

ショウジョウバエとマウスの突然変異を用いた 細胞変性機構の解明

(研究課題番号 02680205)

平成3年度科学研究費補助金 (一般研究C)
研究成果報告書

平成4年3月

研究代表者 井上 宏子

(早稲田大学・人間科学部)

はしがき

細胞変性の分子過程の解明は、細胞の発生と分化を理解するための一つの重要なアプローチとして位置づけられているが、これまでそのメカニズムについては明らかにされてこなかった。この問題を追及することは、この他にもチューブ状の動物器官の形成やがん細胞の致死条件を決定するのに極めて重要な意義を有していることはよく知られていることである。

研究代表者は、その手掛かりをつかむためにショウジョウバエとマウスの突然変異、及びがん細胞株を用いて研究を進めてきた。そして2年間にわたる本研究で細胞変性にかかわる分子を見だした。このことは今後の研究に示唆を与えるものと考えられる。

本研究を進めるにあたり、多大なご援助をいただいた皆様に深く感謝いたします。

研究組織：

研究代表者 井上 宏子（早稲田大学・人間科学部・講師）

研究経費：

平成2年度	1,000 千円
平成3年度	1,200 千円
計	2,200 千円

研究発表：

(1) 学会誌等

S. Toyoshima, N. Matsumoto, P. Wong, H. Inoue, T. Yoshioka, Y. Hotta, and T. Osawa: Purification and Partial amino acid sequences of phosphoinositide-specific phospholipase C of *Drosophila* eye. *J. Biol. Chem.* 265, 14842-14848 (1990)

S. Noguchi, Y. Kubota, T. Shuin, E. Ito, H. Inoue and T. Yoshioka: Effect of extracellular phosphatidylinositol on c-myc gene expressed human renal cancer cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 644-650 (1992)

H. Inoue, T. Yoshioka, Y. Hotta: Partial purification and characterization of membrane-associated diacylglycerol kinase of *Drosophila* Heads. *Biochim. Biophys. Acta* (in press)

(2) 口頭発表

井上宏子、鶴田敏彦、吉岡亨、堀田凱樹: ショウジョウバエ視細胞に局在するジアシルグリセロールキナーゼ の特性とその生理作用
第28回日本生物物理学会年会 (1990) 福岡

宮沢淳夫、井上宏子、吉岡亨、梅田真郷、五十嵐浩二、井上圭三：
ラット小脳プルキンエ細胞におけるホスファチジルセリンとC
キナーゼの相互作用、第64回日本生化学学会大会 (1991) 東京

井上宏子、吉岡亨、野口純男、窪田吉信：脳神経細胞のプログラム死に関与するガン遺伝子の役割、第29回生物物理学学会年会（1991）
仙台

A. Miyazawa, H. Inoue, T. Yoshioka, D. Alkon: A direct evidence that protein kinase C is exist in the neuron of *Hermisenda crassicornis*. 第15回日本神経科学学会（1991）東京

(3) 出版物

井上宏子、吉岡亨：無脊椎動物視細胞のセカンドメッセンジャーはイノシトール三リン酸か？ 生物物理 30, 193-196 (1990)

井上宏子、吉岡亨：イノシトールリン脂質代謝関連酵素のショウジョウバエ突然変異を用いた解析、蛋白質 核酸 酵素 36, 299-305, (1991)

井上宏子、堀田凱樹：視覚情報変換突然変異におけるリン脂質代謝異常、新生化学実験講座14巻（印刷中）

研究成果

I. 目的

細胞変性の分子機構の解明の手掛かりをつかむために、我々はショウジョウバエの視細胞が変性を起こす突然変異において欠失している分子を検索してきた。なぜならば、もし或る分子が欠損した結果、細胞変性が起こったことが判明すれば、その分子こそ生体内では代用充足が効かない重要な分子であるはずだからである。その結果、ジアシルグリセロール (DG) をリン酸化してホスファチジン酸を生成する DG キナーゼがその分子であることを可能性を見出した¹⁾。本研究の目的はこの点を確認することと、これが他種の細胞における変性の原因となっているかどうかを明らかにすることであった。

II. 実験結果

(1) ショウジョウバエ複眼の DG キナーゼの精製

我々はショウジョウバエの視細胞が羽化後、目を追って変性する突然変異、rdgA (retinal degeneration A) において欠失している分子を検索してきたが、rdgA の複眼でイノシトールリン脂質代謝に係わっている DG キナーゼ活性が全く欠失していること、さらに rdgA 遺伝子の遺伝子産物が DG キナーゼである可能性を見出した¹⁾。従って、rdgA 遺伝子の産物が DG キナーゼであることを証明することができれば、DG キナーゼ活性の欠失が細胞変性を引き起こす原因のひとつであることを証明したことになる。DG キナーゼが rdgA 遺伝子の産物であることを明らかにするためには、rdgA 遺伝子をクローニングしてその配列を決定してその産物を特定するか、

DGキナーゼを精製してそのアミノ酸配列を決定してその遺伝子を特定するかである。本研究では後者の方法をとることとし、まずDGキナーゼの精製を試みた。

ショウジョウバエの頭部のDGキナーゼは複眼に局在し、また膜分画にあることを確認したので、頭部の膜分画のKCl抽出液を出発材料として精製を行った。精製はイオン交換樹脂→硫酸アンモニウム沈澱→ゲルろ過→ヒドロキシルアパタイト→ATPアガロースの順に行った。この段階ではまだ均一にまでは精製されていなかったが、出発材料が少量であったことと、DGキナーゼが非常に不安定な酵素であったことにより、これ以上の精製はできなかった。しかし分子量115kdのタンパク質であることは明らかになった。ヒドロキシルアパタイトのステップを省略することにより、より多くのDGキナーゼを得ることを試みたが、アミノ酸配列を決定できるほどの量は得られなかった。また、DGキナーゼの性質を調べてみたが、これまでに報告されている他種の動物のDGキナーゼとはかなり異なっており、特にデオキシコール酸の効果に大きな差がみられた。

本研究ではDGキナーゼがrdgA遺伝子の産物であることは確認できなかったが、Masai et al.²⁾は他種の動物でクローニングされて明らかになっているDGキナーゼの配列³⁾をもとにショウジョウバエのDGキナーゼ遺伝子をクローニングした。その結果、少なくとも2種のDGキナーゼ遺伝子があり、そのうちの一方がrdgA遺伝子であることが確認された。従って、ショウジョウバエの視細胞の変性の原因のひとつがDGキナーゼ活性の欠失であることが明らかになったことになる。

それではDGキナーゼ活性の欠失がどのようにして細胞膜変性をもたらすかということであるが、これは今後の研究課題である。可能性としてはDGキナーゼ活性の欠失は重要な構築因子であるホスファチ

ジン酸の欠損をもたらすと共に、Cキナーゼ活性のオフ状態を抑制し、過剰なタンパク質リン酸化を招く可能性がある。予備実験の段階であるが、正常とrdgA突然変異の複眼のリン酸化を調べたところ、差がみられた。その差がCキナーゼによるものであるかどうか今後調べる必要がある。

(2) マウス、ラットの小脳の変性とイノシトールリン脂質代謝

小脳は生後発生をするため、突然変異や各種の薬物による細胞変性の研究材料として有用である。本研究ではマウスやラットの小脳に変性が起きた時に、イノシトールリン脂質代謝に変異が見られるかを数種の抗体を用いて免疫組織化学的に調べてみることにした。

マウスには小脳のプルキンエ細胞が変性する突然変異、pcdがいるが、この小脳ではプルキンエ細胞に特異的に存在することが知られているイノシトール三リン(IP_3)結合タンパク質とCキナーゼ(タイプI)の染色は見られなかった。一方、イノシトール二リン(PIP_2)はプルキンエ細胞以外では差は見られなかった。

ラットでは小脳の変性するものは入手が困難であるが、ある種の薬物は変性を起こさせることが知られているので、薬物処理後の変異を見ることにした。用いた薬物は、MAM(発がん剤)とAraC(制がん剤)である。MAMは注射する時期により効果が異なっていたが、プルキンエ細胞の変性というよりは、むしろ神経回路網の形成障害が見られ、プルキンエ細胞自体の免疫組織化学的には正常と差は見られなかった。またAraCでは顆粒細胞の変性が見られたが、 PIP_2 の抗体の染色性は正常と同じであった。

このように IP_3 結合タンパク質、Cキナーゼ(タイプI)、 PIP_2 の抗体による免疫組織化学的に見た場合は、細胞変性に伴って起こる変化が見られなかった。そこで今後は、ショウジョウバエの

結果を踏まえて、D Gキナーゼや、Cキナーゼ活性の測定を行う必要があるものと考えられる。

(3) がん細胞の変性とイノシトールリン脂質代謝

がん細胞はある種のリン脂質のリポソームで処理すると変性を起こすことが知られているが^{4, 5)}、そのメカニズムは今までのところ不明である。我々はその点を明らかにするためにまず種々のがん細胞を大豆のホスファチジルイノシトール (P I) リポームで処理してみたところ、殆どの細胞が変性を起こすが、中に変性を起こさない細胞があることを見出した。その変性を起こさない細胞はがん遺伝子である *c - m y c* を発現しているヒトの腎臓がん細胞であった。このがん細胞では、ホスファチジン酸から P I が生成される経路の中間体である C D P - D G が蓄積されることを我々は以前に見出していた⁶⁾。そこで本研究では P I リポームによって変性を起こす原因を明らかにするために、酵素活性の測定や各種の薬物の効果を調べた。

一般的に細胞が変性を起こす時には、細胞内 C a イオン濃度の上昇が見られることが知られているので、P I リポーム処理後の細胞内 C a イオン濃度を *furaII* を用いて C a イメージング装置で測定した。その結果、変性を起こす細胞では処理後約 3 時間で細胞内 C a イオン濃度の上昇が見られ、数時間持続した。しかし、変性を起こさない細胞では変化が見られなかった。

また、P I リポーム処理により起こる変化として予想されているのは、Cキナーゼ活性の上昇である。なぜならば、P I は細胞内に取り込まれてホスホリパーゼの作用により分解され、脂肪酸や D G が生成されることが明らかになっており、これらは Cキナーゼを活性化剤であるからである。そこで P I リポーム処理して 6 時間後の細胞の Cキナーゼ活性を、可溶性分画と膜分画とに分けて測定した。その結果、変性する細胞、しない細胞ともに、両分画で活性が低下していたが、

変性する細胞における膜分画の低下が著しかった。そこでCキナーゼの阻害剤を細胞に添加してみたところP Iリポーム処理の場合と同様の結果が見られた。こうした結果は、脳虚血により細胞内C a イオンやアラキドン酸、D Gの濃度が増大するにもかかわらずCキナーゼの活性が低下したという報告⁷⁾とも一致しており、Cキナーゼ活性の上昇ではなく、活性の抑制と細胞変性が関連している可能性が考えられる。従って、細胞内でCキナーゼ活性がどのように制御されているかを解明することは、細胞変性のメカニズムの研究にとっての重要な課題である。またc - m y c 遺伝子が発現しているがん細胞ではP Iリポソーム処理により細胞変性が起こらなかった理由を明らかにすることは、細胞のプログラム死のメカニズムを解明につながるものと考えられる。

III. 今後の展開

細胞変性の研究の中で最も大きな課題は、一過性の脳虚血による海馬や小脳の変性であろう。これまでの研究でグルタミン酸受容体やC a イオン、Cキナーゼの関与や初発遺伝子の発現も報告されており、そのメカニズムの解明に力が注がれている。また一方で海馬や小脳は記憶の場でもあると考えられているが、その場合も上記のような分子の関与が示唆されている。細胞変性と記憶という全くかけ離れた現象に同じような分子が関わっているとすれば、これは非常に興味深いことである。今後は、細胞変性ばかりでなく記憶におけるD GキナーゼやCキナーゼの役割を調べることを研究課題としてゆきたい。

[参考文献]

- 1) H. Inoue, T. Yoshioka, Y. Hotta (1989) *J. Biol. Chem.*, 264, 5996-6000
- 2) I. Masai, T. Hosoya, D. Kojima and Y. Hotta (submitted)
- 3) F. Sakane, K. Yamada, H. Kanoh, C. Yokoyama and T. Tanabe (1990) *Nature*, 344, 345-348
- 4) M. Jett and C.R. Alving (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 114, 863-871
- 5) H. Shimura, M. Ohtsu, A. Matsuzaki, T. Mitsudomi, K. Onodera and G. Kimura (1988) *Cancer Res.*, 48, 578-583
- 6) Y. Kubota, T. Shuin, M. Yao, H. Inoue and T. Yoshioka (1987) *FEBS Lett.*, 212, 159-162
- 7) R.C. Christian, G. Dubyak and J.C. LaManna: Decreased protein kinase C activity during cerebral ischemia and after reperfusion in the adult rat. *J. Neurochem.*, 55, 2001-2007 (1990)

**EFFECT OF EXTRACELLULAR PHOSPHATIDYLINOSITOL ON *c-MYC*
GENE-EXPRESSED HUMAN RENAL CANCER CELL LINE**

Sumio Noguchi¹, Yoshinobu Kubota¹, Taro Shuin¹, Etsuro Ito²,
Hiroko Inoue³, and Tohru Yoshioka^{3*}

¹ Department of Urology, Yokohama City University, School of Medicine, 3-9,
Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama, 236, Japan

² Advanced Research Center for Human Sciences, ³ Department of Basic Human
Sciences, School of Human Sciences, Waseda University, Tokorozawa, Saitama,
359, Japan

Received December 14, 1991

Summary: Effect of exogenously added soybean phosphatidylinositol on *c-myc* gene expressed and unexpressed human cancer cell lines was investigated. When phosphatidylinositol liposomes were introduced into culture media, viability of *c-myc* unexpressed cells was reduced, while that of *c-myc* expressed cells was not. Death of *c-myc* unexpressed cells by phosphatidylinositol liposomes was found to be caused by abnormally accumulated intracellular Ca^{2+} , and it seemed to be related to reduction of protein kinase C activity. © 1992 Academic Press, Inc.

It is known that phospholipid liposomes composed of some kinds of phosphatidylinositol (PI) or phosphatidylcholine (PC) are selectively cytotoxic to cancer cells (1,2). The high sensitivity of cells to toxic phospholipid liposomes seems to be a common character of cancer cells, but some of them had as low sensitivity as normal cells. The cell killing mechanism is not clear yet, but a few authors proposed so far that phospholipid metabolic products, such as linoleic acids, lyso-PI or diacylglycerols were responsible for cytotoxicity (2,3).

In order to elucidate the mechanism of cytotoxicity of phospholipids on cancer cell viability, we examined effects of soybean PI liposome treatment on intracellular Ca^{2+} concentration and calcium-phospholipid dependent protein kinase C (PKC) activity

*To whom correspondence should be addressed.

Abbreviations: PI, phosphatidylinositol; PC, phosphatidylcholine; Tdr, thymidine; PKC, protein kinase C.

of the cells, because it was reported that exposure of cells to toxic compounds eventually led to elevated intracellular Ca^{2+} concentration, followed by cell death (4-6). And because some of PI metabolic products are known as activators of PKC. Our results obtained here suggest that sustained increase in intracellular Ca^{2+} concentration with soybean PI liposome treatment cause cell killing, associated with reduction of PKC activity.

Materials and Methods

Materials EJ-1 and T-24, human bladder cancer cell lines were kindly supplied by Dr. Prout, Jr., Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA. Four human renal cancer cell lines were supplied as follows; 5873-T was from Duke University, NC, USA. ACHN was purchased from the American Type Culture Collection NY, USA. KN-41 was from Kanazawa University, Kanazawa, Japan. YCR-1 was established in our laboratory. TIG-1, which is a diploid human fibroblast derived from female fetal lung, was purchased from Japanese Tissue Culture Collection, Tokyo, Japan. Soybean PI was purchased from Avanti Polar-Lipids Inc. Phosphatidylserine and 1,2-dioleine were from Serdary Research Laboratories Inc. Histone III S was from Sigma. Methyl- [^3H]thymidine ([^3H]Tdr, 63 Ci/mg) was purchased from Amersham Co. [γ - ^{32}P]ATP (3000 Ci/mmol) was from NEN. Fura-2 acetoxy-methylester (fura-2/AM) was obtained from Dojin, Kumamoto, Japan. Ham's F-12 medium was supplied by GIBCO laboratories, NY, USA.

Preparation of liposomes All the phospholipids in methanol/chloroform solution were dried up by nitrogen gas in the glass spits aseptically. Subsequently, the appropriate amount of media were added in them and mixed by vortex mixer for 3 minutes. Then cloudy solution of liposomes containing phospholipids were obtained.

Viable cell count Since the correlation between viable cell count and [^3H]-Tdr incorporation is linear, [^3H]Tdr is used instead of viable cell count. The culture cells were inoculated on the glass in 24 wells plastic culture dish at the concentration of 1×10^4 cells/well with appropriate media. After 24 hours incubation, cells were submitted 48 hours incubation with the various concentrations of PI. Then [^3H]Tdr ($10 \mu\text{Ci}/100 \mu\text{l}/\text{well}$) was added to each well and incubated for 3 hours. Finally it was washed at each 10 minutes with cold 5% trichloroacetic acid (TCA) twice to remove unbound radiolabel.

Measurement of intracellular Ca^{2+} level Cells were cultured on thin glass plate (5×10^5 cells) and then exposed to $5 \mu\text{M}$ fura-2/AM in basal salt solution and kept for 60 minutes at 37°C . After fura-2 loading, the cells were incubated with cell culture medium containing PI liposomes of $160 \mu\text{M}$ at 37°C . After incubation period, cells were placed on a microfluorometric imaging analysis system (INTER DEC M-500, Osaka, Japan). The fluorescence intensities of 512 nm in wavelength from fura-2-loaded cells were recorded under illumination lights of 340 to 380 nm. In order to exclude the artifact produced by long incubation time, the intracellular Ca^{2+} level of PI treated cells was compared with untreated ones for each incubation condition.

Assay of protein kinase C After incubation with PI liposomes ($160 \mu\text{M}$) for 6 hours, cells were scraped from dishes, homogenized with buffer A (20mM Tris/HCl, pH 7.4, 2mM EGTA, 0.5mM EDTA, 2mM dithiothreitol, 0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride and $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin) and centrifuged at $100,000 \times g$ for 60 min. The

supernatant was saved and pellet was suspended with buffer A containing 0.1% Triton X-100. PKC activity was determined in the reaction medium containing 20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 0.02% Triton X-100, 50 µg histone, 10 µM [*r*-³²P]ATP, 0.5 mM CaCl₂, 20 µg phosphatidylserine (PS), 6 µg dioleine and enzyme in 100 µl for 10 min at 30 °C. The Ca²⁺/PS independent kinase activity was measured under the same condition without Ca²⁺, PS and dioleine but containing 1 mM EGTA. The reaction was terminated by addition of 1 ml of 25% TCA, and acid-precipitable materials were collected by a filter. The filter was washed with 5% TCA and radioactivity was counted.

Results

Effect of soybean PI on viability of various kinds of cancer cells

The effect of soybean PI liposomes on viability of various kinds of cancer cells was examined and results are shown in Fig. 1. Of seven cancer cell lines tested, five were found to be reduced [³H]Tdr incorporation after the treatment of soybean PI. Soybean PI liposomes were the most effective on EJ-1 and T-24, which were known to have almost the same level of H-*ras* expression. These two cells showed steep reduction in the viability in proportion to PI concentrations. ACHN, 5873-T and TIG-1, showed a mild response to PI toxicity. On the contrary, YCR-1 and KN-41 showed no inhibition of [³H]-Tdr incorporation into cells. Among seven cell lines used in this experiment, it was already known that *c-myc* gene was expressed in two cell lines (YCR-1 and KN-41), while it was not in others (7). This classification was found to be corresponding exactly to the effectiveness of soybean PI toxicity; YCR-1 and KN-41, which have *c-myc* expression, are not affected by PI treatment at all, but other cell lines, which have no *c-myc* expression, are significantly influenced by PI treatment. Therefore, human cancer cell lines tested here can be divided into two groups, depending upon the *c-myc* expression.

Change of intracellular Ca²⁺ level induced by PI liposome treatment

Since it is known that exposure of cytotoxic compounds leads to elevation of intracellular Ca²⁺ concentration to cause cell death (4-6), we measured intracellular Ca²⁺ levels of T-24 and YCR-1 with Ca²⁺ imaging system. Number of cells in the visual field of optical microscope was adjusted to 1-10² by selecting magnification of objective lens. As shown in Fig. 2, intracellular concentration of Ca²⁺ was increased largely with the incubation time in T-24. When the incubation time reached 5 hours,

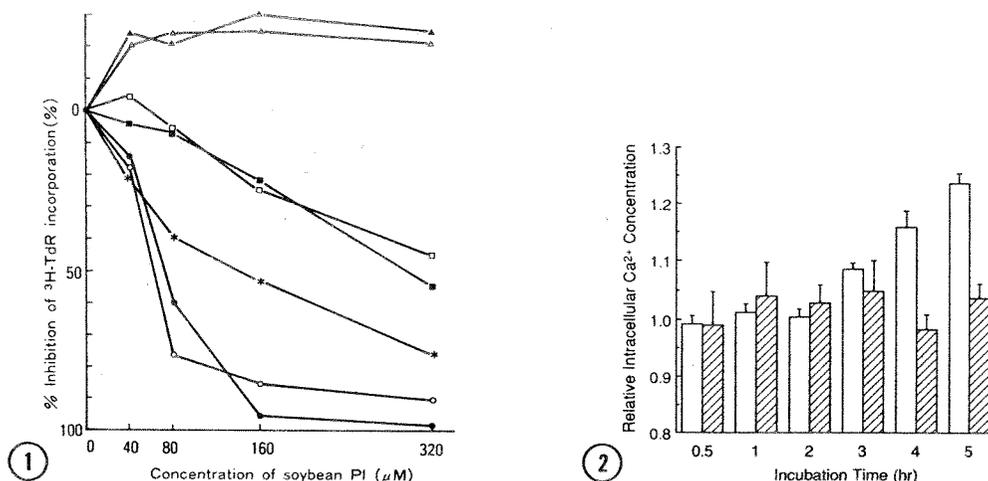


Fig. 1. Inhibitory effect of liposomes consisted of soybean PI on various kinds of cancer cells. Methods are described in Materials and Methods. Samples were manipulated in duplicate. EJ-1 (●), T-24 (○), TIG-1 (*), 5873-T (■), ACHN (□), KN-41 (Δ), YCR-1 (▲).

Fig. 2. Relative change of intracellular Ca^{2+} concentration in T-24 (□) and YCR-1 (▨) for various incubation periods of PI treatment. Data are means of three experiments and bars represent the absolute maximum error. The values were normalized with that of untreated cells.

the increase of intracellular Ca^{2+} level of T-24 was found to be 24%. Such a long lasting increase of intracellular Ca^{2+} level is quite unusual. Since the long lasting increase in Ca^{2+} concentration observed in numerous cells was observed clearly even in a single living cell, we can conclude that this is not an artifact caused by cell death. On the other hand, the same treatment with PI liposomes for YCR-1 did not cause Ca^{2+} concentration increase at all.

Change of PKC activity induced by PI liposome treatment

In order to check whether activation of PKC is induced by PI liposome treatment in cancer cells, we examined PKC activities of the cells. Since PKC activity is thought to be translocated to the membrane when it is activated, we assayed PKC activity of soluble and particulate fractions of cells. As shown in Table 1, PI liposome treatment (6 hours) caused decrease of total PKC activity (soluble plus particulate) in all cells we examined. Reduction of PKC activities of particulate fraction was significant in *c-myc* unexpressed cells; the activities were decreased to 36 and 54 % of their control values in ACHN and T-24 cells, respectively, while 88 and 69 % of activities were

Table 1. PKC activity in *c-myc* expressed and unexpressed cells

	Control		PI liposome treated	
	supernatant	particulate	supernatant	particulate
ACHN	71.8 ± 12.0	58.9 ± 4.4	55.4 ± 4.8	21.3 ± 7.6
T-24	64.1 ± 17.3	48.3 ± 2.9	46.7 ± 8.3	26.2 ± 4.6
KN41	51.1 ± 6.3	21.0 ± 0.7	33.7 ± 3.8	14.4 ± 1.4
YCR-1	51.5 ± 11.6	38.1 ± 0.7	42.6 ± 7.3	33.7 ± 3.2

PKC activity was assayed in control and PI liposome treated (6 hours) cells, as described in Materials and Methods. Activity was expressed pmol/min/mg protein of the cells. Each value is the mean ± S.D. of four determinations.

remained both in YCR-1 and KN-41, respectively. The values of PKC activity of the cells incubated with PI liposomes for 3 hours was intermediate between those of control and incubated cells for 6 hours in both *c-myc* expressed and unexpressed cells.

Discussion

In this report, we showed that two renal cancer cell lines, which had *c-myc* expression, were not sensitive to cytotoxic effect of soybean PI, and in these cells, PI liposome treatment could not induce the increase of intracellular Ca^{2+} concentration, which might cause cell killing in *c-myc* unexpressed cells. Cytotoxic effect of exogenously added soybean PI on cancer cells was initially reported by Jett and Alving (1). This work was followed by many investigators, and the PI toxicity has been confirmed so far (1-3,8). Although the toxic effect of PI liposomes has been criticized as an artifact produced by the unidentified impurity containing in the phospholipids, such possibility was excluded after careful examination of purity of phospholipids used.

It is important to decide if the elevation of intracellular Ca^{2+} concentration is the cause or result of cell death. It was found that Ca^{2+} elevation preceded to cell death determined by [3H]Tdr incorporation. Therefore, it is likely that intracellular Ca^{2+} elevation in *c-myc* unexpressed cells might be a cause of cell death. Although we don't know the mechanism of elevation of Ca^{2+} concentration by soybean PI

liposome treatment, an interesting study reported recently about PI effect on Na⁺-K⁺-ATPase (9) was suggestive for the elucidation of this mechanism. According to the work, soybean PI was selective inhibitor of Na⁺-K⁺-ATPase of synaptosomal membrane. In such a case, it is expected that intracellular Ca²⁺ will be increased, because of the decrease of Na/Ca exchange derived from the increase of Na⁺ due to the inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase (10).

Since Jett, *et al.* showed that PI incorporated into cells was metabolized to produce diacylglycerol (3), which was a PKC activator, we assayed PKC activities of the cancer cells. PKC activities, however, was found to be reduced by PI liposome treatment in both *c-myc* expressed and unexpressed cells (Table 1). The reduction of PKC activity can be explained by down regulation as was caused by phorbol ester, which is known as a PKC activator (11). Although it is a preliminary result yet, the specific PKC inhibitor, calphostine (Kyowa K.K., UCN-1028C; 50 nM) showed the same effect as soybean PI did on T-24 and YCR-1. Therefore, it is likely that significant reduction of particulate PKC activity and increase of intracellular Ca²⁺ concentration in *c-myc* unexpressed cells by PI treatment may relate to cell death. Crumrine *et al.* (12) found that PKC activities of total and particulate fraction were reduced in cerebral ischemia accompanied with elevation of Ca²⁺ content, and suggested that the inhibition of PKC activity may have a significant damage on cellular function. Similar results were reported in spinal cord ischemia (13). It is still not obvious whether *c-myc* expression is related to PKC activation, although it is reported that over expression of PKC gene cause *c-myc* expression (14). On the basis of these results we can consider there is an intense relationships between *c-myc* expression and regulation of PKC activity.

Acknowledgments

This work was supported by Grant-in-Aids (63570753 and 02680205) from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

References

1. Jett, M. and Alving, C.R. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114, 863-871
2. Shimura, H., Ohtsu, M., Matsuzaki, A., Mitsudomi, T., Onodera, K. and Kimura, G. (1988) *Cancer Res.* 48, 578-583

3. Jett, M., Chudzik, J., Alving, C.R. and Stanacev, N.Z. (1985) *Cancer Res.* 45, 4810-4815
4. Starke, P.E., Hoek, J.B. and Farber, J.L. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 3006-3012
5. Kobayashi, M., Kondo, S., Yasumoto, T. and Ochizumi, Y. (1986) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238, 1077-1083
6. Olafsdottir, K., Pascoe, G.A. and Reed, D.J. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* 263, 226-235
7. Kubota, Y., Shuin, T., Yao, M., Inoue, H. and Yoshioka, T. (1987) *FEBS Lett.* 212, 159-162
8. Myher, J.J. and Kuksis, A. (1984) *Biochem. Biophys. Acta*, 795, 85-90
9. Nishikawa, T., Goto, M. and Shimizu, S. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126, 893-900
10. Gill, D.L. (1982) In *Hormon Receptors* pp.199-236. John Wiley and sons, New York
11. Ase, K., Berry, N., Kikkawa, U., Kishimoto, A. and Nishizuka, Y. (1988) *FEBS Lett.* 236, 396-400
12. Crumrine, R.C., Dubyak, G. and LamManna, J.C. (1990) *J. Neurochem.* 55, 2001-2007
13. Kochhar, A., Saitoh, T. and Zivin, J. (1989) *J. Neurochem.* 53, 946-952
14. Hwieh, L.L., Hoshina, S. and Weinstein, I.B. (1989) *J Cell. Biochem.* 41, 179-188

Partial Purification and Characterization of Membrane-Associated
Diacylglycerol Kinase of *Drosophila* Heads

Hiroko Inoue¹, Tohru Yoshioka¹ and Yoshiki Hotta²

¹ Department of Basic Sciences, School of Human Sciences, Waseda University,
2-579-15, Mikajima, Tokorozawa, 359, Japan

² Department of Physics, Faculty of Science, University of Tokyo, 7-3-1, Hongo,
Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

Summary A membrane-associated diacylglycerol kinase of *Drosophila* heads was purified to near homogeneity from the KCl extract of *Drosophila* heads. The purification procedure involved chromatography on Q-Sepharose, ammonium sulfate fractionation, Superose 12, hydroxylapatite, and ATP-agarose. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of fractions after the ATP-agarose column chromatography showed that only a 115 kd protein correlated well with the enzyme activity. The apparent K_m values of partially purified DG kinase were 220 μM for ATP and 540 μM for diolein, respectively. The activity of the DG kinase was inhibited by deoxycholate and was not activated by Ca^{2+} .

Introduction

In a variety of cells, diacylglycerol (DG) is generated in response to stimulation that enhances phospholipase C-mediated breakdown of inositol phospholipids, and serves as a second messenger to activate protein kinase C [1,2]. Phosphorylation of DG to phosphatidic acid (PA) by DG kinase is suggested to be a major pathway for removal of DG [3], and thus it is likely that this enzyme regulates an intracellular signaling via phosphatidylinositol (PI) cycle. Recently it was also shown that an

elevation in the steady-state levels of DG in *ras*-transformed cells causes long lasting activation and down-regulation of protein kinase C [4,5]. This elevation was shown to be the result of reduction of DG kinase activity in the membrane fraction [5]. These results indicated that DG kinase also plays a role in such a long-term responses. In addition, PA has been suggested to be an activator of cell signalling [6-8]. The study of DG kinase is therefore important for the elucidation on the physiological role of PI response.

Previously we demonstrated that DG kinase activity is localized in the compound eyes of *Drosophila* head, and the enzyme activity is deficient in the heads of visual mutant, *rdgA* (retinal degeneration A) [9,10]. We also suggested that *rdgA* gene may code DG kinase based on the results of gene dosage dependence experiments [10]. Recently Masai and Hotta isolated *Drosophila* DG kinase homologues using a 80 kd porcine DG kinase cDNA probe (unpublished data). The gene isolated initially was found not to be *rdgA* gene, although it was expressed in the compound eyes. Another *Drosophila* DG kinase gene isolated subsequently was mapped to the *rdgA* locus. These results indicate that there are at least two different types of isozyme of DG kinase in *Drosophila* eyes, and lack of the enzyme must be causing rhabdomere degeneration in *rdgA* mutant, as we suggested [10].

Recent studies revealed that several isozymes of DG kinase are present with different properties in various organisms [11-15]. Although only small numbers of DG kinase have been purified and characterized in detail [14-17], it is suggested that the each isozyme plays different role in regulating the signal transduction. In our previous studies, we have found that some properties of the DG kinase in *Drosophila* head crude fraction were different from those in other sources [10]. To extend the study, we attempted to purify DG kinase from *Drosophila* heads and examined its biochemical properties. Because of the limited source of the starting material and instability of the enzyme, purification of DG kinase was still not complete. However, the partially purified DG kinase of *Drosophila* heads was

found to be largely different from that of mammals as to Ca^{2+} independence and the inhibitory effect of deoxycholate for this enzyme.

Materials and Methods

Materials

Canton-S (CS) strain of *Drosophila melanogaster* was used as a standard, normal strain, from which the mutant, *rdgA^{KO14}* (retinal degeneration A) was derived. Flies were collected within 1 day after eclosion, and kept on fresh cornmeal-agar-yeast food until they become 4 to 7 days old. They were then frozen in liquid nitrogen and kept in a deep-freezer (-80°C) until use. Prepacked columns of Hiload Q-Sepharose Fast Flow, Mono Q and Superose 12, and ATP-agarose Type 3 (attached through C-8 to agarose) were purchased from Pharmacia LKB Biotechnology Inc. TSK gel HA-1000 Glass column was from Tosho (Japan). Protein assay kit was from Bio-Rad Laboratories. [γ - ^{32}P]ATP (specific activity; 3,000Ci/mmol) was from New England Nuclear. 1,2-diolein was obtained from Serdary Research Laboratories Inc.

Assay of DG kinase activity

The standard reaction mixture contained 10 mM MgCl_2 , 10 mM NaF, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 100 mM Tris/HCl buffer, pH 7.4, 2 mM 1,2-diolein, 1 mM [γ - ^{32}P]ATP and the enzyme in a final volume of 100 μl . In some cases bovine serum albumin (1 $\mu\text{g}/\text{tube}$) was added. Immediately before the incubations, DG was sonicated using a microtip. The incubation was carried out for 5 min at room temperature and the reaction was terminated by adding 2 ml of chloroform/methanol/ 12 N HCl (200:100:0.75, v/v). Then 0.4 ml of 1 N HCl was

added, and the lower phase was washed once with 1 ml of chloroform/ methanol/ 1 N HCl (3:48:47, v/v). An aliquot was removed and radioactivity was counted. To analyze the reaction product, extracted lipids were separated by thin-layer chromatography (TLC) on a silica gel plate as described previously [18]. ^{32}P labeled PA was detected by autoradiography, and radioactivity was counted by scintillation counting. Over 85% of the total radioactivity was associated with PA.

Purification

All procedures were carried out at 0-4 °C unless otherwise stated.

Step 1. Preparation of head extract — The frozen heads were decapitated by vibration with sucrose and collected with a mesh (35 mesh) at liquid N_2 temperature. Since we have found that more than 90% of DG kinase in *Drosophila* heads were localized in eyes under the conditions of the assay [9,10,19], we isolated DG kinase from heads. The heads (20 g) were homogenized in 100 ml of 0.25 M sucrose containing 50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 50 μM ATP (buffer A), using a polytron. The homogenate was centrifuged at 10,000 x g for 20 min. The pellet was suspended in 40 ml of buffer A containing 0.5 M KCl. Twenty minutes later, the suspension was centrifuged at 10,000 x g for 20 min. The resulting supernatant was centrifuged at 100,000 x g for 60 min. The supernatant was dialyzed overnight against buffer containing 20 mM Tris/HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 50 μM ATP and 20% (v/v) glycerol (buffer B).

Step 2. Q-Sepharose Fast Flow column Chromatography — The dialyzed solution was centrifuged and the supernatant was applied to a Q-Sepharose Fast Flow prepacked column (1.6 x 10 cm) equilibrated with buffer B. The column was washed with 20 ml of buffer B and eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in 200 ml of buffer B at a flow rate of 2 ml/min. This procedure was carried out at room temperature, but the column was cooled below 4 °C using cooling pump. The active fractions were pooled.

Step 3. Ammonium Sulfate precipitation — The active fractions were brought to 60% saturation by adding saturated ammonium sulfate solution, adjusted to pH 7.0 with Tris. The mixture was stirred gently for 30 min and centrifuged at 20,000 x g for 20 min. The precipitate was dissolved in a small amount of buffer containing 20 mM Tris/HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF and 50 μ M ATP, and centrifuged at 15,000 x g for 10 min.

Step 4. Superose 12 column chromatography — The supernatant was applied to a Superose 12 column equilibrated with buffer B containing 0.4 M NaCl. The column was eluted with the same buffer at a flow rate of 0.4 ml/min. This procedure was carried out at room temperature. The active fractions were pooled and dialyzed for 4 hours against 10 mM sodium phosphate (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 50 μ M ATP and 20% (v/v) glycerol (buffer C).

Step 5. Hydroxylapatite column chromatography — The dialyzed solution was applied to a hydroxylapatite column (0.5 x 5 cm) equilibrated with buffer C. The column was eluted with a linear gradient of sodium phosphate from 10 to 500 mM in 10 ml of buffer C at flow rate of 0.4 ml/min. This procedure was carried out at room temperature. The active fractions were pooled and dialyzed against buffer containing 20 mM Tris/HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF and 20% (v/v) glycerol (buffer D) for 5 hours.

Step 6. ATP-agarose column chromatography — The dialyzed sample was applied to an ATP-agarose column (0.5 x 5 cm) equilibrated with buffer D. The column was eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in 15 ml of buffer D at a flow rate 0.5 ml/min. This procedure was carried out at room temperature. The active fractions were pooled and stored at -80 °C.

Other Methods

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed by the method of Laemmli (20). Protein was determined by a Bio-Rad protein assay kit with bovine serum albumin as a standard.

Results

Over 80% of the total DG kinase in *Drosophila* heads was associated with the particulate fraction, and could be extracted with 0.5 M KCl. When the extract obtained from normal fly was applied to a Q-Sepharose column (step 2), the DG kinase activity was eluted between 0.23 and 0.33 M NaCl (Fig. 1). A low enzyme activity was also detected in the wash-out fractions, but this was not used for further purification. DG kinase activity in the extract from *rdgA* mutant heads was very low (1.5 nmol/mg protein/min), and was eluted at NaCl concentration around 0.25 M (Fig. 1). Therefore, we attempted to purify the peak obtained from normal fly heads.

The value of activity obtained at step 3 must be an underestimate, because of the inhibitory effect of ammonium sulfate on the enzyme activity. Fig. 2 shows the elution profile of DG kinase on a Superose 12 column (step 4). The enzyme activity was eluted from the column at a position between gamma globulin (Mr 158 kd) and bovine serum albumin (Mr 67 kd). DG kinase was not recovered from the column with a lower NaCl concentration (0.15 M). The pooled fractions from step 4 were dialyzed and applied to a hydroxylapatite column. The enzyme activity was not eluted with a gradient of NaCl, but was eluted with that of sodium phosphate (Fig. 3). Fractions containing the major peak were pooled and dialyzed against buffer without ATP. DG kinase did not bind to an ATP-agarose in the presence of 50 μ M ATP. The dialyzed samples were chromatographed on the column (Fig 4A). SDS polyacrylamide gel electrophoresis of individual fractions after the ATP-agarose column chromatography showed that a 115 kd protein correlated well with the enzyme activity (Fig 4B). Since the enzyme was unstable and amount of protein obtained was very small, further purification was not performed. A summary of the purification is presented in Table 1.

The purification achieved was not complete because of the small amount of the enzyme in *Drosophila* heads and its low yield through the purification procedures.

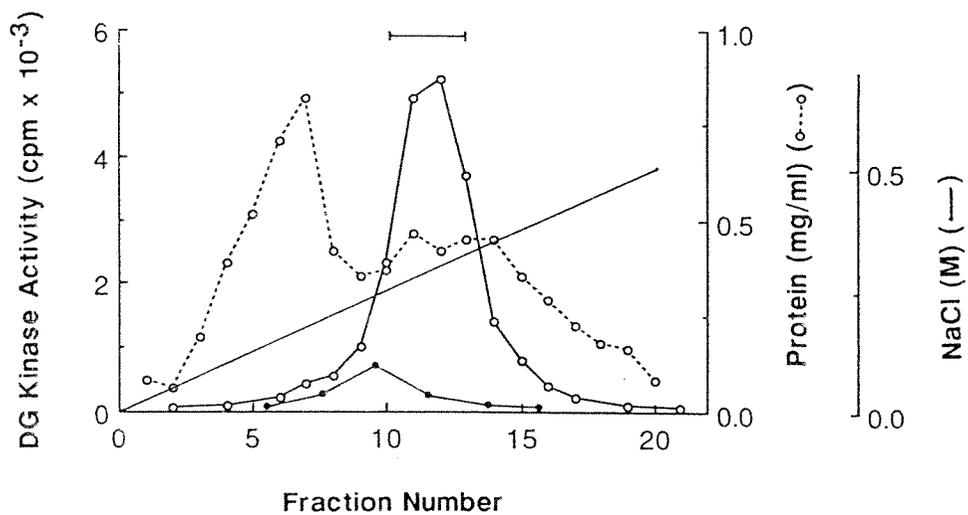


Fig. 1 Ion exchange chromatography on Q-Sepharose Fast Flow. KCl extracts from normal and *rdgA* mutant fly heads were applied and eluted as described under Materials and Methods. Fractions of 10 ml were collected, and DG kinase activities of normal (○—○) and *rdgA* (●—●) were assayed. Protein concentrations were determined by Protein assay kit (Bio-Rad). The active fractions indicated by the bar were pooled.

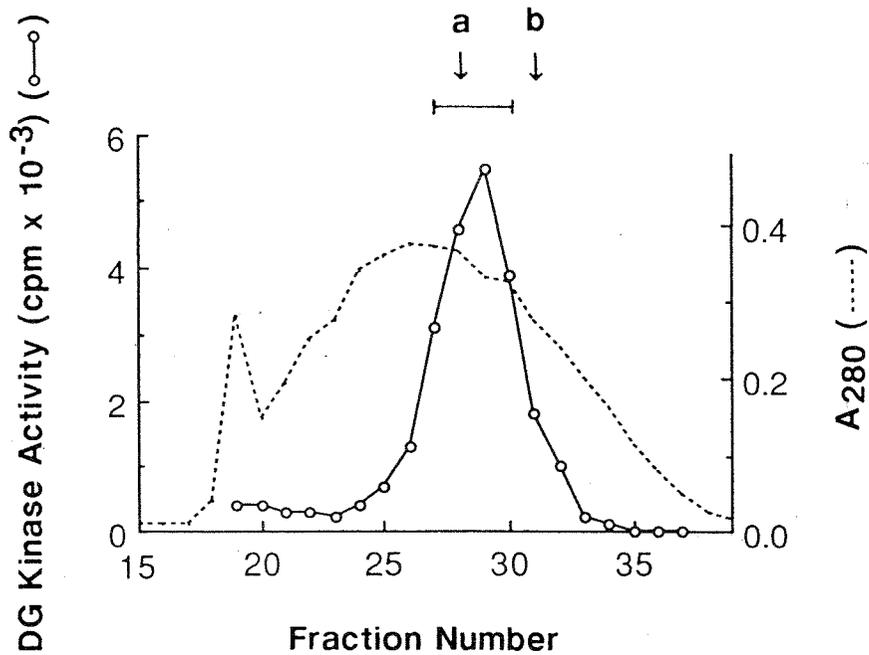


Fig. 2 Gel-filtration chromatography on Superose 12 column. A sample after ammonium sulfate precipitation was applied to a Superose 12 column. The details are given under Materials and Methods. Fractions of 0.4 ml were collected. The active fractions indicated by the bar were pooled. Arrows indicate the positions of standard proteins (a, gamma globulin, 158 kd; b, bovine serum albumin, 67 kd).

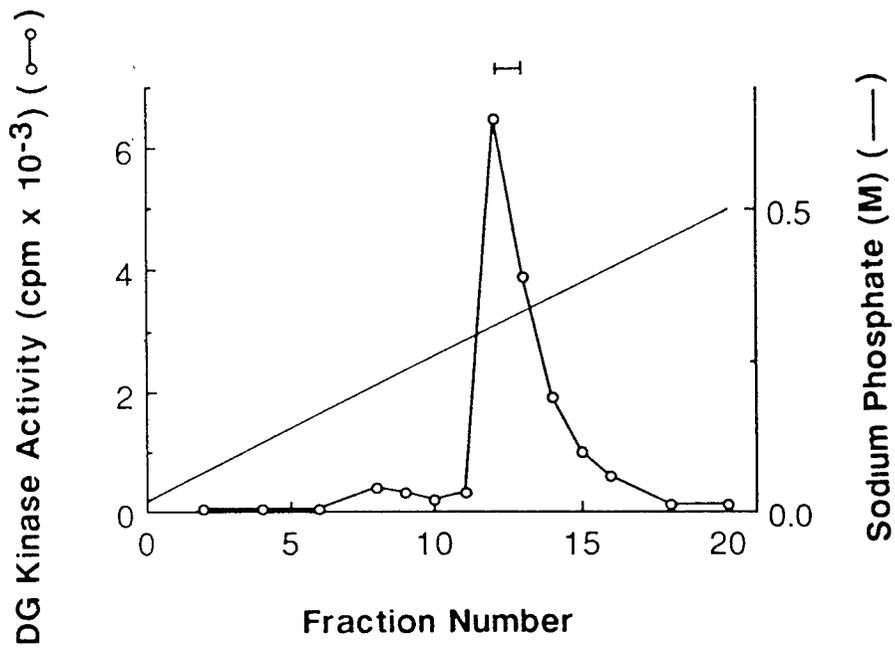
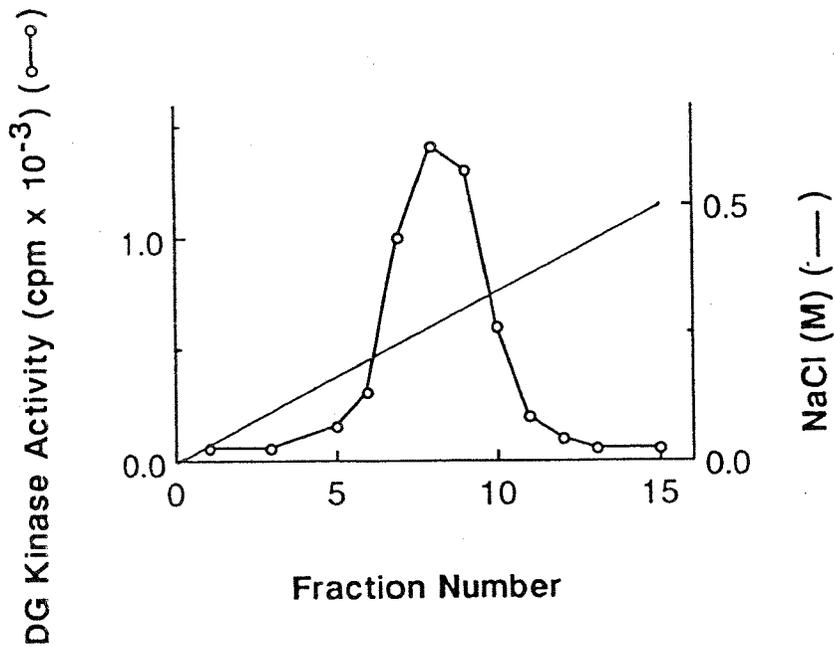


Fig 3. Hydroxylapatite column chromatography. The active fractions obtained from Superose 12 were applied, eluted and assayed as described under Materials and Methods. Fractions of 0.5 ml were collected. The active fractions indicated by the bar were pooled.

(A)



(B)

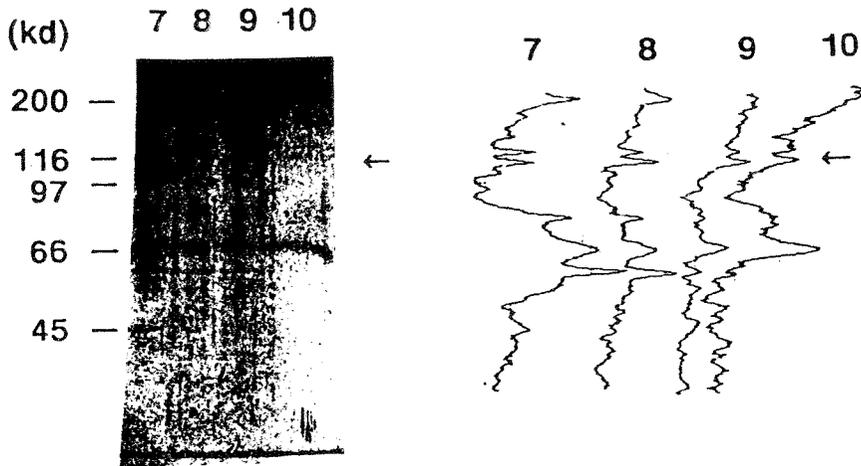


Fig. 4 (A) ATP- agarose column chromatography. The active fractions obtained from hydroxylapatite were applied and eluted as described under Materials and Methods. The enzyme activity was assayed with bovine serum albumin (1 μ g/tube) Fractions of 1 ml were collected. (B) SDS polyacrylamide gel electrophoresis of fractions 7-10 obtained on ATP agarose column chromatography and densitometric scans of the gel. Aliquots (40 μ l) of fractions were subjected to SDS gel electrophoresis and proteins were stained with silver staining. Molecular weight markers were myosin (200 kd), β -galactosidase (116 kd), phosphorylase b (97 kd), bovine serum albumin (66 kd) and ovalbumin (45 kd). An arrow indicate a 115 kd protein.

Table 1
Purification of DG kinase from *Drosophila* heads

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (nmol/min)	Specific activity (nmol/mg protein/min)	Purification (-fold)	Yield (%)
KCl extract	123	11,160	91	1	100
Q-Sepharose Fast Flow	15	2,860	191	2.1	25.6
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	5.6	1,120	200	2.2	10.0
Superose 12	1.5	1,140	760	8.4	10.2
Hydroxylapatite	0.25	210	840	9.2	1.9
ATP-agarose	0.006	46	7,667	84.3	0.4

The previous experience of other investigators in purifying enzymes from *Drosophila* also indicated that prevention of enzyme inactivation was difficult [21-23]. Twenty per cent glycerol was essential to maintain DG kinase activity in the *Drosophila* head preparation. PMSF was partly effective in keeping the enzyme active, but leupeptin and pepstatin A were ineffective. Since rapid handling is essential in such a case, the purification protocol was simplified. Mono Q column was used, instead of a Q-sepharose, and step 5 (hydroxylapatite column) was omitted; the active fractions from Superose 12 column was dialyzed and applied to an ATP-agarose column. Some additional protein bands were observed in the active fraction (data not shown). The specific activity of DG kinase obtained with this abbreviated purification procedure was 6.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein, which was lower than the value obtained by the full process (7.6 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein). Although we have separated a 115 kd protein with two dimensional electrophoresis and extracted it, amount of the protein was not sufficient to determine its amino acid sequences.

Properties of DG kinase

Biochemical properties of the purified DG kinase were examined using enzyme fractions obtained with the abbreviated procedure. The effects of DG, ATP and Mg²⁺ concentration on the enzyme activity are shown in Fig. 5, and were similar to those obtained using head homogenate [9]. The apparent K_m value for DG was

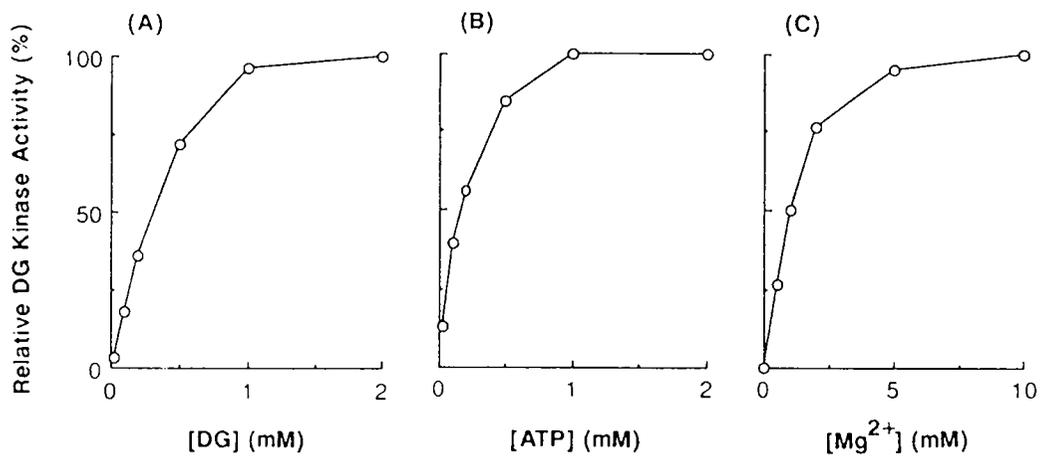


Fig. 5 Effect of DG (A), ATP (B) and Mg²⁺ (C) on DG kinase activity. DG kinase purified with the abbreviated purification procedure was assayed as described under Materials and Methods in the presence of bovine serum albumin (1 μ g/tube).

540 μM , and this was higher than that in the crude extract [10]. The apparent K_m value for ATP was 220 μM . Purified DG kinase had a moderate pH dependence as shown in Fig 6A. Previously we reported that deoxycholate (1 mM) increased DG kinase activity about two-fold in head homogenate [10]. Deoxycholate activation of the purified enzyme is only marginal at low concentrations below 0.5 mM, but it is inhibited at higher concentrations (Fig 6B). The enzyme activity was not affected by the addition of Ca^{2+} (Fig 6C).

Discussion

Recent reports have shown existence of several isozymes of DG kinase in mammalian cells, which had distinct biochemical properties [11-15], suggesting that each DG kinase species had a different role in regulating the signal transduction process. DG kinases that have been purified were cytosol enzymes from rat liver (120 kd) [16] and brain (110 kd) [14], porcine brain (78 kd) [17] and thymus (83 and 150 kd) [13], and human platelet (58, 75 and 152 kd) [15], and a membrane-associated enzyme from rat brain (150 kd) [14]. In this study, we partially purified a membrane-associated DG kinase from *Drosophila* heads, and its molecular weight was estimated to be 115 kd. Since we have found that more than 90% of DG kinase activity in *Drosophila* heads was localized in the eyes [9,10,19], we consider that the purified DG kinase from heads must come mostly from the eyes. We examined some biochemical characteristics, and found that the purified DG kinase of *Drosophila* had properties significantly different from those of mammalian enzymes.

More than 50% of DG kinase activity was found in the cytosol fraction in various mammalian tissue [14, 15], whereas over 80% of DG kinase activity was associated with the particulate fraction in *Drosophila* heads. Partially purified DG kinase of

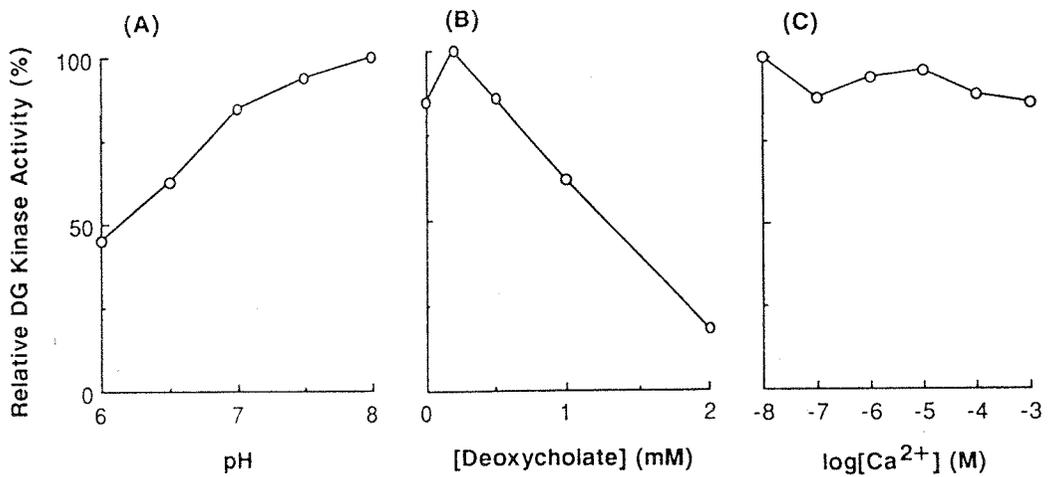


Fig. 6 Effect of pH (A), deoxycholate (B) and Ca²⁺ (C) on DG kinase activity. DG kinase purified with abbreviated purification procedure was assayed as described under Materials and Methods in the presence of bovine serum albumin (1 μ g/tube). The value of pH at each point was adjusted with Tris/Maleate/NaOH buffer. Ca²⁺ concentrations were varied by using Ca²⁺/EGTA buffer according to Raaflaub (26).

Drosophila eyes had properties similar to several kinds of purified mammalian enzymes with regard to ATP and Mg^{2+} dependence [14,15,17], but the apparent K_m of *Drosophila* DG kinase was 4 to 10 times higher than those of mammalian enzymes. The effect of pH, deoxycholate and Ca^{2+} on the *Drosophila* enzyme activity was also different from those of mammalian enzymes. *Drosophila* DG kinase has a moderate pH dependence, but rat brain enzyme has a stronger pH dependence, reaching its maximum activity at pH 7.4 [14]. Although deoxycholate had inhibitory effect on DG kinase activity of *Drosophila* at concentrations higher than 0.5 mM, it was essential to assay the activity of the enzyme in mammal tissues, except for isozymes of porcine thymus and human platelet. Deoxycholate inhibited porcine thymus 150 kd enzyme [13] and did not activate the human platelet 150 kd enzyme [15]. Ca^{2+} did not activate the *Drosophila* DG kinase activity, but it enhanced rat brain [14] and 83 kd pig thymus [24] enzyme activities. It is shown that porcine 80 kd DG kinase have two sets of E-F hand motifs as potential Ca^{2+} binding sites [24].

A specific activity of *Drosophila* heads DG kinase was found to be higher than that of mammalian tissue enzymes. Although *Drosophila* enzyme was only partially purified, the specific activity of the DG kinase ($7.7 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) was almost the same level as that of rat brain ($11.5 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) [14], which is the highest value among the mammalian enzymes.

The number of DG kinase isoforms present in *Drosophila* is yet to know, but Masai and Hotta recently cloned at least two genes of *Drosophila* encoding DG kinase (unpublished data). Both of them are expressed in *Drosophila* eyes, although there are differences in the levels of the gene expression. Only one major peak of DG kinase activity was observed in our purification steps, and the DG kinase may be *rdgA* gene product. The enzyme activity in minor peaks be derived from isozymes.

Physiological function of DG kinase is still unclear at present, but the enzyme activity may be essential for the maintenance of rhabdomere structure of

Drosophila eye. Abnormality in the subrhabdomeric cisternae in *rdgA* mutant eyes [25] could be related to accumulation of DG and/or absence of PA caused by lack of DG kinase activity.

Acknowledgement

This study was supported by Grants-in-Aid from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (no. 02680205). We thank Dr. R. F. Irvine (Institute of Animal Physiology & Genetics Research) for critical reading of the manuscript.

References

1. Nishizuka, Y. (1984) *Nature* 308, 693-698
2. Nishizuka, Y. (1986) *Science* 233, 305-312
3. Bishop, W.R., Ganong, B.R. and Bell, R.M. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 6993-700
4. Wolfman, A. and Macara, I.G. (1987) *Nature* 325, 359-361
5. Huang, M., Chida, K., Kamata, N., Nose, K., Kato, M., Homma, Y., Takenawa, T. and Kuroki, T. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 17975-17980
6. Moolenaar, W.H., Kruijer, W., Tilly, B.C., Verlaan, I., Bierman, A.J. and de Laat, S.W. (1986) *Nature* 323, 171-173
7. Yu, C., Tsai, M. and Stacey, D.S. (1988) *Cell* 52, 63-71
8. Tsai, M.H., Yu, C.L., Wei, F.S. and Stacey, D.W. (1989) *Science*, 243, 522-526
9. Yoshioka, Y., Inoue, H. and Hotta, Y. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 389-395
10. Inoue, H., Yoshioka, Y. and Hotta, Y. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 5996-6000
11. MacDonald, M.L., Mack, K.F., Richardson, C.N. and Glomset, J.A. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 1575-1583
12. Yamada, K. and Kanoh, H. (1988) *Biochem. J.* 255, 601-608
13. Sakane, F., Yamada, K. and Kanoh, H. (1989) *FEBS Lett.* 255, 409-413
14. Kato, M. and Takenawa, T. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 794-800
15. Yada, Y., Ozeki, T., Kanoh, H. and Nozawa, Y. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 19237-19243
16. Kanoh, H. and Ohno, K. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 209, 266-275
17. Kanoh, H., Kondoh, H. and Ono, T. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 1767-1774
18. Yoshioka, T., Inoue, H. and Hotta, Y. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111, 567-573
19. Fujita, S.C., Inoue, H., Yoshioka, T. and Hotta, Y. (1987) *Biochem. J.* 243, 97-104

20. Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685
21. Banks, G.R., Boezi, J.A. and Lehman, I.R. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 9886-9892
22. Kauvar, L.M. (1982) *J. Neurosci.* 2, 1347-1358
23. Toyoshima, S., Matsumoto, N., Wang, P., Inoue, H., Yoshioka, T., Hotta, Y. and Osawa, T. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 14842-14848
24. Sakane, F., Yamada, K., Kanoh, H., Yokoyama, C. and Tanabe, T. (1990) *Nature* 344, 345-348
25. Matusmoto, E., Hirosawa, K. and Hotta, Y. (1989) *J. Neurocytol.* 18, 87-93
26. Raaflaub, J. (1960) *Methods Biochem. Anal.* 3, 301-325



イノシトールリン脂質代謝関連酵素の ショウジョウバエ突然変異を用いた解析

井上宏子・吉岡 亨

ショウジョウバエ視覚異常突然変異の中に、複眼のイノシトールリン脂質代謝に異常のあるものが2種ある。ひとつは *rdg A* (retinal degeneration A) で、羽化後1週間以内に視細胞が崩壊する。ほかは *norp A* (no receptor potential A) で、形態的にはほぼ正常であるにもかかわらず受容器電位を発生しない。*rdg A* では DG キナーゼ活性が欠失しており、その結果、複眼に PA がほとんど存在しないことが明らかになった。また、*norp A* ではホスホリパーゼC活性が欠失しており、そのため PIP₂ の加水分解が起こっていないことがわかった。

はじめに ここ数年、PI 代謝は刺激受容後の細胞における Ca²⁺ の動員とCキナーゼの活性化という2つの役割を果たすと考えられるようになってきている。しかしそれだけの役割しかもっていないのであろうか。筆者らはショウジョウバエの視覚異常突然変異の複眼にみられる分子レベルでの異常を調べてゆく過程で、イノシトールリン脂質代謝に異常がみられる突然変異を2種類見いだした。視細胞が崩壊する突然変異, *rdg A* (retinal degeneration A)^{1,2)} と受容器電位を発生しない突然変異, *norp A* (no receptor potential A)^{1,3,4)} である。これらの突然変異の異常は直接 Ca²⁺ の動員機構の欠失とはむすびついていない。そこでこれらの突然変異の異常と、欠失している酵素活性との関連を検討することによって PI 代謝に関与する酵素の役割、ひいては PI 代謝回転そのものの役割を考察してゆきたい。このことはショウジョウバエの視細胞における PI 代謝の意味ばかりでなく、細胞レベルでの PI 代謝の研究からはみえてこない部分を明らかにしてゆく一助になるものと考えられる。

I. ショウジョウバエの視細胞の構造 と光受容機構

ショウジョウバエの複眼は数千個の個眼が集まってできている。個眼は細長い6個の周辺視細胞と2個の中心視細胞からなっており、図1に示したように配置している。中心視細胞は網膜の途中で入れ替わる。無脊椎動物の視細胞の光受容部は脊椎動物とは異なり、形質膜がく

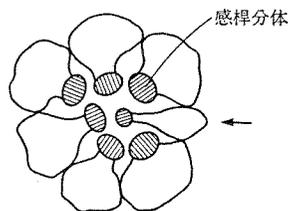


図1. 個眼の横断面図
矢印は中心視細胞を示す。他の細胞は周辺視細胞である。

Hiroko Inoue, 東京大学医科学研究所 (〒108 東京都港区白金台 4-6-1) [The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108, Japan]

Tohru Yoshioka, 早稲田大学人間科学部 (〒359 所沢市三ヶ島 2-579-15) [Waseda University, School of Human Science, Tokorozawa, Saitama 359, Japan]

An Approach to the Analysis of Phosphatidylinositol Cycle (PI) Related Enzymes Using Visual Mutant of *Drosophila*

[Key word] 【ショウジョウバエ】【DG キナーゼ】【ホスホリパーゼC】

びれこんだ直径 0.05~0.1 μm の微小管構造をとっている。この部分は感桿分体 (rhabdomere) とよばれている。この膜上に視物質であるロドプシンとイオンチャンネルが存在していると考えられている。

視細胞に光を照射すると、無脊椎動物では閉じていたイオンチャンネルが開いて脱分極性の電位を発生する(脊椎動物の場合は開いていたチャンネルが閉じて過分極性の電位を発生する)。ハエの場合は、光を照射してから受容器電位を発生するまでの時間が非常に短く、数ミリ秒である。ロドプシンが光を受容してからイオンチャンネルが開く機構は、これまでのところ明らかにされておらず、また関与する分子も同定されてこなかった。以前には Ca^{2+} がかわっていると考えられていたが、 Ca^{2+} は受容器電位発生には必ずしも必要ではなく、むしろ明順応に関与していると考えられるようになった。その後、脊椎動物と同様に cGMP 説も提唱された⁶⁾が、決定的な証拠は得られていない。ロドプシンとイオンチャンネルが同じ膜上に存在するならば、両者の間にはその他の分子は必要ないとも思われるが、ロドプシン1個で数千個のチャンネルを開くという計算結果もあり、なんらかの増幅機構が存在するとの考えが有力である⁶⁾。また、ロドプシンがイオンチャンネルである可能性も否定されている⁷⁾。したがって、受容器電位発生にかかわる分子を探し出すことが、無脊椎動物の視覚研究の重要な課題のひとつである。

II. ショウジョウバエの突然変異

ある機能を解明しようとするときに突然変異を用いることは、非常に有効な方法であることは周知のことである。ある機能の欠失した突然変異の原因となる分子を明らかにすれば、逆にその分子がその機能にかかわっていることになるからである。突然変異といえばその代表はショウジョウバエであり、これまでに数多く見いだされてきており、遺伝子解析もさかんに行なわれている。そして、現在も新しいものが報告されつづけている。最近では動物種間で遺伝子の相同性があることが明らかにされてきており、ショウジョウバエで遺伝子の機能が解明されれば、それは他の種にも適用できることになる。

ここではイノシトールリン脂質代謝に関与する酵素活性を欠失した2種類の突然変異にみられる異常を述べるとともに、それがどのように関連をもっているかについて筆者らが得たデータをもとに考察してみたい。

1. *rdg A* 突然変異

ショウジョウバエの視覚異常突然変異の中には、視細胞が崩壊するものがあり、*rdg* (retinal degeneration) とよばれている。*rdg* は *rdg A*, *rdg B* の2種類が知られている⁸⁾。*rdg A* では、羽化後1週間ほどの間に視細胞が崩壊する。一方 *rdg B* では、光によって崩壊が引き起こされる。

rdg A の羽化時の視細胞の形態はアレルによってかなり差がみられ、ほとんど正常に近いものから、かなり異常なものまである^{9,10)}。後者の場合は視細胞の形成が不完全といえるアレルもある。

このように *rdg* 突然変異は細胞の形態を維持することができない突然変異であり、その原因を探ることは細胞の形成過程を解明することにつながると考えられてきた。そして、これまでその原因はまったく不明であったが、*rdg A* 突然変異において欠損している分子が明らかになったので、それを手がかりに今後解明が進むことと思われる。

A. *rdg A* 突然変異とジアシルグリセロール (DG) キナーゼ

rdg A 突然変異の複眼の機能欠損は、視覚異常突然変異におけるイノシトールリン脂質代謝異常を調べてゆく過程で明らかになったのであるが、イノシトールリン脂質代謝酵素のひとつである DG キナーゼ活性がまったくないことがわかった²⁾。DG キナーゼは DG をリン酸化してホスファチジン酸 (PA) を生成する酵素である。表1は *rdg* 突然変異の頭部の DG キナーゼ活性を示している。*rdg A* については3つのアレルで調べたが、いずれも DG キナーゼ活性がほとんどみられなかった。羽化時の視細胞においてこの3つのアレルでは、*rdg KO14* と *rdg AKS60* は比較的正常に近く、*rdg ABS12* は形成が不完全である。*rdg A* 突然変異で DG キナーゼ活性がみられない原因が視細胞の崩壊ではないことは、*rdg B* では正常の36%の活性があることから明らかである。

ところで、ショウジョウバエから複眼のみを取り出すことは容易ではないので、筆者らは主として頭部全体を

表1. 正常のハエと *rdg A* 突然変異の頭部における DG キナーゼ活性の比較

遺伝子型	DG キナーゼ活性 (%)
+	100
<i>rdg A KO14</i>	5
<i>rdg A KS60</i>	4
<i>rdg A BS12</i>	3
<i>rdg B KS222</i>	36

表 2. 正常のハエと *rdg A* ヘテロ接合体の頭部における DG キナーゼ活性の比較

遺 伝 子 型	DG キナーゼ活性 (%)
+/+	100
<i>rdg A</i> ^{KO14} /+	58
<i>rdg A</i> ^{KS60} /+	50
<i>rdg A</i> ^{BS12} /+	42
<i>rdg B</i> ^{KS222} /+	113

用いて実験を行なったが、頭部全体の DG キナーゼのどの程度の割合が眼に存在するかを明らかにしておく必要がある。そこでこの点を2つの方法で調べた。ひとつは複眼のない突然変異である *so* を用いる方法であり、他のひとつはハエを凍結乾燥したのち、針で複眼を分離する方法である¹¹⁾。後者の場合はアセトン処理をするので酵素活性が低下するが、それは部位による差はないと考えられる。いずれの方法を用いても DG キナーゼの90%以上が眼に存在することがわかった。

このように *rdg A* の複眼において DG キナーゼ活性が欠損していることは明らかになったが、これが視細胞の崩壊の原因であるかどうかを知りたいところである。この点を筆者らは2つの方向から調べた。ひとつは DG キナーゼが *rdg A* 遺伝子の遺伝子産物であるかどうかということである。ショウジョウバエの場合は、遺伝子産物の量が遺伝子量と比例することが知られているので、遺伝子量を変えたときの結果から遺伝子産物であるか否かを判定できると考えられている。遺伝子量が半分のハエは、正常なハエ (+/+) と *rdg A* 突然変異 (*rdg A*/*rdg A*) をかけあわせてつくられる (*rdg A*/+, ヘテロ接合体)。このヘテロ接合体では *rdg A* 遺伝子の遺伝子産物の量は半分になっている。そこで *rdg A* のヘテロ接合体の DG キナーゼ活性を測定した。その結果、それらは正常のほぼ半分の活性をもつことがわかった (表2)。他の突然変異のヘテロ接合体は正常のものに近い活性がみられた。そこでさらに *rdg A* 遺伝子を含む部分の染色体を欠失している突然変異と正常とのヘミ接合体についても DG キナーゼ活性を調べたところ、それらも正常の半分程度の活性であった (表3)。遺伝子量を0, 0.5, 1.0と変えたときに、DG キナーゼ活性もほぼ0, 0.5, 1.0と比例して変化した。このことは *rdg A* 遺伝子が DG キナーゼをコードしている可能性を示唆している。念のためこうした結果が DG キナーゼに関してのみみられるものであるかを検討するために、他のイノシトールリン脂質代謝の関連酵素であるホスホリパーゼCについて調べた。その結果、*rdg A* のヘテロ接

表 3. 正常の *rdg A* 遺伝子 (*rdg A*⁺) の量を変えた場合の DG キナーゼ活性の変化

遺 伝 子 型	<i>rdg A</i> ⁺ 遺伝子量 (%)	DG キナーゼ活性 (%)
<i>rdg A</i> / <i>rdg A</i>	0	5
<i>rdg A</i> / <i>Df(1)KA14</i> ^{a)}	0	3
<i>rdg A</i> /+	50	58
<i>Df(1)KA14</i> /+	50	67
+/+	100	100

a) *Df(1)KA14* は *rdg A* 遺伝子の領域を欠失した系統。

体におけるホスホリパーゼC活性はほとんど正常のものと同じレベルであった。

さらに視細胞の崩壊と DG キナーゼの関連を明らかにするために、羽化後の DG キナーゼ活性を日を追って調べた。その結果、正常のハエは羽化直後は羽化後4日目のもののおよそ60%で、その後徐々に増大した。しかし、*rdg A* では羽化直後も正常の数%であった。この実験に用いた *rdg A* のアレルは、比較的正常に近い形態をもったものである。こうした結果は、*rdg A* における視細胞の形態上の崩壊以前に分子レベルでの欠損が起きていることを示している。

以上の結果は *rdg A* 突然変異における視細胞の崩壊の原因が DG キナーゼの欠損であることを示しているが、それでは DG キナーゼ活性の欠損が細胞に何をもたらすのであろうか。まず考えられるのは、基質として消費する酵素がないために起こる DG の蓄積である。そこで DG の定量を試みた。細胞の DG 含有量は非常に少なく定量がかなりむずかしいが、筆者らは液体クロマトグラフィーで頭部全体を用いて測定した。その結果、正常も *rdg A* 突然変異もほぼ同じで、頭1個あたり約0.1 μgあった。また *so* は正常のおよそ半分程度であったので、*rdg A* 突然変異の複眼とくに DG が多いという結果は得られなかった。DG は細胞に対して毒性があるといわれているが詳細は明らかではないので、DG の作用の解明は今後の課題である。

次に考えられるのは、DG キナーゼ活性が欠損しているためにホスファチジン酸 (PA) が生成されないということである。PA も含有量が少なく定量が困難であるが、³²P 標識した無機リン酸を経口投与すると1日後にはリン脂質に放射能が取り込まれるので、この方法で PA 量を比較した。この場合には、ラベル後ハエを凍結乾燥させることによって複眼のみを取り出して脂質を抽出した。その結果、*rdg A* の複眼の PA には正常の数%の放射能しかみられなかったので、*rdg A* の複眼には PA はほとんど存在しないと考えられる (図2)。

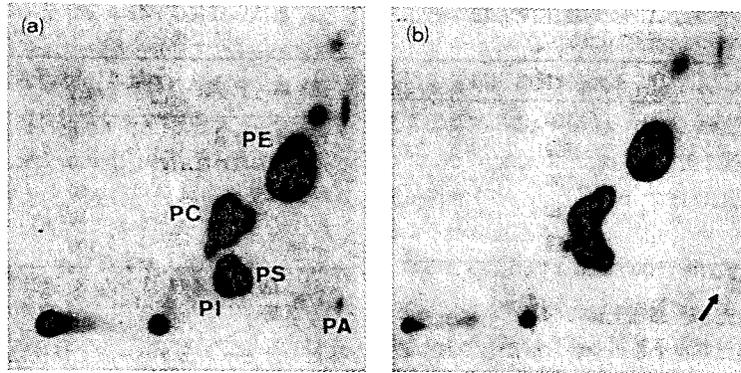


図2. [32 P] 無機リン酸を投与したハエの網膜から抽出したリン脂質の二次元薄層クロマトグラムのオートラジオグラム

(a) 正常, (b) *rdgA* 突然変異。
矢印は PA の位置を示す。

PC: ホスファチジルコリン, PE: ホスファチジルエタノールアミン, PI: ホスファチジルイノシトール, PS: ホスファチジルセリン, PA: ホスファチジン酸。

ところで PA の作用であるが、一時は PA がカルシウムイオンホアであるという仮説も出された¹³⁾が、その後否定され、その役割はいまのところ明らかではない。しかし PA は中間代謝産物であり、通常は極微量しか存在しないと考えられており、事実、ショウジョウバエの脳は眼に比べて非常に少ない。逆にいえば、ショウジョウバエの複眼にはかなり多量の PA が含まれているということである。これはまったくの仮説であるが、感桿の微小管のように曲率半径の小さい構造をつくるには極性基の小さい PA が必要である可能性が考えられる。したがって PA の細胞における役割を調べることは重要な課題といえよう。

このように、これまでのところ視細胞の崩壊と DG キナーゼ活性の欠損とは直接的な関連は見いだされていない。しかし DG キナーゼが *rdgA* 遺伝子の産物であるならば、なんらかのつながりがあるはずである。DG キナーゼが *rdgA* 遺伝子の産物であるかどうかは、DG キナーゼの精製と遺伝子のクローニングによって明らかになると考えられる。DG キナーゼの精製は現在行なっているところである。

ところで、図2の結果はこれまで展開してきた議論とはいささか矛盾するかのように見える。それは *rdgA* の複眼では DG キナーゼが欠損しているために PA が生成されないはずなのに PI に放射能が取り込まれている点である。もし PI が DG キナーゼによって生成された PA から合成されるならば、PI に放射能は取り込まれないはずである。この結果は逆に、*rdgA* の複眼の PI のほとんどは DG キナーゼによって生成される PA から

合成されるのではないことを示している。おそらく *de novo* 合成系によって生成される PA から合成されると考えられる。事実、モノアシルグリセロールリン酸にアシル基を転移して PA を生成する酵素がショウジョウバエの頭部に存在し¹³⁾、その活性は、正常と *rdgA* 突然変異で差がないことを筆者らは確認している。PI には2種のプールがあり、一方は刺激に応答するがその量は全体の 1/10 程度であり、他方は刺激に応答しないが大量にあるという仮説が出されている¹⁴⁾。DG キナーゼは刺激に応答する PI 代謝系にのみかかわっている酵素である可能性が高い。

2. *norpA* 突然変異

norpA (no receptor potential A) 突然変異は形態的にはほぼ正常であるにもかかわらず、受容器電位を発生せず、光信号変換機構の突然変異と考えられている。*norpA* には多数のアレルが報告されていて表現形もさまざまであり、まったく受容器電位を発生しないものや、温度依存性に電位を発生するもの、光の条件によっては正常に近い電位を発生するものもある^{15,16)}。温度依存性のアレルである *norpAKO50* は 18°C で飼育すると正常に近い受容器電位や走光性を示すが、25°C 以上で飼育するとまったく光に反応しない。さらに飼育温度を変えると光応答が可逆的に変わることが知られている¹⁶⁾。こうした点は *norpA* が光情報変換機構の突然変異であることを強く示唆している。したがって、*norpA* 突然変異で機能の欠損している分子が受容器電位の発生にかかわっていると考えられる。

表 4. 正常のハエと *norpA* 突然変異における ERG^{a)} (網膜電図) と PI, PIP₂ を基質とした場合のホスホリパーゼC活性の比較

遺伝子型	ERG	ホスホリパーゼC活性 (%)	
		PI	PIP ₂
+		100	100
<i>norp AJM11</i>		1	8
<i>norp ASB17</i>		1	6
<i>norp AEE5</i>		1	2
<i>norp AKO50</i>			
18°C		5	11
28°C		1	2

a) ERG は受容器電位とは異なるが、光照射による網膜の電氣的応答を記録したものである。

A. *norpA* 突然変異のホスホリパーゼC

先に述べたように Ca²⁺ は受容器電位の発生そのものには関与していないと考えられるが、光照射により Ca²⁺ 濃度が視細胞内で増大することは確かである。そこで筆者らはまず、その機構を明らかにするために、PI 代謝回転を調べることにした。なぜならば PI 代謝回転が刺激により促進されることと細胞内 Ca²⁺ 濃度の増大が関連していると考えられていたからである。

無脊椎動物の視細胞において PI 代謝が関与しているらしいことを筆者らはすでにタコの視細胞で見いだしていた¹⁷⁾が、*norpA* においては PI 代謝回転の促進が起きていない可能性もあると考え、この点を調べてみることにした。その結果、PI を基質とするホスホリパーゼC活性が *norpA* 突然変異の複眼でまったく欠失していることを見いだした⁹⁾。したがって *norpA* では PI 代謝回転が阻害されていると考えられた。さらに PIP₂ を基質にしてホスホリパーゼC活性を測定したところ、やはりほとんど酵素活性がみられなかった⁴⁾ (表 4)。この場合も頭部全体を用いて実験を行なったので、眼のない突然変異 (*so*) と凍結乾燥したハエから集めた複眼のホスホリパーゼC活性を測定した。その結果、DG キナーゼと同様に頭部全体の 90% 以上の活性が眼に存在することが明らかになった。したがって、*norpA* の複眼にはホスホリパーゼC活性がほとんどないといえる。

このように、*norpA* 突然変異においてはホスホリパーゼC活性が欠失していることは明らかになったが、それではそのことが受容器電位を発生しない直接の原因であるのであろうか。この点を明らかにするために、DG キナーゼの場合と同様にまず *norpA* 遺伝子がホスホリパーゼCの構造遺伝子であるかどうか調べてみた。*norpA* ヘテロ接合体におけるホスホリパーゼCの活性を測定したところ、基質が PI, PIP₂ どちらの場合も正常の 90% 以上の活性がみられた。したがって、この結果からは *norpA* 遺伝子がホスホリパーゼCの構造遺伝子であるという証拠は得られなかった。

ところで、表 4 で注目されることは *norp AJM11* と *norp AKO50* の結果である。*norp AJM11* はごく小さいが受容器電位を発生し、わずかに走光性を示す。一方、*norp AKO50* は先に述べたように 18°C では光応答を示すが、28°C では示さない。したがって、ホスホリパーゼC活性と光応答がよい相関関係をもっているといえる。そこでさらにこの点を明確にするために、*norp AKO50* の飼育温度を変えた場合の走光性とホスホリパーゼC活性の変化の時間経過を調べてみた。18°C から 28°C へ変化させた場合は走光性もホスホリパーゼC活性も 1 時間内に急速に低下し、その後緩やかに低下した。一方、28°C から 18°C へ変化させた場合は、両者とも非常にゆっくりと上昇した¹⁸⁾。

以上の結果はホスホリパーゼCが光受容機構にかかわっていることを強く示唆しているが、それではどのように関与しているのであろうか。PIP₂ のホスホリパーゼCによる分解によって生じるのはイノシトール三リン酸 (IP₃) とジグリセリド (DG) である。確かに IP₃ をカプトガニの複眼に注入すると光照射の場合と同様な電氣的応答を示すことが報告されている¹⁹⁾。しかし光の場合とは異なり、EGTA をあらかじめ注入しておいてから IP₃ を注入しても応答がみられなくなることも示されている。こうした結果は IP₃ による応答は Ca²⁺ を介していることを意味している。したがって、IP₃ は無脊椎動物の光情報変換機構にはかかわっていないことになる。

このことは、先に述べたホスホリパーゼCが光応答に関与しているであろうという結論と矛盾するかのようにも見える。もしホスホリパーゼCが IP₃ 生成の役割しかもたないとするならば、*norpA* 突然変異においてはホスホリパーゼCの欠損により IP₃→Ca²⁺ 動員という過程が阻害されているために電位を発生しないことになる。しかし前述した結果から判断して、この過程が働かなくても光を照射すると受容器電位が発生する。したがって、

norpA の異常はこの点にあるのではないことになる。むしろ PIP₂ の分解そのものが重要な役割をもっているのではないかと考えられる。

ところで、先に *norpA* 遺伝子の遺伝子産物はホスホリパーゼCであるという証拠は得られなかったと述べたが、1988年に Bloomquist ら²⁰⁾は *norpA* 遺伝子をクローニングしてその DNA 配列を決定し、アミノ配列を解析したところ、ホスホリパーゼCとよく一致したと報告した。こうした結果は *norpA* 遺伝子がホスホリパーゼCをコードしていることを示唆するが、彼らの報告はまだ決定的ではない。なぜならばクローニングされた遺伝子を *norpA* 突然変異に導入して回復させる実験が行なわれていないからである。したがってクローニングされた遺伝子が間違いなく *norpA* 遺伝子であることが確認されていない。

しかし、1次効果であれ、2次効果であれ *norpA* 突然変異の複眼においてホスホリパーゼC活性が極端に低下しており、少ないながら存在している活性と光応答が非常に相関をもっていることは確かである。したがってショウジョウバエの光受容機構にホスホリパーゼCが関与していることは間違いないと思われる。

B. *norpA* 突然変異の DG キナーゼ

norpA 突然変異の PI 代謝系を調べていたときに、筆者らは *norpA* でホスホリパーゼC活性が欠失していると同時に DG キナーゼ活性もまた正常に比べて著しく低いレベルにあることをつきとめていた¹³⁾(表5)。当時(1984年)すでに DG キナーゼの役割は PA を生成する酵素として知られていた。PA (PI ではない) サイクル仮説の創始者である Hokin-Hokin 夫妻は PI サイクルの引き金は DG キナーゼが引くと唱えていたこともあって、1985年に出版された Michell の総説 "Inositol phospholipid breakdown as a receptor-controlled generator of second messenger"¹⁴⁾には筆者らの論文¹³⁾が「ショウジョウバエ突然変異 (*norpA* のこと) では DG キナーゼが少なく、この突然変異では目がみえないことが知られている。おそらく C キナーゼによる細胞抑制がはずれるために受容器電位が発生しないのだろう」と論評されている。現段階で振り返ってみると、この論評は半分正しく、半分誤りである。正しい部分は DG キナーゼ活性の欠損により C キナーゼの抑制がはずれるという指摘であり、誤っている部分は C キナーゼと受容器電位を関連させているところである。すでにこれまで述べてきたように、受容器電位の発生はホスホリパーゼC活性の欠損によって妨げられるのであって、C キナーゼ

表 5. 正常のハエと *norpA* 突然変異の感桿分体の大きさ²¹⁾と DG キナーゼ活性の比較

遺伝子型	感桿分体の大きさ (μm ²)	DG キナーゼ活性 (%)
+	32	100
<i>norpA</i> ^{JM11}	—	59
<i>norpA</i> ^{EE5}	11	18

によるのではない。

それでは *norpA* における DG キナーゼの欠損は何と考へたらよいのだろうか? 答えは感桿分体の大きさの抑制である。*norpA* の感桿分体の大きさ(断面積)は正常のそれと比べると約 1/3 に縮退していることが知られている²¹⁾。DG キナーゼの活性と感桿分体の大きさが比例するわけではないが、感桿分体の大きさを一定に保つには DG キナーゼの活性がある一定の臨界値をこえていることが必要なのであろう。

では、どのようなプロセスにより大きさが決まるのであろうか? おそらく Michell が彼の総説で指摘したように C キナーゼの関与が期待される。通常では C キナーゼのスイッチの ON はホスホリパーゼCによる DG の生成によって行なわれ、OFF が DG キナーゼによる DG のリン酸化によって行なわれていると思われる。もしこの説が正しいとすると、*norpA* や前述の *rdgA* で特定の蛋白質のリン酸化が促進されているはずである。筆者らの研究室で行なわれている予備的な実験結果によると、確かに突然変異においてリン酸化の促進されているスポットを見いだすことができる。この蛋白質の同定はまだ行なわれていないが、おそらく細胞の成長にかかわる重要な蛋白質であると思われる。

おわりに 近年の情報伝達機構の解明は驚くほど進展したといってよい。10年前まではセカンドメッセンジャーといえば環状スクレオチドを指すのが普通であった。それが現在では Ca²⁺ 動員系が加わり、セカンドメッセンジャーの種類も3種となった。これら3系統のセカンドメッセンジャーがそれぞれどのような役割分担をしているのかいまだによくわかっていない。液性のセカンドメッセンジャーとしてこのほかにどのような分子があるのか、それも予想できない。分子生物学の進歩により、重要な蛋白質はクローニングされている。しかしその3次元構造はどうなっているのか、またその機能はいったい何か? といった基本的質問に答えられていない。また、異なる蛋白質間の相互作用を規定する遺伝子

は何かといったことも不明である。

このような問題を解決するには力づくでできるものではない。新しい測定手段を工夫し、新しい事実を積み重ねていかねばならない。そのような意味において情報伝達の機構の物理的側面の重要性を指摘しておきたい。これまでの情報伝達学は生化学的側面が強調されてきた。まず現象と平行的に変化する酵素活性が見いだされると、それが精製され、その遺伝子がクローニングされてきた。いわば“情報伝達”という名のドラマに登場する役者が決まった段階である。次にわれわれが知らなければならないのは、そのドラマの脚本である。登場する役者間の関係が明らかにされ、それらがどのような順番で登場してきて一連の流れができあがっているのかを明らかにすることである。そのためには生きている細胞の中での物質(分子)の動きと変化を物理的手段で捕捉することである。その指導原理として“情報はエントロピーの形で伝えられる”をあげておきたい。

文 献

- 1) Yoshioka, T., Inoue, H., Hotta, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **111**, 567-573 (1983)
- 2) Inoue, H., Yoshioka, T., Hotta, Y.: *J. Biol. Chem.*, **264**, 5996-6000 (1989)
- 3) Yoshioka, T., Inoue, H., Hotta, Y.: *J. Biochem.*, **97**, 1251-1254 (1985)
- 4) Inoue, H., Yoshioka, T., Hotta, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **132**, 513-519 (1985)
- 5) Johnson, E. C., Robinson, P. R., Lisman, J. E.: *Nature*, **324**, 468-470 (1986)
- 6) Fein, A.: *Trends in Neurosci.*, March, 110-114 (1986)
- 7) Khorana, H. G., Knox, B. E., Nasi, E., Swanson, R., Thompson, D. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7917-7921 (1988)
- 8) Hall, C. H.: *Quarterly Rev. Biophys.*, **15**, 223-479 (1982)
- 9) Stark, W., Carlson, S. D.: *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, **14**, 243-254 (1985)
- 10) Matsumoto, E., Hirose, K., Takagawa, K., Hotta, Y.: *Cell Tissue Res.*, **252**, 293-300 (1988)
- 11) Fujita, S. C., Inoue, H., Yoshioka, T., Hotta, Y.: *Biochem. J.*, **243**, 97-104 (1987)
- 12) Serhan, C., Anderson, P., Goodman, E., Dunham, P., Weissmann, G.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 2736-2741 (1981)
- 13) Yoshioka, T., Inoue, H., Hotta, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **119**, 389-395 (1984)
- 14) Downs, P. C., Michell, R. H.: in *Molecular Mechanism of Transmembrane Signalling* (eds. Cohen, P., Housley, M. D.), pp. 3-56, Elsevier, Amsterdam (1985)
- 15) Meyertholen, E. P., Stein, P. J., Williams, M. A., Ostroy, S. E.: *J. Comp. Physiol.*, **161**, 793-798 (1987)
- 16) Hotta, Y., Benzer, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **67**, 1156-1163 (1970)
- 17) Yoshioka, T., Inoue, H., Takagi, M., Hayashi, F., Amakawa, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, **755**, 50-55 (1983)
- 18) 井上 宏子・吉岡 亨: *細胞工学*, **8**, 1053-1058 (1989)
- 19) Payne, R., Corson, D. W., Fein, A., Berridge, M. J.: *J. Gen. Physiol.*, **88**, 127-142 (1986)
- 20) Bloomquist, B. T., Shortridge, R. D., Schneuwly, S., Perdue, M., Montell, C., Steller, H., Rubin, G., Pak, W. L.: *Cell*, **54**, 723-733 (1988)
- 21) 廣澤一成: 私信