

アポトーシス細胞におけるグリセロリン脂質  
膜アシル化・再アシル化酵素群の解析

一 巖 味 厚

①

アポトーシス細胞における  
グリセロリン脂質脱アシル化  
・再アシル化酵素群の解析

平成4年度入学 厚味巖一  
指 導 教 官 井上圭三

# 目次

第 I 章	はじめに	5
第 II 章	アポトーシス細胞におけるグリセロリン脂質の変化と 代謝酵素群の解析	
II-1	序論	1 0
II-2	脱アシル化反応	1 2
II-3	アシル CoA 合成酵素と加水分解酵素	3 0
II-4	再アシル化反応	3 9
II-5	アポトーシスの進行に対する脱アシル化反応の関与	4 2
II-6	神経細胞死におけるリン脂質変動	4 3
II-7	まとめ	4 9
第 III 章	アポトーシス細胞における細胞質ホスホリパーゼ $A_2$ の限定分解	
III-1	序論	5 2
III-2	アポトーシスに伴う $cPLA_2$ の限定分解	5 3
III-3	$cPLA_2$ 限定分解機構の解析	6 0
III-4	普遍性	6 8
III-5	$cPLA_2$ 限定分解の生物学的意義の解明への試み	7 4
III-6	まとめ	7 9



第 IV 章	アポトーシスに伴う細胞膜の分泌性 IIA 型ホスホリパーゼ $A_2$ に対する感受性の獲得	
IV-1	序論	8 3
IV-2	IIA 型 sPLA $_2$ 感受性の獲得	8 4
IV-3	まとめ	9 2
第 V 章	総括	9 4
第 VI 章	試薬ならびに方法	9 8
第 VII 章	参考文献	1 1 5
	謝辞	1 3 1
	論文内容の要旨	



## 略語

PAF : 血小板活性化因子 (platelet activating factor)

TNF : 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor)

ICE : インターロイキン 1 $\beta$  転換酵素 (interleukin 1 $\beta$ - converting enzyme)

TLC : 薄層クロマトグラフィー

DAPI : 4', 6-diamidino-2-phenylindole

PLA<sub>2</sub> : ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub>)

cPLA<sub>2</sub> : 細胞質ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>)

sPLA<sub>2</sub> : 分泌型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (secretory phospholipase A<sub>2</sub>)

iPLA<sub>2</sub> : カルシウム非依存性ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>)

BEL : bromoenol lacton

DMSO : dimethyl sulfoxide

AACOCF<sub>3</sub> : arachidonyl trifluoromethyl ketone

MAFP : methyl arachidonyl fluorophosphate

EDTA : ethylenediamine tetraacetic acid

ATP : adenosine triphosphate

CoA : coenzyme A

pCMB : p-chloromercuribenzoate

NGF : nerve growth factor

SDS : sodium dodecylsulfate

PAGE : polyacrylamido gel electrophoresis

TNFR : TNF レセプター

CHX : サイクロヘキシミド

# I はじめに

17世紀の顕微鏡の発明により、生物の基本的な共通した構造の単位が細胞であるという概念が生み出された。19世紀になると、細胞は何らかのバリアーにより区切られ、その中に袋のような粒子と水溶液が含まれるものであることが一般に受けいられた概念となった。しかし、このバリアーが脂質性の分子により構成されていることが示唆されたのは19世紀も終わろうとする1895年のことで、Overtonが形質膜の透過性の実験より導きだした。今世紀に入り、科学的な技術の進歩と共に生体膜の研究も爆発的な勢いで進み、現在では生体膜はタンパク質、リン脂質やコレステロールの分子が約10 nmの厚さをもって規則的に正しく並んだものと考えられている。そしてこの薄層が、連続して湾曲することで袋状になり細胞を形作っているのである。

ところで、生体膜は細胞という生命の最小単位の確立あるいは維持に重要な物であることは疑いもない。膜構造による外界と細胞内の分離は、細胞の独立性を保つことで、細胞個々の個性の確立にも関与してきた。さらに、細胞は生体膜により各コンパートメントごとに分離され、その機能が厳密に調節されている。このように膜構造による分離は生物の進化において重要な役割を果たしてきた。

生体膜の構成成分は化学的にはたんぱく質と脂質の2つの成分である。その中でも脂質は、生体膜が疎水性を持つバリアーとしての機能を示すために重要な分子である。1925年にGorterとGrendelにより脂質分子が2重層であることが示された。彼らは赤血球の脂質を抽出し、単分子膜を形成したところ元の赤血球の2倍の面積になったことから、2重層であることを提唱した。さらに、1972年には生体膜は固まった構造をしているのではなく、生体膜の構成要素は非対称分布を示し、膜はダイナミックに流動性のある構造であるという現在も膜の基本構造として認められている「流動モザイクモデル」がSingerとNicolsonにより提唱された。しかし、近年まではこのようにその構造や種類の研究が行なわれていたのみで、生化学的には注目される物質ではなかった。ところが、生体膜主要構成成分のグリセロリン脂質の1つであるイノシトールリン脂質の細胞内情報伝達経路への関与は、生体膜が分子的に大きく注目を浴びるきっかけを作った。

Michellは1975年にホルモンによるホスファチジルイノシトール代謝の亢進が細胞内



へのカルシウムイオンを流入させると報告した。この報告は、膜脂質が細胞機能に関与するという概念を初めて世に示したものであり、この理論は様々な紆余曲折を得て、現在ではイノシトール代謝回転として細胞内情報伝達では中心的な位置づけに置かれている。この発見がまさにスイッチを入れたかのように、生理作用との関与についての生化学的な脂質研究がスタートした。

Takenawa は以下に示すように脂質の機能を大きく5つに分類している [1]。

- 1: 生理活性を持つ脂質
- 2: 活性モジュレータとしての脂質
- 3: シグナル伝達に関与する脂質
- 4: 膜アンカーリング脂質
- 5: 膜構成成分としての脂質

生理活性を持つ脂質メディエーターはリゾホスファチジン酸 [2]、血小板活性化因子 (PAF) [3] やエイコサノイド類 [4] を始めとして多数存在することが明らかにされている。これらには特異的な受容体が存在し、その受容体からのシグナル伝達経路についても現在盛んに研究が進められている。

酵素活性が特異的な脂質の添加により変化することは、プロテインキナーゼ C [5, 6] や細胞骨格系のタンパクにおいて知られている。ホスファチジルイノシトール 2 リン酸は、ホスホリパーゼ D の活性化 [7] のみならずアクチン重合阻害 [8] など多様な機能を示す。他にも、細胞内情報伝達においてセカンドメッセンジャーの供給源として働くことも明らかとなっている。また、膜とたんぱく質をつなぎ止める脂質としてホスファチジルイノシトールやミリスチン酸やパルミチン酸などの脂肪酸などがある [9]。

セカンドメッセンジャーとして最近、スフィンゴミエリナーゼが加水分解することにより産生されるセラミドが注目されている [10, 11]。Hannun らは刺激にตอบสนองして、スフィンゴミエリナーゼが活性化され、セラミドの産生が促進されることを報告している [12]。セラミドは、スフィンゴミエリンへホスファチジルコリンとのコリン交換反応により再び戻ることから、この分解と再生はスフィンゴミエリンサイクルと呼ばれ、制

御する酵素にスフィンゴミエリナーゼがあげられる。このように、脂質の様々な生理的作用には数多くの脂質の代謝に関与する酵素の存在がある [13]。

脂質代謝に関与する酵素は基質が脂質であることから、基質認識に関与する部分は疎水物質に親和性があると考えられる。それゆえ、酵素精製における水溶液中での存在は酵素にとっては好ましくない環境であり、活性の損失などを招きやすい。また、*in vitro*での反応も水溶液中で行うことが多く、実際の細胞中での反応が観察できにくい欠点があり、これらの酵素の精製は困難な場合が多い。しかし、ニーマン・ピック病がスフィンゴミエリナーゼの欠損が原因であること [14] や PAF アセチルヒドラーゼがヒト滑脳症の原因遺伝子であること [15] など、疾病と密接に関与する可能性が示唆されている。

脂質代謝とそれに関与する酵素群の解析は、様々な生体現象を明らかにしていく未知の可能性を秘めている。現在困難を極めている疾病の原因解明やもしかすると遺伝病の解明にもつながる可能性さえ予想され、興味深い。本研究では、最近になり注目を集めているアポトーシスという細胞死に焦点を絞り解析を行った。アポトーシスは細胞構造のダイナミックな変化を伴う現象である。すなわち、膜構造の変化が大きいと予想される現象である。本研究では脂質の中でも主要構成成分のグリセロリン脂質について注目し、アポトーシスに伴う変動を解析した。さらに、この変動に関与する代謝酵素のなかでも脱アシル化、再アシル化酵素について検討を加えた。

## II アポトーシス細胞における グリセロリン脂質の変化と 代謝酵素群の変動



## II-1 序論

生体において細胞は増殖しさらには死んでいく。この機構は、巧妙に調節され生体は恒常性を維持している。細胞の増殖機構については精力的に研究が進められてきたが、細胞死についての研究は、無くなりゆくものであるためか、増殖機構の解明に対しては著しく遅れていた。しかし、1972年に病理学者の Kerr らは特徴的な形態を示す細胞死を見出し、ギリシャ語で木の葉が秋になると離れて落ちることを意味する、アポ（離れる）トーシス（落ちる）、と名付けた〔16〕。さらに、アポトーシスは病理的な所見から実は古くから知られていたものであったが、定義がなく認知されてはいなかったことも明らかとなった。

Kerr らの報告から細胞死を形態学的等の特徴により、分類して考えるようになった。アポトーシスによる細胞死の例として、発生段階での細胞死や神経細胞死などがあげられる。特に発生段階の細胞死はプログラムされた細胞死とも呼ばれ、このプログラム細胞死とアポトーシスが同じ意味として取り扱われることもあった。しかし、アポトーシスは一般的には能動的な死を指すことが多く、細菌感染やウイルス感染による細胞の死などはプログラム細胞死とは呼べないものである。このアポトーシスと対比される細胞死として、外界からの刺激等による受動的な死のネクローシスがある。ネクローシスは日本語では壊死と訳される。アポトーシスとネクローシスは細胞形態に大きな差が見られる。アポトーシス細胞は組織学的にクロマチンの凝縮、核濃縮や断片化、細胞質の断片化が観察されるが、細胞内容物は細胞外へ漏れださない。一方、ネクローシス細胞は細胞構造が破壊され、細胞内容物は外へと漏れだす。このことは、アポトーシス細胞が周りの細胞に影響を与えず、炎症反応を起こすことなく除かれていくのに対し、ネクローシス細胞は炎症を惹起することの原因として考えられる。

アポトーシス細胞は生化学的にもいくつかの特徴を有する。例えば、DNA のヌクレオソーム単位での断片化はアポトーシス細胞の検出にも用いられる代表的な特徴である。

最近、アポトーシスにおける DNA の断片化をおこなうヌクレエースが同定された [17, 18]。この酵素は、アポトーシスに関与する重要な因子の Caspase プロテアーゼにより制御されている。この Caspase プロテアーゼもアポトーシス細胞における生化学的な大きな特徴の 1 つである [19-21]。線虫の発生段階での細胞死に関与する遺伝子 *ced-3* のホモログとして発見されたインターロイキン 1 $\beta$  変換酵素 (ICE) は [22]、システインプロテアーゼで大きなファミリーが存在することが明らかとなった。これらのファミリーは、互いに活性化するカスケードをアポトーシス細胞において形成していることが示され、アポトーシスの中心的な役割を果たしていると考えられている。

アポトーシスの研究が注目を浴び始めたのは、1989 年に Yonehara らが報告した抗 Fas 抗体の発見からである [23]。この抗体を B 細胞に加えると細胞死が誘導された。また、この時の細胞死は形態学的にも生化学的にもアポトーシスの特徴を示した。さらに、この抗体が認識する抗原 Fas は 1991 年に Itoh らによりクローニングされた [24]。Fas は膜貫通型の糖たんぱく質でその構造から腫瘍壊死因子 (TNF) レセプターのファミリーに属する。また、細胞内にデスドメインとよばれる配列を持つのが特徴で、このドメインを介して細胞死のシグナルが細胞内に伝達される (詳細については後述)。さらに、Fas に対するリガンドも 1993 年に Suda らにより発見され [25]、生体は細胞死のための機構を備えていることが明らかとなった。

Fas のシステムの発見により生体にとってのアポトーシスの生理学的、医学的な意義が見直され、自己免疫疾患やガン、さらには痴呆症など様々な疾患への関与が示唆され注目度はますます高くなった。しかし、アポトーシス細胞における脂質に関しての研究は、アポトーシスに伴い細胞小体の形成や核の凝縮など細胞形態の変化に伴う生体膜構造の変化、すなわち膜脂質の変動が予想されるが、スフィンゴミエリン代謝の解析以外はほとんど行われてはいない。また、アポトーシス細胞がマクロファージなどに貪食されるためのマーカーとして、ホスファチジルセリンが細胞膜の外側を向くことが報告され [26-32]、膜リン脂質の変化がアポトーシスに何らかの役割を果たすことも予想される。そこで、アポトーシス細胞におけるグリセロリン脂質の変化を調べた。さらに、



この変化に対応した代謝酵素群の変動についても合わせて検討した。

## II-2 脱アシル化反応

### II-2-1 アラキドン酸遊離反応

アポトーシスを誘導するサイトカインである Fas の刺激によるアラキドン酸遊離量の変化を観察するため、ヒト単核球系白血病細胞株 U937 細胞をあらかじめ放射標識アラキドン酸で標識した後、様々な濃度 (0, 5, 50 ng/ml) の抗 Fas 抗体量で処理することでアポトーシスを誘導した。12 時間後に細胞を回収し、ドールの変法 [33] により脂質画分を抽出した。ドールの抽出法は極性を持つ脂質は抽出されず、脂肪酸や中性脂質のように極性を持たない脂質が抽出される。そこで抽出後、TLC により各脂質を分離し、各々の放射活性を測定した (Fig. 2-1)。その結果、ドールの変法により抽出した脂質画分の放射活性は抗 Fas 抗体量依存的に増加していた。その増加は遊離アラキドン酸量の増加によるものであった。他の中性脂質には大きな変動は観察されなかったが、ジアシルグリセロール量の有意な増加が観察された (Fig. 2-1)。この増加は、リン脂質の新生成経路が亢進したか、ホスホリパーゼ C が活性化した可能性が考えられる。

U937 細胞の抗 Fas 抗体処理により、Fig. 2-1 で観察されたアラキドン酸遊離について、抗 Fas 抗体量依存性並びに抗 Fas 抗体処理時間依存性を調べた (Fig. 2-2)。その結果、抗 Fas 抗体処理 3 時間後からアラキドン酸遊離の増加が観察された。さらにその遊離量は抗 Fas 抗体量ならびに処理時間依存的に増加し、抗 Fas 抗体 100 ng/ml 処理では処理前の約 6 倍になった。一方、未処理細胞においては、24 時間後でもアラキドン酸遊離の有意な増加は観察されなかった。これらの結果より Fas によるシグナルによりアラキドン酸遊離が増加することが示唆された。



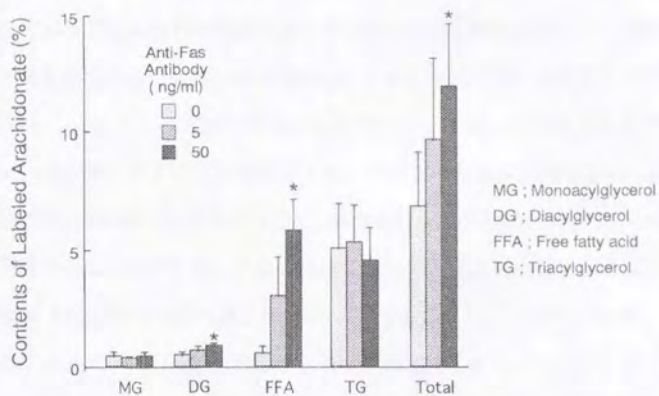


Fig. 2-1 放射アラキドン酸標識 U937 細胞の抗 Fas 抗体処理による  
ドール抽出画分における放射活性の増加

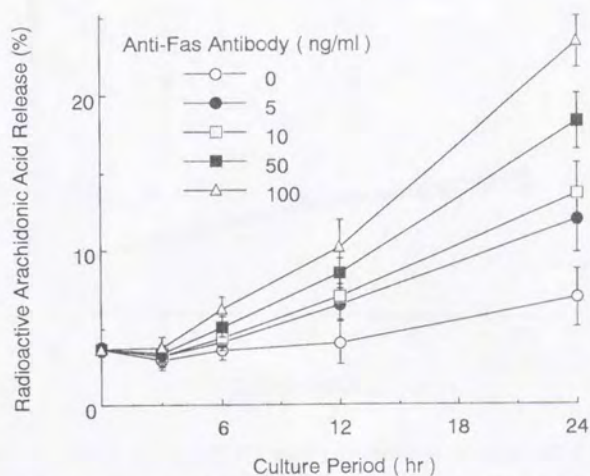


Fig. 2-2 U937 細胞の抗 Fas 抗体処理によるアラキドン酸遊離の  
抗 Fas 抗体量並びに処理時間依存性

さらに、このアラキドン酸遊離反応が抗 Fas 抗体が Fas 分子に結合し、細胞死のシグナルのスイッチを入れたためであることを確かめる目的で、アポトーシスを誘導することが単独では不可能な抗 Fas 抗体を用いて先程と同様の実験を行った。Fas 分子は 3 量体以上の複合体を作ることにより細胞死のシグナルを細胞内に伝えることが知られている [34-36]。Fig. 2-1, -2 で用いた抗 Fas 抗体の CH-11 は、抗体のクラスが IgM であるため Fas 分子を重合することが可能であり、アポトーシスが誘導できる [23, 37]。しかし、IgG である SM1/1 は抗体のみでは Fas を重合させることが不可能なため、アポトーシスを誘導することができない。この抗体を用いた結果、抗体量に関わらずアラキドン酸遊離量は未処理細胞と差が見られなかった (Fig. 2-3)。この結果から、アラキドン酸遊離はアポトーシスの進行と相関する可能性が示唆された。

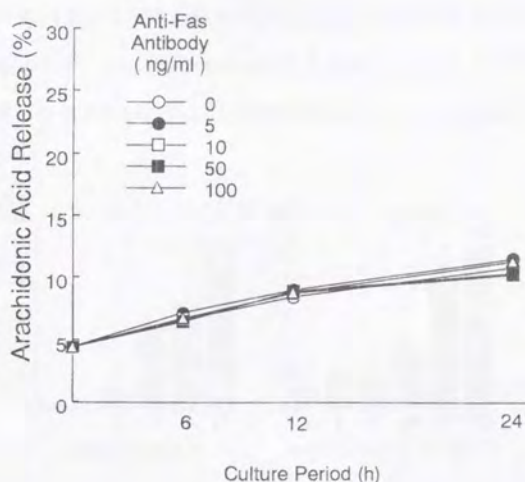


Fig. 2-3 アポトーシスを誘導できない抗 Fas 抗体 (SM1/1) による  
アラキドン酸遊離反応

## II-2-2 アポトーシスとの相関

次に、抗 Fas 抗体処理に伴うアラキドン酸遊離反応とアポトーシスとの相関性を調べる目的で、アポトーシスの定量を試みた。方法としては、トリパンブルー染色による死細胞率の測定 (Fig. 2-4) と DNA に特異的に結合する蛍光試薬の 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いた DNA 断片化の定量 (Fig. 2-5) [38] を行った。50 ng/ml の抗 Fas 抗体処理 6 時間後から有意な死細胞率の増加が観察され、12 時間後にはおよそ半数の細胞が死んでいた (Fig. 2-4、左)。DNA のヌクレオソーム単位への断片化はアポトーシスに特徴的である。そこで、遠心により断片化した DNA とインタクトな DNA とを分離し、DAPI を用いて定量した。抗 Fas 抗体処理 9 時間後には約 30 % が断片化しており (Fig. 2-5、左)、12 時間後には抗 Fas 抗体 1 ng/ml でも断片化の傾向が見られ、10 ng/ml 以上で有意に増加していた (Fig. 2-5、右)。さらに、実際に細胞から DNA を抽出して電気泳動を行ったところ、抗 Fas 抗体 1 ng/ml では断片化していない DNA が多いが、10、100 ng/ml となると断片化した DNA が観察され始め、100 ng/ml ではインタクトな DNA はほとんど観察されなかった (Fig. 2-6)。

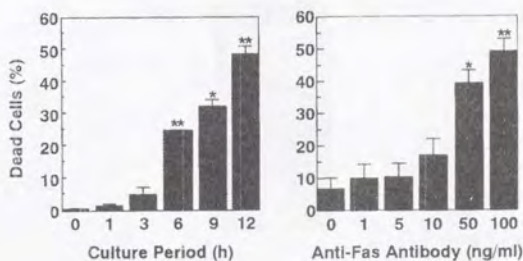


Fig. 2-4 トリパンブルー染色によるアポトーシス細胞の定量 (左: 抗 Fas 抗体 100 ng/ml における時間依存性、右: 12 時間後の抗 Fas 抗体量依存性)



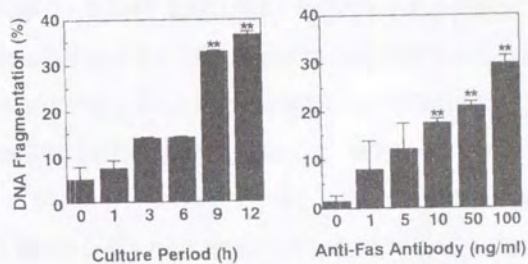


Fig. 2-5 蛍光試薬 DAPI を用いた DNA 断片化の定量 (左: 抗 Fas 抗体 100 ng/ml における時間依存性、右: 12 時間後の抗 Fas 抗体量依存性)



Fig. 2-6 抗 Fas 抗体処理 12 時間後の U937 細胞 DNA の電気泳動 (レーン 1 : 0 time、2 : 抗 Fas 抗体未処理、3 : 1 ng/ml、4 : 10 ng/ml、5 : 100 ng/ml)

## II-2-3 脂肪酸選択性

抗 Fas 抗体処理により U937 細胞に誘導したアポトーシスの進行によく相関して、アラキドン酸遊離が観察されることが明らかになった。細胞外からの様々な刺激によりアラキドン酸遊離反応が起こることが様々な細胞において観察されている [39]。これらのアラキドン酸遊離反応に関与する酵素として、細胞質ホスホリパーゼ  $A_2$  ( $cPLA_2$ ) が知られている [40, 41]。 $cPLA_2$  はアラキドン酸含有リン脂質に選択的に作用するため、アラキドン酸カスケードの開始酵素として位置づけられている酵素である。そこで、抗 Fas 抗体刺激によるアラキドン酸遊離反応がアラキドン酸特異的に観察されるか否かをまず調べることで  $cPLA_2$  の関与の有無について検討した。

U937 細胞をアラキドン酸のかわりに放射標識オレイン酸あるいはパルミチン酸で 24 時間標識し、抗 Fas 抗体処理によりアポトーシスを誘導した。24 時間後に細胞を回収し、ドールの方法により抽出した脂質画分を TLC により分離し、放射活性を測定した。その結果、Fig. 2-1 と同様にパルミチン酸 (Fig. 2-7) やオレイン酸 (Fig. 2-8) で標識した場合も、脂肪酸の抗 Fas 抗体量依存的な遊離が観察された。脂肪酸遊離の割合はどの脂肪酸で標識した場合もほとんど差が無く、抗 Fas 抗体により誘導されたアポトーシスに伴う脂肪酸遊離反応には、脂肪酸選択性はないと考えた。

Fig. 2-7, -8 よりトリアシルグリセロールのアポトーシスに伴う変化が観察された。そこで、Brigh & Dyer 法 [42] により脂質画分をすべて抽出し、TLC により分離後、放射活性を測定した。すると、ドール抽出法と同じくアラキドン酸 (Fig. 2-9, 上)、オレイン酸 (Fig. 2-9, 下) のどちらの放射標識脂肪酸で標識した場合も、抗 Fas 抗体処理による脂肪酸遊離は観察された。また、トリアシルグリセロールについてはアラキドン酸標識の場合、減少が観察された。Balsinde らは、P388D1 細胞において外来性のアラキドン酸の取り込みがリン脂質とトリアシルグリセロールでは経路が違うことを示し、トリ

アシルグリセロールへの取り込みは脂質の新生合成系からによることを報告した[43]。  
本研究の結果より、アポトーシス細胞において新生合成系による脂質合成の低下の可能性が考えられる。

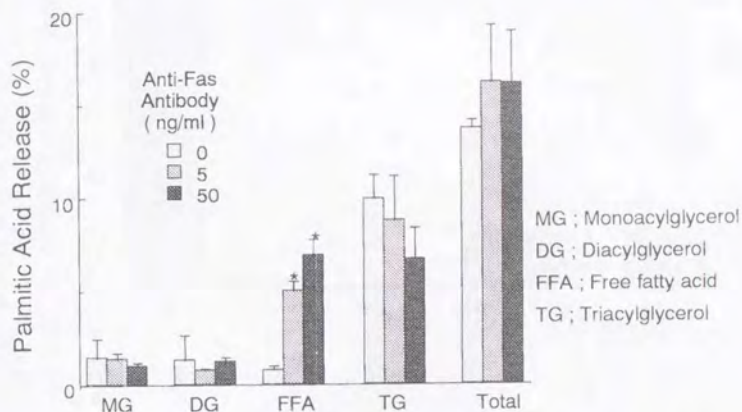


Fig. 2-7 放射パルミチン酸標識 U937 細胞の抗 Fas 抗体処理による  
ドール抽出画分の放射活性の増加

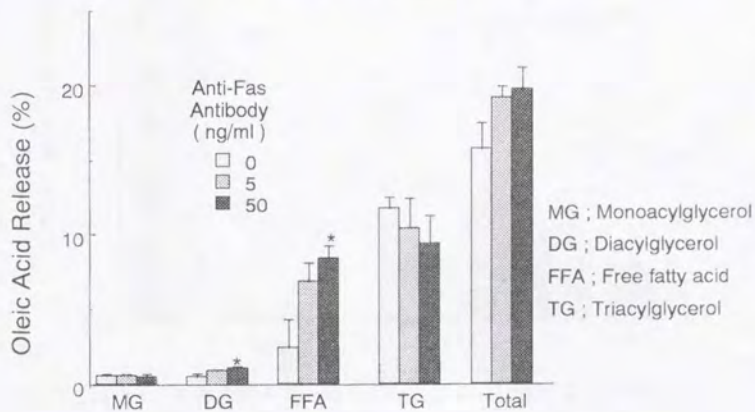


Fig. 2-8 放射オレイン酸標識 U937 細胞の抗 Fas 抗体処理による  
ドール抽出画分の放射活性の増加



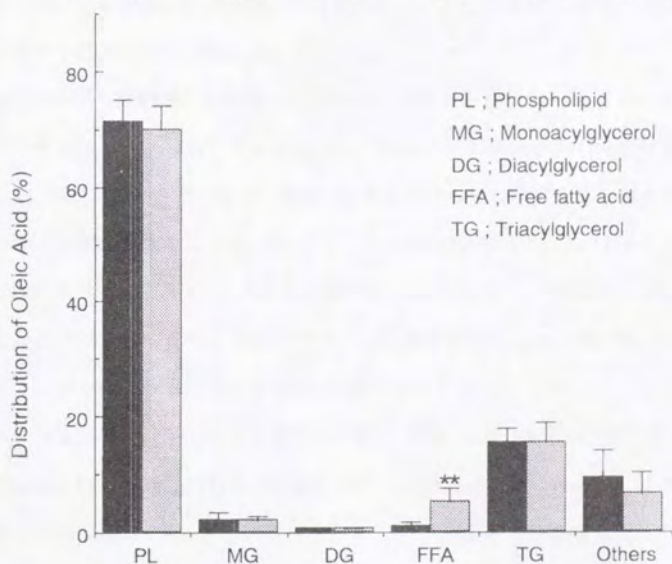
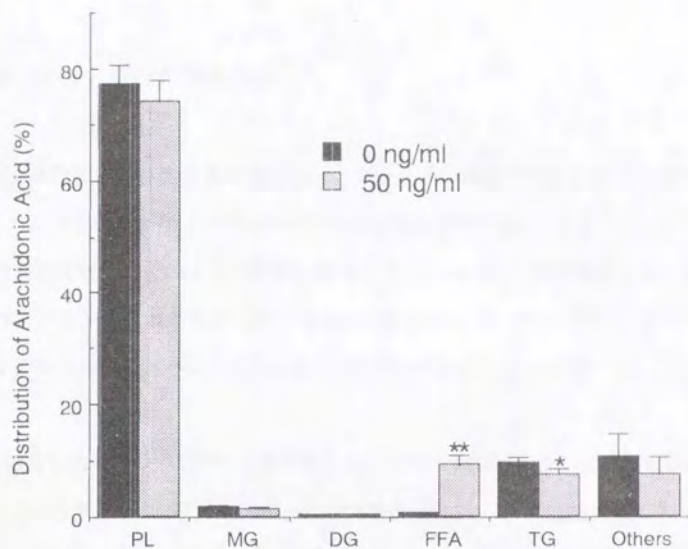


Fig. 2-9 放射アラキドン酸あるいはオレイン酸標識 U937 細胞の  
抗 Fas 抗体処理による、脂質画分の放射活性変動

## II-2-4 関与する酵素群の解析

抗 Fas 抗体処理に伴う脂肪酸遊離反応は、アラキドン酸選択的な現象では無かったこと (Fig. 2-7、-8、-9) より、cPLA<sub>2</sub> のみが関与する現象ではないと考えられた。そこで、この脂肪酸遊離反応にどのような酵素が関与するかについて、次に検討した。遊離脂肪酸量に対応する中性脂質の大きな減少は観察されなかった (Fig. 2-9) ことから、グリセロリン脂質に注目し、どのリン脂質種から遊離されるかを始めに調べた。

U937 細胞を放射標識アラキドン酸あるいはオレイン酸であらかじめ 24 時間標識し、次に、抗 Fas 抗体処理 24 時間でアポトーシスを誘導した。24 時間後の細胞および培養液から Brigh & Dyer 法により、脂質画分を抽出した。2 次元 TLC によりリン脂質各種を分離後、各々の放射活性を測定した。

細胞をアラキドン酸標識した場合、放射標識アラキドン酸含有ホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンが減少し、遊離アラキドン酸と中性脂質を含む画分が増加した (Fig. 2-10)。ところで、遊離アラキドン酸と中性脂質を含む画分の増加は、遊離アラキドン酸の増加によるものであることは既に確認している (Fig. 2-9)。他のリン脂質はホスファチジルイノシトールやホスファチジルセリンを始めとして、分解されることにより生成するセラミドがアポトーシスを誘導すること [44, 45] が知られているスフィンゴミエリンもほとんど変化しなかった。しかし、スフィンゴミエリン代謝はアポトーシスの早い段階でおきるとされており [46]、抗 Fas 抗体処理から短い時間では差が観察される可能性がある。遊離アラキドン酸の増加量 (11.5%) はホスファチジルコリンの減少量 (4%) とホスファチジルエタノールアミンの減少量 (8%) の和と一致していた。このことは、ホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンからアラキドン酸が遊離した可能性を示唆している。

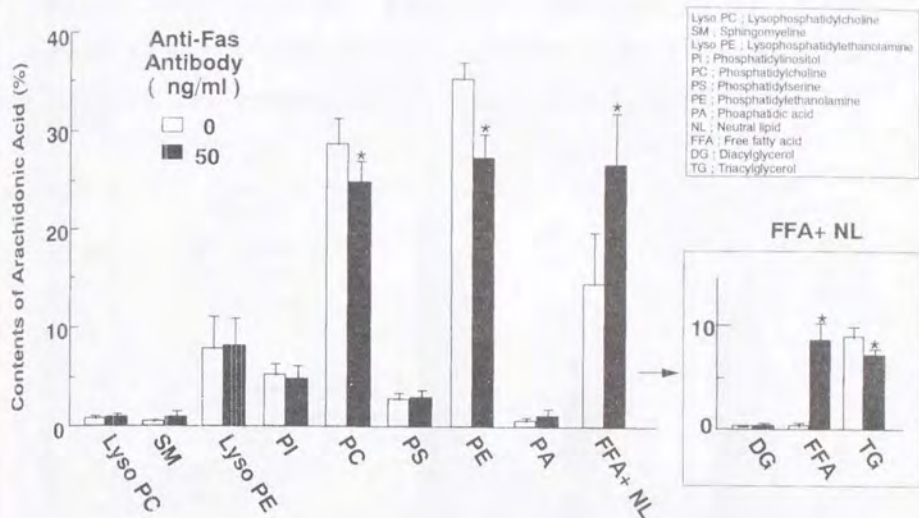


Fig. 2-10 放射アラキドン酸標識 U937 細胞のアポトーシスに伴う

放射標識アラキドン酸含有リン脂質の変化

細胞をオレイン酸で標識した場合にも、遊離オレイン酸の増加が観察された (Fig. 2-11)。放射オレイン酸標識リン脂質の減少は、ホスファチジルコリンが若干の減少傾向にあるものの、アラキドン酸標識細胞で観察されたホスファチジルエタノールアミンの有意な減少は観察されなかった (Fig. 2-11)。ホスファチジン酸の減少は遊離オレイン酸の増加に対応する量は減少しておらず、Fig. 2-9 の放射アラキドン酸標識細胞で明らかになったトリアシルグリセロールの減少と考えあわせると、脂質の新生合成がアポトーシス細胞で減少しているためと考えることができる。

また、このアラキドン酸標識細胞とオレイン酸標識細胞での結果の差は、これら脂肪酸のリン脂質へのアシル化位置の配向性の違いであると考えられる。飽和脂肪酸のパルミチン酸やステアリン酸などはリン脂質の主に 1 位に存在し、不飽和脂肪酸は 2 位に存在することが知られている [47]。その中でも、アラキドン酸はリン脂質の主に 2 位にエス



テル結合して存在している [48]。本反応がオレイン酸標識細胞よりも、アラキドン酸標識細胞で変化が大きく観察されたことは、このアポトーシスに伴う脂肪酸遊離反応にリン脂質の2位を加水分解する酵素の  $PLA_2$  が関与することを示唆している。

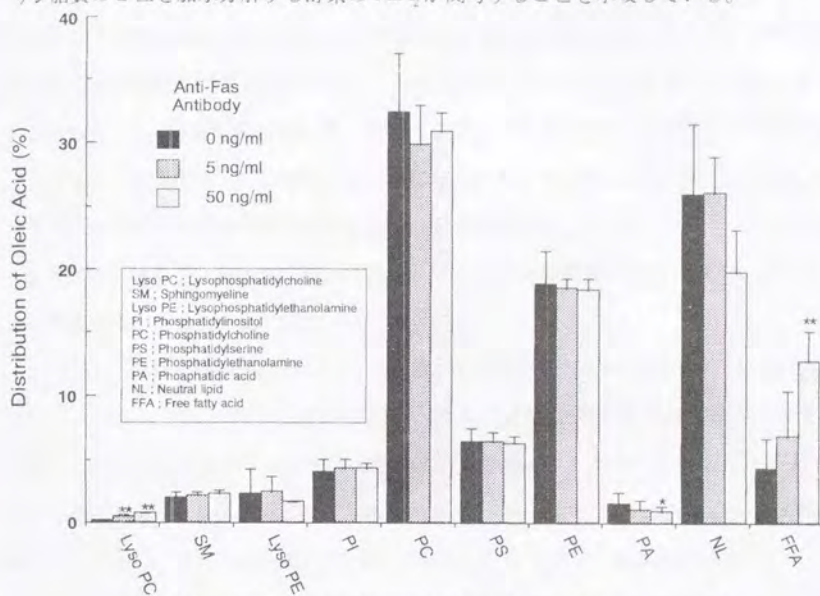


Fig. 2-11 放射オレイン酸標識 U937 細胞のアポトーシスに伴う

放射標識オレイン酸含有リン脂質の変化

$PLA_2$  はグリセロリン脂質の2位のエステル鎖を加水分解し、遊離脂肪酸とリゾリン脂質を産生する酵素である [49-51]。この酵素は、ヘビ毒中に検出されるばかりかハチ科にも検出され、種を越えて広く存在することが明らかにされている。 $PLA_2$  は近年様々なグループにより次々と遺伝子クローニングがなされ、ファミリーを形成していることが明らかとなりつつある [52]。

哺乳動物においてクローニングされている  $PLA_2$  は、大きく4種類に分けることができる。1つめは、比較的分子量の分泌型の酵素で、この中にはI型  $sPLA_2$  やIIA型  $sPLA_2$  が含まれる [53]。I型  $sPLA_2$  は、消化酵素として考えられてきたが、特異的な

レセプターの存在が明らかにされ [54-58]、細胞増殖機能 [59] やエイコサノイド産生 [60, 61] などへの関与が示唆されている。IIA 型 sPLA<sub>2</sub> については、IV 章にて詳しく述べる。最近になり、IIC 型 sPLA<sub>2</sub> [62, 63]、V 型 sPLA<sub>2</sub> [64-67] と X 型 sPLA<sub>2</sub> [68] の 3 種類が相次いでクローニングされた。これらはいずれも分子量 14 kDa の低分子量の分泌型酵素である。システイン残基を 10 個以上持ち、分子内でジスルフィド結合を作り、3 次構造を保っている。活性中心はヒスチジン残基 [69] で、プロモフェナシルプロミド (BPB) はこのヒスチジンに作用することで活性を阻害する。また、活性発現には mM オーダーのカルシウムイオンが必要である。

2 つめは、細胞質に存在する高分子量で、アラキドン酸選択的に働く cPLA<sub>2</sub> である。この酵素については III 章にて詳しく述べる。

3 つめは、酵素活性発現にカルシウムイオンを必要としないカルシウム非依存性ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>) である [70, 71]。iPLA<sub>2</sub> は始めに P388D<sub>1</sub> 細胞で単離精製され [72]、CHO 細胞を始めとし、様々な細胞や臓器からクローニングされた [73-75]。構造の特徴として、8 つのアンキリンリピートとリパーゼに保存されている G-X-S-X-G モチーフを持つ。また、分子量は 80 kDa であるが、オリゴマーを形成して約 300 kDa の巨大分子として存在する。ヒトの cDNA も最近になりクローニングされたが、スプライシングの違いにより少なくとも 3 種類のアイソフォームが存在する可能性が示唆されている [76]。また、iPLA<sub>2</sub> には選択的阻害剤としてプロモエノールラクトン (BEL) が存在する [77]。iPLA<sub>2</sub> の機能としては、P388 D<sub>1</sub> 細胞でのアンチセンスを用いた解析から、細胞膜リン脂質のリモデリングに関与していることが示された [78]。

4 つめは、PAF のアセチル基を加水分解する、PAF アセチルハイドロレースである [79]。様々な生理活性を持つ PAF を不活化する酵素で、血漿型と細胞内型の 2 種の存在が明らかにされており、それぞれクローニングされている。

そこで、アポトーシスに伴う脂肪酸遊離反応に関与する PLA<sub>2</sub> の同定を試みるために、分泌型、細胞質型、カルシウム非依存型の各種に特異的な阻害剤を用いて検討した。



PAF アセチルヒドレースについては、酸化リン脂質を基質にすることが知られているが [80]、通常の長鎖脂肪酸には作用しない点から関与を否定した。なお、本反応の変化はアラキドン酸標識細胞を用いたほうが観察しやすいと考え、以降は放射アラキドン酸標識細胞を用いて行った。

あらかじめ 24 時間放射アラキドン酸標識した U937 細胞に、抗 Fas 抗体 100 ng/ml でアポトーシスを誘導するときに阻害剤を共存させた。アポトーシス誘導 24 時間後に遊離されてきた放射活性を測定し、阻害剤を加えずに (DMSO のみ) アポトーシスを誘導した細胞の放射活性を 100 % として、阻害剤を加えた場合の遊離の割合を求めた (Fig. 2-12)。

cPLA<sub>2</sub> の阻害剤であるアラキドニルトリフルオロメチルケトン (AACOCF<sub>3</sub>) は様々な細胞において cPLA<sub>2</sub> の関与する反応を阻害している [81]。U937 細胞ライセート中の cPLA<sub>2</sub> 活性は、1 μM AACOCF<sub>3</sub> で 94 % が抑制され、10 μM AACOCF<sub>3</sub> で完全に抑制された (data not shown)。この結果から 10 μM AACOCF<sub>3</sub> で実験を行ったところ、アポトーシスに伴うアラキドン酸遊離反応を全く阻害しなかった (Fig. 2-12)。以上の結果より、cPLA<sub>2</sub> の関与はないと考えた。また、更なる解析を行ったところ cPLA<sub>2</sub> がアポトーシスに伴い限定分解されることを明らかとし、詳細については第 III 章にて述べる。これらにより、cPLA<sub>2</sub> はアポトーシスに伴うアラキドン酸遊離反応に関与しないと結論した。

アメリカのリリー社で開発された、ヒト II A 型 PLA<sub>2</sub> 特異的阻害剤 LY311727 は [82-84]、本反応に影響を与えなかった (Fig. 2-12)。この阻害剤は、ヒト II A 型 PLA<sub>2</sub> の構造を基に、コンピューターモデルにより作られた化合物で、基質に対する酵素側のポケットにはまりこみ、活性を阻害する。また、活性中心のヒスチジンに結合することで sPLA<sub>2</sub> 活性を抑制するとされている、ブロモフェナシルブロミド (BPB) [85] や II 型 PLA<sub>2</sub> の阻害剤として開発された、チエロシン A1 [86] も効果を示さなかった。以上のことより、アポトーシスに伴うアラキドン酸遊離反応への、sPLA<sub>2</sub> の関与も否定



的となった。

ところが、cPLA<sub>2</sub> と iPLA<sub>2</sub> の阻害剤であるメチルアラキドニルフルオロホスホエート (MAFP) [87, 88] を加えると、アラキドン酸遊離は MAFP 10 nM から抑制され始め、100 nM では約 50 %、1  $\mu$ M では 85 % が抑制された (Fig. 2-12)。cPLA<sub>2</sub> の関与が考えられないことから、アポトーシスに伴うアラキドン酸遊離反応への iPLA<sub>2</sub> の関与が示唆された。そこで、iPLA<sub>2</sub> の特異的な阻害剤として知られている BEL を加えたところ、阻害傾向が観察され、50  $\mu$ M では約 40 % 抑制した (Fig. 2-12)。

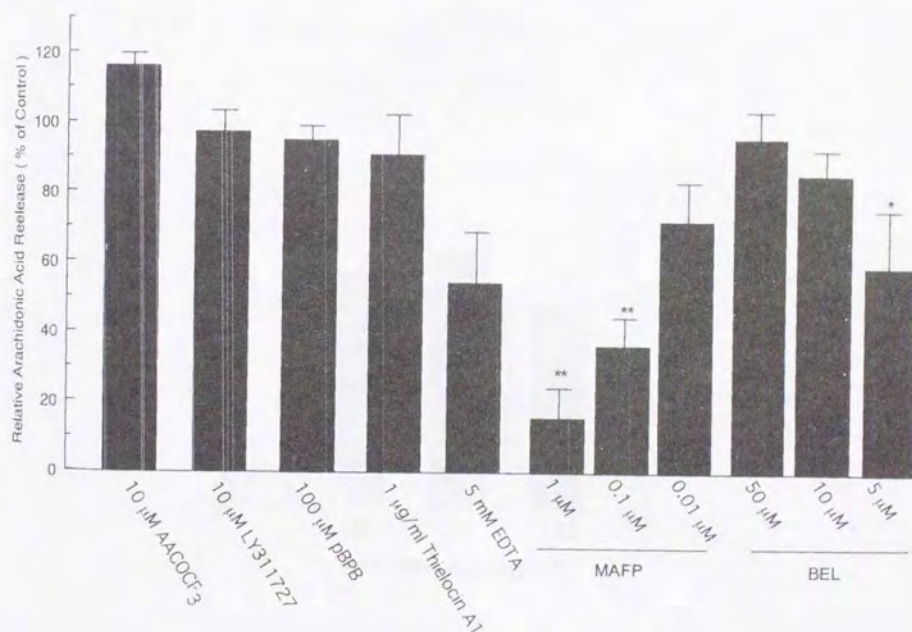


Fig. 2-12 各種 PLA<sub>2</sub> 阻害剤のアポトーシスに伴うアラキドン酸遊離反応への効果

アポトーシスに伴うアラキドン酸遊離反応において  $iPLA_2$  の関与が阻害剤により示唆された。また、放射オレイン酸標識細胞を用いた場合のオレイン酸遊離反応も、 $1\ \mu\text{M}$  MAFP により阻害され (data not shown)、アポトーシスに伴う脂肪酸遊離反応は MAFP により阻害された。しかし、阻害剤の感受性が今まで同定された  $iPLA_2$  とは異なっている。現在のところ報告された  $iPLA_2$  は BEL に対して特異性が強く、 $\text{nM}$  のオーダーで効果が現れる [77, 88]。しかし、本反応では、BEL に較べておよそ約 1,000 倍 MAFP の方が感受性が高い。そこで実際に  $iPLA_2$  活性を測定することにした。

Ackermann らの方法 [72] に従い活性を測定することとしたが、基質を以下の理由により変えた。Fig. 2-10 に示した様にホスファチジルエタノールアミンの減少が顕著であることと、オレイン酸よりもアラキドン酸含有リン脂質で変化が大きかったことから、ジパルミトイルホスファチジルコリンから 1-パルミトイル-2-アラキドニルホスファチジルエタノールアミンに変えた。

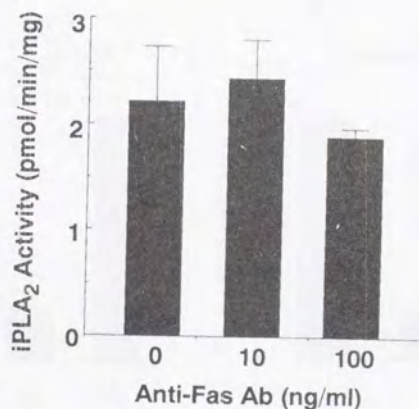


Fig. 2-13 アポトーシス誘導 U937 細胞中の  $iPLA_2$  活性

Triton X-100 存在下のソニケーションによりリボソームを形成させた基質を用いて、EDTA や ATP の存在下 40 °C で 30 分間反応を行った。その結果、抗 Fas 抗体未処理、抗 Fas 抗体 10 あるいは 100 ng/ml で 12 時間処理した U937 細胞のライゼート中の  $iPLA_2$  の比活性 (pmol/min/mg) は、それぞれ 2.14、2.25、1.82 であり、抗 Fas 抗体量には関係なくほぼ一定であった (fig. 2-13)。すなわち、アポトーシス細胞においても変化しないと考えられる。

次に、MAFP と BEL の U937 細胞ライゼート中の  $iPLA_2$  活性に与える影響について調べた。ライゼートと阻害剤をあらかじめ 5 分間インキュベーションし、その後、基質を加え反応を行った。その結果、10  $\mu$ M MAFP の処理で酵素活性は約 85 % が抑制された (Fig. 2-14)。さらに 1  $\mu$ M の濃度においても約 70 % の活性が抑制された (data not shown)。一方 BEL は、10  $\mu$ M でも抑制傾向は見られず、50  $\mu$ M を加えることで、約 30 % の活性が抑制された (Fig. 2-14)。この抑制傾向及び濃度は、Fig. 2-12 で示したアラキドン酸遊離反応の場合と良く似ていた。

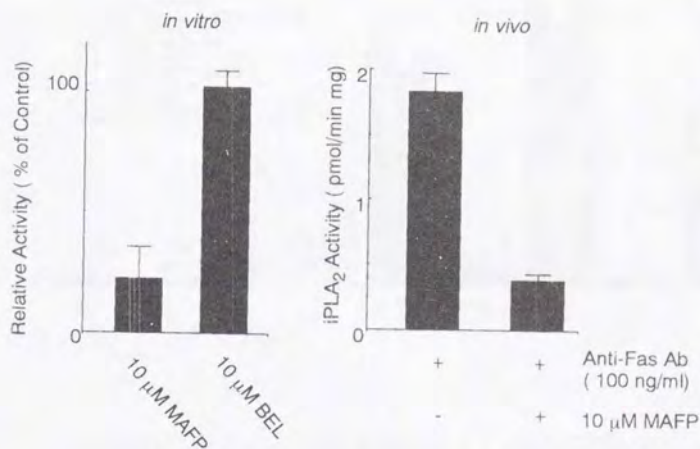


Fig. 2-14 阻害剤の  $iPLA_2$  活性への影響 (右: in vitro、左: in vivo)



さらに、MAFPを用いて検討を行った。まず、MAFP処理細胞における*iPLA<sub>2</sub>*活性を測定した。U937細胞を抗Fas抗体100 ng/mlと10  $\mu$ M MAFPの両方で12時間処理後、細胞を回収し、*iPLA<sub>2</sub>*活性を測定した。その結果、比活性はMAFP未処理細胞のライセートに比べ、約10分の1であり (Fig. 2-14)、MAFPが細胞内でも*iPLA<sub>2</sub>*活性を阻害することが明らかになった。次に、リン脂質組成の変化について、放射アラキドン酸標識細胞を用いて調べたところ、アラキドン酸遊離は抗Fas抗体未処理細胞と同程度まで抑制された (Fig. 2-15)。また、アポトーシスに伴う放射アラキドン酸含有ホスファチジルエタノールアミンの減少は観察されず、アポトーシスを誘導していない細胞のレベル以上に回復した (Fig. 2-15)。

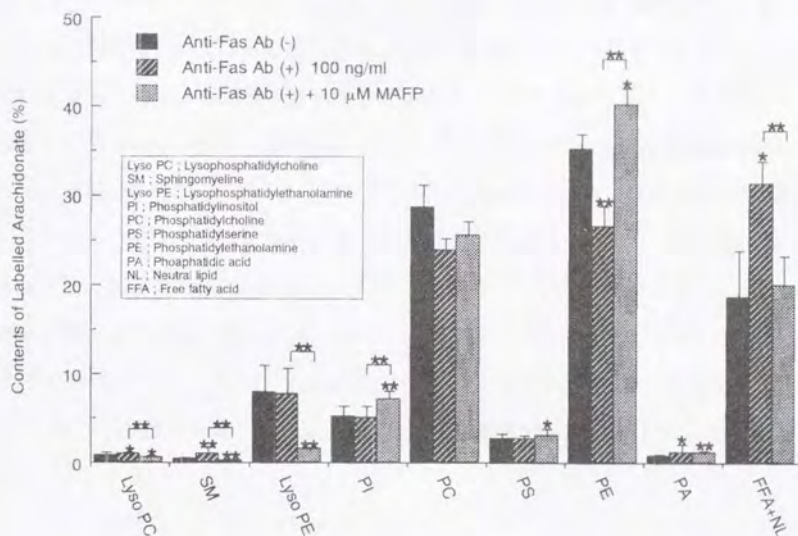


Fig. 2-15 アポトーシス誘導放射アラキドン酸標識細胞の  
MAFP処理によるリン脂質組成変動

以下に示す点よりアポトーシスに伴う脂肪酸遊離反応への  $iPLA_2$  の関与が示唆された。

- 1: 脂肪酸選択性がなかった (Fig. 2-7, -8, -9)。
- 2:  $iPLA_2$  阻害剤の MAFP および BEL により部分的に脂肪酸遊離反応が抑制された (Fig. 2-12)。
- 3: アポトーシス細胞中に  $iPLA_2$  活性が検出され (Fig. 2-13)、この活性は阻害剤により抑制された (Fig. 2-14)。また、阻害濃度が2の場合の濃度と良く似ていた。
- 4: アポトーシス誘導時に同時に MAFP 処理した細胞では、 $iPLA_2$  活性が低下していた (Fig. 2-14)。
- 5: この細胞では、脂肪酸遊離が観察されずホスファチジルエタノールアミンの減少も抑制された (Fig. 2-15)。

Dennis は、 $iPLA_2$  はリン脂質のリモデリングに関与する酵素として位置づけている。アポトーシス細胞においては細胞膜が大きく変化するため、リン脂質のリモデリングも盛んであると考え、本研究の結果は Dennis の説と矛盾しない。また、アポトーシス細胞において  $iPLA_2$  活性が一定である (Fig. 2-13) にもかかわらず、脂肪酸遊離量が増加することについては、アポトーシスによる細胞膜構造変化あるいは細胞内の活性調節因子の変化などにより説明できると考えている。Hullin-Matsuda らは、HL-60 細胞に細胞刺激により活性化され、ホスファチジルエタノールアミンをホスファチジルコリンより良い基質とする  $iPLA_2$  を検出した [89]。今後、この酵素と本研究で検出した酵素の異同を確かめると共に、MAFP 処理はホスファチジルコリンの減少には影響しなかったこと (Fig. 2-15) からホスファチジルコリンに働く新規  $PLA_2$  の関与についても検討したい。

## II-3 アシル CoA 合成酵素と加水分解酵素

### II-3-1 アシル CoA 加水分解酵素

アポトーシスに伴う脂肪酸遊離反応に、 $iPLA_2$  が関与することを II-2 で示した。しかし、阻害剤でこの遊離が完全に抑制されない点などから、 $iPLA_2$  の関与のみで脂肪酸遊離のすべてを説明することはできない。そこで次に、 $PLA_2$  以外の経路を考えた。脂肪酸にコエンザイム A (CoA) がエステル結合したアシル CoA は脂肪酸分解 ( $\beta$ -oxidation) によるエネルギー産生の出発物質や脂質合成の材料としても重要な物質である。このアシル CoA が加水分解を受ければ脂肪酸が産生される。そこで、アポトーシス細胞におけるこの反応の変化に注目した。

アシル CoA 加水分解酵素は、細胞内のアシル CoA の量を調節する酵素あるいは脂肪酸合成の最終ステップの酵素として定義されている [90]。様々な細胞で活性が検出され、現在のところアシル CoA 加水分解酵素として 4 種類 [91-98]、アシル CoA チオエステラーゼとして 3 種類 [99-101] の計 7 種類が同定されている。

アシル CoA 加水分解酵素は肝臓に 3 種類 [91, 92, 94]、脳と精巣に 1 種類検出されており [93, 95]、肝臓の酵素には peroxisome proliferator により誘導される細胞質に存在するものと、ミトコンドリアに存在するものがある。細胞質に存在する酵素のクローニングの結果 [97, 98]、脳に存在する酵素 [96] とホモロジーが高いことが示され、同じ遺伝子から発現していることが示唆されている。

アシル CoA チオエステラーゼは、2 種類が 1994 年にクローニングされ、1 種類は長鎖脂肪酸、1 種類は単鎖脂肪酸を良い基質とした [99]。昨年になり、ほぼ同時に 2 つのグループから HIV-1 ウイルス感染により細胞に発現する Nef タンパクと相互作用するタンパクとしてアシル CoA チオエステラーゼが検出され、クローニングされた [100, 101]。これは、1994 年にクローニングされた酵素とは異なり、新規の酵素であった。



また、Nefにより酵素活性が上昇することやその結合がCD4発現の低下に関与することが示され、アシル CoA 加水分解酵素が細胞機能に関与することが初めて示唆され、今後の展開が期待される。

そこで、アポトーシス細胞におけるアシル CoA 加水分解酵素活性を、加水分解により生じる CoA 部分のチオール吸光度上昇により測定した [91]。アラキドノイル CoA と細胞質画分とをリン酸バッファー中で、30℃、3分間反応させ 232 nm の吸光度を測定し、その変化より活性を求めた。その結果、抗 Fas 抗体でアポトーシスを 12 時間誘導した U937 細胞の方が、アポトーシスを誘導していない細胞に比べ、比活性が約 1.74 倍高かった (Fig. 2-16)。

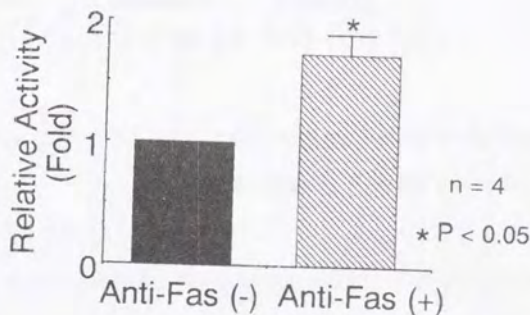


Fig. 2-16 アポトーシス U937 細胞におけるアシル CoA 加水分解酵素活性

(非放射標識基質を用いて測定) の上昇

しかし、吸光度測定による実験では、測定値が一定しないことや阻害剤が持つ吸光度の影響があることなどから、アラキドン酸が $^{14}\text{C}$ で放射標識されたアラキドノイル CoAを用い、遊離してくる放射標識アラキドン酸の量から活性を測定した。その結果、抗 Fas 抗体処理 12 時間によりアポトーシスを誘導した U937 細胞の方が、非放射標識基質を用いた場合と同様に、誘導していない細胞に比べ 1.7 倍比活性が上昇していた (Fig. 2-17)。

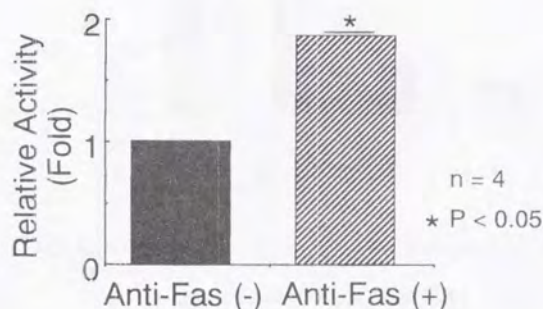


Fig. 2-17 アポトーシス細胞におけるアシル CoA 加水分解酵素活性  
(放射標識基質を用いて測定) の上昇

アシル CoA 加水分解酵素活性を抑制する試薬が、アポトーシス誘導 U937 細胞中のアシル CoA 加水分解酵素活性に影響を与えるかについて調べた。SH 阻害剤である *p*-chloromercuribenzoate (pCMB) は  $10\ \mu\text{M}$  で、ラットで検出された 2 種類のアシル CoA 加水分解酵素をどちらも完全に阻害する [92]。そこで、1.5 分間のプレインキュベーション時に pCMB を共存させ、前処理した後、活性を 3 分間測定した。その結果、アポトーシス誘導の有無に関わらず、細胞中のアシル CoA 加水分解酵素活性は pCMB  $10\ \mu\text{M}$

で80%以上阻害された (Fig. 2-18)。また、1  $\mu$ Mでは活性がほとんど阻害されなかったことから、ラットの脳で検出されたタイプより、肝臓で検出されたタイプに近いと考えられる。

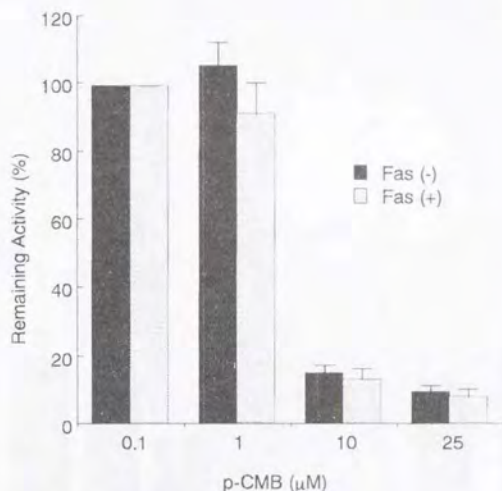


Fig. 2-18 in vitro におけるアシル CoA 加水分解酵素活性に対する  
*p*-chloromercuribenzoate (pCMB) の効果

アポトーシス誘導細胞中のアシル CoA 加水分解酵素が pCMB により抑制されたことから、pCMB がアポトーシスに伴うアラキドン酸遊離反応にどのような影響を与えるかを次に調べた。その結果、pCMB 濃度が上昇するに従ってアラキドン酸遊離量は減少した (Fig. 2-19)。40  $\mu$ M では 60 %、50  $\mu$ M では 70 % の遊離が阻害された。この結果から、アポトーシスに伴うアラキドン酸遊離反応にアシル CoA 加水分解酵素の関与が示唆された。しかし、アシル CoA 加水分解酵素の他の阻害剤である clofibrilic acid は 2 mM でもアラキドン酸遊離を阻害しなかった (Fig. 2-19)。5 mM の clofibrilic acid でラット脳に存在するタイプの 70 % が、肝臓に存在するタイプの 40 % が in vitro の活性測定において阻害される [92]。clofibrilic acid がアラキドン酸遊離反応を阻害しない理由として、



アポトーシス細胞中に検出した酵素は肝臓型であると考えると、clofibric acid による阻害効果が見にくいと予想されることが示唆される。また、clofibric acid の U937 細胞内へ取り込む割合が悪いことも予想される。

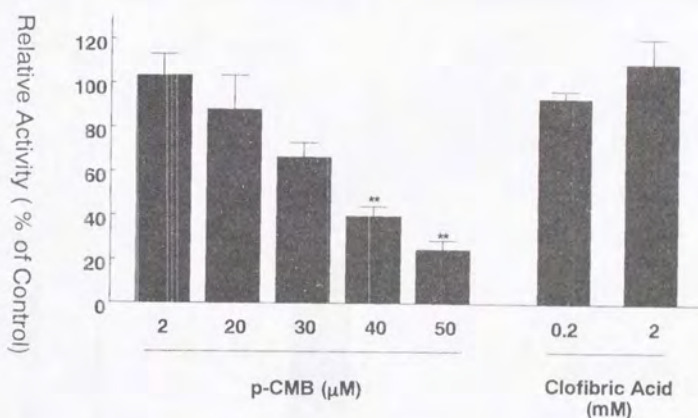


Fig. 2-19 アポトーシスに伴うアラキドン酸遊離反応に対する  
アシル CoA 加水分解酵素阻害剤の影響

ところで、pCMB 処理した細胞中のアシル CoA 加水分解酵素活性を測定したところ抑制効果がなかった (data not shown)。そこで、アポトーシスに伴うアラキドン酸遊離反応にアシル CoA 加水分解酵素が関与するか否かを検討するために、アポトーシス細胞のアラキドン酸遊離を抑制する試薬の MAFP で U937 細胞をアポトーシス誘導時に処理し、細胞内のアシル CoA 加水分解酵素活性を測定した。抗 Fas 抗体 100 ng/ml と MAFP

10  $\mu$ M を同時に処理した細胞を回収し、細胞質画分のアシル CoA 加水分解酵素活性を測定した。抗 Fas 抗体処理により比活性は上昇し、MAFP 処理によりアポトーシスを誘導していない細胞と同程度まで活性は抑制された (Fig. 2-20)。

しかし、in vitro では MAFP によりアシル CoA 加水分解酵素活性は阻害されなかった (data not shown) ことから、MAFP は酵素活性を直接阻害するのではなく、活性調節機構に何らかの作用をする可能性が示唆された。また、pCMB は、SH 試薬であるために様々な酵素に影響を与えることが考えられる。その中でも、iPLA<sub>2</sub> は SH 試薬の 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) により活性が抑制されることが報告されている [74]。この結果は、pCMB が iPLA<sub>2</sub> に作用し、アラキドン酸遊離反応を抑制する可能性を示唆している。

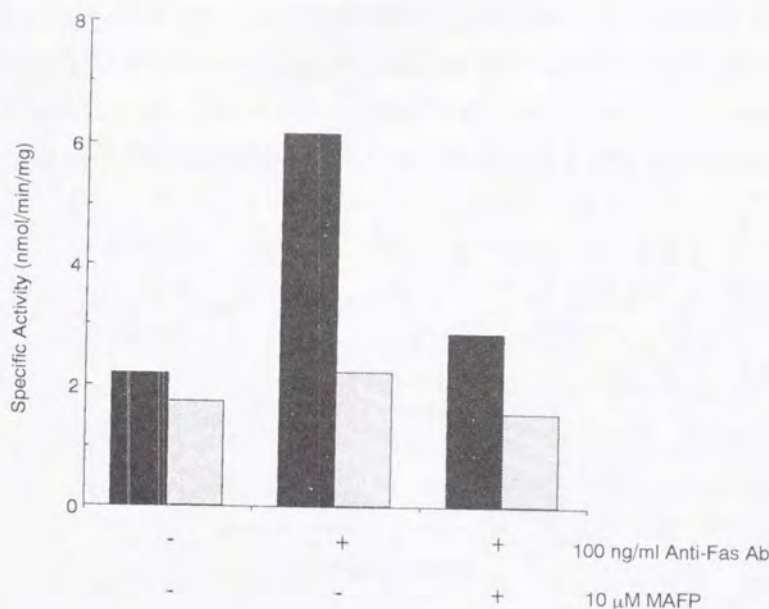


Fig. 2-20 MAFP 処理細胞可溶性画分中のアシル CoA 加水分解酵素活性変化

### II-3-2 アシル CoA 合成酵素活性

アポトーシス細胞においてアシル CoA 加水分解酵素活性が上昇することが示唆された。そこで、逆反応であるアシル CoA 合成酵素活性の変化について次に調べてみた。

アシル CoA 合成酵素はルシフェラーゼファミリーに属する酵素で [102]、1990 年にはラット肝より [102]、1992 年にはラット脳 [103] およびヒトの脳と肝臓より [104]、1994 年にはマウスの脂肪細胞より [105] クローニングされた。他にも数種類の活性が検出されており [106, 107]、さらにアラキドン酸特異的な活性も報告されている [108-110]。また、これらの酵素の中には fatty acyl-CoA synthetase signature motif (FACS signature motif) と呼ばれる種を越えて保存されている 25 アミノ酸配列が存在し、この部分は活性や基質認識に重要な部分であることが報告されている [111]。

活性はマグネシウムイオン、ATP、CoA の存在下、放射標識アラキドン酸から生成される放射標識アラキドニル CoA の量を指標に測定した。抗 Fas 抗体 100 ng/ml でアポトーシスを誘導した細胞ライセート中のアシル CoA 合成酵素活性は、アポトーシス誘導後の時間依存的に減少し、12 時間後には誘導していない細胞の約 4 分の 1 となった (Fig. 2-21)。

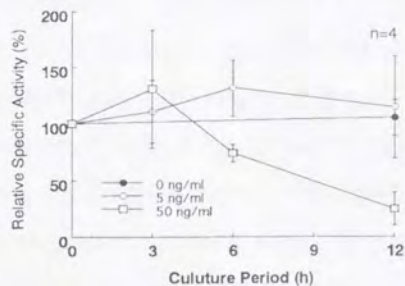


Fig. 2-21 アポトーシス細胞ライセートのアシル CoA 合成酵素活性の変動



以上の結果から、アシル CoA 代謝回転は抗 Fas 抗体により誘導されたアポトーシス細胞には加水分解酵素活性が亢進し、合成酵素活性が抑制されることより、大きく平衡が脂肪酸が蓄積される方向に傾くと考えられる (Fig. 2-22)。

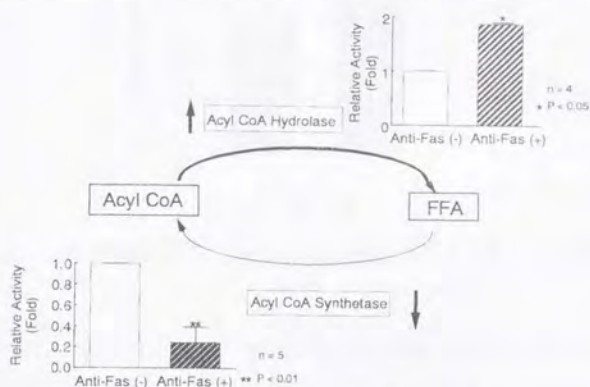


Fig. 2-22 アシル CoA 代謝回転 (アシル CoA 合成酵素と加水分解酵素)

ところで、アシル CoA の合成には ATP 非依存的な活性の存在が Sugiura らにより報告されている [112]。この活性は、リン脂質へのアシル基転移酵素の逆反応と考えられ、先ほどのアシル CoA 合成酵素活性に必須の ATP とマグネシウムイオンを必要としない。また、アラキドン酸に選択性が強く、脂肪酸を遊離するリン脂質はホスファチジルイノシトールやホスファチジルコリンである。アラキドン酸が放射標識されたホスファチジルコリンを基質に、1 mM CoA と 1 % BSA 存在下、アポトーシス U937 細胞のライゼートに 30 分間 37 °C で反応させた。Brigh & Dyer 法により未反応のホスファチジルコリンなどを除き、生成されてくるアラキドノイル CoA の量を求めたところ、アポトーシスの誘導による比活性の変化は観察されなかった (Fig. 2-23)。この酵素によってもアシル CoA が供給される可能性が示唆された。また、ホスファチジルコリンを良い基質とすることやアラキドン酸選択性があることよりアポトーシス細胞における脱アシル反応に関与する可能性も考えられる。

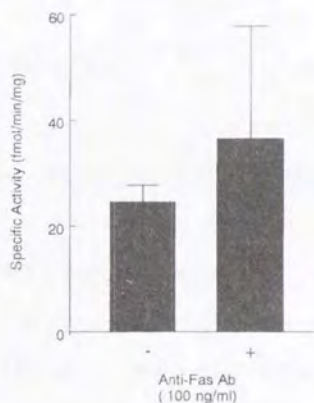


Fig. 2-23 ATP 非依存性アシル CoA 合成酵素活性のアポトーシス誘導による変化

アポトーシス細胞において、アシル CoA 量が低下することが示唆された。アシル CoA は脂質合成や脂肪酸分解の中間物質として重要な位置づけにあるが、最近では、細胞内輸送を始めとした様々な細胞内のシステムの調節に関与していることが明らかになっている [113]。また、細胞内のアシル CoA 濃度はアシル CoA 結合タンパク等により、厳密に調節されており、アポトーシス細胞において予想されるアシル CoA 量の変動やその意味についての解析は意義あることと考えられる。従来、細胞内のアシル CoA 量は TLC や High-performance liquid chromatography (HPLC) を用いて測定されてきたが [114, 115]、最近アシル CoA に対する抗体が開発され [116]、アシル CoA 量の測定などの良いツールとなりえると思われる。

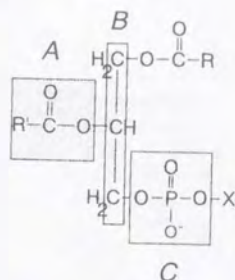
また、アシル CoA 合成酵素活性を特異的に阻害する薬剤である triacsin 処理により Raji 細胞の分化が影響されることや [117]、アシル CoA 合成酵素活性を阻害するケルレニンがヒトの肺ガン細胞にアポトーシスを誘導することも明らかにされており [118]、アシル CoA 量の恒常性の維持が細胞にとって重要であることが示唆される。

## II-4 再アシル化反応

### II-4-1 アポトーシス細胞におけるリン脂質組成変動

あらかじめ U937 細胞を放射アラキドン酸標識し、抗 Fas 抗体でアポトーシスを誘導すると、ホスファチジルエタノールアミンやホスファチジルコリンからアラキドン酸が遊離すること (Fig. 2-10) から、アポトーシス細胞においてリン脂質組成に大きな変動が生じている可能性が考えられた。このことを確かめるために、 $[^3\text{H}]$  標識グリセロールあるいは  $[^{32}\text{P}]$  標識正リン酸で細胞内のリン脂質骨格を標識した。Fig. 2-24 に示すように、アラキドン酸などの脂肪酸で細胞を標識した場合は A の位置が、グリセロールで標識した場合は B の位置が、正リン酸では C の位置が標識される。

これらの細胞を用い、アポトーシス誘導によるリン脂質組成の変化を調べた。24 時間それぞれの放射標識化合物を用いて細胞を標識した。細胞を洗浄後、抗 Fas 抗体 100 ng/ml 処理によりアポトーシスを誘導した。24 時間後に細胞を回収し、Brigh & Dyer 法により脂質画分を抽出した。



2 次元 TLC により各リン脂質を分離 Fig. 2-24 リン脂質における様々な放射標識物質による標識位置  
し、各々の放射活性を測定した。

$[^3\text{H}]$  グリセロール標識した場合も (Fig. 2-25)、 $[^{32}\text{P}]$  正リン酸標識した場合も (Fig. 2-26) リン脂質組成の大きな変化は観察されなかった。さらに、放射アラキドン



酸標識細胞を用いた場合に観察されたホスファチジルエタノールアミンとホスファチジルコリンの減少は観察されなかった。

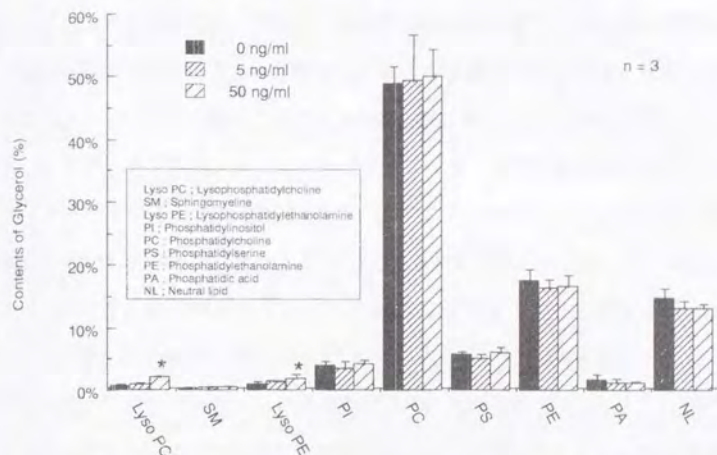


Fig. 2-25 放射グリセロール標識細胞を用いたアポトーシス誘導による

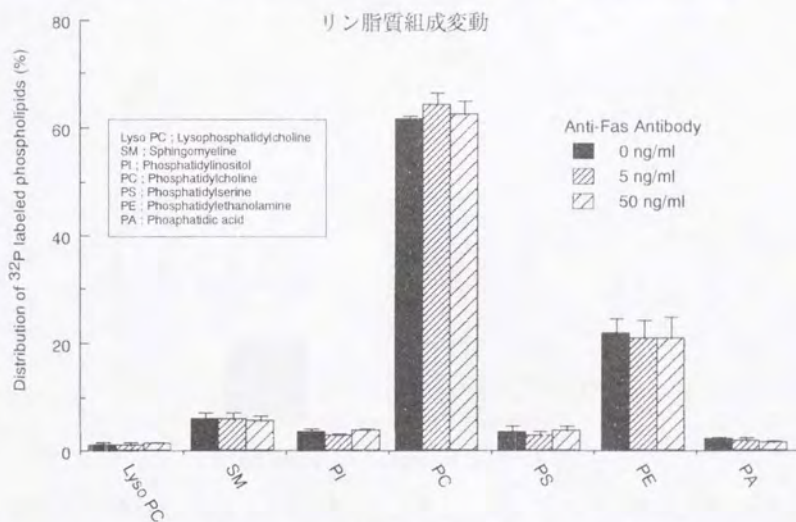


Fig. 2-26 放射正リン酸標識細胞を用いたアポトーシス誘導による

リン脂質組成変動

#### II-4-2 アシル CoA : リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性

アポトーシス細胞において脱アシル化酵素反応が亢進し、放射脂肪酸標識リン脂質量が減少するにも関わらずリン脂質組成に変化が観察されないのは、生成したリゾリン脂質に再びアシル基が付加する再アシル化反応が亢進しているためと考え、アシル CoA : リゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ活性を測定した [119-121]。アラキドノイル CoA と放射脂肪酸標識リゾホスファチジルコリン存在下、細胞ライセートを反応させた。反応後 Brigh & Dyer 法により脂質画分を抽出し、TLC により分離した。生成されてきた放射標識 ホスファチジルコリンの割合を測定して酵素活性を求めた。

その結果、抗 Fas 抗体 100 ng/ml によりアポトーシスを 12 時間誘導した U937 細胞は誘導していない細胞に比べ、比活性が約 2.7 倍上昇した (Fig. 2-27)。この活性上昇により、アポトーシスに伴う脱アシル化反応により生成したリゾリン脂質は蓄積することなしに再びリン脂質へ戻り、アポトーシス細胞においてリン脂質変動が観察されないと考えられる。

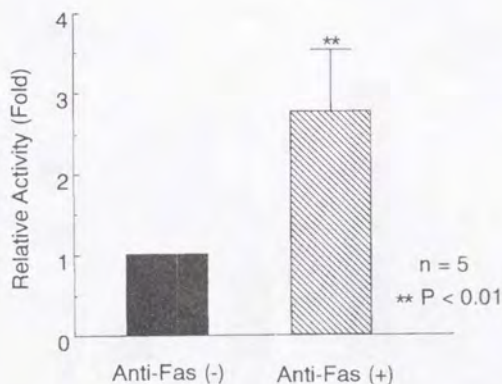


Fig. 2-27 アポトーシス誘導細胞における、アシル CoA : リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性の変動

## II-5 アポトーシスの進行に対する脱アシル化反応の関与

本研究で観察してきた脱アシル化反応がアポトーシスの進行に必須の現象であるか否かを確かめるために、アポトーシスにおける死細胞率への阻害剤の影響を調べた。アポトーシスに伴うアラキドン酸遊離反応を抑制する試薬の MAFP を抗 Fas 抗体処理時に 1  $\mu$ M 共存させ、6, 12, 24 時間後の死細胞率を測定した (Fig. 2-28)。その結果、MAFP を共存させて抗 Fas 抗体処理 24 時間後では約 75 % 以上の細胞が死んでおり、MAFP による死細胞率の低下は約 6 % であった (Fig. 2-28)。しかし、アポトーシス誘導 6 時間後には MAFP 共存により、死細胞率の有意な約 3 % の低下が観察され、12 時間後には約 8.5 % 近く死細胞率が低下した (Fig. 2-28)。この結果より、脱アシル化はアポトーシスにおいて必須な出来事ではないにしろ、アポトーシスの進行に早い段階で関与する出来事であることが示唆された。

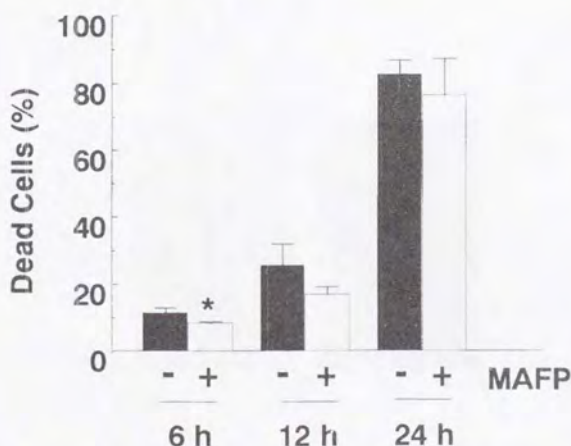


Fig. 2-28 MAFP による抗 Fas 抗体処理で誘導したアポトーシスへの影響



## II-6 神経細胞死におけるリン脂質変動

### II-6-1 アポトーシスに伴うリン脂質変動

ここまで、抗 Fas 抗体処理によるアポトーシス細胞におけるリン脂質変動を調べてきた。この章では、神経成長因子 (NGF) を除去することにより誘導されるアポトーシスにおけるリン脂質変動を調べ、抗 Fas 抗体処理によるアポトーシスの場合と較べた。神経細胞のモデルとして、ラット副腎髄質由来 PC12 細胞を用いた。PC12 細胞は NGF により神経様に分化し、神経伝達物質にも応答性を持つようになるため、神経のモデルとして用いられる [122]。

NGF 存在下で 1 週間 PC12 細胞を培養すると、Fig. 2-29 の左の写真に示すように神経様に分化する。この PC12 細胞を NGF や血清を含まない培地で洗浄し、培養を続けることでアポトーシスを誘導した [123, 124]。アポトーシスした細胞は、Fig. 2-29 の右の写真のように神経突起が消失し丸い細胞となった。

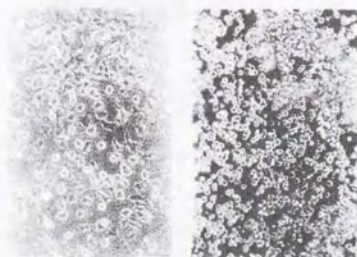


Fig. 2-29 アポトーシス誘導前 (左) と誘導後 (右) の PC12 細胞

この操作によりアポトーシスが誘導されたかについて、アポトーシスの定量を DNA に結合する蛍光試薬である DAPI を用いて行った。DNA の断片化は NGF 除去 12 時間後から観察され始め、24 時間後には約 60 % の細胞が断片化をおこしていた (Fig. 2-30)。これらの細胞から DNA を抽出しアガロースゲル電気泳動すると、NGF 除去 12 時間後から断片化された DNA が観察され、24 時間後には断片化していない DNA がほとんど観察されなかった (Fig. 2-30、写真)。

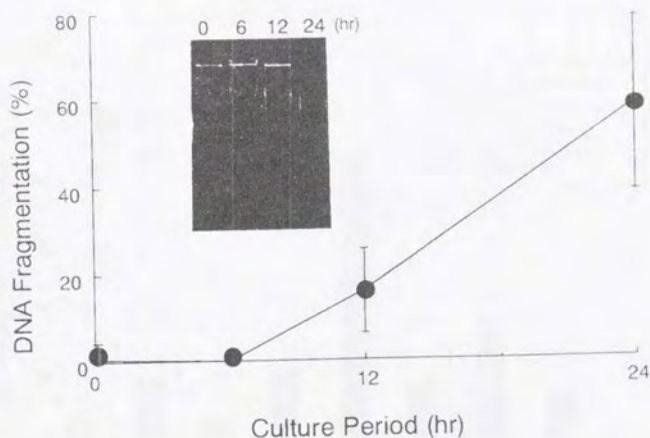


Fig. 2-30 神経栄養因子除去により PC12 細胞に誘導したアポトーシスの DNA 断片化による定量 (写真: DNA のアガロースゲル電気泳動)

アポトーシス誘導後（NGF 除去後）36 時間の細胞を回収し、リン脂質組成をアポトーシス誘導前の細胞と比較した。細胞から脂質画分を Brigh & Dyer 法により抽出し、2 次元 TLC により分離後各々のスポットをかき取り、含まれるリンの量を定量することで、リン脂質量を求めた。その結果、リン脂質組成はスフィンゴミエリンやホスファチジルセリンの割合は減少したものの、大きな変化は観察されなかった（Fig. 2-31）。

アポトーシス細胞では、スフィンゴミエリンが分解されセラミドを産生するスフィンゴミエリン回転がおこることが知られている [44 - 46]。しかし、神経細胞死においてはセラミドがアポトーシスを抑制するとの報告もあり [125]、ここで観察されるスフィンゴミエリン量の減少がセラミドの産生と関与するのかやセラミドが細胞でどのような働きをするかなどの点で興味もたれる。

また、ホスファチジルセリンはアポトーシス細胞において形質膜の内側から外側へトランスロケーションすることが知られており [26 - 32]、外側に向くことで外来性の酵素に作用されやすくなることが含有量の減少に関与するかなどは今後の検討課題である。

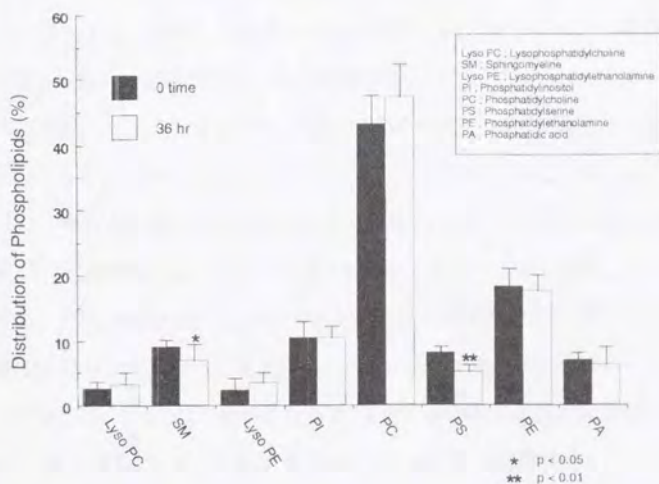


Fig. 2-31 NGF 除去により誘導したアポトーシス PC12 細胞のリン脂質組成変化



NGF 除去により神経細胞に誘導したアポトーシスにおいてもリン脂質組成は大きく変化しなかった。これは、抗 Fas 抗体により U937 細胞に誘導したアポトーシスの場合と同様であった。そこで、抗 Fas 抗体によるアポトーシスにおいて観察された脱アシル化反応の亢進が、このアポトーシスにおいても観察されるかについて、次に検討した。

神経様分化させた PC12 細胞を 24 時間放射標識アラキドン酸で標識し、NGF を除去することでアポトーシスを誘導した。細胞から脂質を抽出後、TLC により分離した各々のリン脂質の放射活性を測定した。その結果、放射標識アラキドン酸遊離が観察された (Fig. 2-32)。この遊離量は DNA の断片化により定量した (Fig. 2-30) アポトーシスの進行に伴い増加した (Fig. 2-33)。抗 Fas 抗体で誘導したアポトーシスの場合と同様に放射オレイン酸標識した PC12 細胞を用いた場合もオレイン酸の遊離が観察された (data not shown)。これらのことから、NGF 除去により誘導されるアポトーシスにおいても、基質特異性がない放射標識脂肪酸の遊離反応が亢進した。どのリン脂質からアラキドン酸が遊離したかを検討すると、抗 Fas 抗体で誘導したアポトーシス細胞とは異なり、放射標識アラキドン酸含有ホスファチジルイノシトールが大きく減少した。ホスファチジルエタノールアミンは抗 Fas 抗体で誘導したアポトーシスの場合と同様に減少した (Fig. 2-32)。放射標識アラキドン酸含有ホスファチジルイノシトールは U937 細胞では 5 % 程度の割合で含まれていたが、PC12 細胞では約 30 % 近くも含まれている。これは、PC12 細胞でのホスファチジルイノシトール代謝回転が盛んなため、放射標識アラキドン酸がよく取り込まれたためと考えられ、アポトーシス細胞における脂肪酸遊離反応は、代謝回転の盛んなリン脂質からおきることも示唆される。

さらに、PC12 細胞のアポトーシスにおける脂肪酸遊離反応に関与する酵素群について、阻害剤を用いて調べた。その結果、抗 Fas 抗体で誘導したアポトーシスの場合と同様に (Fig. 2-12)、 $iPLA_2$  の阻害剤である HELSS と MAFP が脂肪酸遊離反応を抑制した (Fig. 2-34)。NGF 除去によるアポトーシス細胞における脱アシル化反応にも  $iPLA_2$  の関与が示唆され、アポトーシス細胞において普遍的におこっている反応であることが示唆された。また、細胞外カルシウムを EGTA を添加することでキレートして除いてもア

ラキドン酸遊離反応は観察され (Fig. 2-33)、細胞外カルシウムの存在ならびに細胞内へのカルシウムの流入は必要ないことが示唆された。

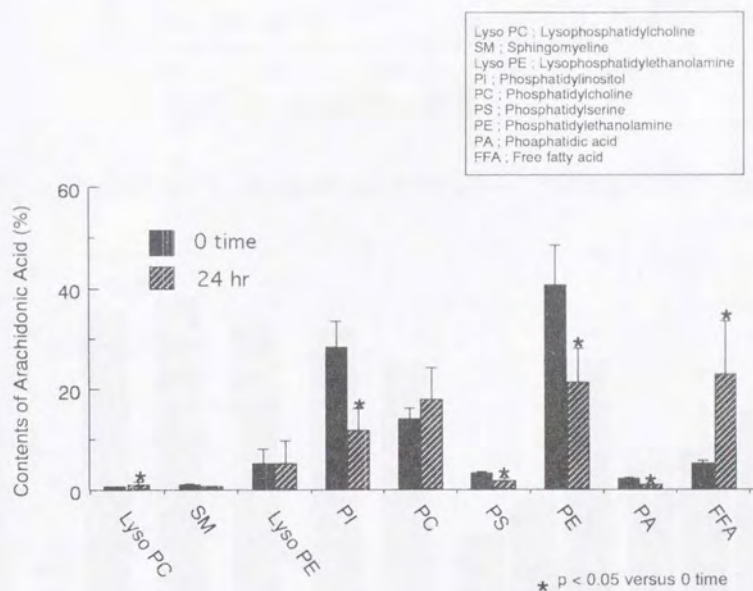


Fig. 2-32 放射アラキドン酸標識 PC12 細胞の NGF 除去により誘導した  
アポトーシスにおけるリン脂質組成変化

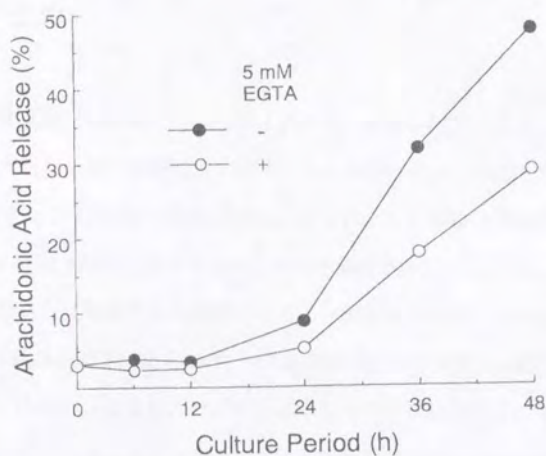


Fig. 2-33 放射アラキドン酸標識 PC12 細胞のアポトーシスに伴うアラキドン酸遊離

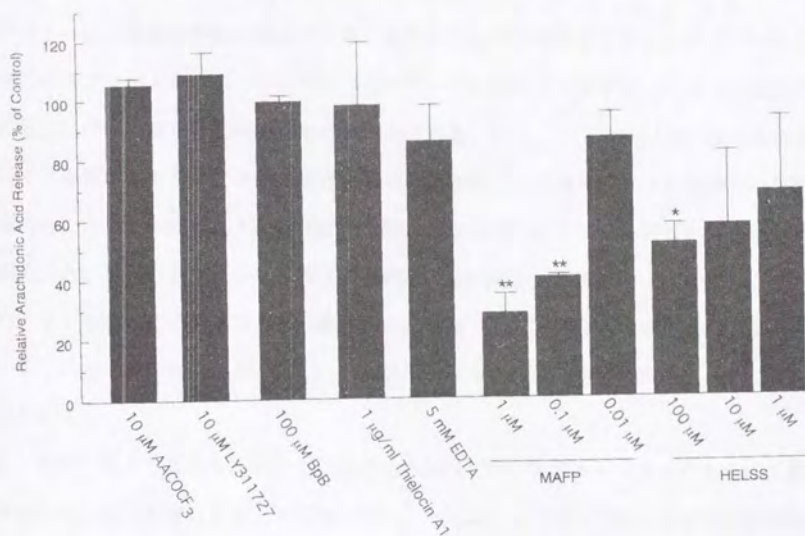


Fig. 2-34 各種 PLA<sub>2</sub> 阻害剤による PC12 細胞の NGF 除去によるアポトーシスに伴うアラキドン酸遊離反応への影響



## II-7 まとめ

放射脂脂肪酸標識細胞に抗 Fas 抗体によりアポトーシスを誘導すると、放射標識脂脂肪酸の遊離が観察された。その遊離量はアポトーシスの進行に良く相関しており、アポトーシスに関与しておこる現象であると考えた。さらに、この現象は神経成長因子を除去することで PC12 細胞に誘導したアポトーシスでも観察されたことから、かなりアポトーシスにおいて普遍的に観察される現象であることが示唆された。しかし、アポトーシスに伴い脱アシル化は亢進されたものの、リン脂質組成の大きな変化は観察されなかった。これは、脱アシル化により生じたリゾリン脂質を再びアシル化する、再アシル化酵素活性が上昇したためであることを明かとした。すなわち、アポトーシス細胞においてはリン脂質の脱アシル化、再アシル化回転が亢進していることとなる。これらの現象はアポトーシスにおいてどのような意味を持っているのであろうか。

アポトーシス細胞は細胞の構造が大きく変化する特徴を有する。更に、アポトーシスが進行するとアポトーシス小体と名付けられた、ベシクルを放出する。これらの細胞構造の変化に伴い細胞膜構造の変化も当然予想される。また、アポトーシス小体の放出に関与する機構は、今までにエキソサイトーシスで研究されてきた機構よりも細胞分裂の機構に近いと考えられており、細胞分裂の際に膜融合部位にリゾリン脂質が集まとも言われることから、アポトーシスに伴う細胞構造の変化にリン脂質の脱アシル化、再アシル化サイクルが重要であることが示唆される。また、リン脂質合成は細胞周期と関連していることが示唆されており [126]、最近アポトーシスの細胞周期依存性と共に興味をもたれる。

ところで、脱アシル化を阻害する試薬である MAFP が、アポトーシスそのものには影響を与えず、進行を遅らすことが示唆された。今回は、トリパンプルーを用いた死細胞率の測定で検討したが、細胞構造変化に直接関与する、細胞外膜へのホスファチジルセリンのトランスロケーション、すなわちアネキシン V の結合能やマクロファージの食食

能などを指針として、アポトーシス細胞をとらえていくことで、脱アシル化反応のアポトーシスにおける意義が明らかになると期待される。

脂質代謝回転とアポトーシスについては、スフィンゴミエリンサイクルについては多くの研究がなされているが、他にも、脂肪酸合成を阻害するケルレニンによりアポトーシスが誘導されること [118]、ホスファチジルコリンを産生することができない温度感受性の chinese hamster ovary 細胞がアポトーシスにより死ぬこと [127]、アポトーシスに伴い飽和脂肪酸含有リン脂質が増加すること [128] や Chilton らにより CoA 非依存性のアシル基転移酵素を阻害するとリン脂質へのアラキドン酸の分布が変化し、アポトーシスを誘導すること [129-132] が報告されている。いずれの研究においても、何がアポトーシスの誘導のシグナルとなるのかについては全く述べられてはいない。これらの報告と本研究とから、リン脂質が恒常性を維持できなくなることで、アポトーシスが誘導されることを仮説として提唱する。また、再アシル化を阻害する試薬としてチメロザールがある [133, 134] が、この仮説に従うとアポトーシスを誘導することができると考えられ、今後の検討課題である。

また、脱アシル化に関与する酵素として iPLA<sub>2</sub> を考えたが、iPLA<sub>2</sub> はその活性調節機構や細胞内での挙動などについては明らかにはされておらず、今回検出した活性も阻害剤の感受性が既存のものとは異なっており、更に解析が必要であると考えられる。最近、iPLA<sub>2</sub> はスプライシングにより様々なバリエーションが存在することが予想されており [76]、それとの関係も興味深い。

他にも、アシル CoA 代謝回転の平衡も大きく崩れていることが示唆された。これらの結果から、細胞内のアシル CoA の量が減少していることが考えられ、このことも細胞内の恒常性の維持に関与すると考えられる。

アポトーシス細胞においては、様々な恒常性が乱れていることが明らかとなった。このことから、アポトーシスの研究を通して細胞の恒常性維持機構も明らかにされうると考えられる。

### III アポトーシス細胞における 細胞質ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) の限定分解



### III-1 序論

細胞質ホスホリパーゼ  $A_2$  (cPLA<sub>2</sub>) [40, 41] は一定のレベルで様々な臓器や細胞に発現しており、そのアミノ酸配列はよく保存されている。アラキドン酸含有リン脂質を他の脂肪酸を含むリン脂質より、良い基質とするためアラキドン酸カスケードの開始酵素として重要である。749 アミノ酸からなる計算上分子量 85 kDa の蛋白質であるが、SDS-PAGE では 110 kDa の位置に泳動される。これは、C 末端付近に存在するプロリンが多く含まれる配列によるためと考えられている。活性中心は 228 番目のセリン残基で、この周辺のアミノ酸配列は多くのセリンエステラーゼや中性リパーゼでよく見られる Gly-X-Ser-X-Gly のモチーフである [135]。また、活性に必要なアミノ酸に 549 番目のアスパラギン酸と 200 番目のセリンがある [136]。その中でも、549 番目のアスパラギン酸は、subtilisin ファミリープロテアーゼで保存されている活性に必須なアスパラギン酸とモチーフが一致する [137]。

cPLA<sub>2</sub> はインターロイキン 1 や TNF を始めとした様々なサイトカイン類の刺激のみではなく、UV [138] や酸化 [139-141] 等によっても活性化されることが明らかにされている。活性化を制御する因子としては、カルシウムイオンが挙げられる。in vitro の活性測定においては 0.3-2  $\mu$ M のカルシウムイオン濃度で活性化される [142]。また、一定濃度以上のカルシウムイオンが存在すると、cPLA<sub>2</sub> の N 末端に存在するカルシウム依存性リン脂質結合ドメイン (CaLB ドメイン) により細胞膜へと cPLA<sub>2</sub> は移動し、膜に結合する [143, 144]。現在では、細胞の刺激に呼応した細胞内カルシウムイオン濃度上昇で cPLA<sub>2</sub> は核周辺膜へと移行することが明らかにされている [145-147]。他にも、505 番目のセリンが MAP キナーゼによりリン酸化を受け、活性が上昇することも報告されている [148]。しかし、不活化のメカニズムや細胞膜のターゲット分子などについての報告はなく、未知な点も多く残されている。

抗 Fas 抗体で U937 細胞にアポトーシスを誘導した際に、細胞をあらかじめ放射アラ

キドン酸標識しておく、放射標識アラキドン酸が遊離することを見出し、II章で述べてきた。このアラキドン酸遊離反応に関与する酵素として cPLA<sub>2</sub> を考えたが以下の点において関与は否定的となった。1: オレイン酸標識細胞を用いると、アラキドン酸と同程度オレイン酸も遊離され、アラキドン酸選択的な反応ではなかった。2: cPLA<sub>2</sub> 選択的な阻害剤である AACOCF<sub>3</sub> によってこのアラキドン酸遊離反応は抑制されなかった。

さらに、細胞内での動態について検討したところ、アポトーシスに伴い cPLA<sub>2</sub> が限定分解されることを見出した。また、この限定分解にはアポトーシスにより活性化される caspase-3 が関与することや cPLA<sub>2</sub> に存在する限定分解サイトを明らかにしたので III 章で述べる。

## III-2 アポトーシスに伴う cPLA<sub>2</sub> の限定分解

### III-2-1 cPLA<sub>2</sub> 活性の変動

始めに、アポトーシスに伴い細胞ライセート中の cPLA<sub>2</sub> 活性がどのように変動するかを、2 位のアラキドン酸が放射標識されたホスファチジルエタノールアミンを基質に、カルシウムイオン存在下で測定した。抗 Fas 抗体処理あるいは未処理細胞を 12 時間後に回収し、細胞を超音波破碎した後、cPLA<sub>2</sub> 活性を 37 °C で 30 分間測定した。その結果、比活性は抗 Fas 抗体量依存的に減少し、10 ng/ml では未処理細胞のおよそ 50 %、100 ng/ml ではおよそ 10 分の 1 までになった (Fig. 3-1)。cPLA<sub>2</sub> 活性は様々なサイトカイン刺激により上昇することが知られているため、抗 Fas 抗体刺激による活性低下のメカニズムはとても興味深く、次にイムノブロットングによりタンパクの変化を検討した。

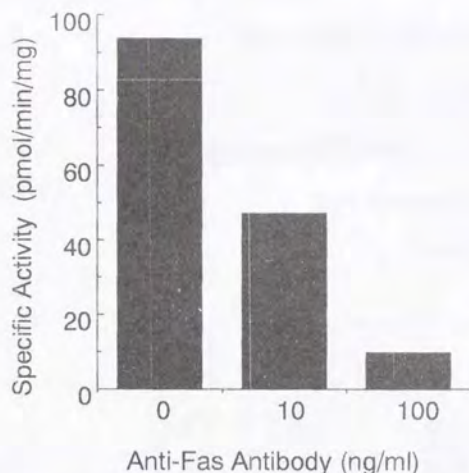


Fig. 3-1 抗 Fas 抗体処理細胞における cPLA<sub>2</sub> 活性変動

### III-2-2 cPLA<sub>2</sub> タンパク質の変化

様々な抗 Fas 抗体量で処理した細胞を 12 時間後に回収し、SDS-PAGE により 10  $\mu$ g タンパク質/lane で泳動後、ニトロセルロース膜にトランスファーした。引き続き抗ヒト cPLA<sub>2</sub> ウサギポリクローナル抗体でイムノブロッティングを行った。その結果、分子量 110 kDa に見られるインタクトな cPLA<sub>2</sub> のバンドは抗 Fas 抗体量が増加するに従い薄くなり、50 ng/ml ではほぼ完全に消失した (Fig. 3-2、上)。かわって分子量 78 kDa に新たなバンドが抗 Fas 抗体 5 ng/ml から見え始め、抗 Fas 抗体量が増加するに従い濃くなった (Fig. 3-2、上)。このインタクトな cPLA<sub>2</sub> の消失と 78 kDa タンパクの出現はトリパンブルー染色により求めた死細胞率 (Fig. 3-2、中) や DNA に特異的に結合する蛍光試薬 DAPI を用いた DNA 断片化率 (Fig. 3-3、下) と良く相関していた。インタクトな cPLA<sub>2</sub> は消滅したときの死細胞は 30 % 以上であった。



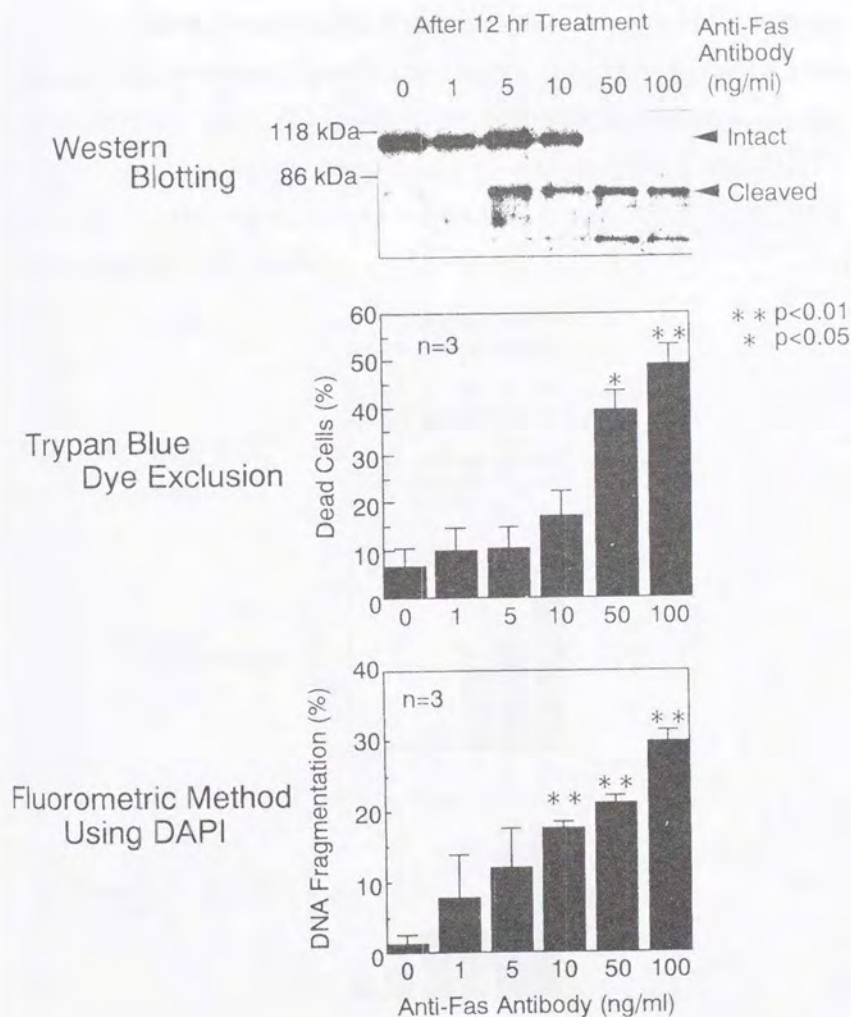


Fig. 3-2 抗 Fas 抗体で誘導したアポトーシス U937 細胞における

cPLA<sub>2</sub> 限定分解の抗 Fas 抗体量依存性

次に、抗 Fas 抗体量を 50 ng/ml と一定にし、抗 Fas 抗体処理時間を変えて同様の実験を行った。その結果、インタクトな 110 kDa の cPLA<sub>2</sub> のバンドは抗 Fas 抗体処理時間依存的に薄くなり、9 時間後にはほぼ消失した (Fig. 3-3、上)。また、抗 Fas 抗体処理 3 時間後には 78 kDa に新たなバンドが観察され始め、処理時間依存的に濃くなった (Fig. 3-3、上)。これらの現象は死細胞率 (Fig. 3-3、中) と DNA の断片化率 (Fig. 3-3、下) に良く相関していた。やはり、インタクトな cPLA<sub>2</sub> のバンドがほぼ完全に消失した 9 時間後の死細胞率は 30 % であった。

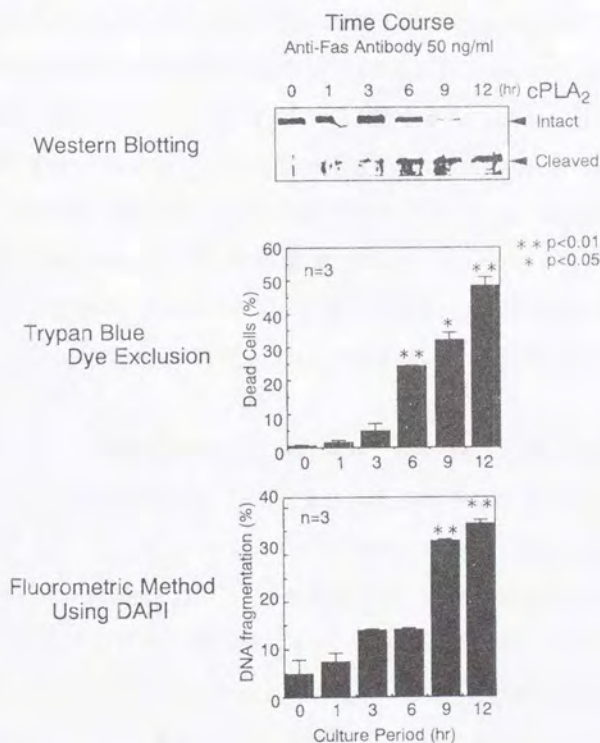


Fig. 3-3 抗 Fas 抗体で誘導したアポトーシス U937 細胞における  
cPLA<sub>2</sub> 限定分解の抗 Fas 抗体処理時間依存性

以上の結果より、抗 Fas 抗体で誘導したアポトーシス U937 細胞において、アポトーシス依存的に cPLA<sub>2</sub> が消失し、新たに 78 kDa タンパク質が出現することが明らかになった。

### III-2-3 アポトーシス細胞に誘導される cPLA<sub>2</sub> 分解活性の検出

そこで、アポトーシス細胞に cPLA<sub>2</sub> を分解する活性が誘導されるか否かについて、バキュロウイルスを用いた系で Sf9 細胞に発現させたリコンビナントマウス cPLA<sub>2</sub> あるいは in vitro transcription/translation 法を用いて作製した [<sup>35</sup>S] メチオニン標識 cPLA<sub>2</sub> を用いて確かめた。リコンビナントマウス cPLA<sub>2</sub> はバキュロウイルスを感染させた Sf9 細胞の可溶性画分から、DEAE セファロースカラムとフェニルスーパーロースカラムを用い精製した。その結果、イムノブロットングで単一バンドとなった (data not shown)。また、T3 RNA polymerase とウサギ網状赤血球のライセートを用いた、in vitro transcription/translation 法により [<sup>35</sup>S] メチオニン標識マウス cPLA<sub>2</sub> を作製し SDS-PAGE を行ったところ、オートラジオグラフィーにより 110 kDa の位置に単一バンドが確認できた (data not shown)。

抗 Fas 抗体 100 ng/ml で 12 時間アポトーシスを誘導させた U937 細胞ライセートとリコンビナントマウス cPLA<sub>2</sub> を 37 °C で反応させ、SDS-PAGE 後イムノブロットングにより解析した。その結果、インタクトな cPLA<sub>2</sub> のバンドは反応時間依存的に減少した (Fig. 3-4)。6 時間後にはバンドの濃さは 0 時間のおよそ半分となった。

次に、[<sup>35</sup>S] メチオニン標識 cPLA<sub>2</sub> を用い、抗 Fas 抗体 100 ng/ml によりアポトーシスを誘導した U937 細胞のライセートと 37 °C で 4 時間反応させ、SDS-PAGE 後オートラジオグラフィーにより解析した。その結果、110 kDa に見られたインタクトな cPLA<sub>2</sub> のバンドはアポトーシスを誘導していない U937 細胞ライセートを反応させても変化しなかった (Fig. 3-5)。しかし、アポトーシスを誘導させた U937 細胞のライセートを反応



させると、ライセート量依存的に 110 kDa のインタクトな  $cPLA_2$  のバンドは消失した。ライセート 10  $\mu$ l (  $1 \times 10^5$  cells ) と反応させると、4 時間後にはインタクトな  $cPLA_2$  のバンドは完全に消失した (Fig. 3-5)。また、インタクトな  $cPLA_2$  のバンドがライセート量依存的に消失していくのに対し、新たに 78 kDa にバンドが観察され始め、ライセート量依存的に増加した (Fig. 3-5)。

以上の結果より、抗 Fas 抗体処理によりアポトーシスを誘導した U937 細胞に  $cPLA_2$  を限定分解する活性が誘導されることが明らかになった。

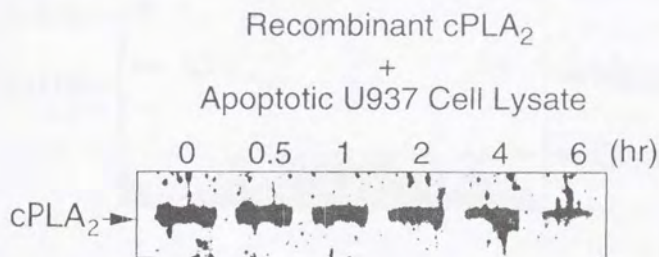


Fig. 3-4 抗 Fas 抗体誘導アポトーシス U937 細胞ライセートによる  
in vitro でのリコンビナントマウス  $cPLA_2$  の分解

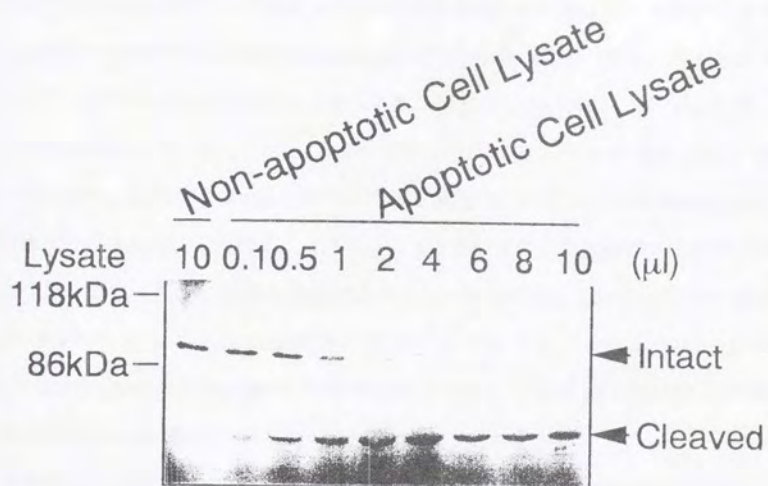


Fig. 3-5 抗 Fas 抗体誘導アポトーシス U937 細胞ライセートによる  
in vitro での [ $^{35}\text{S}$ ] メチオニン標識 cPLA<sub>2</sub> の分解

### III-3 cPLA<sub>2</sub> 限定分解機構の解析

#### III-3-1 caspase 阻害剤の影響

アポトーシス細胞においてシステインプロテアーゼである caspase ファミリープロテアーゼが重要な役割を担うことが明らかにされている [19-21]。線虫のプログラム細胞死に関与する遺伝子の 1 つである *ced-3* の哺乳動物ホモログとして、インターロイキン 1 $\beta$  転換酵素 (interleukin 1 $\beta$ -converting enzyme: ICE) が見つかり [22]、それ以降 ICE とホモロジーがあるタンパクが次々と発見され、現在では 12 種類以上のプロテアーゼファミリーを形成している。これら Caspase ファミリーはアスパラギン酸の後ろで切断する特徴があり、さらにはほとんどが不活性型で細胞内に存在し、他の Caspase により分解され活性化される。それゆえ、アポトーシスにおいて中心的な役割をはたすこれらのプロテアーゼは、互いに活性を制御するカスケードを形成している。抗 Fas 抗体や TNF 受容体からのシグナルは受容体に存在するデスドメインを介して、FADD (Fas-associated protein with a novel death domain protein) [149] や TRADD (TNFR-1 associated death domain protein) [150] などのデスドメインをもつアダプター分子の重合により細胞内に伝えられていく。最近では、この複合体に Caspase-8 が結合し、Caspase-1 などを分解により活性化することで、Caspase-3 の活性化につながりアポトーシスが進行する仮説 [151, 152] が示され支持されてはいるが、Caspase の活性化は細胞種や刺激の違いにより異なることが阻害剤の実験から示唆されており [153]、Caspase 活性化の組合せには多様性があると考えられる。Caspase ファミリーの基質認識には切断されるアスパラギン酸を含めて、N 末端側に 4 つのアミノ酸残基のみが必要であることが示されている [154]。この配列を基に Nicholson らは 3 つのグループに分類している (Fig. 3-6) [155]。1 つめは、サイトカインの成熟や分泌に関与するグループで Caspase-1、4、5 が属する。2 つめは DEXD 配列を認識し、アポトーシスの際の様々な



タンパク質の分解に関与していると考えられていて、Caspase-2、3、7が属する。3つめは、Caspase-6、8、9が属しており、Caspase の分解に関係すると考えられている。

### Specificities of Caspases and Granzyme B

Optimal Tetrapeptide Sequence					Macromolecular Substrate Cleavage Sequences				
Enzyme	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	Substrate
caspase-1	W	E	H	D	F	E	A	D	pro-interleukin-1β site I
					Y	V	H	D	pro-interleukin-1β site II
					L	E	S	D	interferon-γ-inducing factor
caspase-3	D	E	V	D	D	E	V	D	poly(ADP-ribose) polymerase
					D	E	V	D	DNA-dependent protein kinase <sub>ca</sub>
					D	G	P	D	70kDa U1 small ribonucleoprotein
					D	E	P	D	sterol regulatory element-binding protein
					D	E	L	D	D4 G-protein dissociation inhibitor
					D	E	E	D	huntingtin
caspase-6	V	E	H	D	V	E	I	D	lamin A
granzyme B	I	E	P	D	I	E	T	U	caspase-3 proenzyme
					I	Q	A	D	caspase-7 proenzyme

Fig. 3-6 認識配列を基にした Caspase の分類

そこで、アポトーシスに伴い観察される  $cPLA_2$  の限定分解が Caspase による可能性について阻害剤を用いることで検討した。Caspase 阻害剤としては2種類用いた。どちらの阻害剤もペプチド阻害剤で、Caspase の基質になっている。Ac-YVAD-CHO は Caspase-1 に対して効果が示され、Ac-DEVD-CHO は Caspase-3 に効果がある。これらを [ $^{35}$ S]メチオニン標識  $cPLA_2$  をもちいた in vitro 限定分解検出系に加え、効果を調べた。抗 Fas 抗体 100 ng/ml で 12 時間処理した U937 細胞のライセートと阻害剤存在下 37℃ で 4 時間反応させた。その結果、Ac-DEVD-CHO は 0.1  $\mu$ M でインタクトな  $cPLA_2$  タンパクの消失ならびに 78 kDa タンパクへの変換すなわち限定分解を阻害した (Fig. 3-7)。Ac-YVAD-CHO は 10  $\mu$ M でも  $cPLA_2$  の 110 kDa から 78 kDa への限定分解を阻害しなかった (Fig. 3-7)。この結果より、 $cPLA_2$  の限定分解は Caspase-3 様プロテアーゼにより行なわれることが示唆された。

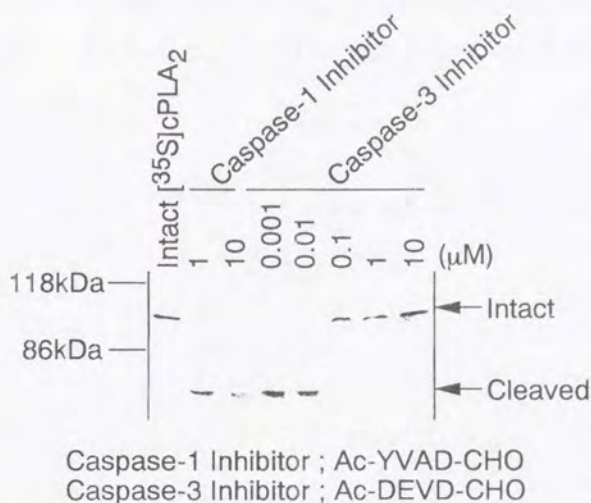


Fig. 3-7 Caspase ファミリープロテアーゼ阻害剤による [ $^{35}$ S]メチオニン標識  $cPLA_2$  の in vitro 限定分解反応に対する効果

### III-3-2 Caspase 活性測定

そこで次に、実際に細胞中の Caspase 活性を測定した。ペプチド蛍光基質として Mca-YVADAPK(Dnp) と Mca-DEVDAPK(Dnp) を用いた。抗 Fas 抗体 100 ng/ml で一定時間処理した細胞を回収後、凍結融解を繰り返すことで破壊した。このうち 10  $\mu$ g タンパクを蛍光基質と 30  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。反応液の蛍光を励起波長 325 nm、測定波長 392 nm で測定した。Mca-YVADAPK(Dnp) と Mca-DEVDAPK(Dnp) はそのアミノ酸配列により各々 Caspase-1 と Caspase-3 活性が測定される。Caspase-3 活性は抗 Fas 抗体処理時間依存的に上昇し、12 時間後には 0 時間の細胞の約 3.5 倍になった (Fig. 3-8、下)。これは、cPLA<sub>2</sub> の限定分解のタイムコースと良く一致していた (Fig. 3-8、上)。Caspase-1 活性は抗 Fas 抗体処理 1 時間で上昇し、6 時間後まで同程度の活性を保ち、9 時間後にはほぼ 0 時間のレベルまで低下した (Fig. 3-8、下)。この結果は cPLA<sub>2</sub> 限定分解のタイムコースと一致しなかった。以上の結果と阻害剤の結果より、抗 Fas 抗体により誘導されたアポトーシスにおける cPLA<sub>2</sub> の限定分解に Caspase-3 が関与していると考えた。

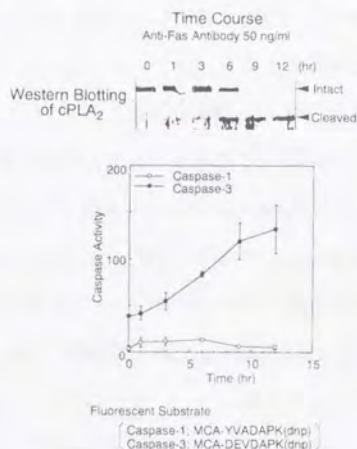


Fig. 3-8 抗 Fas 抗体誘導アポトーシス U937 細胞における Caspase 活性



### III-3-3 限定分解位置の同定

Caspase プロテアーゼファミリーは基質認識に特徴がある。Caspase-3 は DEXD 部位を認識することより [155]、cPLA<sub>2</sub> 中にこの配列を探したところ、522 番目のアスパラギン酸の付近が一致した。もし、この DELD<sup>S22</sup>A が Caspase により切断される部位であるとしたら、522 番目までのアスパラギン酸までの断片の分子量は、アミノ末端までのアミノ酸数との比から計算して 77.6 kDa となり、実際に観察される断片の分子量 78 kDa (Fig. 3-2、-3) とほぼ一致する。そこで、この 522 番目のアスパラギン酸を Caspase-3 による切断部位と予想し、アスパラギン酸をアスパラギンに変異させた cPLA<sub>2</sub> を site-directed mutagenesis 法を用いて、点突然変異を導入することで作製した。この方法の概要について以下に記す。導入したい変異のプライマーをセンス側とアンチセンス側の両方用意し、cPLA<sub>2</sub> の cDNA が組み込まれたプラスミドを鋳型に耐熱性ポリメレーズにより伸長反応を行う。生成したニックの入った環状 DNA と鋳型として用いたプラスミドの混液を、メチル化された配列を認識する制限酵素で処理し、鋳型のプラスミドを分解する。鋳型のプラスミドは大腸菌内で複製されているため、メチル化をうけており制限酵素に感受性である。さらに、ニックの入った環状 DNA は大腸菌にトランスフェクションすると、環状のプラスミドとなって増える。プラスミドを抽出し、そのシーケンスを確認して点突然変異が導入されたプラスミドを得た。

このプラスミドを用いて、in vitro transcription/translation 法により [<sup>35</sup>S] メチオニン標識 cPLA<sub>2</sub>(D522N) を作製した。次に、[<sup>35</sup>S] メチオニン標識 cPLA<sub>2</sub>(D522N) がアポトーシス細胞ライセートにより分解されるかについて検討した。その結果、37 °C で 4 時間反応させると cPLA<sub>2</sub> は限定分解され 78 kDa の断片になったが、cPLA<sub>2</sub>(D522N) は分解されなかった (Fig. 3-9)。このことから、この変異により Caspase-3 が cPLA<sub>2</sub> を基質として認識できなくなったことが明らかとなった。

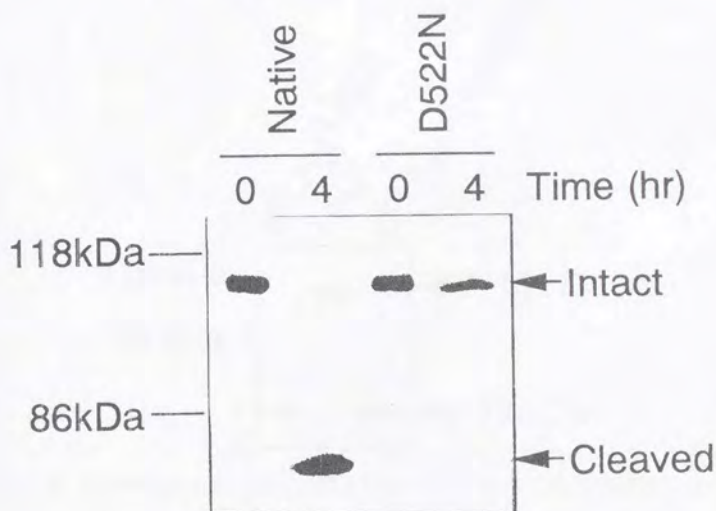


Fig. 3-9  $[^{35}\text{S}]$  メチオニン標識  $\text{cPLA}_2$  あるいは  $\text{cPLA}_2(\text{D522N})$  の  
アポトーシス細胞ライセートによる in vitro 限定分解の解析

さらに、 $\text{cPLA}_2$  の 523 番目のアミノ酸のコドンを終止コドンにかえた  $\text{cPLA}_2(1-522)$  を PCR 法を用いて作製し、in vitro transcription/translation 法により  $[^{35}\text{S}]$  メチオニン標識した。この、 $[^{35}\text{S}]$  メチオニン標識  $\text{cPLA}_2(1-522)$  を SDS-PAGE 電気泳動したところ、 $\text{cPLA}_2$  のアポトーシスにより生成される 78 kDa 断片と同じ位置に泳動された (Fig. 3-10)。以上の結果より、抗 Fas 抗体により誘導されたアポトーシスにおいて、 $\text{cPLA}_2$  は 522 番目のアスパラギン酸の位置で Caspase-3 により限定分解されることが明らかになった。

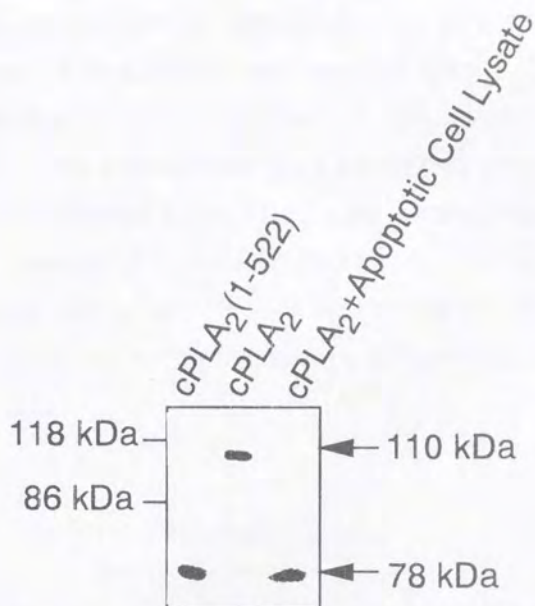


Fig. 3-10 抗 Fas 抗体処理により誘導されるアポトーシス細胞で観察される  $cPLA_2$  の 78 kDa の断片と  $cPLA_2(1-522)$  との電気泳動での移動度の比較

### III-3-4 限定分解産物の酵素活性

抗 Fas 抗体で誘導したアポトーシス細胞における  $cPLA_2$  活性はアポトーシスに伴い減少した (Fig. 3-1)。これは、 $cPLA_2$  が限定分解により 522 番目で断片化して、549 番目の活性発現に必須なアスパラギン酸 [137] が除かれるため活性が失われると予想した。そこで、細胞に  $cPLA_2(1-522)$  を発現させ、酵素活性を測定することでこの仮説について検討した。

ヒト胎児腎細胞 293 細胞にリポフェクション法で、コントロールベクターあるいは  $cPLA_2$ 、 $cPLA_2(D522N)$ 、 $cPLA_2(1-522)$  の cDNA を組み込んだベクターをそれぞれトラ



ンスフェクションした。48 時間後に細胞を回収し、ライセート中の  $cPLA_2$  活性を測定した。その結果、 $cPLA_2$  を発現させた細胞中の  $cPLA_2$  活性はコントロールベクターを感染させた細胞の約 4 倍に上昇していた (Fig. 3-11)。また、522 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに変えた  $cPLA_2(D522N)$  を発現させた細胞は、 $cPLA_2$  を発現させた細胞と同程度の  $cPLA_2$  活性を示した (Fig. 3-11)。しかし、 $cPLA_2(1-522)$  を発現させた細胞は予想通り、 $cPLA_2$  活性はコントロール細胞と変わらなかった (Fig. 3-11)。この結果より、 $cPLA_2$  は抗 Fas 抗体によるアポトーシスにより 522 番目のアスパラギン酸で限定分解を受け、549 番目のアスパラギン酸が除かれることで活性を消失すると考えられる。

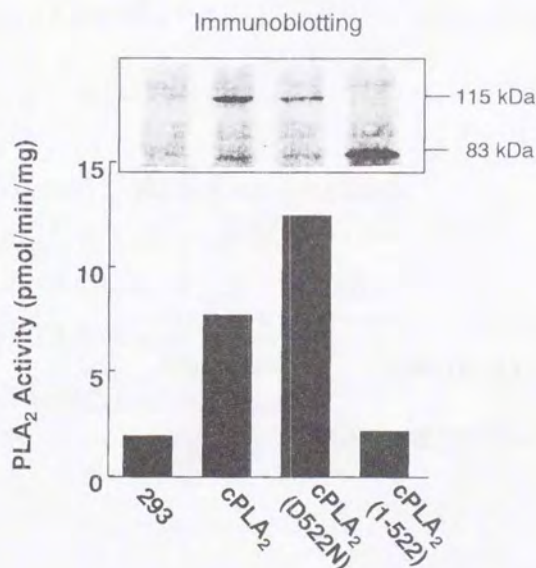


Fig. 3-11  $cPLA_2$  および変異  $cPLA_2$  発現細胞ライセートの  $cPLA_2$  活性

### III-4 普遍性

#### III-4-1 抗 Fas 抗体によるアポトーシス

ヒト前骨髄球系白血病細胞株 HL-60 細胞を用いて、抗 Fas 抗体によりアポトーシスを誘導すると、1 ng/ml から 78 kDa 断片が観察され始め、10 ng/ml ではインタクトな 110 kDa の cPLA<sub>2</sub> は限定分解によりほとんど消滅した (Fig. 3-12)。この時の死細胞率および DNA 断片化率を観察したところ、50 ng/ml 抗 Fas 抗体で約 30 % 以上の細胞がアポトーシスしており、約 30 % の細胞が DNA の断片化を生じていた (data not shown)。この結果は、U937 細胞の場合と良く似ていた。このように、U937 細胞以外の細胞においても抗 Fas 抗体により誘導されたアポトーシスにおいて、cPLA<sub>2</sub> の限定分解が観察された。

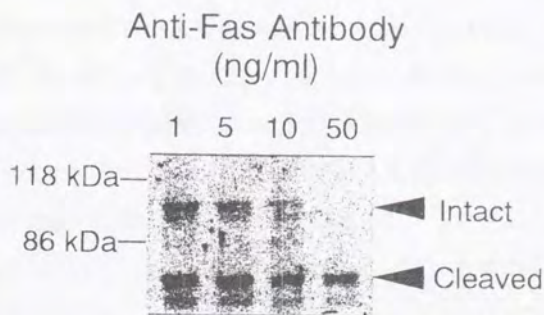


Fig. 3-12 ヒト前骨髄球系白血病細胞株 HL-60 細胞に  
抗 Fas 抗体で誘導したアポトーシスにおける cPLA<sub>2</sub> の限定分解

### III-4-2 抗ガン剤により誘導されたアポトーシス

ガン細胞を抗ガン剤などの薬剤で処理したときに観察される細胞死はアポトーシスであると報告されている [156]。しかし、この抗ガン剤によるアポトーシスの機構については、現在のところよくはわかっていない。抗ガン剤により細胞内に何らかの傷害が生じると、アポトーシスの進行に関与する分子がそれを認識し、アポトーシスに至ると考えられる。また、Caspase ファミリープロテアーゼの関与が示唆される報告は多く存在するが [157-159]、統一的な見解は得られていない。他にも、セラミドを介するシグナルの関与も示唆されている [160]。そこで、DNA トポイソメラーゼ II 活性を阻害し、アポトーシスを誘導することが知られているエトポシド [156] を用い、U937 細胞および HL-60 細胞にアポトーシス誘導し、この場合の  $cPLA_2$  の限定分解について検討した。

種々の濃度のエトポシドで細胞を 1 時間処理し、洗浄後さらに 10 時間培養を続けた。10 時間後に細胞を回収し、抗ヒト  $cPLA_2$  抗体を用いたイムノブロッティングを行った。あわせて死細胞率並びに DNA 断片化率の測定も行った。その結果、エトポシド濃度が上昇するに従いインタクトな  $cPLA_2$  のバンドは減少した。また、エトポシド濃度が 1  $\mu\text{g/ml}$  から  $cPLA_2$  の限定分解産物の 78 kDa の断片が観察され始め、エトポシド濃度に従って濃くなった (Fig. 3-13)。エトポシド 5、10  $\mu\text{g/ml}$  処理でそれぞれ死細胞率は 36 %、48 % で、DNA の断片化率は 30 %、54 % であったが、インタクトな  $cPLA_2$  のバンドは完全には消滅しなかった (Fig. 3-13)。この結果は、抗 Fas 抗体によるアポトーシスの場合と異なっていた。エトポシド処理 U937 細胞において DEVD 阻害剤感受性のプロテアーゼ (恐らく Caspase-3 様) の関与が示唆されており、抗 Fas 抗体によるアポトーシスの経路とクロスすることが示唆されている [161]。この  $cPLA_2$  の限定分解の差はエトポシドで誘導される Caspase-3 様プロテアーゼが抗 Fas 抗体により誘導されるプロテアーゼと種類が異なるのか、あるいは量が少ないためと考えられ、活性化される



Caspase が刺激により使い分けられているという仮説を証明するものとも考えられる。

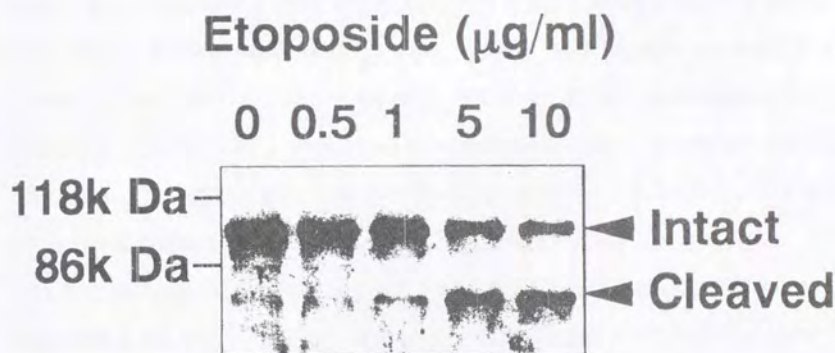


Fig. 3-13 エトポシド処理によりU937 細胞に誘導したアポトーシスにおける  
cPLA<sub>2</sub> の限定分解とアポトーシスの定量

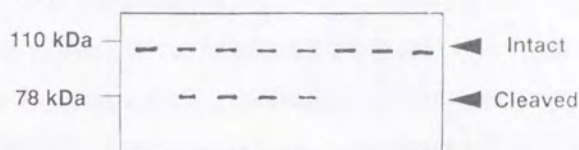
### III-4-3 腫瘍壊死因子 (TNF) によるアポトーシス

腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor ; TNF) は炎症反応に関与するサイトカインとして知られ、細胞の増殖や分化などの作用を示す [162]。TNF 受容体は分子量が 55 kDa の TNFR1 と 75 kDa の TNFR2 の 2 種類存在する。これらの細胞外ドメインは神経成長因子の受容体や Fas に似ており、ファミリーを形成している [163, 164]。また、TNFR1

のC末端側には細胞内ドメインとして、デスドメインと名付けられ、Fasの細胞内部位にも存在するドメインが存在する[165]。デスドメインを持つアダプター分子と受容体のデスドメインが結合することにより、アポトーシスのシグナルは細胞内へと伝達されていく。アダプター分子のTRADD[150]、FADD[149]、FLICE[151, 152]が複合体を形成し、Caspaseファミリーの活性化にとつながることが報告されている[20]。また、TRAF (TNFR-associated factor) 2[166]は直接TNFR2と結合するのみならずTRADDを介してTNFR1とも複合体を形成し、RIPを介してNF(nuclear factor)- $\kappa$ Bの活性化を導く[167]。また、JNK(c-Jun N-terminal protein kinase)を活性化する報告もある[168]。以上のことから、TNFのシグナルはアポトーシスを誘導するシグナル以外にも、JNK活性化やNF- $\kappa$ Bの活性化を導くことが明らかにされ始めている。

そこで、TNFからのシグナルにより誘導されるアポトーシスにおいて、cPLA<sub>2</sub>の限定分解が観察されるかについて、次に検討した。5 x 10<sup>6</sup> cells/mlのU937細胞を1  $\mu$ g/mlのサイクロヘキシミド(CHX)の存在下で、10 U/mlのヒトリコンビナントTNF(Genzymeから購入)で処理した。CHXを加えることによりタンパク質合成を阻害し、細胞を積極的にアポトーシスへと向かわせた。その結果、処理3時間後には約35%の細胞が、6時間後には50%を超える細胞がアポトーシスしていた(Fig. 3-14)。また、6時間後からは死細胞率の変化は観察されなかった。24時間後においては、未処理細胞の死細胞率は10%以下で、TNFやCHX単独処理の死細胞率も15%以下であった(Fig. 3-14)。各々の時間に細胞を回収後、抗ヒトcPLA<sub>2</sub>抗体でイムノブロットィングを行った。cPLA<sub>2</sub>の限定分解は3時間後には観察され、78 kDa断片が出現した(Fig. 3-14)。TNFやCHX単独刺激24時間後の細胞においては、cPLA<sub>2</sub>の限定分解は観察されなかった(Fig. 3-14)。また、抗Fas抗体で誘導したアポトーシスの場合と異なり、インタクトなcPLA<sub>2</sub>の完全な消失は観察されなかった。この傾向は、エトポシド処理により誘導されるアポトーシスの場合と類似していた。この結果は、TNFレセプターからのシグナルとFasからのシグナルとは異なる経路が存在することを表していると考えられる。

# Western Blotting



# Trypan Blue Dye Exclusion

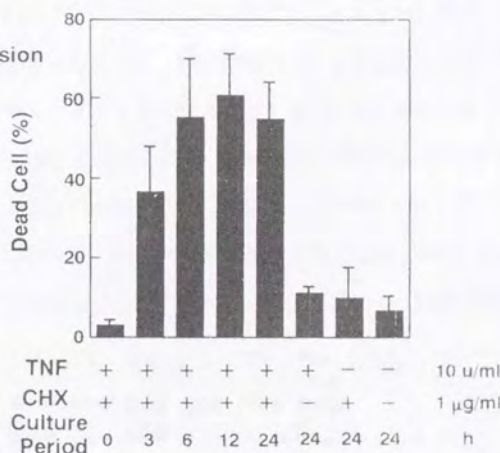


Fig. 3-14 TNF とサイクロヘキシミドにより U937 細胞に誘導した  
アポトーシスにおける cPLA<sub>2</sub> の限定分解と死細胞率

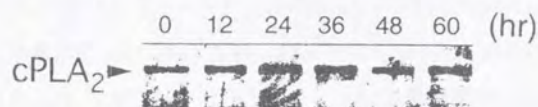
## III-4-4 サイトカイン除去による肥満細胞のアポトーシス

血球系の細胞は造血幹細胞が増殖、分化することにより恒常的に維持されている。この細胞の増殖や分化を司る因子がサイトカインや接着因子などであり [169]、サイトカインは特に血球系細胞の維持に必須な液性因子である [170, 171]。肥満細胞は IL-3 を始めとするサイトカインの存在により維持されている。これらのサイトカインの供給を断つと、肥満細胞はアポトーシスに特徴的な形態を示す [172]。このようにして誘



導したアポトーシス肥満細胞における cPLA<sub>2</sub> の限定分解について検討した。

IL-3 の供給源として WEHI 細胞の培養上清を用い、マウス骨髓幹細胞より分化させ、培養してきた肥満細胞 (BMMC) を 3 回 WEHI 培養上清を含まない培地で洗浄した。IL-3 を含まない培地でさらに培養を続けると、24 時間後には約 30 %、60 時間後には約半数の細胞の DNA が断片化していた (Fig. 3-15)。この場合の cPLA<sub>2</sub> タンパクの変化を抗ヒト cPLA<sub>2</sub> 抗体を用いた、イムノブロットィングにより調べたところ、cPLA<sub>2</sub> 量の変化並びに限定分解は観察されなかった (Fig. 3-15)。造血因子除去後のアポトーシスの機構については、アクチノマイシン D 添加により阻害されることから新たなタンパク発現が必要であることが示唆されたり [173]、Caspase が必要ないとの知見 [174] などが報告されているが、最近、Caspase-3 が IL-2 除去によるアポトーシスに関与することが示され、まだ混沌としている。また、cPLA<sub>2</sub> の限定分解が観察されない理由として、Fas や TNF などの刺激により誘導されたアポトーシスとは異なった機構の存在が考えられる。



### Fluorometric Method Using DAPI

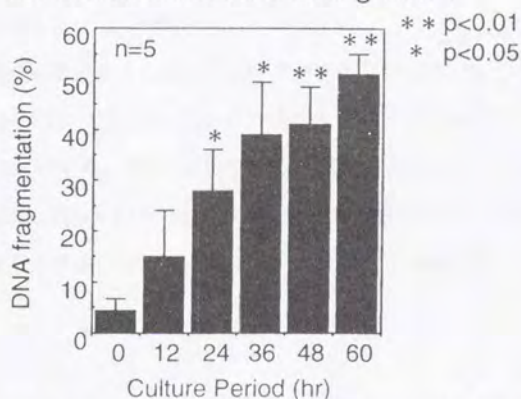


Fig. 3-15 IL-3 除去により肥満細胞に誘導したアポトーシスにおける cPLA<sub>2</sub> の変化

### III-5 cPLA<sub>2</sub> 限定分解の生物学的意義解明への試み

#### III-5-1 cPLA<sub>2</sub> 限定分解産物の細胞内分布

cPLA<sub>2</sub> は N 末端側に存在するカルシウム依存性膜移行ドメイン (CalB ドメイン) 依存的に、カルシウムイオンにより膜画分に移行することが知られている [143, 144]。そこで、断片化された cPLA<sub>2</sub> が細胞内のどこに存在するかを調べた。抗 Fas 抗体 100 ng/ml で 24 時間アポトーシスを誘導した U937 細胞と抗 Fas 抗体処理をしない U937 細胞を 24 時間後に回収し、超音波破碎した。それぞれの細胞ライセートを 100,000 x g、1 時間の超遠心で分離した。超遠心後の上清を細胞質画分、沈殿を上清と同量のバッファーで懸濁させたものを膜画分とし、SDS-PAGE 電気泳動により分離した。分離後、抗ヒト cPLA<sub>2</sub> 抗体を用いたイムノブロッティングにより存在部位を確認した。その結果、アポトーシスを誘導していない細胞では、cPLA<sub>2</sub> は細胞質画分と膜画分の両画分にインタクトなまま存在した (Fig. 3-16)。アポトーシスを 24 時間誘導した細胞においては、ライセート中には限定分解された cPLA<sub>2</sub> のみが観察され、インタクトな cPLA<sub>2</sub> は見られなかった (Fig. 3-16)。このライセートを更に分画したところ、cPLA<sub>2</sub> の限定分解産物はすべて膜画分に存在した (Fig. 3-16)。

さらに、この現象を確かめるために、[<sup>35</sup>S] メチオニン標識 cPLA<sub>2</sub> ならびに [<sup>35</sup>S] メチオニン標識 cPLA<sub>2</sub>(1-522) を用いた。これらの標識体と U937 細胞のライセートとを反応させ、超遠心により分画した。上清と沈殿をそれぞれ電気泳動し、オートラジオグラフィーを行った。その結果、Figure 3-16 で示した *in vivo* で観察された現象と同じく、インタクトな cPLA<sub>2</sub> は細胞質と膜画分の両方に存在し、cPLA<sub>2</sub>(1-522) は膜画分のみ観察された (Fig. 3-17)。

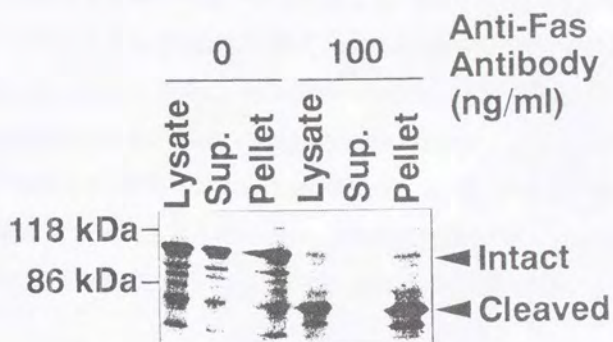


Fig. 3-16 アポトーシスに伴う  $cPLA_2$  の限定分解による  $cPLA_2$  存在部位の変化

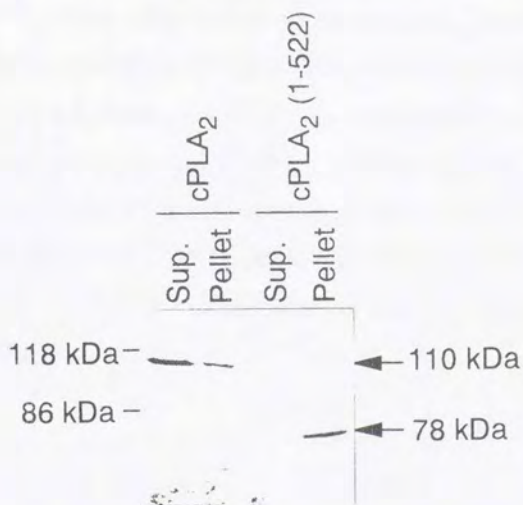


Fig. 3-17  $[^{35}\text{S}]$  メチオニン標識  $cPLA_2$  の U937 細胞ライセート中の存在部位



cPLA<sub>2</sub>の膜移行には CalB ドメインの関与が明らかになっているが、この結果から C 末端側に膜移行を調節する部分が存在することが考えられる。Sierra-Honigmann らは、サブコンプレントな上皮細胞中の cPLA<sub>2</sub> は核画分に存在し、その分子量が 70 kDa であると報告した [147]。さらに、彼らは核への移行に関与する配列が 2 か所 cPLA<sub>2</sub> に存在すると指摘している。1 つは 273 番目から 284 番目のアミノ酸にかけて存在する核存在シグナルである [176]。2 つめは 556 番目から 565 番目のアミノ酸にかけて存在する核外輸送シグナルである [177, 178]。核外輸送配列はアポトーシスに伴い除かれる配列であり、本研究にて観察された現象との関連が強く示唆される。

### III-5-2 cPLA<sub>2</sub> および cPLA<sub>2</sub> 変異体高発現 293 細胞の生化学的解析

cPLA<sub>2</sub> の限定分解のアポトーシスの進行への影響ならびにアポトーシスにおける意義を明らかにするためのツールとして、cPLA<sub>2</sub> あるいはアポトーシスにより限定分解される部位の 522 番目のアスパラギン酸をアスパラギンにかえた cPLA<sub>2</sub> (D522N) を高発現した細胞を構築した。ヒト胎児腎由来 293 細胞は cPLA<sub>2</sub> の発現が少ない細胞であると共に遺伝子導入に良く用いられるため、本実験に用いた。哺乳動物発現ベクターに cPLA<sub>2</sub> あるいは cPLA<sub>2</sub>(D522N) をサブクローニングした。このベクターをリポフェクション法で 293 細胞にトランスフェクションをした。抗生物質の G418 への耐性獲得をベクター遺伝子の恒常的発現のマーカーとして用い、cPLA<sub>2</sub> 高発現株 1 つと、cPLA<sub>2</sub>(D522N) 高発現株 2 つ (A8 と E14) を得た。各々の細胞増殖は E14 が少し早いものの大きな差は観察されなかった (Fig. 3-18)。

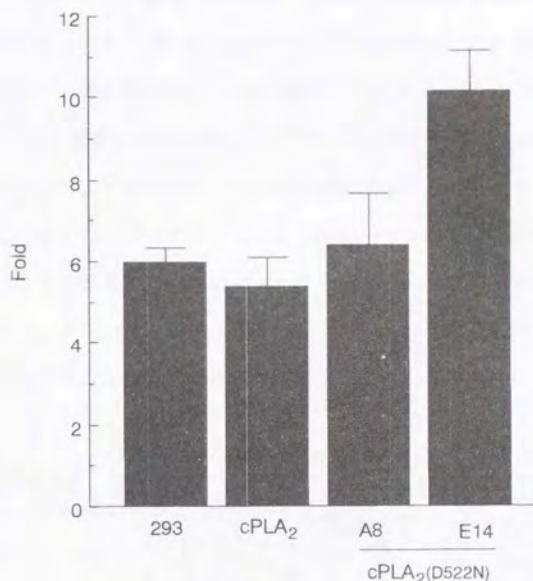


Fig. 3-18 cPLA<sub>2</sub> あるいは cPLA<sub>2</sub>(D522N) 高発現 293 細胞トランスフォーマント  
の細胞増殖

次に、これらトランスフォーマントの細胞応答性を調べる目的で、カルシウムイオノフォア刺激あるいは IL-1/FCS による刺激に呼応したアラキドン酸遊離反応を調べた。cPLA<sub>2</sub> は細胞内カルシウム濃度上昇や MAP キナーゼのリン酸化により活性化され、アラキドン酸を遊離させることが知られている [41, 42]。そこで細胞をあらかじめ放射標識アラキドン酸で標識し、カルシウムイオノフォアの A23187 10  $\mu$ M で 30 分間刺激することで、細胞内カルシウムイオン濃度上昇による即時的な細胞応答を調べた。その結果、cPLA<sub>2</sub> を過剰発現している細胞のアラキドン酸遊離量はコントロール細胞の約 4 倍であった (Fig. 3-19)。ところが、cPLA<sub>2</sub>(D522N) は A23187 刺激によるアラキドン酸遊離反応は亢進しなかった (Fig. 3-21)。また、1 ng/ml IL-1 と FCS で 4 時間刺激するこ

とで観察される、細胞内イオン濃度上昇に依存しない応答によるアラキドン酸遊離反応でも同様の現象が観察された。cPLA<sub>2</sub>を高発現している細胞は、コントロール細胞に比べて約7倍のアラキドン酸を遊離した (Fig. 3-19)。しかし、cPLA<sub>2</sub>(D522N)を発現した細胞はコントロール細胞と差が観察されなかった (Fig. 3-19)。cPLA<sub>2</sub>(D522N)は Fig. 3-11 に示したように、in vitro においては活性が測定されることから、この変異が活性に影響を与えていないことがわかる。しかし、細胞内において酵素活性を発現できないことが示唆され、この変異が細胞内の cPLA<sub>2</sub> 活性化あるいは細胞内輸送に影響を与えることが考えられる。すなわち、このアポトーシスによる断片化部位の522番目のアスパラギン酸が cPLA<sub>2</sub> の新たな活性調節機構に関与する部位であることが予想される。

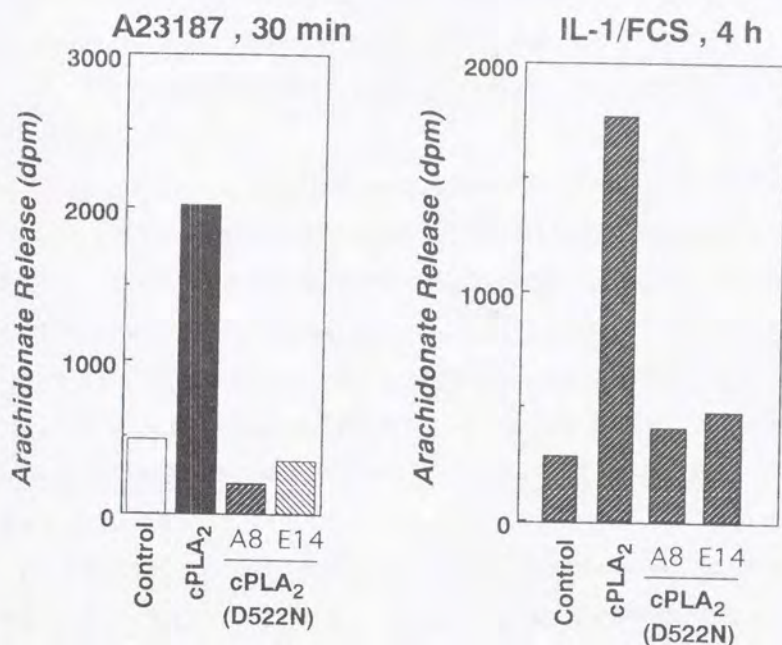


Fig. 3-19 293 細胞トランスフォーマントへの細胞刺激による即時型あるいは遅延型

アラキドン酸遊離反応



### III-6 まとめ

抗 Fas 抗体により誘導されたアポトーシス U937 細胞で観察された cPLA<sub>2</sub> の限定分解は、アポトーシスの進行と良く相関していた。また、TNF や抗ガン剤により誘導されるアポトーシスでも観察され、かなりアポトーシスにおいて普遍的な現象であると考えられる。また、限定分解部位はアポトーシスにより活性化する Caspase-3 様プロテアーゼが認識する配列として知られた配列 DXXD と一致する、DELDD<sup>322</sup>A の 522 番目のアスパラギン酸であった。しかし、限定分解の程度は細胞種や誘導方法により異なり、造血因子除去により誘導したアポトーシスにおいてはほとんど観察されなかった。このことは、アポトーシス細胞において活性化されている Caspase 分子種の多様性を示すと考えられる。Caspase ファミリープロテアーゼによるカスケードはプロテアーゼによる互いの活性化という点で血液凝固経路に似ているとも考えられるが、はるかに複雑かつ巧妙に形作られていると考えられる。

ところで、アポトーシスにおける cPLA<sub>2</sub> の関与についてはいくつかの報告がある。Hayakawa らは TNF $\alpha$  に耐性を獲得した L929 細胞では cPLA<sub>2</sub> の発現量が減少していることを示し、さらに、cPLA<sub>2</sub> タンパクを発現させることで耐性は克服されることを報告した [179]。Jayadev らは、この細胞を用いて、アポトーシスに伴うセラミドの産生に cPLA<sub>2</sub> が重要であることを示した [180]。Voelkel-Johnson らは TNF によるアポトーシスにおいて cPLA<sub>2</sub> が必要なことを過剰発現やアンチセンスの系を用いて示した [181]。MacEwan も TNF や NGF レセプターからのシグナルにより cPLA<sub>2</sub> 活性が上昇することを報告している [182]。

cPLA<sub>2</sub> のアポトーシスに伴う限定分解については、Voelkel-Johnson らは C3HA 線維芽細胞において報告している [183]。彼らは、この分解により細胞内 cPLA<sub>2</sub> 活性が低下すると報告しており、本研究の結果と一致する。しかし、Wissing らは肺ガン細胞 MCF-7S1 に TNF により誘導したアポトーシスでは、アポトーシスに伴うアラキドン酸

遊離の増加が、断片化された  $cPLA_2$  の活性化によるためであると昨年報告した [184]。この報告は、アラキドン酸遊離への  $cPLA_2$  の関与の点で本研究と異なっている。本研究では II 章で述べたように抗 Fas 抗体により誘導されたアポトーシスに伴うアラキドン酸遊離反応は  $iPLA_2$  によることを示唆した。また、抗 Fas 抗体によりアポトーシスを誘導した場合、 $cPLA_2$  は完全に限定分解され、インタクトな  $cPLA_2$  は全く消失していた。しかし、彼らの報告や本研究でも TNF により誘導されたアポトーシスではインタクトな  $cPLA_2$  は完全には消失せず、かなり残る。TNF により誘導されるアポトーシスにおいては、この残ったインタクトな  $cPLA_2$  が活性化してアラキドン酸遊離を起こしている可能性が考えられ、現在阻害剤を用いた検討を行っている。

また、TNF に耐性を獲得した L929 細胞を用いて、抗 Fas 抗体によりアポトーシスを誘導したところ、アポトーシスに  $cPLA_2$  は関与しないことが報告されている [185]。Fas と TNF は互いに細胞死の経路においてクロスするが、全く同じ経路ではない。TNF の刺激からは MAP キナーゼの活性化などのシグナルも伝わり、このようなシグナルの多様性がアポトーシスにおける  $cPLA_2$  の関与について統一的な見解が得られない理由の 1 つと考えられる。

Caspase ファミリープロテアーゼの基質となる分子は、数多く報告されている。ポリ ADP リボースポリメラーゼ (PPAR) は、今やアポトーシスの進行の指標としてもその酵素の限定分解が用いられるほど有名なタンパクである [186, 187]。この酵素は損傷を受けた DNA の修復に関与すると考えられている。DNA-依存性プロテインキナーゼも DNA 二本鎖修復に関与する酵素で、アポトーシスに伴い分解される [188]。細胞内情報伝達に関与する分子の中にもアポトーシスに伴い限定分解を受けるものがある。網膜芽細胞腫たんぱく質 (RB) [189, 190] は  $cPLA_2$  と同じく限定分解により不活性化される。しかし、Ghayur らはプロテインキナーゼ C $\delta$  がアポトーシスによる限定分解を受けると活性化されアポトーシスを更に促進させることを示し [191]、限定分解により活性化されるタンパク (MAP キナーゼキナーゼ [192]、カルパイン [193] や p21 活性化キナーゼ 2 [194]) の存在を報告した。脂質に関与する物としては、細胞内コレス

テロール濃度の調節に関与する sterol regulatory element-binding protein (SREBP) が挙げられる [195, 196]。

また、基質となるものでは、細胞骨格に関与する分子が多い。フォドリン [197-199]、ラミン [200, 201] などがアポトーシスにより限定分解を受ける。これらの分子の限定分解がアポトーシスにおける形態変化に必要であることを想像するのは容易である。しかし、アポトーシスの進行における意義についてはほとんど明らかにされていない。最近になって、Rao らは中間系フィラメントのラミンの切断にアポトーシスにおける意義を示した。切断部分に変異を導入したラミンを発現させた細胞にアポトーシスを誘導すると、細胞死や DNA の断片化が遅れ、核の凝縮が阻害されていた [202]。ラミンの分解がアポトーシスにおいて、核の形態変化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

cPLA<sub>2</sub> の限定分解も、限定分解産物が膜に移行することや限定分解部位に変異を導入した cPLA<sub>2</sub> は細胞内では機能しないことなど、限定分解に何らかの意義があることを予想させる知見が見出された。トランスフォーマントを用いた解析は、アポトーシスにおける cPLA<sub>2</sub> の役割のみではなく、新たな cPLA<sub>2</sub> の細胞内での作用や活性化機構を解明する手助けになることが多いに示唆される。



IV アポトーシスに伴う細胞膜の  
分泌性 IIA 型ホスホリパーゼ  $A_2$  に対する  
感受性の獲得

## IV-1 序論

アポトーシス細胞はホスファチジルセリンが細胞の外側に配向することにより、マクロファージが認識し、食食される。このことから、アポトーシス細胞においてマクロな膜変化の可能性が考えられる。

PLA<sub>2</sub>の中でも分泌型のIIA型 sPLA<sub>2</sub>は、炎症部位や免疫担当細胞などに大量に存在し、炎症の増悪化に関与する分子量 14 kDa のタンパクである [20]。炎症性刺激により、様々な細胞で発現が誘導され、プロスタグランジンを始めとするエイコサノイド産生に関与している報告が多数見られる [204 - 209]。また、IIA型 sPLA<sub>2</sub>は細胞膜表面に存在するヘパラン硫酸に結合して作用すると考えられている [210]。しかし、未刺激の正常な細胞の形質膜は加水分解することができず [204, 211 - 213]、次に示すような活性化された細胞の膜に対してアタックする。カルシウムイオノフォア刺激の好中球 [212]、抗原抗体刺激肥満細胞 [213] や TNF 刺激血管内皮細胞 [204] などは細胞外から IIA 型 sPLA<sub>2</sub> を作用させると、プロスタグランジン産生が促進する。他にも、細胞の活性化により放出される小体にも IIA 型 sPLA<sub>2</sub> が作用し、lysoPA を供給するという考えも報告されている [214]。

このように、IIA 型 sPLA<sub>2</sub> は活性化された細胞膜、すなわち何らかの構造変化により IIA 型 sPLA<sub>2</sub> に対して感受性を獲得した膜構造に作用することが示唆される。そこで、アポトーシス細胞も IIA 型 sPLA<sub>2</sub> に感受性を示すような膜構造変化をしている可能性があると予想し、NGF 除去によりアポトーシスを誘導したラット副腎髄質褐色腫細胞株 PC12 細胞 [122] ならびに抗 Fas 抗体によりアポトーシスを誘導した U937 細胞を用いて検討した。

## IV-2 IIA 型 sPLA<sub>2</sub> 感受性の獲得

### IV-2-1 神経成長因子除去によるアポトーシス

ラット副腎髄質褐色腫細胞株 PC12 細胞は NGF [215] の存在下、神経様細胞へと分化する [122]。この分化した PC12 細胞の培養液から NGF ならびに血清を除くと細胞はアポトーシスする [123, 124]。このアポトーシスにおいて、アポトーシスの進行に伴いアラキドン酸遊離量が増加することを II 章で示した。そこで、さらに細胞外に IIA 型 sPLA<sub>2</sub> を存在させることにより、アラキドン酸遊離にどのような変化が観察されるかを検討した。

1 週間 NGF の存在下で神経様に分化させた PC12 細胞を NGF と血清を含まない培地で 8 回洗浄し、さらに培養を続けた。すると、24 時間後には 60 % の細胞が DNA の断片化をおこしていた (Fig. 2-30)。あらかじめ 24 時間放射標識アラキドン酸で標識した PC12 細胞を用いると、アポトーシスに伴い放射標識アラキドン酸が遊離してきた (Fig. 2-34, 4-1)。また、アポトーシス誘導時に、ラット血小板から抗体カラムを用いることで精製してきた IIA 型 sPLA<sub>2</sub> を共存させたところ、アラキドン酸遊離は著しく増強された (Fig. 4-1)。その増強作用はアポトーシス誘導 24 時間後すなわちアポトーシスが進行した段階で強かった。アラキドン酸遊離量は 24 時間後には IIA 型 sPLA<sub>2</sub> を添加していない細胞の 6 倍以上の 65 % にまで達した (Fig. 4-1)。



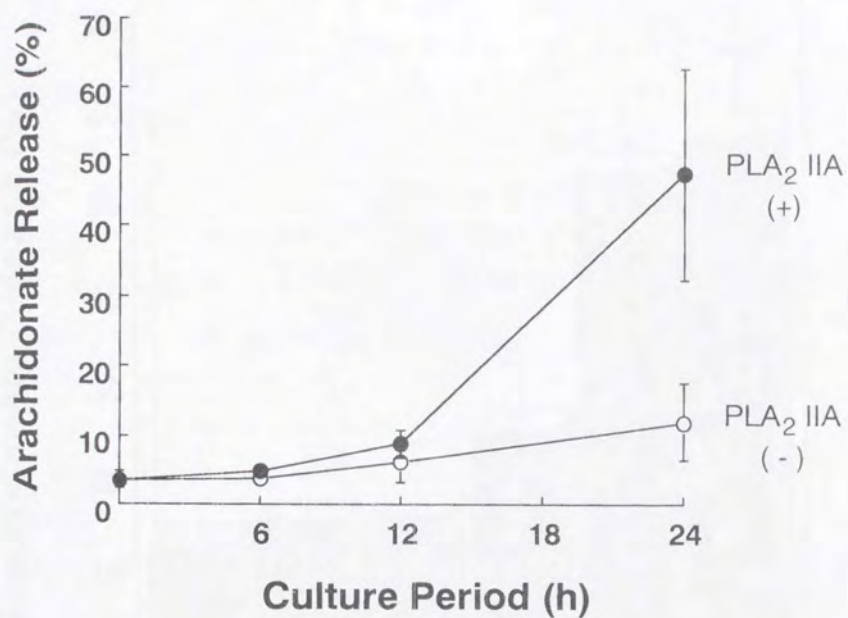


Fig. 4-1 アポトーシスに伴うアラキドン酸遊離反応の IIA 型 sPLA<sub>2</sub> による増強作用

この増強効果が IIA 型 sPLA<sub>2</sub> に依存性であるかを調べるため、IIA 型 sPLA<sub>2</sub> 量を変化させた。その結果、アポトーシス誘導 24 時間後のアラキドン酸遊離量は、IIA 型 sPLA<sub>2</sub>

量依存的に増強された (Fig. 4-2)。IIA 型 sPLA<sub>2</sub> 1  $\mu\text{g/ml}$  で増強効果が現れ始め、5  $\mu\text{g/ml}$  では未処理細胞に較べ約 4 倍以上も増強された。

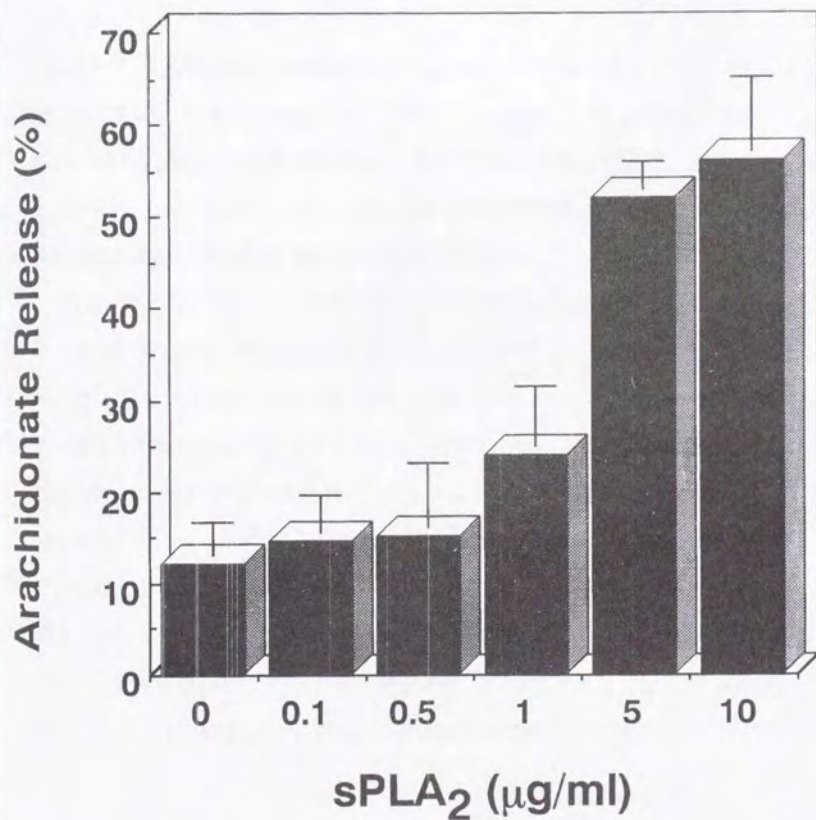


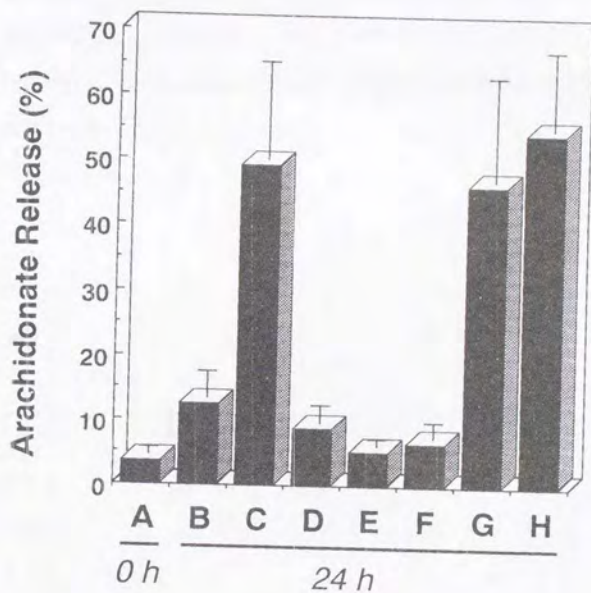
Fig. 4-2 IIA 型 sPLA<sub>2</sub> によるアポトーシスに伴うアラキドン酸遊離反応  
の増強効果の IIA 型 sPLA<sub>2</sub> 量依存性

栄養因子除去によるアポトーシスは栄養因子を存在させるとおこらない。このアポトーシスが操作により誘導されたものではなく、栄養因子が除かれたためおこったことを確かめるため、NGF を共存させた。その結果、NGF 存在下ではアラキドン酸遊離反応も抑制され (Fig. 4-3、B と E)、さらに IIA 型  $sPLA_2$  感受性は獲得しなかった (Fig. 4-3、C と F)。IIA 型  $sPLA_2$  感受性はアポトーシスにより獲得するものであることが示唆された。

ところで、IIA 型  $sPLA_2$  は活性発現にカルシウムイオンを必要とする [216]。そこで、培養液に EGTA を加え、細胞外カルシウムイオンを除くことによる効果を調べた。その結果、EGTA 存在下では IIA 型  $sPLA_2$  によるアラキドン酸遊離反応の増強効果は観察されなかった (Fig. 4-3、C と D)。この結果より IIA 型  $sPLA_2$  のアラキドン酸遊離反応増強効果には酵素活性が必要であることが示唆された。

IIA 型  $sPLA_2$  はヘパリンに親和性が強く、効果発現にはヘパリンへの結合が必須であると言われている [210]。そこで、ヘパリン結合部位のリジン残基をグルタミン酸にかえてヘパリンへの結合性を無くした、変異 IIA 型  $sPLA_2$  [210] の効果を検討した。この変異 IIA 型  $sPLA_2$  KE4 はマウスの IIA 型  $sPLA_2$  の変異体であるために、まず、マウス IIA 型  $sPLA_2$  の PC12 細胞のアポトーシスにおけるアラキドン酸遊離反応への効果を調べたところ、ラットの IIA 型  $sPLA_2$  と差はなかった (Fig. 4-3、C と G)。また、ヘパリンに結合できない IIA 型  $sPLA_2$  の KE4 も同様のアラキドン酸遊離増強効果を示した (Fig. 4-3、G と H)。これらの結果より、PC12 細胞はアポトーシスに伴い IIA 型  $sPLA_2$  感受性を獲得し、アラキドン酸遊離反応が増強される。この増強効果に IIA 型  $sPLA_2$  のヘパリンへの結合は必要なく、酵素活性は必要であった。





- A: Before incubation  
 B: Medium alone  
 C: 10 µg/ml rat sPLA<sub>2</sub>  
 D: 10 µg/ml rat sPLA<sub>2</sub> + 5 mM EGTA  
 E: 5 ng/ml NGF  
 F: 5 ng/ml NGF + 10 µg/ml sPLA<sub>2</sub>  
 G: 10 µg/ml mouse sPLA<sub>2</sub>  
 H: 10 µg/ml KE4

Fig. 4-3 アポトーシス PC12 細胞の様々な処理による  
 IIA 型 sPLA<sub>2</sub> 感受性獲得への影響

次に、どのリン脂質からのアラキドン酸遊離が増強されるかについて検討した。IIA 型 sPLA<sub>2</sub> 共存下、NGF 除去によりアポトーシスを 24 時間誘導した細胞を回収し、脂質画分を抽出後、2 次元 TLC により分離し、各リン脂質の放射活性を測定した。その結果、どのリン脂質も減少していたが、特に、ホスファチジルエタノールアミンの減少が顕著であった (Fig. 4-4)。IIA 型 sPLA<sub>2</sub> は基質として酸性リン脂質を好む [50, 203] こととこの結果は矛盾しなかった。

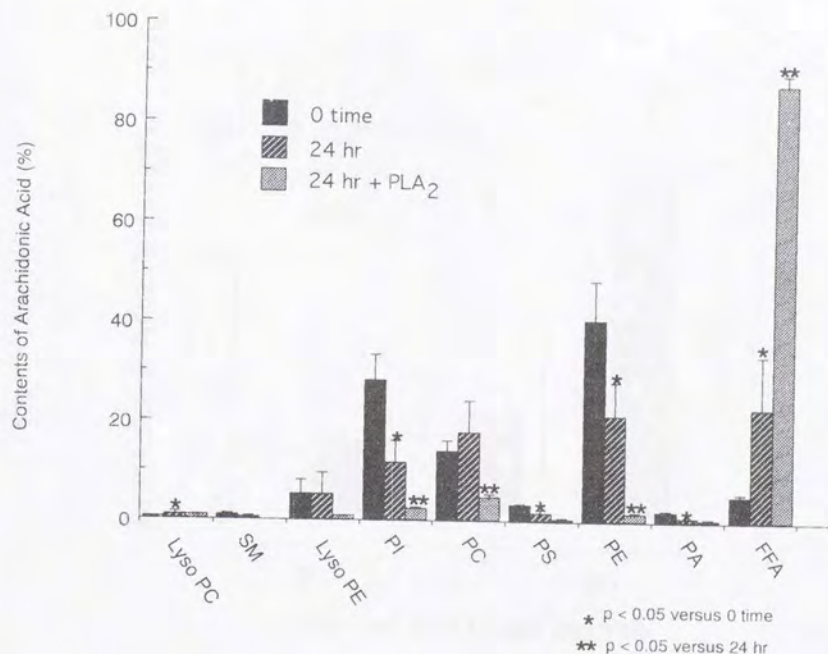


Fig. 4-4 アポトーシス PC12 細胞の IIA 型 sPLA<sub>2</sub> 処理によるリン脂質組成変化

#### IV-2-2 抗 Fas 抗体により誘導されたアポトーシス

U937 細胞を抗 Fas 抗体で処理することでアポトーシスを誘導し、IIA 型 sPLA<sub>2</sub> 添加による効果を調べた。5 または 50 ng/ml の抗 Fas 抗体で 12 時間処理した U937 細胞に 10  $\mu$ g/ml の IIA 型 sPLA<sub>2</sub> を加え、さらに 12 時間反応を続けた。その結果、IIA 型 sPLA<sub>2</sub> を加えたほうがアラキドン酸遊離反応が増強された。また、この増強効果は抗 Fas 抗体量が多いほど強かった (Fig. 4-5)。

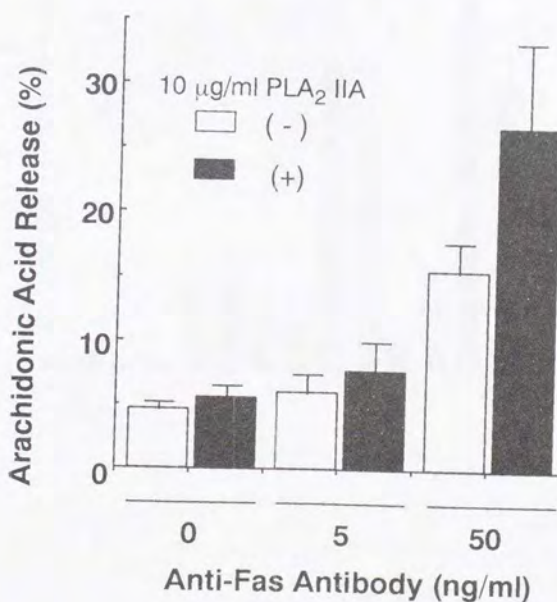


Fig. 4-5 抗 Fas 抗体により誘導したアポトーシスにおける IIA 型 sPLA<sub>2</sub> の効果



さらに、どのリン脂質から遊離してくるかを調べた。その結果、顕著に減少しているリン脂質分子種は観察されなかった (Fig. 4-6)。

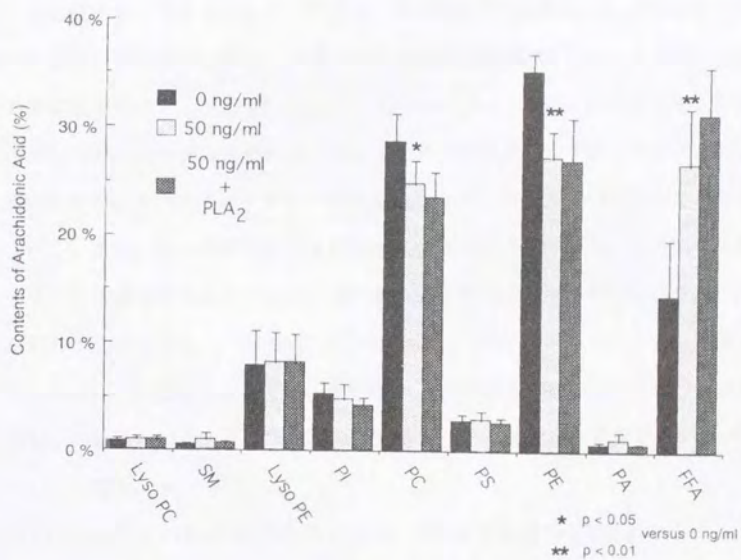


Fig. 4-6 抗 Fas 抗体でアポトーシスを誘導した U937 細胞での  
IIA 型 sPLA<sub>2</sub> の作用するリン脂質分子種

### IV-3 まとめ

PC12 細胞の栄養因子除去あるいは抗 Fas 抗体により U937 細胞に誘導したアポトーシスにより細胞は、IIA 型 sPLA<sub>2</sub> 感受性を獲得した。IIA 型 sPLA<sub>2</sub> は炎症局所に多く観察され、炎症の増悪化や様々な疾病に関与していると考えられている [50, 203]。また、IIA 型 sPLA<sub>2</sub> を正常な細胞に処理してもほとんど効果は見られないが、サイトカインなどにより活性化された細胞や断片化された細胞小体には作用でき、その効果が顕著に現れることが明らかにされている。すなわち、IIA 型 sPLA<sub>2</sub> は細胞膜の変化、おそらく“乱れ”を認識するとも考えられる。アポトーシス細胞に IIA 型 sPLA<sub>2</sub> は作用することが可能であるという今回の結果は、アポトーシス細胞の膜構造の変化を形態学上以外の酵素への感受性を指標として証明したことになる。さらに、PC12 細胞と U937 細胞といった、動物種や由来が違った細胞に、異なった方法で誘導したアポトーシスにおいて共通に観察されたことから、アポトーシス細胞に共通しておきている現象であることが示唆される。また、我々の研究室では骨髓由来マウス肥満細胞から、造血因子の IL-3 を除去することで誘導されたアポトーシスにおいても同様の IIA 型 sPLA<sub>2</sub> 感受性の獲得を明らかにしており [217]、今回の結果を支持する。アポトーシスによる細胞膜の変化は、IIA 型 sPLA<sub>2</sub> の感受性の観点から考えると、炎症部位や疾患部位における細胞の変化と共通しているといえよう。すなわち、アポトーシス細胞も生体内で IIA 型 sPLA<sub>2</sub> のターゲットとなりえる。

炎症部位において IIA 型 sPLA<sub>2</sub> の作用により、アラキドン酸が供給されアラキドン酸カスケードが開始することで、エイコサノイドが産生される経路の存在を当教室では最近報告した [218]。また、肥満細胞に誘導したアポトーシスにおいて、遊離してきたアラキドン酸がプロスタグランジン D<sub>2</sub> に代謝されることも明らかにしている [217]。このことから、アポトーシス細胞が炎症部位において、近くに存在する正常細胞へのアラキドン酸の供給源となりえる可能性も示唆される。

IIA 型 sPLA<sub>2</sub> の細胞への作用には、ヘパリンへの結合が必須であることを我々は報告してきた [210]。しかし、アポトーシス細胞への作用にはヘパリンへの結合性を全く必要とはせず、酵素活性のみが必要であった。この結果は、アポトーシス細胞の膜構造が刺激等により観察される膜構造とは大きく異なることを示唆していると考えられる。また、IIA 型 sPLA<sub>2</sub> はアポトーシス細胞のホスファチジルエタノールアミンとホスファチジルセリンへの作用が顕著で、これは IIA 型 sPLA<sub>2</sub> が酸性リン脂質をよい基質とする *in vitro* での基質特異性の実験結果と一致していた。これらのリン脂質は通常は形質膜の細胞質側を向いて存在している。しかし、アポトーシスにおいて酸性リン脂質が形質膜の外側にトランスロケーションすることが明らかになっており、本研究の結果はこの現象に矛盾しない結果である。

アポトーシスにより細胞の形態は大きく変化することは、明らかな事実である。この形態変化により、酵素への認識を獲得することを本研究において示した。これは、アポトーシス細胞が正常細胞とは異なることを、DNA の断片化などで示す今までの概念とは違ったアプローチで示した。アポトーシス細胞は、炎症部位や虚血部位を始めとした疾患部位に多く存在することが考えられ、これらの疾患を増悪化する危険性も考えられるともいえよう。炎症を起こさずに、静かに死んでいくプロセスとして定義されたアポトーシスは、本当に炎症反応に関係しないのであろうか。それは、食食による除去とのバランスが重要であると考えられる。新たな炎症反応関与分子としてアポトーシス細胞も考える必要が示唆される。



## V 総括

細胞死にアポトーシスという概念が登場し、25 年が経過した。この間にアポトーシスの研究は驚異的なペースで行なわれ、今や細胞機能の 1 つとして細胞死が挙げられるようになった。その研究はアポトーシスの分子機構に中心が置かれ、Caspase ファミリーや Fas や TNF からのシグナルに関与するアダプター分子が次々と明らかにされている。本研究で注目した膜構造の変化は、アポトーシスにおいて大きな特徴であるにもかかわらず、その解析は遅れている。本研究では、膜構造変化をグリセロリン脂質に注目し、分子のレベルで解析することで以下のことを明らかにした。

アポトーシス細胞において、あらかじめ細胞を放射脂脂肪酸標識しておくことと抗 Fas 抗体により誘導されたアポトーシスに伴い、放射標識脂脂肪酸が遊離してきた。脂肪酸を遊離するリン脂質の同定や阻害剤を用いた検討より、この遊離反応に  $iPLA_2$  が関与することを明らかにした。 $iPLA_2$  はその活性調節機構などは明らかにされていないが、膜リン脂質のリモデリングに関与していることが報告されており [78]、 $iPLA_2$  のアポトーシスにおける膜変動への関与はアポトーシス細胞における膜リン脂質のリモデリングの亢進を示唆する結果である。しかし、 $iPLA_2$  の阻害剤を用いて抗 Fas 抗体により誘導されるアポトーシスへの影響を調べたが、アポトーシス自体には全く影響を与えず、アポトーシスは進行した。ところが、トリパンブルー染色による死細胞率測定により、アポトーシスの早い段階で、アポトーシスの進行が遅れることを示唆する結果を得た。アポトーシスにはコミットメント（死ぬことを不可逆的に決定付ける）のポイントが存在するとされている。 $iPLA_2$  が関与する脱アシル化はこのポイント以降に存在すると考えられる。しかし、阻害剤を用いた場合、影響がどのような表現系として観察されるかは、アポトーシスの進行を測定する様々な因子（DNA の断片化、Caspase の活性化、細胞形態の変化、ホスファチジルセリンの配向性の変化など）を検討していく必要があると考えられる。また、*in vitro* における観察のみではなく、マクロファージの食食能への影響などの *in vivo* での変化についても検討が必要となるであろう。

また、アポトーシス細胞において脱アシル化が亢進されるものの、リン脂質組成には大きな変化は観察されなかった。このことから、再アシル化酵素の比活性の上昇を予想

したところ、アポトーシス細胞において上昇が見られた。アポトーシス細胞において脱アシル化・再アシル化反応、Lands サイクル、の亢進が観察された。アポトーシス細胞におけるリン脂質代謝サイクルの重要性については、最近、Chilton らが CoA 非依存性のアシルトランスフェラーゼの阻害によるアポトーシスの誘導を報告していること [130] や Cui らがホスファチジルコリン生合成阻害によるアポトーシスの誘導を報告していること [127] などからも推測できる。しかし、アポトーシスにおける位置づけについてはその見解は得られておらず、今後明らかにしていく必要があると考えられる。

脱アシル化反応を調べる過程で、アシル CoA 代謝に関与する酵素の変動を明らかにした。アポトーシス細胞においてアシル CoA 加水分解酵素の比活性が上昇し、アシル CoA 合成酵素活性が低下することが明らかになった。この反応によりアポトーシス細胞において、アシル CoA は減少することになる。先ほど示したように、アポトーシス細胞では再アシル化反応が亢進しており、これらの結果を考えあわせると細胞内アシル CoA 量の減少が予想される。アシル CoA は、脂質合成や脂肪酸分解の中間物質として重要であり、その量はアシル CoA 結合タンパクにより厳密に調節されている [113]。細胞内に存在するアシル CoA は数  $10\ \mu\text{M}$  であることが報告されており、このほとんどはタンパクや細胞膜と結合して存在し、遊離しているアシル CoA は数  $10\ \text{nM}$  である。アシル CoA の量により影響を受けるタンパクの多くは脂質代謝に関与する酵素で、アシル CoA により酵素活性が阻害される。また、エネルギー産生に関与する酵素も活性が阻害される。これらの酵素活性がアポトーシス細胞で予想されるアシル CoA 量の減少によりどのように変化するかは、アポトーシス細胞におけるエネルギー産生を考える点でも興味をもたれる。さらに、アシル CoA はイオンチャネルやある種の PKC 分子の活性調節にも関与することが報告されており、これらとアポトーシスとの関係も興味深い。また、生成される脂肪酸についても、その量により細胞におけるエネルギー産生やミトコンドリア膜の透過性に影響を与えることが報告されており、アポトーシス細胞においてミトコンドリアの役割の重要性が最近特に注目を浴びている事実 [219-221] と考えあわせると大変興味深い。



さらに、本研究ではアポトーシスに伴い cPLA<sub>2</sub> が Caspase-3 により限定分解されることを明らかにした。アポトーシスに伴う Caspase の活性化による様々なタンパクの限定分解が報告されており、その意義についていくつかのタンパクで明らかにされつつある。しかし、ほとんどのタンパクはアポトーシスの進行には直接関与しないと考えられており、cPLA<sub>2</sub> もアポトーシスの進行への関与については否定的に考える。cPLA<sub>2</sub> ノックアウトマウスが作製され、プロスタノイド産生や炎症への関与が明らかにされているが [222, 223]、cPLA<sub>2</sub> の生体の恒常性の維持への関与は明らかになっていない。さらに、エイコサノイド産生と細胞のアポトーシスへの関連についての報告も多く見られることから [224-227]、cPLA<sub>2</sub> の生体恒常性の維持に対する役割について、アポトーシスによる限定分解の研究により明らかになることが期待される。また、アポトーシスにより限定分解を受けないように変異を導入した cPLA<sub>2</sub>(D522N) はアラキドン酸を遊離させる反応に対して応答しない。さらには、断片化により出現する cPLA<sub>2</sub> の 78 kDa 断片はすべて膜画分に存在する。これらのことから、この 522 番目のアスパラギン酸付近に cPLA<sub>2</sub> の活性調節や細胞内動態に関与する部位が存在することも予想でき、今後解析する必要がある。

ところで、アポトーシス細胞は IIA 型 sPLA<sub>2</sub> への感受性を獲得した。これは、アポトーシス細胞が細胞膜構造を変化させることを酵素を用いて示したことになる。IIA 型 sPLA<sub>2</sub> の傷害のある細胞への作用については、いくつかの報告があり [228-230]、IIA 型 sPLA<sub>2</sub> が大量に存在する炎症部位におけるアポトーシスを始めとする傷害を持つ細胞の存在は、炎症反応を増悪化させる可能性がある。実際の体内における、マクロファージによる貪食と IIA 型 sPLA<sub>2</sub> への感受性獲得との時間的な関係について検討する必要があると考えられる。

アポトーシス細胞において様々な変化をグリセロリン脂質に注目し観察した。その変化のアポトーシスにおける意義については、まだ、暗やみの中である。しかし、この解明は、アポトーシスの研究のみならず正常細胞機能の維持の研究にもつながると予想され、今後に期待がもてる。

## VI 試薬ならびに方法

## VI-1 試薬

マウス cPLA<sub>2</sub> cDNA は辻本博士（理化学研究所）より、抗ヒト cPLA<sub>2</sub> ウサギ抗体は Dr. J. D. Clark（Genetics institute）より供与頂いた。cPLA<sub>2</sub> の阻害剤 arachidonoyl trifluoromethyl ketone（AACOCF<sub>3</sub>）、cPLA<sub>2</sub> と iPLA<sub>2</sub> の阻害剤 methyl arachidonoylfluorophosphonate（MAFP）、iPLA<sub>2</sub> の阻害剤 bromoenol lactone（BEL）は Cayman より入手した。ヒト IIA 型 sPLA<sub>2</sub> の阻害剤 LY311727 は Dr. R. M. Kramer（Lilly research）より供与頂いた。Caspase 阻害剤（Ac-YVAD-CHO、Ac-DEVD-CHO）とプロテアーゼ阻害剤の chymostatin は Peptide Institute より caspase 基質（Mca-YVADAPK(Dnp)-OH、Mca-DEVDAPK(Dnp)-OH）は Takara より入手した。4',6'-diamidino-2-phenylindole（DAPI）、p-bromophenacyl bromide、leupeptin、antipain、pepstatin、cytochalasin B、N $\alpha$ -benzoyl-arginine ethyl ester、trizma base（Tris）、bovine serum albumin（BSA）、3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate、ovalbumin、arachidonoyl CoA、p-chloromercury benzoic acid、cycloheximide は Sigma より購入した。EDTA、EGTA は dojin より購入した。その他の試薬は wako より購入した。DNA のオリゴマーやプライマーは作製を pharmacia に委託した。

## VI-2 細胞培養

### VI-2-1 U937 細胞、HL-60 細胞

ヒト単核球系白血病細胞株 U937 細胞（RIKEN Cell Bank）あるいはヒト前骨髄球系白血病細胞株 HL-60 細胞（RIKEN Cell Bank）は 10 % ウシ胎児血清（JRH Bioscience）、2 mM グルタミン（Gibco BRL）、100 U/ml ペニシリン、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン



(大日本製薬)を含む RPMI1640 培地 (ニッスイ) を用い、3 日毎に  $2 \times 10^5$  cells/ml で  $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  の条件で継代した。

## VI-2-2 PC12 細胞

ラット副腎髄質褐色腫細胞株 PC12 細胞 (Health Science Research Resources Bank) は 10 % ウマ血清 (JRH Bioscience)、5 % ウシ胎児血清 (JRH Bioscience)、2 mM グルタミン (Gibco BRL)、100 U/ml ペニシリン、100  $\mu\text{g/ml}$  ストレプトマイシン (大日本製薬) を含む RPMI1640 培地 (ニッスイ) を用い、 $2 \times 10^5$  cells/ml で  $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  の条件で継代した。神経様に分化させるときには、コラーゲンコートされた 6 穴プレート (IWAKI) に  $2 \times 10^5$  cells/well/2 ml となるように 5  $\mu\text{g/ml}$  のマウス NGF 2.5S (ケミコン) を加えた RPMI1640 培地で  $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  の条件で培養した。また、2 日毎に 5  $\mu\text{g/ml}$  の NGF を含む RPMI1640 培地を交換した。

## VI-2-3 293 細胞

ヒト胎児腎細胞 293 細胞 (Riken cell bank) は RPMI1640 培地で培養を行い、5 日後とに 0.25 % トリプシン (Gibco BRL)、0.01 % EDTA を用いて細胞を浮遊させ、回収し、 $1 \times 10^5$  cells/ml で  $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  の条件で継代した。

## VI-3 アポトーシスの誘導

### VI-3-1 PC12 細胞へのアポトーシスの誘導

NGF の存在下で 6 日間コラーゲンコートプレートで神経様に分化させた PC12 細胞を

放射アラキドン酸あるいはオレイン酸で標識する場合は、 $0.1 \mu\text{Ci/ml}$  [ $^3\text{H}$ ] アラキドン酸 (DuPont NEN) あるいは  $0.6 \mu\text{Ci/ml}$  [ $^3\text{H}$ ] オレイン酸 (DuPont NEN) を加え、さらに 24 時間培養した。細胞は血清と NGF を加えていない RPMI1640 培地で 3 回洗った後、ラバーポリスマンを用いて回収した。さらに血清を加えていない培地を用い、1,000 rpm、5 分間の遠心で細胞を洗う操作を 5 回繰り返した。次に  $1 \times 10^7$  cells/ml の細胞濃度に血清を含まない培地に懸濁し、 $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  の条件でアポトーシスを誘導した。

### VI-3-2 抗 Fas 抗体によるアポトーシスの誘導

U937 細胞あるいは HL-60 細胞を培養 2 日後に回収し、RPMI1640 培地で 3 回洗った。放射アラキドン酸あるいはオレイン酸で標識する場合は、 $0.1 \mu\text{Ci/ml}$  [ $^3\text{H}$ ] アラキドン酸 (DuPont NEN) あるいは  $0.6 \mu\text{Ci/ml}$  [ $^3\text{H}$ ] オレイン酸 (DuPont NEN) を 24 時間前に加え、放射グリセロールあるいは正リン酸で標識する場合は、 $2 \mu\text{Ci/ml}$  [ $^3\text{H}$ ] グリセロール (DuPont NEN) あるいは  $15 \mu\text{Ci/ml}$  [ $^{32}\text{P}$ ] 正リン酸 (DuPont NEN) を 24 時間前に加えた。 $1 \times 10^7$  cells/ml の細胞濃度になるように培地に懸濁させ、抗ヒト Fas 抗体 CH-11 (医学生物学研究所) を加え、 $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  の条件でアポトーシスを誘導した。

### VI-3-3 エトポシドによるアポトーシスの誘導

U937 細胞あるいは HL-60 細胞を VI-3-2 の操作で調製し、エトポシド (Sigma) で 1 時間処理した。3 回細胞を洗った後エトポシドを含まない培地でさらに 10 時間培養を続けアポトーシスを誘導した。

## VI-4 アポトーシスの定量

### VI-4-1 アガロースゲルによる DNA の断片化の観察

細胞を 400  $\mu\text{g/ml}$  の Proteinase K (ペーリンガーマンハイム) を含む Lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 mM EDTA、0.5 % Triton X-100) に懸濁し、55  $^{\circ}\text{C}$  で細胞が破壊され溶液が透明なるまで、1 晩中処理した。フェノール抽出を 2 回行い、次にエタノール沈殿をした。得られた沈殿を 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA 溶液に溶解し、100  $\mu\text{g/ml}$  RNase (ニッポンジーン) と 1 晩反応させた。フェノール抽出、エタノール沈殿し、DNA 溶液を得た。この溶液を 2 % Agarose S (ニッポンジーン) ゲル電気泳動により分離し、UV ランプ (コスモバイオ) 下で写真を撮った (ボラロイド)。

### VI-4-2 DAPI を用いた DNA 断片化の定量

アポトーシスを誘導した細胞  $1 \times 10^7$  個を回収し、PBS で洗った後、定量用バッファー (5 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 mM EDTA、0.5 % Triton X-100) 1 ml に懸濁し、氷上に 20 分間放置した。次に 27,000  $\times g$  で 20 分間、4  $^{\circ}\text{C}$  で遠心し、上清 (断片化した DNA を含む) と沈殿 (インタクトな DNA) を得た。沈殿は定量用バッファー 1 ml に懸濁し、それぞれを 1 分間ブランソン社のソニケーターを用い、power 30、50 % パルスサイクルで超音波破碎した。この溶液に、4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を 100 ng/ml とするように加え、Hitachi の蛍光測定装置で励起波長 362 nm、測定波長 454 nm で蛍光を測定した。

### VI-4-3 死細胞率の測定



トリパンブルー染色により、死細胞と正細胞数を数え、その比率により、死細胞率を求めた。

## VI-5 遊離脂肪酸量の測定

VI-3-1 や VI-3-2 の方法でアポトーシスを誘導した放射標識アラキドン酸やオレイン酸で標識された細胞ならびに培養液を一定時間に回収し、ドールの変法により遊離脂肪酸を抽出した。ドールの変法とは以下のような方法である。先ほどの細胞溶液に  $H_2O$  を加え 750  $\mu l$  とし、ドール試薬 (isopropanol : n-heptane : 1N 硫酸 = 78 : 20 : 2) 1.25 ml、n-ヘプタン 750  $\mu l$  を加え 5 分間搅拌した。次に、3,000 rpm で 5 分間遠心し、上層を n-ヘプタンがあらかじめ 750  $\mu l$  いれてある別の試験管に移した。この試験管にさらに適量のシリカゲルを加え、5 分間搅拌し、3,000 rpm で 5 分間遠心した。この上層に遊離脂肪酸が抽出される。遊離脂肪酸量を測定するために、この上層をシンチレーションカクテルと混合し、アロカ社の液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。また、各種阻害剤が本反応に与える影響を調べた際には、アポトーシス誘導時にこれら阻害剤を共存させた。

## VI-6 脂質の薄層クロマトグラフィー (TLC)

### による分離

#### VI-6-1 脂質の抽出 (Brigh & Dyer 法)

細胞ならびに細胞培養液を回収し、メタノールとクロロホルムを比率が水 : メタノール : クロロホルム = 0.8 : 2 : 1 となるように順番に加えた。5 分間搅拌後 0.2 M クエン酸

をクロロホルムと同量加えさらに5分間攪拌した。次に、クロロホルムを先程と同量加え、水：メタノール：クロロホルム=0.9:1:1とし、5分間攪拌後3,000 rpm、5分間遠心した。下層のクロロホルム層をスピッツ管に移し、再びクロロホルムを加え、攪拌、遠心、抽出を2回繰り返した。3回の抽出によりスピッツ管に集めたクロロホルムをIWAKIのエバポレーターを用いて、減圧乾固させた。適量のクロロホルムを加え、脂質画分とした。

## VI-2 2次元 TLC

VI-6-1の方法で抽出した脂質画分に必要に応じてAbanti社の標準リン脂質混液(PC、PE、PS、PI、PA、SM、LysoPC、LysoPE)を加え、10 cm x 10 cmのシリカ60ゲルプレート(メルク社)の左角にスポットした。1次元目の溶媒として、クロロホルム：メタノール：酢酸：水=65:25:4:2(v/v/v)を用い、展開した。良く乾燥させた後、2次元目の溶媒は、クロロホルム：メタノール：ギ酸=65:25:8.8(v/v/v)で展開した。ヨード発色により各種リン脂質、中性脂質と脂肪酸の位置を同定し、そのスポットをかき取り放射活性測定あるいはリンの定量によるリン脂質量の定量を行った。 $[^{32}\text{P}]$ 正リン酸で標識した細胞を用いた場合は、フジフィルム社のBAS2000を用いてイメージング解析を行った。

## VI-3 中性脂質分離のTLC

Brigh & Dyer法やDoleの変法により抽出した脂質画分を、シリカ60ゲルプレートを用い、ヘキサン：エーテル：酢酸=80:30:1(v/v/v)の展開溶媒で分離した。分離後はVI-2の方法に基づき解析した。

## VI-7 ホスホリパーゼ $A_2$ ( $PLA_2$ ) 活性測定

### VI-7-1 細胞質 $PLA_2$ ( $cPLA_2$ ) 活性測定

細胞を PBS で洗った後、TBS バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl) に懸濁し、VI-4-2 で示したように細胞を 1 分間超音波破碎した。この細胞のライゼートを用いて、100 mM Tris-HCl (pH 9.0)、4 mM  $CaCl_2$  と 0.1 % BSA を含む反応溶液で、 $2\mu M$  1-palmitoyl-2- $[^{14}C]$ arachidonyl-glycerophosphoethanolamine (DuPont NEN) を基質に、 $37^\circ C$  で 30 分間反応させた。トルエンに溶解している基質は、窒素ガスでトルエンを乾固させた後、水を加え、バス型のソニケーターを用いてリポソームにしてから用いた。 $PLA_2$  活性は、反応により遊離した放射標識アラキドン酸を、VI-5 に示したドールの変法により抽出し、液体シンチレーションカウンターでその量を測定した値より求めた。

### VI-7-2 カルシウム非依存性 $PLA_2$ ( $iPLA_2$ ) 活性測定

細胞を 1 mM EDTA、0.34 M sucrose を含む 10 mM HEPES (pH 7.5) バッファーで洗った後、1 mM DTT を含んだこのバッファーに  $3.3 \times 10^7$  cells/ml で懸濁した。細胞懸濁液を VI-4-2 の方法で超音波破碎した後、 $10,000 \times g$  で 30 分間遠心し、その上清を反応に用いた。基質に  $20\mu M$  1-palmitoyl-2- $[^{14}C]$ arachidonyl-glycerophosphoethanolamine (DuPont NEN) を用い、100 mM HEPES (pH 7.5)、5 mM EDTA、0.4 mM Triton X-100、0.1 mM ATP の組成のバッファーでソニケーションによりリポソームとした後、ライゼートを加え  $40^\circ C$  で 30 分間反応させた。活性は  $cPLA_2$  の場合と同様に求めた。阻害剤の本反応に与える影響を調べた際には、あらかじめ  $40^\circ C$  で 5 分間細胞ライゼートと阻害剤とを反応させた。



## VI-8 アシル CoA 合成酵素活性測定

### VI-8-1 de novo 合成酵素活性測定

細胞を回収後 PBS で洗い、TBS に懸濁し、VI-4-2 の方法で超音波破碎した。反応液 (100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM KCl、50 mM ATP、15 mM  $MgCl_2$ 、5 mM DTT、5 mM CoA) に 250  $\mu$ M [ $^3H$ ] アラキドン酸 (0.1  $\mu$ Ci/ml) を基質として加え、さらに細胞ライセートを加えて 250  $\mu$ l とし、37  $^{\circ}C$  で 30 分間反応させた。生成したアラキドノイル CoA はドールの変法を用いて未反応のアラキドン酸と分離させた。すなわち、ドールの変法でヘプタン層を除くことにより未反応のアラキドン酸を除き、水層にアラキドノイル CoA を抽出した。微量なアラキドン酸の混入を除くために、2 mg/ml のステアリン酸 (Funakoshi) を含むヘプタンを用いた。活性は水層 1 ml の放射活性を測定し、この値を 1.725 倍することで求めた。

### VI-8-2 ATP 非依存性アシル CoA 合成酵素活性測定

細胞を回収後、SET バッファー (250 mM sucrose、10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 mM EDTA) に  $1 \times 10^8$  cells/ml で懸濁し、VI-4-2 の方法で 1 分間超音波破碎した。このライセートを用いて、反応液 (10 mM HEPES (pH 7.3)、1 mM CoA、1 mM EDTA、1 % BSA) に基質として 2  $\mu$ M 1-palmitoyl-2- $[^{14}C]$ arachidonyl-glycerophosphocholine (DuPont NEN) を加え 250  $\mu$ l とし、37  $^{\circ}C$  で 30 分間反応させた。反応後、25 nmol の heptadecanoyl CoA (Sigma) を加え、Brigh & Dyer の方法で未反応の PC やアラキドン酸をクロロホルム層に抽出した。クロロホルム層を除く操作を 3 回繰り返す、水層に生成したアラキドノイル CoA を回収し、放射活性を測定した。

## VI-9 アシル CoA 加水分解酵素活性測定

### VI-9-1 非放射標識基質を用いた活性測定

細胞を回収後、SET バッファーに  $1 \times 10^8$  cells/ml で懸濁し、VI-4-2 の方法で 1 分間超音波破碎した。ライセートを  $100,000 \times g$ 、1 時間遠心分離し、その上清を  $100,000 \times g$  sup. とした。試験管に 0.2 M リン酸バッファー 500  $\mu$ l に  $100,000 \times g$  sup. と水を加え 900  $\mu$ l とし、30  $^{\circ}\text{C}$  で 1.5 分間ブレインキュベーションを行った。0.2 mM アラキドニル CoA (in 0.1 M クエン酸バッファー(pH 4.95)) を 100  $\mu$ l 加え、反応を 30  $^{\circ}\text{C}$  で 3 分間行った。3 分後に 232 nm の吸光度を測定し、この値と  $\epsilon = 4250 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  より生成した CoA の量を求め、活性とした。

### VI-9-2 放射標識基質を用いた活性測定

VI-9-1 の方法で調製した  $100,000 \times g$  sup. を試料として用いた。試験管に 0.2 M リン酸バッファー 125  $\mu$ l に  $100,000 \times g$  sup. と水を加え 175  $\mu$ l とし、30  $^{\circ}\text{C}$  で 1.5 分間ブレインキュベーションを行った。 $[^3\text{H}]$  アラキドノイル CoA ( $0.08 \mu\text{Ci/ml}$ ) を 60  $\mu\text{M}$  となるように加え、全量を 250  $\mu$ l とし、30  $^{\circ}\text{C}$  で 3 分間反応を行った。加水分解により遊離されたアラキドン酸はドールの変法を用いて抽出し、その放射活性を測定して活性を求めた。阻害剤の本反応に与える影響を調べた際には、阻害剤と  $100,000 \times g$  sup. をリン酸バッファー中であらかじめ 30  $^{\circ}\text{C}$  で 1.5 分間反応させた。

## VI-10 アシル CoA : リゾリン脂質

### アシルトランスフェラーゼ活性測定

細胞を回収後、バッファー (20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、20 % エチレングリコール) に懸濁し、VI-4-2 の方法で超音波破碎を行った。このライセートを基質として 0.2 mM アラキドノイル CoA と 5 mM [ $^{14}$ C] リゾ PC (0.2  $\mu$ Ci/ml) を用いて、先ほどのバッファーに 5 mM DTT を加えた反応液で 37 °C で 15 分間反応させた。反応後 Brigh & Dyer の方法で脂質画分を抽出し、この脂質画分をクロロホルム : メタノール : 1 M アンモニア水 = 65 : 25 : 4 の展開溶媒を用いて、TLC により分離した。BAS2000 を用いた解析より、生成された PC の割合を算出した。

## VI-11 イムノブロットティング

細胞を回収し PBS で洗浄後、PBS に  $1 \times 10^7$  cells/ml に懸濁して VI-4-2 の方法で超音波破碎した。各サンプルは 10  $\mu$ g タンパク / レーンで 10 % (W/V) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を 2-メルカプトエタノールを含む還元条件下で行った。泳動後ニトロセルロース膜 (Schleicher and Schuell) にセミドライ方式のエレクトロブロットティング装置 (Bio-Rad) でタンパクを転写した。次に、5 % スキムミルクを含む TPBS (0.5 % Tween-20 を含む PBS) でブロッキングを行い、さらに TPBS でニトロセルロース膜を 3 回洗った。次に、抗ヒト cPLA<sub>2</sub> 抗体を 1 : 10,000 で加え、室温で反応させた。TPBS で 1 次抗体を 5 回洗浄した後、2 次抗体の抗ウサギ IgG (H+L) ヒツジ抗体 (Zymed) と室温で反応させた。TPBS で 5 回洗浄した後、ECL ウェスタンブロット解析システム (Amersham) を用いた蛍光発色を行い、X 線フィルム (Kodak) に感光させ視覚化した。



## VI-12 [ $^{35}\text{S}$ ] メチオニン標識 cPLA<sub>2</sub> の作製

(in vitro transcription / translation)

[ $^{35}\text{S}$ ] メチオニン標識 cPLA<sub>2</sub> の作製は PROTEINscript™ キット (Ambion) を用いて行った。目的の cDNA を含むプラスミド 0.5  $\mu\text{g}$  を transcription バッファー、T3 あるいは T7 ポリメラーゼ (5 U/ml) と Ribonuclease inhibitor (5 U/ml) を含む 10  $\mu\text{l}$  の反応液を 30  $^{\circ}\text{C}$  で 15 分間反応させた。続いてこの反応液に translation バッファー、reticulocyte のライセート、63  $\mu\text{Ci}$  の [ $^{35}\text{S}$ ] メチオニン (Amersham) を加え、全量を 50  $\mu\text{l}$  とした。30  $^{\circ}\text{C}$  で 90 分間反応させ、さらに RNase A (Sigma) を 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で加えて 30  $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間反応させた。生成物は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、オートラジオグラフィにより確認した。

## VI-13 リコンビナントマウス cPLA<sub>2</sub> の調製

当教室で既に作製された、マウス cPLA<sub>2</sub> の cDNA がサブクローニングされた baculovirus transfection ベクター (Pharmlngen) を Sf9 細胞 (Invitrogen) にトランスフェクションさせた。4 日後の細胞を回収し、各種プロテアーゼ阻害剤 (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、1 mM N $\alpha$ -benzoyl-arginine ethylester、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  antipain) を加えた SET バッファーに懸濁し、VI-4-2 の方法で 1 分間超音波破碎した。ライセートを 100,000  $\times g$  で 1 時間遠心することにより得た 100,000  $\times g$  sup. を DEAE-Sepharcel カラムにアプライした。あらかじめ TBS により平衡化してあったカラムをアプライ後に TBS でよく洗った。吸着した画分は 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) バッファーの塩濃度の 150 mM から 500 mM へのリニアグラジエントにより溶出させ、フラクションごとに分取した。VI-7-1 で示した方法で各フラクションの cPLA<sub>2</sub> 活性を測定し、活性が高かったフラ

クションを集めた。このフラクションを 5 M NaCl 溶液を用いて塩濃度を 1 M にした後、1 M NaCl を含む 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) で平衡化した phenylsuperose カラム (Pharmacia) にアプライした。カラムをよく洗った後、塩を含まない 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) バッファーで吸着画分を溶出した。各画分について cPLA<sub>2</sub> 活性を測定し、活性が高かった画分についてはさらにイムノブロットングを行い、cPLA<sub>2</sub> の存在を確認した。

## VI-14 cPLA<sub>2</sub> の in vitro における

### アポトーシス細胞ライセートによる分解

抗 Fas 抗体処理によりアポトーシスを 12 時間誘導した U937 細胞および未処理細胞を回収し、PBS で洗った後、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) バッファー (5 mM DTT、1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride、1 µg/ml antipain) に懸濁し、VI-4-2 の方法で 1 分間超音波破碎し、ライセートを得た。これらのライセートと VI-12 で作製した [<sup>35</sup>S] メチオニン標識 cPLA<sub>2</sub> とを 37 °C で一定時間反応させた。反応後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、オートラジオグラフィーにより解析した。リコンビナントの cPLA<sub>2</sub> を用いる場合は、VI-13 で精製してきた cPLA<sub>2</sub> とライセートを反応させた。この場合は、反応後イムノブロットングにより解析した。これらの反応における caspase 阻害剤 (Ac-YVAD-CHO、Ac-DEVD-CHO) の効果を調べる際には、反応液中に阻害剤を存在させ反応を行った。

## VI-15 caspase 活性測定

アポトーシス細胞中の caspase-1、caspase-3 活性は、それぞれに対する蛍光基質を用いて測定した。抗 Fas 抗体処理によりアポトーシスを誘導させた U937 細胞  $1 \times 10^7$  個を

経時的に回収し、抽出バッファー (50 mM PIPES (pH 7.0)、50 mM KCl、5 mM EGTA、2 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、20 μM cytochalasin B、1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride、1 μg/ml leupeptin、1 μg/ml pepstatin A、50 μg/ml antipain、10 μg/ml chymostatin) に懸濁後、凍結させた。凍結と解凍を2回繰り返した。36 μg タンパク分を500 μl の反応バッファー (100 mM HEPES (pH 7.5)、10 % sucrose、0.1 % 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate、10 mM DTT、0.1 mg/ml ovalbumin) に加え、1 μM の蛍光基質 (caspase-1 用 Mca-YVADAPK(Dnp)-OH、caspase-3 用 Mca-DEVDAPK(Dnp)-OH) と 30 °C で 30 分間反応させた。励起波長 325 nm、測定波長 392 nm で蛍光を測定することで、切断された基質の割合を求めた。

## VI-16 変異 cPLA<sub>2</sub> の作製

### VI-16-1 cPLA<sub>2</sub> (D522N) の作製

マウス cPLA<sub>2</sub> の 522 番目のアミノ酸をアスパラギン酸からアスパラギンに変異させた cPLA<sub>2</sub> (D522N) は、QuikChange™ site-directed mutagenesis キット (Stratagene) を用いて作製した。このキットを用いて 522 番目のコドンが GTC から GTT に変えた。pBK-CMV (Stratagene) ベクターに EcoRI サイトでサブクローニングされたマウス cPLA<sub>2</sub> cDNA に、変異を下線部に導入したセンス、アンチセンスの両合成オリゴマー (5'-C CTT CGA TGA CGA GCT CAA CGC AGC GGT AGC AG-3'、5'-C TGC TAC CGC TGC GTT GAG CTC GTC ATC GAA GG-3') をアニールさせ、*pfu* DNA ポリメラーゼにより、伸長反応を行うサイクル反応を 12 回行った。鋳型になったプラスミドを除くため、メチル化部位を認識する制限酵素 Dpn I で 37 °C、1 時間処理した。変異が導入されたプラスミドを大腸菌 XL1-blue supercompetent cell (Stratagene) にトランスフェクションし、トランスフォーマントを得た。トランスフォーマントからプラスミドを調製し、シークエンスを



Taq cycle sequencing kit (Takara) を用いたダイデオキシ法により、自動蛍光シーケンサー DSQ-1000L (Shimadzu) で決定し、変異の導入を確認した。

#### VI-16-2 cPLA<sub>2</sub> (1-522) の作製

523 番目を終止コドンにかえたプライマー (5'-TC AGT CGA GCT CGT CAT CGA A-3') と cPLA<sub>2</sub> の N 末端のプライマー (5'-ATG TCA TTT ATA GAT CCT TAC-3') で VI-16-1 で用いたベクターを鋳型に ex Taq ポリメラーゼ (Takara) で PCR 反応を行った。増幅されたおよそ 1600 bp の断片を pCR<sup>TM</sup>3.1 ベクター (Invitrogen) にライゲーションした。ライゲーション反応終了後、大腸菌 Top10F<sup>+</sup> supercompetent cell (Invitrogen) にトランスフェクションした。トランスフォーマントからプラスミドを調製し、制限酵素 Eco RI 処理により正しい長さのインサートの存在を確認した。さらに、VI-16-1 の方法を用いてシーケンスの確認も行った。

#### VI-17 293 細胞へのトランスフェクション

293 細胞へ cPLA<sub>2</sub> のインタクトあるいは変異体の cDNA は LipofectAMINE PLUS reagent (Gibco BRL) を用いてトランスフェクションした。VI-16 で作製したプラスミドを CsCl<sub>2</sub> 超遠心により精製し、そのうち 4 µg を 250 µl の Opti-MEM (Gibco BRL) に加え、8 µl の plus reagent と室温で 15 分間反応させた。反応液にさらに 250 µl の Opti-MEM と 12 µl のリポフェクトアミンを加え、室温で 15 分間反応させた。この反応液を 6 cm シャーレに  $1 \times 10^5$  cells/ml で 3 日間培養した 293 細胞に加えた。3 時間後に RPMI1640 培地に交換し、さらに 48 時間、37 °C で CO<sub>2</sub> インキュベーター中で培養を続けた。48 時間後に細胞を回収し、酵素活性の測定およびイムノプロテイングを行った。

## VI-18 トランスフォーマント 293 細胞の作製

高発現させたいタンパクの cDNA を含むプラスミド 2  $\mu\text{g}$  と 200  $\mu\text{l}$  の Opti-MEM の混液を Cellfectin (Gibco BRL) 5  $\mu\text{l}$  と 200  $\mu\text{l}$  の Opti-MEM の混液に混ぜ合わせ、30 分間室温で反応させた。3 cm シャーレにコンフルントまで培養させた 293 細胞を Opti-MEM で洗い、さらに先ほどの反応液を Opti-MEM 中にゆっくりと加えた。6 時間後に RPMI1640 培地に交換し、さらに 24 時間後にもう一度培地を交換した。培地交換から 48 時間後に、細胞を  $2 \times 10^3$  cells/100  $\mu\text{l}$ /well で 96 穴プレートに継代した。この時に培地に 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で G418 (Gibco BRL) を加えた。単一コロニーが観察された穴から細胞を回収し、12 穴プレートに継代した。個々の穴から RNA を TriZOL (Gibco BRL) を用いて調製し、ノーザンブロッティングを行った。プローブとして別途調製したマウス cPLA<sub>2</sub> の N 末端断片を klenow fragment を用いた Random primer DNA labelling kit ver. 2.0 (Takara) により <sup>32</sup>P 標識したものを用いた。mRNA の発現が高かった株はさらに、イムノブロッティングや活性測定などを行い、高発現株を得た。

## VI-19 IIA 型 sPLA<sub>2</sub> の調製

### VI-19-1 ラット IIA 型 sPLA<sub>2</sub> の調製

ラット IIA 型 sPLA<sub>2</sub> はラット血小板より精製した。ラット 100 匹から血小板を調製し、1 M NaCl 存在下で超音波破碎した。このライセートを 100,000  $\times$  g、1 時間超遠心して得られた上清を、抗ラット IIA 型 sPLA<sub>2</sub> ポリクローナル抗体を結合させた抗体カラムにアプライさせた。吸着画分は pH 2.0 のグリシンバッファーを用いて溶出した。直ちに中和後活性を測定し、IIA 型 sPLA<sub>2</sub> 存在画分を確認し、IIA 型 sPLA<sub>2</sub> を得た。

#### VI-19-2 マウスIIA 型 sPLA<sub>2</sub> およびその変異体 KE4 の調製

Sf9 細胞に cDNA を組み込んだベクターを感染し、発現させることで培養液に分泌されたリコンビナント酵素は、ヘパリンセファロース (Pharmacia) に吸着させて精製した後、抗マウスIIA 型 sPLA<sub>2</sub> 抗体を結合させた抗体カラムを用いて更に精製した。

#### VI-20 タンパク定量

BCA プロテインアッセイキット (Pierce) で BSA を用いて検量線を描き、試料のタンパク量を求めた。



## VII 参考文献

1. Takenawa, T. (1996) *Jikkenigaku* **14**, 1909-1910
2. Moolenaar, W. H. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 12949-12952
3. Hanahan, D. J. (1986) *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 483-509
4. Shimizu, T. and Wolf, L. S. (1990) *J. Neurochem.* **55**, 1-15
5. Hannun, Y. A., Loomis, C. R. and Bell, R. M. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 10039-10043
6. Hannun, Y. A., Loomis, C. R. and Bell, R. M. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 7184-7190
7. Liscovitch, M. and Cantley, L. C. (1995) *Cell* **81**, 659-662
8. Fukami, K., Endo, T., Imamura, M., and Takenawa, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 1518-1522
9. Field, M. C. and Menon, A. K. (1993) In *Lipid Modification of Proteins* (schlesinger, M. J. ed.) CRC Press, 88-134
10. Testi, R. (1996) *Trends Biochem. Sci.* **21**, 468-471
11. Ballou, L. R., Laulederkind, S. J. F., Rosloniec, E. F., and Raghov, R. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1301**, 273-287
12. Hannun, Y. A. and Obeid, L. M. (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20**, 73-77
13. Liscovitch, M. and Cantley, L. C. (1994) *Cell* **77**, 329-334
14. Horinouchi, K., Erlich, S., Perl, D. P., Ferlinz, K., Bisgaier, C. L., Sandhoff, K., Desnick, R. J., Stewart, C. L., and Schuchman, E. H. (1995) *Nature Genetics* **10**, 288-293
15. Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H., and Inoue, K. (1994) *Nature* **370**, 216-218
16. Keer, J. F. R., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972) *Brit. J. Cancer* **26**, 239-257
17. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998) *Nature* **391**, 43-50
18. Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998) *Nature* **391**, 96-99
19. Cohen, G. M. (1997) *Biochem. J.* **326**, 1-16
20. Nicholson, D. W., and Thornberry, N. A. (1997) *Trends Biochem. Sci.* **22**, 299-306

21. Villa, P., Kaufmann, S. H., and Earnshaw, W. C. (1997) *Trends Biochem. Sci.* **22**, 388-393
22. Miura, M., Zhu, H., Rorello, R., Hartwig, E. A. and Yuan, J. (1993) *Cell* **75**, 653-660
23. Yonehara, S., Ishii, A., and Yonehara, M. (1989) *J. Exp. Med.* **169**, 1747-1756
24. Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Sato, Y., and Nagata, S. (1991) *Cell* **66**, 233-243
25. Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., and Nagata, S. (1993) *Cell* **75**, 1169-1178
26. Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., and Henson, P. M. (1992) *J. Immunol.* **148**, 2207-2216
27. Fadok, V. A., Savill, J. S., Haslett, C., Bratton, D. L., Doherty, D. E., Campbell, P. A., and Henson, P. M. (1992) *J. Immunol.* **149**, 4029-4035
28. Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P. M., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C. A. A., LaFace, D. M., and Green, D. R. (1995) *J. Exp. Med.* **182**, 1545-1556
29. Verhoven, B., Schlegel, R. A., and Williamson, P. (1995) *J. Exp. Med.* **182**, 1597-1601
30. Martin, S. J., Finucane, D. M., Amarante-mendes, G. P., O'Brien, G. A. and Green, D. R. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 28753-28756
31. Hampton, M. B., Vanags, D. M., Porn-Ares, M. I., and Orrenius, S. (1996) *FEBS Lett.* **399**, 277-282
32. Bratton, D. L., Fadok, V. A., Richter, D. A., Kailey, J. M., Guthrie, L. A., and Henson, P. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 26159-26165
33. Dole, V. P., and Meinertz, H. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 2595-2599
34. Nagata, S., and Golstein, P. (1995) *Science* **267**, 1449-1456
35. Baker, S. J., and Reddy, E. P. (1996) *Oncogene* **12**, 1-9
36. Strasser, A., and O'Connor, L. (1998) *Nature Med.* **4**, 21-22
37. Kobayashi, N., Hamano, Y., Yamamoto, N., Ishi, A., Yonehara, M., and Yonehara, S. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9620-9624



38. Kizaki, H., Tadakuma, T., Odaka, C., Muramatsu, J., and Ishimura, Y. (1989) *J. Immunol.* **143**, 1790-1794
39. Takayama, K., Kudo, I., Kim, D. K., Nagata, K., Nozawa, Y., and Inoue, K. (1991) *FEBS Lett.* **282**, 326-330
40. Kramer, R. M. and Sharp, J. D. (1997) *FEBS Lett.* **410**, 49-53
41. Leslie, C. C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 16709-16712
42. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-918
43. Balsinde, J., and Dennis, E. A. (1996) *Eur. J. Biochem.* **235**, 480-485
44. Pena, L. A., Fuks, Z., and Kolensnick, R. (1997) *Biochem. Pharm.* **53**, 615-621
45. Ariga, T., Jarvis, W. D., and Yu, R. K. (1998) *J. Lipid Res.* **39**, 1-16
46. Sillence, D. J., and Allan, D. (1997) *Biochem. J.* **324**, 29-32
47. Nakagawa, Y., Waku, K., Hirose, A., Kawashima, Y., and Kozuka, H. (1986) *Lipids* **21**, 634-638
48. Hill, E. E., Husbands, D. R., and Lands, W. E. M. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 4440-4451
49. Murakami, M., Nakatani, Y., Atsumi, G., Inoue, K., and Kudo, I. (1997) *Clinical Reviews in Immunology* **17**, 225-283
50. Kudo, I., Murakami, M., Hara, S., and Inoue, K. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1170**, 217-231
51. Dennis, E. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 13057-13060
52. Dennis, E. A. (1997) *Trends Biochem. Sci.* **22**, 1-2
53. Tischfield, J. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 17247-17250
54. Ishizaki, J., Hanasaki, K., Higashino, K., Kishino, J., Kikuchi, N., Ohara, O., and Arita, H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 5897-5904
55. Higashino, K., Ishizaki, J., Kishino, J., Ohara, O., and Arita, H. (1994) *Eur. J. Biochem.* **225**, 375-382
56. Lambeau, G., Ancian, P., Barhanin, J., and Lazdunski, M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**,

57. Ancian, P., Lambeau, G., Mattei, M-G., and Lazdunski, M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 8963-8970
58. Hanasaki, K., Yokota, Y., Ishizaki, J., Itoh, T., and Arita, H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 32792-32797
59. Arita, H., Hanasaki, K., Nakano, T., Oka, S., Teraoka, H., and Matsumoto, K. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 19139-19141
60. Tohkin, M., Kishino, J., Ishizaki, J., and Arita, H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 2865-2871
61. Kishino, J., Ohara, O., Nomura, K., Kramer, R. M., and Arita, H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 5092-5098
62. Chen, J., Engle, S. J., Seilhamer, J. J., and Tischfield, J. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 23018-23024
63. Chen, J., Shao, C., Lazar, V., Srivastava, C. H., Lee, W-H., Tischfield, J. A. (1997) *J. Cell. Biochem.* **64**, 369-375
64. Chen, J., Engle, S. J., Seilhamer, J. J., and Tischfield, J. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 2365-2368
65. Chen, J., Engle, S. J., Seilhamer, J. J., and Tischfield, J. A. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1215**, 115-120
66. Reddy, S. T., Winstead, M. V., Tischfield, J. A., and Herschman, H. R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 13591-13596
67. Balboa, M. A., Balsinde, J., Winstead, M.V., Tischfield, J. A., and Dennis, E. A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 32381-32384
68. Cupillard, L., Koumanov, K., Mattei, M.-G., Lazdunski, M., and Lambeau, G. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 15745-15752
69. Verheji, H. M., Slotboom, A. J., and de Haas, G. H. (1981) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **91**, 92-203

70. Ackermann, E. J., and Dennis, E. A. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1259**, 125-136
71. Balsinde, J., and Dennis, E. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 16069-16072
72. Ackermann, E. J., Kempner, E. S., and Dennis, E. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 9227-9233
73. Tang, J., Kriz, R. N., Wolfman, N., Shaffer, M., Seehra, J., and Jones, S.S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 8567-8575
74. Balboa, M. A., Balsinde, J., Jones, S. S., and Dennis, E. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 8576-8580
75. Ma, Z., Ramanadham, S., Kempe, K., Chi, X. S., Ladenson, J., and Turk, J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 11118-11127
76. Larsson, P. K. A., Claesson, H-E., and Kennedy, B. P. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 207-214
77. Ackermann, E. J., Conde-Frieboes, K., and Dennis, E. A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 445-450
78. Balsinde, J., Balboa, M. A., and Dennis, E. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 29317-29321
79. Stafforini, D. M., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., and Prescott, S. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 17895-17898
80. Hattori, M., Hattori, K., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H., and Inoue, K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 22308-22313
81. Riendeau, D., Guay, J., Weech, P. K., Laliberte, F., Yergey, J., Li, C., Desmarais, S., Perrier, H., Liu, S., Nicoll-Griffith, D., and Street, I. P. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 15619-15624
82. Verlinde, C. L. M. J., and Dijkstra, B. W. (1995) *Nature Struct. Biology* **2**, 429-432
83. Schevitz, R. W., Bach, N. J., Carlson, D. G., Chirgadze, N. Y., Clawson, D. K., Dillard, R. D., Draheim, S. E., Hartley, L. W., Jones, N. D., Mihelich, E. D., Olkowski, J. L., Snyder, D. W., Sommers, C., and Wery, J.-P. (1995) *Nature Struct. Biology* **2**, 458-465



84. Fleisch, J. H., Armstrong, C. T., Roman, C. R., Mihelich, E. D., Spaethe, S. M., Jackson, W. T., Bobbitt, J. L., Draheim, S., Bach, N. J., Dillard, R. D., Martinelli, M., Fouts, R., and Snyder, D. W. (1996) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **278**, 252-257
85. Bolwerk, J. J., Pieterse, W. A., and de Hass, G. H. (1974) *Biochemistry* **13**, 1446-1454
86. Tanaka, K., Matsutani, S., Matsumoto, K., and Yoshida, T. (1995) *Eur. J. Pharmacol.* **279**, 143-148
87. Lio, Y.-C., Reynolds, L. J., Balsinde, J., and Dennis, E. A. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1302**, 55-60
88. Teslenko, V., Rogers, M., and Lefkowitz, J. B. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1344**, 189-199
89. Hullin-Matsuda, F., Tsujishita, Y., and Nishizuka, Y. (1997) *FEBS Lett.* **419**, 117-120
90. Waku, K. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1124**, 101-111
91. Miyazawa, S., Furuta, S., and Hashimoto, T. (1981) *Eur. J. Biochem.* **117**, 425-430
92. Yamada, J., Matsumoto, I., Furihata, T., Sakumura, M., and Suga, T. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **308**, 118-125
93. Broustas, C. G., and Hajra, A. K. (1995) *J. Neurochem.* **64**, 2345-2353
94. Svensson, L. T., Wilcke, M., and Alexson, S. E. H. (1995) *Eur. J. Biochem.* **230**, 813-820
95. Yamada, J., Furihata, T., Tamura, H., Watanabe, T., and Suga, T. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **326**, 106-114
96. Broustas, C. G., Larkins, L. K., Uhler, M. D., and Hajra, A. K. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 10470-10476
97. Engberg, S. T., Aoyama, T., Alexson, S. E. H., Hashimoto, T., and Svensson, L. T. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 525-531
98. Yamada, J., Furihata, T., Iida, N., Watanabe, T., Hosokawa, M., Satoh, T., Someya, A., Nagaoka, I., and Suga, T. (1997) *Biochem. J.* **232**, 198-203

99. Smith, S. (1994) *FASEB J.* **8**, 1248-1259
100. Liu, L. X., Margottin, F., Le Gall, S., Schwartz, O., Selig, L., Benarous, R., and Benichou, S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 13779-13785
101. Watanabe, H., Shiratori, T., Shoji, H., Miyataka, S., Okazaki, Y., Ikuta, K., Sato, T., and Saito, T. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**, 234-239
102. Suzuki, H., Kawarabayashi, Y., Kondo, J., Abe, T., Nishikawa, K., Kimura, S., Hashimoto, T., and Yamamoto, T. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 8681-8685
103. Fujino, T., and Yamamoto, T. (1992) *J. Biochem.* **111**, 197-203
104. Abe, T., Fujino, T., Fukuyama, R., Minoshima, S., Shimizu, N., Toh, H., Suzuki, H., and Yamamoto, T. (1992) *J. Biochem.* **111**, 123-128
105. Schaffer, J. E., and Lodish, H. F. (1994) *Cell* **79**, 427-436
106. Saunders, C., Voigt, J. M., and Weis, M. T. (1996) *Biochem. J.* **313**, 849-853
107. Weis, M. T., and Bercute, A. (1997) *Biochem. J.* **322**, 649-654
108. Wilson, D. B., Prescott, S. M., and Majerus, P. W. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 3510-3512
109. Neufeld, E. J., Bross, T. E., and Majerus, P. W. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 1986-1992
110. Laposata, M., Reich, E. L., and Majerus, P. W. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 11016-11020
111. Black, P. N., Zhang, Q., Weimar, J. D., and Dirusso, C. C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 4896-4903
112. Sugiura, T., Kudo, N., Ojima, T., Mabuchi-Itoh, K., Yamashita, A., and Waku, K. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1255**, 167-176
113. Faergeman, N. J., and Knudsen, J. (1997) *Biochem. J.* **323**, 1-12
114. Juguelin, H., and Cassagne, C. (1984) *Anal. Biochem.* **142**, 329-335
115. Taylor, D. C., Weber, N., Hogge, L. R., and Underhill, E. W. (1990) *Biochemistry* **184**, 311-316
116. Maneta-Peyret, L., Sturbois-Balcerzak, B., Cassagne, C., and Moreau, P. (1998)

117. Tomoda, H., Igarashi, K., Cyong, J.-C., and Omura, S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 4214-4219
118. Pizer, E. S., Jackisch, C., Wood, F. D., Pasternack, G. R., Davidson, N. E., and Kuhajda, F. P. (1996) *Cancer Res.* **56**, 2745-2747
119. Deka, N., Sun, G. Y., and MacQuarrie, R. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 554-563
120. Sanjanwala, M., Sun, G. Y., Cutrera, M. A., and MacQuarrie, R. A. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* **265**, 476-483
121. Bakken, A. M., and Farstad, M. (1992) *Biochem. J.* **288**, 763-770
122. Greene, L. A., and Tischler, A. S. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 2424-2428
123. Rukenstein, A., Rydel, R. E., and Greene, L. A. (1991) *J. Neurosci.* **11**, 2552-2563
124. Batistatou, A., and Greene, L. A. (1991) *J. Cell Biol.* **115**, 461-471
125. Ito, A., and Horigome, K. (1995) *J. Neurochem.* **65**, 463-466
126. Jackowski, S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 20219-20222
127. Cui, Z., Houweling, M., Chen, M. H., Record, M., Chap, H., Vance, D. E., and Terce, F. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 14668-14671
128. Singh, J. K., Dasgupta, A., Adayev, T., Shahmehdi, S. A., Hammond, D., and Banerjee, P. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1304**, 171-178
129. Chilton, F. H., Surette, M. E., and Winkler, J. D. (1996) Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators 2 edited by Nigam et al. 169-172
130. Winkler, J. D., Eris, T., Sung, C.-M., Chabot-Fletcher, M., Mayer, R. J., surette, M. E., and Chilton, F. H. (1996) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **279**, 956-966
131. Surette, M. E., Winkler, J. D., Fonteh, A. N., and Chilton, F. H. (1996) *Biochemistry* **35**, 9187-9196
132. Mollinedo, F., Fernandez-Luna, J. L., Gajata, C., Martin-Martin, B., Benito, A.,



- Martinez-Dalmau, R., and Mosolell, M. (1997) *Cancer Res.* **57**, 1320-1328
133. Hatzelmann, A., Haurand, M., and Ullrich, V. (1990) *Biochem. Pharmacol.* **39**, 559-567
134. Brown, M. L., Clark, C. A., Vaillancourt, R., and Deykin, D. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1165**, 239-247
135. Sharp, J. D., Pickard, R. T., Chiou, X. G., Manetta, J. D., Kovacevic, S., Miller, J. R., Varshavsky, A. D., Roberts, E. F., Striffler, B. A., Brems, D. N., and Kramer, R. M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 23250-23254
136. Pickard, R. T., Chiou, X. G., Striffler, B. A., DeFelippis, M. R., hyslop, P. A., Tebbe, A. L., Yee, Y. K., reynolds, L. J., Dennis, E. A., Kramer, R. M., and Sharp, J. D. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 19925-19231
137. Siezen, R. J., de Vos, W. M., Leunissen, J. A., and Dijkstra, B. W. (1991) *Protein Eng.* **4**, 19-37
138. Gresham, A., Masferrer, J., Chen, X., Leal-Khoury, S., and pentland, A. P. (1996) *Am. J. Physiol.* **270**, C1037-C1050
139. Chen, X., Gresham, A., Morrison, A., and Pentland, A. P. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1299**, 23-33
140. Rao, G. N., Runge, M. S., and Alexander, R. W. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1265**, 67-72
141. Sapirstein, A., Spech, R. A., Witzgall, R., and Bonventre, J. V. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 21505-21513
142. Clark, J. D., Schievella, A. R., Nalefski, E. A., and Lin, L.-L. (1995) *J. Lipid Media. Cell Sig.* **12**, 83-117
143. 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
144. Nalefski, E. A., Sultzman, L. A., Martin, D. M., Kriz, R. W., Towler, P. S., Knopf, J. L., and Clark, J. D. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 18239-18249

145. Schievella, A. R., Regier, M. K., Smith, W. L., and Lin, L.-L. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 30749-30754
146. Glover, S., Bayburt, T., Jones, M., Chi, E., and Gelb, M. H. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 15359-15367
147. Sierra-Honigmann, M. R., Bradley, J. R., and Pober, J. S. (1996) *Lab. Invest.* **74**, 684-695
148. de Carvalho, M. G. S., McCormack, A. L., Olson, E., Ghomashchi, F., Gelb, M. H., Yates III, J. R., and Leslie, C. C. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 6987-6997
149. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. (1995) *Cell* **81**, 505-512
150. Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D. V. (1995) *Cell* **81**, 495-504
151. Boldin, N. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., and Wallach, D. (1996) *Cell* **85**, 803-815
152. Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Dixit, V. M. (1996) *Cell* **85**, 817-827
153. Sarin, A., Wu, M. L., and Henkart, P. A. (1996) *J. Exp. Med.* **184**, 2445-2450
154. Talanian, R. V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M. C., Mankovich, J. A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K. D., and Wong, W. W. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 9677-9682
155. Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T., and Nicholson, D. W. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 17907-17911
156. Kaufmann, S. H. (1989) *Cancer Res.* **49**, 5870-5878
157. Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E., and Poirier, G. G. (1993) *Cancer Res.* **53**, 3976-3985
158. Mashima, T., Naito, M., Fujita, N., Noguchi, K., and Tsuruo, T. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**, 1185-1192

159. Martins, L. M., Kottke, T., Mesner, P. W., Basi, G. S., Sinha, S., Frigon, Jr. N., Tatar, E., Tung, J. S., Bryant, K., Takahashi, A., Svingen, P. A., Madden, B. J., McCormick, D. J., Earnshaw, W. C., and Kaufmann, S. H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 7421-7430
160. Herr, I., Wilhelm, D., Bohler, T., Angel, P., and Debatin, K.-M. (1997) *EMBO J.* **16**, 6200-6208
161. Dubrez, L., Savoy, I., Hamman, A., and Solary, E. (1996) *EMBO J.* **15**, 5504-5512
162. Tracey, K. J., and Cerami, A. (1993) *Ann. Rev. Cell Biol.* **9**, 317-343
163. Gruss, H. J., and Dower, S. K. (1995) *Blood* **85**, 3378-3404
164. Baker, S. J., and Reddy, E. P. (1996) *Oncogene* **12**, 1-9
165. Boldin, M. P., Mett, I. L., Varfolomeev, E. E., Chumakov, I., Shemer-Avni, Y., Camonis, J. H., and Wallach, D. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 387-391
166. Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., and Goeddel, D. V. (1994) *Cell* **78**, 681-692
167. Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M., and Goeddel, D. V. (1995) *Science* **269**, 1424-1427
168. Lee, S. Y., Reichlin, A., Santana, A., Sokol, K. A., Nussenzweig, M. C., and Choi, Y. (1997) *Immunity* **7**, 703-713
169. Arai, K., Lee, F., Miyajima, A., Arai, N., and Yokota, T. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 783-836
170. Miyajima, A., Kitamura, T., Harada, N., Yokota, T., and Arai, K. (1992) *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 295-331
171. Ihle, J. N. (1995) *Nature* **377**, 591-594
172. Mckori, Y. A., Oh, C. K., and Metcalfe, D. D. (1993) *J. Immunol.* **151**, 3775-3784
173. Schwartz, L. M., and Osborne, B. A. (1993) *Immunol. Today* **14**, 582-590
174. Vasilakos, J. P., Ghayur, T., Carroll, R. T., Giegel, D. A., and saunders, J. M. (1995) *J. Immunol.* **155**, 3433-3442
175. Ohta, T., Kinoshita, T., Naito, M., Nozaki, T., Matsutani, M., Tsuruo, T., and Miyajima, A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 23111-23116



176. Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A., and Dingwall, C. (1991) *Cell* **64**, 615-623
177. Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Madore, S., and Cullen, B. R. (1995) *Cell* **82**, 485-494
178. Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattaj, I. W., and Luhrmann, R. (1995) *Cell* **82**, 475-483
179. Hayakawa, M., Ishida, N., Takeuchi, K., Shibamoto, S., Hori, T., Oku, N., Ito, F., and Tsujimoto, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 11290-11295
180. Jayadev, S., Hayter, H. L., Andrieu, N., Gamard, C. J., Liu, B., Balu, R., Hayakawa, M., Ito, F., and Hannun, Y. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 17196-17203
181. Voelkel-Johnson, C., Thorne, T. E., and Laster, S. M. (1996) *J. Immunol.* **156**, 201-207
182. MacEwan, D. J. (1996) *FEBS Lett.* **379**, 77-81
183. Voelkel-Johnson, C., Entingh, A. J., Wold, W. S. M., Gooding, L. R., and Laster, S. M. (1995) *J. Immunol.* **154**, 1707-1716
184. Wissing, D., Mouritzen, H., Egeblad, M., Poirier, G. G., and Jaattela, M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5073-5077
185. Enari, M., Hug, H., Hayakawa, M., Ito, F., Nishimura, Y., and Nagata, S. (1996) *Eur. J. Biochem.* **236**, 533-538
186. Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G., and Earnshaw, W. C. (1994) *Nature* **371**, 346-347
187. Leist, M., Single, B., Kunstle, G., Volbracht, C., Hentze, H., and Nicotera, P. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 518-522
188. Song, Q., Lees-Miller, S. P., Kumar, S., Zhang, N., Chan, D. W., Smith, G. C. M., Jackson, S. P., Alnemri, E. S., Litwack, G., Khanna, K. K., and Lavin, M. F. (1996) *EMBO J.* **15**, 3238-3246
189. Janicke, R. U., Walker, P. A., Lin, X. Y., and Porter, A. G. (1996) *EMBO J.* **15**, 6969-6978
190. Dou, Q. P., An, B., Antoku, K., and Johnson, D. E. (1997) *J. Cell. Biochem.* **64**,

191. Ghayur, T., Hugunin, M., Talanian, R. V., Ratnofsky, S., Quinlan, C., Emoto, Y., Pandey, P., Datta, R., Huang, Y., Kharbanda, S., Allen, H., Kamen, R., Wong, W., and Kufe, D. (1996) *J. Exp. Med.* **184**, 2399-2404
192. Cardone, M. H., Salvesen, G. S., Widmann, C., Johnson, G., and Frisch, S. M. (1997) *Cell* **90**, 315-323
193. Squier, M. K. T., Miller, A. C. K., Malkinson, A. M., and Cohen, J. J. (1994) *J. Cell. Phys.* **159**, 229-237
194. Rudel, T., and Bokoch, G. M. (1997) *Science* **276**, 1571-1574
195. Wang, X., Pai, J.-T., Wiedenfeld, E. A., Medina, J. C., Slaughter, C. A., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18044-18050
196. Wang, X., Zelenaki, N. G., Yang, J., Sakai, J., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1996) *EMBO J.* **15**, 1012-1020
197. Martin, S. J., O'Brien, G. A., Nishioka, W. K., McGahon, A. J., Mahboubi, A., Saido, T. C., and Green, D. R. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 6425-6428
198. Vanaga, D. M., Porn-Ares, M. I., Coppola, S., Burgess, D. H., and Orrenius, S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 31075-31085
199. Cryns, V. L., Bergeron, L., Zhu, H., Li, H., and Yuan, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 31277-31282
200. Oberhammer, F. A., Hochegger, K., Froschl, G., Tiefenbacher, R., and Pavelka, M. (1994) *J. Cell Biol.* **126**, 827-837
201. Zhivotovsky, B., Gahm, A., and Orrenius, S. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 96-101
202. Rao, L., Perez, D., and White, E. (1996) *J. Cell Biol.* **135**, 1441-1455
203. Pruzanski, W., and Vadas, P. (1991) *Immunol. Today* **12**, 143-146
204. Murakami, M., Kudo, I., and Inoue, K. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 839-844

205. Suga, H., Murakami, M., Kudo, I., and Inoue, K. (1993) *Eur. J. Biochem.* **218**, 807-813
206. Pfeilschifter, J., Schalkwijk, C., Briner, V. A., and van den Bosch, H. (1993) *J. Clin. Invest.* **92**, 2516-2523
207. Barbour, S. E., and Dennis, E. A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 21875-21882
208. Balsinde, J., Barbour, S. E., Bianco, I. D., and Dennis, E. A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11060-11064
209. Balsinde, J., and Dennis, E. A. *J. Biol. Chem.* **271**, 6758-6765
210. Murakami, M., Nakatani, Y., and Kudo, I. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 30041-30051
211. Hara, S., Kudo, I., Komatani, T., Takahashi, K., Nakatani, Y., Natori, Y., Ohshima, M., and Inoue, K. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1257**, 11-17
212. Hara, S., Kudo, I., and Inoue, K. (1991) *J. Biochem.* **110**, 163-165
213. Murakami, M., Kudo, I., and Inoue, K. (1991) *FEBS Lett.* **294**, 247-251
214. Fourcade, O., Simon, M.-F., Viode, C., Rugani, N., Leballe, F., Ragab, A., Fournie, B., Sarda, L., and Chap, H. (1995) *Cell* **80**, 919-927
215. Levi-Montalcini, R., Toso, R. D., della Valle, F., Skaper, S. D., and Leon, A. (1995) *J. Neuro. Sci.* **130**, 119-127
216. Murakami, M., Kudo, I., and Inoue, K. (1995) *J. Lipid Med. Cell Sig.* **12**, 119-130
217. Atsumi, G.-I., Murakami, M., Tajima, M., Shimbara, S., Hara, N., and Kudo, I. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1349**, 43-54
218. Kuwata, H., Nakatani, Y., Murakami, M., and Kudo, I. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 1733-1740
219. Petit, P. X., Susin, S.-A., Zamzami, N., Mignotte, B., and Kroemer, G. (1996) *FEBS Lett.* **396**, 7-13
220. Skulachev, V. P. (1996) *FEBS Lett.* **397**, 7-10
221. Henkart, P. A., and Grinstein, S. (1996) *J. Exp. Med.* **183**, 1293-1295
222. Uozumi, N., Kume, K., Nagase, T., Nakatani, N., Ishii, S., Tashiro, F., Komagata, Y.,



- Maki, K., Ikuta, K., Ouchi, Y., Miyazaki, J.-I., and Shimizu, T. (1997) *Nature* **390**, 618-622
223. Bonventre, J. V., Huang, Z., Taheri, M. R., O'Leary, E., Li, E., Moskowitz, M. A., and Sapirstein, A. (1997) *Nature* **390**, 622-625
224. Tsujii, M., and DuBois, R. N. (1995) *Cell* **83**, 493-501
225. Tang, D. G., Chen, Y. Q., and Honn, K. V. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5241-5246
226. Ballif, B. A., Mincek, N. V., Barratt, J. T., Wilson, M. L., and Simmons, D. L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5544-5549
227. Korystov, Y. N., Dobrovinskaya, O. R., Shaposhnikova, V. V., and Eidus, L. K. (1996) *FEBS Lett.* **388**, 238-241
228. Wang, H., Harrison-Shostak, D. C., Lemasters, J. J., and Herman, B. (1996) *FASEB J.* **10**, 1318-1325
229. Dan, P., Nitzan, D. W., Dagan, A., Ginsburg, I., and Yedgar, S. (1996) *FEBS Lett.* **383**, 75-78
230. Kolko, M., DeCoster, M. A., de Turco, E. B. R., and Bazan, N. G. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 32722-32728

## 謝辞

会社勤めを半年で断念し、途方に暮れていた私を温かくむかい入れてくださり、本研究を行う機会を与えて下さった東京大学薬学部井上圭三教授に心から感謝いたします。先生の様々な御助言や御指導がなかったら、今の私は無かったと考えています。

また、本研究は終始にわたり、昭和大学薬学部工藤一郎教授のもとで行なわれました。先生にとってはできの悪い生徒でありましたが、先生の親切な御指導により何とかここまでたどり着けました。本当に感謝いたします。

東京大学時代には、新井洋由先生や梅田真郷先生には大変お世話になりました。ありがとうございました。

また、昭和大学薬学部村上誠助教授には実際の実験の指導や研究の方針について数えきれないほど、お世話になり御迷惑をおかけしました。感謝すると共におわびいたします。

東京大学で出会った諸先輩方や同じ空間で同じときを過ごした衛生化学裁判化学教室の皆さまからは、大変多くの目には見えない貴重なものを頂きました。感謝します。また、皆さまの御活躍を心からお祈りいたします。

昭和大学においては、7年の長きにわたり東京大学時代からお世話になっている中谷良人先生を始め新原智子先生、桑田浩先生に感謝いたします。さらに、本研究は田島勝恵さん、山川清美さん、後藤奈緒美さん、和田宏美さん、西村一美さん、波多野敦義さんの協力なくしてはできなかったものです。皆さまの社会での活躍を楽しみにしつつ感謝いたします。また、研究環境をよくすることに協力していただいた衛生化学教室の皆さまにも感謝します。

岡山大学薬学部早津彦哉教授は、私に研究とは何かを指し示し、さらに方向性を付けて下さりました。大変感謝しております。また、岡山大学薬学部綿矢有佑教授、岡山大学遺伝子実験施設根岸和雄助教授、岡山大学薬学部根岸友恵助教授、有元佐賀恵先生を始めとした岡山大学薬学部薬品化学教室の皆さまに感謝いたします。

cPLA<sub>2</sub> 遺伝子を御供与下さった辻本雅文博士、cPLA<sub>2</sub> 抗体を御供与下さった Clark 博士、IIA 型 sPLA<sub>2</sub> 阻害剤 LY311727 を御供与下さった Kramer 博士に感謝いたします。

長かった学生生活を経済的や精神的に支えてくれた、父、勇二、母、明美、弟夫婦の良助と朱海、祖母の久保静江に感謝いたします。

研究に対しての姿勢や考え方がまるで赤ん坊のようであった 7 年前の私は、ようやく幼稚園の年長さんぐらいになりました。これはひとえに私の周りにいた皆さまのおかげです。心から感謝いたします。また、まだ道のりは続いていきます。皆さまの期待に答えることができるように驕ることなく常に前を向いて歩んでいこうと考えています。



## 論文の内容の要旨

論文題目 アポトーシス細胞におけるグリセロリン脂質  
脱アシル化・再アシル化酵素群の解析

氏名 厚味 徹一

【序】アポトーシスと呼ばれる細胞死は細胞への特定の刺激により誘導され、細胞小体の形成や核の凝集など細胞構造の大きな変化を伴うことから、生体膜構造の大きな変化が予想されるが、その生化学的な解析はほとんど行われていない。本研究ではアポトーシスに伴うグリセロリン脂質の変化及びそれに関わる代謝酵素群の変動について解析した。

### 【実験と結果】

(1) アポトーシスに伴うグリセロリン脂質代謝の亢進：放射標識アラキドン酸であらかじめ標識したヒト単核球系白血病細胞株 U937 細胞に抗 Fas 抗体処理でアポトーシスを誘導したところ、放射標識アラキドン酸含有ホスファチジルコリン及びホスファチジルエタノールアミンが有意に減少し、遊離アラキドン酸が有意に増加した。この遊離アラキドン酸の増加は抗 Fas 抗体処理時間および量依存的であり、アポトーシスの進行に相関していた。同様の実験を、放射標識グリセロールあるいは正リン酸であらかじめ標識した細胞を用いて行ったところ、アポトーシス誘導によるグリセロリン脂質組成に有意な差は観察されず、リゾリン脂質の蓄積もなかった。以上の結果は、①アポトーシスに伴いグリセロリン脂質の脱アシル化反応が亢進していること、②脱アシル化により生成したリゾリン脂質は再アシル化されグリセロリ

ン脂質に戻ることを示唆している。

(2) アポトーシスに伴う cPLA<sub>2</sub> の限定分解: 生体膜主要構成成分であるグリセロリン脂質 2 位のエステル結合を加水分解する酵素であるホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) は現在までに約 10 種類以上のサブタイプが同定されている。その中で、様々な細胞や臓器に普遍的に存在する細胞質ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) はアラキドン酸含有リン脂質に選択的に作用し、刺激に応じた細胞内カルシウム濃度上昇などにより活性化され細胞膜へ移行することから、アラキドン酸代謝開始に重要な役割を担うと考えられている。

(2-1) 発見: アポトーシスに伴う脱アシル化反応に cPLA<sub>2</sub> が関与する可能性を想定し解析した。しかし、U937 細胞中の cPLA<sub>2</sub> 活性は予想に反し、抗 Fas 抗体量依存的に減少した。また、アポトーシス細胞中の cPLA<sub>2</sub> タンパクを抗ヒト cPLA<sub>2</sub> ポリ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り調べたところ、みかけの分子量が 110 kDa のインタクトな cPLA<sub>2</sub> が消失し、78 kDa のタンパクが出現した。この現象はアポトーシスの進行(死細胞率の増加および DNA の断片化)に相関していた。また、抗ガン剤であるエトポシドにより U937 細胞にアポトーシスを誘導した場合、あるいはヒト前骨髄急性白血病細胞株 HL60 細胞に抗 Fas 抗体またはエトポシド処理でアポトーシスを誘導した場合にも同様の現象が観察された。

(2-2) 限定分解のメカニズム; in vitro transcription/translation 法で [<sup>35</sup>S] Met 標識 cPLA<sub>2</sub> を作製し、抗 Fas 抗体処理でアポトーシスを誘導した U937 細胞のライセートと反応させた。その結果 [<sup>35</sup>S] cPLA<sub>2</sub> のインタクトなバンドは細胞のライセート量あるいは反応時間依存的に減少し、78 kDa タンパクが生成した(図 1、左 2 列)。この変換はアポトーシスを誘導していない細胞のライセートでは観察されなかったことから、アポトーシスにより cPLA<sub>2</sub> を限定分解するプロテアーゼ活性が細胞に誘導されることが示唆された。

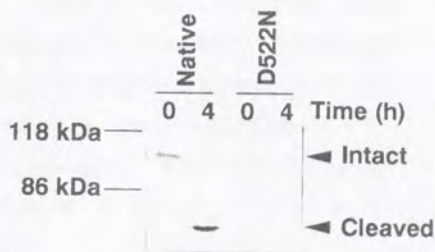


図 1 [<sup>35</sup>S] Met 標識 cPLA<sub>2</sub> を用いた  
限定分解検出系

アポトーシスの進行に伴い Caspase Family プロテアーゼが活性化される。 $^{35}\text{S}$  Met 標識 cPLA<sub>2</sub> を用いた限定分解検出系で種々検討した結果、Caspase-3 阻害剤が本反応を抑制した。そこで、細胞ライセート中の Caspase-3 活性を測定したところ、抗 Fas 抗体処理 3 時間後より時間依存的に上昇し、cPLA<sub>2</sub> 限定分解の経時変化とよく相関していた。さらに、cPLA<sub>2</sub> の 522 番目のアスパラギン酸周辺のアミノ酸配列に、これまで報告のある Caspase-3 が認識するコンセンサス配列の DXXD サイトが存在することに着目し、522 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに変えた cPLA<sub>2</sub> (D522N) を作製し、この変異 cPLA<sub>2</sub> がアポトーシスを誘導した U937 細胞ライセートにより、限定分解されるか否かを調べた。その結果、変異 cPLA<sub>2</sub> は限定分解されなかった (図 1、右 2 列)。また、523 番目を終止コドンにかえた cPLA<sub>2</sub> (1-522) を作製したところ、アポトーシスにより観察される 78 kDa の cPLA<sub>2</sub> 限定分解産物と同じ位置に泳動された。また、cPLA<sub>2</sub> (1-522) を細胞に発現させたところ cPLA<sub>2</sub> 活性は発現前と差が見られなかった。以上の結果より cPLA<sub>2</sub> 上の 522 番目のアスパラギン酸が Fas 依存的なアポトーシスに伴い活性化される Caspase-3 による分解部位であると結論した。また、興味深いことに cPLA<sub>2</sub> (1-522) は細胞質画分ではなく膜画分にすべて回収された。

(2-3) 限定分解の生物学的意義：ヒト胎児腎細胞株 293 細胞における内在性 cPLA<sub>2</sub> の発現は検出限界以下であった。この細胞にインタクトな cPLA<sub>2</sub> あるいは cPLA<sub>2</sub> (D522N) の遺伝子を導入し、恒常的に発現した細胞株を樹立した。これらの細胞の成長に有意な差は見られなかった。

(2-4) 限定分解部位の Asp<sup>522</sup> の新たな側面：インタクトな cPLA<sub>2</sub> と cPLA<sub>2</sub> (D522N) の細胞活性化に伴うアラキドン酸遊離反応の差異を調べた。その結果、インタクトな cPLA<sub>2</sub> が発現した細胞では予想通りカルシウムイオノフォアによる即時的刺激、または IL-1 と血清刺激による遅発的刺激の両方で有意なアラキドン酸遊離増強効果が観察されたが、cPLA<sub>2</sub> (D522N) を発現した細胞ではどちらの刺激においてもアラキドン酸遊離は親株と差がなかった。しかし、cPLA<sub>2</sub> (D522N) 発現細胞のライセート中の cPLA<sub>2</sub> 活性は親株と比べて有意に増加していた。この結果から、cPLA<sub>2</sub> の Asp<sup>522</sup> はアラキドン酸代謝過程での cPLA<sub>2</sub> 機能発現に重要な役割を担うことを示唆している。

### (3) アシル CoA 代謝関連酵素群の変動：

(3-1) 再アシル化酵素活性：(1) に示したようにアポトーシス細胞ではリゾリン脂質に再びアシル基が付加し、リン脂質に戻る再アシル化反応が亢進していると予想された (図 2A)。実際、再アシル化酵素の 1 つであるアシル CoA リゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ活性を測定したところ、アポトーシス細胞では比活性が約 3 倍上昇していた。



#### (8-2) アシル CoA加水分解酵素：(1)

に示したようにアポトーシス細胞ではグリセロリン脂質の脱アシル化反応が亢進していることから、本反応に既知の  $\text{PLA}_2$  アイソザイムが関与することを想定し、阻害剤の効果を検討したところ、カルシウム非依存性  $\text{PLA}_2$  の阻害剤で抑制された。しかし、(2) に示す  $\text{cPLA}_2$  を始め、既知のカルシウム依存性  $\text{PLA}_2$  の阻害剤は全く効果がなかった。また、 $\text{PLA}_2$  によらないアラキドン酸遊離経路として、図 2 B に示すアシル CoA 加水分解酵素に注目した。その結果、アポトーシス細胞では比活性が約 2 倍上昇しており、アシル CoA の加水分解が亢進していた。また、逆反応であるアシル CoA 合成酵素活性は、アポトーシス細胞では比活性が約 4 分の 1 に減少したことより、アポトーシスに伴いこの平衡反応は大きく右に傾いていることがわかった。

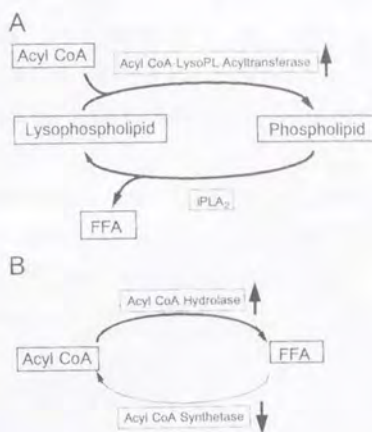


図 2 アポトーシスに伴うアシル CoA 代謝関連酵素群の変動

#### (4) アポトーシスに伴う細胞膜の分泌型 IIA 型ホスホリパーゼ $\text{A}_2$ に対する感受性の獲得：

IIA 型  $\text{sPLA}_2$  は正常状態にある細胞の膜には作用できないが、活性化された細胞の膜には作用できることが明らかにされている。そこで、アポトーシスに伴う細胞膜構造の変化により IIA 型  $\text{sPLA}_2$  感受性となるかを検討した。神経様に神経成長因子 (NGF) により分化させた PC12 細胞から NGF を除去することによりアポトーシスを誘導した。PC12 細胞をあらかじめ放射標識アラキドン酸で標識しておくと、アポトーシスに伴うアラキドン酸の遊離が観察される。さらに、IIA 型  $\text{sPLA}_2$  を共存させるとこのアラキドン酸遊離は著しく増加し、アポトーシス細胞が IIA 型  $\text{sPLA}_2$  に感受性となった。U937 細胞に抗 Fas 抗体でアポトーシスを誘導した場合にも、この増強効果は観察された。この増強効果は、IIA 型  $\text{sPLA}_2$  の細胞への作用に必須と考えられていたヘパリンへの結合は必要とせず、酵素活性が必要であった。アポトーシス細胞が生体内で IIA 型  $\text{sPLA}_2$  の標的細胞となる可能性が示唆された。

# 【考察】

アポトーシス細胞で、グリセロリン脂質の脱アシル化および再アシル化反応、いわゆるリモデリング系が亢進していることが示唆された。酵素レベルの解析の結果、①アシル CoA レベルの低下、②アシル CoA リゾリン脂質アシル基転移酵素活性の亢進を明らかにした。今後は、これらのことがアポトーシス細胞におけるアポトーシス小体形成や細胞膜断片化などの急激な細胞膜構造の変化に対応した細胞膜構造を保つ過程の一つと想定し、解析する予定である。

抗 Fas 抗体で誘導されたアポトーシスに伴う Caspase-3 活性化による cPLA<sub>2</sub> の 522 番目の残基での限定分解により、活性発現に必要とされるアミノ酸残基の一つ (Asp<sup>549</sup>) が取り除かれる。このため酵素活性が消失すると考えられる。さらに、この限定分解部位周辺は、①活性化に伴う膜移行の調節、②刺激に応じたアラキドン酸代謝、と共に重要な役割を持つと予想された。

