

博士論文

血小板活性化因子生合成酵素の活性調節機構の解析

森 本 亮

目次

	ページ番号
1. 略語一覧	2
2. 要旨	6
3. 序論	7
4. 血小板活性化因子生合成酵素の活性調節機構の解析	
4.1 実験に用いた試薬と方法	21
4.2 結果	31
5. 結論と考察	49
5.1 結論	49
5.2 考察	51
6. 謝辞	56
7. 参考文献	57

1. 本文中で用いた略語一覧

AGPAT, 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase, 1-アシルグリセ

ロール-3-リン酸 アシル転移酵素

BAPTA-AM, 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic

acidtetrakis(acetoxymethyl)ester, 1,2-ビス(2-アミノフェノキシ)エタン

-N,N,N',N'-四酢酸テトラキス(アセトキシメチルエステル)

BSA, bovine serum albumin, 牛血清アルブミン

cDNA, complementary DNA, 相補的 DNA

CHO-S, Chinese hamster ovary-S, チャイニーズハムスター卵巣 S 株

CoA, coenzyme A, 補酵素 A

cPLA₂ α , cytosolic phospholipase A₂ α , 細胞質型ホスホリパーゼ A₂ α

DMPC, dimyristoyl phosphatidylcholine (14:0/14:0 PC), ジミリストイル

ホスファチジルコリン

DMSO, dimethylsulfoxide, ジメチルスルホキシド

FBS, fetal bovine serum, ウシ胎児血清

HRP, horseradish peroxidase, 西洋ワサビペルオキシダーゼ

LC-MS/MS, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, 液体ク

ロマトグラフ/タンデム質量分析

LPCAT, lysophosphatidylcholine acyltransferase, リゾホスファチジルコリ

ンアシル転移酵素

LPCAT1, lysophosphatidylcholine acyltransferase1, リゾホスファチ

ジルコリンアシル転移酵素 1

LPCAT2, lysophosphatidylcholine acyltransferase2, リゾホスファチ

ジルコリンアシル転移酵素 2

LPC, lysophosphatidylcholine, リゾホスファチジルコリン

lyso-PAF, lyso-platelet-activating factor, リゾ血小板活性化因子

lyso-PAFAT, lyso-platelet-activating factor acetyltransferase, リゾ血

小板活性化因子アセチル転移酵素

m/z, mass-to-charge ratio, 質量電荷比

PC, phosphatidylcholine, ホスファチジルコリン

SRM, selected reaction monitoring, 選択反応モニタリング

PCR, polymerase chain reaction, ポリメラーゼ連鎖反応

RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction, 逆転写

ポリメラーゼ連鎖反応

LPS, lipopolysaccharide, リポ多糖

mcPAF, methylcarbanyl-PAF, メチルカルバミル PAF

PAF, platelet-activating factor, 血小板活性化因子

PAF-AH, PAF acetylhydrolase, PAF アセチル水解酵素

PBS, phosphate buffered saline, リン酸緩衝生理食塩水

TLR, Toll-like receptor, Toll 様受容体

siRNA, small interference RNA 低分子干渉 RNA

MAPK, mitogen activated protein kinase, 分裂促進因子活性化タンパク質キ

ナーゼ

MK2, mitogen activated protein kinase-activated protein kinase2, MAPK

活性化タンパク質キナーゼ

PKC, protein kinase C, プロテインキナーゼ C

PLC, phospholipase C, ホスホリパーゼ C

SDS, sodium dodecyl sulfate, ドデシル硫酸ナトリウム

SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-poly-acrylamide gel electrophoresis,

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

TBS, Tris-buffered saline, トリス緩衝生理食塩水

TLC, thin layer chromatography, 薄層クロマトグラフィー

2. 要旨

強力な炎症惹起性の脂質メディエーターである血小板活性化因子 (platelet-activating factor, PAF)は細胞外の刺激に応答して前駆体の生体膜リン脂質から生合成されるが、細胞内での PAF 生合成調節に関わる分子や機構には不明点が多く残されていた。本論文では PAF 生合成酵素である LPCAT2 (lysophosphatidylcholine acyltransferase 2)について生化学的、細胞生物学的な解析を行った。細胞が ATP や PAF 安定アナログで刺激された際には LPCAT2 の 34 番目のセリン残基がリン酸化され *in vitro* での活性が上昇すること及び、このリン酸化が細胞内カルシウムシグナリングと PKC α に仲介されていることを明らかにした。生合成調節機構が明らかになったことで今後 PAF の関係する病態の理解が進展し、疾患における PAF シグナル制御に貢献することも期待される。

3. 序論

生命の基本単位である細胞は外環境と細胞膜で仕切られることで生命活動の特徴づける化学反応を統合している。RNA world など初期の触媒反応についてメカニズムが提唱されているが、内外を区別する隔膜がなければ分裂し、自己増殖するという過程を経ることはできない。化学反応の場を分ける事が生命発祥の重要な一段階であったと考えられる。また、細胞内環境も決して均一ではない。細胞内は膜で仕切られて細胞内小器官として独立し、それぞれが協調しながら特徴を持つ生化学反応を担い、各細胞の機能を維持している。

厚さ 5~10 nm ほどの生体膜は均一な構造ではなく、リン脂質などの両親媒性を持つ脂質の集合体を土台とし、タンパク質が埋め込まれている複雑なシステムである。構成している主な脂質はグリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、コレステロールであり、糖脂質も含まれる。これらの多様な物質がひとつの膜として機能している仕組みは長い時間をかけて明らかにされてきた。

初期の生体膜モデルは Gorter と Grendel が赤血球膜を用いて計算した結果から得られた。水面に一層に浮かせた脂質膜と計算上の赤血球表面積を比較し、ヒト、イヌ、ウサギ、ラットなどのほ乳類に共通して細胞内外の水層が 2 分子

分の厚さを持つ脂質膜で隔てられていると結論づけた(1)。この観察は現在判明している脂質二重膜の基本的な構造とよく一致している。

次に Danielli と Davson によって「細胞内外にある 2 層のタンパク質層の間にリン脂質二重層が存在する」というモデルが提唱された(2)。これは表面張力を説明しようとする試みであったが、その後の実験的な観察とは齟齬が指摘されていた。この矛盾を克服するアイデアを示したのが Singer と Nicolson による流動モザイクモデルである(3)。このモデルでは先のような脂質膜を挟む 2 層のタンパク層を仮定する代わりに膜貫通タンパク質が導入された。このことで極性を持つ物質の通過も含めた生物学的観察に近いとされ、現在まで生体膜構造の基本モデルとなっている。近年はさらに脂質を主とする構成分子が物理化学的な性質に応じて局所に集合しタンパク質とともにマイクロドメインと呼ばれるような特定の領域を形成する場合も知られている。

現在、膜を構成している脂質はおよそ 1500 種類ほどであるとされている。グリセリン脂質には極性基が異なるホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロールとカルジオオリピンが存在する。スフィンゴ脂質にはセラ

ミドやスフィンゴリエリンが含まれる。グリセロリン脂質の場合、極性基が異なるグリセロール骨格にふたつの脂肪酸が結合している。脂肪酸の結合方式、炭素数、不飽和結合の数および位置が異なる組み合わせが多く存在することから膜の脂質は先述の多様性を持つ。この多様な物理化学的性質を背景に、細胞外環境や細胞内部構造に適応するように脂質組成が調節されていると考えられる。

生体膜は仕切りとして働くこと以外にも多くの機能を担っている。原核生物においては外環境に対する物理的なセンサーとして機能している(4,5)。また、真核生物においては細胞間のコミュニケーションを司るシグナル分子（脂質メディエーター）の前駆体貯蔵庫としての機能がある。脂質メディエーターは遺伝子に直接にはコードされておらず、生体膜脂質に酵素が働くことによって作成される。その多くは合成・分解の代謝バランスと受容体感受性などによって生理作用を調節されており、主に急性期の炎症、感染症など早い応答が要求される場面において合理的な仕組みと考えられる。

ステロイドホルモンを除き、情報伝達を担う脂質には構造で分類すると大きく 3 つのグループがある。アラキドン酸、エイコサタペンタエン酸、ドコサヘ

キサエン酸などの多価不飽和脂肪酸を前駆体とするエイコサノイド、ドコサノイドの脂肪酸グループ、リン脂質の構造を持つホスファチジルイノシトールや血小板活性化因子などのグループ、リン脂質からひとつだけ脂肪酸が切りはなされた構造を取るリゾホスファチジン酸やスフィンゴシン-1-リン酸などのリゾリン脂質のグループが挙げられる。それぞれが共通して生体膜脂質を前駆体とすることから、個々のメディエーターの働きが統合されて精密な情報伝達を制御していると考えられる。

今回解析の対象とした血小板活性化因子(platelet-activating factor, PAF)は強い生理活性を持つ炎症惹起性の脂質メディエーターである。1972年にIgE感作ウサギ好塩基球から放出され血小板を凝集させる物質として初めて同定された(6)。1979年に複数のグループからPAFがリン脂質に属する化学構造(1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine)を持つと報告された(7-9)。PAFの構造はホスファチジルコリンに属するが、グリセロール骨格のsn-1位には炭素数(C)16もしくはC18の脂肪酸がエーテル結合(アルキル結合)している特徴がある(10)。骨格のsn-2位、sn-3位にはそれぞれアセチル基、ホスホコリンが結合している。また、腎髄質中に存在しプロスタグランジンとは異なる脂溶性

の降圧物質として知られていた物質(anti-hypertensive polar renomedullary lipid, APRL)(11,12)が PAF と同じものであることも独立に確認された(8)。PAF は比較的単純な構造を持つが立体特異性が高度であり、他の脂質メディエーターと比べても非常に微量で強い作用を示す。sn-1 位の炭素数が 16 のものが他のものに比べて生理活性が高く、一般的に PAF とされるのはこの構造を取るものである (図 1)。また sn-1 位がアシル結合やアルケニル結合している PC もわずかながら活性を示す場合がある。

膜面分を用いた生化学的な解析により、PAF は細胞外刺激に応答して生体膜脂質二重層のリン脂質から迅速に生合成されることが明らかとなった (図 1)。細胞質型ホスホリパーゼ A₂α (cytosolic phospholipase A₂α, cPLA₂α) の作用により膜構成リン脂質である 1-アルキル PC(sn-1 位がアルキル結合した PC) の sn-2 位からアラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)が切り離されリゾ PAF が産生される(13,14)。続いてリゾ PAF アセチル転移酵素(lyso-PAF acetyltransferase, lyso-PAFAT)がリゾ PAF にアセチル CoA のアセチル基を転移し PAF へと変換する。アセチル基は炭素数 2 の小さい構造だが PAF の活性発現に重要であることが構造決定の過程で示された(15)。

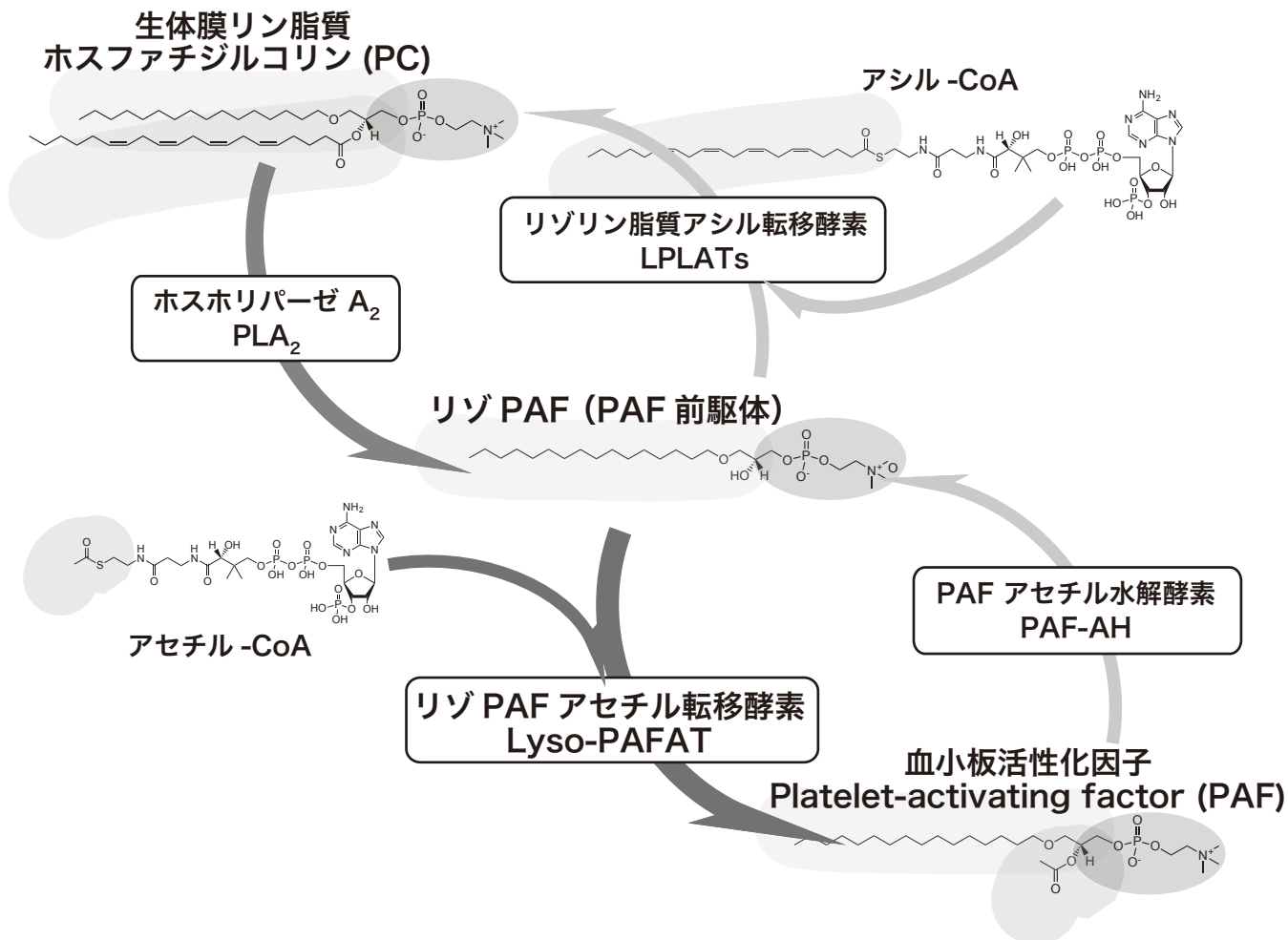


図 1. リモデリング経路による PAF 代謝

生体膜リン脂質のホスファチジルコリン (PC) から PLA₂ により前駆体のリゾ PAF が供給され
 リゾ PAF アセチル転移酵素がアセチル基を転移し PAF が合成される。
 合成された PAF は PAF アセチル水解酵素の作用でリゾ PAF へ分解される。
 リゾ PAF はリゾリン脂質アシル転移酵素の働きで生体膜リン脂質の PC に戻る。

また、cPLA₂αによりリゾ PAF が産生される際には 1-アルキル PC の sn-2 位に結合していた多価不飽和脂肪酸が加水分解され、エイコサノイドの前駆体であるアラキドン酸も同時に供給される。細胞外部の環境の変化により産生された PAF とエイコサノイドが協調し、あるいは役割分担して複雑にシグナルを伝えていることが示唆される。

他に、生化学的な活性として PAF がアルキルアセチルグリセロールと CDP コリンから *de novo* に合成される経路の報告(16)もあり腎髄質での血圧調整に寄与している可能性が検討されている(17)が、その他の臓器での生理的な寄与は明らかではない。炎症惹起性の PAF 生合成は先に述べた lyso-PAFAT 活性に依存すると考えられている。実際に細菌内毒素(lipopolysaccharide, LPS)刺激(18)や活性酸素への暴露(19)、カルシウムイオノフォア A23187 処理(20)、低浸透圧と低 pH 環境(21)、TNF α やホルミルメチオニルロシルフェニルアラニン (fMLP) などのサイトカイン刺激(22)、PAF 自体を含む G タンパク共役型受容体 (G-protein coupled receptor, GPCR) シグナルを惹起する脂質メディエーターによる刺激(23)など多彩な刺激で lyso-PAFAT 活性が秒から分の単位で急激に活性化するという報告は蓄積されていた。

PAF は低濃度で作用することから生体での存在量調節が生理活性の調節と密接に関係する。例えば定常状態において血中や組織中に PAF を検出することは困難であり、PAF 分解系による濃度調節が恒常的に行われている。ラットに静注された PAF の半減期は 30 秒程度であるなど、必要に応じて速やかに合成され分解も速やかであることが報告されていた(24)。PAF の sn-2 位に結合したアセチル基が PAF アセチル水解酵素(PAF acetyl hydrolase, PAF-AH)により加水分解され、不活性化リゾ PAF へと分解される。PAF-AH は長鎖不飽和脂肪酸を sn-2 位のアシル鎖に持つグリセロリン脂質に反応せず、活性にカルシウムイオン要求性も無いことが明らかになり、cPLA₂ α とは異なる酵素であることが示唆されていた(25,26)。PAF-AH は lyso-PAFAT よりも先にクローニングされ現在までに細胞外型 (血漿型) (27,28) 、細胞内型 Type-I (29), Type-II (30)の 3つが報告されている。

また、クローニングはされていなかったもののこの当時既に加水分解を受けた PAF がリゾ PAF になり sn-2 位に不飽和脂肪酸を持つ 1-アルキル PC として膜リン脂質に戻される粗活性も報告されていた(31-33)。他方、リゾ PAF の sn-1 位にあるエーテル結合を非可逆的に分解する Alkylglycerol monooxygenase

(AGMO)という酵素も本研究室で解析されている(34)。このようにリゾ PAF の供給量により PAF 産生が調節されている可能性も示されてきた。

PAF は喘息、アナフィラキシーを含むアレルギー疾患(35-37)や敗血症、急性呼吸窮迫症候群(*acute respiratory distress syndrome, ARDS*)(38)、気道過敏性(39)、虚血再還流障害(40)、疼痛(41)、自己免疫疾患(42)など様々な疾患の病態生理に関与することが示されてきた(43,44)。また、生理的な役割には名前の由来となった血小板活性化以外にも血圧の調節、受精卵の着床や分娩(45)、精子機能、胎児肺の成熟過程への関与も示唆されている(46)。しかし、PAF 合成の鍵を握る lyso-PAFAT は膜貫通タンパク質で精製困難なため、活性化メカニズムを含めた分子的な実態は不明なままだった。

一方、PAF 下流シグナル伝達については研究が進んだ。血小板を用いた PAF の結合実験から解離定数 36 nM の受容体が血小板あたり 1400 個程度存在することが示唆された(47)。鏡像異性体がほとんど活性を示さないことなどから PAF は形質膜に存在する特異的な受容体を介して作用している可能性が示唆されていた(48,49)。PAF の化学構造が明らかになって以来(7-9)、構造活性相関を調べることや血小板凝集や降圧作用を指標としたアンタゴニストの発見を目的に脂

質性アンタゴニストが多数合成された(50)。さらに天然成分からテトラヒドロフラン骨格を持つ非脂質性アンタゴニストが発見された(51)のを端緒として、ジアゼピン系化合物の抗 PAF 作用の発見(52)など多くの合成化合物を用いて薬理的な解析も進んでいた。

当初、PAF 受容体の実体は GPCR もしくはカルシウムチャンネルであると論争があり、受容体タンパク精製などのアプローチで検証が続けられていた。しかし最終的に 1991 年、所属研究室で電気生理学を応用した発現クローニング法によって GPCR である PAF 受容体(PAF receptor, PAFR)がクローニングされた(53)。主に Gq、Gi を介したシグナルを活性化し白血球の遊走、血管透過性亢進などに作用していることが明らかとなった(54)。PAFR ノックアウトマウスの解析から受容体を介したシグナルが喘息、ARDS、多発性硬化症や色素細胞増殖などこれまで報告されてきた病態にも関与していることが実験的に明らかになっていった(44)。現在まで PAF を認識する受容体はこの PAFR のみが報告されており他の脂質メディエーターに比べ 1:1 関係がはっきりとしている。脂質メディエーターが GPCR を介して作用することを示した最初の例であり、創薬など応用研究の発展にも寄与した。残念ながら喘息など疾患における PAF 受容体シグ

ナル制御を目的にした PAFR アンタゴニストは副作用や限定的な効果から実臨床で使用されるに至らなかった(55-57)。

2007 年から 2008 年にかけて、所属研究室でゲノム情報の解析から二つの lyso-PAFAT が同定された(58,59)。一つは II 型肺胞上皮細胞に高発現するリゾホスファチジルコリンアシル転移酵素 (lysophosphatidylcholine acyltransferase, LPCAT)1 であり、他方はマクロファージ、好中球など炎症細胞に高発現する LPCAT2 である。いずれの酵素も千種類以上ある膜リン脂質の多様性を制御する酵素のファミリーに属するものであり(60)、PAF 合成以外にも肺サーファクタント脂質や膜リン脂質合成活性を持つ。LPCAT1 は肺胞サーファクタントの主成分 dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC)を産生する(61)。LPCAT2 は脂肪酸がアシル結合した PC のみならず PAF の前駆物質である 1-アルキル PC を作る。1-アルキル PC はその sn-2 位にアラキドン酸など多価不飽和脂肪酸をもつ場合が多く(62,63)、マクロファージなど炎症細胞の細胞膜の主要な構成成分である(64)。LPCAT2 の膜リン脂質合成活性は sn-2 位にアラキドン酸を好んで導入するため仕切りとしての膜脂質の調整のみならず、脂質メディエーターの前駆体プールを調節している可能性が示唆されている。こ

のように改めて膜リン脂質代謝と PAF 生合成の深い関係が示唆され、脂質メディエーター研究が膜代謝領域の研究と合わさって新たな展開をみせている(65)。

PAF 生合成酵素のクローニング後に酵素の特性が解析された。以前に細胞や臓器のホモジネートで報告された lyso-PAFAT は *in vitro* での酵素活性にカルシウムを必要とした(66,67)。LPCAT1 はカルシウムを必要としないが、LPCAT2 は EDTA を加えた条件では *in vitro* の活性が著しく低下した。恒常的に発現している LPCAT1 に対し、LPCAT2 は炎症性の刺激により発現が誘導されるほか、リポポリサッカライド(lipopolysaccharide, LPS)の刺激後 30 分程度の比較的短時間で急速に *in vitro* の活性を上昇させた(58)。一方、LPCAT1 の lyso-PAFAT 活性は刺激の有無で変動しなかった。これまでにオプソニン化ザイモザン(68)、fMLP(69)、A23187(70)で刺激した組織や細胞のホモジネートでは *in vitro* で lyso-PAFAT 活性の上昇が報告されており、これらは LPCAT2 の性質を報告したものと考えられた。マウス脾臓ホモジネートを ATP、マグネシウムイオン、ホスファチジルセリン、ジアシルグリセロール、カルシウムイオンと反応させることにより lyso-PAFAT 活性が上昇し、反対にホスファターゼ処理するとこの現象が阻害されることが報告された(71)。マウス肥満細胞(72)やヒト好中球(73)の

ホモジネートでも同様の結果が得られ、リン酸化をはじめとする何らかの翻訳後修飾の関与が示唆された。これらの報告では酵素精製はできていなかったがホモジネートの lyso-PAFAT 活性の上昇が K_m の変化ではなく V_{max} の上昇を伴うことも観察されていた。リン酸化に関しては分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(mitogen activated protein kinase, MAPK)やプロテインキナーゼ A (protein kinase A, PKA)、プロテインキナーゼ C (protein kinase C, PKC)、カルモジュリンキナーゼ (calmodulin kinase, CaMK)などの関与について議論があったが結論は出ていなかった。ホモジネートでの lyso-PAFAT 活性上昇は、刺激するリガンドによって刺激後 10 から 30 分程度で起きるものと数十秒から長くても 5 分以内に起きるものという複数の経路が報告されていた(18)。

2010 年に質量分析計での解析(74,75)や変異体作成を通して、LPS 刺激後 30 分程度で観察された lyso-PAFAT 活性上昇の原因が LPCAT2 の 34 番目のセリン残基リン酸化であることを明らかにした。阻害剤や siRNA を用いた実験により、リン酸化が Toll 様受容体 (Toll like receptor 4, TLR4) の下流で MAPK activated protein kinase 2 (MK2)に依存して引き起こされることも示された(76)。また、LPCAT2 が 34 番目のセリン周囲に MK2 基質に共通するアミノ酸

配列(77)を持つことから **MK2** が直接リン酸化を起こすことを強く示唆した。

一連の結果により刺激依存的な **lyso-PAFAT** 活性化メカニズムのひとつを明らかにできた。

lyso-PAFAT 粗活性は **PAF** そのものによる刺激など **GPCR** への刺激後 30 秒程度の短時間で活性化することも知られていたが、責任酵素や制御しているシグナル伝達経路は不明であった(18)。本研究は **LPS** 刺激とは異なる制御が想定される秒単位の **GPCR** 刺激による **lyso-PAFAT** 活性化メカニズムを明らかにすることを目的とした。さらに、生合成のメカニズムに基づいた特異的 **lyso-PAFAT** 阻害剤開発につなげて **PAFR** アンタゴニストでは困難だった **PAF** シグナルの制御の新しい標的を提供することを目的にした。

4. 血小板活性化因子生合成酵素の活性調節機構の解析

4.1 実験に用いた試薬と方法

【試薬】

溶媒、緩衝液に用いた試薬は下に記述が無い限り和光純薬工業株式会社から購入した。以下、試薬等とその購入先を記す。卵黄由来 PC、*Salmonella minnesota* 由来のリポ多糖(lipopolysaccharide, LPS)、ATP、Bovine serum albumin (fraction V, fatty acid-free)、抗-FLAG M2 抗体、抗- β -actin 抗体、Sigma (St. Louis, MO)。Lyso-PAF、重水素ラベル d4-16:0 lyso-PAF, d4-16:0 PAF、16:0 lyso-PAF、16:0 methylcarbonyl PAF (mcPAF, PAF の安定アナログ)、Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI)。Arachidonoyl-CoA、Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)。[³H] Acetyl-CoA (129.5 GBq/mmol)、horseradish peroxidase (HRP)-linked anti-rabbit IgG、HRP-linked anti-mouse IgG、GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)。[¹⁴C] Arachidonoyl-CoA (2.22 GBq/mmol)、Moravec Biochemicals (Brea, CA)。薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography, TLC) シリカゲルプレート (type 5721)、Merck (Darmstadt, Germany)。Acetyl-CoA、dimethyl sulfoxide

(DMSO)、acrylamide bis 29:1、Phos tag Acrylamide、Wako (Osaka, Japan)。
U73122、U73343 (U73122 の不活性アナログ)、bisindolylmaleimide I (BIM-I)、
Ro-31-8220、Ro-31-8425、BIM-V (BIM-I の不活性アナログ)、
12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)、Calbiochem。siRNA
(ON-TARGETplus Non-targeting Pool D-001810-10-20、ON-TARGETplus
SMARTpool L-040348-00-0005 (PKC α)、L-052470-01-0005 (LPCAT2))
Thermo Scientific (Waltham, MA)。The cell line Nucleofector kit V、Lonza
(Basel, Switzerland)。抗-PKC α 、抗-MK2、抗-phospho-MK2 抗体、Cell
Signaling Technology (Beverly, MA)。プロテアーゼ阻害剤カクテル(EDTA-free
Complete)、Roche (Mannheim, Germany)

【マウス】

C57BL/6J マウスは日本クレア株式会社から購入し、22°Cの明暗サイクル(午前8時から午後8時に照明を点灯)で飼育した。餌には標準的な実験飼料を用いて自由摂食とした。全ての動物実験計画とその実施は東京大学および国立国際医療研究センターの動物実験ガイドラインに従いそれぞれの施設の倫理委員会において承認されている。東京大学動物実験番号(08-042)、東京大学第二種使

用等拡散防止措置承認申請書（機関承認用）承認番号(3)、国立国際医療研究センター動物実験承認番号(12053、13009、14045、15037、16062)。

【チオグリコレート誘導マウス腹腔マクロファージの回収】

オスの7週齢 C57BL/6J マウス腹腔に 2 ml の 4%チオグリコレートを投与した(18)。投与 72 時間後に氷冷した PBS を腹腔に注入することで誘導されたマクロファージを回収した。セルストレイナーで大きなデブリを除いてから遠心（スウィング式 1,000 rpm、10 分、4°C）して上清を除き 10%FBS を含む RPMI 培地に再懸濁して細胞数を調製し培養ディッシュ上に播種した。このように回収した細胞は 16 時間後に実験に使用した。

【細胞の調整とタンパク質の回収】

細胞を図に記載の濃度と時間であらかじめ阻害剤とインキュベートし、200 nM の mcPAF または 250 μ M の ATP で 30 秒間刺激した。刺激後、細胞を氷冷した緩衝液（20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 mM sodium orthovanadate、5 mM 2-mercaptoethanol、1 \times EDTA-free Complete を含む)で洗浄し、スクレイパーで回収した。氷冷した状態でプローブ型超音波破碎装置を用いて 30 秒間のソニケーションを 2 回繰り返し、遠心分離（9,000 \times g、10 分、4°C）することで細

胞のデブリなどを取り除いた。

初代培養のチオグリコレート誘導マウス腹腔マクロファージについてはこの上清を超遠心装置でさらに遠心 (100,000 × g、1 時間、4°C) して分画し、沈殿した膜画分を回収し、再度同じ緩衝液に溶解した。

調整したタンパク質は液体窒素で急速に凍結し、使用するまで-80°Cで保存した。溶液中のタンパク質の濃度は Bovine serum albumin (fraction V, fatty acid-free, Sigma)をスタンダードにしてブラッドフォード法(78)で定量した。

【LPCAT2 変異体作成】

オーバーラップエクステンション PCR 法を用いて 2 種類のマウス LPCAT2 変異体 (S34A および S34D) を得た(76)。S34A は 34 番目のセリンをアラニンに、S34D はアスパラギン酸に置換したものである。S34D はアスパラギン酸の構造がリン酸化されたセリンの構造に似ることから、リン酸化フォーム LPCAT2 の構造を模すことを期待して作成した。PCR 産物は pCXN2.1 ベクターにクローニングし、配列を確認した。変異体作成に用いたプライマーセットは以下に記載の通りであった。

S34A (Forward: CGC CAG GCG GCC TTC TTC CCG CCG C, Reverse: GCG

GCG GGAAGAAGG CCG CCT GGC G)

S34D (Forward: CGC CAG GCG GAC TTC TTC CCG CCG C, Reverse: GCG

GCG GGAAGAAGT CCG CCT GGC G)

【抗 LPCAT2 抗体と抗リン酸化 LPCAT2 抗体の作成】

LPCAT2 の C 末端ペプチド配列(SNKVSPESQEEGTSDKKVD)を用いてウサギを免疫した(Immuno-Biological Laboratories)。ウサギ抗 LPCAT2 血清からエピトープを結合した活性化チオールセファロース 4B を用いて抗 LPCAT2 抗体を精製した。抗リン酸化 LPCAT2 抗体は LPCAT2 の N 末端のリン酸化ペプチド RQA(pS)FFPPP を用いて作成した(SCRUM (Tokyo, Japan)) (76)。

【ウェスタンブロット解析】

タンパク質は 9%アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE を用いて分離した。リン酸化を検出するためには 50 μ M Phos-tag アクリルアミドと 100 μ M マンガンイオン (Mn^{2+})を含む 9%アクリルアミドゲルを使用した。Phos-tag はふたつの Mn^{2+} と錯体を形成し、リン酸基と相互作用することで電気泳動におけるリン酸化フォームのタンパク質の泳動速度を遅くする作用がある(79)。

アクリルアミドゲル中で分離したタンパク質はセミドライ方式の機器

(BioRad)を用いてニトロセルロース膜 (Hybond ECL, GE Healthcare) へ転写した。転写後のニトロセルロース膜は 5%スキムミルク(Becton Dickinson)を含むトリス緩衝生理食塩水-0.1% Tween20 (TBS-T)で一晩ブロッキングした。洗浄後、一次抗体と反応させ、さらに洗浄した後 HRP 標識された二次抗体と反応させた。二次抗体の洗浄後、検出のために ECL 溶液(GE Healthcare)を用いて反応、発光させて目的のシグナルを LAS4000 イメージングシステム (Fuji Film) または LAS500 イメージングシステム (GE Healthcare)を用いて検出した。

【放射性同位元素を用いた酵素活性測定】

酵素活性は lyso-PAF への放射性ラベルされた基質の転移により計測した。放射性ラベルされた基質は [^3H]acetyl-CoA (1.11 GBq/mmol) もしくは [^{14}C]arachidonoyl-CoA (1.11–2.035 GBq/mmol)を使用した。

反応溶液は以下の組成であった。 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、2 mM CaCl_2 、1 mg/ml PC、5 mM 2-mercaptoethanol、1 X Complete(タンパク分解酵素阻害剤カクテル)、100 μM acyl-CoA、20 μM lyso-PAF。 基質溶液 50 μL とタンパク溶液 50 μL を混合し 37 °C で 10 分間反応させた後、300 μL のクロロホルム/メタノール(1:2, v/v)を加えて酵素反応を停止させた。 Bligh & Dyer 法(80)で反

応液中の総脂質を有機層に抽出し薄層クロマトグラフィー(TLC)により解析した。展開溶媒には クロロホルム/メタノール/酢酸/水 (50:25:8:4, v/v/v/v)を用いた。アッセイ産物に対応する部位を TLC シリカゲルプレート上でヨウ素蒸気により可視化し、剃刀の刃でそぎ落とすことによりプレートから回収した。回収したシリカゲルを Microscinti-O (Packard Bioscience)と混合し液体シンチレーションカウンターLS6500 (Beckman)で測定した。

【液体クロマトグラフィータンデム型質量分析 (LC-MS/MS) を使用した

LPCAT2 活性測定】

LPCAT2 を過剰発現し、mcPAF で刺激した PAFR 安定発現 CHO-S 細胞からタンパクを調製し、未精製の状態で酵素活性の K_m と V_{max} を以下の条件において検討した: 5 $\mu\text{g/ml}$ 膜画分のタンパク質 (100,000 $\times g$, 1 時間超遠心操作後の沈殿) を反応バッファーと 37°C で 5 分間反応させた。反応バッファーの組成は 100 mM Tris-HCl pH 7.4、0.015% Tween 20、1 μM CaCl₂、重水素ラベル lyso-alkyl PC (d4-16:0 lyso-PAF) および acetyl-CoA もしくは arachidonoyl-CoA であった。 K_m と V_{max} を計算するためそれぞれの基質の濃度は複数の組み合わせで検討し、図中 (図 5 A から D) に表記している。

他の酵素活性測定は以下の組成で行った: 10 $\mu\text{g/ml}$ タンパク質 (9,000 x g、10 分間の遠心後の上清)を 反応溶液(100 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.015% Tween 20, 1 μM CaCl_2 , 5 μM d4-16:0 lyso-PAF, 1 mM acetyl-CoA) と 37°C で 5 分間反応させた。反応産物の脂質は内部標準として dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC, 14:0/14:0 PC) もしくは 17:0 LPC を含むメタノールで抽出し、液体クロマトグラフ/タンデム質量分析(LC-MS/MS)により検出した。

Ultra Performance LC (UPLC)は Waters の機器を、質量分析には三連四重極質量分析計 TSQ vantage (Thermo Scientific)を使用した。酵素活性測定には 2.1 x 30 mm の C8 UPLC カラム (Waters)を用い、LC の有機相にはアセトニトリル、水相に 20 mM 炭酸水素アンモニウムを使用しこれらの濃度をグラジエントで変化させて LC を行った。

質量分析の際は選択反応モニタリング(selected reaction monitoring, SRM)をもちい、予め計算から求めた m/z 値の親イオンから衝突誘導解離で生じるホスホコリンに相当する m/z 184.1 の娘イオンを検出した。重水素ラベル d4-16:0 PAF とラベルされていない PAF は陽イオンスキャンモードの選択反応モニタリング(SRM) トランジション (それぞれ m/z 528.4 to 184.1 および、524.4 to

184.1)で検出した。重水素ラベル 1-alkyl-PC は陰イオンスキャンモードの SRM トランジション (m/z 832.6 to 303.2)で検出した。シグナル強度は内部標準として用いた DMPC もしくは 17:0LPC との比として標準化した。マススペクトルは Xcalibur 2.0 software (Thermo Scientific)を用いて解析した。

【LC-MS/MS を用いた内因性 PAF の定量】

35 mm 培養ディッシュ上の細胞から 500 μ l のメタノール (内部標準として d4-16:0 PAF を含む) により総脂質を抽出した。さらに Oasis HLB カートリッジ(Waters) を用い、総脂質から脂質メディエーターを含む分画を精製した。精製された分画は Nexera UHPLC (Shimadzu) を LCMS-8040 (Shimadzu) 質量分析計に接続した LC-MS/MS システムで解析した(81)。LC のカラムには Kinetex C₈ column (2.1 × 150 mm; Phenomenex)を使用した。重水素ラベル d4-16:0 PAF と内因性の PAF は陽イオンスキャンモードの SRM トランジション (それぞれ m/z 528.4 to 184.1 および、524.4 to 184.1)で検出した。マススペクトルは LabSolutions 5.53 software (Shimadzu)を用いて解析した。

【Quantitative real-time PCR】

総 RNA は RNeasy mini kit (Qiagen)を使用して抽出し、濃度を測定してサン

プルごとにそろえた上で cDNA を Superscript III (Invitrogen)により合成した。

Fast SYBR Green Master Mix を用い StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems)により定量 PCR を行った。

使用したプライマーは以下の通りである。

Lpcat2, a 64-bp fragment, CCCTGCCAATACAGAAGAGATCA (forward)

GCCGTCCTCATCAACATCAA (reverse)

Prkca, a 172-bp fragment, GTGTCCTACCCCAAATCCTTGTC (forward)

GTTGGATCTCCCTGTTCTCCAGT (reverse)

Rplp0, a 136-bp fragment, CTGAGATTCGGGATATGCTGTTG (forward)

AAAGCCTGGAAGAAGGAGGTCTT (reverse)

【解析ソフトウェア】

全ての統計計算は Prism 4 (GraphPad Software)を用いて行った。各動物種の LPCAT2 の配列 mouse (BAF47695)、human (BAF47696) は DDBJ/EMBL/GenBank databases のものを使用した。

4.2 結果

4.2.1 PAFR シグナルによる LPCAT2 リン酸化

過去の報告にある短時間の GPCR 刺激による lyso-PAFAT 活性化のメカニズム(18)を検討することとした。FLAG タグのついた LPCAT1, LPCAT2 をリポフュージョン法で PAFR 安定発現 CHO-S 細胞(CHO-S-PAFR 細胞)に過剰発現した。この細胞はカルシウム応答などの PAFR 下流で起きるシグナル伝達応答を再現できることが確認されている(82)。トランスフェクション後 48 時間経過してから methylcarbanyl PAF (mcPAF)で 30 秒間細胞を刺激した。mcPAF は PAF-AH による加水分解を受けない PAF の安定アナログである(83)。細胞からタンパク質を回収し、放射性同位元素を用いた lyso-PAFAT 酵素活性測定を行った。ベクターコントロール群では lyso-PAFAT 活性がほとんど検出できなかった。刺激の有無で LPCAT1 の活性に変化はなかったが、LPCAT2 発現細胞では刺激した群で lyso-PAFAT 活性が上昇した (図 2 A)。同様に回収したタンパク質を phos-tag SDS-PAGE 後にウェスタンブロットで解析した結果、LPCAT2 のみが刺激に反応してリン酸化を示す泳動度の異なるシグナルをひとつだけ示した (図 2 B)。このことから、以前の報告にある GPCR 刺激後の lyso-PAFAT

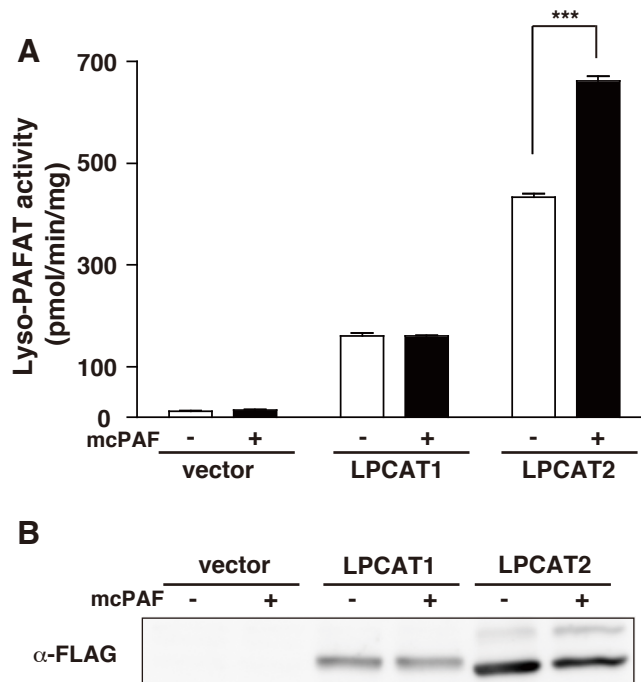


図 2. mcPAF 刺激による LPCAT2 の活性化とリン酸化

PAFR 安定発現 CHO-S 細胞 (CHO-S-PAFR) にベクター、FLAG-LPCAT1、FLAG-LPCAT2 をトランスフェクションし、200 nM の mcPAF で 30 秒間刺激した。

(A) mcPAF 刺激は LPCAT2 の lyso-PAFAT 活性を活性化したが、LPCAT1 では変化しなかった。結果はトリPLICATEで行われたアッセイの平均値 +S. D. で表した。

(B) Phos-tag SDS-PAGE 後にウェスタンブロットを行った。LPCAT2 にのみ、刺激に応じてリン酸化を示す泳動度が異なるシグナルが見られた。

*** は $p < 0.001$ を表し、分散解析とテューキーの多重比較的検定を行った。

それぞれ 3 回独立して行った実験の代表例を示した。文献 (94) より引用して改変した。

活性上昇(18)は LPCAT2 のリン酸化が担っていることが推定された。

4.2.2 LPCAT2 リン酸化と腹腔マクロファージからの PAF 産生

すでに MK2 による Ser34 のリン酸化を同定していたことから(76)、チオグリコレート誘導腹腔マクロファージを LPS で 30 分間刺激した場合と mcPAF で 30 秒間刺激した場合の膜画分を用意してウェスタンブロットにより解析した。LPS 刺激、mcPAF 刺激のいずれの場合も刺激依存的にリン酸化 Ser34 を検出する抗体由来のシグナルが検出された (図 3 A)。一方で mcPAF 刺激の場合には MK2 が活性化されておらず (図 3 A)、異なるシグナル経路が LPCAT2 の同ジアミノ酸残基をリン酸化することが示された。時間軸が異なるシグナル伝達経路が LPCAT2 による PAF 産生を独立に調節していることが示唆された。

4.2.3 内因性の PAF 産生と LPCAT2 のリン酸化

チオグリコレート誘導腹腔マクロファージを mcPAF で経時的に刺激し、LPCAT2 のリン酸化とマクロファージからの PAF 産生を解析した。

刺激したマクロファージからタンパク質を回収し 100,000 x g の沈殿にあたる膜画分をウェスタンブロットで解析した。約 40 分までの mcPAF 刺激では LPCAT2 の総発現量に大きな変化は無かったが、刺激後 10 秒程度の短時間で

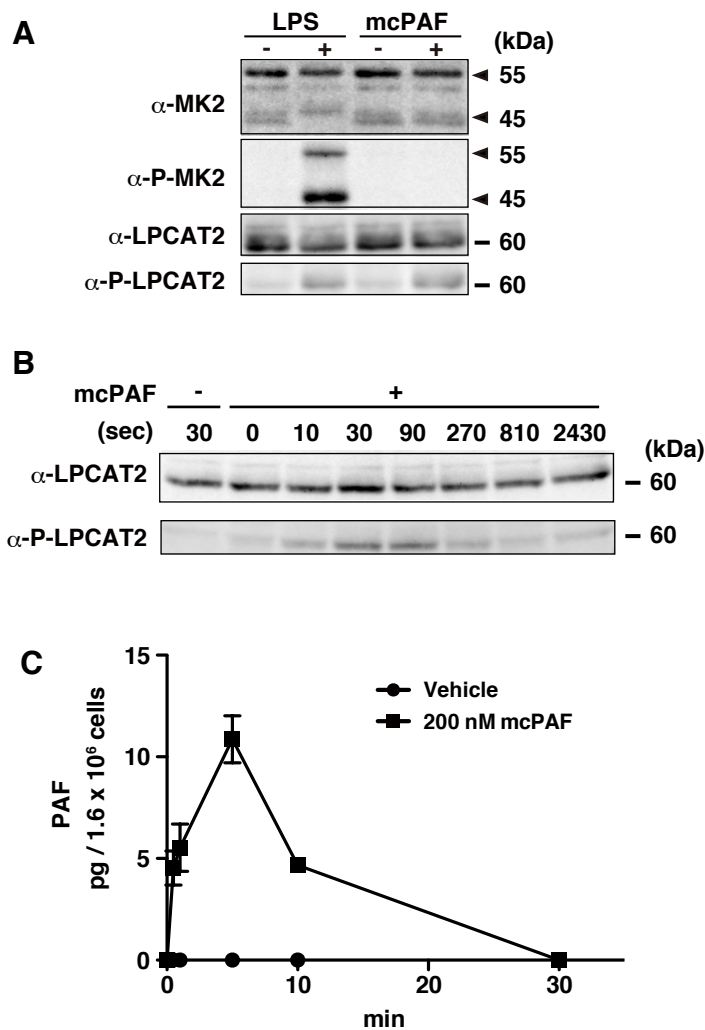


図 3. mcPAF 刺激による LPCAT2 リン酸化の時間経過

(A) チオグリコレート誘導マウス腹腔マクロファージを 100 ng/ml の LPS で 30 分間もしくは、200 nM mcPAF で 30 秒間刺激した。両方の刺激で LPCAT2 の Ser34 リン酸化が観察されたが、mcPAF 刺激時には LPS 刺激時に見られた MK2 のリン酸化は見られなかった。矢頭は MK2 のスプライズバリエーションを表している。

(B) チオグリコレート誘導マウス腹腔マクロファージを 200 nM の mcPAF で図中に記載した時間刺激し、マイクロソーム画分のタンパクをウェスタンブロットで解析した。LPCAT2 は 10-30 秒程度でリン酸化されていた。

(C) 同様に経時的に刺激したマクロファージから産生された PAF 量を LC-MS/MS を用いて定量した。脂質はメタノールで抽出し、重水素ラベルされた PAF を内部標準に用いた。結果は 3 回の実験の平均 \pm S. E. で示されている。

(A) (B) は 3 回独立して行った実験の代表例を示した。文献 (94) より引用して改変した。

ン酸化が始まり、30 秒から 90 秒にかけてリン酸化 LPCAT2 由来のシグナルが最も強くなりその後速やかに消失した (図 3 B)。さらに刺激したマクロファージから脂質を抽出して LC-MS/MS で PAF 産生量を測定したところ、PAF 産生は mcPAF 刺激後 10 秒程度で始まっており、およそ 5 分で最大量となっていた (図 3 C)。

これらの結果から mcPAF 刺激後の LPCAT2 のリン酸化とマクロファージからの PAF 産生が概ね経時的に一致する動態を示すことを明らかにした。

4.2.4 リン酸化部位(Ser34)の同定と変異体解析

次に PAF 刺激によるリン酸化部位が Ser34 以外に存在するか確かめるために CHO-S-PAFR 細胞に 2 種類の Ser34 変異体(76)を過剰発現させ、mcPAF による刺激を 30 秒間行った。タンパク質を phos-tag SDS-PAGE で分離し、抗 FLAG タグ抗体を用いてウェスタンブロットにより解析した。S34A、S34D のふたつの変異体はともに刺激依存的なリン酸化シグナルが消失しており (図 4 A) Ser34 が唯一のリン酸化部位であることが示唆された。同時に回収したタンパク質を用いて放射性同位元素を用いた lyso-PAFAT 酵素活性測定を行った (図 4 B, C)。mcPAF 刺激は野生型 LPCAT2 のふたつの活性 (lyso-PAFAT と LPCAT) を増加

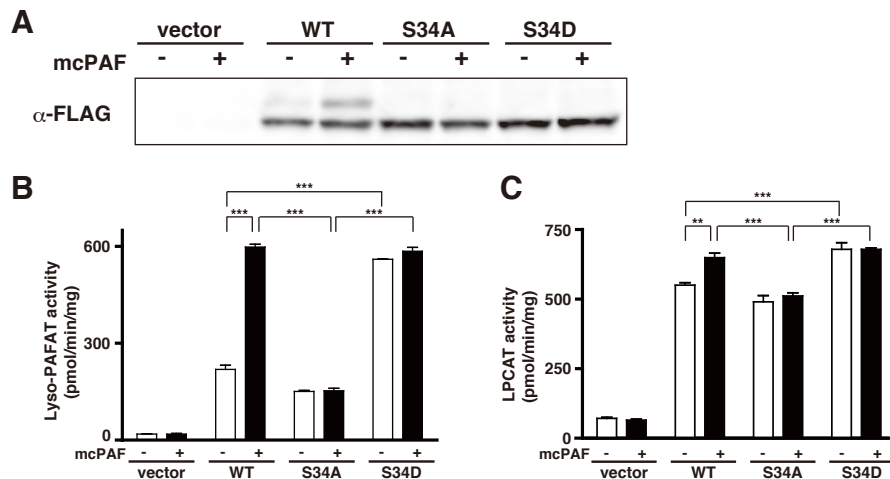


図 4. 34 番目のセリン残基変異体への mcPAF 刺激

CHO-S-PAFR 細胞にベクター、FLAG タグのついた LPCAT2 の野生型 (WT)、S34A、S34D をトランスフェクションし、200 nM の mcPAF で 30 秒間刺激した。

(A) Phos-tag ウェスタンブロット解析では WT のみ刺激に応じてシフトしたシグナルが見られたが、S34A、S34D ふたつの変異体ではこのシグナルは観察されなかった。

(B) (C) mcPAF 刺激は LPCAT2 の lyso-PAFAT 活性と LPCAT 活性の両方を上昇させたが、変異体の活性は刺激の有無で変化しなかった。S34A では無刺激時の活性は保たれるが刺激による活性化は見られなかった。リン酸化フォームを模す S34D は無刺激時に WT より高い活性を持っていた。結果はトリPLICATEで行われたアッセイの平均値 +S. D. で表した。** は $p < 0.01$ 、*** は $p < 0.001$ を表し、分散解析とテューキーの多重比較的検定を行った。それぞれ 3 回独立して行った実験の代表例を示した。文献 (94) より引用して改変した。

させたが、S34A では定常時の活性が保たれているもの mcPAF 依存的な活性上昇は見られなかった。リン酸化フォームを模倣した S34D では mcPAF 刺激がなくとも刺激時の WT と同程度の活性を示していたが、刺激による追加の活性上昇は見られなかった。これらの結果から mcPAF 刺激下でも活性調節を司るリン酸化を受けるのは Ser34 のみであると結論した。

4.2.5 リン酸化による酵素活性変化の生化学的解析

Ser34 リン酸化が LPCAT2 の酵素的な性質に与える影響を調べるため、基質濃度を様々に変化させて酵素活性測定を行い、細胞ホモジネートの K_m と V_{max} をミカエリスメンテンの式から計算した。なお、LPCAT2 は膜貫通型のタンパク質であることが予想され精製が困難であったため、LPCAT2 を過剰発現した CHO-S-PAFR 細胞を mcPAF もしくはコントロールで 30 秒刺激し、その膜画分を酵素源に使用した。

また、今回の条件での mcPAF 刺激によるリン酸化は、過剰発現された全ての LPCAT2 におこる訳ではないため (図 2 B) この実験には純粋なリン酸化フォームに由来する数値が算出できない、精製タンパクを用いていないことから lyso-PAFAT 活性化がリン酸化を介さない補助因子による可能性を排除できな

いという限界がある。リン酸化フォームを含む mcPAF 刺激を受けたホモジネートでは lyso-PAFAT, LPCAT 両方の酵素反応の V_{max} が上昇しており、 K_m の変化はほとんど見られなかった (図 5 A から D)。Ser34 のリン酸化は LPCAT2 の立体構造に変化を与えることで基質の結合には大きな影響を与えないものの、反応産物の放出速度を早めていると推測できた。

4.2.6 リン酸化に至るシグナル伝達経路の解析

30 秒間の mcPAF 刺激によって LPCAT2 リン酸化が引き起こされるシグナル伝達経路を解析した。PAFR の下流では Gq/11-PLC β -イノシトール(1,4,5)三リン酸の経路を介して細胞内カルシウム濃度が急激に上昇することが示されていた(44,84,85)。Ser34 のリン酸化は刺激後 10 秒程度から始まり 30 秒後にはピークを迎える早い反応である (図 3 B) ためカルシウムシグナルの関与について阻害剤を用いて検討した。

細胞内カルシウムイオンをキレートする BAPTA/AM(86,87)で腹腔マクロファージを 20 分間処理して mcPAF で 30 秒間刺激した。BAPTA/AM 処理群では LPCAT2 のリン酸化が阻害されていた (図 6 A)。また、細胞内カルシウムシグナルをより上流で制御するホスホリパーゼ C β (PLC β)を阻害する U73122 お

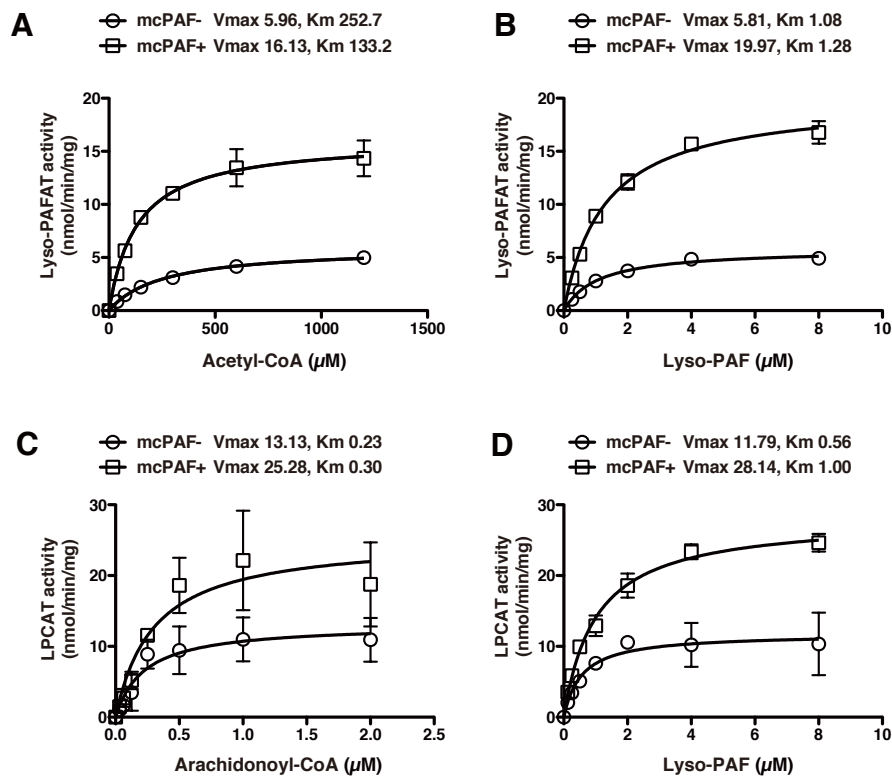


図 5. mcPAF 刺激は LPCAT2 酵素活性の Vmax に影響する。

CHO-S-PAFR 細胞に LPCAT2 の野生型 (WT) をトランスフェクションし、200 nM の mcPAF で 30 秒間刺激した。細胞からミクロソーム画分を回収し活性を測定した lyso-PAFAT 活性を測定するにあたり (A) では 5 μ M 重水素ラベル lyso-PAF と様々な濃度のアセチル CoA を基質とし、(B) では逆にアセチル CoA の濃度を 1 mM に固定し、様々な濃度の lyso-PAF を使用した。

LPCAT 活性を測定する際は、(C) で 5 μ M 重水素ラベル lyso-PAF と様々な濃度の アラキドノイル CoA を基質とし、(D) では判定にアラキドノイル CoA を 2.5 μ M に固定し、様々な濃度の lyso-PAF を使用した。図中の Vmax, Km の単位は nmol/min/mg である。結果はトリPLICATEで行われたアッセイの平均値 \pm S. D. で表した。

それぞれ 3 回独立して行った実験の代表例を示した。文献 (94) より引用して改変した。

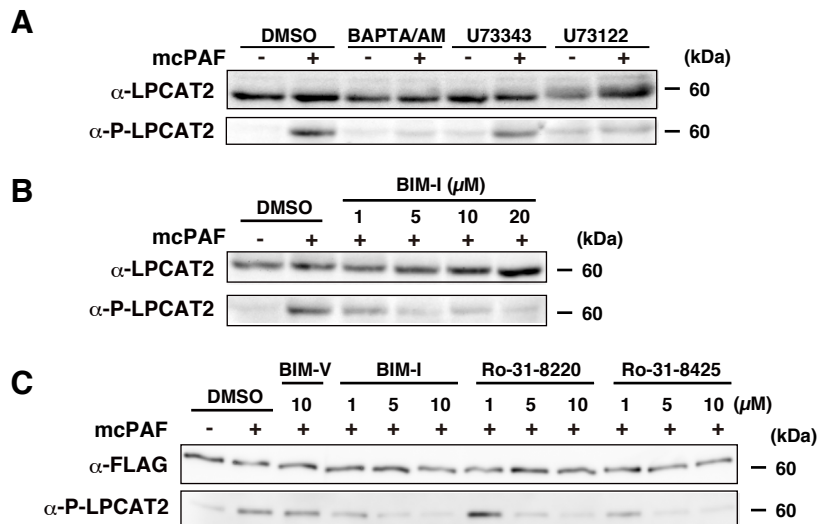


図 6. LPCAT2 リン酸化につながる GPCR 下流シグナル伝達経路の解析

チオグリコレート誘導マウス腹腔マクロファージを各阻害剤で前処理した後 200 nM の mcPAF で 30 秒間刺激した。(A) 10 μ M BAPTA/AM、10 μ M U73122 は LPCAT2 のリン酸化を阻害した。U73343 は U73122 の不活性アナログである。

(B) PKC を阻害する BIM-I による前処理は濃度依存的に LPCAT2 のリン酸化を阻害した。

(C) CHO-S-PAFR 細胞に FLAG タグのついた野生型の LPCAT2 をトランスフェクションし、BIM-I および、cPKC により特異性の高い阻害剤 Ro-31-8220, Ro-31-8425 で前処置し、200 nM の mcPAF で 30 秒間刺激した。BIM-V は不活性アナログである。各阻害剤は LPCAT2 のリン酸化を濃度依存的に阻害した。

それぞれ 3 回以上独立して行った実験の代表例を示した。

文献 (94) より引用して改変した。

よびその不活性アナログである U73343(88)でそれぞれ腹腔マクロファージを 20 分間処理後、mcPAF で 30 秒間刺激した。U73343 では LPCAT2 のリン酸化が見られたが、U73122 処理群ではリン酸化が阻害されていた (図 6 A)。これらの結果から、mcPAF 刺激時には PAFR 下流の $G\alpha q$ が働いて PLC β を介したカルシウム応答が惹起され、リン酸化に至ると考えられた。

さらに、このシグナル伝達経路下流で働き、LPCAT2 のリン酸化に関わる責任リン酸化酵素の同定を試みた。活性調節にカルシウムを必要とするリン酸化酵素として PKC と CaMK を候補と考え、それぞれの阻害剤を用いてリン酸化への寄与を検討した。データには示していないが CaMK を阻害しても LPCAT2 のリン酸化には影響が見られなかった。一方、PKC をアイソフォームによらず幅広く阻害する bisindolylmaleimide-I (BIM-I) (89)でチオグリコレート誘導腹腔マクロファージを処理すると濃度依存的に mcPAF 刺激による LPCAT2 リン酸化が減弱しており (図 6 B)、PKC がリン酸化に関与することが示唆された。

PKC にはアイソフォームが複数あり、conventional PKC (cPKC: α 、 β I、 β II、 γ)、novel PKC (nPKC: δ 、 ϵ 、 η 、 θ)、atypical PKC (aPKC: ζ 、 λ 、 ι)の 3 つのサブグループに分類されている(90)。PAFR 下流シグナルの検討に

は活性化にカルシウムイオンを必要とする cPKC を候補とした。BIM-I と比べて cPKC をより特異的に阻害する低分子化合物として Ro-31-8220、Ro-31-8425(91)がある。LPCAT2 を過剰発現した CHO-S-PAFR 細胞をこれらの薬剤で処理してリン酸化への寄与を検討した。不活性アナログである BIM-V では阻害が見られなかったが、検討した阻害剤はいずれも濃度依存的に mcPAF 刺激後の LPCAT2 リン酸化を阻害した (図 6 C)。

別の方法で cPKC の関与を確かめるため、CHO-S-PAFR 細胞を 100 nM のホルボールエステル (12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA) で 24 時間処理し、cPKC の発現を低下させた。低濃度の TPA 処理は cPKC の発現を薬理的に抑制する(92,93)。細胞ホモジネートをウェスタンブロットで解析した結果、TPA は PKC α の発現を低下させたが、LPCAT2 の発現には影響がなかった (図 7 A)。TPA 処理された細胞に mcPAF 刺激を加えると LPCAT2 のリン酸化は減弱し (図 7 A)、lyso-PAFAT 活性化も抑制されていた (図 7 B)。

上述の実験により cPKC、特に PKC α と LPCAT2 リン酸化の関与が示唆されたがさらに特異的に PKC α を阻害するため siRNA を導入した。PKC α の siRNA は LPCAT2 の発現に影響せず PKC α タンパク質の発現を低下させた (図 7 C)。

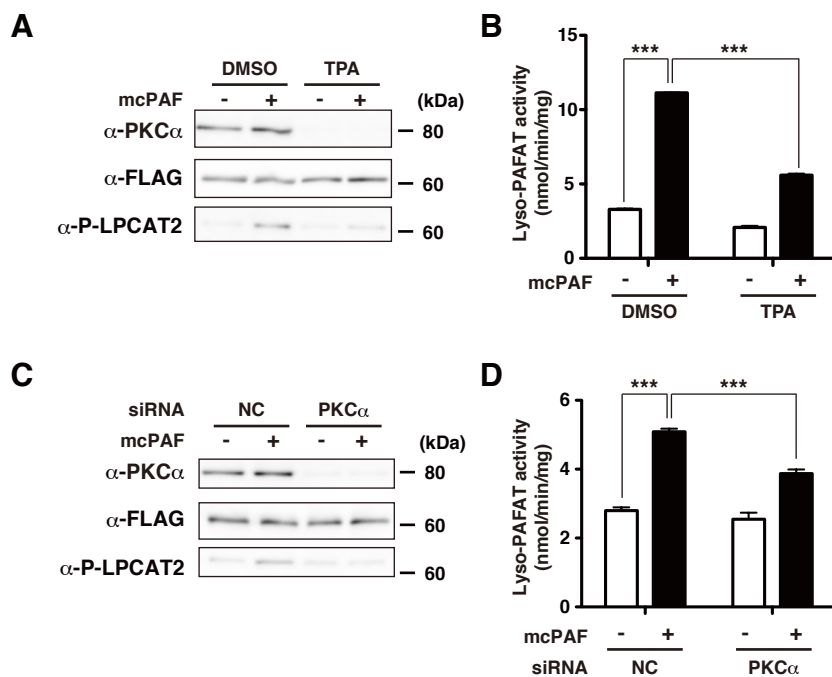


図 7 PKC α の発現量低下と mcPAF 刺激後の LPCAT2 リン酸化

(A, B) CHO-S-PAFR 細胞を 100 nM TPA で 24 時間前処理した。PKC α タンパク質の発現は低下し、リン酸化 LPCAT2 のシグナルは DMSO 処理の細胞に比べて減弱していた。mcPAF 刺激は DMSO 処理の細胞で lyso-PAFAT 活性を上昇させたが TPA 前処理では活性化が抑制されていた。(C, D) PKC α siRNA でノックダウンした CHO-S-PAFR 細胞の PKC α タンパク質の発現は低下し、リン酸化 LPCAT2 のシグナルはコントロール (NC) の細胞に比べて減弱していた。mcPAF 刺激は NC の細胞で lyso-PAFAT 活性を上昇させたがノックダウンでは活性化が抑制されていた。*** は $p < 0.001$ を表し、分散解析とテューキーの多重比較的検定を行った。それぞれ 4 回独立して行った実験の代表例を示した。文献 (94) より引用して改変した。

siRNA を導入された細胞に mcPAF 刺激を加えると LPCAT2 のリン酸化は減弱し(図 7 C)、酵素活性測定では lyso-PAFAT 活性化も抑制されていた(図 7 D)。以上の結果から mcPAF 刺激に引き続いて起こる LPCAT2 リン酸化は PAFR 下流で Gq/11-PLC β -イノシトール(1,4,5)三リン酸の経路を介してジアシルグリセロール(diacylglycerol, DAG)と細胞内カルシウム濃度が急激に上昇し、PKC α が活性化することで起きると結論した(94)。

4.2.7 LPCAT2 は PAF 産生酵素である (ATP 刺激による PAF 産生)

mcPAF とは別の GPCR 刺激による LPCAT2 リン酸化を検討した。なかでも 250 μ M の ATP は 30 秒程度で RAW264.7 細胞の内在発現の LPCAT2 をリン酸化した(図 8 B)。LPCAT2 が PAF 産生を担うことを確認するために LPCAT2 もしくは vector を安定発現する RAW264.7 細胞(76)(それぞれ RAW-LPCAT2、RAW-VEC とした)で siRNA により LPCAT2 をノックダウンした。これらの細胞で siRNA 導入後 48 時間において LPCAT2 の mRNA、タンパクは減少していた(図 8 A, B)。RAW-LPCAT2 細胞における LPCAT2 の内在発現は安定過剰発現された FLAG-LPCAT2 に比べ低かった。ATP 刺激による LPCAT2 のリン酸化は LPCAT2 siRNA 導入細胞で減少していた(図 8 B)。

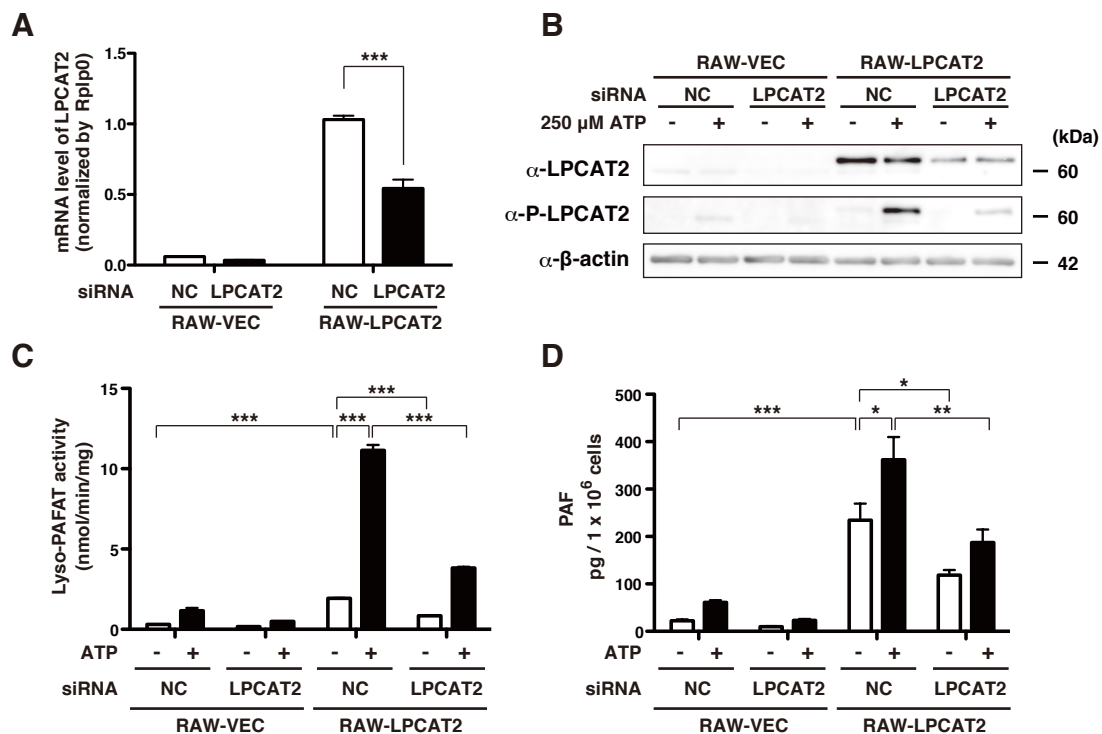


図 8. LPCAT2 は ATP 刺激による PAF 生合成の責任酵素である

LPCAT2 を安定発現した RAW264.7 細胞に LPCAT2 の siRNA をトランスフェクションし、48 時間経過後に 250 μ M の ATP で 30 秒間刺激 (B), (C) もしくは 1 分間 (D) 刺激した。(A), (B) LPCAT2 の siRNA により mRNA およびタンパク質の発現量は低下した。

(C) 重水素ラベルした lyso-PAF へのアセチル転移により lyso-PAFAT 活性を LC-MS/MS で測定した。細胞内の lyso-PAFAT 活性は LPCAT2 のタンパク発現量に相関していた。

(D) ATP 刺激の 1 分後、メタノールにより脂質を回収しカラム精製をおこなって LC-MS/MS で細胞から産生された PAF 量を測定した。PAF 産生量は LPCAT2 のタンパク発現量およびリン酸化の程度と相関していた。

* は $p < 0.05$, ** は $p < 0.01$, *** は $p < 0.001$ を表し、分散解析とチューキーの多重比較的検定を行った。(A) (D) は 3 回の実験の平均 + S.E. を表記している。(B) は実験の平均 + S.D. を示した。(B), (C) はそれぞれ 3 回独立して行った実験の代表例を示した。

文献 (94) より引用して改変した。

重水素ラベルされた基質を用いて酵素活性を測定した結果、LPCAT2 がノックダウンされた場合 lyso-PAFAT 活性は減少していた。また、ATP 刺激によるリン酸化と一致して lyso-PAFAT 活性は上昇していた (図 8 C)。さらに、質量分析を用いた計測から刺激に応答して細胞で PAF が産生されていることが確認された。RAW-LPCAT2 と RAW-VEC の両細胞において刺激により細胞内 PAF 量は増加し、LPCAT2 の安定発現により産生される PAF 量は増加した。また、LPCAT2 がノックダウンされた条件では産生量が減少した (図 8 D)。

以上の結果から、LPCAT2 は細胞外刺激に応答してリン酸化を受け活性化され、実際に細胞からの PAF 産生を引き起こしていることを確認した。

4.2.8 ATP 刺激下流のシグナル伝達経路の解析

次に、ATP 刺激による LPCAT2 リン酸化と PAF 産生が mcPAF で検討したのと同様の経路で起こっているかどうか確かめるために RAW-LPCAT2 細胞を複数の PKC 阻害剤で処理した後に ATP で 30 秒間刺激した。これら阻害剤の全てで LPCAT2 のリン酸化は阻害されており、ATP 刺激においても PKC が関係していることが確認された (図 9 A)。

薬理的に cPKC の発現を抑制するため RAW-LPCAT2 を 100 nM TPA で

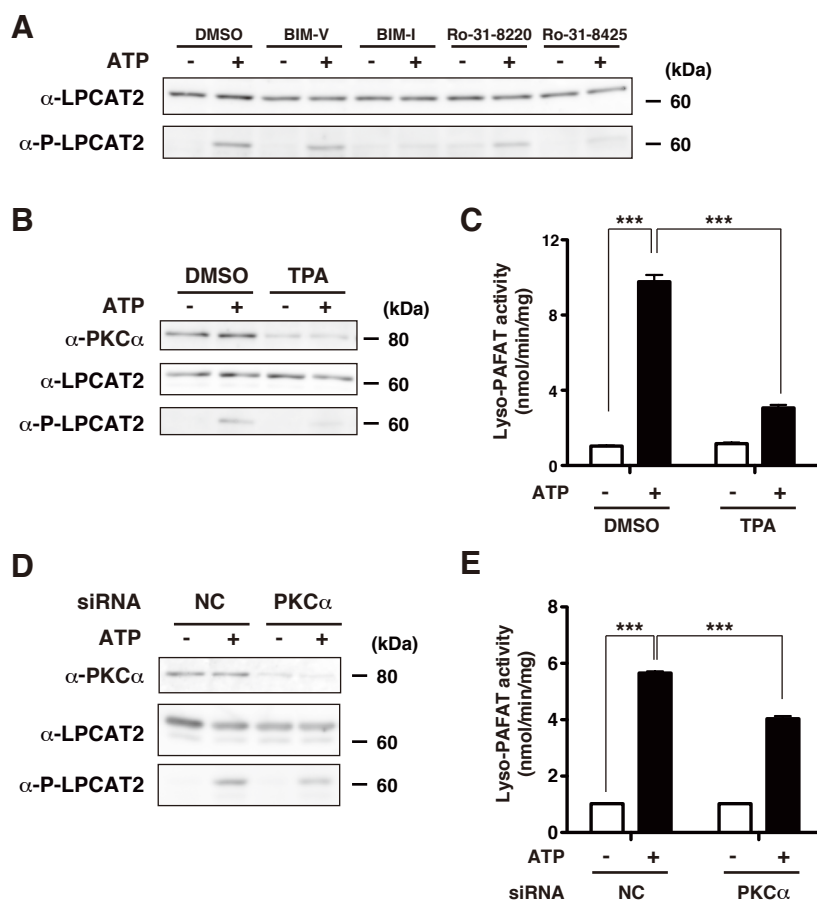


図 9. ATP 刺激後に LPCAT2 リン酸化へ至るシグナル伝達経路の解析

(A) RAW264.7 細胞を 10 μM の各阻害剤で前処理した後 250 μM の ATP で 30 秒間刺激した。BIM-V は不活性アナログである。それぞれ 3 回以上独立して行った実験の代表例を示した。

(B, C) 100 nM TPA で 24 時間前処理したところ PKC α タンパク質の発現は低下し、リン酸化 LPCAT2 のシグナルは DMSO 処理の細胞に比べて減弱していた。ATP 刺激により DMSO 処理の細胞では lyso-PAFAT 活性が上昇したが TPA 前処理では活性化が抑制されていた。

(D, E) PKC α siRNA でノックダウンしたところ PKC α タンパク質の発現は低下し、リン酸化 LPCAT2 のシグナルはコントロール (NC) の細胞に比べて減弱していた。ATP 刺激は NC の細胞で lyso-PAFAT 活性を上昇させたがノックダウンでは活性化が抑制されていた。

*** は $p < 0.001$ を表し、分散解析とテューキーの多重比較的検定を行った。それぞれ 3 回独立して行った実験の代表例を示した。文献 (94) より引用して改変した。

24 時間処理し、ATP で 30 秒間刺激した。ウェスタンブロット解析では TPA 処理により PKC α の発現が検出できないほど低下しており、ATP 刺激による LPCAT2 のリン酸化はほぼ消失していた (図 9 B)。同じタンパク試料を用いた酵素活性測定では、TPA 処理群において ATP 刺激による lyso-PAFAT 活性化は抑制されていた (図 9 C)。

より特異的に PKC α を阻害するため、RAW-LPCAT2 細胞に PKC α の siRNA を導入した。siRNA は LPCAT2 の発現に影響せず PKC α タンパク質の発現を低下させた (図 9 D)。siRNA を導入された細胞を ATP で刺激すると LPCAT2 のリン酸化は減弱し (図 9 D)、酵素活性測定では lyso-PAFAT 活性化も抑制されていた (図 9 E)。LPCAT2 のリン酸化がやや残存しているのは薬理的ノックダウンに比べて PKC の発現を減少させる効率が低かったためと考えられた。

以上から ATP 刺激においても細胞内カルシウム濃度上昇に伴い、PKC α が活性化して LPCAT2 の Ser34 がリン酸化されると結論した(94)。

5. 結論と考察

5.1 結論

本研究では PAF 生合成酵素 lyso-PAFAT の活性調節機構を生化学/酵素学的に解析し、細胞外刺激が LPCAT2 を活性化するまでのシグナル伝達経路を明らかにすることを目的とした。

Phos-tag SDS-PAGE による泳動度の差を用いて細胞外刺激に応答して LPCAT2 がリン酸化されることを示し、変異体実験とリン酸化部位特異的抗体によりリン酸化部位の Ser34 を特定した。加えて、LPCAT2 過剰発現細胞のホモジネートを用いて Ser34 リン酸化が LPCAT2 の酵素活性の V_{max} を上昇させる可能性を示唆した。

阻害剤を用いた薬理学的実験、siRNA を用いた実験によって ATP や PAF 安定アナログによる GPCR 刺激では 30 秒以内の短時間に Gq/11-PLC β -イノシトール(1,4,5)三リン酸の経路を介して DAG の増加と細胞内カルシウムの上昇が起き、PKC α を介して Ser34 がリン酸化されることを示唆した (図 10)。

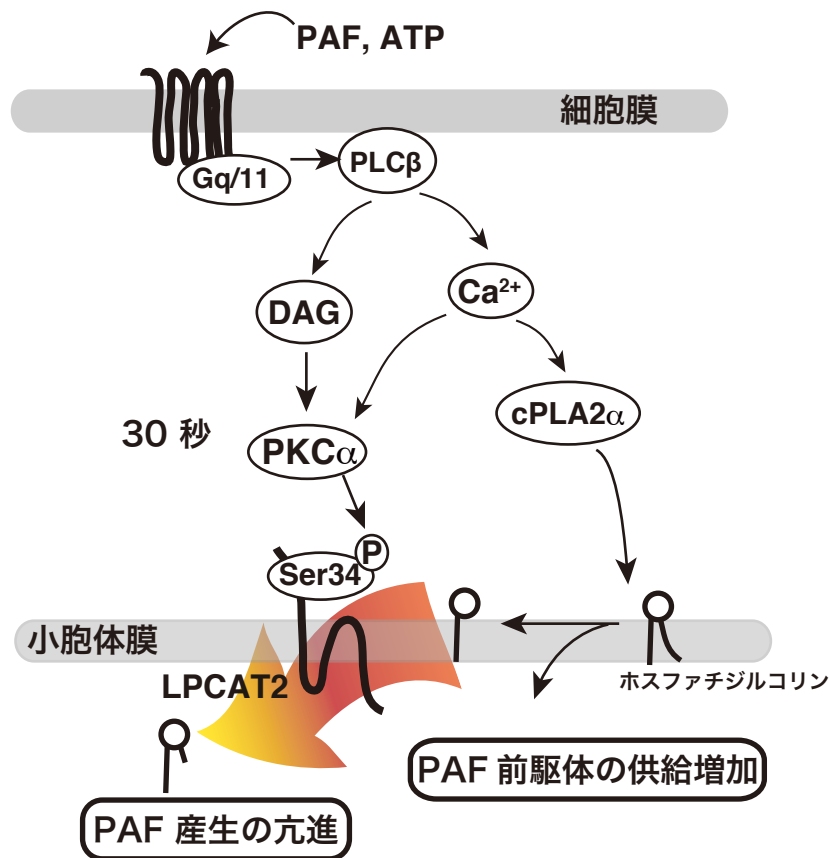


図 10. LPCAT2 リン酸化につながるシグナル伝達経路と PAF 生合成への影響
ATP や mcPAF による GPCR を介した刺激では 30 秒以内の短時間で PKC α に依存して Ser34 がリン酸化される。

生体における急激な PAF 産生には LPCAT2 のリン酸化による活性上昇に加え、基質の一つであるリゾ PAF の供給が必要で、これは細胞内カルシウム濃度上昇や細胞質型ホスホリパーゼ A₂ α (cPLA₂ α) の活性化が必要であることも示唆された。

5.2 考察

今回の解析とこれまでの研究で明らかにした 2 通りのシグナルによる共通のリン酸化部位 Ser34 の制御(76,94)について生理的な意味を考察する。細菌感染を想定すると、まず細菌との接触により TLR を介して細胞内の PAF 産生能を高めることができる。その後、感染が進む過程で脂質メディエーターが組織から放出される、もしくは組織障害により ATP が拡散し一種の細胞障害関連分子パターン(damage-associated molecular pattern, DAMPs)として認識されると即座にカルシウムシグナルが各受容体の下流で応答して PAF 生合成が開始すると考えられる。LPS 刺激に比べて GPCR の刺激が迅速に LPCAT2 のリン酸化を引き起こすのは GPCR 刺激ではカルシウム増加により前駆体リゾ PAF が供給されるまでの時間が短く、即座に PAF 生合成を開始できるためと考えられる。質量分析を用いた解析から、細胞の PAF 産生には LPCAT2 のリン酸化のみならず基質であるリゾ PAF が供給される必要があることが示唆された。細胞内カルシウム濃度上昇により cPLA₂α の活性化と局在の変化を起こすことで生体膜からリゾ PAF を供給すると考えられる(13)。基質の供給と生合成酵素、分解酵素の調和による脂質メディエーターの産生調節がその作用に重要であることを

示唆している。

合成された PAF の分泌、放出メカニズムの解明は今後の課題である。水溶性画分での PAF 分解活性が高いため、細胞外に多量に放出されて距離のある組織に作用している可能性は少ないと考える。生体膜の中で安定してオートクライン的に PAFR に作用しているか、近傍の細胞に次々と受け渡されていると推測する。パラクライン的に作用する場合、単純な拡散か生体膜と一緒に輸送されるのか、もしくはトランスポーターのように PAF 輸送に特化した分子機構があるかなど、更なる検討が必要である。

今回、mcPAF が PAF 生合成活性を上昇させたことから産生された PAF による PAF 産生のポジティブフィードバックも想定される。合成された PAF がどのように作用するかという点に共通する疑問だが、mcPAF が代謝されない PAFR アゴニストであることから今回の実験には限界がある。先述のように PAF は炎症の初期に炎症反応開始の引き金のように働く可能性がある。細胞内でのフィードバックより、炎症の開始期において近接する細胞集団へと次々に PAF シグナルが伝達されていくのではないかと推測する。

また、LPCAT2 がリン脂質を前駆体とする複数の脂質メディエーター産生量

を調節している可能性がある。生体膜リン脂質の 1-アルキル PC から cPLA₂ α により前駆体の lyso-PAF が生成される際、同時に sn-2 位に結合していたアラキドン酸を主とする多価不飽和脂肪酸が放出されプロスタグランジンやロイコトリエンなどのエイコサノイドの前駆体となる。LPCAT2 は PAF を生合成すると同時に放出されたアラキドン酸を lyso-PAF の sn-2 位に再転移して生体膜リン脂質の 1-alkyl PC に戻す活性を持つ(58)。細胞外刺激に応答する際にエイコサノイドの前駆体を膜リン脂質に戻すことで多価不飽和脂肪酸の供給を負に制御しているか、反対に定常状態に置いて膜リン脂質へ前駆体のプールを供給してエイコサノイド産生を増加させている可能性もある。

脂質メディエーターにはもともと血清中に一定量存在し、細胞表面への受容体の輸送と回収で下流のシグナル伝達が調整されるものがある。リゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid, LPA) やスフィンゴシン-1-リン酸 (sphingosine-1-phosphate, S1P) がこの場合にあたり、それぞれ少なくとも 5 個以上の受容体を持ち(95)、細胞表面での受容体発現量の組み合わせにより最終的なシグナル応答の方向性が決定されている。一方で PAF は高い活性を持つ分解系が常に機能していることにより(96)、定常時には血中や組織でほとんど検出

できない。既知の受容体は PAFR ひとつのみで一對一の対応である。多細胞生物の細胞集団において PAF が細胞外の環境に応じて即時に生合成されることで、急激な外環境の変化を迅速に伝える機能を持つと考えられる。比較的化学構造の似ている LPA や S1P などのリゾリン脂質メディエーターと異なる PAF の作用機序にどのような進化的背景があるのかも興味深い。例えばミミズなどの環形動物では体外に大量の PAF が分泌されていることが知られている(97)。ここで観察される PAF は定常状態でほとんど検出できない哺乳類の PAF とは異なる働きをしていると推測できる。実際、これらの動物からは PAFR は発見されていない。開放血管系から閉鎖血管系への進化の過程で血液循環システムが閉じてくること、体内と体外の認識に関係していた可能性を考察できる。実際に進化の過程で脊索動物や脊椎動物など異なる進化の過程にある動物間での比較を行うと脂質メディエーターのより本質的な役割の変遷を明らかにできる可能性がある。

PAF はこれまで敗血症などの感染症に限らず、喘息やアナフィラキシーなどのアレルギー疾患、血圧の調節、分娩、痛みなど多彩な病態生理との関わりが示唆されてきた(44)。多くの受容体アンタゴニストが開発され、疾患動物モデル

での効果(98)を根拠に喘息などの疾患で臨床試験が行われたが、結果は一定せず最終的にヒトでの効果不足や副作用により臨床応用には至らなかった(55-57)。

喘息を標的としたアレルギー性疾患の動物モデルが短期間で完成されるのに対し、ヒト疾患は長い期間をかけて慢性的に進行するという違いがある。動物疾患モデルがヒト疾患のどの過程をモデル化しているか改めて検証する必要がある。結果的に短時間で局所に作用する PAF の性質からは受容体拮抗薬により下流シグナルを阻害するのには困難だったと考えられる。今回、長らく不明であった生合成酵素 lyso-PAFAT の活性化機序が明らかになった(76,94)ことで酵素阻害によって PAF 病態生理作用へ介入する新しいアプローチを提供できたと考えている。実際に、大規模化合物ライブラリーからの LPCAT2 特異的阻害剤のスクリーニングにより、阻害剤候補化合物の同定につながった(99)。現在、所属研究室において疾患動物モデルを用いた *in vivo* での解析が進められている。

このように当研究では生理活性脂質である PAF の生合成調節機構を生化学的に明らかにした (図 10)。これらの基礎的な知見を基に、生体における PAF の病態生理作用のさらなる解明と創薬に関連して臨床での疾患制御が期待される。

6. 謝辞

まず、本研究の遂行に当たり学部学生時代から多大なご指導を賜りました清水孝雄特任教授に深甚なる感謝の意を表します。具体的な実験の遂行に当たっては進藤英雄博士に数多くのご助言とご指導、励ましをいただき、心より感謝申し上げます。博士論文作成にあたっては北芳博准教授にも多大な支援を賜りました。

また、本研究の過程で多くの議論を行い、ご助言をいただきましたリポドミクス社会連携講座の皆様、国立国際医療研究センター脂質シグナリングプロジェクトの皆様に感謝致します。

7. 参考文献

1. Gorter, E., and Grendel, F. (1925) On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood. *The Journal of experimental medicine* **41**, 439-443
2. Danielli, J. F., and Davson, H. (1935) A contribution to the theory of permeability of thin films. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **5**, 495-508
3. Singer, S. J., and Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731
4. de Mendoza, D. (2014) Temperature sensing by membranes. *Annual review of microbiology* **68**, 101-116
5. Cybulski, L. E., Ballering, J., Moussatova, A., Inda, M. E., Vazquez, D. B., Wassenaar, T. A., de Mendoza, D., Tieleman, D. P., and Killian, J. A. (2015) Activation of the bacterial thermosensor DesK involves a serine zipper dimerization motif that is modulated by bilayer thickness. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 6353-6358

6. Benveniste, J., Henson, P. M., and Cochrane, C. G. (1972)
Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *The Journal of experimental medicine* **136**, 1356-1377
7. Demopoulos, C. A., Pinckard, R. N., and Hanahan, D. J. (1979)
Platelet-activating factor. Evidence for
1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J Biol Chem* **254**, 9355-9358
8. Blank, M. L., Snyder, F., Byers, L. W., Brooks, B., and Muirhead, E. E. (1979) Antihypertensive activity of an alkyl ether analog of phosphatidylcholine. *Biochem Biophys Res Commun* **90**, 1194-1200
9. Benveniste, J., Tence, M., Varenne, P., Bidault, J., Boulet, C., and Polonsky, J. (1979) [Semi-synthesis and proposed structure of platelet-activating factor (P.A.F.): PAF-acether an alkyl ether analog of lysophosphatidylcholine]. *Comptes rendus des seances de*

l'Academie des sciences. Serie D, Sciences naturelles **289**, 1037-1040

10. Hanahan, D. J., Demopoulos, C. A., Liehr, J., and Pinckard, R. N. (1980) Identification of platelet activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. *J Biol Chem* **255**, 5514-5516
11. Muirhead, E. E., Stirman, J. A., and Jones, F. (1960) Renal autoexplantation and protection against renoprival hypertensive cardiovascular disease and hemolysis. *The Journal of clinical investigation* **39**, 266-281
12. Prewitt, R. L., Leach, B. E., Byers, L. W., Brooks, B., Lands, W. E., and Muirhead, E. E. (1979) Antihypertensive polar renomedullary lipid, a semisynthetic vasodilator. *Hypertension* **1**, 299-308
13. 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. (1997) Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition. *Nature* **390**, 618-622

14. Shindou, H., Ishii, S., Uozumi, N., and Shimizu, T. (2000) Roles of cytosolic phospholipase A(2) and platelet-activating factor receptor in the Ca-induced biosynthesis of PAF. *Biochem Biophys Res Commun* **271**, 812-817
15. Benveniste, J., Le Couedic, J. P., Polonsky, J., and Tence, M. (1977) Structural analysis of purified platelet-activating factor by lipases. *Nature* **269**, 170-171
16. Renooij, W., and Snyder, F. (1981) Biosynthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet activating factor and a hypotensive lipid) by cholinephosphotransferase in various rat tissues. *Biochimica et biophysica acta* **663**, 545-556
17. Woodard, D. S., Lee, T. C., and Snyder, F. (1987) The final step in the de novo biosynthesis of platelet-activating factor. Properties of a unique CDP-choline:1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol choline-phosphotransferase in microsomes from the renal inner medulla of rats. *J Biol Chem* **262**, 2520-2527

18. Shindou, H., Ishii, S., Yamamoto, M., Takeda, K., Akira, S., and Shimizu, T. (2005) Priming effect of lipopolysaccharide on acetyl-coenzyme A:lyso-platelet-activating factor acetyltransferase is MyD88 and TRIF independent. *J Immunol* **175**, 1177-1183
19. Tosaki, T., Sakamoto, H., Kitahara, J., Imai, H., and Nakagawa, Y. (2007) Enhancement of acetyl-CoA: 1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase activity by hydrogen peroxide. *Biol Pharm Bull* **30**, 272-278
20. Jouvin-Marche, E., Ninio, E., Beaurain, G., Tence, M., Niaudet, P., and Benveniste, J. (1984) Biosynthesis of Paf-acether (platelet-activating factor). VII. Precursors of Paf-acether and acetyl-transferase activity in human leukocytes. *J Immunol* **133**, 892-898
21. Owen, J. S., Baker, P. R., O'Flaherty, J. T., Thomas, M. J., Samuel, M. P., Wooten, R. E., and Wykle, R. L. (2005) Stress-induced platelet-activating factor synthesis in human neutrophils. *Biochimica*

et biophysica acta **1733**, 120-129

22. Nixon, A. B., O'Flaherty, J. T., Salyer, J. K., and Wykle, R. L. (1999) Acetyl-CoA:1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase is directly activated by p38 kinase. *J Biol Chem* **274**, 5469-5473
23. Doebber, T. W., and Wu, M. S. (1987) Platelet-activating factor (PAF) stimulates the PAF-synthesizing enzyme acetyl-CoA:1-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine O²-acetyltransferase and PAF synthesis in neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7557-7561
24. Blank, M. L., Cress, E. A., Whittle, T., and Snyder, F. (1981) In vivo metabolism of a new class of biologically active phospholipids: 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a platelet activating-hypotensive phospholipid. *Life sciences* **29**, 769-775
25. Stafforini, D. M., Prescott, S. M., and McIntyre, T. M. (1987) Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Purification and

- properties. *J Biol Chem* **262**, 4223-4230
26. Yanoshita, R., Kudo, I., Ikizawa, K., Chang, H. W., Kobayashi, S., Ohno, M., Nojima, S., and Inoue, K. (1988) Hydrolysis of platelet activating factor and its methylated analogs by acetylhydrolases. *Journal of biochemistry* **103**, 815-819
27. Tjoelker, L. W., Eberhardt, C., Unger, J., Trong, H. L., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Stafforini, D. M., Prescott, S. M., and Gray, P. W. (1995) Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad. *J Biol Chem* **270**, 25481-25487
28. Tjoelker, L. W., Wilder, C., Eberhardt, C., Stafforini, D. M., Dietsch, G., Schimpf, B., Hooper, S., Le Trong, H., Cousens, L. S., Zimmerman, G. A., Yamada, Y., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., and Gray, P. W. (1995) Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* **374**, 549-553
29. Hattori, M., Arai, H., and Inoue, K. (1993) Purification and

- characterization of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* **268**, 18748-18753
30. Hattori, K., Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H., and Inoue, K. (1995) Purification and characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase II from bovine liver cytosol. *J Biol Chem* **270**, 22308-22313
31. Chilton, F. H., O'Flaherty, J. T., Ellis, J. M., Swendsen, C. L., and Wykle, R. L. (1983) Metabolic fate of platelet-activating factor in neutrophils. *J Biol Chem* **258**, 6357-6361
32. Kramer, R. M., Patton, G. M., Pritzker, C. R., and Deykin, D. (1984) Metabolism of platelet-activating factor in human platelets. Transacylase-mediated synthesis of 1-O-alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *J Biol Chem* **259**, 13316-13320
33. Malone, B., Lee, T., and Snyder, F. (1985) Inactivation of platelet activating factor by rabbit platelets. Lyso-platelet activating factor as

a key intermediate with phosphatidylcholine as the source of arachidonic acid in its conversion to a tetraenoic acylated product. *J Biol Chem* **260**, 1531-1534

34. Tokuoka, S. M., Kita, Y., Shindou, H., and Shimizu, T. (2013) Alkylglycerol monooxygenase as a potential modulator for PAF synthesis in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **436**, 306-312
35. Tsujimura, Y., Obata, K., Mukai, K., Shindou, H., Yoshida, M., Nishikado, H., Kawano, Y., Minegishi, Y., Shimizu, T., and Karasuyama, H. (2008) Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis. *Immunity* **28**, 581-589
36. Jonsson, F., Mancardi, D. A., Kita, Y., Karasuyama, H., Iannascoli, B., Van Rooijen, N., Shimizu, T., Daeron, M., and Bruhns, P. (2011) Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *The Journal of clinical investigation* **121**, 1484-1496

37. Jonsson, F., Mancardi, D. A., Zhao, W., Kita, Y., Iannascoli, B., Khun, H., van Rooijen, N., Shimizu, T., Schwartz, L. B., Daeron, M., and Bruhns, P. (2012) Human FcγRIIIA induces anaphylactic and allergic reactions. *Blood* **119**, 2533-2544
38. Nagase, T., Ishii, S., Kume, K., Uozumi, N., Izumi, T., Ouchi, Y., and Shimizu, T. (1999) Platelet-activating factor mediates acid-induced lung injury in genetically engineered mice. *Journal of Clinical Investigation* **104**, 1071-1076
39. Nagase, T., Ishii, S., Shindou, H., Ouchi, Y., and Shimizu, T. (2002) Airway hyperresponsiveness in transgenic mice overexpressing platelet activating factor receptor is mediated by an atropine-sensitive pathway. *American journal of respiratory and critical care medicine* **165**, 200-205
40. Souza, D. G., Pinho, V., Soares, A. C., Shimizu, T., Ishii, S., and Teixeira, M. M. (2003) Role of PAF receptors during intestinal ischemia and reperfusion injury. A comparative study between PAF

- receptor-deficient mice and PAF receptor antagonist treatment. *Brit J Pharmacol* **139**, 733-740
41. Hasegawa, S., Kohro, Y., Shiratori, M., Ishii, S., Shimizu, T., Tsuda, M., and Inoue, K. (2010) Role of PAF Receptor in Proinflammatory Cytokine Expression in the Dorsal Root Ganglion and Tactile Allodynia in a Rodent Model of Neuropathic Pain. *Plos One* **5**
42. Kihara, Y., Yanagida, K., Masago, K., Kita, Y., Hishikawa, D., Shindou, H., Ishii, S., and Shimizu, T. (2008) Platelet-Activating Factor Production in the Spinal Cord of Experimental Allergic Encephalomyelitis Mice via the Group IVA Cytosolic Phospholipase A2-Lyso-PAFAT Axis. *The Journal of Immunology* **181**, 5008-5014
43. Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., and McIntyre, T. M. (1990) Platelet-activating factor. *J Biol Chem* **265**, 17381-17384
44. Ishii, S., and Shimizu, T. (2000) Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res* **39**, 41-82

45. Orozco, C., Perkins, T., and Clarke, F. M. (1986) Platelet-activating factor induces the expression of early pregnancy factor activity in female mice. *Journal of reproduction and fertility* **78**, 549-555
46. Frenkel, R. A., Muguruma, K., and Johnston, J. M. (1996) The biochemical role of platelet-activating factor in reproduction. *Prog Lipid Res* **35**, 155-168
47. Valone, F. H., Coles, E., Reinhold, V. R., and Goetzl, E. J. (1982) Specific binding of phospholipid platelet-activating factor by human platelets. *J Immunol* **129**, 1637-1641
48. Hwang, S. B., Lee, C. S., Cheah, M. J., and Shen, T. Y. (1983) Specific receptor sites for 1-O-alkyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet activating factor) on rabbit platelet and guinea pig smooth muscle membranes. *Biochemistry* **22**, 4756-4763
49. Hwang, S. B., Lam, M. H., and Shen, T. Y. (1985) Specific binding sites for platelet activating factor in human lung tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **128**, 972-979

50. Braquet, P., Touqui, L., Shen, T. Y., and Vargaftig, B. B. (1987) Perspectives in platelet-activating factor research. *Pharmacological reviews* **39**, 97-145
51. Biftu, T., Gamble, N. F., Doebber, T., Hwang, S. B., Shen, T. Y., Snyder, J., Springer, J. P., and Stevenson, R. (1986) Conformation and activity of tetrahydrofuran lignans and analogues as specific platelet activating factor antagonists. *Journal of medicinal chemistry* **29**, 1917-1921
52. Kornecki, E., Ehrlich, Y. H., and Lenox, R. H. (1984) Platelet-activating factor-induced aggregation of human platelets specifically inhibited by triazolobenzodiazepines. *Science* **226**, 1454-1456
53. Honda, Z., Nakamura, M., Miki, I., Minami, M., Watanabe, T., Seyama, Y., Okado, H., Toh, H., Ito, K., Miyamoto, T., and et al. (1991) Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature* **349**, 342-346

54. Honda, Z., Ishii, S., and Shimizu, T. (2002) Platelet-activating factor receptor. *Journal of biochemistry* **131**, 773-779
55. Hozawa, S., Haruta, Y., Ishioka, S., and Yamakido, M. (1995) Effects of a PAF antagonist, Y-24180, on bronchial hyperresponsiveness in patients with asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* **152**, 1198-1202
56. Freitag, A., Watson, R. M., Matsos, G., Eastwood, C., and O'Byrne, P. M. (1993) Effect of a platelet activating factor antagonist, WEB 2086, on allergen induced asthmatic responses. *Thorax* **48**, 594-598
57. Evans, D. J., Barnes, P. J., Cluzel, M., and O'Connor, B. J. (1997) Effects of a potent platelet-activating factor antagonist, SR27417A, on allergen-induced asthmatic responses. *American journal of respiratory and critical care medicine* **156**, 11-16
58. Shindou, H., Hishikawa, D., Nakanishi, H., Harayama, T., Ishii, S., Taguchi, R., and Shimizu, T. (2007) A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of

- inflammatory cells. Cloning and characterization of acetyl-CoA:LYSO-PAF acetyltransferase. *J Biol Chem* **282**, 6532-6539
59. Harayama, T., Shindou, H., Ogasawara, R., Suwabe, A., and Shimizu, T. (2008) Identification of a novel noninflammatory biosynthetic pathway of platelet-activating factor. *J Biol Chem* **283**, 11097-11106
60. Shindou, H., and Shimizu, T. (2009) Acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases. *J Biol Chem* **284**, 1-5
61. Nakanishi, H., Shindou, H., Hishikawa, D., Harayama, T., Ogasawara, R., Suwabe, A., Taguchi, R., and Shimizu, T. (2006) Cloning and characterization of mouse lung-type acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1). Expression in alveolar type II cells and possible involvement in surfactant production. *J Biol Chem* **281**, 20140-20147
62. Robinson, M., Blank, M. L., and Snyder, F. (1985) Acylation of lysophospholipids by rabbit alveolar macrophages. Specificities of CoA-dependent and CoA-independent reactions. *J Biol Chem* **260**,

7889-7895

63. Sugiura, T., Masuzawa, Y., Nakagawa, Y., and Waku, K. (1987) Transacylation of lyso platelet-activating factor and other lysophospholipids by macrophage microsomes. Distinct donor and acceptor selectivities. *J Biol Chem* **262**, 1199-1205
64. Sugiura, T., Onuma, Y., Sekiguchi, N., and Waku, K. (1982) Ether phospholipids in guinea pig polymorphonuclear leukocytes and macrophages. Occurrence of high levels of 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *Biochimica et biophysica acta* **712**, 515-522
65. Shimizu, T. (2009) Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **49**, 123-150
66. Gomez-Cambronero, J., Velasco, S., Mato, J. M., and Sanchez-Crespo, M. (1985) Modulation of lyso-platelet activating factor: acetyl-CoA acetyltransferase from rat splenic microsomes. The role of cyclic

- AMP-dependent protein kinase. *Biochimica et biophysica acta* **845**,
516-519
67. Domenech, C., Machado-De Domenech, E., and Soling, H. D. (1987)
Regulation of acetyl-CoA:1-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine
O²-acetyltransferase (lyso-PAF-acetyltransferase) in exocrine glands.
Evidence for an activation via phosphorylation by
calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **262**,
5671-5676
68. Alonso, F., Gil, M. G., Sanchez-Crespo, M., and Mato, J. M. (1982)
Activation of 1-alkyl-2-lysoglycero-3-phosphocholine. Acetyl-CoA
transferase during phagocytosis in human polymorphonuclear
leukocytes. *J Biol Chem* **257**, 3376-3378
69. Lee, T., Lenihan, D. J., Malone, B., Roddy, L. L., and Wasserman, S. I.
(1984) Increased biosynthesis of platelet-activating factor in activated
human eosinophils. *J Biol Chem* **259**, 5526-5530
70. Alam, I., and Silver, M. J. (1986) Acetyltransferase activity in human

platelet microsomes and washed platelets. *Biochimica et biophysica acta* **884**, 67-72

71. Lenihan, D. J., and Lee, T. C. (1984) Regulation of platelet activating factor synthesis: modulation of 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine:acetyl-CoA acetyltransferase by phosphorylation and dephosphorylation in rat spleen microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* **120**, 834-839
72. Ninio, E., Joly, F., Hieblot, C., Bessou, G., Mencia-Huerta, J. M., and Benveniste, J. (1987) Biosynthesis of paf-acether. IX. Role for a phosphorylation-dependent activation of acetyltransferase in antigen-stimulated mouse mast cells. *J Immunol* **139**, 154-160
73. Nieto, M. L., Velasco, S., and Sanchez Crespo, M. (1988) Modulation of acetyl-CoA:1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine (lyso-PAF) acetyltransferase in human polymorphonuclears. The role of cyclic AMP-dependent and phospholipid sensitive, calcium-dependent protein kinases. *J Biol Chem* **263**, 4607-4611

74. Katayama, H., Tabata, T., Ishihama, Y., Sato, T., Oda, Y., and Nagasu, T. (2004) Efficient in-gel digestion procedure using 5-cyclohexyl-1-pentyl-beta-D-maltoside as an additive for gel-based membrane proteomics. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**, 2388-2394
75. Nakamura, T., Myint, K. T., and Oda, Y. (2010) Ethylenediaminetetraacetic acid increases identification rate of phosphoproteomics in real biological samples. *Journal of proteome research* **9**, 1385-1391
76. Morimoto, R., Shindou, H., Oda, Y., and Shimizu, T. (2010) Phosphorylation of lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 at Ser34 enhances platelet-activating factor production in endotoxin-stimulated macrophages. *J Biol Chem* **285**, 29857-29862
77. Gaestel, M. (2006) MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 120-130
78. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle

- of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254
79. Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K., and Koike, T. (2006) Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol Cell Proteomics* **5**, 749-757
80. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* **37**, 911-917
81. Yamada, M., Kita, Y., Kohira, T., Yoshida, K., Hamano, F., Tokuoka, S. M., and Shimizu, T. (2015) A comprehensive quantification method for eicosanoids and related compounds by using liquid chromatography/mass spectrometry with high speed continuous ionization polarity switching. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **995-996**, 74-84
82. Ishii, S., Kihara, Y., and Shimizu, T. (2005) Identification of T cell death-associated gene 8 (TDAG8) as a novel acid sensing

- G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* **280**, 9083-9087
83. Kume, K., and Shimizu, T. (1997) Platelet-activating factor (PAF) induces growth stimulation, inhibition, and suppression of oncogenic transformation in NRK cells overexpressing the PAF receptor. *J Biol Chem* **272**, 22898-22904
84. Singer, W. D., Brown, H. A., and Sternweis, P. C. (1997) Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu Rev Biochem* **66**, 475-509
85. Rhee, S. G. (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* **70**, 281-312
86. Tsien, R. Y. (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* **19**, 2396-2404
87. Tsien, R. Y. (1981) A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* **290**, 527-528
88. Thompson, A. K., Mostafapour, S. P., Denlinger, L. C., Bleasdale, J. E.,

- and Fisher, S. K. (1991) The aminosteroid U-73122 inhibits muscarinic receptor sequestration and phosphoinositide hydrolysis in SK-N-SH neuroblastoma cells. A role for Gp in receptor compartmentation. *J Biol Chem* **266**, 23856-23862
89. Martiny-Baron, G., Kazanietz, M. G., Mischak, H., Blumberg, P. M., Kochs, G., Hug, H., Marme, D., and Schachtele, C. (1993) Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J Biol Chem* **268**, 9194-9197
90. Steinberg, S. F. (2008) Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* **88**, 1341-1378
91. Wilkinson, S. E., Parker, P. J., and Nixon, J. S. (1993) Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *Biochem J* **294** (Pt 2), 335-337
92. Ballester, R., and Rosen, O. M. (1985) Fate of immunoprecipitable protein kinase C in GH3 cells treated with phorbol 12-myristate 13-acetate. *J Biol Chem* **260**, 15194-15199

93. Ohno, S., Konno, Y., Akita, Y., Yano, A., and Suzuki, K. (1990) A point mutation at the putative ATP-binding site of protein kinase C alpha abolishes the kinase activity and renders it down-regulation-insensitive. A molecular link between autophosphorylation and down-regulation. *J Biol Chem* **265**, 6296-6300
94. Morimoto, R., Shindou, H., Tarui, M., and Shimizu, T. (2014) Rapid production of platelet-activating factor is induced by protein kinase Calpha-mediated phosphorylation of lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 protein. *J Biol Chem* **289**, 15566-15576
95. Blaho, V. A., and Hla, T. (2011) Regulation of mammalian physiology, development, and disease by the sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid receptors. *Chemical reviews* **111**, 6299-6320
96. Arai, H., Koizumi, H., Aoki, J., and Inoue, K. (2002) Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH). *Journal of biochemistry* **131**, 635-640

97. Sugiura, T., Fukuda, T., Miyamoto, T., and Waku, K. (1992) Distribution of alkyl and alkenyl ether-linked phospholipids and platelet-activating factor-like lipid in various species of invertebrates. *Biochimica et biophysica acta* **1126**, 298-308
98. Arima, M., Yukawa, T., and Makino, S. (1995) Effect of YM264 on the airway hyperresponsiveness and the late asthmatic response in a guinea pig model of asthma. *Chest* **108**, 529-534
99. Tarui, M., Shindou, H., Kumagai, K., Morimoto, R., Harayama, T., Hashidate, T., Kojima, H., Okabe, T., Nagano, T., Nagase, T., and Shimizu, T. (2014) Selective inhibitors of a PAF biosynthetic enzyme lysophosphatidylcholine acyltransferase 2. *Journal of lipid research* **55**, 1386-1396