

氏名 (本籍)	大口 健 司 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 361 号
学位授与日付	平成 10 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Regulatory mechanisms of phospholipase D in human promyelocytic leukemic HL60 cells
	1) Regulation of Membrane-bound Phospholipase D by Protein Kinase C in HL60 Cells : Synergistic action of small GTP-binding protein RhoA
	2) Increased Activity of Small GTP-binding Protein-dependent Phospholipase D during Differentiation in Human Proliferating Myelocytic Leukemic HL60 Cells
審査委員	(主査) 教授 野 澤 義 則 (副査) 教授 岡 野 幸 雄 教授 植 松 俊 彦

論文内容の要旨

細胞膜脂質を介する情報伝達システムにおいて、ホスホリパーゼ系と脂質キナーゼ系が重要な役割を果たしている。ホスホリパーゼ D (PLD) は、主に膜リン脂質の主要成分であるホスファチジルコリン (PC) を加水分解して、細胞内でセカンドメッセンジャーとして機能するホスファチジン酸 (PA) やジアシルグリセロール (DG) を産生する膜リン脂質分解酵素である。種々の動物細胞において、ホルモンや増殖因子などの刺激に反応して活性化され、様々な細胞応答に関与することが示唆されており、細胞内情報伝達における PC ターンオーバーを担う新規のシグナル変換酵素として重要視されている。中でも好中球では、PLD は走化性因子などの刺激に反応して迅速に活性化され、活性酸素種の産生、脱顆粒、貧食といった好中球機能と密接に関連している可能性が示唆されている。しかし、PLD の活性制御機構の詳細については不明な点が多く残されている。そこで本研究では、好中球の培養細胞系モデルとして知られているヒト前骨髄性白血病細胞株 (HL60 細胞) を用いて PLD の活性制御機構について検討を行った。

PLD 活性の制御には、いくつかの因子が関与することが示唆されており、HL60 細胞および好中球においては低分子量 GTP 結合蛋白質の Rho ファミリー蛋白質 (RhoA, Rac, Cdc42Hs) および ADP リボシル化因子 (Arf) が、活性化因子として作用することが示されていた。そこで本研究では、これらの低分子量 GTP 結合蛋白質とは異なる活性化因子の探索を試みた。無細胞系において、サイトゾル画分を除いた HL60 細胞由来の膜画分ではホルボール 12-ミリステート 13-アセテート (PMA) による PLD の活性化は軽微であるが、サイトゾル画分の添加によって顕著な活性化が示された。このサイトゾル画分中に存在する PMA 依存性の活性化因子を精製し、プロテインキナーゼ C α (PKC α) であることを明らかにした。PKC α による PLD の活性化は、PMA および Ca²⁺ の存在下でみられるが、活性化の補助因子としてホスファチジルイノシトール 4, 5-ビスリン酸 (PIP₂) が必要であった。また、PKC α による PLD 活性化は、活性型 RhoA によって著しく促進され、PKC α と RhoA は PLD を協調的に活性化することが示された。

一方、HL60 細胞は種々の分化誘導剤で処理することにより好中球様細胞への分化が誘導される。ジブチリルサイクリック AMP やレチノイン酸の添加により HL60 細胞を好中球様に分化誘導した場合、種々の刺激に対して PLD 活性が著しく上昇することが見いだされた。そこで、HL60 細胞の好中球様分化に伴う非水解性 GTP アナログ (GTP γ S) 依存性の PLD 活性の変化を無細胞系で調べたところ、経時的に著明な活性上昇がみられた。分化に伴いサイトゾル中の PKC α および Arf の蛋白質質量が増大することが示されたが、分化前後の HL60 細胞から調製した膜およびサイトゾル画分を用いた再構成実験から、分化に伴う PLD 活性の上昇はサイトゾルではなく膜

画分の変化に起因することが推測された。ウエスタンブロット法で活性化因子RhoAの分化誘導に伴う細胞内局在の変化を検討したところ、膜画分に著しく増加していることが示された。また、分化した細胞の膜結合性PLD活性はRhoAの機能を不活化することが知られている菌体外毒素（C3毒素および毒素B）によってほぼ完全に抑制された。一方、分化前後の膜画分より部分精製したPLD画分とリコンビナントArfとの再構成系実験では、分化した細胞由来のPLD活性が未分化の活性に比べ増大しており、PLD酵素の量的な増加が示唆された。そこで、ヒトPLD遺伝子 (*hPLD1*) のmRNA発現をRT-PCR法により解析した結果、分化に伴い*hPLD1* mRNAの発現が顕著に増大していることが示された。

本研究によって、HL60細胞のPLDの活性化にはRhoおよびArfといった低分子量GTP結合蛋白質に加えPKC α も関与し、これらが互いに協調してPLD活性を制御することが再構成系実験より明らかにされた。また、好中球様分化に伴うPLD活性の上昇は、PLD活性化因子RhoAのサイトソルから膜画分への移行という局在変化とPLDの量的な増加に起因する可能性が示唆され、PLDが好中球の機能発現に必須の役割を果たしているという従来の推測を強く指示する結果が得られた。

論文審査の結果の要旨

申請者 大口健司は、HL60細胞を用いてPLDの活性制御機構について詳細な解析を行い、PKC α がPLDの活性化因子として作用することを明らかにするとともに、好中球様分化に伴うPLD活性の上昇が、PLD活性化因子である低分子量GTP結合蛋白質のRhoAの膜画分への移行とPLD自体の発現量の増加によって誘起されることを示した。

この研究は、細胞膜脂質を介するシグナル変換機構に新しい知見をもたらし、細胞内情報伝達メカニズムの研究の発展に寄与するものと考えられる。

[主論文公表誌]

Regulatory mechanisms of phospholipase D in human promyelocytic leukemic HL60 cells

- 1) Regulation of Membrane-bound Phospholipase D by Protein Kinase C in HL60 Cells : Synergistic action of small GTP-binding protein RhoA
平成8年2月発行 J. Biol. Chem. 271 (8) : 4366~4372
- 2) Increased Activity of Small GTP-binding Protein-dependent Phospholipase D during Differentiation in Human Promyelocytic Leukemic HL60 Cells
平成9年1月発行 J. Biol. Chem. 272 (3) : 1990~1996