

審査の結果の要旨

氏名 森本 亮

本研究は細胞外刺激に応答して急激に産生される炎症惹起性の脂質メディエーターである血小板活性化因子 (Platelet-activating factor, PAF) の生合成調節機構を明らかにすることを目的とした。マウスチオグリコレート誘導腹腔マクロファージやマクロファージ系培養細胞 RAW264.7 細胞などの系を用いて、PAF 生合成活性であるリゾ血小板活性化因子アセチル転移酵素 (lyso-PAF acetyltransferase, lyso-PAFAT) 活性を持つ LPCAT2 (lysophosphatidylcholine acyltransferase 2) の活性調節機構を生化学的に解析した。一連の実験から下記の結果を得ている。

- 既知の lyso-PAFAT には LPCAT1、LPCAT2 の 2 種類があり、それぞれを PAF 受容体安定発現 CHO-S 細胞に過剰発現し、methylcarbanyl PAF (mcPAF、PAF の安定アナログ) で 30 秒間刺激した。lyso-PAFAT 活性を *in vitro* で測定したところ、刺激の有無で LPCAT1 の活性に変化はなかったが、LPCAT2 発現細胞では刺激により活性が上昇した。細胞ホモジネートを phos-tag SDS-PAGE 後にウェスタンブロットで解析した結果、LPCAT2 のみが刺激に応答してリン酸化を示す泳動度の異なるシグナルを示した。
- チオグリコレート誘導腹腔マクロファージを mcPAF で経時的に刺激した。約 40 分までの mcPAF 刺激では LPCAT2 の総発現量に大きな変化は無かったが、刺激後 10 秒程度の短時間で LPCAT2 のリン酸化が観察された。刺激したマクロファージから脂質を抽出して液体クロマトグラフ-タンデム質量分析で PA を定量した結果、細胞からの PAF 産生は mcPAF 刺激後 10 秒程度で始まっており、およそ 5 分で最大量となっていた。
- LPCAT2 はリポ多糖による刺激後 30 分程度で 34 番目のセリン残基 (Ser34) にリン酸化を受けることを所属研究室から以前に報告した。Ser34 をアラニン、もしくはアスパラギン酸に置換した変異体 (それぞれ S34A、S34D とした) を過剰発現した細胞を mcPAF で 30 秒間刺激し、ホモジネートを解析した結果、2 種類の変異体では刺激依存的なリン酸化シグナルが消失しており、刺激依存的な lyso-PAFAT 活性の上昇が消失していた。リン酸化フォームを模す S34D では無刺激のホモジネートでも野生型よりも高い lyso-PAFAT 活性を示した。これらの結果から、Ser34 が唯一の

リン酸化部位であることが示唆された。

- 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。
- 阻害剤を用いた薬理学的実験、siRNA を用いた実験によって ATP や mcPAF による G タンパク共役型受容体 (G-protein coupled receptor, GPCR) を介した刺激では 30 秒以内の短時間に Gq/11-PLC β -イノシトール(1, 4, 5)三リン酸の経路を介して DAG の増加と細胞内カルシウムの上昇が起き、PKC α を介して Ser34 がリン酸化されることが示唆された。
- 細胞からの 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。

本論文は PAF 生合成酵素 LPCAT2 が細胞外部からの刺激に応答して Ser34 にリン酸化を受け、活性を調製されていること及びこのリン酸化に至るシグナル伝達経路を明らかにした。本研究はこれまでホモジネートで数多く報告されてきた、PAF 生合成酵素の活性化メカニズムを明らかにし、疾患における病態生理的な PAF シグナルに介入する標的を提供した。実際にこれらの結果を基にして大規模化合物ライブラリーから LPCAT2 の特異的阻害剤が報告された。また、膜リン脂質代謝と PAF 生合成の関係も示唆され、今後の脂質メディエーター研究にも重要な貢献をなすと考えられる。以上のことから学位の授与に値するものと考えられる。