

細胞質型ホスホリパーゼ $A_2\alpha$ の
新規活性制御機構に関する研究

2008 年

清水雅也

目次

略語表	1
使用薬物	3
緒言	5
実験方法	10
第 1 章 細胞内スフィンゴ脂質代謝バランスによる cPLA ₂ α 活性への影響	
1-1. 序論	15
1-2. 結果	16
1-3. 考察	29
第 2 章 リン酸化に依存しない cPLA ₂ α 活性制御機構における CaMK II の役割	
2-1. 序論	32
2-2. 結果	33
2-3. 考察	41
総括	44
参考文献	45
論文目録	56
謝辞	57

略語表

AA	: arachidonic acid
BEL	: bromoenol lactone
BHA	: butylated hydroxyanisole
BSA	: bovine serum albumin
CaMK II	: calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
CERK	: ceramide kinase
CHO	: Chinese hamster ovary
COX	: cyclooxygenase
cPLA ₂ α	: cytosolic phospholipase A ₂ α
C1P	: ceramide-1-phosphate
D-erythro-MAPP	: (1S, 2R)-D-erythro-2-(N-myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol
DME	: Dullbecco's modified Eagle's
DTT	: dithiothreitol
EC	: electrostatic complementary
ERK	: extracellular signal-regulated kinase
FBS	: fetal bovine serum
GFP	: green fluorescent protein
HBSS	: Hank's balanced salt solution
HEK	: human embryonic kidney
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
iPLA ₂	: Ca ²⁺ -independent phospholipase A ₂
LT	: leukotriene
5-LOX	: 5-lipoxygenase
MAPK	: mitogen-activated protein kinase
NBD	: 7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl)amino
PAF	: platelet-activating factor
PAPC	: 1-palmitoyl-2-arachidonyl-phosphatidylcholine
PBS	: phosphate buffered saline
PG	: prostaglandin
PIP ₂	: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC	: protein kinase C

PTX	: pertussis toxin
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SM	: sphingomyelin
sPLA ₂	: secretory phospholipase A ₂
S1P	: sphingosine-1-phosphate
TBS	: Tris-buffered saline
Triton X-100	: polyoxyethylene (10) octylphenyl ether

使用試薬

A23187	: Calbiochem
Anti- β -tubulin antibody (T4026)	: Sigma
Anti-cPLA ₂ antibody (4-4B-3C)	: Santa Cruz
Anti-ERK-1 antibody (C-16)	: Santa Cruz
Anti-ERK-2 antibody (C-14)	: Santa Cruz
Anti-mouse IgG antibody	: Amersham
Anti-myc antibody	: Invitrogen
Anti-phospho-cPLA ₂ (Ser505) antibody	: Cell signaling
Anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) antibody	: Cell signaling
Anti-rabbit IgG antibody	: Amersham
[³ H] arachidonic acid	: Amersham
BEL	: Cayman
BSA	: Sigma
C1P	: Sigma
C2 ceramide	: Sigma
C6 ceramide	: Calbiochem
C8 ceramide	: Calbiochem
C8-C1P	: Biomol
C16 ceramide	: Biomol
CHAPS	: Sigma
D-erythro-MAPP	: Calbiochem
DME	: Sigma
G418 (geneticin)	: Sigma
GF109203x	: Sigma
Gö6976	: Calbiochem
H ₂ O ₂	: 和光純薬
Ham's F12	: Sigma
Hygromycin B	: 和光純薬
KN-62	: Sigma
KN-93	: Calbiochem
LipofectAMINE	: Invitrogen

Myriocin	: Sigma
NBD-C6 ceramide	: Molecular Probes
PAF	: Cayman
[¹⁴ C] PAPC	: Perkin Elmer
PLUS reagent	: Invitrogen
PMA	: Calbiochem
PTX	: List Biological Laboratories
Pyrophenone	: 塩野義製薬
SB202190	: Sigma
SM	: Sigma
Sphingosine	: Sigma
Triton X-100	: 和光純薬
U0126	: Promega
W-7	: 生化学工業
ブロックエース	: 大日本製薬

緒言

ホスホリパーゼは生体膜の主要構成成分であるグリセロリン脂質を加水分解する酵素である。加水分解する位置により、sn-1 位を加水分解する phospholipase A₁(PLA₁)、sn-2 位を加水分解する PLA₂、リン酸ジエステルのグリセロール側を切断する PLC、その反対側を切断する PLD に分類される。sn-2 位には多くの場合、アラキドン酸に代表される不飽和脂肪酸が結合していることから、PLA₂ は様々な生理活性を発揮するアラキドン酸を切り出す酵素として重要な役割を持つ。PLA₂ の活性化は、アラキドン酸代謝系あるいはリゾリン脂質由来の生理活性脂質産生系の初発律速過程であると同時に、生体膜のリン脂質再構築にもきわめて重要である。PLA₂ は、サイトカインやホルモン、神経伝達物質、抗体、エンドトキシンなど、様々な刺激によって活性化する (Lin et al., 1992; Clark et al., 1995)。PLA₂ は、構造およびその性質 (局在性、Ca²⁺ 要求性、基質特異性) の類似性から分泌型 PLA₂ (sPLA₂)、細胞質型 PLA₂ (cPLA₂)、Ca²⁺ 非依存性 PLA₂ (iPLA₂)、PAF アセチルヒドロラーゼの 4 つのグループに分類されている (Dennis, 1997; Tischfield, 1997; Balsinde and Dennis, 1997; Hirabayashi et al., 2004; Murakami, 2004, Table 1)。sPLA₂ は比較的低分子量の酵素群で、腭液や炎症性細胞に局所的に存在している。普段は分泌顆粒内に貯蔵され、刺激によって細胞外に分泌され酵素活性を発揮する。現在 10 種類の分子種が同定されており、いずれも細胞外分泌のためのシグナル配列を持ち、活性化には mM オーダーの Ca²⁺ 濃度を必要とする。iPLA₂ は複数のスプライシングバリエーションが存在する 63 - 89 kDa の酵素で、活性化に細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇を必要としない。cPLA₂ は、現在までに α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ の 6 つの分子種が同定されている。cPLA₂ は細胞質局在性の PLA₂ 群で、 γ を除く 5 つの分子種は、活性化に細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇を必要とする。

多様な分子種が存在する PLA₂ のうち、本研究で対象としている cPLA₂ α は、アラキドン酸代謝に最も密接に関連した 85 kDa の PLA₂ 分子種であり、さまざまな刺激に応じた細胞応答に伴って活性化し、生体膜リン脂質からアラキドン酸を選択的に遊離する。cPLA₂ α により核周辺部で遊離されたアラキドン酸は、シクロオキシゲナーゼ (COX)、リポキシゲナーゼ (5-LOX) などのアラキドン酸代謝関連酵素によってプロスタグランジン (PG)、ロイコトリエン (LT) などの種々の脂質メディエーターに効率よく変換されると考えられている (Fig. 1)。cPLA₂ α の欠損マウスでは、PG、LT、PAF などのエイコサノイドの産生が著し

く減少し、アレルギー性気道過敏症、リウマチ関節炎、肺線維症などの病態モデルにおいて劇的な改善が見られる一方、分娩異常も引き起こす (Uozumi et al., 1997; Bonventre et al., 1997; Nagase et al., 2000; Hegen et al., 2003)。さらに、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患や細胞死にも cPLA₂α 活性が関与していることが知られている (Stephenson et al., 1996; Klivenyi et al., 1998; Kalyvas and David., 2004)。よって cPLA₂α の活性化機構の解明、また活性制御物質を明らかにすることは非常に重要であると考えられる。

cPLA₂α の活性化には細胞内 Ca²⁺濃度の上昇 (Qiu et al., 1998; Hirabayashi et al., 1999) と cPLA₂α のリン酸化 (Lin et al., 1993; Leslie, 1997; Hefner et al., 2000; Muthalif et al., 2001; Xu et al., 2002)、および脂質による制御 (Das and Cho, 2002; Six and Dennis, 2003) が重要であると考えられている。cPLA₂α は、μM 程度の細胞内 Ca²⁺濃度上昇に応じて、細胞質から核膜や小胞体、ゴルジ体に移動し、酵素活性を発揮する (Hirabayashi and Shimizu, 2000; Evans et al., 2001)。この Ca²⁺による制御機構は、N 末端に存在する C2 ドメインに依存し、基質であるリン脂質への結合親和性の増大、あるいは膜脂質からの解離の抑制によると考えられている。また、cPLA₂α にはリン酸化によって活性制御に関わることが報告されている 3 つのセリン残基が存在し、Ser505 は extracellular signal-regulated kinase (ERK) や p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)、Ser515 は calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II)、Ser727 は MAPK interacting kinase である MNK1 によってそれぞれリン酸化される。リン酸化されることで構造変化を引き起こし、膜脂質との保持時間を延長することで酵素活性が数倍に上昇するとされている (Lin et al., 1993; Leslie, 1997; Hefner et al., 2000; Muthalif et al., 2001, Fig. 2)。さらに、cPLA₂α は脂質によっても活性制御が行われることが知られている。phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) が Lys488、Lys541、Lys543、Lys544 に結合することにより、酵素活性や基質であるリン脂質との親和性を増大させると考えられている (Nalefski et al., 1994; Balsinde et al., 2000; Das and Cho, 2002; Six and Dennis, 2003)。

スフィンゴ脂質はスフィンゴイド類 (長鎖塩基) を基本骨格として持つ複合脂質の総称である。糖がグリコシド結合した スフィンゴ糖脂質とリン酸および塩基が結合したスフィンゴリン脂質とに分類される。これらスフィンゴ脂質は、細胞膜構成成分の一群であり、コレステロールなどと共に細胞膜上でマイクロドメインを形成し、シグナル伝達経路の場として働く。スフィンゴ脂質の一種

であるセラミド、セラミド-1-リン酸 (C1P)、スフィンゴシン、スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) などは生理活性脂質として注目されており、アポトーシス、ストレス応答、細胞分化、老化など様々な生命現象に重要な役割を果たすことが知られている (Hannun, 1996; Pyne and Pyne, 2000; Gomez, 2004)。

スフィンゴ脂質の生合成は、まず小胞体での L-セリンとパルミトイル CoA からの *de novo* 合成経路によってセラミドが生成するところから始まる。小胞体で生合成されたセラミドは、ゴルジ体に輸送され、ゴルジ体で細胞膜構成成分となるスフィンゴミエリン(SM)やスフィンゴ糖脂質に代謝される。セラミドはまた、SM からスフィンゴミエリナーゼ(SMase)による加水分解によっても産生される。セラミドはさらに、セラミダーゼによってスフィンゴシンに、スフィンゴシンはスフィンゴシンキナーゼ(SPHK)によって S1P に代謝される。また、セラミドはセラミドキナーゼ(CERK)によってリン酸化され C1P にも代謝される(Fig. 3)。これらセラミドやスフィンゴシン、C1P といったスフィンゴ脂質が、アラキドン酸代謝や PLA₂ 活性を制御するということが報告されている (Pfau et al., 1998; Sato et al., 1999; Kitatani et al., 2000; Huwiler et al., 2001; Nakamura et al., 2004, 2006; Pettus et al., 2004)。しかしながら、スフィンゴ脂質による cPLA₂α 活性の調節に関しては統一的な見解が得られておらず、またメカニズムも明らかとなっていない。

このように、cPLA₂α は異なる経路による複数の制御を受けている。cPLA₂α の活性制御機構の解析が精力的に進められた結果、Ca²⁺による cPLA₂α の活性制御機構はかなり解明されてきているが、リン酸化や脂質による活性調節に関しては依然不明な部分が多い。そこで本研究では、リン酸化と脂質による cPLA₂α の活性制御に着目し、制御機構の解明を試みた。第 1 章では、細胞内のスフィンゴ脂質の代謝バランスが cPLA₂α の活性制御にどのように関与するかを検討した。第 2 章では cPLA₂α のリン酸化部位 3 カ所のセリン残基のうち、515 番目のセリン残基の活性への影響と、CaMK II の cPLA₂α 活性化に対する役割を検討した。

ファミリー	サブタイプ	kDa	分布	機能
Secretory PLA ₂ (sPLA ₂)	IB, II A, C, II D, E, F V, X, XII III	13–19 56	炎症性細胞 涙液など	食物中のリン脂質の消化 アラキドン酸代謝
Cytosolic PLA ₂ (cPLA ₂)	IV A (α) IV B (β) IV C (γ) IV D (δ) IV E (ε) IV F (ζ)	85 110 60 90	普遍的 脳、脾臓、肝臓 心臓 骨格筋、心筋 皮膚、胎盤 心臓、骨格筋、甲状腺 甲状腺、胃	アラキドン酸代謝 ? 酸化ストレス応答? 皮膚炎?
Ca ²⁺ - independent PLA ₂ (iPLA ₂)	VI A VI B	85, 88 63, 77, 88.5	普遍的 骨格筋	リン脂質リモデリング リソソームでのリン脂質消化 アラキドン酸代謝
PAF acetylhydrolase	VII A, B, VIII A, B	45, 40 30, 29	血漿、肝臓 脳	PAFの分解 酸化リン脂質の加水分解

Table. 1 Classification of mammalian phospholipase A₂.

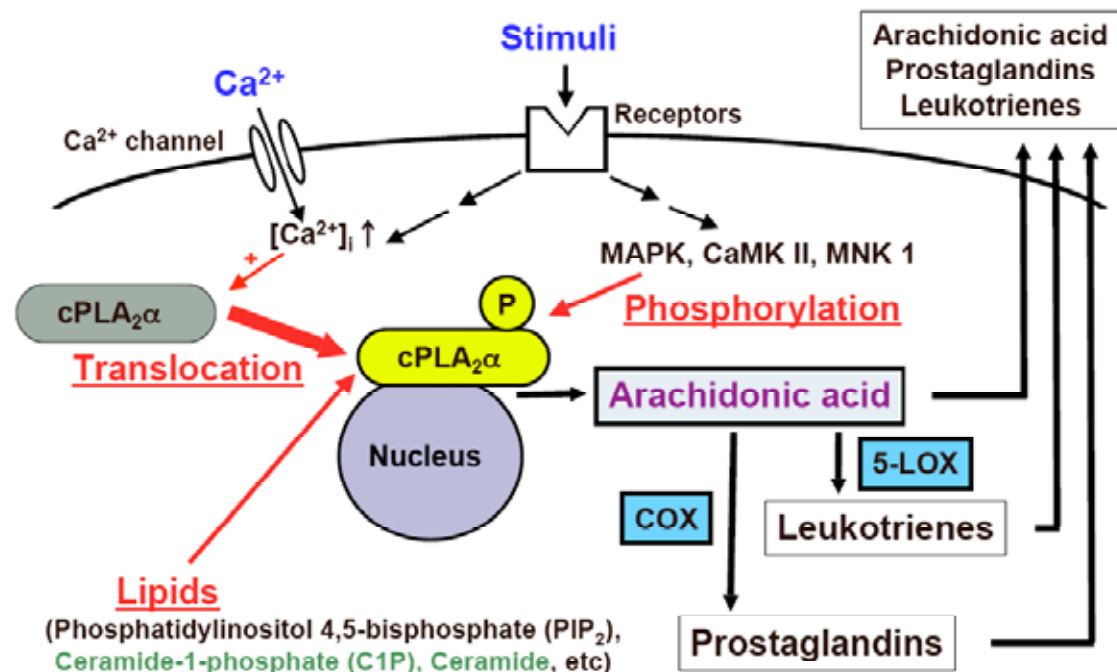


Fig. 1 Activation mechanism of cPLA₂α.

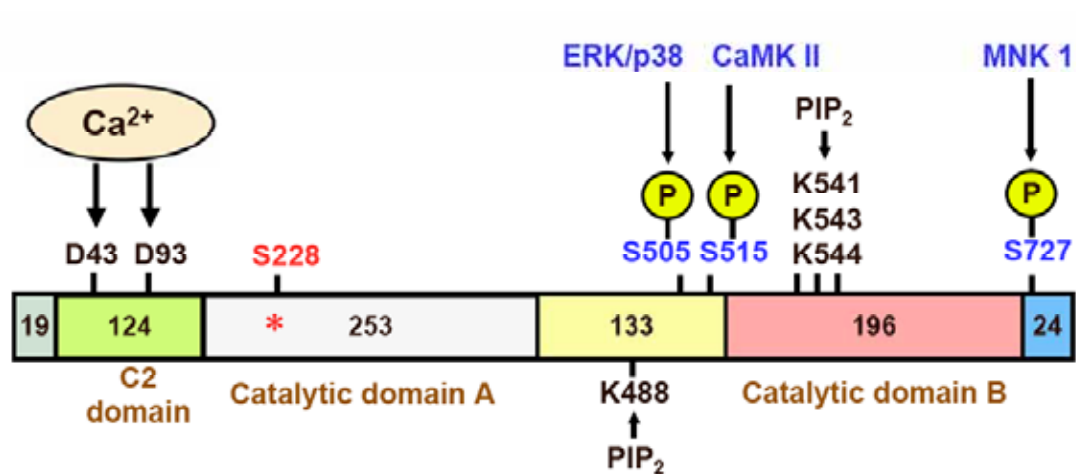


Fig.2 Primary structure of cPLA₂α.

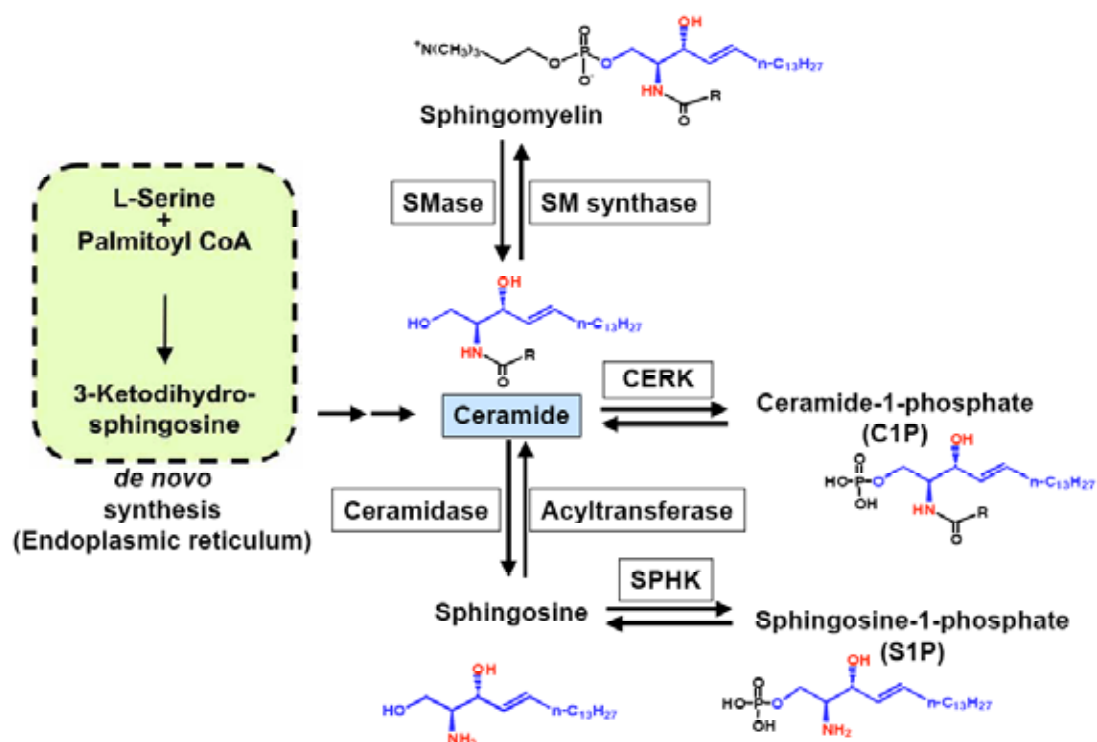


Fig.3 Metabolic pathway of sphingolipids.

実験方法

1. 細胞培養

L929 細胞、C12 細胞（マウス線維芽細胞）は、摂南大学の辻本博士から御供与して頂いた。両細胞は、5 % FBS (fetal bovine serum)を含む DME 培地を用い、95 % air-5 % CO₂、37℃の条件下で培養した。HEK293T 細胞 (human embryonic kidney) は、10 % FBS を含む DME 培地を用い同様に培養した。CHO-W11A 細胞 (Chinese hamster ovary) は、10 % FBS を含む Ham's F12 培地を用い同様に培養した。

2. 発現ベクターの構築

cPLA₂αの変異体は鋳型プラスミドとして pcDNA3.1-cPLA₂αを使用し、Quick ChangeTM (Invitrogen)を用いて作成した。プラスミド DNA の精製は、Plasmid Midi Kit (QIAGEN)を用いて精製した。各 cPLA₂α の変異体は、以下のプライマーを用いて作製した。S228A 5'-CGT TGC TGG TCT TGC GGG CTC CAC CTG G-3'とその相補鎖； S505A 5'-CAT CTT ATC CAC TGG CTC CTT TGA GTG ACT TTG CC-3'とその相補鎖； S515A 5'-CTT TGC CAC ACA GGA CGC CTT TGA TGA TGA TG-3'とその相補鎖； S727A 5'-CCA TCT CGT TGC GCT GTT TCC CTT AGT AAT G-3' とその相補鎖； cPLA₂α-C2 domain-forward (5'-GGA AGA TCT ATG TCA TTT ATA GAT CCT T-3'), reverse (5'-GGT CTG CAG TCA GTC TGG GCA TGA GCA AAC-3')； GFP-cPLA₂α-Δ397-749-forward (5'-GGA AGA TCT ATG TCA TTT ATA GAT CCT T-3') reverse (5'-CAA CTG CAG GGC ACT GCC CCA GAC ACC-3')。pEB6 CAG ベクターは、筑波大学の三輪佳宏先生より、CERK 遺伝子は、第一三共株式会社の古浜孝文博士より頂いた。

マウス cPLA₂α の siRNA は、TaKaRa の Web サービス (siRNA Design Support System) と、BLAST サーチ (NCBI web-site) を用いて配列候補を決定した (No. 1, GCG AAC GAG ACA CTT CAA T, No. 2, GCA CAT CGT GAG TAA TGA C, No. 3, GGT GCA TAA CTT CAT GCT G)。これらの配列を、siRNA 発現プラスミドベクター・pSilencer 2.1-U6 Hygro (Ambion)に組み込み、大腸菌を用いて増幅・精製し実験に用いた。なお、これらベクターや変異体は、DNA シーケンスにより塩基配列の確認を行った後、実験に用いた。

3. 細胞への遺伝子導入

トランスフェクションには、60 mm ディッシュに 5×10^5 細胞となるようにまき、24 時間培養後、LipofectAMINE PLUS Reagent (Invitrogen) を用いて行った。pEB6 発現ベクターを導入した C12 細胞の G418 (geneticin) による選択は、それぞれ 500 $\mu\text{g/mL}$ で 1 週間作用させることにより行った。

4. L929-cPLA₂ α -siRNA クローンの作成

L929 細胞を 60 mm dish に 4×10^5 細胞/ウェルとなるようにまきこみ、24 時間培養後、作製した pSilencer 2.1-U6 Hygro-mcPLA₂ α -2 を LipofectAMINE (Invitrogen) を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入から 24 時間後、細胞を 96 ウェルプレートに 100, 300, 1000, 3000 細胞/ウェルとなるようにまき、1000 $\mu\text{g/mL}$ の濃度の Hygromycin B で 10–14 日間選択をかけた。生き残った細胞のうち、シングルコロニー由来の細胞のみをピックアップし、24 ウェルプレートに継代した。それを同濃度の Hygromycin B で 5–7 日間選択を行い、生き残った細胞で形態が著しく異常でない細胞を選び、35 mm dish に継代した。同様の操作で培養スケールを大きくしていき、得られたクローンの cPLA₂ α の発現レベルと酵素活性を測定して適切なクローンを選別した。得られたクローンは 500 $\mu\text{g/mL}$ の濃度の Hygromycin B を添加し培養し、実験に使用する前日から Hygromycin B が入っていない DME 培地を用いて培養した。

5. サンプルの調製

各試薬による刺激後に、細胞を PBS (-) で 2 回洗浄した後、lysis buffer (10 mM HEPES pH 7.6, 0.34 M sucrose, 100 μM dithiothreitol (DTT), 0.2 % CHAPS, 10 $\mu\text{g/mL}$ leupeptin, 10 $\mu\text{g/mL}$ aprotinin, 0.1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM Na_3VO_4) とセルスクレイパーを用いて細胞をディッシュからはがした。プローブ型ソニケーター(タイテック、VP-5S)を用いて 5 秒 $\times$ 5 回のソニケーションを行い、その後遠心 (15,000 rpm, 10 分間, 4°C) し、上清を回収してサンプルとした。

6. ウェスタンブロッティング

調製したサンプル 50 μg をポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE

(10 %分離ゲル)により分離し、PVDF 膜に転写した。5 % BSA/TBS-T (Tween 0.1 %)あるいはブロックエース (大日本製薬)を用いて 4℃で一晩ブロッキングした。抗原抗体反応は、cPLA₂αを検出する際は、一次抗体として抗 cPLA₂ 抗体 (Santa Cruz、2000 倍希釈)、抗リン酸化 cPLA₂ 抗体 (Cell Signaling、500 倍希釈)、抗 ERK1 抗体 (2000 倍)、抗 ERK2 抗体 (20000 倍)、抗リン酸化 ERK 抗体 (2000 倍)を 5 % BSA/TBS-T で希釈し、CERK を検出する際は、一次抗体として抗 myc 抗体 (Invitrogen、5000 倍希釈)を 10 % ブロックエース/TBS-T (Tween 0.1 %)で希釈し、室温で 2~3 時間反応させた。二次抗体として HRP (horseradish peroxidase) 標識された抗マウス抗体 (Amersham)あるいは抗ラビット抗体 (Amersham)を 10 % ブロックエース/TBS-T でそれぞれ 2000 倍に希釈し、室温で 1 時間反応させた。ECL 溶液 (PIERCE)に 1 分間浸して化学発光させたものを、イメージアナライザー (LAS1000-Plus、富士フイルム)を用いて画像を取り込んだ。

7. [³H]アラキドン酸遊離量測定

24 ウェルプレートに 2×10^4 細胞/ウェルになるように細胞をまき、[³H] ラベルされたアラキドン酸を 0.05 μ Ci/ウェルとなるように加え、37℃、18 時間インキュベートした。0.1 % BSA、10 mM HEPES を含む HBSS で 2 回洗浄し、その後、0.1 % BSA、10 mM HEPES 含む培地 500 μ L の実験系にアゴニストを作用させた。刺激後上清 300 μ L を回収して 8000 rpm、5 分間の遠心後、そのうちの 250 μ L の上清に含まれる放射活性を測定した (count A)。また、上清回収後のプレートに 2 % Triton X-100 を 200 μ L を加え、100 rpm、20 分間の振とうにより細胞を溶解し、そのうちの 200 μ L に含まれる放射活性を測定 (count B)し、それらの値から下式に従ってアラキドン酸遊離量(%)を求めた。

$$\begin{aligned}\text{アラキドン酸遊離量 (\%)} &= (\text{遊離した放射活性} / \text{取り込まれた放射活性}) \times 100 \\ &= \{(\text{count A} \times 2) / (\text{count A} \times 300 / 250 + \text{count B} \times 2)\} \times 100\end{aligned}$$

8. 共焦点顕微鏡を用いた細胞内局在変化の観察

HEK293T 細胞あるいは CHO-W11A 細胞を 60 mm ディッシュに 4×10^5 細胞まき、一晩培養した。2 μ g の pEGFP-cPLA₂α、pEGFP-CERK、およびそのコントロールベクターをそれぞれ無血清の培地を用いてトランスフェクションし、3

時間後に血清を含んだ培地に交換した。トランスフェクションして 24 時間後、ガラスボトムディッシュ(イワキ)に 2×10^4 細胞まき、その 48 時間後に共焦点レーザー顕微鏡(オリンパス FV500-IX、60 倍水浸対物レンズ PlanApo60 x WLSM、開口数 1.00) でアルゴンレーザー(励起波長 488 nm、蛍光波長 507 nm)を用いて観察した。観察時のバッファーは、0.1 % BSA、10 mM HEPES を含む HBSS を用い、薬物刺激は 1.8 mL のバッファーに 10 倍濃度の薬物を 200 μ L 加えることにより行った。

9. 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の観察

CHO-W11A 細胞を、ガラスボトムディッシュ(イワキ)に、 2×10^4 細胞まき、二日間培養した。培養後、HBSS (0.1 % BSA、10 mM HEPES) で一度洗浄し、6 μ M Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (Molecular Probes) を加え、37°C、1 時間ローディングを行った。その後、HBSS で 3 回洗浄した。薬物刺激は 1.8 mL の HBSS に 10 倍濃度の薬物を 200 μ L 加えることにより行った。観察は共焦点レーザー顕微鏡(オリンパス FV500-IX、60 倍水浸対物レンズ PlanApo60 x WLSM、開口数 1.00) でアルゴンレーザー、FITC フィルターを用いて観察した。

10. 細胞内スフィンゴ脂質量の測定

6 ウェルプレートに 2×10^5 細胞/ウェルで細胞をまき、24 時間培養した。その後、血清を除去した状態で一晚培養し、実験に用いた。HBSS (0.1 % BSA、10 mM HEPES 含む) で一度洗浄し、NBD-C6 ceramide (励起波長 466 nm、蛍光波長 536 nm) あるいは C6 ceramide をそれぞれ 0.5 μ M、30 μ M 加え、30 分間 37°C でインキュベートした。その後各試薬を加え、30 分間 37°C でインキュベート後、氷冷した PBS (-) で 3 回洗浄し、400 μ L の PBS (-) で回収し、ガラスチューブに移した。その後、Bligh & Dyer 法 (Bligh and Dyer, 1959) を用いて脂質を抽出した。まず、0.5 mL のクロロホルムと 1 mL のメタノールを加えてボルテックスし、10 分間氷上で静置した。その後、0.5 mL のクロロホルムと 0.5 mL の蒸留水を加え、3000 rpm で 10 分遠心し、下層の有機層を回収した。窒素气流を吹き付けて溶媒を揮発させた後、メタノール：クロロホルム = 1：1 溶媒でサンプルを溶解させ、TLC にスポットした。展開溶媒 (クロロホルム：メタノール：酢酸 = 13：3：1) で展開させた後、イメージアナライザー (LAS1000-Plus、富士フイルム) を用いて蛍光像を取り込んだ。また、47 % 希硫酸を噴霧し、加熱

乾燥後、イメージアナライザーを用いて画像を取り込んだ。

11. In vitro PLA₂ 活性測定

1-palmitoyl-2-[¹⁴C]-arachidonyl-phosphatidylcholine (PAPC)に窒素ガスを吹き付けて脂質フィルムを作成し、水と 0.1 % Triton X-100 を加えて 5-6 分間ソニケートした。Reaction buffer (100 mM HEPES ; pH 7.4、1 mg/mL BSA、4 mM CaCl₂、10 mM DTT) 175 μL、基質として PAPC 50 μL (~60000 dpm/tube)、cell lysate (1 μg/μL) 25 μL を混合し、37°C、30 分間インキュベートした。各阻害剤は、Reaction buffer 中にあらかじめ添加した状態で実験を行った。Dole 試薬 (1N H₂SO₄/ n-heptane/ isopropanol =2/20/78) 1.25 mL を加えて反応を止めたあと、n-ヘプタン 0.75 mL、蒸留水 0.5 mL を加えて、遠心 (3000 rpm、5 分間) した。上清 0.75 mL をとり、等量の n-ヘプタンと、100 mg のシリカゲルを加えて、もう一度遠心 (3000 rpm、5 分間) した。2 回のヘプタン抽出により PAPC から酵素反応により切り出され、有機層に移った [¹⁴C]アラキドン酸を含む上清 1 mL に、Microscint-0 (シンチレーションカクテル) 1 mL を加え、液体シンチレーションカウンターを用いて、¹⁴C 放射活性を測定することにより、PLA₂ 活性を測定した。

12. コンピューターによる相互作用予測モデル

cPLA₂α と CaMK IIα の三次元モデルは、それぞれ、Brookhaven Protein Databank 1CJY と 2F86 に基づく MOE (バージョン 2006.0801、CCG 社) で造った。cPLA₂α と CaMK IIα の間のドッキング複合体の構造は、ZDOCK (ボストン大学) で予測した。さらに、分子力学計算とこれらの複合体の相互作用エネルギーの計算は、MOE で Amber99 フォースフィールドを用いて行った。静電相補性 (EC) の測定は、文献を参考に行った (McCoy et al., 1997)。各々の複合体の結果として生じる三次元構造は、MolFeat (バージョン 3、FiatLux) を使って表示した。

第 1 章 細胞内スフィンゴ脂質代謝バランスによる cPLA₂α 活性への影響

1. 序論

近年、cPLA₂α の活性制御機構に、従来報告されている Ca²⁺ による制御とリン酸化による制御に加え、脂質が関連することが報告されている。この cPLA₂α 活性を制御する脂質として、PIP₂ とスフィンゴ脂質がある。PIP₂ は、cPLA₂α の C 末側に存在するリジン残基と相互作用することで、cPLA₂α と基質の存在する生体膜との親和性を増大させることで酵素活性を増大させることが知られている (Nalefski et al., 1994; Das and Cho, 2002; Six and Dennis, 2003)。スフィンゴ脂質は代謝により多くの分子種が存在するが、その中でも、セラミドや C1P が cPLA₂α を活性化すること (Huwiler et al., 2001; Pettus et al., 2004; Nakamura et al., 2006)、スフィンゴシンが cPLA₂α を抑制することが報告されている (Nakamura et al., 2004)。また、C1P 産生酵素である CERK を RNAi 法で down regulation すると、Ca²⁺ イオノフォアやインターロイキン 1β (IL-1 β) 刺激によるアラキドン酸遊離量が減少し、その減少が細胞外からの C1P 添加により回復するという報告 (Pettus et al., 2003, 2004) もある。このように、スフィンゴ脂質代謝酵素の有無が PLA₂ 活性に影響を与えることから、スフィンゴ脂質の代謝バランスが cPLA₂α の活性を制御する可能性が考えられる。しかしながら、細胞外から添加したスフィンゴ脂質が、どのような代謝を受け cPLA₂α の活性を制御しているかは明らかとなっていない。本研究において、cPLA₂α を活性化させる刺激の種類によって、細胞内のセラミド代謝が変化し、血小板活性化因子 (PAF) 刺激を行った際は、細胞外から添加したセラミドがスフィンゴシンへと代謝されることで cPLA₂α 活性を抑制的に制御することが示された。一方、Ca²⁺ イオノフォア・A23187 刺激ではスフィンゴシン量が増加せず、cPLA₂α 活性が増強的に制御されることが示された。また、CERK 発現細胞において、C1P 産生量の亢進による cPLA₂α 活性の増大が示された (manuscript in preparation)。

2. 結果

2-1. CHO-W11A 細胞におけるセラミド添加によるアラキドン酸遊離への影響

CHO-W11A 細胞は、PAF 受容体が高発現したカルシウム応答性の高いクローンで、PAF 刺激により cPLA₂α を介したアラキドン酸遊離が引き起こされることが報告されている (Hirabayashi et al., 1999)。PAF 受容体は G タンパク質共役型受容体のひとつで、複数の G タンパク質と共役することで、MAPKをはじめとする各種キナーゼ、PLA₂ の酵素活性を上昇させ、またアデニル酸シクラーゼ活性を抑制することが明らかになっている (Izumi et al., 1995)。この PAF 受容体が高発現している CHO-W11A 細胞に、セラミドの生理作用を模倣するセラミドアナログで、膜透過性である C2 セラミド (N-アセチルスフィンゴシン、30 μM) を 30 分間前処理した後に PAF 刺激、A23187 刺激を行った。まず C2 セラミド添加後の各刺激によるアラキドン酸遊離の経時的変化を調べたところ、PAF 刺激単独では、5 分の時点でアラキドン酸遊離が起こり、20 ~ 30 分の間で最大反応を示すが、C2 セラミドを前処置すると、5 分の時点で抑制効果が観察され、60 分経ってもアラキドン酸遊離が増大することはなかった (Fig. 4A)。一方、A23187 刺激では、PAF 刺激とは反対に 10 分過ぎから C2 セラミドによる増強効果が現れ、30 分の時点で最も差が開いた (Fig. 4B)。

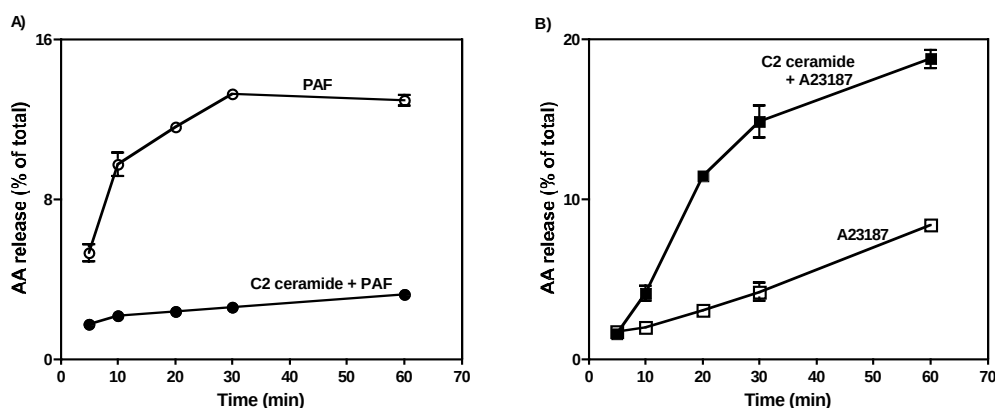


Fig. 4 Time course of PAF- or A23187-induced AA release from CHO-W11A cells with or without C2 ceramide pretreatment.

CHO-W11A cells were pretreated with 30 μM C2 ceramide for 30 min, and then cells were stimulated with 100 nM PAF (A) or 5 μM A23187 (B) for indicated minutes. In Panel A, open symbol and closed symbol indicated pretreatment without C2 ceramide and pretreatment with C2 ceramide, respectively. Representative graph of three experiments are shown and the results are the average ± S.D. of triplicate

この C2 セラミド添加による効果が、cPLA₂α に関連したものかどうかを検討するため、cPLA₂α 選択的阻害剤であるピロフェノン (Ono et al., 2002) を用いた。PAF 刺激時の C2 セラミド添加によるアラキドン酸遊離の抑制効果は、ピロフェノン添加による抑制効果とほぼ同程度であり、かつピロフェノンと C2 セラミドを併用しても抑制効果に違いが観察されなかった (Fig. 5A)。このことから、C2 セラミド添加による PAF 刺激時のアラキドン酸遊離の抑制は、cPLA₂α 活性を抑制して引き起こしていることが考えられた。一方、同様の条件で A23187 刺激を行ったところ、セラミド添加により A23187 刺激時に観察されたアラキドン酸遊離が顕著に増大した (Fig. 5B)。このアラキドン酸遊離の増大は、ピロフェノンによってほぼ完全に消失したことから、cPLA₂α の活性化を介して引き起こされたことが示された。これら C2 セラミド添加による作用は、セラミドの濃度依存的に起こり、PAF 刺激時の抑制効果も A23187 刺激時の増強効果も 30 μM の C2 セラミド添加が最大反応を示した (data not shown)。

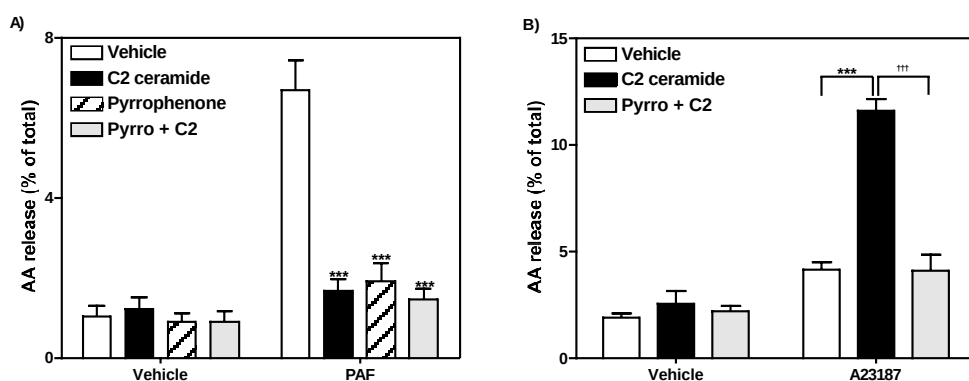


Fig. 5 Effect of C2 ceramide on PAF- or A23187-induced AA release from CHO-W11A cells.

CHO-W11A cells were pretreated with 30 μM C2 ceramide and/or 3 μM pyrrophenone for 30 min, and then cells were stimulated with 100 nM PAF (A) or 5 μM A23187 (B) for 30 min. Data represent means ± S. E. M. of three independent experiments and each performed in duplicate. *** P < 0.001, ††† P < 0.001, significantly different from the vehicle-treated cells or C2 ceramide-treated cells, respectively.

2-2. C2 セラミドによる細胞内 Ca²⁺濃度上昇への影響

C2 セラミド添加による PAF 刺激時のアラキドン酸遊離の抑制と、A23187 刺激時のアラキドン酸遊離の増強という相反する現象の原因が、C2 セラミドが、

PAF 受容体の機能を阻害しているという可能性を考え、PAF 受容体のシグナルのひとつである細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の検証を Ca^{2+} 感受性蛍光色素である Oregon Green 488 BAPTA-1, AM を用いて行った。蛍光色素を取り込ませた細胞に PAF 刺激を行うと、数秒で細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が観察された (Fig. 6A upper)。C2 セラミドの存在下でも、PAF 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に変化はなかった (Fig. 6A lower)。A23187 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇も、PAF 刺激と同様に数秒で上昇が観察され、C2 セラミドによる影響も受けなかった (Fig. 6B)。

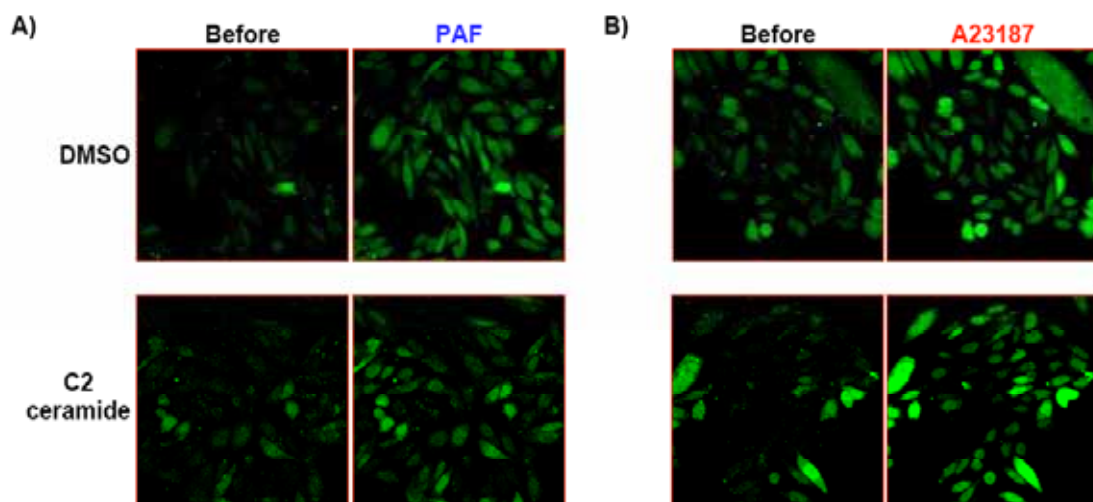


Fig. 6 Effect of C2 ceramide on PAF- or A23187-induced increase in intracellular Ca^{2+} concentration in CHO-W11A cells.

CHO-W11A cells were loaded with 6 μM Oregon Green 488 BAPTA-1, AM for 60 min. After washing, cells were pretreated with 30 μM C2 ceramide, and then cells were stimulated with 100 nM PAF (A) or 5 μM A23187 (B). The pictures are at the time of 20 sec after stimulation. Data are representative of three independent experiments.

2-3. C2 セラミドによる cPLA₂ α 局在変化への影響

C2 セラミドを添加した状態においても、PAF 受容体からの Ca^{2+} シグナルはコントロールと違いが観察されなかったことから、次に我々は、C2 セラミド添加が、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇によって引き起こされる cPLA₂ α の細胞質から核周辺部への局在変化に影響を与えている可能性を考えた。そこで、蛍光タンパク質 GFP を cPLA₂ α に融合させたキメラタンパク質を CHO-W11A 細胞に発現さ

せ、PAF 刺激および A23187 刺激による GFP-cPLA₂α の局在変化を観察した。PAF 刺激では、刺激後数秒から 30 秒以内で GFP-cPLA₂α の局在変化が観察されるが、C2 セラミドを 30 分間前処理した後 PAF 刺激を行うと、PAF 単独刺激時に見られていた GFP-cPLA₂α の局在変化が阻害された (Fig. 7A)。一方、A23187 刺激では、C2 セラミド存在下でも GFP-cPLA₂α の局在変化が観察された (Fig. 7B)。つまり、C2 セラミド処置は、PAF 刺激時の cPLA₂α の局在変化を抑制することで、酵素活性を発揮できない状態にしていることが示された。

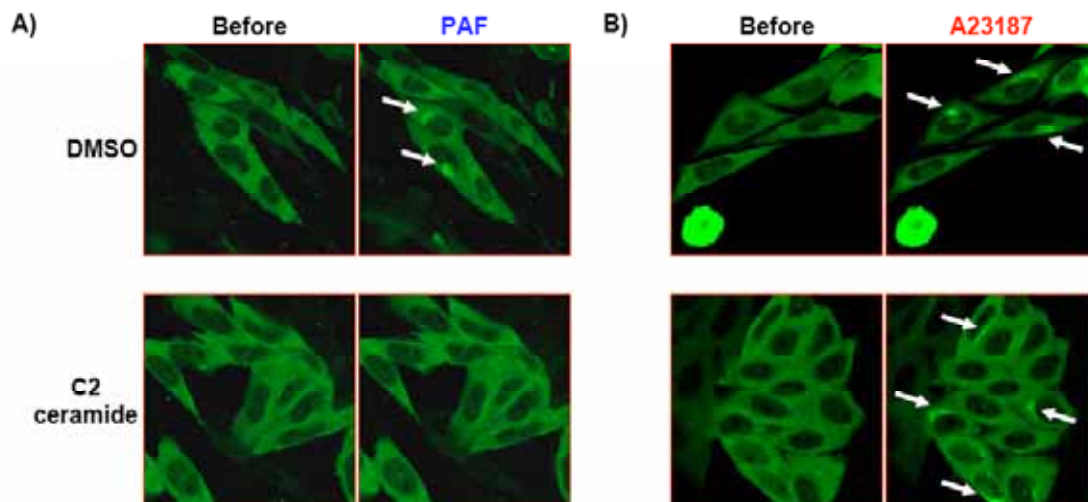


Fig. 7 Effect of C2 ceramide on PAF- or A23187-induced translocation of GFP-cPLA₂α in CHO-W11A cells.

CHO-W11A cells transiently transfected with the expression vector for GFP-cPLA₂α were pretreated with 30 μM C2 ceramide for 30 min, and then cells were stimulated with 100 nM PAF (A) or 5 μM A23187 (B). The pictures are at the time of 1 min after stimulation. Data are representative of four independent experiments.

2-4. 様々なセラミドによるアラキドン酸遊離への影響

セラミドは、アシル基を構成する炭素数の違いで多くの類似化合物が存在する。C2 セラミドは、最も膜透過性の高いセラミドであるが、その他にも、C6 (N-ヘキサノイル)や C8 (N-オクタノイル)も、細胞膜透過性のセラミドである。そこで、C2 セラミドで観察された現象が、他のセラミド分子でも観察されるか検討した。その結果、C6 セラミドも C8 セラミドも、C2 セラミドと同様の挙動を示し、PAF 刺激によるアラキドン酸遊離は抑制し、A23187 刺激によるアラキドン

酸遊離は増強する現象が観察された (Fig. 8)。また、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇への影響や、GFP-cPLA₂ α の局在変化への影響も、C2 セラミドと同様の結果であった (data not shown)。

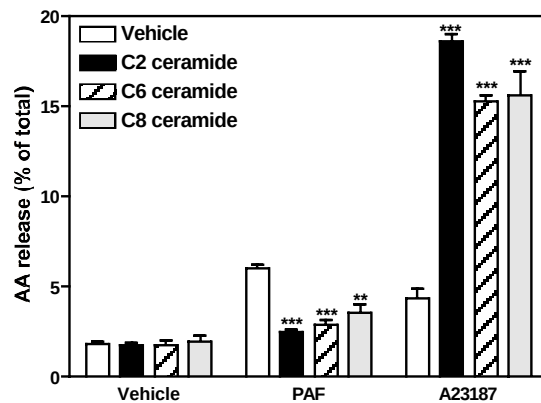


Fig. 8 Effects of various ceramides on PAF- or A23187-induced AA release from CHO-W11A cells.

CHO-W11A cells were pretreated with 30 μM C2 ceramide, 30 μM C6 ceramide, or 30 μM C8 ceramide for 30 min, and then cells were stimulated with 100 nM PAF or 5 μM A23187 for 30 min. Data represent means $\pm$ S. E. M. of three independent experiments and each performed in duplicate. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, significantly different from the vehicle-treated cells.

次に、内在性のセラミド量を変化させた時の cPLA₂ α 活性への影響を調べるため、セラミドをスフィンゴシンへと代謝するセラミダーゼの阻害剤・D-erythro-MAPP を用いて検討を行った。D-erythro-MAPP は、セラミドの代謝を阻害することで、細胞内のセラミド量が増大することが報告されている (Bielawska et al., 1996)。D-erythro-MAPP (30 μM) を 3 時間前処置し、その後 PAF 刺激と A23187 刺激を行ったところ、PAF 刺激によるアラキドン酸遊離は変化がなく、A23187 刺激のアラキドン酸遊離は増大するという結果が得られた (Fig. 9)。A23187 刺激の結果は、細胞外からセラミド添加をした時と同様の結果であったが、PAF 刺激では細胞外からのセラミド添加時の結果と異なった結果となった。このことから、セラミド自身が作用して PAF 刺激時のアラキドン酸遊離を抑制するのではなく、セラミドが細胞内でスフィンゴシンに代謝されることで抑制効果を発揮する可能性が考えられた。

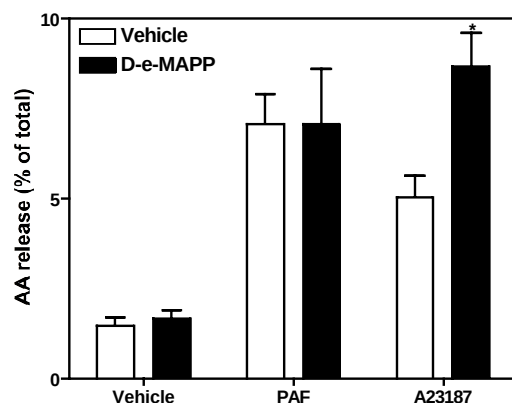


Fig. 9 Effect of D-erythro-MAPP on PAF- or A23187-induced AA release from CHO-W11A cells. CHO-W11A cells were pretreated with 30 μ M D-erythro-MAPP for 3 hr, and then cells were stimulated with 100 nM PAF or 5 μ M A23187 for 30 min. 3 H levels in supernatants were calculated as a percentage of the total incorporation of [3 H] AA. Data represent means $\pm$ S. E. M. of three independent experiments and each performed in duplicate. * $P < 0.05$, significantly different from the vehicle-treated cells.

2-5. セラミド代謝の検出とスフィンゴシンによるアラキドン酸遊離への影響

そこで、細胞外からのセラミド添加により、セラミドがどのように代謝されるか検討した。C6 セラミド (30 μ M) を 30 分間前処理したあと、PAF 刺激あるいは A23187 刺激を 30 分間行った後の細胞内脂質を抽出し、TLC を用いて検出したところ、PAF 刺激時において、スフィンゴシンへの代謝量の亢進が観察された (Fig. 10)。一方、A23187 刺激では、スフィンゴシン量は無刺激時と同程度であった。スフィンゴシンは、L929 細胞において cPLA $_2\alpha$ 活性を抑制することが報告されている (Nakamura et al., 2004)。CHO-W11A 細胞においてもスフィンゴシンが cPLA $_2\alpha$ 活性を抑制するか検討したところ、PAF 刺激によるアラキドン酸遊離も A23187 刺激によるアラキドン酸遊離も、スフィンゴシン添加により有意に抑制された (Fig. 11)。これらの結果より、PAF 刺激時のセラミド存在下でのアラキドン酸遊離の抑制は、スフィンゴシンへの代謝亢進が原因であることが示唆された。

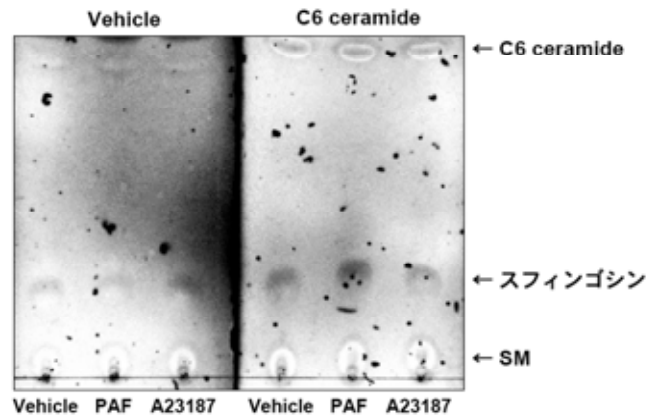


Fig. 10 Detection of sphingosine in CHO-W11A cells.

CHO-W11A cells were pretreated with 30 μ M C6 ceramide for 30 min, and then cells were stimulated with 100 nM PAF or 5 μ M A23187 for 30 min. Lipids were separated by TLC. Lipids spots were detected by the dilute sulfuric acid. Data are representative of two independent experiments.

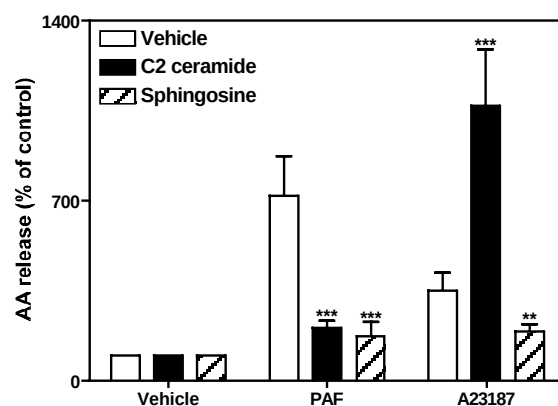


Fig. 11 Effect of sphingosine on PAF- or A23187-induced AA release from CHO-W11A cells.

CHO-W11A cells were pretreated with 30 μ M C2 ceramide or 30 μ M sphingosine for 30 min, and then cells were stimulated with 100 nM PAF or 5 μ M A23187 for 30 min. The levels of AA release expressed as a percentage of the each vehicle-treated cells. Data represent means $\pm$ S. E. M. of four independent experiments and each performed in duplicate. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, significantly different from the vehicle-treated cells.

2-6. セラミド添加による cPLA₂ α 、ERK のリン酸化への影響

PAF 刺激による cPLA₂ α の活性化は、Gq タンパク質を介したシグナル伝達と Gi タンパク質を介したシグナル伝達によって引き起こされる。C2 セラミド添加

によるアラキドン酸遊離の抑制が、Gi タンパク質からの MAPK のリン酸化シグナルを抑制することで起こっている可能性を考え、Gi タンパク質の阻害剤である PTX を用いて検討した。その結果、PAF 刺激によって起こるアラキドン酸遊離は、PTX 前処置（100 ng/mL、18 時間前処置）ではほとんど抑制されず、C2 セラミドと PTX の併用処置群では、C2 セラミド単独処置群と比べ、アラキドン酸遊離の抑制効果に違いが見られなかった（Fig. 12）ことから、Gi タンパク質のアラキドン酸遊離への寄与は大きくないことがわかる。

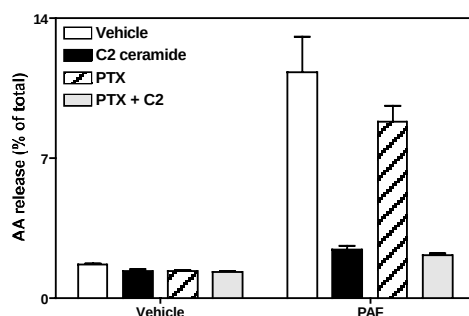


Fig. 12 Effect of PTX, an inhibitor of Gi protein, on PAF-induced AA release from CHO-W11A cells.

CHO-W11A cells were pretreated with 100 ng/mL PTX for 18 hr and/or 30 μ M C2 ceramide for 30 min, and then cells were stimulated with 100 nM PAF for 30 min. 3 H levels in supernatants were calculated as a percentage of the total incorporation of [3 H] AA. Representative graph of two experiments are shown and the results are the average $\pm$ S.D. of triplicate.

cPLA $_2\alpha$ は、リン酸化を受けることによって酵素活性が大きく増大する (Lin et al., 1993; Leslie, 1997; Hefner et al., 2000; Muthalif et al., 2001; Xu et al., 2002)。PAF 刺激によるアラキドン酸遊離は、細胞内 Ca $^{2+}$ 濃度上昇に加え、キナーゼによるリン酸化シグナルによって cPLA $_2\alpha$ が活性化されることで引き起こされる (Honda et al., 1994; Hirabayashi et al., 1999; Ishii and Shimizu, 2000)。そこでどのようなキナーゼがアラキドン酸遊離に関与するか、各種キナーゼ阻害剤を用いて検討した。MEK/ERK 阻害剤として U0126、p38 MAPK 阻害剤として SB202190、PKC 阻害剤として GF109203x と Gö6976 をそれぞれ 10 μ M の濃度で用いた。その結果、U0126、GF109203x、Gö6976 を前処置した群で、PAF 刺激によるアラキドン酸遊離が抑制されたことから、PAF 刺激によるアラキドン酸遊離には、ERK と PKC が関与していることが確認された (Fig. 13)。

そこで次に、C2 セラミド添加によって cPLA₂α と ERK のリン酸化レベルにどのような影響を与えるかを、ウエスタンブロットを用いてそれぞれのリン酸化レベルを検出した。PAF 刺激により cPLA₂α と ERK のリン酸化が亢進し、C2 セラミドの前処置によって cPLA₂α と ERK のリン酸化は、完全ではないが抑制された (Fig. 14)。一方、A23187 刺激では、cPLA₂α も ERK リン酸化は検出されず、C2 セラミドの存在下でも大きな変化は観察されなかった。

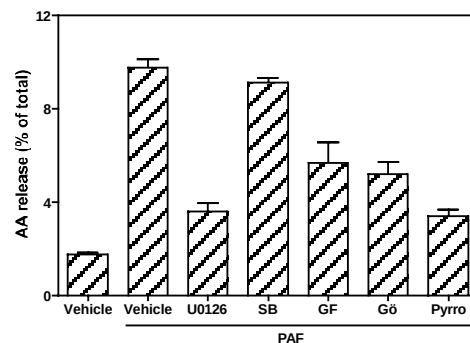


Fig. 13 Effects of kinase inhibitors on PAF-induced AA release from CHO-W11A cells.

CHO-W11A cells were pretreated with each kinase inhibitors (10 μM) or pyrrophenone (3 μM) for 30 min, and then cells were stimulated with 100 nM PAF for 30 min. U0126 is an inhibitor of MEK/ERK and SB201290 is an inhibitor of p38 MAPK. GF109203x and Gö6976 are inhibitors of PKC, and pyrrophenone is an inhibitor of cPLA₂α. Representative graph of two experiments are shown and the results are the average ± S.D. of triplicate.

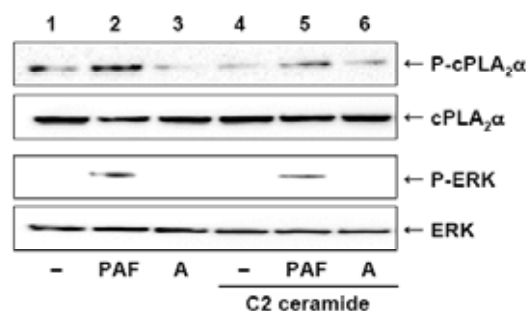


Fig. 14 Effect of C2 ceramide on PAF- or A23187-induced phosphorylation of cPLA₂α and ERK.

CHO-W11A cells were pretreated with 30 μM C2 ceramide for 30 min, and then cells were stimulated with 100 nM PAF or 5 μM A23187 (A) for 30 min. The picture shows the phosphorylation levels and protein levels of cPLA₂α or ERK; vehicle-treated cells in lane 1, PAF-treated cells in lane 2, A23187-treated cells in lane 3, C2 ceramide-treated cells in lane 4, C2 ceramide/PAF-treated cells in lane 5, C2 ceramide/A23187-treated cells in lane 6. Data are representative of two-three independent experiments.

2-7. CERK および C1P のアラキドン酸遊離への影響

セラミドは、スフィンゴシンのほかに、C1P にも代謝される。近年、この C1P が、cPLA₂α を活性化するという報告がいくつかなされている (Pettus et al., 2004; Nakamura et al., 2006)。C1P は、細胞内でセラミドがセラミドキナーゼ (CERK) によってリン酸化されることで産生される。CERK は、N 末がミリスチル化されており、膜結合型の局在を示す脂質キナーゼで、cPLA₂α と同様に、細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇によって活性化するという特徴を持つ酵素である (Sugiura et al., 2002; Mitsutake et al., 2004; Carre et al., 2004, Fig. 15)。そこで、細胞内での C1P 産生を亢進させるため、CHO-W11A 細胞にこの CERK を一過性に発現させ、各種刺激による cPLA₂α の活性化レベルを測定した。CERK を発現させただけの状態ではアラキドン酸遊離に大きな違いは観察されないが、Ca²⁺ 流入刺激である A23187 や PAF を用いて刺激すると、CERK 発現群でアラキドン酸遊離の有意な増大が観察された (Fig. 16)。また、これらの増大は、ピロフェノンにより完全に抑制された (data not shown) ことから、CERK 発現によるアラキドン酸遊離の増大は、cPLA₂α の活性化に起因するものであることが示された。

CERK 発現によるアラキドン酸遊離の増大が、C1P 量の増大に起因するかどうかを検証するため、蛍光色素がついたセラミド (NBD-C6 セラミド) を細胞に取り込ませて、C1P 産生量を検出した。その結果、コントロールベクターを導入した細胞群では、C1P の産生が検出されないのに対し、CERK 発現細胞群では、無刺激時でもわずかに C1P が産生され、それが PAF 刺激により顕著に増大するという結果が得られた (Fig. 17)。このことから、刺激により増大した C1P が、cPLA₂α を活性化しアラキドン酸遊離を増大させたことが考えられた。



Fig. 15 Primary structure of CERK.

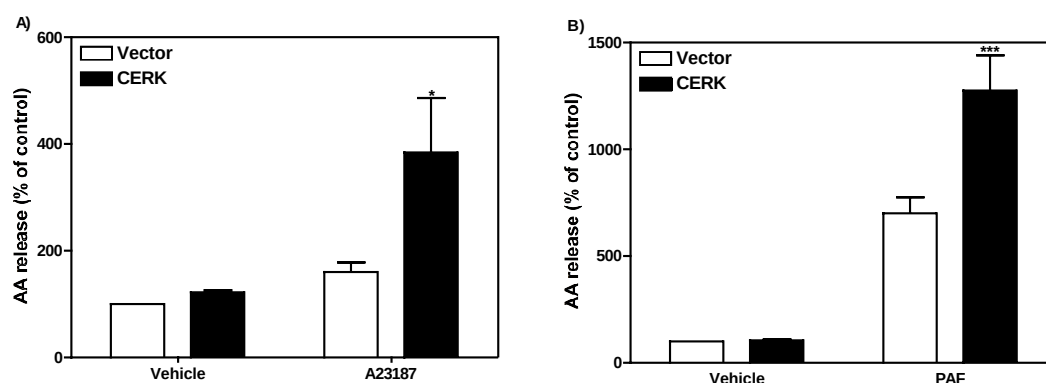


Fig. 16 Effect of CERK expression on PAF- or A23187-induced AA release from CHO-W11A cells.

CHO-W11A cells transiently transfected with the expression vector for CERK were stimulated with 5 μ M A23187 (A) or 100 nM PAF (B) for 30 min. The levels of AA release expressed as a percentage of the each vehicle-treated cells transfected with control vector. Data represent means $\pm$ S. E. M. of four (A) or eight (B) independent experiments and each performed in duplicate. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, significantly different from the vehicle-treated cells.

さらに、CERK 発現によるアラキドン酸遊離の増大に、C1P が関与するかを確認するため、C1P の前駆体であるセラミド量を減少させた状態で実験を行った。小胞体での *de novo* 合成経路の律速段階となる酵素、セリンパルミトイルトランスフェラーゼを欠損させると、細胞内のセラミドなど全てのスフィンゴ脂質量は、大きく低下することが報告されている (Hanada et al., 2000)。そこで、セリンパルミトイルトランスフェラーゼを阻害するミリオシン (1 μ M) を 18 時間前処理することで細胞内スフィンゴ脂質量を低下させ、その後、PAF 刺激を行った。その結果、CERK 発現群で観察されていたアラキドン酸遊離の増強が、ミリオシン処理によりほぼ完全に抑制される結果となった (Fig. 18)。これらの結果から、細胞内セラミドが C1P に代謝されることで、cPLA₂ α 活性を増大させることが明らかとなった。

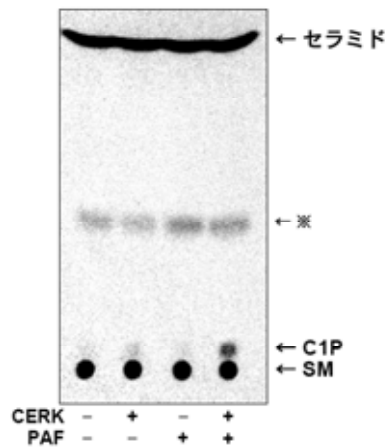


Fig. 17 Detection of C1P in CHO-W11A cells expressing CERK.

CHO-W11A cells transiently transfected with the expression vector for CERK were pretreated with 0.5 μ M NBD-C6 ceramide for 30 min, and then cells were stimulated with 100 nM PAF for 30 min. Lipids were separated by TLC. Sphingolipid spots were detected by using LAS1000-Plus. ※ is unidentified spot. Data are representative of three independent experiments.

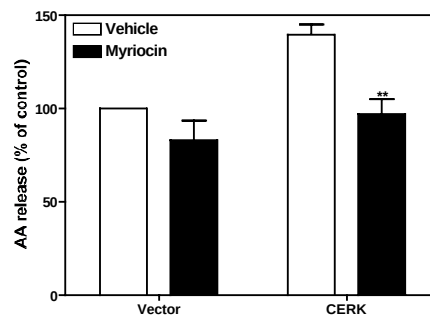


Fig. 18 Effect of myriocin on PAF-induced AA release from CHO-W11A cells expressed CERK.

CHO-W11A cells transiently transfected with the expression vector for CERK were pretreated with 1 μ M myriocin for 18 hr, and then cells were stimulated with 100 nM PAF for 30 min. The levels of AA release expressed as a percentage of the each PAF-treated cells transfected with control vector. Data represent means $\pm$ S. E. M. of three independent experiments and each performed in duplicate. ** $P < 0.01$, significantly different from the vehicle-treated cells

2-8. セラミド/A23187 刺激によるアラキドン酸遊離に対する各種阻害剤の影響

セラミドは、PKC 活性を制御することが報告されており (Kajimoto et al., 2001; Aschrafi et al., 2003)、またセラミドのリン酸化物である C1P も PKC を介した cPLA₂α 活性を制御することが報告されている (Nakamura et al., 2006)。そこで、C2 セラミドを前処置した際の A23187 刺激時によるアラキドン酸遊離の増大が、PKC などのキナーゼの活性化を介して起こっているか、各キナーゼの阻害剤を用いて検討した。その結果、C2 セラミド添加時に見られたアラキドン酸遊離の増大が、U0126、GF109203x、Gö6976 でそれぞれ 3 割程度抑制されたことから、C2 セラミド/A23187 刺激によるアラキドン酸遊離には、ERK, PKC を介していることが示された (Fig. 19)。

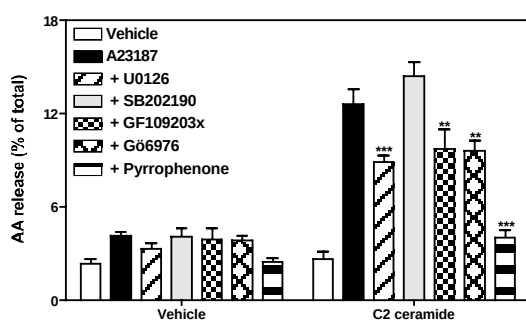


Fig. 19 Effects of kinase inhibitors on C2 ceramide/A23187-induced AA release from CHO-W11A cells.

CHO-W11A cells were pretreated with each inhibitors (10 μ M) or pyrrophenone (3 μ M) with or without 30 μ M C2 ceramide for 30 min, and then cells were stimulated with 5 μ M A23187 for 30 min. U0126 is an inhibitor of MEK/ERK, SB202190 is an inhibitor of p38 MAPK, GF109203x and Gö6976 are inhibitors of PKC, and pyrrophenone is an inhibitor of cPLA₂α. ³H levels in supernatants were calculated as a percentage of the total incorporation of [³H] AA. Data represent means $\pm$ S. E. M. of three-four independent experiments and each performed in duplicate. ** P < 0.01, *** P < 0.001, significantly different from the C2 ceramide/A23187-treated cells.

3. 考察

本研究では、細胞外から添加した C2 セラミドが、PAF 刺激時はスフィンゴシンに代謝されることでアラキドン酸遊離抑制効果を示すことを明らかにした。また、A23187 刺激ではスフィンゴシンへの代謝亢進が起こらず、おそらく C1P 産生の亢進によりアラキドン酸遊離が増大することを示した。

セラミドあるいはスフィンゴシンによる cPLA₂α 活性抑制機構として、cPLA₂α の局在変化の阻害とリン酸化の抑制という二つの経路によって引き起こされていることが考えられた。セラミドやスフィンゴシンによる局在変化抑制機構は明らかにされていないが、cPLA₂α の C 末端側の欠損変異体を用いた検討で、セラミドやスフィンゴシンによる局在変化抑制効果が、cPLA₂α の C 末端領域 (726-749) を介して起こっていることが報告されている (Nakamura et al., 2004)。セラミドやスフィンゴシンが cPLA₂α の C 末端領域と直接あるいは間接的に相互作用することで Ca²⁺流入シグナルに対する cPLA₂α の局在変化を抑制しているのかもしれない。また、スフィンゴシンが持続的な細胞内 Ca²⁺流入を抑制することが報告されている (Mathes et al., 1998)。今回用いた蛍光色素は、不可逆的な変化であるため、今回の実験系では細胞内 Ca²⁺濃度の増減を検出することはできていない。そのため、刺激により細胞内 Ca²⁺濃度は上昇しているように見えるが、セラミドあるいはスフィンゴシン存在下では、細胞内 Ca²⁺濃度上昇が弱い、もしくは一過性の上昇だけが起こり持続しないなどの現象が起こっているのかもしれない。その現象が起こることによって、細胞内 Ca²⁺濃度が cPLA₂α の局在変化を引き起こすのに十分な Ca²⁺濃度に達していなかった可能性も考えられる。今後は、細胞内 Ca²⁺濃度の増減を経時的に検出できる実験系で、セラミドおよびスフィンゴシン存在下の細胞内 Ca²⁺濃度の推移を明らかにすることが必要である。

また、PAF 受容体刺激で起こるアラキドン酸遊離は、Gi タンパク質の阻害剤である PTX 処置ではほとんど影響を受けなかったが、PKC 阻害剤の処置および ERK 阻害剤の処置によってアラキドン酸遊離が大きく抑制された。このことから、Gi タンパク質に非依存的なリン酸化シグナルがアラキドン酸遊離に影響を及ぼしていることが考えられる。おそらく Gq タンパク質からのシグナルによる細胞内 Ca²⁺濃度の上昇、あるいは PLC によって産生されるジアシルグリセロールが、PKC を活性化させたのかもしれない。セラミドが PKC を活性化する (Kajimoto et al., 2001; Aschrafi et al., 2003) という報告がある一方で、スフィンゴシンが PKC 活性を阻害するという報告 (Hannun et al., 1986) もある。さ

らに、マスト細胞の cell line である RBL-2H3 細胞では、C6 セラミドの存在下で抗原刺激を行うと、cPLA₂α を介したアラキドン酸遊離の抑制が起こることが報告されている (Kitatani et al., 2001)。彼らの報告では、セラミド前処置時の cPLA₂α 活性の抑制は、ERK のリン酸化が阻害されることで起こり、ERK のリン酸化を Na₃VO₄ で回復させると、cPLA₂α の酵素活性が抑制されるという結果である。我々の結果も、PAF 刺激によって ERK や cPLA₂α のリン酸化は亢進するが、セラミド前処置によってそのリン酸化は抑制されることを示しており、彼らの結果とも一致する。我々はさらに、この cPLA₂α 活性の抑制が、セラミドではなく、スフィンゴシンに代謝されて発揮される可能性も示した。よって、PAF 刺激によって代謝されたスフィンゴシンが、PKC の活性化を阻害し、その下流にある ERK のリン酸化を抑制することで、cPLA₂α の活性化を阻害したのかもしれない。加えて我々は、cPLA₂α の局在変化も抑制することで cPLA₂α 活性を抑制するという新たな可能性を提唱した。これらを併せて考えると、セラミド存在下での PAF 刺激時のアラキドン酸遊離の抑制は、cPLA₂α のリン酸化シグナルの抑制と、局在変化の抑制という二つの抑制機構が働くことで顕著な cPLA₂α 活性の抑制につながったのかもしれない。今後は、PAF 刺激による PKC の活性化とセラミド、スフィンゴシンとの関連を明らかにしていく必要がある。

セラミドからスフィンゴシンへの代謝を阻害するため、セラミダーゼ阻害剤である D-erythro-MAPP を用いて検討したところ、D-erythro-MAPP 前処置に C2 セラミドを添加しても、予想に反して PAF 刺激時のアラキドン酸遊離抑制効果は阻害されなかった (data not shown)。セラミダーゼには、酸性、中性、アルカリ性の 3 種類のセラミダーゼが存在する (Bernardo et al., 1995; Tani et al., 2000; Mao et al., 2001; Delgado et al., 2006)。今回用いた D-erythro-MAPP は、このうちのアルカリ性セラミダーゼの阻害剤であるため (Bielawska et al., 1996)、1 つだけを阻害しても十分なスフィンゴシンへの代謝阻害効果が得られなかったのかもしれない。

PAF 受容体刺激が、セラミダーゼ活性を制御するという報告は、現時点では報告されておらず、我々の結果からも PAF 刺激によるセラミダーゼ活性の増大を明らかにできていない。しかしながら、NO によって誘導されるセラミダーゼの分解が PKC の活性化により抑制されること (Franzen et al., 2002)、PDGF や IGF、EGF などの受容体型チロシンキナーゼアゴニストがセラミダーゼ活性を増大させることが報告されている (Coroneos et al., 1995)。これらのことから、PKC やチロシンキナーゼによるリン酸化シグナルあるいはその下流に存在

する分子がセラミダーゼ活性を制御する可能性が考えられる。PAF 受容体刺激によるアラキドン酸遊離に、PKC が関与するという結果が得られており、また、PAF 刺激時と A23187 刺激時での ERK のリン酸化レベルに大きな違いがあることから、PAF 刺激による PKC あるいは ERK の活性化が、セラミダーゼを活性化しスフィンゴシンへの代謝を亢進させた可能性が考えられる。このリン酸化シグナルの違いが、PAF 刺激と A23187 刺激でのセラミド代謝を決定づける要因となっているのかもしれない。

今回の実験では、セラミドあるいはスフィンゴシン、C1P が、cPLA₂α に直接相互作用を及ぼすかどうかは検討していない。セラミドやスフィンゴシンは、cPLA₂α に直接結合しないことが報告されており (Pettus et al., 2004)、その一方で C1P においては、cPLA₂α の C2 ドメインと相互作用することや、in vitro において cPLA₂α 活性を直接増大することが報告されている (Pettus et al., 2004; Nakamura et al., 2006)。また、C1P は、cPLA₂α に対する直接作用だけではなく、PKC を介したリン酸化シグナルによっても cPLA₂α 活性を制御することが示されている (Nakamura et al., 2006)。この結果は、C1P への代謝亢進を想定している、C2 セラミド前処理時の A23187 刺激によるアラキドン酸遊離の増大が、PKC や ERK の阻害剤により部分的ではあるが抑制されるという本研究の結果とも一致している。また、ウサギの血小板において、C6 セラミド添加により Ca²⁺ 依存的に cPLA₂α の局在変化が亢進することでアラキドン酸遊離が増強することが報告されている (Kitatani et al., 2000)。さらに、セラミドのリン酸化体である C1P が cPLA₂α と相互作用し、cPLA₂α の酵素活性の増大や局在変化を引き起こすことも報告されている (Pettus et al., 2004; Nakamura et al., 2006)。本研究では、CERK 過剰発現時に C1P 産生の亢進が観察されている。通常状態の細胞で C1P 産生の亢進が起こっているかは確認できていないが、細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇によって活性化される CERK が、Ca²⁺ 流入刺激により細胞内での C1P 産生の亢進を引き起こすことが考えられる。この細胞内で増加した C1P が、cPLA₂α の局在変化の亢進や酵素活性の増強を引き起こすことが推測される。

まとめると、セラミド前処置後の PAF 刺激と A23187 刺激による cPLA₂α 活性の抑制や増強という相反する現象が、各刺激によるセラミド代謝の違いに起因することを示した。

第2章 リン酸化に依存しない cPLA₂α 活性制御機構における CaMK II の役割

1. 序論

Ca²⁺は、カルモジュリンとの相互作用を介して 100 種類以上の酵素を活性化させることができるセカンドメッセンジャーである。Ca²⁺によって活性が制御される酵素のひとつである、Ca²⁺/カルモジュリン依存性キナーゼ (CaMK) は、Ca²⁺シグナルをリン酸化シグナルへと変換し、様々なシグナル伝達を行う多機能性酵素として知られている (Ishida et al., 2003; Tombes et al., 2003)。この CaMK には、I~IV までのサブタイプが存在するが、そのうち CaMK II は、cPLA₂α のリン酸化を亢進するキナーゼとしての役割をもつことが報告されている (Muthalif et al., 1996, 2001)。cPLA₂α には、キナーゼによってリン酸化される部位が 3 ヶ所存在し、505 番目のセリン残基は ERK/p38 MAPK によってリン酸化を受け (Lin et al., 1993)、727 番目のセリン残基は、MNK1 によってリン酸化を受ける (Hefner et al., 2000) ことが報告されている。この CaMK II によってリン酸化される部位は 515 番目のセリン残基である (Muthalif, et al., 2001) が、この新たに見つかった 515 番目のセリン残基が、酵素活性にどのような影響を及ぼすか明らかとなっていない。また、CaMK II の阻害により、血管平滑筋細胞において、ノルエピネフリンやカルシウムイオノフォア刺激による cPLA₂α の核膜への局在変化が抑制されるという報告も得られている (Fatima et al., 2003) が、515 番目のセリン残基との関わりは明らかにされていない。そこで本研究では、515 番目の cPLA₂α 活性および局在変化への影響を明らかにすべく、515 番目のセリン残基をアラニン残基に変えた変異体を用いて解析を行った。また、CaMK II 阻害剤・KN-93 による cPLA₂α 局在変化抑制の機序を cPLA₂α の欠損変異体とコンピューターによるシミュレーションを用いて予測した。その結果、515 番目のセリン残基は、リン酸化による cPLA₂α 活性への影響は無いことが示された。また、KN-93 による cPLA₂α の局在変化抑制にも影響を与えなかった。この KN-93 による局在変化抑制作用は、CaMK II が、cPLA₂α の触媒ドメイン A 内に直接あるいは間接的に作用して起こっていることが示唆された (Shimizu et al., 2008)。

2. 結果

2-1. リン酸化部位変異体の cPLA₂α 活性への影響

cPLA₂α の 3 ヶ所のセリン残基をそれぞれアラニン残基に置換した変異体 (S505A, S515A, S727A) と、3 ヶ所すべてをアラニンに変えた変異体 (AAA) を作製した。また、ネガティブコントロールとして、cPLA₂α の活性中心 (Ser228, Sharp et al., 1994) をアラニン残基に置換した変異体 (S228A) も作製した。これら変異体の機能を解析するため、マウス繊維芽細胞 L929 の変異株である内在性 cPLA₂α の発現レベルが低い C12 細胞 (Hayakawa et al., 1993) を用いた。C12 細胞は、細胞への遺伝子導入効率が悪く、通常のベクターを一過性に導入しても十分量の目的タンパク質の発現が観察されないため (Shimizu et al., 2004)、ウイルス由来の複製開始因子 (EBNA-1) が組み込まれた pEB6 CAG ベクターを用いて細胞に遺伝子導入した。このベクターは、細胞分裂に伴い自分自身も複製することで、比較的長期間安定して目的タンパク質を発現させることのできる特徴を持つベクターである (Tanaka et al., 1999; Shimizu et al., 2004)。遺伝子導入した細胞を、約 1 週間の抗生物質による選択後に cPLA₂α の発現量をウエスタンブロットにより確認した。その結果、どの変異体も、WT と同程度の発現量を示した (Fig. 20)。また、この cPLA₂α の発現レベルは、親株である L929 細胞とほぼ同程度であった (data not shown)。

この pEB6 CAG ベクターによる発現系を用いて、各リン酸化部位の変異体の酵素活性を測定した。刺激として、カルシウムイオノフォア・A23187 (10 μM) と活性酸素種の一種で、cPLA₂α のリン酸化に関わるキナーゼ類の活性を亢進させることが報告 (Tournier et al., 1997; Han et al., 2003; Han et al., 2004; Nguyen et al., 2004) されている H₂O₂ (1 mM) を用いた。また、これらの刺激の組み合わせにより、L929 細胞で cPLA₂α 由来のアラキドン酸遊離が大きく増大することが報告されている (Taniguchi et al., 2006)。この刺激を用いて、cPLA₂α を発現させた C12 細胞を刺激したところ、WT においてはアラキドン酸遊離の顕著な増加がみられ、活性中心の変異体である S228A では、アラキドン酸遊離の大きな増大は見られなかった。また、S505A と S727A、AAA 変異体では、WT に比べそれぞれ 4 割～7 割程度のアラキドン酸遊離しか起こさなかったが、S515A 変異体では、WT と同程度のアラキドン酸遊離を引き起こした (Fig. 21)。この結果から、515 番目のセリン残基は、酵素活性には影響を与えないことが明らかとなった。

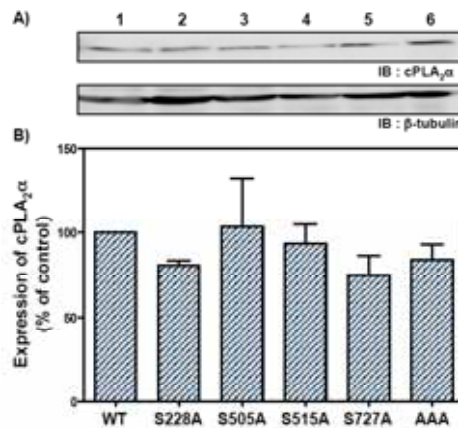


Fig. 20 Protein expression in C12 cells transfected with pEB6 CAG vector encoding wild-type and mutant cPLA₂α.

(A) C12 cells were transfected with the expression vectors for wild-type and mutant cPLA₂α. Panel A shows the protein levels of cPLA₂α (Upper panel) and β-tubulin (Lower panel); C12-cPLA₂α (wild-type, WT) cells in lane 1, C12-S228A cells in lane 2, C12-S505A cells in lane 3, C12-S515A cells in lane 4, C12-S727A cells in lane 5, and C12-AAA cells in lane 6. Data are from a typical experiment repeated 3 ~ 4 times. (B) The band signals of cPLA₂α proteins were quantified using a densitometer, and the ratios of cPLA₂α to β-tubulin were determined. The levels of cPLA₂α mutant proteins, that is expressed as a percentage of the control cells expressing the wild-type cPLA₂α (N = 3 ~ 4).

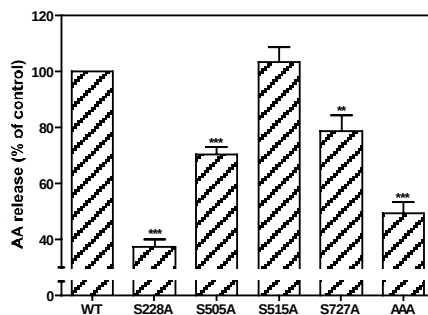


Fig. 21 A23187/H₂O₂-induced AA release from C12 cells expressing wild-type and mutant cPLA₂α.

The cells were stimulated with vehicle or A23187/H₂O₂ (10 μM and 1 mM, respectively) for 30 min. Data shows the results of net increases in the amount of AA released by A23187/H₂O₂ in the mutants are normalized as percentages of the control value for C12-cPLA₂α cells. Data are means ± S.E.M. for 3 ~ 4 independent experiments. ** P < 0.01, *** P < 0.001, significantly different from C12-cPLA₂α WT cells.

2-2. リン酸化部位変異体の A23187 刺激による cPLA₂α 局在変化への影響

次に、S515A の局在変化への影響を検証するため、GFP が融合した cPLA₂α キメラタンパク質を発現するベクターを構築した。C12 細胞は遺伝子導入効率が悪いので、1 視野で複数の GFP-cPLA₂α 発現細胞の挙動を見ることができる HEK293T 細胞に一過性に導入した。各リン酸化部位変異体を導入した HEK293T 細胞に、A23187 刺激 (10 μM) を行うと、1 分以内にすべての変異体で核膜周辺への局在変化が観察された (Fig. 22)。局在変化先や局在変化を引き起こすまでの時間に変異体間で大きな違いも見られなかったことから、cPLA₂α のリン酸化は、局在変化には影響を与えないことが示された。

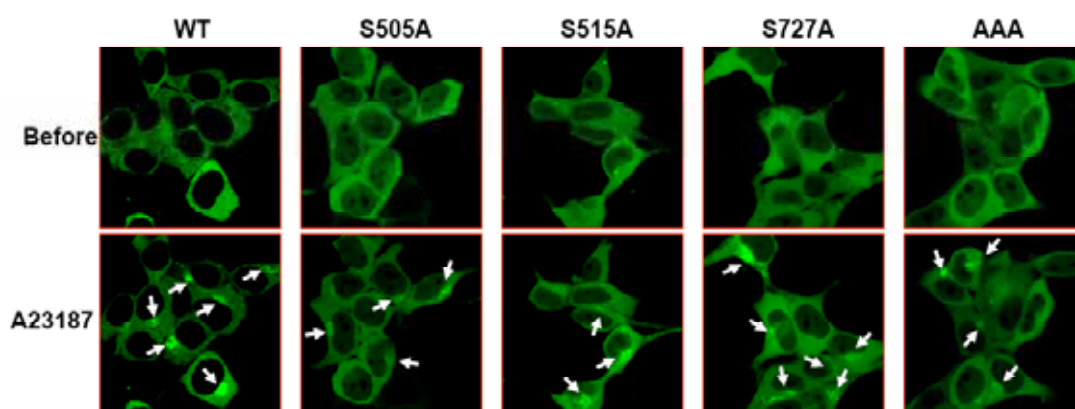


Fig. 22 A23187-induced translocation of wild-type and mutant cPLA₂α in HEK293T cells. HEK293T cells transiently transfected with the expression vector for GFP, GFP-cPLA₂α, or respective GFP-cPLA₂α-mutants were stimulated with 10 μM A23187. The pictures are at the time of 1 min after stimulation. Arrows indicate the typical areas showing an increase in fluorescence. Data are from a typical experiment repeated three times.

2-3. CaMK II 阻害による cPLA₂α 活性への影響

In vitro での PLA₂ 活性測定で、CaMK II の添加により cPLA₂α の酵素活性が増大することが報告されている (Muthalif et al., 2001) ことから、CaMK II が何らかの形で cPLA₂α の活性に影響を与えている可能性が考えられた。そこで、今回用いた C12 細胞においても、CaMK II が cPLA₂α の酵素活性に関与しているかを確認するため、CaMK II の阻害剤 (KN-93、10 μM) と CaMK II の上流に存在するカルモジュリンの阻害剤 (W-7、10 μM) を用いて、アラキドン酸遊離への

影響を検証した。その結果、阻害剤の添加により、WT や S515A、AAA 変異体においても有意にアラキドン酸遊離が抑制された (Fig. 23)。また、S505A や S727A においても同様の抑制効果であった (data not shown)。しかしながら、in vitro の PLA₂ 活性測定で、KN-93 と KN-62 (KN-93 とは構造の異なる CaMK II 阻害剤) は、cPLA₂ α の酵素活性を抑制しなかった (Table. 2)。このことは、KN-93 などの薬物自身が cPLA₂ α 活性を抑制しているのではなく、CaMK II の阻害効果が cPLA₂ α 活性抑制効果に結びついていることを示唆し、またこの cPLA₂ α 活性抑制効果は、リン酸化には無関係で起きていることが示された。

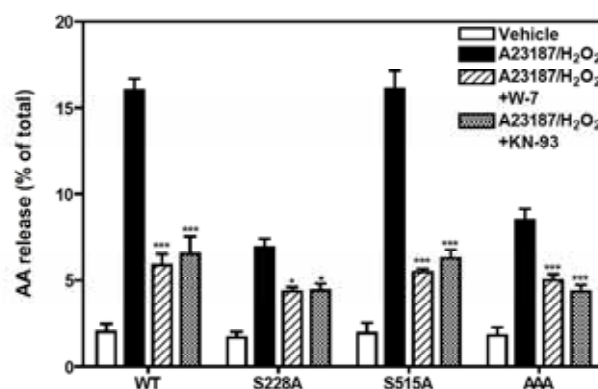


Fig. 23 Inhibitory effects of W-7 and KN-93 on A23187/H₂O₂-induced release of AA from C12 cells expressing wild-type and mutant cPLA₂ α .

C12 cells were transfected with each expression vector (wild-type and respective mutant of cPLA₂ α). The cells were pretreated with vehicle, 10 μ M W-7, or 10 μ M KN-93 for 30 min, and then stimulated with vehicle or A23187/H₂O₂ (10 μ M and 1 mM, respectively). Data are means $\pm$ S.E.M. for 3 ~ 4 independent experiments, each performed in triplicate. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, significantly different from that without the inhibitors.

PLA ₂ activity (dpm/15 µg protein)			
	Vehicle	KN-93	KN-62
Control vector	756 ± 28	644 ± 56	803 ± 158
Wild-type	4604 ± 635	4563 ± 282	4209 ± 241
S228A	863 ± 30	836 ± 46	744 ± 40
S515A	4555 ± 100	4438 ± 302	4646 ± 191
AAA	3173 ± 35	2760 ± 111	3049 ± 5

Table. 2 Activities of wild-type and mutants cPLA₂α in vitro and effects of KN-93 and KN-62 on the activity.

Cell lysates were prepared from HEK293T cells expressing the wild-type, S228A, S515A, and AAA mutant proteins and from the control vector-treated cells. The PLA₂ activity in the cell lysates (15 µg protein) were measured as described in Experimental Procedures in the presence of the indicated reagents. Data are means ± S.D. for duplicate determinations in a typical experiment involving two representative experiments.

2-4. CaMK II 阻害による cPLA₂α 局在変化への影響

CaMK II による cPLA₂α 活性制御機構の可能性として、cPLA₂α の局在変化の制御があげられる。血管平滑筋細胞では、CaMK II の阻害によりノルエピネフリン誘導の cPLA₂α の局在変化が阻害されることが報告されている (Fatima et al., 2003)。そこで、今回用いた実験系においても、CaMK II が cPLA₂α の局在変化を制御しているかどうかを検証した。その結果、A23187 刺激によって観察されていた cPLA₂α の局在変化が、KN-93 前処置により抑制された。また、リン酸化部位の変異体 (AAA) でも、WT と同様に局在変化が抑制された (Fig. 24A, B)。各リン酸化部位単独の変異体 (S505A, S515A, S727A) でも同様に局在変化が抑制された (data not shown)。この結果から、CaMK II 阻害による cPLA₂α の局在変化抑制は、リン酸化に依存しないことがわかる。CaMK II の局在変化制御の標的部位を調べるため、cPLA₂α の C 末端側からの欠損変異体を作製した (Fig. 24C)。cPLA₂α の局在変化には C2 ドメインが必須で、この部位に Ca²⁺ が結合することで局在変化が引き起こされる (Perisic et al., 1999; Gijon et al., 1999)。この C2 ドメインのみの変異体を用いて検討したところ、A23187 刺激により速やかに局在変化が起こり、しかもその変化は KN-93 によって阻害されなかった

(Fig. 24D)。一方、C2 ドメインより C 末端側の領域を含む変異体 ($\Delta 397-749$) では、KN-93 の前処置により cPLA₂ α の局在変化が抑制された (Fig. 24E)。さらに C 末端側を含む変異体 ($\Delta 530-749$) においても、KN-93 によって局在変化が抑制された (data not shown)。これらの結果から、CaMK II は、cPLA₂ α の触媒ドメイン A を介して cPLA₂ α の局在変化を制御する可能性が示唆された。

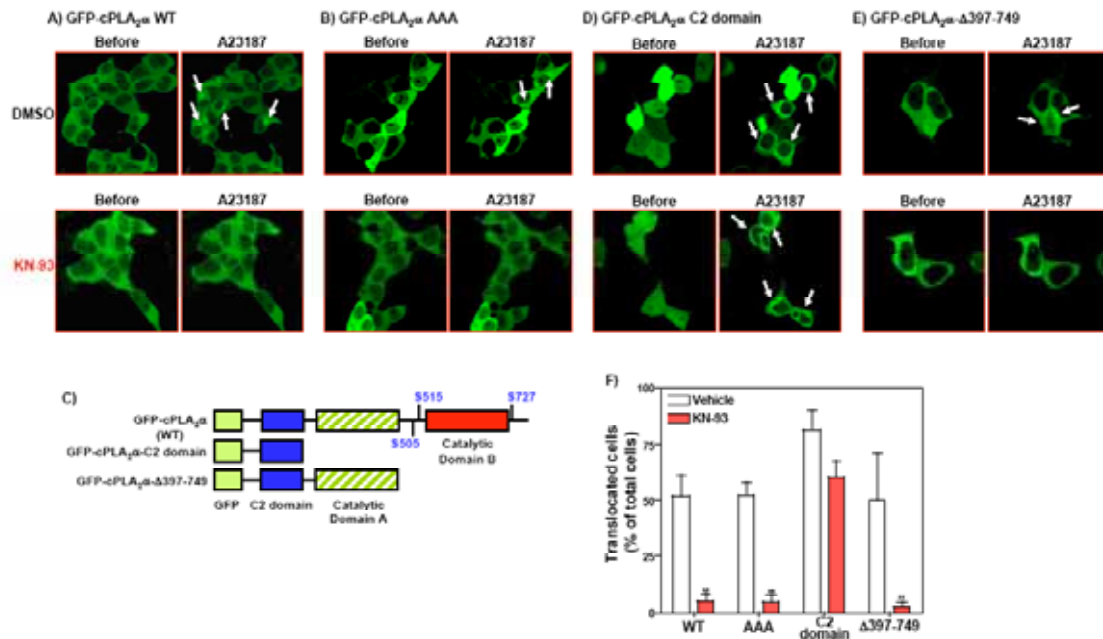


Fig. 24 Effect of KN-93 on A23187-induced translocation of wild-type and mutant cPLA₂ α in HEK293T cells.

HEK293T cells were transiently transfected with the expression vector for GFP-cPLA₂ α , or respective GFP-cPLA₂ α -mutants. The cells were pretreated with vehicle or 10 μ M KN-93 for 30 min, and then stimulated with 10 μ M A23187. The pictures are the at the time of 1 min after stimulation. Arrows indicate the typical areas showing an increase in fluorescence. Panels A and B show the response of wild-type cPLA₂ α and cPLA₂ α -AAA proteins, respectively. Data are from a typical experiment repeated 3 ~ 4 times. Panel C shows the structure of vectors expressing wild-type and mutant cPLA₂ α . Panels D and E show the response of cPLA₂ α -C2 domain and cPLA₂ α - $\Delta 397-749$, respectively. Panel F shows the results of quantitative analyses of the responses of wild-type cPLA₂ α and respective mutants, and the effect of KN-93. Data are from experiments repeated 3 ~ 4 times, and the 30 ~ 40 GFP-positive cells in each experiment were examined. ** P < 0.01, significantly different from that without KN-93.

2-5. コンピューターシミュレーションによる cPLA₂α と CaMK II の相互作用

CaMK II と cPLA₂α が直接相互作用する可能性を検証するため、コンピューターシミュレーションによる結合予測実験と静電相補性 (electrostatic complementary, EC) の計算を行った。CaMK II は哺乳類では、α、β、γ、δ の 4 つの異なる発現型で存在し、スプライシングの違いにより 38 種類のサブタイプが存在している (Tobimatsu and Fujisawa, 1989; Tombes et al., 2003)。また CaMK II は 12 の相同なサブユニットからなるオリゴマーとして存在している (Kolb et al., 1998)。In vitro の実験系において、CaMK IIα が、cPLA₂α をリン酸化することが報告されている (Muthalif et al., 2001)。そこで、CaMK IIα サブユニットと cPLA₂α の二つの分子の相互作用の可能性を、ZDOCK ドッキングシミュレーションにより予測した。その結果、CaMK IIα サブユニットと cPLA₂α が、直接相互作用する可能性があることが予測された (Fig. 25)。また、その相互作用領域を検索したところ、cPLA₂α の Gln160 ~ Gly174 で二つの分子の距離が最も近かった。この領域は、cPLA₂α の触媒ドメイン A 内に存在する領域であり、Fig. 24 の結果と併せて考えると、CaMK II は、cPLA₂α の触媒ドメイン A 内の Gln160 ~ Gly174 の領域で相互作用し、cPLA₂α の局在変化を制御している可能性が示された。さらに、cPLA₂α と CaMK II の相互作用の静電相補性を計算したところ、cPLA₂α と CaMK II が、お互いに反対の静電ポテンシャルをそれぞれの対象分子の表面に形成していた (Fig. 26)。この静電相補性に対するピアソンの積率相関係数、スピアマンの順位相関係数はそれぞれ 0.48 と 0.58 であり、ポジティブな相関であることから、CaMK II と cPLA₂α は、タンパク質-タンパク質相互作用を起こしうることが予測できた。



Fig. 25 Molecular interaction of cPLA₂α and CaM kinase IIα.

Orange, CaM kinase IIα; green, cPLA₂α; magenta, from Gln160 to Gly174 of cPLA₂α. CaM kinase IIα can interact with the catalytic domain A of cPLA₂α via Gln160 ~ Gly174.

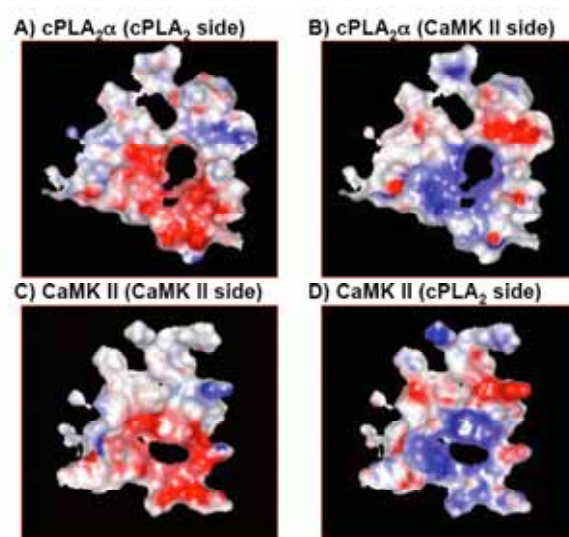


Fig. 26 The electrostatic potential on the molecular surfaces buried in the interface between cPLA₂α and CaM kinase IIα.

(A) EC on the buried molecular surface of cPLA₂α generated by charges on cPLA₂α, (B) that of cPLA₂α generated by charges on CaM kinase IIα, (C) that of CaM kinase IIα generated by charges on cPLA₂α, (D) that of CaM kinase IIα generated by charges on CaM kinase IIα. The most negative electrostatic potential throughout all spaces for each electrostatic field is indicated in red and the most positive electrostatic potential is indicated in blue. The protein-protein interfaces of CaM kinase IIα and cPLA₂α have anti-correlated (complementary) surface electrostatic potentials that were adequate to support our speculation. EC values of Pearson's and Spearman's correlation were 0.49 and 0.54, respectively. Since these EC values are significantly positive, we presume that CaM kinase II can directly interact with cPLA₂α.

3. 考察

本研究では、cPLA₂α の 3 番目のリン酸化部位である Ser515 のアラキドン酸遊離（酵素活性）と局在変化への影響、および CaMK II の cPLA₂α 活性に与える影響について検討した。Ser505 や Ser727 のリン酸化は、cPLA₂α 酵素活性を増大することが報告されている（Lin et al., 1993; Hefner et al., 2000）。Ser515 のリン酸化部位も、CaMK II によってリン酸化されることで cPLA₂α 酵素活性を制御する可能性が報告されているが（Muthalif et al., 2001; Fatima et al., 2003）、リン酸化部位の点変異体を用いた解析は行われておらず、Ser515 の酵素活性への影響は明らかとなっていなかった。今回用いた C12 細胞において、A23187/H₂O₂ 刺激が、CaMK II を活性化しているかどうかは検討していないが、CaMK II は細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇によって活性化される酵素であり（Colbran et al., 1988, 1989）、また、H₂O₂ 刺激によって CaMK II のリン酸化が亢進するという報告（Nguyen et al., 2004）もあることから、今回の A23187/H₂O₂ 刺激で CaMK II は活性化していたことが推測される。しかしながら、我々の点変異体を用いた解析では、過去の報告からの予想と異なり、Ser515 は、A23187/H₂O₂ 刺激によって起こるアラキドン酸遊離に影響を与えなかった。3 ヶ所のリン酸化部位をすべて変異させた AAA 変異体では、1 ヶ所のリン酸化部位変異体に比べてアラキドン酸遊離量がさらに低下しており、WT の約 40 %となっていた。このことは、cPLA₂α が複数ヶ所のリン酸化によって酵素活性が制御されうること示している。しかしながら、別のグループらの報告では、Ser505 と Ser727 の 2 ヶ所を変異させた場合でも、そのアラキドン酸遊離量は、WT の 30~40 %となっている（Das et al., 2003）ことから、cPLA₂α の活性を制御するリン酸化部位は、Ser505 と Ser727 であり、Ser515 は少なくとも今回の A23187/H₂O₂ 刺激による実験系では、cPLA₂α 酵素活性制御における役割を担っていないことが示唆される。

CaMK II の存在下で cPLA₂α の酵素活性が増大することが報告されており（Muthalif et al., 2001）、我々の阻害剤を用いた実験系でも、CaMK II の阻害により cPLA₂α の酵素活性が大幅に抑制されたことから、CaMK II が何らかの機序で cPLA₂α 活性を制御していることが示唆される。ここで興味深いことに、CaMK II 阻害によるアラキドン酸遊離抑制効果は、WT のみではなく、S515A や AAA 変異体など全てのリン酸化部位変異体においても観察された。つまり、このアラキドン酸遊離抑制効果は、cPLA₂α のリン酸化に依存しない経路で起きている可能性が考えられた。

血管平滑筋細胞において、CaMK II の阻害によりノルエピネフリン誘導の cPLA₂α の局在変化が阻害されることが報告されている (Fatima et al., 2003)。そこで局在変化への CaMK II の影響を検証したところ、CaMK II の阻害により、A23187 刺激によって誘導される cPLA₂α の局在変化が抑制された。この局在変化抑制効果も、WT のみではなく、S515A や AAA 変異体など全てのリン酸化部位変異体においても観察されたことから、cPLA₂α のリン酸化に依存しない経路で局在変化を制御していることが考えられる。さらに、C2 ドメインのみの欠損変異体では CaMK II 阻害による cPLA₂α の局在変化抑制効果は観察されなかった。一方、C2 ドメインから C 末端側を残した Δ397-749 変異体では、KN-93 処置により cPLA₂α の局在変化が抑制されたことから、CaMK II 阻害による局在変化抑制の機序は、cPLA₂α の触媒ドメイン A に対して作用することで発揮されることが示唆される。

cPLA₂α は、局在変化および膜との結合に C2 ドメインを必要とするが、それ以外にも、PIP₂ などのアニオン性脂質を含む基質と Ca²⁺ 非存在下でも結合することができる (Hixon et al., 1998; Mosior et al., 1998)。C2 ドメインは、Ca²⁺ と結合することで cPLA₂α の膜への局在変化を引き起こす他、膜周辺に存在する細胞骨格タンパク質ビメンチンと相互作用することも知られている (Nakatani et al., 2000)。また、cPLA₂α の触媒ドメインに存在するアニオン性残基 (Glu419, Glu420, Asp436, Asp438, Asp440) の変異体は、WT に比べ膜との親和性が高く、一方疎水性残基 (Ile399, Leu400, Leu522) の変異体は、膜との親和性が低い (Das and Cho, 2002)。このように、Ca²⁺ 依存的にホスファチジルコリンと結合する C2 ドメインとは独立して、触媒ドメインは膜と相互作用することから、CaMK II が触媒ドメインと直接あるいは間接的に相互作用することで、cPLA₂α と膜との結合親和性を増大させている可能性が考えられる。この相互作用が CaMK II の機能阻害で失われることで、cPLA₂α の細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇に応答する局在変化能が著しく損なわれるのかもしれない。S100 ファミリーに属する p11 タンパク質が、cPLA₂α の C 末端近傍に直接作用して酵素活性を抑制することが報告されており (Yao et al., 1999)、タンパク質-タンパク質相互作用による cPLA₂α の活性制御が起こることが明らかになりつつある。ドッキングシミュレーションの結果から、cPLA₂α と CaMK II は触媒ドメイン A と相互作用するという結果であるが、今後は、cPLA₂α と CaMK II が実際に直接の相互作用を起こすか免疫沈降法などを用いて明らかにし、さらに cPLA₂α のどの部位と相互作用するのかを明らかにしていく必要がある。

In vitro の実験系において、PKC や PKA が Ser505 以外の部位をリン酸化することが報告されている (Lin et al., 1993; Li et al., 2007) ことから、cPLA₂α にまだ同定されていない CaMK II あるいはその下流のシグナルによってリン酸化される部位が存在し、それが cPLA₂α 活性や局在変化を制御している可能性も考えられる。CaMK II によってリン酸化される配列は、cPLA₂α のアミノ酸配列上では Ser515 以外にいくつか存在しているが、実際それらが CaMK II によってリン酸化を受けるという報告は今までなく、本研究においても確かめられていない。コンピューターシミュレーションによる予測計算と点変異体を用いた解析を組み合わせ、新規リン酸化部位の存在も検討する必要がある。

まとめると、本研究では、cPLA₂α 活性制御における Ser515 リン酸化部位と CaMK II の役割について検討し、Ser515 は酵素活性に影響を与えないこと、CaMK II が、リン酸化に依存しない経路で、cPLA₂α の触媒ドメイン A と直接あるいは間接的に相互作用することで cPLA₂α の局在変化を制御する可能性があることを示した。

総括

本研究では、cPLA₂α 活性制御における細胞内スフィンゴ脂質代謝バランスの影響と、cPLA₂α 活性制御における Ser515 リン酸化部位と CaMK II の役割について検討した。セラミドを細胞外から添加した後に、PAF 刺激を行うと、PAF 刺激によるアラキドン酸遊離が抑制された。一方、A23187 刺激によるアラキドン酸遊離は増強された。この刺激の違いによる cPLA₂α 活性への影響の相違は、PAF 刺激時においては、セラミドがスフィンゴシンに代謝されることで cPLA₂α 活性を抑制していることが示された。また、細胞内 C1P 産生能を亢進させると、cPLA₂α 活性が増大したことから、A23187 刺激時のアラキドン酸遊離の増強は、C1P への代謝亢進によって引き起こされたことが推測される。つまり、細胞内でのスフィンゴ脂質代謝バランスの変化によって、cPLA₂α 活性が正にも負にも制御されることを示唆する。これらの結果は、生体内でのスフィンゴ脂質と cPLA₂α 活性への影響を明らかにする上で、重要な知見となることが考えられる。今後、スフィンゴシンや C1P 以外のスフィンゴ脂質における cPLA₂α 活性への影響についてのさらなる検討が望まれる。

cPLA₂α Ser515 は、CaMK II によってリン酸化される部位であるが、点変異体を用いた解析から、この部位のリン酸化は酵素活性や局在変化に影響を及ぼさないことが示された。しかしながら、CaMK II の阻害によってアラキドン酸遊離が大きく減少し、また、cPLA₂α の局在変化が抑制された。その局在変化抑制効果は、cPLA₂α の C2 ドメインのみの変異体では観察されず、触媒ドメイン A を含む変異体で観察された。これらの結果は、cPLA₂α の触媒ドメイン A が局在変化やタンパク質-タンパク質相互作用において重要な領域である可能性を示唆するものであり、この触媒ドメイン A が、cPLA₂α 活性調節の新たな役割を担うことが考えられる。今後、CaMK II と cPLA₂α との直接相互作用の検討、また、cPLA₂α の局在変化を制御する、CaMK II と相互作用するアミノ酸残基の特定が望まれる。

本研究によって、cPLA₂α 活性制御機構における新たな知見を提案することができた。cPLA₂α 活性は、アレルギー性気道過敏症、リウマチ関節炎、肺線維症、さらに、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患など様々な症状の原因となる。本研究の結果から、cPLA₂α 活性を制御する新規メカニズムの存在が、これら疾患に対する治療薬開発の有用なツールとなることが望まれる。

参考文献.

- Aschrafi A, Franzen R, Shabahang S, Fabbro D, Pfeilschifter J, and Huwiler A. Ceramide induces translocation of protein kinase C α to the Golgi compartment of human embryonic kidney cells by interacting with the C2 domain. *Biochim Biophys. Acta.* 1634, 30-39, 2003.
- Balsinde J and Dennis EA. Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 272, 16069-16072, 1997.
- Balsinde K, Balboa MA, Li W, Llopis J, and Dennis EA. Cellule regulation of cytosolic group IV phospholipase A₂ by phosphatidylinositol bisphosphate levels. *Immunology.* 164, 5398-5402, 2000.
- Bernardo K, Hurwitz R, Zenk T, Desnick RJ, Ferlinz K, Schuchman EH, and Sandhoff K. Purification, characterization, and biosynthesis of human acid ceramidase. *J. Biol. Chem.* 270, 11098-11102, 1995.
- Bielawska A, Greenberg MS, Perry D, Jayadev S, Shayman JA, McKay C, and Hannun YA. (1*S*, 2*R*)-D-erythro-2-(*N*-Myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol as an inhibitor of ceramidase. *J. Biol. Chem.* 271, 12646-12654, 1996.
- Bligh EG and Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 39, 911-917, 1959.
- Bonventre JV, Huang Z, Taheri MR, O'Leary E, Li E, Moskowitz MA, and Sapirstein A. Reduced fertility and postischemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A₂. *Nature.* 390, 622-625, 1997.
- Carre A, Graf C, Stora S, Mechtcheriakova D, Csonga R, Urtz N, Billich A, Baumruker T, and Bornancin F. Ceramide kinase targeting and activity determined by its N-terminal pleckstrin homology domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 1215-1219, 2004.
- Clark JD, Schievella AR, Nalefski EA, and Lin LL. Cytosolic phospholipase A₂. *J. Lipid Mediat. Cell. Signal.* 12, 83-117, 1995.

- Colbran RJ, Fong YL, Schworer CM, and Soderling TR. Regulatory interactions of the calmodulin-binding, inhibitory, and autophosphorylation domain of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* 263, 18145-18151, 1988.
- Colbran RJ, Smith MK, Fong YL, Schworer CM, and Soderling TR. Regulatory domain of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* 264, 4800-4804, 1989.
- Coroneos E, Martinez M, McKenna S, and Kester M. Differential regulation of sphingomyelinase and ceramidase activities by growth factor and cytokines. *J. Biol. Chem.* 270, 23305-23309, 1995.
- Das S and Cho W. Roles of catalytic domain residues in interfacial binding and activation of group IV cytosolic phospholipase A_2 . *J. Biol. Chem.* 277, 23838-23846, 2002.
- Das S, Rafter JD, Kim KP, Gygi SP, and Cho W. Mechanism of group IVA cytosolic phospholipase A_2 activation by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 278, 41431-41442, 2003.
- Delgado A, Casas J, Llebaria A, Abad JL, and Fabrias G. Inhibitors of sphingolipid metabolism enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758, 1957-1977, 2006.
- Dennis EA. The growing phospholipase A_2 superfamily of signal transduction enzyme. *Trends Biochem. Sci.* 22, 1-2, 1997.
- Evans JH, Spencer DM, Zweifach A, and Leslie CC. Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A_2 translocation to internal membranes. *J. Biol. Chem.* 276, 30150-30160, 2001.
- Fatima S, Yaghini FA, Ahmed A, Khandekar Z, and Malik KU. CaM kinase $\text{II}\alpha$ mediates norepinephrine-induced translocation of cytosolic phospholipase A_2 to the nuclear envelope. *J. Cell Sci.* 116, 353-365, 2003.

- Franzen R, Fabbro D, Aschrafi A, Pfeilschifter J, and Huwiler A. Nitric oxide induces degradation of the neutral ceramidase in rat renal mesangial cells and is counterregulated by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 277, 46184-46190, 2002.
- Gijon MA, Spencer DM, Kaiser AL, and Leslie CC. Role of phosphorylation sites and the C2 domain in regulation of cytosolic phospholipase A₂. *J. Cell Biol.* 145, 1219-1232, 1999.
- Gomez-Munoz A. Ceramide-1-phosphate : a novel regulator of cell activation. *FEBS Lett.* 28186, 562, 5-10, 2004.
- Han HJ, Lim MJ, and Lee YJ. Oxalate inhibits renal proximal tubule cell proliferation via oxidative stress, p38 MAPK/JNK, and cPLA₂ signaling pathways. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 287, C1058-C1066, 2004.
- Han WK, Sapirstein A, Hung CC, Alessandrini A, and Bonventre JV. Cross-talk between cytosolic phospholipase A₂ α (cPLA₂ α) and secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) in hydrogen peroxide-induced arachidonic acid release in murine mesangial cells. *J. Biol. Chem.* 278, 24153-24163, 2003.
- Hanada K, Nishijima M, Fujita T, and Kobayashi S. Specificity of inhibitors of serine palmitoyltransferase (SPT), a key enzyme in sphingolipid biosynthesis, in intact cells. *Biochem. Pharmacol.* 59, 1211-1216, 2000.
- Hannun YA, Loomis CR, Merrill AH, and Bell RM. Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding *in vitro* and in human platelets. *J. Biol. Chem.* 261, 12604-12609, 1986.
- Hannun YA. Function of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science.* 274, 1855-1859, 1996.
- Hayakawa M, Ishida N, Takeuchi K, Shibamoto S, Hori T, Oku N, Ito F, and Tsujimoto M. Arachidonic acid-selective cytosolic phospholipase A₂ is crucial in the cytotoxic action of tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* 268, 11290-11295, 1993.

- Hefner Y, Borsch-Haubold AG, Murakami M, Wilde JI, Pasquet S, Schieltz D, Gfomashchi F, Yates III JR, Armstrong CG, Paterson A, Cohen P, Fukunaga R, Hunter T, Kudo I, Watson SP, and Gelb MH. Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A₂ by MNK1-related protein kinases. *J. Biol. Chem.* 275, 37542-37551, 2000.
- Hegen M, Sun L, Uozumi N, Kume K, Goad ME, Nickerson-Nutter CL, Shimizu T, and Clark JD. Cytosolic phospholipase A₂ α -deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis. *J. Exp. Med.* 197, 1297-1302, 2003.
- Hirabayashi T, Kume K, Hirose K, Yokomizo T, Iino M, Itoh H, and Shimizu T. Critical duration of intracellular Ca²⁺ response required for continuous translocation and activation of cytosolic phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 274, 5163-5169, 1999.
- Hirabayashi T and Shimizu T. Localization and regulation of cytosolic phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta.* 1488, 124-138, 2000.
- Hirabayashi T, Murayama T, Shimizu T. Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A₂. *Biol. Pharm. Bull.* 8, 1168-1173, 2004.
- Hixon MS, Ball A, and Gelb MH. Calcium-dependent and -independent interfacial binding and catalysis of cytosolic group IV phospholipase A₂. *Biochemistry.* 37, 8516-8526, 1998.
- Honda Z, Takano T, Gotoh Y, Nishida E, Ito K, and Shimizu T. Transfected platelet-activating factor receptor activates mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP kinase kinase in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 269, 2307-2315, 1994.
- Huwyler A, Johansen B, Skarstad A, and Pfeilschifter J. Ceramide binds to the CaLB domain of cytosolic phospholipase A₂ and facilitates its membrane docking and arachidonic acid release. *FASEB J.* 15, 7-9, 2001.
- Ishii S and Shimizu T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog. Lipid Res.* 39, 41-82, 2000.

- Ishida A, Shigeri Y, Taniguchi T, and Kameshita I. Protein phosphatases that regulate multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases: from biochemistry to pharmacology. *Pharmacol. Ther.* 100, 291-305, 2003.
- Izumi T and Shimizu T. Platelet-activating factor receptor: gene expression and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta.* 1259, 317-333, 1995.
- Kajimoto T, Ohmori S, Shirai Y, Sakai N, and Saito N. Subtype-specific translocation of the δ subtype of protein kinase C and its activation by tyrosine phosphorylation induced by ceramide in HeLa cells. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1769-1783, 2001.
- Kalyvas A and David S. Cytosolic phospholipase A_2 plays a key role in the pathogenesis of multiple sclerosis-like disease. *Neuron.* 41, 323-335, 2004.
- Kitatani K, Oka T, Murata T, Hayama M, Akiba S, and Sato T. Acceleration by ceramide of calcium-dependent translocation of phospholipase A_2 from cytosol to membranes in platelets. *Arch. Biochem. Biophys.* 382, 296-302, 2000.
- Kitatani K, Akiba S, Hayama M, and Sato T. Ceramide accelerated dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 to decrease prostaglandin D_2 production in RBL-2H3 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 395, 208-214, 2001.
- Klivenyi P, Beal MF, Ferrante RJ, Andreassen OA, Wermer M, Chin MR, and Bonventre JV. Mice deficient in group IV cytosolic phospholipase A_2 are resistant to MPTP neurotoxicity. *J. Neurochem.* 71, 2634-2637, 1998.
- Kolb SJ, Hudmon A, Ginsberg TR, and Waxham MN. Identification of domains essential for the assembly of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II holoenzymes. *J. Biol. Chem.* 273, 31555-31564, 1998.
- Leslie CC. Properties and regulation of cytosolic phospholipase A_2 . *J. Biol. Chem.* 272, 16706-16712, 1997.
- Lin LL, Lin AY, and Knopf JL. Cytosolic phospholipase A_2 is coupled to hormonally regulated release of arachidonic acid. *Cell Biol.* 89, 6147-6151, 1992.

- Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, and Davis RJ. cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell*. 72, 269-278, 1993.
- Li Q, Subbulakshmi V, Oldfield CM, Aamir R, Weyman CM, Wolfman A, Cathcart MK. PKC α regulates phosphorylation and enzymatic activity of cPLA₂ in vitro and in activated human monocytes. *Cell. Signal*. 19, 359-366, 2007.
- Mao C, Xu R, Szulc ZM, Bielawska A, Galadari SH, and Obeid LM. Cloning and characterization of a novel human alkaline ceramidase. *J. Biol. Chem*. 276, 26577-26588, 2001.
- Mathes C, Fleig A, and Penner R. Calcium release-activated calcium current (I_{CRAC}) is a direct target for sphingosine. *J. Biol. Chem*. 273, 25020–25030 1998.
- McCoy AJ, Epa VC, and Colman PM. Electrostatic complementarity at protein/protein interfaces. *J. Mol. Biol*. 268, 570-584, 1997.
- Mitsutake S, Kim TJ, Inagaki Y, Kato M, Yamashita T, and Igarashi Y. Ceramide kinase is a mediator of calcium-dependent degranulation in mast cells. *J. Biol. Chem*. 279, 17570-17577, 2004.
- Mosior M, Six DA, and Dennis EA. Group IV cytosolic phospholipase A₂ binds with high affinity and specificity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate resulting in dramatic increases in activity. *J. Biol. Chem*. 273, 2184-2191, 1998.
- Murakami M. Hot topics in phospholipase A₂ field. *Biol. Pharm. Bull*. 8, 1179-1182, 2004.
- Muthalif MM, Benter IF, Uddin MR, and Malik KU. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II α mediates activation of mitogen-activated protein kinase and cytosolic phospholipase A₂ in norepinephrine-induced arachidonic acid release in rabbit aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem*. 271, 30149-30157, 1996.
- Muthalif MM, Hefner Y, Canaan S, Harper J, Zhou H, Parmentier JH, Aebersold R, Gelb MH, and Malik KU. Functional interaction of calcium-/calmodulin-dependent protein kinase II and cytosolic phospholipase

- A₂. J. Biol. Chem. 276, 39653-39660, 2001.
- Nagase T, Uozumi N, Ishii S, Kita Y, Yamamoto H, Ohga E, Ouchi Y, and Shimizu T. A pivotal role of cytosolic phospholipase A₂ in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Nat. Med. 8, 480-484, 2000.
- Nakamura H, Hirabayashi T, Someya A, Shimizu M, and Murayama T. Inhibition of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A₂ alpha activity by D-erythro-sphingosine. Eur. J. Pharmacol. 484, 9-17, 2004.
- Nakamura H, Hirabayashi T, Shimizu M, and Murayama T. Ceramide-1-phosphate activates cytosolic phospholipase A₂α directly and by PKC pathway. Biochem. Pharmacol. 71, 850-857, 2006.
- Nakatani Y, Tanioka T, Sunaga S, Murakami M, and Kudo I. Identification of a cellular protein that functionally interacts with the C2 domain of cytosolic phospholipase A₂α. J. Biol. Chem. 275, 1161-1168, 2000.
- Nalefski EA, Sultzman LA, Martin DM, Kriz RW, Towler PS, Knopf JL, and Clark JD. Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A₂, a regulatory Ca²⁺-dependent lipid-binding domain and Ca²⁺-independent catalytic domain. J. Biol. Chem. 269, 18239-18249, 1994.
- Nguyen A, Chen P, and Cai H. Role of CaMK II in hydrogen peroxide activation of ERK1/2, p38 MAPK, HSP27 and actin reorganization in endothelial cells. FEBS Lett. 572, 307-313, 2004.
- Ono T, Yamada K, Chikazawa Y, Ueno M, Nakamoto S, Okuno T, and Seno K. Characterization of a novel inhibitor of cytosolic phospholipase A₂alpha, pyrrophenone. Biochem. J. 363, 727-735, 2002.
- Perisic O, Paterson HF, Mosedale G, Lara-Gonzalez S, and Williams RL. Mapping the phospholipid-binding surface and translocation determinants of the C2 domain from cytosolic phospholipase A₂. J. Biol. Chem. 274, 14979-14987, 1999.
- Pettus BJ, Bielawska A, Spiegel S, Roddy P, Hannun YA, and Chalfant CE. Ceramide kinase mediates cytokine- and calcium ionophore-induced

- arachidonic acid release. *J. Biol. Chem.* 278, 38206-38213, 2003.
- Pettus BJ, Bielawska A, Subramanian P, Wijesinghe DS, Maceyka M, Leslie CC, Evans JH, Freiberg J, Roddy P, Hannun YA, and Chalfant CE. Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 279, 11320-11326, 2004.
- Pfau JC, Walker EB, and Card GL. A comparison of the effects of lipopolysaccharide and ceramide on arachidonic acid metabolism in THP-1 monocytic cells. *Cell. Immunol.* 186, 38206-38213, 1998.
- Pyne S and Pyne NJ. Sphingosine 1- phosphate signaling in mammalian cells. *Biochem. J.* 349, 385-402, 2000.
- Qiu ZH, Gijon MA, Carvalho MS, Spencer DM. The role of calcium and phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂ in regulating arachidonic acid release in macrophages. *J. Biol. Chem.* 273, 8203-8211, 1998.
- Sato T, Kageura T, Hashizume T, Hayama M, Kitatani K, and Akiba S. Stimulation by ceramide of phospholipase A₂ activation through a mechanism related to the phospholipase C-initiated signaling pathway in rabbit platelets. *J. Biochem.* 125, 96-102, 1999.
- Sharp JD, Pickard RT, Chiou XG, Manetta JV, Kovacevic S, Miller JR, Varshavsky AD, Roberts EF, Striffler BA, and Brems DN. Serine 228 is essential for catalytic activities of 85-kDa cytosolic phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 269, 23250-23254, 1994.
- Shimizu M, Azuma C, Taniguchi T, Murayama T. Expression of cytosolic phospholipase A₂ α in murine C12 cells, a variant of L929 cells, induces arachidonic acid release in response to phorbol myristate acetate and Ca²⁺ ionophores, but not tumor necrosis factor- α . *J. Pharmacol. Sci.* 96, 324-332, 2004.

- Shimizu M, Matsumoto Y, Kurosawa T, Azuma C, Enomoto M, Nakamura H, Hirabayashi T, Kaneko M, Okuma Y, Murayama T. Release of arachidonic acid induced by tumor necrosis factor- α in the presence of caspase inhibition: evidence for a cytosolic phospholipase $A_2\alpha$ -independent pathway. *Biochem. Pharmacol.* 2008; in-press.
- Shimizu M, Nakamura H, Hirabayashi T, Suganami A, Tamura Y, Murayama T. Ser515 Phosphorylation-independent regulation of cytosolic phospholipase $A_2\alpha$ (cPLA $_2\alpha$) by calmodulin-dependent protein kinase: possible interaction with catalytic domain A of cPLA $_2\alpha$. *Cell. Signal.* 2008; in-press.
- Six DA and Dennis EA. Essential Ca^{2+} -independent role of the group IVA cytosolic phospholipase A_2 C2 domain for interfacial activity. *J. Biol. Chem.* 278, 23842-23850, 2003.
- Stephenson DT, Lemela CA, Selkoe DJ, and Clemens JA. Cytosolic phospholipase A_2 (cPLA $_2$) immunoreactivity is elevated in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Dis.* 3, 51-61, 1996.
- Sugiura M, Kono K, Liu H, Shimizugawa T, Minekura H, Spiegel S, and Kohama T. Ceramide kinase, a novel lipid kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 23294-23300, 2002.
- Tanaka J, Miwa Y, Miyoshi K, Ueno A, and Inoue H. Construction of Epstein-Barr Virus-based expression vector containing mini-OriP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 938-943, 1999.
- Tani M, Okino N, Mitsutake S, Tanigawa T, Izu H, and Ito M. Purification and characterization of a neutral ceramidase from mouse liver. *J. Biol. Chem.* 275, 3462-3468, 2000.
- Taniguchi T, Shimizu M, Nakamura H, Hirabayashi T, Fujino H, Murayama T. Hydrogen peroxide-induced arachidonic acid release in L929 cells; roles of Src, protein kinase C and cytosolic phospholipase $A_2\alpha$. *Eur. J. Pharmacol.* 546, 1-10, 2006.

- Taniguchi T, Shimizu M, Nakamura H, Hirabayashi T, Fujino H, Saito T, Murayama T. Vanadate-induced activation of cytosolic phospholipase A₂ α in L929 cells: Roles of tyrosine kinase, protein kinase C, and extracellular signal-regulated kinase. *Biochem. Pharmacol.* 73, 854-62, 2007.
- Tischfield JA. A reassessment of the low molecular weight phospholipase A₂ gene family in mammals. *J. Biol. Chem.* 272, 17247-17250, 1997.
- Tobimatsu T and Fujisawa H. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J. Biol. Chem.* 264, 17907-17912, 1989.
- Tombes RM, Faison MO, and Turbeville JM. Organization and evolution of multifunctional Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase genes. *Gene.* 322, 17-31, 2003.
- Tournier C, Thomas G, Pierre J, Jacquemin C, Pierre M, and Saunier B. Mediation by arachidonic acid metabolites of the H₂O₂-induced stimulation of mitogen-activated protein kinases (extracellular-signal-regulated kinase and c-Jun NH₂-terminal kinase). *Eur. J. Biochem.* 244, 587-595, 1997.
- Uozumi N, Kume K, Nagase T, Nakatani N, Ishii S, Tashiro F, Komagata Y, Maki K, Ikuta K, Ouchi Y, Miyazaki J, and Shimizu T. Role of cytosolic phospholipase A₂ in allergic response and parturition. *Nature.* 390, 618-622, 1997.
- Xu J, Weng YI, Simonyi A, Krugh BW, Liao Z, Weisman GA, Sun GY, and Simoni A. Role of PKC and MAPK in cytosolic PLA₂ phosphorylation and arachidonic acid release in primary murine astrocytes. *J. Neurochem.* 83, 259-270, 2002.
- Yao XL, Cowan MJ, Gladwin MT, Lawrence MM, Angus CW, and Shelhamer JH. Dexamethasone alters arachidonate release from human epithelial cells by induction of p11 protein synthesis and inhibition of phospholipase A₂ activity. *J. Biol. Chem.* 274, 17202-17208, 1999.

論文目録

主論文目録

1. Shimizu M, Nakamura H, Hirabayashi T, Suganami A, Tamura Y, Murayama T. Ser515 Phosphorylation-independent regulation of cytosolic phospholipase $A_2\alpha$ (cPLA $_2\alpha$) by calmodulin-dependent protein kinase: possible interaction with catalytic domain A of cPLA $_2\alpha$. **Cell. Signal.** **2008; in-press.**
2. Shimizu M, Matsumoto Y, Kurosawa T, Azuma C, Enomoto M, Nakamura H, Hirabayashi T, Kaneko M, Okuma Y, Murayama T. Release of arachidonic acid induced by tumor necrosis factor- α in the presence of caspase inhibition: evidence for a cytosolic phospholipase $A_2\alpha$ -independent pathway. **Biochem. Pharmacol.** **2008; in-press.**
3. Taniguchi T, Shimizu M, Nakamura H, Hirabayashi T, Fujino H, Saito T, Murayama T. Vanadate-induced activation of cytosolic phospholipase $A_2\alpha$ in L929 cells; role of tyrosine kinase, protein kinase C, and extracellular signal-regulated kinase. **Biochem Pharmacol.** **73, 854-862, 2007.**
4. Shimizu M, Azuma C, Taniguchi T, Murayama T. Expression of cytosolic phospholipase $A_2\alpha$ in murine C12 cells, a variant of L929 cells, induces arachidonic acid release in response to phorbol myristate acetate and Ca^{2+} ionophores, but not to tumor necrosis factor- α . **J. Pharmacol. Sci.** **96, 324-332, 2004.**

副論文目録

1. Taniguchi T, Shimizu M, Nakamura H, Hirabayashi T, Fujino H, Murayama T. Hydrogen peroxide-induced arachidonic acid release in L929 cells; roles of Src, protein kinase C and cytosolic phospholipase $A_2\alpha$. **Eur. J. Pharmacol.** **546, 1-10, 2006.**
2. Nakamura H, Hirabayashi T, Shimizu M, Murayama T. Ceramide 1-phosphate activates cytosolic phospholipase $A_2\alpha$ directly and by PKC pathway. **Biochem. Pharmacol.** **71, 850-857, 2006.**
3. Nakamura H, Hirabayashi T, Someya A, Shimizu M, Murayama T. Inhibition of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase $A_2\alpha$ activity by D-erythro-sphingosine. **Eur. J. Pharmacol.** **484, 9-17, 2004.**

謝辞

本研究の遂行に際し、終始御指導御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院薬効薬理学研究室 村山俊彦教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、多大なる御協力、御助言を頂きました千葉大学大学院薬学研究院薬効薬理学研究室 藤野裕道准教授、中村浩之助教、平林哲也助教に厚く御礼申し上げます。

さらに、本論文を審査いただき、貴重な御助言を賜りました千葉大学大学院薬学研究院分子細胞生物學研究室 山口直人教授、高齢者薬剤学研究室 上野光一教授、微生物薬品科学研究室 山本友子教授、医学研究院生命情報科学研究室 田村裕准教授に深く感謝いたします。

また、本研究の遂行に際し、cPLA₂α選択的阻害剤 pyrrophenone を分与して頂きました塩野義製薬株式会社 花崎浩二博士、並びに、CERK 遺伝子を御供与して頂きました第一三共株式会社 古浜孝文博士、pEB6 CAG 発現ベクターを御供与して頂きました筑波大学 三輪佳宏先生に深く感謝いたします。さらに、コンピューターシミュレーションによるタンパク質相互作用予測計算において、多大なる御協力を頂きました千葉大学大学院医学研究院生命情報科学研究室 田村裕准教授、ならびに生命情報科学研究室の皆様にも厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究を通じ御協力を頂きました千葉大学大学院薬学研究院薬効薬理学研究室内の卒業生ならびに在校生の皆様にも深く感謝いたします。

本学位論文の審査は、千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学教授（薬学研究院）薬学博士 山口直人
副査 千葉大学教授（薬学研究院）薬学博士 上野光一
副査 千葉大学教授（薬学研究院）薬学博士、医学博士 山本友子
副査 千葉大学准教授（医学研究院）医学博士 田村裕