の過剰発現細胞においては、PAF-AH の比活性が約 100 倍にまで上昇しており(図 2-6)、ウエスタンブロッティングにおいても約 40 kDa の位置にバンドが検出された(図 2-7)ことから、クローニングした cDNA がⅡ型 PAF-AH のものであることが確認された。さらに、本酵素は可溶性画分から精製されたが、リコンビナントタンパクは、可溶性画分だけでなく膜画分にも分布していることが見いだされた(図 2-6、2-7)。

4 ヒトホモログのクローニング

4-1 材料

cDNA ライブラリーは、SUPERScript™ Human Brain Library (GibcoBRL)を購入した。その他試薬類はウシのクローニングのときと同じものを用いた。

4-2 方法と結果

ウシの酵素の cDNA の翻訳領域をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーション法により、ヒトの酵素をクローニングした。その際、プローブの標識と検出は、ECL™ labeling and detection system (Amersham)

を用いた。

その結果、約 2.5 kbp の cDNA が単離された (図 2-8)。塩基配列より推定される一次構造は、ウシと全く同じ 392 残基のアミノ酸よりなり、88%のアミノ酸が保存されていた (図 2-9)。類似性を有するアミノ酸も含めると、その相同性は 99%であった。また、ウシの酵素に含まれていた二つのコンセンサス配列セリンエステラーゼのコンセンサス配列とミリスチン酸修飾のコンセンサス配列はヒトの酵素においても保存されていた。

5 他のタンパクとの相同性

5-1 方法

他のタンパクとの相同性については、Genome Net World-Wide Web server (アドレス、<http://www.genome.ad.jp>) を利用して検索した。プログラムは BLASTP および FASTA を、データベースは nr (non redundant) を用いた。

5-2 結果

非常に興味深いことに、タンパク全体にわたって、血漿型の PAF-AH と約 40%の相同性を示した (図 2-10)。血漿型の酵素において、活性中心のキャタリティックトライアドを形成しているセリン残基、アスパラギン酸残基、ヒスチジン残基が同定されている(46)が、これら三つのアミノ酸はⅡ型酵素においても保存されていた。

また、*C.elegans* の全ゲノム配列を決定する過程で本酵素と相同性のある遺伝子が見いだされた(47)。これは、cDNA ではなく、genome の配列からの推定であるが、Ⅱ型 PAF-AH と約 30%の相同性を示した (図 2-11)。さらに、この遺伝子産物には N 末端にシグナルシーケンスが無く、細胞内の酵素であると考えられた。*C.elegans* の PAF-AH 活性を測定したこ

とやノーザンブロットング等の解析を行ったこともないので、この遺伝子がどの程度発現しているかは明らかではないが、酵母の genome 中には相同性のある遺伝子は見いだせなかったため、本酵素の進化的側面を考える上で興味深い結果である。

このほかにはタンパク全体にわたって相同性を示すものはなかったが、活性中心付近の配列が図 2-12 に示したようなリパーゼと相同性を有することが見いだされた。これらのリパーゼとは活性中心だけでなく、N 末端側にも相同性を有する部分があった。

6 ノーザンブロットングによる臓器分布の検討

6-1 材料

ヒトのノーザンブロット用フィルターは CLONTECH の Human Multiple Tissue Northern (MTN) Blot を、マウスのノーザンブロット用フィルターはサワディーの Multiple Choice™ Northern Blot mouse type 5 を購入した。ハイブリダイゼーションバッファーは、CLONTECH の ExpressHyb を用いた。レントゲン用フィルム及び現像液は Kodak のものを用いた。その他試薬類は和光純薬工業の特級を用いた。

6-2 方法と結果

ヒトの cDNA の全長をプローブに用いたところ、レーン全体が真っ黒になってしまい、バンドが検出できなかった。おそらくは非翻訳領域に共通配列が存在するためと考え、翻訳領域をプローブとして用いることとした。ヒトの cDNA の翻訳領域を Kpn1 と Apa1 で切り出し、1%アガロースゲル電気泳動で精製したものをプローブとした。プローブの標識には、Amersham の rediprime™ DNA labelling system と redivue[α - 32 P]dCTP を用いた。プローブの精製は Pharmacia の NICK Column (Sephadex G-50、DNA grade) を用いて行った。

プレハイブリは、ハイブリダイゼーションバッファー中に購入したフィルターを浸し、65℃で30分おいた。この間に、標識したプローブを100℃、5分処理した後、水中で急冷した。次に、プレハイブリしたフィルターをハイブリパックにはさみ、3方をシールした後、このプローブを100~200万cpm/mlとなるようハイブリダイゼーションバッファーに加え、ハイブリパックに加え、シールした。気泡を除いてから、65℃で16時間おいた（ハイブリダイゼーションバッファーの説明書によると2~3時間となっているがそれ以上おいても特に問題はない）。ハイブリダイゼーション後、ハイブリパックからフィルターを取り出し、2xSSC (Standard Saline Citrate, 1xSSC; 0.15 M NaCl, 0.15 M Sodium Citrate)、0.05% SDS 溶液で一回すすいだ後、2xSSC、0.05% SDS 溶液中60℃で20分おいて洗った。ここまではヒトとマウスのフィルターを同時に処理した。次に、ヒトのフィルターのみ、0.1xSSC、0.1% SDS 溶液で一回すすいだ後、0.1xSSC、0.1% SDS 溶液中60℃で20分おいて洗った。ヒトのフィルターもマウスのフィルターも洗ったあと、-80℃、40時間、レントゲン用フィルムにexposeした（extensivity screenを一枚入れた）。

その結果、ヒトにおいては、肝臓、脾臓、前立腺などの臓器に比較的高い発現が認められたが、胸腺において非常に強い発現が認められた（図2-13）。この結果は、この他にロットの異なるフィルターを用いて2回確認したが、いずれのフィルターでも同様の結果がえられた。また、胎児においても肝臓に比較的高い発現が見られた（2-14）。マウスでは、肝臓における発現は高かったものの、胸腺における高発現は認められず、極わずかしが発現していなかった（図2-15）。また、データは示さないが、ラットでは肺に最も強く発現しており、肝臓にも比較的高い発現が認められたが、胸腺にはほとんど発現していなかった。以上のように、本酵素の臓器分布は動物によって大きく異なっていた。強い共通点をあげるならば、強さの差はあるもののほとんど全ての臓器に発現が認められるということであると思う。

7 考察

細胞内Ⅱ型 PAF-AH は、cDNA クローニングの結果、ホスホリパーゼとは全く相同性を持たず、セリンエステラーゼのコンセンサス配列を持ち、リパーゼファミリーに属する酵素であることが分かった。私は修士課程において、活性セリン残基特異的修飾試薬ジイソプロピルフルオロフォスフェイト (DFP) により本酵素の活性が完全に阻害されることを見出し、本酵素の活性中心がセリン残基であると予想していたが、一次構造からも、Ser236 が活性中心であることが示唆された。また、Ⅱ型 PAF-AH とリパーゼは活性中心付近の配列だけでなく、N 末端側にも相同性の高い部位が存在していた。この部分がこれらの酵素の間で共通の機能を担っていると推測される。バクテリアのリパーゼについて X 線構造解析の結果が報告されている(48)が、この部位は活性中心近くに位置することが明らかにされている。Ⅱ型 PAF-AH においてもこの部位が活性中心近くに位置すると予想され、この部位が基質との結合に関与していると推測している。現在、Ⅱ型 PAF-AH についても X 線構造解析を進めており、その結果が待たれる。

本酵素の一次構造中には、このほかにミリスチン酸修飾のコンセンサス配列が存在しており、実際にミリスチン酸修飾されることが確認された。これはリパーゼの中では初めての例で、本酵素がユニークな構造を持つことが分かった。

また、これまでヒトの組織を用いて PAF-AH の活性を測定したことはなかったが、ヒトのⅡ型 PAF-AH の cDNA クローニングの結果、ヒトにもⅡ型酵素が存在し、本酵素がウシとヒトで良く保存されていることが分かった。

本酵素と他のタンパクとの相同性を調べた結果、興味深いことに、血漿型の PAF-AH と約 40% の相同性を示すことが見いだされた。基質特異性およびサブユニット組成から、血漿型の PAF-AH とⅡ型酵素が似た性質を持つことが分かっていたが、一次構造の上でもこれらの酵素が高い相同

性を示したことから、共通の遺伝子から進化してきたと考えられる。一方、Ⅰ型酵素は、生化学的な性状だけでなく、一次構造からもこれらの酵素とは全く異なるというが明らかとなった。

C.elegans にも相同性のあるタンパクが見いだされたが、*C.elegans* には PAF が存在しないこと、および、リン脂質中に不飽和脂肪酸を比較的多く含むことが報告されている(49)。このことは、生体内においてもⅡ型 PAF-AH が酸化リン脂質を分解している可能性を示しており、本酵素の生理機能を考える上で興味深い結果である。

血漿型の酵素とⅡ型酵素のように細胞の内外で相同性のある酵素の例として、グルタチオンペルオキシダーゼ(50)やスーパーオキシドディスムターゼ(51)があげられる。これらの酵素も細胞内型と細胞外型が 30～40%の相同性を示す。一般に細胞の中と外では基質濃度等が大きく異なり、相同性のある酵素が存在する例は少ない。PAF-AH の生理機能を考える上で、これらの抗酸素ストレス酵素と類似して、細胞の内外で相同性の高いアイソフォームが存在しているというのは、非常に興味深い点であると考えられる。

最後に本酵素の臓器分布の結果であるが、ヒトにおいて胸腺に非常に強い発現が認められたのは大変面白い結果であるが、なぜヒトにおいてのみこのような発現を示すのかについては今後の課題である。

(表 2-1) 細胞内Ⅱ型 PAF アセチルヒドロラーゼの精製表

(完全精製時の精製表)

Step	Total Protein (mg)	Total Activity (mmol/min)	Specific Activity (nmol/min/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
<i>Cytosol</i>	46000	73.5	1.6	1	100
<i>Butyl Toyopearl</i>	680	16.3	24	15	22
<i>Q Sepharose</i>	72.4	8.96	124	78	12
<i>Bio Gel A-1.5m</i>	6.93	7.38	1060	670	10
<i>Hydroxylaplite</i>	3.45	5.29	1530	1530	7.2
<i>Mono Q FPLC</i>	0.3	2.16	7200	4500	2.9

(大量精製時の精製表)

Step	Total Protein (mg)	Total Activity (mmol/min)	Specific Activity (nmol/min/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
<i>Cytosol</i>	184000	303	1.6	1	100
<i>Butyl Toyopearl</i>	3960	90.3	22.8	14	30
<i>Q Sepharose</i>	540	69.0	128	80	23
<i>Bio Gel A-1.5m</i>	55.7	49.6	890	560	16
<i>Hydroxylaplite</i>	16.7	34.5	2066	1290	11
<i>Mono Q FPLC</i>	2	11	5500	3400	3.6

完全精製の時と比べ、約 4 倍量の肝臓から大量精製を行いアミノ酸シーケンスの材料とした。このとき、回収率を優先したため、若干夾雑タンパクが多くなってしまった。

(表 2-2) HPLC プログラム

(断片化前)

Time (min)	Conc. Acetonitrile (%)
0	20
3	20
68	85
68.1	95
73	95
73.1	Stop

(断片化後)

Time (min)	Conc. Acetonitrile (%)
0	5
3	5
68	70
68.1	95
73	95
73.1	Stop

RP-HPLC のプログラムは以上のようにした。流速は、いずれのときも 1.2 ml/min でタンパクの検出は、215 nm の吸光度によった。カラムは、Vydac 製の protein C4 (φ 4.6 X 150 mm) を使用した。また、0.1% TFA を含む溶出液を用いてカラム操作を行った。

(表 2-3) 精製標品から得られた部分アミノ酸シーケンス

(CNBr 分解断片)

- fr. 17 QFRCAVALDAW
- fr. 18 GAFRTVYSAFC
- fr. 20 EGQSLKGSFFRLFYPCQEAETSE (forward)
- fr. 37 LAFLQKHLCLKEDYDQWNNFIEGFIEGIGPSLTIGAPH

(Lysylendopeptidase 消化断片)

- fr. 19.6 EEWLPHRQIEEG (reverse)
- fr. 24.6 EFYVRNYQVHRVSESVRV

この配列を元に様々なプライマーを合成し、100 通り以上の MOPAC を行ったが、断片が増幅されてきたのは、下線で示した部分のプライマーの組み合わせのみであった。

図2-1 断片化前のRP-HPLCのカラムパターンと各ピークのSDS-PAGEの結果

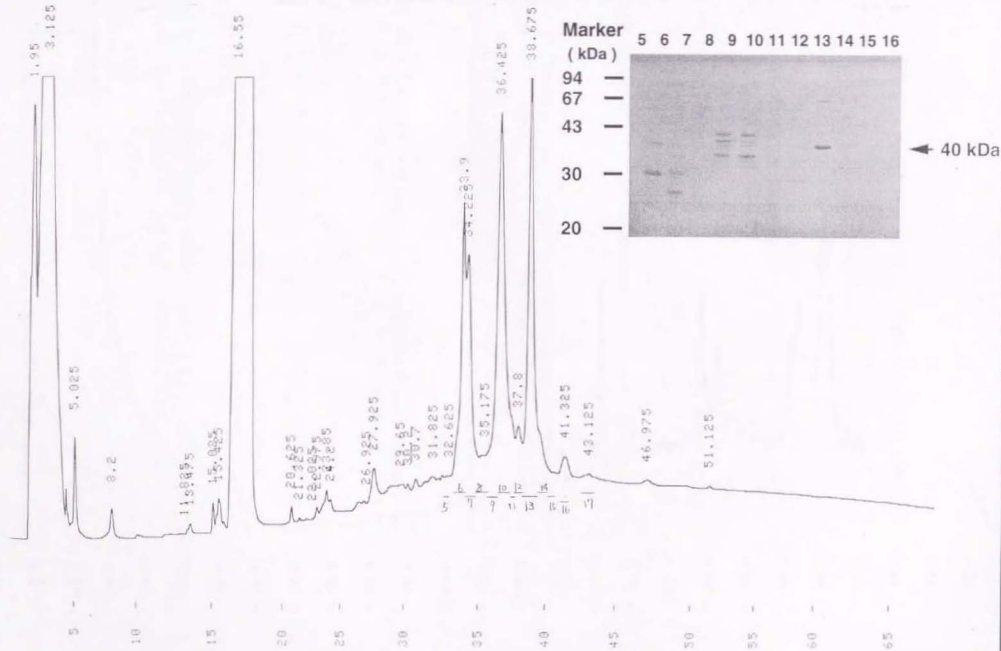


図2-2 断片化後のRP-HPLCのカラムパターン

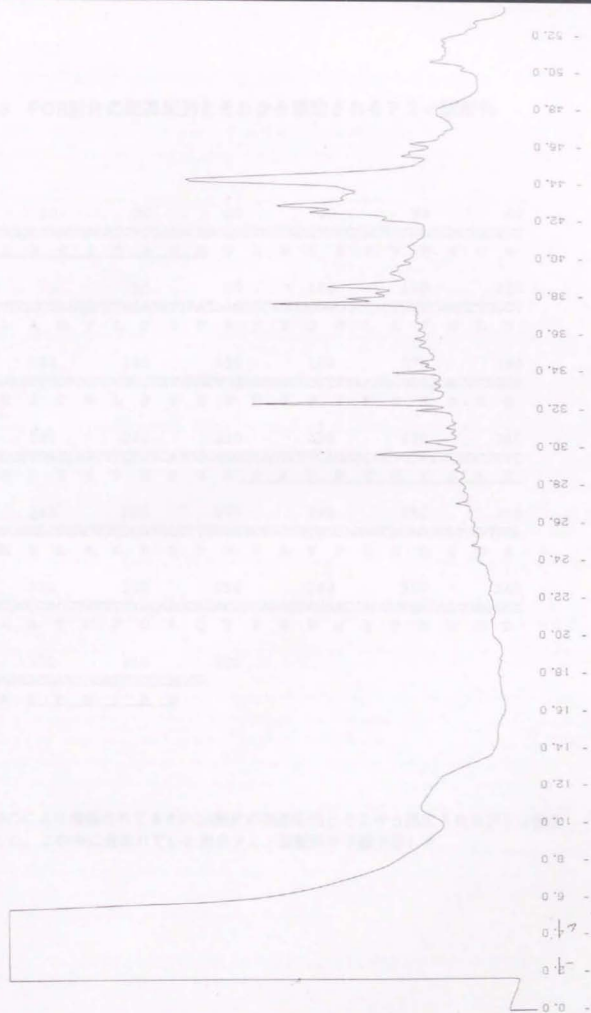


図2-3 PCR断片の塩基配列とそれから推定されるアミノ酸配列

10	20	30	40	50	60
CAGGAGGCGGAGGAGACCTCGGAGCAGCCCCGTGGATTCCCGCTATGAGTACTGCGCT					
<u>Q E A E E T S E Q P L W I P R Y E Y C A</u>					
70	80	90	100	110	120
GGCCTGGCCGAATACCTAAAGATTAATAAGCGCTGGGGGGGTACTGTTCAACCTGGGT					
G L A E Y L K I N K R W G G L L F N L G					
130	140	150	160	170	180
GTGGGATCTTGTCGCGCTGCCTGTTAGCTGGAATGGCCCCCTTTAAACAAGGACTCTGGA					
V G S C R L P V S W N G P F K T K D S G					
190	200	210	220	230	240
TACCCCTTGATCATCTTCTCTCATGGCATGGGAGCCTTCAGGACAGTGTATTCAGCCTTC					
<u>Y P L I I F S H G M G A F R T V Y S A F</u>					
250	260	270	280	290	300
TGCATGGAGCTGGCTTCTCGTGGCTTGTGGTTGCTGTACCAGAGCACAGGGATGGGTCA					
<u>C M E L A S R G F V V A V P E H R D G S</u>					
310	320	330	340	350	360
GCTGCGGCCACCTGTTTCTGCAAGCAGACCCAGAGGAGAACCAGCCTGACAATGAGGCC					
A A A T C F C K Q T P E E N Q P D N E A					
370	380	390			
CTGAAGGAGGAATGGATCCCCACCG					
<u>L K E E W I P H</u>					

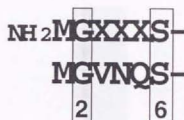
MOPACにより増幅されてきたPCR断片の塩基配列とそこから推定されるアミノ酸配列を示した。この中に含まれていた部分アミノ酸配列を下線で示した。

[illegible]

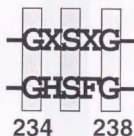
26

図2-5 II型PAF-AHの一次構造中に含まれるコンセンサス配列

Myristylation Motif

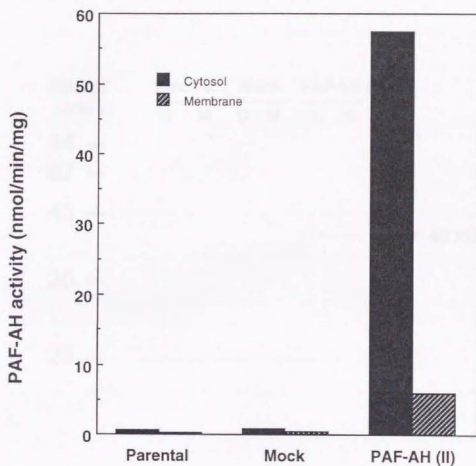


Active Serine Motif



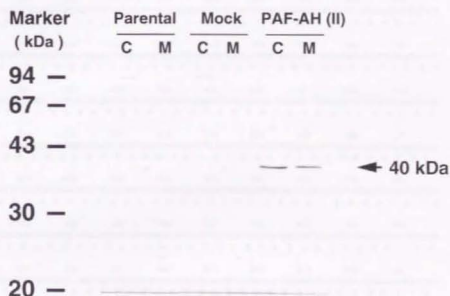
II型PAF-AHの一次構造中にはこの図に示したようにセリンセステラーゼのコンセンサス配列とミリスチン酸修飾のコンセンサス配列が含まれていた。この図に示した部分の一次構造はウシの酵素とヒトの酵素の間で完全に保存されていた。

図2-6 II型PAF-AHのトランスフェクタントのPAF-AH活性



COS7細胞にエレクトロポレーション法を用いてトランジェントトランスフェクションし、超遠心により細胞質画分と膜画分を分画し、それぞれのPAF-AH活性を測定した。

図2-7 COS7トランスフェクタントのウエスタンブロッティング



II型PAF-AHをエレクトロポレーション法により、COS7細胞にトランジェントトランスフェクションし、超遠心により細胞質画分と膜画分を分画し、7F7モノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

図のCはcytosol画分、Mは膜画分である。

図2-8 ヒトⅡ型PAF-AHのcDNAの塩基配列とそこから推定されるアミノ酸配列

[illegible]

図2-9 ウシとヒトのⅡ型PAF-AHのアミノ酸配列の比較

```

1*  MGVNQSVSFPVTPGPHLVGCGDVMGQSLQGSFFRLFYPCQAEETSEQPLWI PRYEYCA
*****
1*  MGVNQSVGFPPVTGPHLVGCGDVMGQNLQGSFFRLFYPCQAEETMEQPLWI PRYEYCT

61* GLAEYLKFNKRWGGLLFNLGVGSCRLPVSWNGPFKTKDSGYPLIIFSHGMGAFTVYSAF
*****
61* GLAEYLQFNKRCGGLLFNLAVGSCRLPVSWNGPFKTKDSGYPLIIFSHGLGAFRTLYSAF

121* CMELASRGFVVAVPEHRDGSAAATCFCKQTPPENQPDNEALKEEWIPHRQIEEGEKEFYV
*****
121* CMELASRGFVVAVPEHRDRSAATTYPCKQAPENQPTNESLQEEWIPFRRVEEKEKEFHV

181* RNYQVHQRVSECVRLKILQEVTAGQAVLNILPGGLDMLTKGGIDVSRVAVMGH*SGGA
**
181* RNPQVHQRVSECLRVLKILQEVTAGQTVFNILPGGLDMLTKGNIDMSRVAVMGH*SGGA

241* TAILALAKEMQFRCAVALDAWMFPLEHDFYPTARGPIFFINA EK FQT VETVNL MKKICDQ
*****
241* TAILALAKETQFRCAVALDAWMFPLERDFYPKARGPVFFINTEKFQTMESVNL MKKICAQ

301* HHQSRIITVLGVSVHRS LTDFV FVAGN WISKFFSSHTRGSLDPYEGQETVVRAMLAF LQKH
*
301* HEQSRIITVLGVSVHRSQTDFAFVTGNLIGKFFSTETRGSLDPYEGQEV MVRAMLAF LQKH

361* LDLKEDYDQWN NFIEGIGPSLTPGAPPHLSSL
*****
361* LDLKEDYNQWN NIEGIGPSLTPGAPPHLSSL

```

上段にウシ、下段にヒトのⅡ型PAF-AHのアミノ酸配列を示した。アミノ酸番号を左端に、両者の間で保存されているアミノ酸を(*)、両者の間で保存されていないアミノ酸を(.)で示した。また、コンセンサス配列から活性中心と予想されるセリン残基を白抜きで示した。

図2-10 II型PAF-AHと血漿型PAF-AHのアミノ酸配列の比較

```

1*                                     MGVNQSGVFPPVT
1* MVPPKLVHVFCLCGCLAVVYFFDWQYINPVAHMKSSAWVNKIQVLMAAA SFGQTKIPRGN
14* GPHLVGCGDVMSQNLQGSFFRLFYPCQKAEETMBQPLWIPRYEYCTGLAEYLQFNKRCG
61* GPYSVSGCTDLMFDHTNKGTFLLRLLYPSQ-DNDRLD-TLWIPNKEYFWGLSKFLGTHWLMG
74* GLLFNLA VSGSCLPVS WNGPFFKTDSGYPLIIFSHGLGAFRTLYSAFCMELASRGFVVAV
119* NIL-RLFGSMTTPANWNSPLRPGKE-YPLVVFSHGLGAFRTLYSAIGIDLASHGPIVAA
134* FEHRDRSAATTYFCKQAPENQPTNESLQEEWIPFRVVEGGEKEPHVRNPQVHQRVSECL
177* VEHRDRSASATYYFK-----DQSAAEIGDKSWL-YLRTLKQEEETHIRNEQVRQRAKES
194* RVLKILQEVTAQTTFVNLPGGLDMLTKGNIDMSRVAVMGHSPFGGATAILALAKETQFR
231* QALSILIDIDHGKPVKNALDLKFDMEQLKDSIDREKIAVIG:SPGGATVIQTLSAQFRFR
254* CAVALDAWMFPLERDFYPKARGPVFFINTEKFQTMESVNLKKICAQHEQSRIITVLGSV
291* CGIALDAWMFPLGDEVYSRIPOPLFFINSEYFYYPANIIKMKKCYSPDKERKMITIRGSV
314* HRSQTDFAFVTGNLIGKFFSTETRGSLDPYEGQEV MVRAMLAPLQKHLDLKEDYNQWNNL
351* QNFADFTFATGKIIGHML--KLKGDIDSNVAIDL SNKASLAPLQKHLGLHKDFDQWDCL
374* IEGIGPSLTPGAPHLSSL
409* IEGDDENLIPGTNINTTNQHIMLQNSSGIEKYN

```

上段にII型、下段に血漿型のPAF-AHのアミノ酸配列を示した。アミノ酸番号を左端に、両者の間で保存されているアミノ酸を(*)、両者の間で類似しているアミノ酸を(.)で示した。また、血漿型で固定されている活性中心を形成しているセリン、アスパラギン酸、ヒスチジン残基を白抜きで示した。下線は、シグナルシーケンスを示している。

図2-11 ヒトのⅡ型PAF-AHとC.elegansのホモログとの
アミノ酸配列の比較

```

1'          MGVMQSVGFPPVTGPHLVGCGDVM-EGQNL--QGSFFRLFYPCQK
          *..* ** *..* *..* ** *..*
61' QTNFSYFYSLYTGSGYISSPQVLTRQVSGQPQVGCKDLMDGTVLGDRGLFMRLYFPTDS
          *..* ** *..* *..* ** *..*
43' AEETMEQ-PLNIPRYEYCTGLAEYLQFNKRCGGLLFNLA VSGSCLFVSWNGPFKTKDSGY
          *..* ** *..* *..* ** *..*
121' QAADISSYPLNLKPKQYAHGLGEYLQSSQKMNVTSTVVGKREDCIENAMSTKCDKW
          *..* ** *..* *..* ** *..*
102' PLIIFSHGLGAPRTLYSAFCMELASRGFVVAVPEH-----RDRSAATTYFCQAPE----
          *..* ** *..* *..* ** *..*
181' PIVVFSHGLGGSRTFYSTYCTSLASHGYVVAAVEHKWGKSGGRCDHVFASCRDHSACWTY
          *..* ** *..* *..* ** *..*
153' ENQPTNESLQEEWIPFRRVEEGEK-EFHVNRNPQVHQVSECLRLVKILQEVTAGQTVFNI
          *..* ** *..* *..* ** *..*
241' QLTEKNGELVEQPIKIKLIEKNEKNEFKIRNQVQKRVTECVKALNVLEQLNLGTVPKEV
          *..* ** *..* *..* ** *..*
212' LPG-GLDMLTKGNIDMSRVAVMGE*GGGATAILALAKETQFRCAVALDAMFPLERDFY
          *..* ** *..* *..* ** *..*
301' LIGDYNWAQFKNKLVMSASVIGH*GGGATSLASSAYTTDFQKAIVDGMYPPLDSTQQ
          *..* ** *..* *..* ** *..*
271' PKARGPVFFINTEKFTMESVNLMMKKICAQHEQSRIITVLGSGVRSQTDFAFVTGNLIGK
          *..* ** *..* *..* ** *..*
361' EQAKQPTLFLNVGDWQWNNENLDVMKKIIISHNDGNLALTNGAVDQCFSDFFPIFSPWLAK
          *..* ** *..* *..* ** *..*
331' FFSSTETRGSLDPYEGQEVMMVRAMLAFQLKHLDLKEDYNQWNNLIEGIGPSLTPGAPPHLS
          *..* ** *..* *..* ** *..*
421' KPGVQGR--TEPSLCMQAAIELSLAFLENGKDGAQKLKDEKFSFISNEIYGREKYKL
          *..* ** *..* *..* ** *..*

```

上段にヒトのⅡ型PAF-AH、下段にC.elegansのcosmid vector C52B9.7にコードされているタンパクのアミノ酸配列を示した。アミノ酸番号を左端に、両者の間で保存されているアミノ酸を(*)、両者の間で保存されていないアミノ酸を(.)で示した。また、血漿型で同定されている活性中心を形成しているセリン、アスパラギン酸、ヒスチジン残基がこれらのタンパクの間でも保存されていたので、白抜きで示した。C.elegansのホモログのN末端を示していないが、このタンパクにはシグナルシーケンスおよびミリスチン酸修飾のコンセンサス配列は含まれていなかった。しかし、↓で示した位置がN末端であるとなるとミリスチン酸修飾のコンセンサス配列と一致する。

図2-12 II型PAF-AHがリパーゼと間で相同性を有する部位

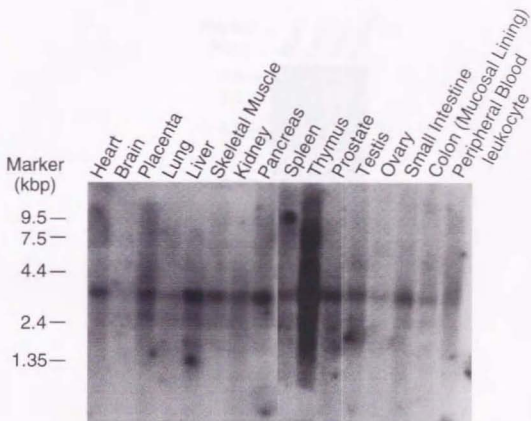
A	103	IIFSHGLGAFRT	114
B	147	VVFSHGLGAFRT	158
C	104	VVVSPGFTAYQS	115
D	95	VVVTPGFTATES	106
E	55	VVISPGFTAYQS	66

A	231	AVMGHSFGG	239
B	268	AVIGHSFGG	276
C	174	GVMGHSMGG	182
D	162	GVIGHSMGG	170
E	126	GVMGHSMGG	134

- A Human PAF-AH(II)
 B Human Plasma PAF-AH
 C 28k lipase from *Streptomyces* sp
 D Lipase from *Streptomyces albus*
 E Lipase from *Streptomyces exfoliatus*

これらの酵素の間で保存されているアミノ酸を網掛けで示した。また、コンセンサス配列から活性中心と予想されるセリン残基を白抜きで示した。両側の数字はアミノ酸番号を示している。本文中にも示したように、これらの酵素の間では、下段に示した活性中心付近の配列だけでなく、上段に示したようにN末端側にも相同性の高い部位が存在していた。

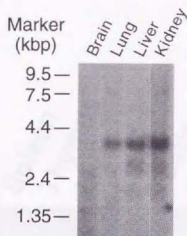
図2-13 ヒトにおける臓器分布



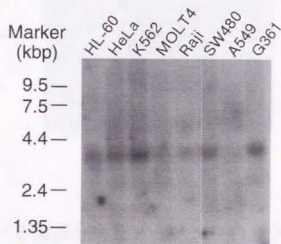
ヒトにおけるⅡ型PAF-AHの臓器分布をノーザンブロッティングにより解析した。プローブにはヒトのcDNAの翻訳領域を用いた。フィルターはCLONTECHより購入した。

図2-14 ヒト胎児における臓器分布と
培養細胞株のノーザンブロッティング

ヒト胎児臓器のノーザンブロット

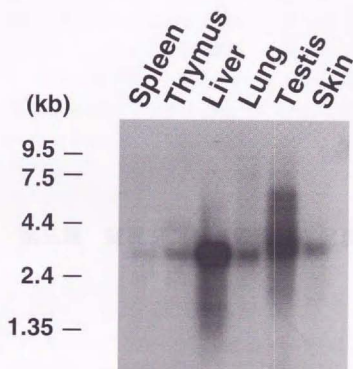


ヒト培養細胞株のノーザンブロット



ヒト胎児におけるⅡ型PAF-AHの臓器分布および培養細胞における発現についてノーザンブロッティングにより解析した。プローブにはヒトのcDNAの翻訳領域を用いた。フィルターはCLONTECHより購入した。

図2-15 マウスにおける臓器分布



マウスにおける臓器分布をノーザンブロッティングにより検討した。プローブにはヒトのcDNAの翻訳領域を用いた。フィルターはサワディーより購入した。

第三章 変異タンパクの作成と発現

1 はじめに

本酵素の一次構造には2つのコンセンサス配列、セリンエステラーゼのコンセンサス配列とミリスチン酸修飾のコンセンサス配列が含まれているが、これらのコンセンサス配列に point mutation を加えた変異タンパクを作成した。ウシの酵素をもとに、セリンエステラーゼのコンセンサス配列中のセリン残基をシステイン残基に置換した変異タンパクを S236C (図 3-1)、ミリスチン酸修飾のコンセンサス配列中のグリシン残基をアラニン残基に置換した変異タンパクを G2A (図 3-1) と名付けた。特に、G2A 変異タンパクを用いてミリスチン酸修飾の酵素活性や細胞内分布に対する影響を検討した。

2 発現コンストラクトの作成

2-1 材料

native pfu は STRATAGENE より購入した。シークエンスは、ABI の 377A シークエンサー、DyeTerminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction kit と Centri Sep カラムを用いて行った。

2-2 方法

PCR を用いて mutagenesis を行った。まず、mutation を加えたい部位と制限酵素サイトの部位についてプライマーを合成し、PCR を行った。具体的には、図 3-2 に示すように、G2A については 1~3 のプライマーを合成し、S236C については 4~6 のプライマーを合成した。テンプレートにはウシの cDNA を、ポリメラーゼは taq ではなく native pfu polymerase を用いた。また、プログラムは、94℃で1分、60℃で1分、72℃で2分

を 35 サイクルとした。G2A と S236C にたいして、以下のようなプライマーの組み合わせで PCR 反応を行った。

(A) G2A プライマー 1 と 2 の組み合わせで PCR を行った。得られた断片を 4% アガロースゲル電気泳動にて精製し、これをプライマーとし、3 との組み合わせで PCR を行った。その結果得られた PCR 産物を EcoRV と BamHI 処理し、pBlueScript にこれらのサイトを用いてライゲーションし、シーケンスを確認した。次に、pBlueScript 上で cDNA の残りの部分とライゲーションし、再構成した。具体的には、G2A の PCR 産物を組み込んだ pBlueScript を BamHI と NotI で処理し、これと cDNA から BamHI と NotI で切り出される部分をライゲーションし、再構成した。この cDNA の全長を EcoRV と NotI で切り出し、pcDNA3 にこれらのサイトを用いて組み込み、発現ベクターとした。

(B) S236C プライマー 4 と 5 の組み合わせで PCR を行った。得られた断片を 4% アガロースゲル電気泳動にて精製し、これをプライマーとし、6 との組み合わせで PCR を行った。その結果得られた PCR 産物を EcoRI と HindIII 処理し、pBlueScript にこれらのサイトを用いてライゲーションし、シーケンスを確認した。次に、pBlueScript 上で cDNA の残りの部分とライゲーションし、再構成した。具体的には、あらかじめ cDNA の全長を pBlueScript の SalI サイトと NotI サイトの間に組み込んでおく。このベクターを EcoRI と HindIII 処理し、1% アガロースゲル電気泳動で長い方 (約 5 kbp) の断片を精製する。一方、シーケンスを確認した S236C の PCR 産物も pBlueScript から EcoRI と HindIII 処理によって切り出し、1% アガロースゲル電気泳動で精製する (約 0.5 kbp)。これらをライゲーションし、再構成した。この cDNA の全長を SalI と NotI で切り出し、pcDNA3 の EcoRV サイトと NotI サイトの間にライゲーションした。具体的には、第二章の 3-2 の (D) cDNA の動物細胞における発現に述べた方法によった。

3 発現

3-1 材料

COS7 細胞は理研細胞バンクから取り寄せた。培養には、FCS (10% Fetal Calf Serum) を含む DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) を用いた。II型 PAF-AH のモノクローナル抗体は、当教室の松沢博士により樹立された 7F7 ハイブリドーマの培養上清を用いた (この抗体は、ウシ肝臓より精製したタンパクを抗原として作製された) (38)。

3-2 方法と結果

正常タンパク及び変異タンパクの発現ベクターを用いて、第二章の 3-2 の (D) cDNA の動物細胞における発現に述べたような方法で COS7 細胞での発現を試みた。活性の測定法及びウエスタンブロッティングの方法については第 4 章に詳しく述べるので省略した。

これら正常タンパク及び変異タンパクを発現させた COS7 細胞のライセートについてウエスタンブロッティングによる解析を行った。その結果、図 3-3 に示したように、正常タンパク、S236C 及び G2A 変異タンパクのいずれもほぼ同程度の発現量が認められた。可溶性画分と膜画分への分布であるが、正常タンパク、S236C 及び G2A 変異タンパクのいずれも同様の分布を示した。つまり、ミリスチン酸修飾を受けない変異タンパクにおいても正常タンパクと同様に膜画分にも分布しているということが見出された。

次に、COS7 細胞のライセートについて活性測定を行った結果、図 3-4 に示したように S236C 変異タンパクが完全に活性を失っていることから、II型 PAF-AH の活性中心が 236 番目のセリン残基であることが確認された。また、可溶性画分と膜画分のいずれにおいても G2A 変異タンパクの活性が正常タンパクの約 1/6 に低下していることが見出された。このことから、膜画分の G2A 変異タンパクにおいても活性があり、変性したタン

パクが超遠心により沈殿し膜画分として回収されたのではないと考えられた。

そこで次に、細胞内の分布をより細かく見るため、正常タンパクの発現細胞と変異タンパクの発現細胞の免疫蛍光染色を行った。

4 細胞染色

4-1 材料

CHO-K1 細胞は 10% FCS を含む Ham's F12 メディウムを用いて培養した。各トランスフェクタントは、リポフェクトアミン（第一化学）を用いて上述の発現ベクターをトランスフェクションし、400 $\mu\text{g/ml}$ の G418（和光純薬工業）を含むメディウムで約 2 週間培養し、得られたコロニーを限界希釈法でシングル化した。スクリーニングは、7F7 モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングによった(52)。

4-2 方法と結果

24 well プレートに直径 13 mm の円形カバーガラス (Iwaki) を入れ、そのうえに CHO トランスフェクタント 1A10 と A14 を 0.7×10^5 cells/well の密度でまいた。約 40 時間 (CHO 細胞の場合、O/N の培養では細胞が十分に付着しないため、きれいな染色像が得られない) 培養し、細胞を付着させた。この細胞の付着したカバーガラスを 24 well プレートに入れたままで以下の操作を行った。PBS で 1 回洗浄し、3.6%パラホルムアルデヒドで 20 分、4℃で固定した。PBS で 4 回洗浄し、0.1% TritonX-100 を含む PBS 加え、室温で 1 分おき、permeabilization を行った。PBS で 4 回洗浄し、3% BSA を含む PBS を加え、室温で 2 時間おき、ブロッキングした。7F7 ハイブリドーマの培養上清を希釈せず加え、4℃で約 14 時間反応させた。0.1% BSA を含む PBS で 4 回洗浄し、0.1% BSA を含む PBS で 1/1000 に希釈した FITC-conjugated anti-mouse IgG antibody

(Cappel)を加え、4℃で2時間、遮光して反応させた。0.1% BSAを含むPBSで5回洗浄し、スライドガラス上で包埋し(PermaFluor、Immunon)、蛍光顕微鏡観察を行った。

図3-5に示したように、正常タンパクはおそらくは小胞体を中心とした細胞全体に分布していることが観察された。当教室の松沢博士により、MDBK細胞においてⅡ型PAF-AHが小胞体に分布することが観察されており(52)、過剰発現細胞における分布もこの結果とほぼ一致した。ところが、G2A変異タンパクは図3-5のようなドット上に異常な分布を示した。これが細胞内のどのような部位に相当するかは、この染色像からでは分らないが、ミリスチン酸が膜との正常な結合に必要であることが示唆された。

5 考察

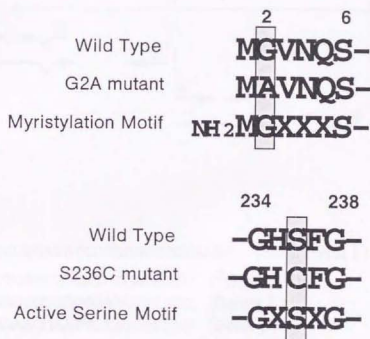
以上の解析から明らかとなったことをまとめると、まず、本酵素の活性中心がコンセンサス配列から推定された236番目のセリン残基であることが確認された。また、ミリスチン酸修飾されない変異タンパクの活性が正常タンパクと比べ約1/6にまで低下していることが見いだされた。さらに、ミリスチン酸修飾をされない変異タンパクは、可溶性過分と膜画分の間の分布は正常タンパクと変わらなかったが、免疫蛍光染色において、ドット上の異常な分布を示すことが明らかとなった。これらの結果から、ミリスチン酸修飾が本酵素の活性と細胞内ソーティングの両方に必要であると考えられた。

他のミリスチン酸修飾され、細胞質画分と膜画分の両方に存在するタンパクの例として、Src(53)やMARCKS(Myristoylated Alanine Rich C Kinase Substrate)(54)などがあげられるが、これらのタンパクはいずれもミリスチン酸修飾のコンセンサス配列に変異を加えると、可溶性画分へののみ局在するようになる。また、Srcにおいては、この変異は酵素活性に

まったく影響しない。この他にミリスチン酸修飾が細胞内の分布に必要とされる例では、チトクローム b5 レダクターゼがあげられるが、この酵素の場合にはミリスチン酸修飾を受ける正常タンパクはミトコンドリア外膜と小胞体膜の両方に分布するが、ミリスチン酸修飾を受けない変異タンパクは小胞体膜のみに分布するようになる(55)。

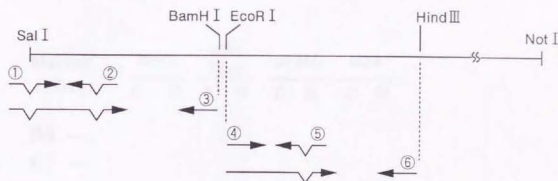
II型 PAF-AH において見られたような、ミリスチン酸修飾を受けない変異タンパクの挙動はこれらの報告とは異なったものであり、どのようなメカニズムによりこのような結果が観察されたのかについては、今のところ不明である。しかし、この変異タンパクについてさらに解析を進めることによって、ミリスチン酸を介した新たな細胞内ソーティング機構が明らかになるものと期待される。

図3-1 コンセンサス配列と変異



本酵素のコンセンサス配列のそれぞれに加えた変異について網掛けで示した。G2Aはミリスチン酸修飾のコンセンサス配列中のグリシンをアラニンに、S236Cはセリンエステラーゼのコンセンサス配列中のセリンをシステインに置換した変異タンパクである。

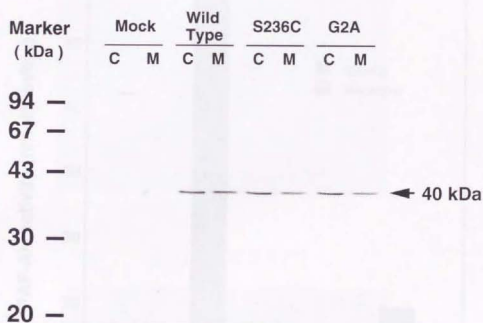
図3-2 変異タンパク作製のためPCR戦略



- ① CCGGGATATCCCACGCGTCCGAGT (Sal I → Not I)
- ② TTGACCGCCATCTCATAACC (²Gly → ²Ala)
- ③ GACGGTGGGGATCCATTCC (BamH I)
- ④ AGAAGGAATTCTATGTTCCG (EcoR I)
- ⑤ CCAAAGCAATGTCCCATTAC (²³⁶Ser → ²³⁶Cys)
- ⑥ TGGGGTCCAAGCTTCCACGGG (Hind III)

変異タンパク作製のために合成したPCRプライマーの一覧表とPCR戦略を示した。G2Aでは、はじめ①と②の組み合わせでPCRを行い、その産物と③の組み合わせで再度PCRを行った。S236Cでは、はじめ④と⑤の組み合わせでPCRを行い、その産物と⑥の組み合わせで再度PCRを行った。プライマーの一覧表では、cDNAの配列に加えた変異もしくは含まれる制限酵素サイトを示した。

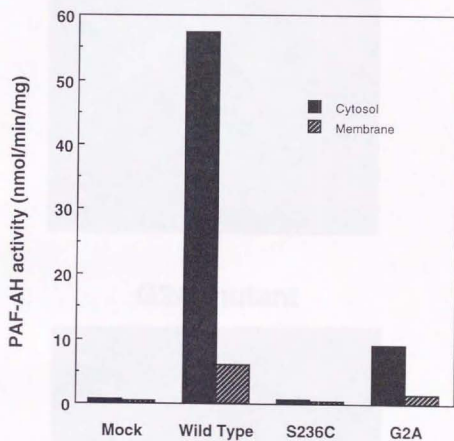
図3-3 正常タンパクおよび変異タンパクのCOS7細胞内での発現のウエスタンブロッティングによる確認



II型PAF-AHをエレクトロポレーション法により、COS7細胞にトランジェントトランスフェクションし、超遠心により細胞質画分と膜画分を分画し、7F7モノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

図のCはcytosol画分、Mは膜画分である。

図3-4 変異タンパクの活性



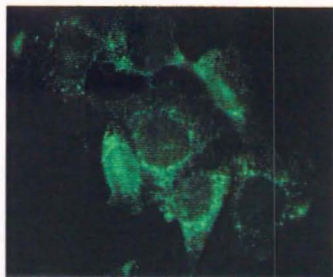
COS7細胞にエレクトロポレーション法を用いてトランジェントトランスフェクションし、超遠心により細胞質画分と膜画分を分画し、それぞれのPAF-AH活性を測定した。

図3-5 免疫蛍光染色による細胞内分布の検討

Wild Type



G2A mutant



各CHOトランスフェクタントについて7F7モノクローナル抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。

第四章 膜結合性 PAF アセチルヒドロラーゼの解析

第四章 膜結合性 PAF アセチルヒドロラーゼの解析

1 はじめに

第二章で示したように、免疫染色及びウエスタンブロッティングの結果から、過剰発現細胞内において、II 型 PAF アセチルヒドロラーゼ (PAF-AH) が細胞質画分だけでなく小胞体を中心とした膜画分にも存在していることが見出された。また、動物組織においても可溶性画分だけでなく膜画分にも PAF-AH 活性が存在していることが知られていた(35, 36) が、その実体については全く不明であった。そこで、私は、動物組織においても II 型 PAF-AH が膜画分にも存在しているのか、また、膜結合性の PAF-AH 活性がどのような酵素によって担われているのかについて解析を行った。

2 材料

ウシの肝臓は、東京芝浦臓器から購入した。1-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (以下 PAF) は、Bachem Feinchemikalein 社製のものをを用いた。1-hexadecyl-2-[^3H]acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (以下 [^3H]PAF) は、New England Nuclear 社製のものをを用いた。トリス (tris[hydroxymethyl]aminomethane) は、シグマ製のものをを用いた。シンチレーターはナカライテスクのクリアゾル I を、その他の試薬は、和光純薬工業の特級品を用いた。

酵素活性測定の基質は、PAF をクロロホルム/メタノール=2/1 溶液に 5 mg/ml になるように溶かし、これを 1040 μl と [^3H]PAF 200 μl を混ぜ、クロロホルム/メタノール=2/1 溶液を 10 ml になるように加え、調製した(すなわち、約 3000 dpm/nmol、1 mM の PAF 溶液とした)。

カラムは、Pharmacia の MonoQ HR5/5 と Superose12 HR10/30 と FPLC システムを用いた。

Ⅱ型 PAF-AH に対するモノクローナル抗体は、松沢博士によって樹立された 7 F 7 ハイブリドーマの培養上清と、当教室の井上によって樹立された #10 ハイブリドーマ培養上清を用いた。7 F 7 ハイブリドーマはウシ肝臓からの精製標品を抗原として、#10 ハイブリドーマはヒトのリコンビナント酵素を抗原として樹立された。7 F 7 ハイブリドーマの培養上清はウシのⅡ型 PAF-AH 特異的であり、#10 ハイブリドーマはヒトのⅡ型 PAF-AH だけでなく、ウシとラットのⅡ型 PAF-AH に対しても反応する。

3 活性測定法及びウエスタンブロッティングについて

3-1 PAF-AH 活性測定法

2 位のアセチル基が ^3H で標識された PAF を用い、それが加水分解を受けたときに遊離してくる酢酸の放射活性を測定することによって、酵素活性を測定した。酵素反応は、小試験管中にて、基質 20 nmoles (20 μl)、酵素液、アッセイ用緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH7.4、5 mM EDTA-3Na) からなる総量 250 μl の反応系で、37 $^{\circ}\text{C}$ においてインキュベートすることによって行った。酵素量及び反応時間は、反応する基質が全基質量の約 40% 以下であることを目安とした。

基質は、PAF の溶液をスリ付きスピッツ遠心管に分注し、エバポレーターにて乾固し、これにアッセイ用緩衝液を PAF が 1 mM となるよう加え、Vortex Mixer 及びバスタイプの超音波発生器 (Ultrasonic Cleaner B12 80 Watts、BRANSON) にて懸濁液とし、基質液として用いた。

インキュベート終了後は、クロロホルム/メタノール = 4/1 を 2.5 ml 加えることによって反応を終了させ、蒸留水 250 μl 加え、Vortex Mixer にて 5 分間攪拌し、3,000 rpm、5 分間 (KN-70; Kubota) 遠心し、2 層に

分離させる。上層から 750 μ l を測りとり、あらかじめシンチレーター 2.5 ml を分注しておいたバイアル瓶に加える。これを液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定し、PAF 分解活性を測定した。

3-2 ウェスタンブロッティング法

SDS-PAGE は、Laemmli の方法に従って行った(56)。分離ゲルは、0.1% SDS、0.15 M Tris-HCl (pH8.8) を含む 12% アクリアミドゲル、濃縮ゲルは、0.1% SDS、0.15 M Tris-HCl (pH6.8) を含む 4% アクリアミドゲルとした。泳動緩衝液は、0.1% SDS を含む 0.15 M Tris-Glycine (pH6.8) を用いた。サンプルは、サンプル用緩衝液 (240 mM Tris-HCl pH6.8、40% Glycerol、8% SDS、20% 2-ME) と 3/1 の割合で混ぜて、アプライした。

泳動終了後、ニトロセルロース膜へタンク式装置を用いてエレクトロブロッティングした。2 枚の濾紙の間にゲルとニトロセルロース膜をはさみ、BioRad 製のタンク式装置にセットし、ブロッティング溶液 (25 mM Tris、192 mM Glycine) に浸し、氷冷下 55 V (このときの電流は、約 280 mA) の定電圧で 2 時間ブロッティングした。

ブロッティング後、ニトロセルロース膜は 5% スキムミルクを含む T-TBS (0.025% tween 20、150 mM NaCl、10 mM Tris-HCl pH7.4) 中で室温 1 時間おき、ブロッキングした。T-TBS で 1 回洗浄後、ハイブリドーマ培養上清を一次抗体として加え、4°C で O/N (約 16 時間) 反応させた。T-TBS で 5 分、3 回洗浄後、HRP-conjugated anti-mouse Ig antibody (Amersham) を 5% スキムミルクを含む T-TBS で 1/2000 希釈し、反応させた。T-TBS で 5 分、4 回洗浄後、ビニールシートにはさみ Amersham 社の ECL ウェスタンブロッティング検出システムを用い、バンドの検出を行った。

4 分布の検討

4-1 方法

(A) ウシの肝臓の分画 全ての操作は氷冷下または 4℃で行った。はじめにウシの肝臓を包丁で刻み、50 g を量り取った。SET (250 mM Sucrose, 1 mM EDTA-3Na, 10 mM Tris-HCl pH7.4) バッファーで洗浄し、9 倍量の SET バッファーを加え、家庭用ジューサーミキサーで 5 秒間、3 回ホモジェナイズした。これをポッター型ホモジェナイザーに入れ、3 回ホモジェナイズした。次に、未破壊の細胞や核などを除くため、1,000xg、10 分間遠心し、上清を回収した。さらに、8,000xg、10 分間遠心し、沈殿と上清を別々に回収する。沈殿に上清と等量の SET バッファーを加え、ポッター型ホモジェナイザーで懸濁液とし、これを 1 万 xg ppt 画分とした。上清は、さらに、100,000xg、60 分間遠心し、上清を 10 万 xg sup 画分とした。沈殿は、1 万 xg ppt 画分と同様に SET バッファーを加え、ポッター型ホモジェナイザーで懸濁液とし、10 万 xg ppt 画分とした。これらの画分は、1 ml ずつ分中し、ドライ/アイソエタノールを用いて急速凍結した後、-80℃に保存した。これらの画分に対するウエスタンブロッティングは 7F7 ハイブリドーマ培養上清を用いて行った。

(B) Hela 細胞の細胞質画分と膜画分の調製 Hela 細胞は、5% FCS (Fetal Calf Serum) を含む DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) を用いて培養した。細胞を 100 mm ディッシュにまき、50% confluent と完全に confluent などのそれぞれの時点でトリプシンを用いて回収した。具体的には、 1×10^5 cells/dish と 3×10^5 cells/dish にまき、48 時間培養後回収した。氷冷下ソニケーション (Branson の sonifier で、目盛り 3、3 秒 3 回でほぼ完全に細胞が壊れる) によりライシスし、1,000 X g、10 分の遠心で核や未破壊の細胞を除いた後、上清を超遠心 (100,000 X g、60 分) により可溶性画分と膜画分に分画した。沈殿 (膜画分) は上清 (可溶性画分) と等量のバッファーを加え、ピペッティングによりほぐした後、シリッジを用いて懸濁し、これを膜画分とした。可溶性画分は超遠心後のま

ま用いた。これらの画分に対するウエスタンブロッティングは#10 ハイブリドーマ培養上清を用いて行った。

4-2 結果

ウシ肝臓の各画分の PAF-AH の比活性を図 4-1 に示した。このように、1 万 xg ppt、10 万 xg ppt、10 万 xg sup のいずれの画分にもほぼ同じ強さで PAF-AH 活性が検出された。各画分の全体のタンパク量は、ほぼ 1:1:3 なので、活性の量はおおよそ 1:1:3 であった。

各画分を活性の量が同じになるようウエスタンブロッティングにアプライしたところ、どの画分にもほぼ同じ強さでバンドが検出された（図 4-2）。つまり、肝臓では可溶性画分と同様に膜画分の PAF-AH 活性がほとんどⅡ型酵素によるということが示唆された。

また、HeLa 細胞においてⅡ型 PAF-AH が細胞密度の応じて細胞質画分と膜画分間の分布を変化させることが観察された。図 4-3 に示したように、細胞密度が低いときには、Ⅱ型 PAF-AH は、細胞質画分と膜画分にはほぼ 1:1 の割合で分布していたが、細胞が confluent になるとほとんどが膜画分へと局在するようになった。このことから、生理的条件下でⅡ型 PAF-AH の細胞内局在が変化する可能性が考えられた。

5 膜結合性酵素の同定

5-1 方法

(A) 可溶化 膜画分の PAF-AH 活性の可溶化を試みた。全ての操作は氷冷下または 4℃で行った。KCl は、1 万 xgppt 画分と 10 万 xgppt 画分のそれぞれに 4 M KCl 溶液を加え、終濃度 1 M KCl になるようにした。氷冷下、30 分おき、遠心操作により上清と沈殿に分けた。沈殿は、上清と等量の SET バッファーを加え、ダウンス型ホモジェナイザーにより懸濁し、活性測定およびウエスタンブロッティングによる解析を行った。

界面活性剤である CHAPS については、1 万 xg ppt 画分と 10 万 xg ppt 画分のそれぞれに 10% CHAPS 溶液を加え、終濃度 1% CHAPS になるようにした。その後の操作は KCl と同様に行った。

(B) MonoQ FPLC カラム 1 万 xg ppt 画分と 10 万 xg ppt 画分から 1% CHAPS により可溶化された画分について MonoQ FPLC カラムによる解析を行った。カラムは、バッファー (A) ; 10 mM Tris-HCl pH7.4、1 mM EDTA-3Na、20% Glycerol、0.5% CHAPS で平衡化した。溶出はバッファー (A) とバッファー (B) ; 10 mM Tris-HCl pH7.4、1 mM EDTA-3Na、20% Glycerol、0.5% CHAPS、500 mM NaCl の直線濃度勾配によって行った。流速は 0.3 ml/min、バッファー (B) の割合を 0% から 90 分間で 100% になるようプログラムし、1 fraction = 3 分間 (0.9 ml) とした。タンパクの検出は 280 nm の吸光度によった。サンプルは各 1 ml ずつアプライした。サンプルをアプライした後、吸光度が安定するまでバッファー (A) でカラムを洗った。その後、先ほどの条件で吸着されたタンパクを溶出した。得られた fraction について PAF-AH 活性の測定およびウエスタンブロッティングによる解析を行った。

5-2 結果

10 万 xg ppt 画分の PAF-AH 活性の可溶化の結果を図 4-4 に示した。このように、1M KCl では約 20% しか可溶化されず、1% CHAPS で約 80% の活性が可溶化されることが分かった。1 万 xg ppt 画分についても同様の結果であったので省略する。一方、ウエスタンブロッティングから II 型 PAF-AH の可溶化の結果は、図 4-5 に示したように、1M KCl ではほとんど可溶化されず、1% CHAPS ではほぼ可溶化されることが分かった。データは示さないが、1M KCl で可溶化された画分および 1% CHAPS で可溶化されない画分についても濃縮すると II 型 PAF-AH のバンドが検出できることから、これらの活性も II 型 PAF-AH によるもので、濃縮しないと検出できないのは単に量的な問題と考えられる。つまり、活性の可溶化の挙動

とⅡ型 PAF-AH の可溶化の挙動が一致することが明らかとなった。

10 万 xg ppt 画分のカラムの溶出パターンおよびウエスタンブロッティングの結果を図 4-6 に示した。PAF-AH 活性は、いずれも約 280 mM NaCl の位置に一本のピークに溶出されることが分かった。また、PAF-AH 活性とⅡ型 PAF-AH のバンドが挙動をともにすることから膜画分の PAF-AH 活性のほとんどがⅡ型 PAF-AH によるということが明らかとなった。1 万 xg ppt 画分についても全く同様の結果であったので省略する。

6 膜結合機構の検討

5-1 方法

1 万 xg ppt 画分と 10 万 xg ppt 画分から 1% CHAPS により可溶化された画分と、10 万 xg sup 画分に CHAPS を終濃度 1% になるように CHAPS を加えたサンプルについて Superose12 FPLC ゲルろ過カラムによる解析を行った。カラムは、バッファー (C) ; 10 mM Tris-HCl pH7.4、1 mM EDTA-3Na、200 mM NaCl、20% Glycerol、0.5% CHAPS で平衡化した。流速は 0.2 ml/min、1 fraction = 2 分間 (0.4 ml) とした。タンパクの検出は 280 nm の吸光度によった。サンプルはいずれも 200 μ l ずつアプライした。

5-2 結果

図 4-7 に示すように、10 万 xg sup 画分の PAF-AH は、約 40 kDa の位置に溶出されたのに対して、10 万 xg ppt 画分から 1% CHAPS により可溶化された画分の PAF-AH は、約 65 kDa の位置に溶出された。可溶性画分の PAF-AH と比べ、膜画分の PAF-AH の方が約 25 kDa ほど分子量が大きいということが見いだされた。1 万 xg ppt 画分についても同様の結果であったので省略する。

しかし、ウエスタンブロッティングにおけるバンドの位置は、可溶性画

分と膜画分の間でまったく同じであることから、25 kDa に相当する何らかの因子が結合していることが示唆された。また、データは示さないが、ゲルろ過カラムにおいても、活性の挙動とウエスタンブロッティング上のⅡ型 PAF-AH の挙動が一致することを確認した。

7 考察

以上の結果をまとめると、膜結合性の PAF-AH がⅡ型 PAF-AH であることが明らかとなった。つまり、細胞内の PAF-AH 活性は、膜画分も含めて、Ⅰ型とⅡ型の PAF-AH でほぼ説明されるということが明らかとなった。また、Ⅱ型 PAF-AH は小胞体膜画分だけでなく、ミトコンドリア膜画分にも同様に分布していることも明らかとなった。さらに、細胞質画分と膜画分間の分布は細胞密度に応じて変化することが観察された。現在のところ、HeLa 細胞において細胞密度が低いときと confluent のときで細胞の状態にどのような違いがあるのか明らかではないが、生理的条件下においても本酵素の分布が変化することが示唆された。データは示さないが浮遊細胞の Jurkat 細胞ではこのような現象は観察されなかった。したがって、この現象は細胞に接着阻害がかかることと関連しているのかもしれない。また、細胞密度だけでなく、松沢博士により、MDBK 細胞において、酸素ストレスに応じて細胞質画分と膜画分の間を移行することが見いだされている(52)。このように様々なストレスに応じて本酵素の分布が変化することが観察されており、このメカニズムを解析することにより、細胞のストレスに対する新たなシグナル伝達機構が見いだされることが期待される。

ところで、膜移行メカニズムを考える上でも本酵素がどのような形で膜と結合しているのかを明らかにすることが重要であると考えられるが、可溶性条件の解析から、Ⅱ型 PAF-AH は KCl では可溶化されず、界面活性剤である CHAPS ではじめて可溶化されるということが分かった。つまり、

膜表在的に結合しているというよりは膜と比較的タイトに結合しているということが示唆された。さらに、ゲルろ過カラムによる解析から、膜画分のⅡ型 PAF-AH には約 25 kDa に相当する何らかの因子が結合していることが示唆された。現在、クロスリンク法などを用いてこの因子を同定しようと試みているが、今のところ明らかではない。我々は、データは示さないが次の実験結果から、この結合因子についてタンパクだけでなく脂質分子もその候補に入れて考えている。膜画分と可溶性画分を 1:1 の割合で混ぜてからゲルろ過カラムにアプライすると PAF-AH 活性は約 65 kDa の位置に一本のピークに溶出される。さらに、膜画分と可溶性画分を 1:4 の割合で混ぜてからゲルろ過カラムにアプライすると PAF-AH 活性は約 50 kDa の位置に溶出される。つまり、単一の因子が結合しているのならば、このような中間の分子量を示すことは考えられないので、複数の比較的 low molecular weight の因子が結合していると予想された。当然、この結果からだけではタンパク因子の可能性を否定することはできない。そこで、双方の可能性を考慮して今後の解析を進めることが必要である。

一般にミリスチン酸修飾は、翻訳と同時に起こることが知られており、本酵素のように細胞質画分と膜画分を移行するようなタンパクの場合、局在を決定する他のシグナルが必要と考えられる。細胞質画分と膜画分の酵素の間で何らかの違いを見いだそうと、二次元電気泳動などの方法を用いて検討したが、今のところ他の修飾は見いだされていない。膜移行シグナルを受けるのが本酵素ではなく、膜に存在する本酵素の標的分子である可能性もあるので、双方の可能性についてさらに解析を進めたい。

図4-1 ウシ肝臓におけるPAF-AH活性の分布

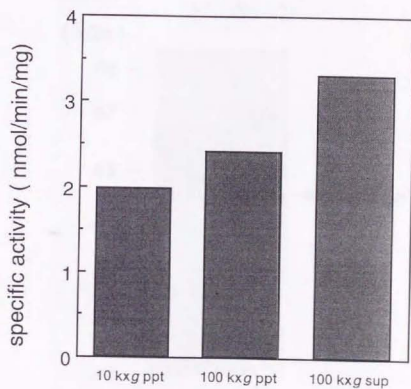
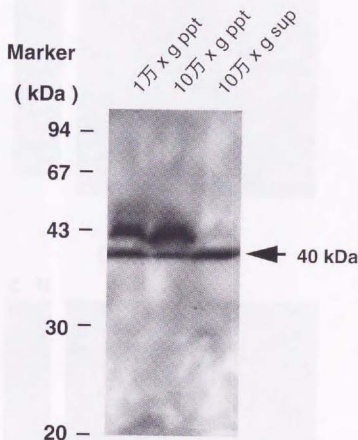


図4-2 ウェスタンブロッティングによる
Ⅱ型PAF-AHの分布の検討

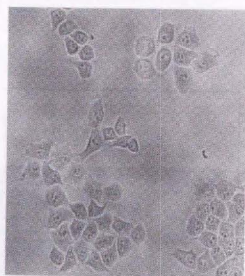


ウシ肝臓の各画分を活性が同じになるようにウェスタンブロッティングにアブライした。検出は7F7モノクローナル抗体を用いた。膜画分の方にはバンドが二本見えるが、下のバンドが大腸菌リコンビナントと一致する。また、上のバンドは、MonoQにおいて活性と挙動が明らかにずれたことから、このバンドはⅡ型PAF-AHではない。

図4-3 HeLa細胞における分布の変化

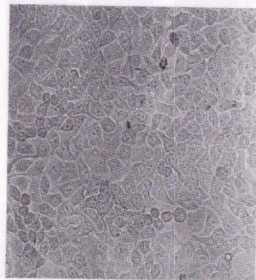
Subconfluent

C M



Confluent

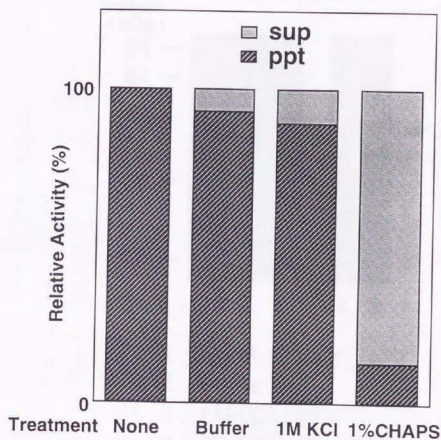
C M



HeLa細胞を写真のように、細胞密度が低いときと高いときに細胞を回収し、ライセートを超音心により分画し、ウエスタンブロッティングによりⅡ型PAF-AHの分布について検討した。

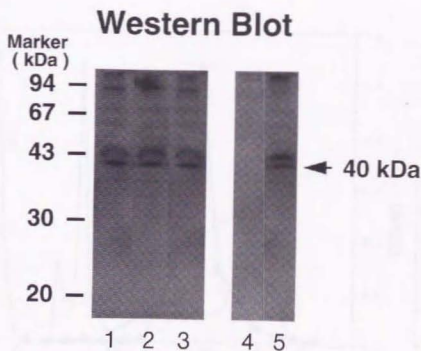
ウエスタンブロッティングのレーンの表示は、Cは細胞質画分、Mは膜画分をそれぞれ表している。

図4-4 PAF-AH活性の可溶化



ウシ肝臓の膜画分に対して、bufferのみ、1 M KCl、1% CHAPSのそれぞれを加えた後、再度100k x gの遠心により分画し、上清と沈殿のPAF-AH活性を測定した。

図4-5 II型PAF-AH活性の可溶化



- 1、None 100 k \times g ppt
- 2、Buffer ppt
- 3、1M KCl ppt
- 4、1% CHAPS ppt
- 5、1% CHAPS sup

ウシ肝臓の膜画分に対して、bufferのみ、1 M KCl、1% CHAPSのそれぞれを加えた後、再度100k x gの遠心により分画し、上清と沈殿のそれぞれに対して、7F7モノクローナル抗体によるウエスタンブロッティングを行い、II型PAF-AHを検出した。

図4-6 膜画分のPAF-AH活性のMonoQ FPLCカラムと
ウエスタンブロッティングによる同定

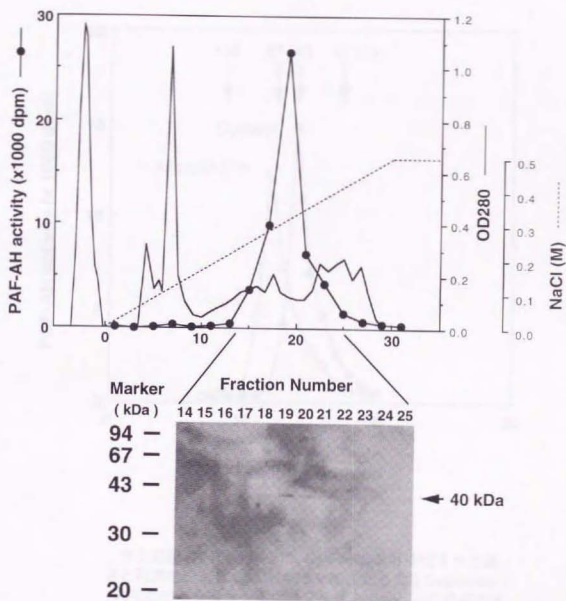
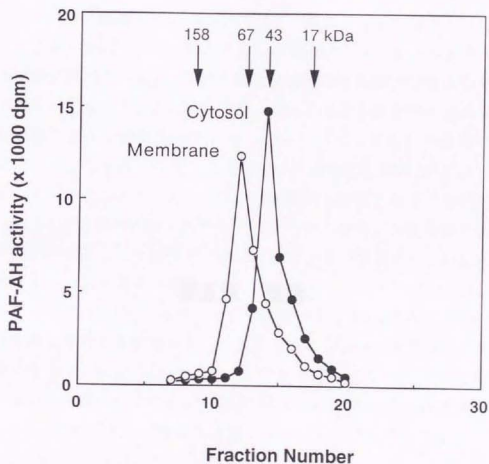


図4-7 膜画分と可溶性画分のⅡ型PAF-AH
の分子量の比較



ウシ肝臓の膜画分から1% CHAPSで可溶化された画分と可溶性画分に1% CHAPSを加えたものをSuperose 12 FPLCゲルろ過カラムにアプライし、nativeな分子の大きさを調べた。

第五章 総括

私は、本研究において、Ⅱ型 PAF-AH の構造を明らかにした。さらに、可溶性画分と比べ解析の遅れていた膜画分の PAF-AH の解析を行い、哺乳動物の PAF アセチルヒドロラーゼ (PAF-AH) の全体像を明らかにした (図 5-1)。哺乳動物の PAF-AH は、まず、細胞外型と細胞内型に分けられる。さらに、細胞内にはⅠ型とⅡ型の 2 種のアイソフォームがあり、Ⅰ型は細胞質に局在しており、Ⅱ型は細胞質と膜画分の両方に分布していることが明らかとなった。これらの酵素について構造的な側面からみると、Ⅰ型酵素はこれまでに報告の無い全く新しい一次構造を持つ酵素であることが明らかとなった。一方、Ⅱ型酵素は、血漿型の酵素と約 40% の相同性を持ち、ともにリパーゼファミリーに属する酵素であることが明らかとなった。これらの酵素は、細胞の内外で生じる酸化リン脂質の分解を通じて生体の防御系として協調的に働いていると考えられた。このことは、他の酸素ストレス防御系の酵素、グルタチオンペルオキシダーゼ(50)やスーパーオキシドディスムターゼ(51)においても細胞の内外に約 30~40% の相同性を有する酵素があることと類似しており、興味深い。

また、*C.elegans* にⅡ型 PAF-AH とアミノ酸レベルで約 30% の相同性を示す遺伝子が見いだされた。大腸菌や酵母にはⅡ型 PAF-AH が存在しないことから、この結果は本酵素の起源を考える上で興味深い結果といえる。さらに、*C.elegans* には PAF が存在しないことが報告されており(49)、Ⅱ型 PAF-AH が酸化リン脂質も分解する活性を持つことと考え合わせると、このことは本酵素が生体内においても酸化リン脂質を分解している可能性を示唆する結果である。

私は、動物組織中においても、Ⅱ型 PAF-AH が、Ⅰ型酵素とは異なり、可溶性画分だけでなく膜画分にも存在することを見いだしたが、この分布は細胞の酸素ストレスに応じて変化することが松沢博士により見いだされている(52)。私は、細胞密度によってもこの分布が変化することを見いだした。このことは人為的なストレスだけでなく生理的条件においても変

化し得ることを示唆している。

この様にII型酵素は細胞質と膜との間を移行することから、膜表在的に結合していると予想されたが、可溶化条件の検討から界面活性剤ではじめて可溶化されるような形で膜と結合していることが分かった。また、変異タンパクの解析から、膜との正常な結合にはミリスチン酸が必要であることも示唆された。さらに、膜には本酵素に結合する因子があることを見いだした。これまでに、ミリスチン酸修飾されたタンパクと結合する膜タンパクの報告はなく、MARCKS (Myristoylated Alanin Rich protein C Kinase Substrate protein) の例では、リボソームとも結合し得ることから膜タンパクの関与は否定されている(57)。しかし、本酵素の変異タンパクの挙動は、これらの例とは異なっていることから、膜に結合タンパクが存在する可能性も考えられる。また、PHドメインのように、脂質との結合による膜結合メカニズムも考えられる。今後、この因子を同定することが膜移行メカニズムを解明するために最も重要な課題であると考えている。

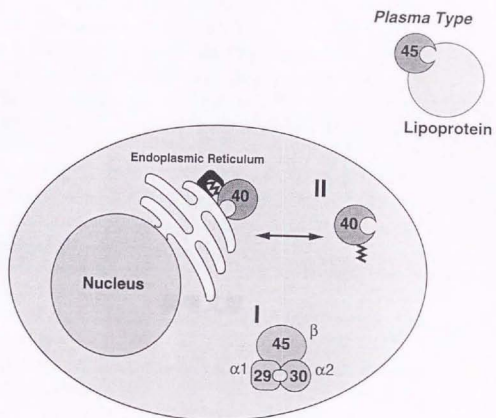
また、松沢博士により、本酵素の過剰発現により細胞が酸素ストレスに対して耐性になることが見いだされ、さらに、この細胞死がアポトーシスであることが示唆された(52)。ところでペルオキシソーム増殖試薬により、cytochrome P-450 による ω -oxidation を介してジカルボン酸が作られ、これがペルオキシソームの脂肪酸 β -oxidation や脂肪酸結合タンパクの誘導シグナルとなるということが報告されている(58)。つまり、酸化リン脂質の代謝物であるジカルボン酸がシグナル伝達物質となることを示唆している。これらの結果と、本酵素が細胞密度が高くなると膜へと移行すること、及び、*C.elegans* は系統樹の上で最も単純な多細胞生物に位置している(59)ことを考え合わせると、本酵素が何らかのシグナル伝達過程に関与しており、細胞増殖を抑えることがストレスの耐性に寄与しているのかも知れないと考えている。

以上の結果をまとめると、I型は脳の形態形成などのPAFを介したシグナル伝達機構に関与していることが示唆されている。一方、II型酵素は、

PAF だけでなく酸化リン脂質をも分解する活性を持ち、細胞質だけでなく膜画分にも存在し、ストレスに応じその局在を変化させ、細胞のストレスに対する防御機構として機能していることが示唆されている。

今後、本酵素の生理機能について解析を進めるにあたって、次の二つの課題が重要であると考えている。第一に、本酵素の膜標的因子を同定することにより、本酵素の膜移行メカニズムを解析すること、第二に、多様な分子種からなる酸化リン脂質の中で、生体内における本酵素の基質を解析することの二つである。

図5-1 哺乳動物におけるPAF-AH



参考文献

- (1) Hanahan, D. J. (1986) *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 483-509
- (2) Snyder, F. (1987) Platelet Activating Factor and Related Lipid Mediators, Plenum Press, New York
- (3) Shukla, S. D. (1991) *Lipids* **26**, 1028-1033
- (4) Snyder, F. (1995) *Biochem. J.* **305** 689-705
- (5) Snyder, F. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1254**, 231-249
- (6) Farr, R. S., Cox, C. P., Wardlow, M. L. and Jorgensen, R. (1980) *Clin. Immunol. Immunopathol.* **15**, 318-330
- (7) Blank, M. L., Lee, T-C., Fitzgerald, V. and Snyder, F. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 175-178
- (8) Stafforini, D. M., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A. and McIntyre, T. M., (1996) *Biochim. Biophys. Acta.* **1301**, 161-173
- (9) Imaizumi, T., Stafforini, D. M., Yamada, Y., McIntyre, T. M., Prescott, S. M. and Zimmerman, G. A. (1995) *J. Int. Med.* **238**, 5-20
- (10) Stafforini, D. M., McIntyre, T. M., Carter, M. E. and Prescott, S. M. (1987) *J Biol Chem* **262** 4215-4222
- (11) Stafforini, D. M., Prescott, S. M. and McIntyre T. M. (1987) *J. Biol. Chem.* 262 4223-4230
- (12) Tjoelker, L. W., Wilder, C., Eberhardt, C., Stafforini, D. M., Dietsch, G., Schimpf, B., Hooper, S., Trong, H. L., Cousens, S., Zimmerman, G. A., Yamada, Y., McIntyre, T. M., Prescott, S. M. and Gray, P. W. (1995) *Nature* **374**, 549-553
- (13) Karasawa, K., Yato, M., Setaka, M. and Nojima, S. (1994) *J Biochem* **116** 374-379
- (14) Karasawa, K., Kato, H., Setaka, M. and Nojima, S. (1994) *J Biochem* **116** 368-373
- (15) Karasawa, K., Kuge, O., Kawasaki, K., Nishijima, M., Nakano, Y., Tomita, M. Yokoyama, K., Setaka, M. and Nojima, S. (1996) *J Biochem* **120** 838-844
- (16) Hattori, M., Arai, H. and Inoue, K. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 18748-18753
- (17) Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H. and Inoue, K. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 23150-23155
- (18) Hattori, M., Adachi, H., Aoki, J., Tsujimoto, M., Arai, H. and Inoue, K.

- (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 31345-31352
- (19) Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H. and Inoue, K. (1994) *Nature* **370**, 216-218
- (20) 服部研之 「新規組織内可溶性酸化リン脂質/PAF 酸化分解酵素の性状解析」 修士論文 (1995)
- (21) Hattori, K., Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H. and Inoue, K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270** 22308-22313
- (22) Miwa, M., Miyake, T., Yamaoka, T., Sugatani, J., Suzuki, Y., Sakata, S., Araki, Y. and Matsumoto M. (1988) *J. Clin. Invest.* **82** 1983-1991
- (23) Stremmler, K. E., Stafforini, D. M., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., and McIntyre, T. M. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 5331-5334
- (24) Stremmler, K. E., Stafforini, D. M., Prescott, S. M., and McIntyre, T. M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 11095-11103
- (25) Steinbrecker, U. P., and Pritchard, P. H. (1989) *J. Lipid Res.* **30**, 305-315
- (26) Heery, J. M., Kozak, M., Stafforini, D. M., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M. and Prescott, S. M. (1995) *J. Clin. Invest.* **96** 2322-2330
- (27) Steinbrecher, U. P., Parthasarathy, S., Leake, D. S. Witztum, J. L., and Steinberg, D. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3883-3887
- (28) Stein brecher, U. P. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 3603-3608
- (29) Frederik, K., Sevanian, A., Handelman, G. J. and Dratz, E. A (1987) *Trends Biochem Sci* **12** 31-34
- (30) Goyal, J., Wang, K., Liu, M. and Subbaiah P. V. (1997) *J. Biol. Chem* **272** 16231-16239
- (31) Lynch, J. M. and Henson, P. M. (1986) *J. Immunol.* **137** 2653-2661
- (32) McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A. and Prescott, S. M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** 2204-2208
- (33) Riches, W. H. D., Young, K.S., Seccombe, F. J., Henson, E. J., Clay, L. K. and Henson M. P. (1990) *J. Immunol.* **145** 3062-3070
- (34) Touqui, L., Hatmi, M. and Vargaftig, B., B. (1985) *Biochem. J.* **229**, 811-816
- (35) 服部光治 「生体内における酸化リン脂質分解反応の解析」 修士論文 (1993)
- (36) Ho, Y. S., Swenson, L., Derewenda, U., Serre, L., Wei, Y., Dauter, Z., Hattori, M., Adachi, T., Aoki, J., Arai, H., Inoue, K. and Derewenda, Z. S. (1997) *Nature* **385** 89-93
- (37) Blank, M. L., Lee, T-C., Fitzgerald, V. and Snyder, F. (1981) *J. Biol. Chem.*

- (38) Hattori, K., Adachi, H., Matsuzawa, M., Yamamoto, K., Tsujimoto, M., Aoki, J., Hattori, M., Arai, H., and Inoue K. (1996) *J. Biol. Chem.* **271** 33032-33038
- (39) Yanoshita, R., Kudoh, I., Ikizawa, K., Chang, H. W., Kobayashi, S., Ohno, M., Nojima, S. and Inoue K. (1988) *J. Biochem.* **103** 815-819
- (40) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed." Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY.
- (41) Lee, C. C. and Caskey, C. T. (1992) *Methods Enzymol.* **216** 69-72
- (42) Grunstein, M. and Wallis, J. (1979) *Methods Enzymol.* **68**, 379-389
- (43) Kwiatkowski Jr, T., Zoghbi, H. Y., Ledbetter, S. A., Ellison, K. A. and Chinault, A. C. (1990) *Nuc. Acids Res.* **18**, 7191-7192
- (44) Brenner, S. (1988) *Nature* **334** 528-530
- (45) Towler, D. A. and Gordon, J. I. (1988) *Ann. Rev. Biochem.* **57** 69-99
- (46) Tjoelker, L. W., Eberhardt, C., Unger, J., Trong, H. L., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Stafforini, D. M., Prescott, S. M. and Gray, P. W. (1995) *J. Biol. Chem.* **270** 25481-25487
- (47) Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copsey, T., Cooper, J., et al. (1994) *Nature* **368** 32-38
- (48) Wei, Y., Swenson, L., Minor, W., Derewenda, U., Inoue, K., Gonzalez, S. L. and Derewenda, S. Z. Submitted for publication
- (49) Satouchi, K., Hirano, K., Sakaguchi, M., Takehara, H. and Matsuura, F. (1993) *Lipids* **28** 837-840
- (50) Ursini, F., Maiorino, M., Flohe, B. R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D. and Flohe, L. (1995) *Methods Enzymol.* **252** 38-53
- (51) Fujii, J., Suzuki, K. and Taniguchi, N. (1995) *Nippon Rinsho* **53** 1227-1231
- (52) Matsuzawa, A., Hattori, K., Aoki, J., Hiroyuki, A. and Inoue, K. (1997) *J. Biol. Chem.* **272** 32315-32320
- (53) Resh, D. (1990) *Oncogene* **10** 1437-1444
- (54) McLaughlin, S. and Aderem, A. (1995) *Trends Biochem Sci* **20** 272-276
- (55) Borgese, N., Aggularo, D., Carrera P., Pietrini, G. and Bassetti, M. (1996) *J. Cell Biol.* **135** 1501-1510
- (56) Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
- (57) George, P. D. and Blackshear, P. J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267** 24879-24885

(58) Kaikaus, R. M., Chan, W. K., Lysenko, N., Ray, L., Ortiz de Montellano, P.

R. and Bass, N. M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268** 9593-9603

(59) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson J. D. (1994)
Molecular Biology of the Cell Third Edition, Garland Publishing, Inc., New York and
London, pp. 38

本書的出版，首先要感謝我的家人，特別是我的母親，她一直支持我，鼓勵我，使我能夠完成這本書。其次要感謝我的老師，他們在學業上給予我無盡的幫助和指導。最後要感謝我的朋友，他們在寫作過程中給予我鼓勵和支持。

本書的出版，首先要感謝我的家人，特別是我的母親，她一直支持我，鼓勵我，使我能夠完成這本書。其次要感謝我的老師，他們在學業上給予我無盡的幫助和指導。最後要感謝我的朋友，他們在寫作過程中給予我鼓勵和支持。

本書的出版，首先要感謝我的家人，特別是我的母親，她一直支持我，鼓勵我，使我能夠完成這本書。其次要感謝我的老師，他們在學業上給予我無盡的幫助和指導。最後要感謝我的朋友，他們在寫作過程中給予我鼓勵和支持。

本書的出版，首先要感謝我的家人，特別是我的母親，她一直支持我，鼓勵我，使我能夠完成這本書。其次要感謝我的老師，他們在學業上給予我無盡的幫助和指導。最後要感謝我的朋友，他們在寫作過程中給予我鼓勵和支持。

本書的出版，首先要感謝我的家人，特別是我的母親，她一直支持我，鼓勵我，使我能夠完成這本書。其次要感謝我的老師，他們在學業上給予我無盡的幫助和指導。最後要感謝我的朋友，他們在寫作過程中給予我鼓勵和支持。

謝辭

謝辞

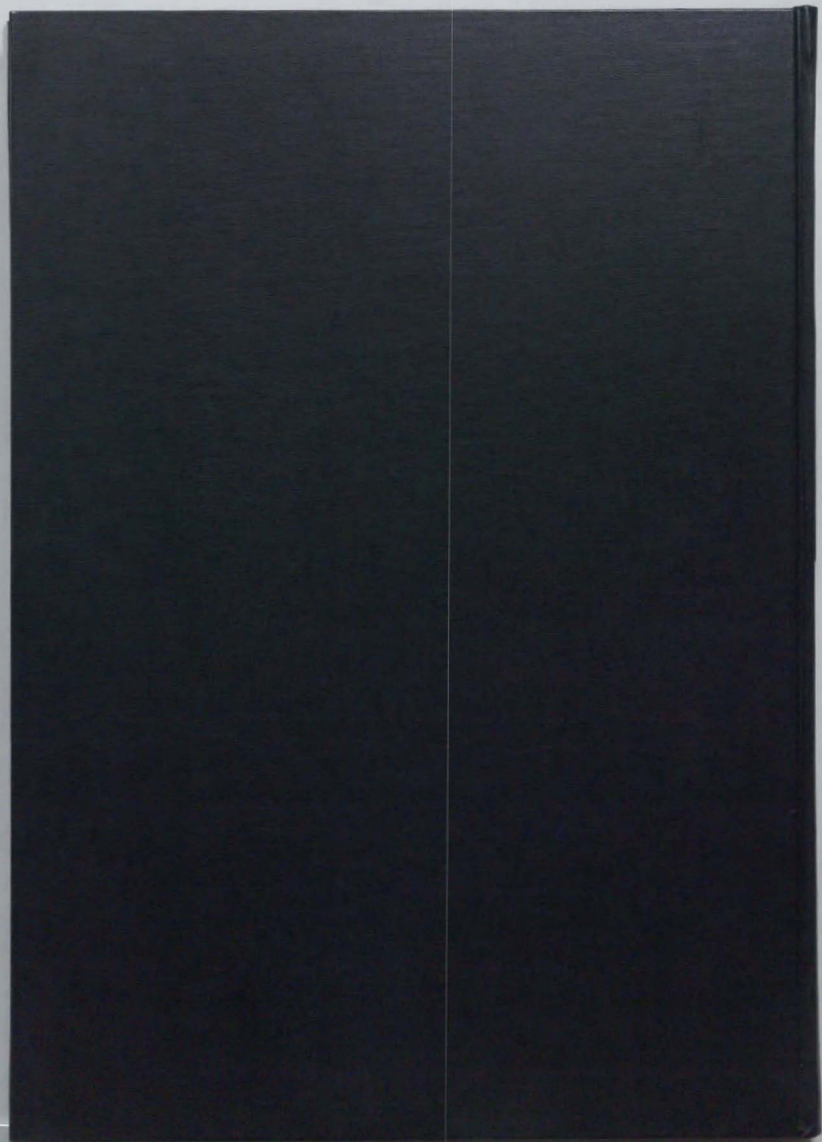
本研究を進めるにあたり、研究の機会を与えてくださり、終始ご指導いただきました東京大学薬学部 衛生化学教室 井上 圭三 教授、新井 洋由 助教授、青木 淳賢 助手、有田 誠 助手に深く感謝いたします。特に、直接ご指導いただきました新井 洋由 助教授に深く感謝いたします。

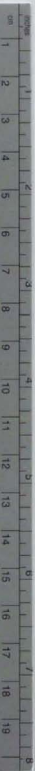
本酵素の部分アミノ酸配列決定に際してご指導いただきました東京大学薬学部 生体異物学教室 山本 一夫 助手に深く感謝いたします。

本酵素の遺伝子クローニングに際してご協力ならびにご指導いただきました現理化学研究所 生物有機化学研究室 辻本 雅文 室長、安達 栄樹 博士に深く感謝いたします。

研究室での日々をともに過ごし、有益な助言、励まし、ご協力をいただきました東京大学薬学部 衛生化学教室の皆さんに深く感謝いたします。特に、本研究の先駆者である服部光治博士、本酵素の抗体を作製して下さった松沢厚博士、井上貴雄君、本酵素の変異タンパク作製に協力して下さった Bae Kyong Ah さんに深く感謝いたします。

最後に、進学の手助けを与えてくれた両親に感謝します。





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue

Cyan

Green

Yellow

Red

Magenta

White

3/Color

Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313