

氏名	山本 いくみ
学位(専攻分野)	博士 (薬学)
学位記番号	論薬博第624号
学位授与の日付	平成12年1月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Studies on Activation and Inhibition of Phospholipase D in Small Unilamellar Vesicles (脂質二重膜におけるバクテリア由来ホスホリパーゼDの活性化と阻害に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 半田哲郎 教授 中川照眞 教授 多賀 徹

論文内容の要旨

Phospholipase D (E. C. 3. 1. 4. 4.) (PLD) は動物細胞の細胞膜と細胞質ゾルの両画分に見いだされ、細胞内の情報伝達に関与することが明らかになってきている。しかし、単離された PLD を用いた研究は少なく、その活性制御メカニズムについてはほとんどわかっていない。筆者は、PLD 活性化メカニズムの基礎的研究として *Chromofuscus Streptomyces* 由来の PLD による egg yolk phosphatidylcholine (PC) リポソーム二分子膜 (small unilamellar vesicles: SUV) 上の PC の加水分解反応速度を測定し、 Ca^{2+} 濃度、反応生成物、中性脂質及び非基質性 SUV の効果について研究し、膜表面での PLD の活性化と阻害について考察した。

第 I 章 Ca^{2+} による膜表面ホスホリパーゼ D の活性化

PLD による PC 分解の検出は、コリン電極によりおこなった。反応生成物の 1 つであるコリンはコリンオキシダーゼにより酸化的に分解されるとき、酸素を消費する。その反応溶液中の溶存酸素濃度の変化を酸素電極で検出し、PLD 酵素反応の追跡をおこなった。PLD による PCSUV の加水分解初速度を Michaelis-Menten 式を用いて解析し、その見かけの最大速度 V_{max} (app) と見かけの Michaelis 定数 K_m (app) を求めた。これらのパラメーターの Ca^{2+} 濃度依存性について不均一系酵素反応速度論に基づいて解析し、水溶液中および膜表面における PLD と Ca^{2+} との解離定数をそれぞれ求めた。この結果、PLD と Ca^{2+} との親和性は、膜に結合している PLD の方が約 5 倍高く、これが酵素の活性化を決定していることが示された。

第 II 章 反応生成物 phosphatidic acid (PA) による PLD 活性の阻害と、中性脂質によるその緩和

PLD による加水分解は、反応開始数分間で PCSUV 外側表面単分子膜の PC の約 3% を PA に変換するが、その後、分解速度は急激に低下 (低活性状態) した。この原因が、溶液中でのコリンの蓄積や Ca^{2+} の欠乏ではないことは EDTA 添加実験等により確認された。一方、PLD と PCSUV の親和性はこの低活性状態で顕著に増大し、大部分の酵素が膜に結合していることが明らかにされた。また、PC/PASUV と PLD の結合性は、その組成によって変化し、PC/PA = 2/8 以上では、上記 PCSUV の低活性状態と同程度であった。

あらかじめ反応生成物 (PA) を膜に均一に添加 (PC/5%PASUV) しても、上記の反応の速度パターンは変化しなかった。この低活性状態 (阻害状態) を解消するには、非イオン性界面活性剤を過剰に加えて、膜構造を破壊する必要がある。すなわち、膜中の単分散状の PA 分子に PLD 阻害能はないことがわかった。以上の結果から、PLD は膜表面上を横方向に拡散しながら PC を分解するために局所的な PA ドメインが生じ、この結果生ずる PA の小クラスターに PLD がトラップされ、反応阻害がおけると推察された。

つぎに、PCSUV 表面への中性脂質の挿入効果について研究した。Diacylglycerol (DAG) や α -トコフェロールの挿入により生成物、PA による阻害効果は緩和され、また加水分解反応初速度も増大した。一方、フーリエ変換赤外線吸収スペクトルより、PC の PO_2^- 逆対称伸縮振動は添加した中性脂質の量とともに低波数側にシフトし、膜表面の PO_2^- 基の水和が増加することがわかった。これらのことから、中性脂質の添加は、PC 分子の親水基間に隙間を作ることによって PLD の近づき

易さを高め、また生成物 PA のクラスター形成を抑制すると考えられた。

第 III 章 PLD-SUV 複合体の酵素活性

すでに述べたように、PCSUV 外側表面単分子膜の PC の約3%が PA に変換されると PLD は膜の PA 小クラスターにトラップされ、反応速度は低下する。このとき、SUV は PLD に対しより高い親和性を持つが、有効な基質としての性質に欠ける。このような PCSUV を postsubstrates, (Post-S: PLD-SUV 複合体) と呼ぶことにする。この Post-S に、あらたに PCSUV を添加すると、競合的阻害から予測されるよりはるかに速い速度で PC の分解反応がおこり、しばしば、PCSUV に直接添加されたフリーの PLD より高い酵素活性が観察される。このとき、Post-S による PCSUV の加水分解反応の V_{max} (a_{PP}) はフリーの PLD の約3倍に増大した。

詳細な研究の結果、(1) PLD と膜 (SUV) が結合した PLD-SUV 複合体は、基質となる別の SUV と衝突して出会ったとき、高い PLD の活性が得られること。(2) PLD-SUV 複合体と基質 SUV の衝突を静電的相互作用で抑制すると、通常の競合的阻害に基づく活性が得られることがわかった。

すなわち、大部分の PLD が SUV に結合し、かつ別の SUV を基質とすると、PLD-SUV 複合体が、高活性のリポ蛋白質 (酵素) として作用することを示唆している。

以上のように、PLD の SUV 二分子膜表面での酵素反応を物理化学的方法を用いて研究し、膜の構造と PLD の活性化や阻害メカニズムの関係について検討した。この結果は基礎的なものではあるが、複雑な PLD の活性化とその抑制メカニズムを解明する上での重要な知見と考えられる。

論文審査の結果の要旨

Phospholipase D (PLD) は動物細胞の膜と細胞質の両画分に見いだされ、情報伝達に関与している。しかし、単離された PLD を用いた研究は少なく、活性制御メカニズムについてはほとんどわかっていない。本研究では、*Chronmofuscus Streptomyces* 由来の PLD による egg yolk phosphatidylcholine (PC) リポソーム二分子膜 (SUV) の加水分解に対する Ca^{2+} 濃度、反応生成物及び中性脂質の効果を研究し、膜表面での活性調製メカニズムについて考察した。

PC 加水分解速度は、コリン電極を作成し測定した。見かけの最大速度 V_{max} (a_{pp}) と見かけの Michaelis 定数 K_m (a_{pp}) に対する Ca^{2+} 濃度依存性を解析し、 Ca^{2+} との親和性は膜に結合している PLD のほうが溶液中の PLD より約5倍高く、これが膜での活性化を決定していることを示した。

PLD は、反応開始数分間で SUV 表面の PC の約3%を PA に速やかに変換する。その後、分解速度は20分の1に低下する (低活性状態) が、PLD と SUV の親和性は顕著に増大し大部分の酵素が膜に結合していることが示された (PLD-SUV 複合体の生成)。前もって反応生成物 PA を (PC の5%) 膜に均一に添加しても低活性状態は再現できなかった。またこの低活性状態を解消するには、非イオン性界面活性剤を過剰に加えて、膜構造を破壊する必要があった。すなわち、膜中の単分散状 PA 分子に PLD 阻害能はないことがわかった。以上の結果から、PLD は膜表面で拡散しながら PC を分解して PA ドメインを生成し、この PA 小クラスターに PLD がトラップされ反応阻害がおこると推察された。さらに、生成物 PA の阻害に対する SUV 表面への中性脂質の挿入効果について研究した。ジグリセライドや α -トコフェロールの挿入により PA の阻害効果は緩和され、反応初速度も増大した。一方、中性脂質の挿入により、膜表面の PC のリン酸基の水和が増加することがわかった。すなわち、中性脂質は PC 分子の親水基間に隙間を作り PLD の近づき易さを高めると同時に、PA クラスター形成を抑制すると考えられた。

低活性状態で生成した PLD-SUV 複合体に新たに基質 PCSUV を添加すると、高速度で PC の加水分解がおこり、フリーの PLD の約3倍の V_{max} (a_{pp}) が得られた。

PLD-SUV 複合体は基質になる別の SUV と衝突して出会ったとき高活性を示し、この衝突を静電的相互作用で抑制すると通常の競合的阻害に基づく活性が得られることがわかった。すなわち、PLD-SUV 複合体は自己消化が抑制され、別の SUV に高活性の酵素 (リポ蛋白質) として作用することを示している。

以上の研究を通して、PLD の SUV に対する酵素反応が二分子膜表面の物理化学的性質や膜の構造により顕著に影響されることを明らかにした。これらの知見は、複雑な PLD の活性化とその抑制メカニズムを解明する上で重要と考えられる。

よって、本論文は博士 (薬学) の論文として価値あるものと認める。

更に、平成11年12月15日論文内容とそれに関連した口頭試問をおこなった結果合格と認めた。