

学位論文の内容の要旨

| | | | |
|------|--|----|--------|
| 専攻 | 分子情報制御医学 | 部門 | 分子細胞医学 |
| 学籍番号 | 09D734 | 氏名 | 篠原 尚樹 |
| 論文題目 | Enzymological analysis of the tumor suppressor A-C1 reveals a novel group of phospholipid-metabolizing enzymes | | |

(論文要旨)

<研究の背景および目的>

A-C1 (別名 HRASLS1) は、癌原遺伝子 Ras の機能を負に制御する癌抑制因子として単離されたタンパク質分子であり、HRAS-like suppressor (HRASLS) ファミリーに分類される。同ファミリー・メンバーは、ほ乳類において5種類 (HRASLS1-5) 存在するが、性状解析はほとんど行われていなかった。最近所属研究室は、HRASLS ファミリーがレシチン・レチノール・アシルトランスフェラーゼに相同性を示すことに着目し、精製組換えタンパク質を用いて検討を進めた結果、同ファミリーの5種類のタンパク質のうち、4種類 (HRASLS2-5) がリン脂質代謝酵素活性を示すことを見出した。そこで本研究では、A-C1 も同様に脂質代謝酵素活性を保有している可能性を考え検討を行った。

<方法>

組み換えタンパク質の調製

ヒト、マウス、ラット A-C1 の cDNA を RT-PCR 法にて単離し、FLAG タグを付加した A-C1 タンパク質を COS-7 細胞に一過性に発現させ、その細胞破砕液を実験に供した。組み換え A-C1 の発現は抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により確認した。さらにヒト A-C1 発現細胞の破砕液を遠心分離し、得られた可溶性画分から抗 FLAG 抗体をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーにより同タンパク質を高度に精製した。

リン脂質代謝酵素活性の測定

ホスホリパーゼ A_{1/2} (PLA_{1/2}) 活性の測定は、sn-1 位と sn-2 位の両方またはいずれかの脂肪酸鎖を¹⁴C で放射標識したホスファチジルコリン (PC) を基質として用いた。アシル基転移活性の測定は、アシル基供与体基質として、放射標識 PC、アシル基受容体基質として非放射標識ホスファチジエタノールアミン (PE) を用いて、PE N-アシル化活性を測定した。あるいは、アシル基供与体基質として非放射標識 PC、アシル基受容体基質として sn-1 位もしくは sn-2 位を放射標識したリゾ PC を用いてリゾ PC O-アシル化活性を測定した。それぞれ反応終了後、生成物を薄層クロマトグラフィーで分離し放射活性を定量した。

生細胞を用いた機能解析

A-C1 を一過性に発現させた COS-7 細胞を、放射標識パルミチン酸を用いて代謝標識を行った。その後、Bligh & Dyer 法にて脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーで分離後、放射活性を測定した。

臓器分布の解析

マウスおよびラットの諸臓器から mRNA を抽出し、逆転写酵素 PCR 法にて cDNA を調整し、A-C1 mRNA の臓器分布を解析した。ヒトについても Clontech 社の cDNA パネルを用いて Real time PCR 法にて A-C1 の臓器分布を解析した。

<結果・考察>

PC を基質としたとき、組換え A-C1 は PLA_{1/2} 活性を示した。また、PLA₁ 活性の方が PLA₂ 活性よりも優位であった。反応は Ca²⁺ を要求しない一方で、ジチオスレイトールの添加が不可欠であっ

た。これらの性質は他の HRASLS ファミリー・メンバーでも同様であることから、触媒機能は類似しているものと考えられた。また、A-C1 は PE の *N*-アシル化反応と、リゾ PC の *O*-アシル化反応も触媒した。COS-7 細胞に A-C1 を一過性に発現させると、コントロールの COS-7 細胞と比べて *N*-パルミトイル PE が著増しており、A-C1 が生体内でも *N*-アシル転移酵素として機能している可能性が示唆された。

A-C1 の mRNA の臓器分布を検討したところ、ヒト、マウス、ラットのいずれにおいても、精巣、骨格筋、心臓および脳で強く発現していた。また、マウスでは肺、胃、腎臓および大腸で、ラットでは胸腺、肺および小腸でも発現していた。

以上の結果から、A-C1 (HRASLS1) を含む HRASLS ファミリーのすべての分子がグリセロリン脂質を基質とする酵素活性を保有していることが明らかになった。これらのタンパク質の PLA_{1/2} 活性とアシル基転移活性を比較すると、HRASLS3 と 4 では前者が強く、1、2 及び 5 では後者が優位であった。HRASLS ファミリー・メンバーが総じて PLA_{1/2} およびアシル基転移活性を持つことから、これらの分子を Phospholipase A/Acyltransferase (PLA/AT) 1-5 と呼ぶことを提唱したい。

| | | | |
|-------------------|---|---------|---|
| 掲 載 誌 名 | Journal of Lipid Research, 第52巻, 第11号, 1927-1935ページ | | |
| (公表予定) 掲 載 年 月 | 2011年 11月 | 出版社(等)名 | American Society for Biochemistry and Molecular Biology |
| Peer Review | ④ . 無 | | |

(備考) 論文要旨は、日本語で1, 500字以内にまとめてください。