

Title	ホスホリパーゼA2 受容体の構造と機能に関する研究
Author(s)	東野, 賢一
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44538
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	ひがし 東 野 賢 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 17438 号
学位授与年月日	平成15年2月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	ホスホリパーゼ A ₂ 受容体の構造と機能に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 土井 健史 (副査) 教授 今西 武 教授 山元 弘 教授 馬場 明道

論 文 内 容 の 要 旨

ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) はグリセロリン脂質の *sn*-2 位のエステル結合を加水分解する酵素であり、生体内に広く分布する。本酵素は、生体膜リン脂質のリモデリングや生体防御反応に関与する他に、アラキドン酸カスケードの開始酵素として生理活性脂質の産生を介して様々な病態や生理作用に関与している。最近の分子生物学的手法の進展や豊富なゲノム情報からこれまでに多くの PLA₂ 分子が見出されているが、哺乳動物の分泌型 PLA₂ (sPLA₂) としては IB 型 sPLA₂ が最も古くから研究され、膵液中に多く存在することから、食餌中のグリセロリン脂質の消化酵素として位置づけられてきた。しかし、有田らは sPLA₂-IB が消化器官以外の組織においても産生されていることに着目し、消化酵素以外の役割を探索する過程を経て、sPLA₂-IB を特異的に認識する PLA₂ 受容体 (PLA₂R) を発見し、これまでに sPLA₂-IB 結合により PLA₂R を介して様々な生体反応が引き起こされることを明らかにしてきた。さらに、ウシ黄体より PLA₂R を精製後、その cDNA を単離し、一次構造を決定した。本受容体は、SDS-PAGE で約 200 kDa の I 型膜タンパク質であり、高システイン領域、II 型フィブロネクチン様ドメインおよび 8 個の糖認識ドメイン (CRD) 様ドメインの繰り返し配列からなる長い細胞外領域と C 末端側の短い細胞内領域から構成され、C 型レクチンファミリーに属するマクロファージマンノース受容体 (サブグループ VI) と相同性を示すことが明らかになった。

本研究では、マウス MC3T3-E1 細胞由来 cDNA ライブラリーよりマウス PLA₂R cDNA の単離に成功し、sPLA₂-IB 結合活性を指標に、単離したマウス PLA₂R cDNA が機能的であることを確認した。続いて、マウス PLA₂R cDNA のシーケンスを行い、そのアミノ酸配列をウシ PLA₂R と比較したところ、CRD-like #4 が最も相同性が高かった。この CRD-like #4 を含む CRD-like #3-5 領域を COS-7 細胞で一過性に発現させ、そのタンパク質を含む上清を用いた sPLA₂-IB 結合実験を行った。その結果、K_d=3.9 nM を示し、PLA₂R 全長に対する場合 (K_d=1.8 nM) と同等の高親和性を得たことから、CRD-like #3-5 が sPLA₂-IB の結合に重要であることが明らかとなった。次に、PLA₂R の組織分布を調べたところ、mRNA レベルでは、腎臓、肺、肝臓、心臓など多くの組織で普遍的に発現していることがわかった。また、タンパク質レベルでも、多くの組織において普遍的に発現していることが確認でき、約 200 kDa 付近に単一のバンドが検出できた。中でも高い発現が認められた肺においては免疫染色法により局在を調べたところ、II 型肺胞上皮細胞を含む肺胞上皮に広く発現がみられた。

sPLA₂ の中でも比較的新しい X 型 sPLA₂ (sPLA₂-X) は、構造的に sPLA₂-IB、IIA の特徴を合わせ持っており、マウスでは、sPLA₂-IB (高親和性)、IIA (低親和性) 同様に、PLA₂R のリガンドとなり得る可能性が考えられた。そこで sPLA₂-X の PLA₂R に対する結合について、MC3T3-E1 細胞を用いて調べたところ、sPLA₂-X の特異的結合

が認められ、 $K_d=4.6$ nM、 $B_{max}=59.7$ fmol/ 10^6 cells であった。affinity cross-linking 実験より、マウス sPLA₂-X 高親和性結合分子の分子量が PLA₂R と同等であることが示唆され、マウス PLA₂R を一過的に発現させた COS 細胞を用いて結合実験を行った結果、マウス sPLA₂-X の特異的な結合を確認することができた。また、PLA₂R 欠損マウス由来肺膜画分には野生型マウスに見られた sPLA₂-X 特異的な結合が検出されなかったことから、sPLA₂-X の特異的な結合が PLA₂R に依存していることも確認できた。

sPLA₂-X は高いアラキドン酸選択性を持ち、その強力なアラキドン酸遊離作用は過剰な脂質メディエーターの産生を引き起こす可能性が考えられる。そこでその受容体である PLA₂R の機能の一つとして sPLA₂-IB 同様 sPLA₂-X のクリアランスが考えられたので、PLA₂R-CHO 細胞を用い、sPLA₂-X クリアランスの速度論的な解析を行った。その結果、sPLA₂-X は PLA₂R を介して細胞内に取り込まれ、分解されることが明らかになった。また、免疫染色法を用いた解析により、細胞膜表面に局在している PLA₂R は、sPLA₂-X と共に細胞内に取り込まれ、リサイクルコンパートメントさらには核周囲のリソゾームへ移行することが確認できた。

PLA₂R はヒト腎臓においてのみ、選択的スプライシングによる sPLA₂R 転写物の存在が報告されているが、これまでに十分な解析は行われていない。マウス血清中に sPLA₂R が存在すれば、蛇毒 PLA₂ の活性を中和する PLA₂ 阻害タンパク質同様に、哺乳動物においても PLA₂ 活性制御物質として作用する可能性が考えられた。そこで著者は、野生型マウス血清中に sPLA₂-IB、X 特異的な結合活性を持つ sPLA₂R が存在することを明らかにし、この可溶型が PLA₂R の細胞外部分をほぼ完全な形で持つことを示した。次に、sPLA₂ の酵素活性および膜結合型 PLA₂R への結合活性に対する sPLA₂R の効果について調べたところ、sPLA₂R が sPLA₂-IB、-X の酵素活性および膜結合型 PLA₂R への結合活性のいずれも阻害し、内因性の阻害因子として機能し得ることを示すことができた。本研究において明らかになったマウス血中の sPLA₂R 量は正常時 23 ng/ml (0.13 nM) 存在し、LPS 投与後、2～3 時間後をピークに一過的な上昇が認められた。sPLA₂R は主にメタロプロテアーゼによる膜結合型 PLA₂R の切断により産生されるが、炎症時には膜結合型 PLA₂R を介した過剰なシグナルの抑制や sPLA₂ の過剰な酵素活性を抑制するために sPLA₂R が産生され、生体防御反応機構として機能している可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) は、グリセロリン脂質の加水分解酵素として良く知られているが、近年、この分子の受容体 (PLA₂R) が発見され、PLA₂R の役割や受容体を介した生体反応に興味をもたれている。

このような背景の下、東野君は、マウス PLA₂R の構造と機能に関する研究を行った。

まず、マウス PLA₂R の cDNA のクローニングを行い、1 次構造を明らかにした。またその発現は、腎臓、肺、肝臓、脾臓、卵巣、心臓など多くの臓器で発現していることを確かめた。

次に PLA₂R について生化学的解析を行い、sPLA₂-X がそのリガンドであることをはじめて明らかにし、さらに PLA₂R から代謝されることを明らかにした。一方、マウスの血清中には細胞外部分をほぼ完全な形でもつ可溶型 PLA₂R (sPLA₂R) が存在することを突き止めた。さらに、この sPLA₂R は、sPLA₂-X の酵素活性および膜結合型 PLA₂R への結合を阻害する因子として機能し得ることを明らかにした。また sPLA₂R の産生は、主にメタロプロテアーゼにより行われることを示した。

肺において、LPS 刺激後のこれらタンパク質の発現量を調べた結果、1 時間で PLA₂R の発現上昇がみられ、また sPLA₂R については 2～3 時間後にピークをむかえることを示した。以上の事実から総合的に判断して、PLA₂ による炎症などの病態形成時には、PLA₂R や sPLA₂R がそれを抑える制御を担っている可能性を本研究をとおして提示した。

以上の結果は、博士 (薬学) の学位論文に値するものと認める。