

論文の内容の要旨

論文題目 血小板活性化因子生合成酵素の活性調節機構の解析

森本 亮

血小板活性化因子(Platelet-activating factor, PAF)は炎症惹起性の脂質メディエーターである。化学構造はリン脂質であり、生体膜に存在するエーテル型ホスファチジルコリンを前駆体として合成される。極性基にホスホコリン、グリセロール骨格 sn-1 位に炭素数 16 または 18 の飽和脂肪酸がエーテル結合し、sn-2 位にはアセチル基がエステル結合している。

定常状態においては生体内の PAF 分解活性が高いため血漿中や組織中でほとんど検出することができない。細胞外刺激に応答して PAF が即時に酵素的に生合成されることは 1980 年代に知られており、また、活性調節にリン酸化が関与することは報告されていたが、酵素はクローニングされず活性調節機構は明らかにならなかった。膜タンパク質と想定された生合成酵素はタンパク精製によるアミノ酸配列決定が困難であったことが主因である。PAF の生合成にはアルキルアセチルグリセロールへのコリン転移による新規合成系と膜リン脂質を出発点とするリモデリング系のふたつの経路が提唱されていたが、炎症時の細胞外刺激による PAF 生合成は後者のリゾ血小板活性化因子アセチル転移酵素 (lyso-PAF acetyltransferase, lyso-PAFAT) が司ることが確立していた。

2000 年代に入り、ゲノム情報の整備に伴う配列情報スクリーニングから PAF 生合成酵素として lyso-PAFAT 活性を持つリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ 2 (lysophosphatidylcholine acyltransferase 2, LPCAT2) が同定された。この酵素は酵素活性にカルシウムイオンを要求し、マクロファージなどの炎症系細胞に強く発現する。これまでに酵素活性として報告されてきたリモデリング経路の PAF 生合成酵素のふるまいをよく再現していた。また、生体膜リン脂質の極めて多様な脂肪酸組成を調節するアシル転移酵素群に属しており膜リン脂質代謝と PAF のいっそう深い関わりを示唆する発見であった。

一方で、LPCAT2 が細胞外刺激に応答して急速に PAF 合成を開始する機構は不明点として残された。2010 年にリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) による刺激では、Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) を介し、刺激後 30 分程度で LPCAT2 の 34 番目セリン

残基(Ser34)がリン酸化されることを明らかにした。このリン酸化がmitogen-activated protein kinase, (MAPK)カスケード、MK2(MAPK activated protein kinase 2)に依存していることも示した。先行研究では30秒程度のGタンパク質共役型受容体(G protein coupled receptor, GPCR)を介する細胞外刺激がPAF産生を上昇させることが明らかになっており、他にもPAF生合成酵素の活性化機構があることを示唆していた。

本研究ではPAF生合成酵素の活性調節機構を生化学/酵素学的に解析し、ATPやPAF自身によるGPCRを介する細胞外刺激がLPCAT2を活性化するまでのシグナル伝達経路を解明することを目的とした。

得られた結果の要点は以下の3点である。

- ATPやmethylcarbonyl PAF (mcPAF, PAFの安定アナログ)によってGPCRを介して細胞を刺激した場合、刺激後30秒以内の短時間にLPCAT2のSer34リン酸化が起き、細胞内lyso-PAFAT活性が上昇している。
- 細胞ホモジネートを用いたin vitroでの活性測定によりLPCAT2のSer34のリン酸化が酵素反応の V_{max} を上昇させることを示唆した。
- 30秒程度のGPCR刺激によるLPCAT2のSer34リン酸化は細胞内カルシウムシグナリングとPKC α に依存している。

酵素学的な解析からはLPCAT2の膜貫通領域外にあるSer34がリン酸化により周囲の構造を変化させ、産物であるPAFの放出を早めることが示唆された。またふたつの異なるシグナル伝達経路が独立のリン酸化酵素により同一アミノ酸残基Ser34でLPCAT2の活性を調節しているのは興味深い性質である。以前に報告したLPSによるTLR刺激、今回報告したATPやPAFによるGPCR刺激とともにLPCAT2はリン酸化され活性化されるが、実際に細胞によるPAF産生が確認できたのは後者のみであった。生体においてPAF産生には、LPCAT2のリン酸化による活性上昇に加え、基質の一つであるリゾPAFの供給が必要で、これは細胞内カルシウム濃度上昇やリン酸化に伴う細胞質型ホスホリパーゼA₂ α の活性化が必要であることを示唆した。細菌感染を想定すると、まず細菌との接触によりTLRを介して細胞内のPAF産生能を高めることができる。細菌感染が進んで破壊される組織、細胞があるとそれらから漏出したATPを一種の細胞障害関連分子パターン(damage-associated molecular pattern, DAMPs)として認識し、カルシウムシグナルにより短時間でPAFを合成して炎症を進展させていくような機構が考察できる。また、LPS

刺激後 16 時間程度経過すると LPCAT2 mRNA が誘導されるという報告もあり、炎症の時期に応じて必要な PAF を産生するために LPCAT2 の発現量とリン酸化が多段階に制御されていると推定できる。

PAF はこれまで敗血症などの感染症に限らず、喘息やアナフィラキシーなどのアレルギー疾患、血圧の調節、分娩、痛みなど多彩な病態生理との関わりが示唆されてきた。PAF 生合成の生化学的解析が進んでいたのと同時に PAF 下流のシグナル伝達経路についても検討されており特異的な受容体の存在が示唆されていた。実際に PAF 受容体は 1991 年に脂質メディエーターの受容体として初めて所属研究室でクローニングされた。多くの受容体アンタゴニストが開発され、喘息をはじめとした疾患への応用が目指されたが、ヒトでの効果不足や副作用により臨床応用には至らなかった。動物モデルが短期間で完成されるのに対し、ヒト疾患は長い期間をかけて慢性的に進行するという違いがあり、結果的に PAF の短時間で局所に作用する性質からは受容体で作用に干渉するには困難が予想される。今回、長らく不明であった生合成酵素活性化の機序が明らかになったことで酵素阻害による新しい視点からの PAF 病態生理作用へ干渉への道筋がつけられたと考えている。実際に、大規模化合物ライブラリーからの LPCAT2 特異的阻害剤のスクリーニングにより、阻害剤候補化合物の同定につながった。今後、疾患動物モデルでの *in vivo* な検討を予定している。

このように当報告では生理活性脂質である PAF の基礎的な生合成調節機構を生化学的に明らかにした。これらの実験事実を基として PAF の生理作用、病態生理作用のさらなる解明と創薬に関連して臨床での疾患制御が期待される。