

氏名 (本籍)	加藤 幸弘 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 351 号
学位授与日付	平成 9 年 3 月 31 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	Involvement of Rho family proteins in prostaglandin F2 $\alpha$ -induced phospholipase D activation in the osteoblast-like cell line MC3T3-E1
審査委員	(主査) 教授 立松 憲親 (副査) 教授 野澤 義則 教授 渡邊 邦友

### 論文内容の要旨

骨芽細胞の増殖や分化は種々のホルモン、ビタミン、サイトカイン、成長因子などにより制御されているが、骨芽細胞自身も増殖・分化の過程においてコラーゲン性蛋白のほか種々の非コラーゲン性蛋白やペプチド、トランスフォーミング成長因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$  : TGF- $\beta$ ), インスリン様成長因子 (insulin-like growth factor : IGF), 骨誘導因子 (bone morphogenetic proteins : BMPs), インターロイキン-1 (interleukin-1 : IL-1) などの各種サイトカインやプロスタグランジン (PGs) を産生し、細胞の形態調節と機能の制御に携わっている。PGsは骨吸収および骨形成の両面に関与する調節因子であり、骨芽細胞の増殖と分化を促進する。

骨芽細胞の増殖および分化の制御は、チロシンキナーゼ受容体、セリン/スレオニンキナーゼ受容体、ステロイドホルモン受容体、GTP結合蛋白質 (G蛋白質)、情報変換ホスホリパーゼ、蛋白質リン酸化反応等の活性化により転写因子に情報伝達されて作動しているが、その詳細なメカニズムについては明らかでない。

細胞は各種刺激により情報変換ホスホリパーゼの一つであるイノシトールリン脂質特異的ホスホリパーゼC (PI-PLC) が活性化され、ホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸 (PIP<sub>2</sub>) を分解してイノシトール1,4,5-三リン酸 (IP<sub>3</sub>) と1,2-ジアシルグリセロール (DG) を産生する。IP<sub>3</sub>は細胞内Ca<sup>2+</sup>貯蔵部位よりCa<sup>2+</sup>を動員し、細胞内遊離Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させ、DGはプロテインキナーゼC (PKC) を活性化する。骨芽細胞のPI-PLCには複数のアイソザイムが存在し、それらの活性化機構も異なる。また、DGは膜リン脂質の主要成分であるホスファチジルコリン (PC) からホスホリパーゼD (PLD) とPAホスホヒドロラーゼにより産生され細胞増殖や分化の情報伝達に重要な役割を果たしており、MC3T3-E1細胞の骨への分化誘導過程にはPI-PLCやPLDは抑制的に制御されていることを明らかにした。

プロスタグランジンF2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) によるPLDの活性化は、PI-PLCの下流でPKCの活性化を介する場合とPKCを介さない場合が知られている。また、PLDの活性化にはPKCの他に低分子量G蛋白質 (ADP-リボシル化因子 (ARF) やRhoファミリーG蛋白質) およびPIP<sub>2</sub>が関与することが明らかにされている。

1982年に*Clostridium difficile* 菌の産生する2種類の毒素が精製されたが、その作用機構は不明であった。ところが最近、これらの毒素A, Bがモノグルコシルトランスフェラーゼ活性を有し、RhoファミリーG蛋白質を特異的にグルコシル化し、その機能を阻害することが明らかにされた。

本研究では骨芽細胞様細胞MC3T3-E1における、PGF2 $\alpha$ によるPLDの活性化機構を明らかにするために*Clostridium difficile* 毒素Bを用いてRhoファミリーG蛋白質の関与を検討し、以下の結果を得た。

(実験方法)

1) PI-PLCの活性測定 : [<sup>3</sup>H]イノシトール標識MC3T3-E1細胞を各濃度の毒素Bで12時間前処理し、10mMの塩化リチウム (LiCl) を含むTyrode-Hepes緩衝液で2回洗浄し、20分間のpre-incubation後、PGF2 $\alpha$  で2分間細胞刺激を行い、産生される [<sup>3</sup>H]イノシトールリン酸を測定した。

2) PLDの活性測定 : PLDの活性測定は、 [<sup>3</sup>H] ミリスチン酸で細胞を標識し、第1級アルコール (ブタノール) 存在下でPLD特有のホスファチジル基転移反応によって生じるホスファチジルブタノール (PBut) の放射活性を測定する方法で行った。 [<sup>3</sup>H] ミリスチン酸標識MC3T3-E1細胞を各濃度の毒素Bで12時間前処理し、Tyrode-Hepes緩衝液にて2回洗浄し、15分間のpre-incubation後、0.25%ブタノール存在下にPGF2 $\alpha$  で10分間細胞刺激

を行った。

(結果および考察)

- 1) 骨芽細胞様細胞MC3T3-E1を毒素Bの各濃度で12時間、およびサイトカラシンD (5  $\mu$ M) で30分間処理したところ、濃度および時間依存的にrounding-upし、顕著な形態変化を示した。
- 2) 低分子量G蛋白質の同定を行うために細胞を超音波で破壊し、20  $\mu$ gの蛋白質を13%SDS-PAGEで分離後、RhoA, Cdc42, Rac1抗体を用いたWesternブロッティングを行い、低分子量G蛋白質のRhoAとCdc42が同定された。無処理細胞では、毒素Bにより22-kDaの蛋白質のUDP [<sup>14</sup>C] glucoseの取り込みが見られたが、毒素B (2 pg/ml) で12時間前処理した細胞では、この22-kDa蛋白質のグルコシル化反応が完全に阻害され、毒素B前処理によりRhoAとCdc42のグルコシル化が起きていることが示された。
- 3) 細胞を毒素Bで前処理し、PGF2 $\alpha$ 刺激によるPLC活性化におよぼす影響を検討したところ、イノシトールリン酸産生にはほとんど影響がなかった。
- 4) MC3T3-E1におけるPGF2 $\alpha$ 刺激による [<sup>3</sup>H] PBut産生はPGF2 $\alpha$ の1  $\mu$ Mでかつ刺激後10分で最大産生量を認めた。細胞を毒素Bで前処理すると、PGF2 $\alpha$ 刺激による [<sup>3</sup>H] PBut産生は約60%阻害された。一方、サイトカラシンD (5  $\mu$ M) で30分間前処理した細胞は、PGF2 $\alpha$ 刺激によるPLD活性化の影響は少なかった。またADP-リボソル化因子 (ARF) の阻害剤であるBreferdin A (25  $\mu$ g/ml) で前処理するとPGF2 $\alpha$ 刺激によるPLD活性化は約23%阻害され、PGF2 $\alpha$ 刺激によるPLD活性化は主にRhoファミリーG蛋白質を介することが示唆された。

Digitoninを用いて膜透過性を亢進させた細胞では、非水解性GTPアナログであるGTP  $\gamma$  S (20  $\mu$ M) およびPMA (100nM) により時間依存的にPLDを活性化し、30分間刺激するとそれぞれ約16倍、約13倍活性化され、両者の同時刺激では約25倍のPLD活性化を認め、両者は相加的にPLDを活性化した。PIP<sub>2</sub>に特異的に結合し、その機能を阻害するNeomycin (1mM) で30分間前処理するとGTP  $\gamma$  S刺激によるPLD活性化は完全に阻害された。最大PLD活性化を得るためにはCa<sup>2+</sup>とATPが必要であった。細胞を毒素Bで前処理すると、GTP  $\gamma$  SおよびPMA刺激によるPLD活性化はそれぞれ約80%、60%阻害された。GTP  $\gamma$  S刺激によるPLD活性化はボツリヌスC3毒素 (6  $\mu$ g/ml) で前処理すると約57%、毒素Bで前処理すると約82%、Breferdin Aで前処理すると約25%のPLD活性化の阻害が認められた。一方、百日咳菌毒素 (PTX) はGTP  $\gamma$  SによるPLD活性化にほとんど影響しなかった。

以上の結果より、PGF2 $\alpha$ によるPLDの活性化系に低分子量G蛋白質のRhoファミリー蛋白質が関与することが明らかにされた。また、この活性化系にはPIP<sub>2</sub>が必須であることを示した。さらに、PGF2 $\alpha$ によるPLDの活性化はPI-PLC活性化の下流で作動するものではなく、受容体刺激により活性化されたRhoファミリーG蛋白質を介する経路が重要であることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 加藤幸弘は、骨芽細胞様細胞MC3T3-E1におけるPGF2 $\alpha$ によるPLDの活性化メカニズムの解明を試み、*Clostridium difficile* 毒素Bを用いて低分子量G蛋白質Rhoファミリー蛋白質が関与することを初めて明らかにした。これらの知見は骨芽細胞の細胞内情報伝達機構の研究進展に寄与するものと思われる。

---

[主論文公表誌]

Involvement of Rho family proteins in prostaglandin F2 $\alpha$ -induced phospholipase D activation in the osteoblast-like cell line MC3T3-E1

平成9年7月発行 Prostaglandins 54 (1) 475~492