

## 細胞膜脂質シグナリングの分子機構

坂野喜子・野澤義則

(岐阜大学医学部生化学教室)

### I. はじめに

膜リン脂質は蛋白質とともに生体膜を構成する二大成分と位置づけられ、もっぱら疎水性環境を提供する構築要素としてその意義づけがなされていた。この構造脂質の概念は典型的な膜構造モデルとして Robertson が提唱した単位膜説であった。脂質二重層の中に蛋白質が対称的に分布するという膜構造であった<sup>1)</sup>。ところが、1972年に至り、この膜モデルの概念が一変し、膜機能との関連性から機能脂質という新しい考えが導入された膜流動モザイクモデル説が Singer-Nicolson により提唱された。その基本理念は、膜流動性と蛋白質・脂質の非対称分布にあり、膜は静的ではなく動的であり、そのことが機能の発現にかなり密接に関連しているという重要な提言であった。

さらに、膜脂質が複雑な膜機能の一つである

情報伝達システムにも関与していることが明らかにされ、膜脂質がにわかに脚光を浴びることになった。40年余前の Hokin 夫婦によるハト腭切片の実験に端を発して、その後の諸細胞を用いた活発な研究によって、生体膜脂質の情報変換素子としての重要性が明らかにされた<sup>2)</sup>。

### II. 細胞内情報伝達における膜脂質の意義

(表1)

最初の細胞内情報伝達系としてアデニル酸シクラーゼ(AC)により産生されるサイクリックAMP(cAMP)を介するシグナル伝達系が初めて明らかにされ、セカンドメッセンジャーを介する蛋白質リン酸化・脱リン酸化によるシグナルカスケードが示されていた。その後、膜脂質が細胞内情報伝達に関わりをもつことが最初に Hokin 夫婦により示され注目されるようになった<sup>3)</sup>。彼らはハト腭臓切片のカルバコール刺激

表1. 細胞情報伝達における脂質の役割

[A]	セカンドメッセンジャー……細胞内情報伝達因子
	1. 加水分解……情報変換ホスホリパーゼ PI-PLC, PC-PLC, cPLA <sub>2</sub> , PLD, SM アーゼ
	2. リン酸・脱リン酸化……脂質キナーゼ・脂質ホスファターゼ DG キナーゼ, PIP5 キナーゼ, PI3 キナーゼ スフィンゴシン-1-キナーゼ, PA ホスファターゼ
[B]	セカンドアゴニスト……細胞間情報伝達因子 リゾPA(LPA), 血小板活性化因子(PAF), エイコサノイド(PG, LT, TX)
[C]	情報伝達関連タンパク質の脂質修飾……細胞膜との相互作用
	1. アシル化(ミリスチル化, パルミトイル化)
	2. プレニル化(ファルネシル化, ゲラニルゲラニル化)
	3. グルコシルPI化(GPIアンカータンパク質)

PI-PLC; ホスホイノシチド特異性ホスホリパーゼ C, PC-PLC; ホスファチジルコリン特異性 PLC, cPLA<sub>2</sub>; 細胞質型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>, PLD; ホスホリパーゼ D, SM アーゼ; スフィンゴミエリナーゼ, PG; プロスタグランジン, LT; ロイコトリエン, TX; トロンボキサン

によるアミラーゼ分泌と RNA との関係を調べているなかで、 $[^{32}\text{P}]$ リン脂質の比活性上昇という現象に遭遇し、分泌にリン脂質代謝が関与することを初めて示唆し、リン脂質効果とよんだ。さらに、このリン脂質がホスファチジルイノシトール (PI) とホスファチジン酸 (PA) と同定され、細胞刺激にみられる応答を PI レスポンス、またその代謝を PI サイクルとして広く知られるようになった。この PI サイクルが  $\text{Ca}^{2+}$  流入と連係しているという  $\text{Ca}^{2+}$  ゲート説が提唱され、分泌などの細胞応答における PI 分解の意義が説明づけられた。ところが、ポリホスホイノシチドの PI-4, 5 二リン酸 ( $\text{PIP}_2$ ) の減少が PI 減少に先行することが虹彩平滑筋や肝細胞で示され、細胞刺激の初発反応は PI の  $\text{PIP}_2$  への変換を反映するものと解釈された。 $\text{PIP}_2$  はホスホリパーゼ C (PLC) により分解され、ジアシルグリセロール (DG) とイノシトール三リン酸 ( $\text{IP}_3$ ) を産生し、前者は C-キナーゼ (PKC) の活性化因子として、後者は細胞内貯蔵部位の受容体に作用する  $\text{Ca}^{2+}$  動員因子として働く<sup>4,5)</sup>。

ついで、膜リン脂質の主要構成成分であるホスファチジルコリン (PC) も情報変換素子として重要な位置を占めるようになった<sup>6)</sup>。PC からはホスホリパーゼ  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) によりリゾ PC (LPC) と不飽和脂肪酸が、またホスホリパーゼ D (PLD) によりホスファチジン酸 (PA) ができる。PC 特異的に作用する PLC の存在も推測されている。PA から  $\text{PLA}_2$  によってリゾ PA (LPA) が生じる。スフィンゴミエリン (SM) からは SM アーゼによりセラミド (Cer) が、さらに代謝されスフィンゴシン (Sph) を経てスフィンゴシン-1-リン酸 (Sph-1-P) も産生される。このように、様々なセカンドメッセンジャーあるいはセカンドアゴニストが産生される。イノシトールリン脂質にも PI3 キナーゼ (PI3K) による  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  という新規セカンドメッセンジャーが出現した。

これらの細胞膜リン脂質代謝に由来するセカンドメッセンジャーやセカンドアゴニストを介

する情報伝達への関与に加えて、最近では情報伝達タンパク質因子の脂質修飾によって、情報伝達系をモデュレートする例が数多く示されている。その主要なものに、アシル化、プレニル化およびグリコシルPI化がある。

以上のように、細胞膜に由来する脂質メディエーターは直接的なシグナル因子として、あるいは間接的なモジュレーターとして情報伝達に関わっている。以下に、それらの主なものについて述べる。

### Ⅲ. 膜脂質由来セカンドメッセンジャーの多様性

膜リン脂質シグナリングを司る多様なセカンドメッセンジャーは、様々な情報変換ホスホリパーゼによる分解系、あるいは脂質キナーゼ・ホスファターゼによる脂質リン酸化・脱リン酸化系によって産生される。生体膜を構成する主要成分の PC をはじめ、量的に少ないイノシトールリン脂質などさまざまな膜リン脂質は、受容体刺激に伴って活性化される情報変換ホスホリパーゼにより多くの種類のセカンドメッセンジャーに変換される。以下これらの情報変換酵素の活性調節およびその作用で産生される膜脂質由来のセカンドメッセンジャーの働きについて述べる (図 1)。

#### 1. 情報変換ホスホリパーゼによる分解系 (図 2)

##### a) サイトゾル型ホスホリパーゼ $\text{A}_2$

$\text{PLA}_2$  は、グリセロリン脂質の C-2 位から不飽和脂肪酸を遊離し、残りはリゾリン脂質となる。その構造、性質から分泌型  $\text{PLA}_2$  (s $\text{PLA}_2$ )、細胞質型  $\text{PLA}_2$  (c $\text{PLA}_2$ )、 $\text{Ca}^{2+}$  非依存型 (i $\text{PLA}_2$ ) に大別されるが、血小板活性化因子 (PAF) に特異的なアセチルヒドロラーゼ (PAF-AH) も最近では 1 つのタイプとして加えられている (表 2)<sup>7)</sup>。細胞外に分泌される s $\text{PLA}_2$  は分子量 14 kDa の I 型 (臍臓型) と II 型 (非臍臓型) がクローニングされている。他に 17 kDa の III 型 (蜂毒) があり、高濃度 (mM) の  $\text{Ca}^{2+}$  を必要とする。

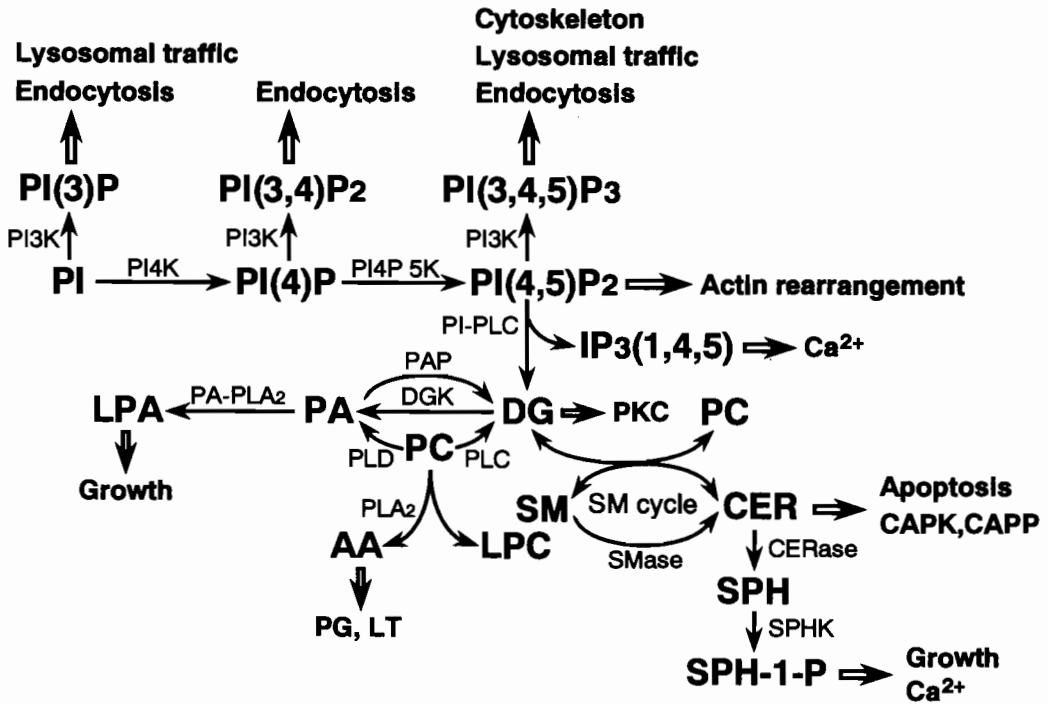


図1. 膜脂質シグナリングの相互連係

PI, ホスファチジルイノシトール; PI3K, PI3 キナーゼ; PI4K, PI4 キナーゼ; PI4P 5K, PI4 リン酸5 キナーゼ; PAP, ホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ; DGK, DG キナーゼ; CERase セラミダーゼ; CER, セラミド; SHP, スフィンゴシン; SPH-1-P, スフィンゴシン-1-リン酸; SPHK, スフィンゴシンキナーゼ; CAPK, セラミド活性化蛋白質キナーゼ; CAPP, セラミド活性化蛋白質ホスファターゼ; PG, プロスタグランدين; LT, ロイコトリエン; SMase, スフィンゴミエリナーゼ.

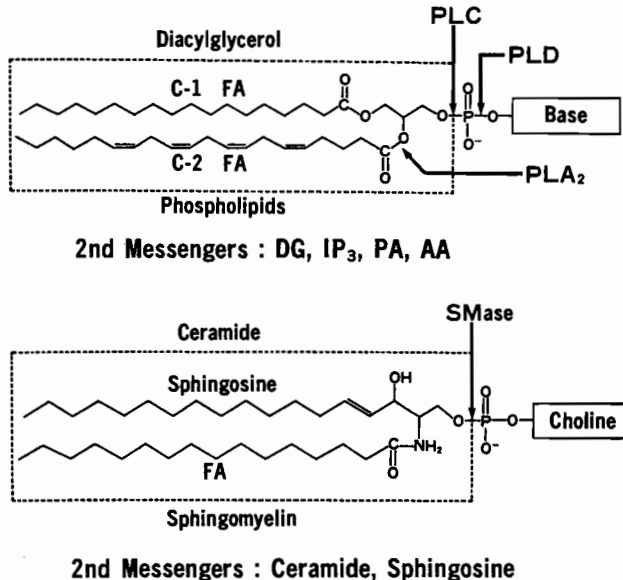


図2. 各種情報変換ホスホリパーゼの作用様式とセカンドメッセンジャー

表2. ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)のタイプと性質

タイプ	分子量	Ca <sup>2+</sup> 依存性	局在	生物活性
sPLA <sub>2</sub>				
I	14 kDa	mM	細胞外(分泌)	食物消化, 蛇毒(コブラ)
II	14 kDa	mM	〃	炎症, 蛇毒(マムシ)
III	17 kDa	mM	〃	蜂毒
cPLA <sub>2</sub>	85 kDa	μM	細胞内(非分泌)	アラキドン酸遊離
iPLA <sub>2</sub>	29~85 kDa	—	細胞内(非分泌)	脂質の remodeling
PAF-HA	29/30/45 kDa	—	細胞内, 血清	PAF の分解

cPLA<sub>2</sub> (85 kDa) は低濃度 (μMオーダー) の Ca<sup>2+</sup> で活性化される. Ca<sup>2+</sup> 非依存型の 29~85 kDa の PLA<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>) は種々の細胞や組織から精製されており, 膜脂質間の変換に関与する. また, Ca<sup>2+</sup> 非依存性の PAF-AH は血清リポ蛋白質に結合して血清中に存在するタイプと細胞質タイプの両方がクローニングされている. 脳 PAF-AH は三量体 G 蛋白質に似た触媒サブユニット (βγ: 30 kDa, 29 kDa) と Miller-Dieker の原因遺伝子 LIS-1 をコードする調節サブユニット (α: 45 kDa) から構成されている<sup>8)</sup>.

cPLA<sub>2</sub> は主に PC からアラキドン酸 (AA) を遊離する. 血小板, マクロファージ, 脳, 腎臓などの多くの細胞や組織に存在し, 大部分は細胞質に局在するが, 受容体活性化により細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度が上昇すると, 膜へ移行し活性化される. N 末端の特定部分 (アミノ酸 45 残基, CaLB ドメイン) は Ca<sup>2+</sup> 依存性の膜移行に必要である. cPLA<sub>2</sub> の活性調節に関しては諸説がある. 細胞刺激に先だつてホルボールエステル (PMA) を加えておくと, AA 遊離が増大することから PKC の関与が指摘されている. しかし, 試験管内での cPLA<sub>2</sub> の酵素活性は PKC の影響を受けない. PLC 活性化→DG 産生→PKC 活性化→PLA<sub>2</sub> 活性化の過程がよく知られているが, 精製 cPLA<sub>2</sub> が MAP キナーゼでリン酸化されると活性化が起こることから, PKC と cPLA<sub>2</sub> の間に MAP キナーゼが介在することが考えられる. cPLA<sub>2</sub> の活性化に重要な 505 番目のセリンが, MAP キナーゼによってリン酸化される<sup>9)</sup>. ヒト血小板では, p 38 MAP キナーゼによる cPLA<sub>2</sub> のリン酸化が起こる<sup>10)</sup>.

cPLA<sub>2</sub> を過剰発現させた細胞では Ca<sup>2+</sup> イオンホアや G 蛋白共役型受容体刺激による即時型アラキドン酸 (AA) 遊離が増強し, 特異的阻害剤 AACOCF<sub>3</sub> で完全に阻害される. 遊離した AA は Cox-1 やリポキシゲナーゼによりプロスタグランジン (PG) やロイコトリエンの産生に利用される. また, サイトカイン刺激に伴う Cox-2 依存的な遅延型 PG 産生にも cPLA<sub>2</sub> が関与している.

#### b) イノシトールリン脂質特異的ホスホリパーゼ C (PI-PLC)

PI-PLC は PIP<sub>2</sub> を分解して, 2 つのセカンドメッセンジャーである IP<sub>3</sub> と DG を産生する. PI-PLC には分子多様性がみられ, 遺伝子クローニングから β (β1, β2, β3, β4), γ (γ1, γ1), δ (δ1, δ2, δ3, δ4) など 10 種類のアイソフォームが存在し, 組織分布や活性調節もさまざまである<sup>11-13)</sup>. 相同性の高い共通領域として X, Y 領域があり, この両者が酵素活性に必要である (図 3). また, 膜表面で PIP<sub>2</sub> と結合する領域として pleckstrin ホモロジー (PH) 領域が N 末端近傍に存在している. さらに, PH ドメインに近接して EF ハンドドメインが, Y 領域に近接して C2 ドメインが存在し, 後者は Ca<sup>2+</sup> 依存的な触媒活性に必要である<sup>14, 15)</sup>. PLCγ ファミリーはがん遺伝子 *src* と相同性の高い領域 (*src* homology domain; SH) の SH2 および SH3 を有する. SH2 はチロシンリン酸化に, また SH3 は細胞骨格のアクチンとの結合に関係するドメインである. また, PLCδ ファミリーは N 末端側に塩基性アミノ酸に富んだ領域があり, IP<sub>3</sub> のような陰性荷電の強い化合物

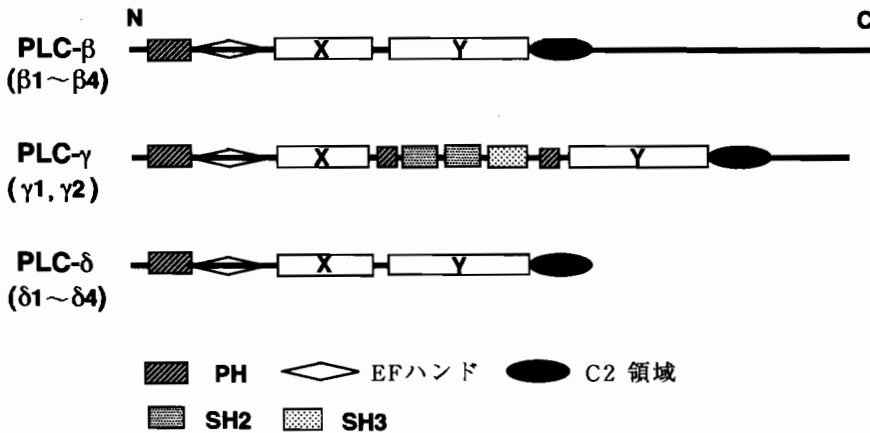


図3. ホスホリパーゼC(PLC)の分子多様性と構造的特異性  
文献16)より改変

PH: Pleckstrin homology 領域 SH: Src homology 領域

と結合する。

PLCの活性調節機構は各アイソフォームにより異なる<sup>16)</sup>。細胞膜7回貫通型受容体を介するPLC $\beta$ の活性化には、百日咳毒素(PT)感受性と非感受性の2種類のG蛋白質が介在する。非感受性G蛋白質としてのGqファミリーはC末端から4番目のシステインを欠くために、PTによるADPリボシル化を受けない。三量体G蛋白質は、 $\alpha$ と $\beta\gamma$ の2つのサブユニットからなり、哺乳類から約20種類(Gs, Gi/Go, Gq, G12のそれぞれのサブファミリー)が同定されているが、PLC $\beta$ の活性化に関与する $\alpha$ サブユニットはGqファミリー(Gq, G11, G14, G15/16)のみである。 $\alpha_q/11$ は、PLC $\beta_1 \geq$  PLC $\beta_3 >$  PLC $\beta_4 >$  PLC $\beta_2$ の順に活性化し、PLCの最大活性( $V_{max}$ )を高めるが、 $Ca^{2+}$ 要求性には影響しない。また、PLC $\beta_2$ は $\alpha_{16}$ に対して、PLC $\beta_4$ は $\alpha_q$ に特異性が高い。

一方、G蛋白質の $\beta\gamma$ サブユニットもPLC $\beta$ を直接活性化することが再構成系で明らかにされている。 $\beta\gamma$ はPLC $\beta_3 >$   $\beta_2 >$   $\beta_1$ の順に活性化するが、PLC $\beta_4$ には作用しない。 $\alpha_q$ と $\beta\gamma$ の結合部位は異なり、 $\alpha_q$ はC末端側に、 $\beta\gamma$ の結合部位はPLC $\beta_2$ のGlu<sup>435</sup>とVal<sup>641</sup>の間に存在する。

増殖因子(PDGF, EGF)の受容体刺激に伴う

PLCの活性化には、受容体結合型のチロシンキナーゼ(RPTK)によるPLC $\gamma_1$ のチロシンリン酸化が重要である。PDGF刺激により、RPTKが自己リン酸化されると、その部位にPLC $\gamma_1$ のSH2ドメインが結合し、自身の771, 783, 1254番目のチロシンがリン酸化される。PLC $\gamma_1$ のチロシンリン酸化は、基質PIP<sub>2</sub>の結合を阻害する因子(プロフィリン, ゲルゾリンなど)との相互作用を変化させることによって活性化するといわれている。また、非受容体型PTK(Src, Lyn, Fyn, Sykなど)によるPLC $\gamma$ のチロシンリン酸化が知られている。たとえば、血小板をコラーゲン刺激すると、SykによるPLC $\gamma_2$ のチロシンリン酸化が起こる。その他に、PLC $\gamma$ はtau蛋白質の存在下でcPLA<sub>2</sub>により生じたAA, PI3-キナーゼによるPIP<sub>3</sub>やPLDによるPAによっても活性化されることが知られている。

一方、PLC $\delta$ の活性化機構は十分明らかにされていない。PLC $\delta_1$ はIP<sub>3</sub>による活性阻害や、またスフィンゴシンによる活性化が示唆されている。また、ある種のG蛋白質が関与する可能性があり、 $\alpha_1$ -アドレナジック受容体活性化の際に3量体G蛋白質のG $\beta\alpha$ がPLC $\delta_1$ を活性化することや低分子量G蛋白質のRhoAのGTPアーゼ様蛋白質が精製PLC $\delta_1$ を活性化

することが知られている。PLC $\delta$ 4 は核に特異的に存在しており、その調節機構が注目されている。

プロテインキナーゼA (PKA) や PKC は PLC 活性を制御する。PKC は PLC $\beta$ 1 をリン酸化するが、Gq $\alpha$  による PLC $\beta$ 1 の活性化に影響しない。Jurkat T 細胞では PKA、PKC の活性化は PLC $\gamma$ 1 のチロシンリン酸化を阻害し、その程度は PLC 活性の減少と相関する。また、PKA の触媒部位を過剰発現させた COS 細胞では  $\beta\gamma$  により PLC $\beta$ 2 の活性化が抑制される。

PLC アイソザイムの生理的役割はノックアウトマウスで調べられており、PLC $\beta$ 1 と  $\beta$ 4 のノックアウトマウスでは、正常に生まれるが発育や運動機能障害がみられる<sup>17)</sup>。一方 PLC $\gamma$ 1 の欠損マウスは、妊娠初期で死亡し、生育には必須であることが示された。また、凝集や分泌異常の血小板では PLC $\beta$ 2 が正常血小板の 1/4 に減少しており、このタイプの PLC アイソザイムが血小板活性化に関与していることが推測されている。

#### c) ホスファチジルコリン特異性 PLC (PC-PLC)

PC-PLC はホスファチジルコリン (PC) を分解して DG とホスホリルコリンを産生する酵素である。PC-PLC の哺乳動物での実体が定かでない上に特異的な活性測定がないために、必ずしも特異的ではないが D609 が阻害剤としてよく用いられる。この酵素によって主要膜成分の PC から量的に多い DG がつくられ、PKC が持続的に活性化され細胞増殖・分化のような長期応答に重要な働きをする。PC-PLC 活性は Ras を過剰発現させた線維芽細胞で強い活性が見られ、MAP キナーゼカスケードと関連している<sup>18)</sup>。

#### d) ホスホリパーゼ D (PLD)

PLD は主として PC を加水分解し、PA とコリンを産生する酵素である。PE や PI を分解する PLD もある。また、一級アルコールの存在下においてはホスファチジル基転移という特異反応を触媒し、代謝されにくい特異リン脂質

であるホスファチジルアルコールを産生するために PLD 活性の特異的測定法として用いられる。PLD は、Hanahan と Chaikoff (1947) によって、ニンジンで見つけられ、当初は植物酵素と考えられていた。その後、PLD は植物のみならず藻類、粘菌、細菌まで広く分布していることが分かった。さらに、Kanfer のグループがラット脳膜画分から部分精製し、哺乳動物における PLD の存在が確実視され、今日では各種動物細胞において種々のアゴニスト刺激によって活性化される情報変換酵素として広く認められている<sup>19,20)</sup>。

PLD の精製は多くの培養細胞系や組織において試みられたが、単一にまで精製するのが困難であった。従来よりラット肝ミクロゾームに不飽和脂肪酸によって活性化される PLD が存在することが知られていたが、その性状は不明であった<sup>21)</sup>。最近、山下ら (1994) によりブタ肺からこのタイプの PLD が単一に精製された<sup>22)</sup>。この酵素は 190 kDa の単一サブユニットからなり不飽和脂肪酸で活性化される。さらに、酵母、バクテリア、植物などから相次いで PLD の遺伝子がクローニングされている。動物細胞からは、酵母の減数分裂に必須である *SPO14* 遺伝子が、実は PLD をコードしていることがホモロジー検索から分かり、ついで、それをもとに HeLa 細胞の cDNA ライブラリーを用いてヒト *PLD1* (*hPLD1*) が初めてクローニングされた (図 4)。すべてに 4 つの相同性アミノ酸配列領域があり、ここに触媒活性が存在すると思われる。*hPLD1a* は 1072 のアミノ酸からなり、分子量 124 kDa の蛋白質である。筆者らは *hPLD1a* と似た性状を有するスプライシングバリエーションの *hPLD1b* (1034 個のアミノ酸) を見出した<sup>23)</sup>。さらに、マウスやラットのライブラリーを用いて、*PLD2* がクローニングされた<sup>24)</sup>。*PLD2* は 932 個のアミノ酸からなり、*PLD1* と 51% の相同性を有する。さらに、ブタ脳膜画分から 95 kDa の PLD が部分精製されている。これらはいずれも膜画分に多く存在するが、可溶性画分からも PLD 活性化が見

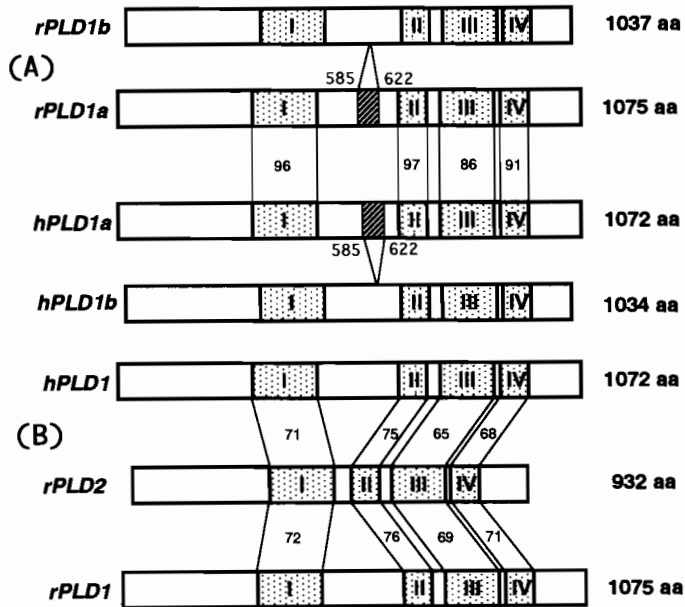


図4. ホスホリパーゼ D (PLD) 遺伝子のアイソフォーム  
*hPLD*, ヒト PLD 遺伝子; *rPLD*, ラット PLD 遺伝子

出されており, PLD にもいくつかのアイソザイムが存在する。

PLD の活性調節にはさまざまな因子が関与する。無細胞系で非水解性 GTP アナログの GTP $\gamma$ S を添加すると PLD が活性化されることから, G 蛋白質が関与することが示唆されていた。Brown ら (1993) および Cockcroft ら (1994) は, HL 60 細胞膜画分や透過性 HL 60 細胞では GTP $\gamma$ S による PLD の活性化は非常に弱い, サイトゾル画分の添加によってより活性化が増強されることから, サイトゾル画分中の PLD 活性化因子として ADP-リポシル化因子 (Arf) を同定した<sup>25)</sup>。さらに肝細胞膜の GTP $\gamma$ S による PLD 活性化が RhoGDI によって阻害され, 過剰 Rho の再添加によって増強されることから Rho の関与が示された<sup>26)</sup>。また, Rho に特異的な *Clostridium botulinum* 由来の C3 毒素, あるいは Rho ファミリーすべてを不活化する *C. difficile* 由来の毒素 B で細胞を処理するとアゴニスト刺激による PLD の活性化は起こらない<sup>27)</sup>。RhoA や Rac を過剰発現させた線維芽細胞を受容体刺激すると,

PLD の活性化は対照細胞より増強される。クローニングされた *PLD1a*, *PLD1b*, *PLD2* 遺伝子を Sf9 で過剰発現させ, 精製した酵素について活性化因子が調べられた。これらはいずれも PIP<sub>2</sub> により活性化され, *PLD1a*, *1b* は Arf 依存性であるが, *PLD2* はそれ自身高い活性を有し Arf による活性上昇を示さない。さらに Arf による *PLD1* の活性化は, Rho, Cdc 42, Rac で相乗的に増強される。また, Ral も直接 *PLD1* に結合して活性化する<sup>28)</sup>。

一方, PKC が PLD 活性化に深く関わっていることは, PMA が PLD を活性化すること, あるいは PKC 阻害剤や PMA の長時間処理による PKC のダウンレギュレーションによって, アゴニスト刺激による PLD 活性化が阻害されることなどからよく知られている。膜画分に各 PKC アイソザイムを直接作用させた場合,  $\alpha$  型が最も効果的に PLD を活性化する。ただし, PKC の触媒部位を欠失した調節部位だけでも PLD の活性化は起こることや, Arf の *PLD1* 活性化は PKC $\alpha$  と相乗効果を示すが ATP 非依存性である。これらのことより,

PKC による PLD の活性化はリン酸化というよりはむしろアロステリック効果によるものと考えられている<sup>29)</sup>.

一方、PLD 活性の阻害作用をする因子も存在する。その一つはセラミド(Cer)であり、阻害のメカニズムとしてサイトゾルの活性化因子(Arf, RhoA, PKC)の膜移行を抑制するためと考えられている<sup>30)</sup>。また、特異的な阻害因子としてフォドリン、シナプトジャニン、クラスリン結合蛋白質3(AP3)がある。シナプトジャニンは PIP<sub>2</sub> に対するホスファターゼ活性を有し、PIP<sub>2</sub> を減少させることにより Arf による hPLD1 活性を阻害する<sup>31)</sup>。AP3 は hPLD1 に直接結合して阻害する。

PLD の細胞機能における役割については、多くの推測がなされているが、十分に明らかにされていない。好中球やマスマト細胞などの分泌反応は、エタノール添加で PA 産生を抑制すると阻害される。Arf は細胞内小胞輸送の重要因子の1つであることはよく知られており、そのN末端ペプチドあるいは Arf 活性を阻害するプレフェルディンAを用いた実験では、PLD 活性とエキソサイトーシスとの相関が見られる<sup>32)</sup>。また、Arf 依存型 PLD はゴルジ膜に局在し、被覆小胞の形成がエタノール処理によって阻害されることが示されている。エキソサイトーシスの膜融合部位での PA の重要性から PLD の関与が推測されているが、直接証拠は得られていない。一方、LPA で血管内皮細胞を刺激するとストレス線維の形成が観察されるが、ブタノール存在下では起こらない。また、PLD の活性調節に関与するゲルゾリンや前述のフォドリンはアクチン結合蛋白質であり、PLD 活性化因子の Rho はアクチン細胞骨格系を介して細胞の運動や形態に密接に関連しており、PLD が細胞骨格制御にも関与していることは十分推測される。

さらに、細胞増殖・分化との関連を示唆する実験知見がいくつかある。PLD の代謝産物である PA や LPA は *c-fos*・*c-myc* の発現や DNA 合成を誘起する。PLC や cPLA<sub>2</sub> と同じ

ように、PLD は核にも存在しており、再生肝から単離した核では Arf 依存型 PLD 活性がS期に増加する<sup>33)</sup>。最近では、HL 60 細胞や C6 グリア細胞の分化誘導に伴って、PLD の活性上昇と *PLD2* mRNA の発現増大が起こることが見出されている。また、Cer で誘導したアポトーシスでは PLD 活性の低下がみられる。

#### c) スフィンゴミエリナーゼ(SM アーゼ)

細胞膜リン脂質の数%を占めるスフィンゴミエリン(SM)はスフィンゴ脂質のなかで最も単純な構造を示し、神経組織などに多く存在する。PC と同じようにコリン含有リン脂質であり、細胞膜の脂質二重層の外層に多い。SM アーゼは SM を分解し、セラミド(Cer)とホスホリルコリンをつくる。Cer はセラミダーゼの作用でスフィンゴシン(Sph)となる。Sph はさらにキナーゼによりスフィンゴシン-1-リン酸(Sph-1-P)となる(図5)。これらはともにセカンドメッセンジャーとして作用する。Cer と PC から SM 合成酵素によって SM がつくられ、SM アーゼで再び Cer となり SM サイクルを形成している。

少なくとも3種類の SM アーゼが存在し、それぞれが異なる局在性を示す。中性 SM アーゼには Mg<sup>2+</sup> 依存性と非依存性があり、それぞれ細胞膜と細胞質に存在する。酸性 SM アーゼはリゾソーム酵素であり、この酵素の欠損がニーマン・ピック病の原因である。腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )、Fas/APO-1、NGF やサイトカイン(IL-1)などの刺激によって、SM アーゼが活性化され Cer が産生される。Fas/APO-1 受容体活性化では2種類の SM アーゼ(中性と酸性)と PC-PLC が活性化されることが示された。しかし一方では、膜結合型中性 SM アーゼが TNF- $\alpha$  と関係しているとする説もあり、議論の多いところである<sup>36)</sup>。

前述したように、Cer は PLD や DG キナーゼ(DGK)活性など増殖シグナル関連酵素活性の阻害作用を示し、ストレスや傷害の誘導因子であり、特にアポトーシス、分化、老化などに関与する。Cer によるアポトーシスでは、カス



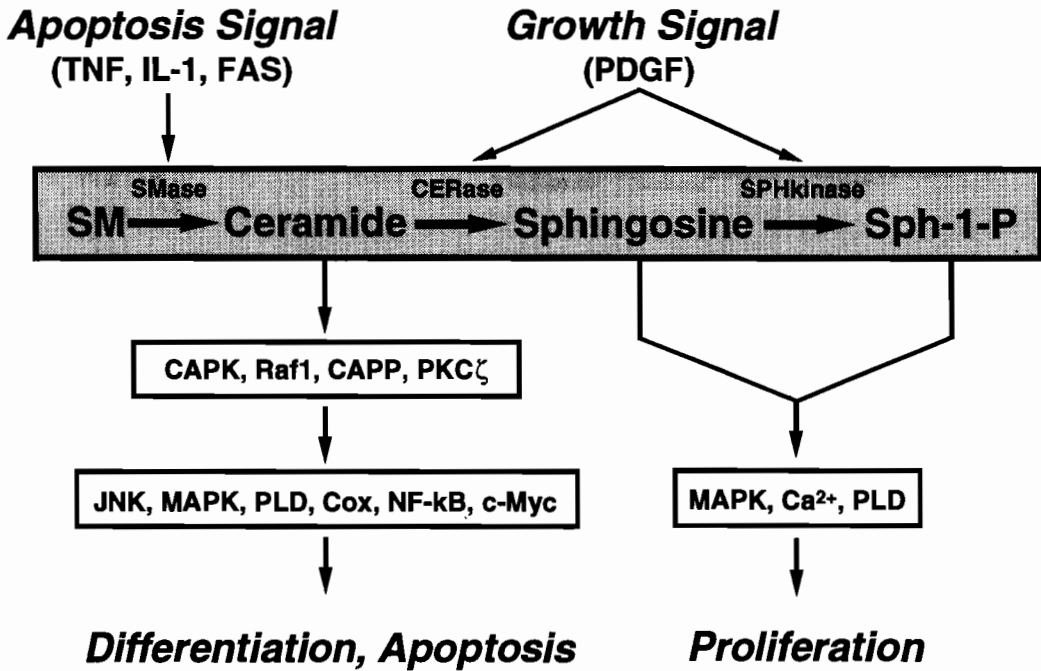


図5. スフィンゴミエリンを介するシグナリング

TNF, tumor necrosis factor; IL-1, interleukin-1; PDGF, platelet-derived growth factor; MAPK, mitogen-activated protein kinase

パーゼ (caspase) ファミリー (interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE), CPP 32 など) を活性化し, Bcl-2 は Cer によるアポトーシス誘導や CPP 32 の活性化を阻害する. Cer から長鎖脂肪酸が切断されてできる Sph も多彩な生理活性を示し, その一つは PKC の阻害作用である. また, PA ホスホヒドロラーゼ (PAP) に対しては抑制的に, DGK に対しては促進的に作用する.

## 2. 脂質キナーゼ・ホスファターゼによるリン酸化・脱リン酸化

### a) 脂質キナーゼ

脂質のキナーゼによるリン酸化, あるいはホスファターゼによる脱リン酸化によって, セカンドメッセンジャーの産生や修飾が起こる. PI キナーゼ, DG キナーゼ, Sph キナーゼなどがその例である. PI キナーゼ (PIK) 系には, イノシトール環の D-4 位をリン酸化する PI4K と D-3 位をリン酸化する PI3K に大別される.

前者は大部分が膜結合型であり, PI から PI(4)P を作り, ついで PIP5K により PI(4,5)P<sub>2</sub> となる. 後者はほとんどサイトゾルに存在し, PI から PI(3)P, PI(4)P から PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(4,5)P<sub>2</sub> から PI(3,4,5)P<sub>3</sub> を生成する. PI(4,5)P<sub>2</sub> は PLC の基質になるが, PI(3,4)P<sub>2</sub> は既存の PLC では分解されず, リン酸化される部位が 3 位と 4 位では性質がまったく異なり, 細胞応答における機能も異なる. PIP5K は RhoA により活性化され PI(4,5)P<sub>2</sub> の量的調節をする. その PI(4,5)P<sub>2</sub> は PLD やカルパインの活性化因子, あるいはゲルグリンやプロフィリンなどのアクチン結合蛋白質に結合しアクチン重合を引き起こすなど, さまざまな作用を発揮する<sup>37)</sup>.

PI3K は 3 つのクラスに分けられ, すべてのクラスに共通した PIK ドメインとキナーゼドメインがある (図 6)<sup>38)</sup>. クラス I には A と B のサブクラスがあり, IA は 110 kDa の触媒サブユニットと p85 ( $\alpha$ ,  $\beta$ , や p55 $\gamma$ ) の調節サ

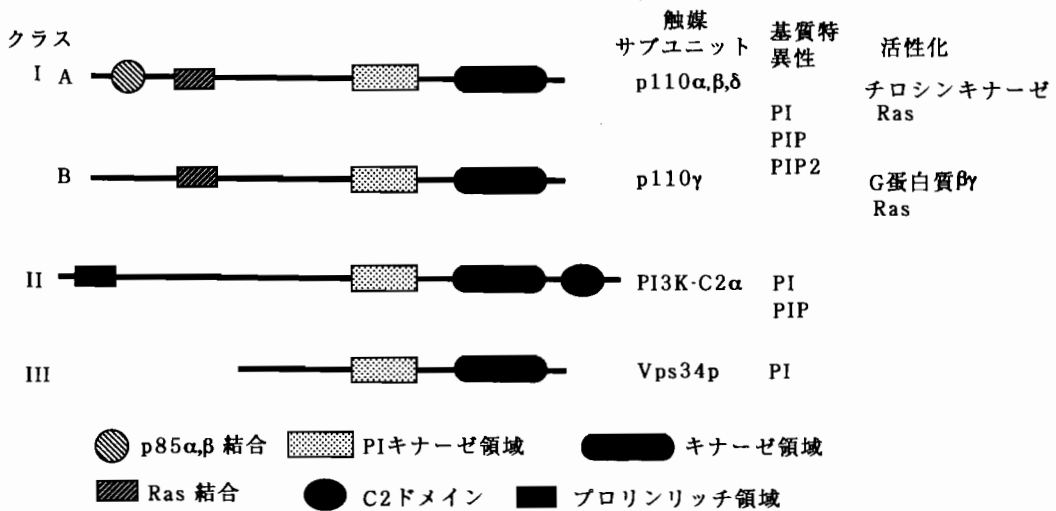


図6. ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ(PI3K)ファミリーの構造的特異性(文献38)より改変

グユニットからなるヘテロダイマーである。前者には p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$  の3種類がある。p85には1つのSH3領域と2つのSH2領域が存在し、PDGFなどでの刺激によって受容体の自己リン酸化が起こり、そのリン酸化部位にPI3KがSH2領域を介して結合し、リン酸化されて活性化される。また、G蛋白質で活性化されるIBクラスはp85を欠きp110 $\gamma$ の触媒サブユニットにp101のアダプター蛋白が隣接している。IAとIBにはRas結合ドメインが存在し、Rasにより活性化される。クラスIIのPI3Kは、カルシウム特異性リン脂質結合ドメイン(C2)を有し分子量(200kDa)も大きく、PIとPI(4)Pをリン酸化するがPSの存在下ではPI(4,5)P2もリン酸化する。クラスIIIのPI3Kは酵母のVps34pに類似性を示しPIのみをリン酸化する。PI3Kの下流シグナルにはPKC $\lambda$ の活性化が知られているが、p70S6キナーゼやAktなどの活性化もある。特異的な阻害剤であるwortmanninを用いて、PI3Kが細胞骨格形成に関与していることが示されている。また、低分子量G蛋白質のRacもPI3Kの下流で活性化され、JNKのシグナル系に連結している。

DGKは主要セカンドメッセンジャーのDG

をPAに転換する酵素である。二相性DG産性の、第一相はPAに転換されるが、第二相のDGはPAにならないという報告がある。

DGKは分子多様性を示し、哺乳動物から少なくとも5つのサブファミリーからなる8種類のアイソザイムの遺伝子がクローニングされている(図7)<sup>39)</sup>。I型DGK( $\alpha, \beta, \gamma$ )はCa<sup>2+</sup>依存性を示し、2個のEFハンドと2個の亜鉛フィンガー構造を有し、受容体刺激によるCa<sup>2+</sup>濃度上昇で膜に移行する。II型DGK( $\delta$ )はC末端側にPHドメインを有し、亜鉛フィンガーも存在するが、EFハンドはない。その他(III; $\epsilon, \text{IV型}; \zeta, \text{V型}; \theta$ )のDGKは触媒領域以外にI型やII型との相同生領域がなく、それぞれ異なっている。III型DGKはアラキドノイル型DGに特異的でPI由来のDGをリン酸化する。IV型は主に核に局在する。DGKの生理機能に関しては、DG量の調節によるPKC活性を制御しさまざまな細胞機能に影響を与える。DGK $\alpha$ はIL-2刺激により核に移行し、またDGK活性を制御するとS期に移行できないなど細胞増殖に関連しており、PA産生酵素としても働いているようである。

SphキナーゼはSph-1-Pを産生する酵素で血小板で高い活性を示す<sup>40)</sup>。精製が困難な

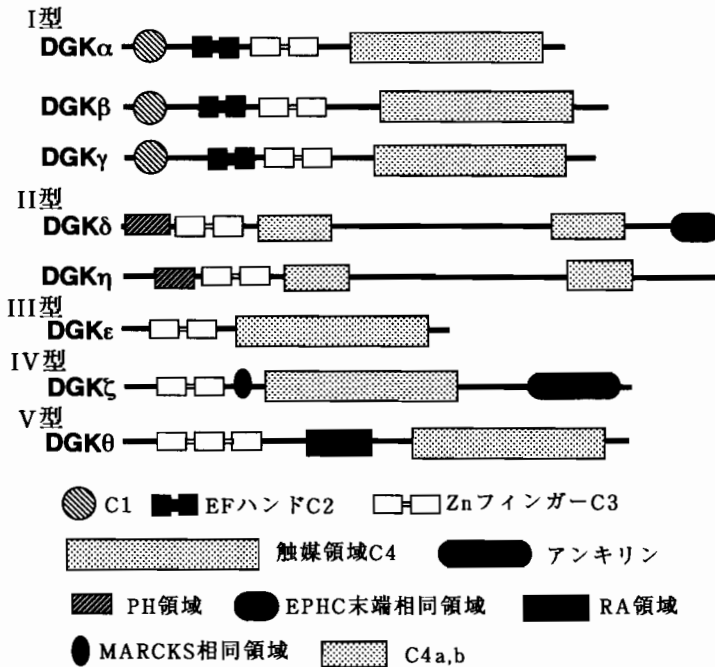


図7. ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)ファミリーの構造異性性  
文献39)より改変

め単一酵素は得られていないが、PS、PAやカルジオリピンなどの酸性リン脂質により活性化される。Sph-1-PはMAPKの活性化を介してDNA合成を促進する増殖シグナルとして作用する<sup>41)</sup>。

#### b) 脂質ホスファターゼ

リン脂質のホスファターゼによる脱リン酸化によってセカンドメッセンジャーの転換が起こる。代表的なものにPAホスホヒドロラーゼ(PAP)があり、PLDなどで生じたPAを脱リン酸化してDGに転換する。この系とDGKとの作用による脱リン酸化・リン酸化によって、セカンドメッセンジャーの相互転換(PA⇌DG)が起こり、両者の質的・量的な調節がなされる。また、イノシトールポリリン酸もホスファターゼの作用で修飾を受ける<sup>42)</sup>。この酵素にもいくつかの種類のものがあり、IP<sub>3</sub>、IP<sub>4</sub>を基質とするタイプI、IP<sub>3</sub>、IP<sub>4</sub>、PIP<sub>3</sub>、PIP<sub>2</sub>を基質とするタイプII、さらにSH領域を有し3位にリン酸基をもつIP<sub>4</sub>(1,3,4,5)やPI(3,4,5)P<sub>3</sub>だけを基質とするSH2-containing inositol phos-

phatase (SHIP) などがある。PI3KとSHIPはシグナルのon-offスイッチとして作用する。また、PIP<sub>2</sub>に対して高いホスファターゼ活性をもつシナプトジャニン(PIP<sub>2</sub>の濃度の低下をもたらす)は、Rhoと共にPIP<sub>2</sub>の量的調節機能を有する。

#### IV. 脂質セカンドアゴニスト

細胞内代謝で生じた脂質誘導体は細胞外に出て、セカンドアゴニストとしてそれぞれ固有の受容体に作用する。したがって、これらは細胞間伝達因子であり、主なものにリゾホスファチジン酸(LPA)、血小板活性化因子(PAF)、エイコサノイドやSph-1-Pがある。

LPAは多機能リン脂質メッセンジャーであり、さまざまな細胞機能の発現に関連している<sup>43)</sup>。血中ではアルブミンと結合した状態で存在し、その主な起源は血小板と考えられている。つまり、血小板刺激によってPAからPLA<sub>2</sub>の作用で生じ、細胞外に遊離する。

LPAのG蛋白質を介するシグナル伝達系に

は、1) PLC, PLD の活性化, 2) アデニル酸シクラーゼの抑制, 3) Ras とその下流シグナル系(Raf/MAPK)の活性化, 4) Rho を介する細胞骨格変化など多彩である。このなかで、2), 3) は Gi を介し, 1), 4) は Gq を介する。LPA の Ras を介する系はかなり分かっているが、Rho 系のシグナルカスケードの連係様式はかなり複雑である。

PAF の受容体がクローニングされ, Gi, Gq を介する系が明らかにされている<sup>44)</sup>。PAF は好塩基球から放出され, 血小板活性化因子として見出されたが, 炎症細胞のみならず, 多くの正常組織, 細胞などでもつくられる。PAF 刺激により受容体を介して PLC, PLD, PLA<sub>2</sub> および MAPK カスケードが活性化され, 実に多彩な機能を発揮する。

リン脂質から PLA<sub>2</sub> により遊離した AA からは多種類のエイコサノイドが作られ, そのいくつかは刺激に伴って細胞外に遊離され, セカンドアゴニストとして作用する。プロスタグランジン(PG)やトロンボキサン A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>), ロイコトリエン B<sub>4</sub> などは種々の G 蛋白質を介する受容体を活性化するセカンドアゴニストとして細胞に作用し, PLC, PLD, PLA<sub>2</sub> などの活性化をもたらす。

Sph-1-P は LPA と同様に血小板でつくられ

細胞外に遊離し, 血中でアルブミンと結合して存在し, オートクライン的に細胞を刺激する。Sph-1-P の受容体は PT 感受性 Gi がカップルしている<sup>45)</sup>。Sph-1-P 添加により DNA 合成が促進され, 増殖アゴニストとして作用する。血小板では LPA と同じように PTK を活性化する。また, 多くの細胞で PLC や PLD の活性化, 細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の増加をきたす。

## V. シグナリング蛋白質の脂質修飾 (Lipidation)

情報伝達関連蛋白質のなかで, 翻訳後脂質修飾を受けて細胞膜と結合するものがかなり多く知られている。脂質修飾の様式には, 脂肪酸を付加するアシル化, イソプレノイド代謝産物によるプレニル化, グリコシル PI による GPI アンカリングなどがある(表3)<sup>2)</sup>。

### a) アシル化(acylation)

3量体G蛋白質の Gi, Go の  $\alpha$  サブユニットの N 末端グリシンにミリスチン酸(14:0)がミリスチルトランスフェラーゼによってアミド結合しているが, Gq, Gs の  $\alpha$  サブユニットでは, N 末端に近いシステインにパルミチン酸(16:0)が非酵素的にチオエステル結合している。Gq, Gs の  $\alpha$  サブユニットの 9, 10 番目のシステインをセリンで置換すると, C16:0 が付加されな

表3. 情報伝達関連タンパク質の脂質修飾様式

修飾脂質	修飾を受けるタンパク質	修飾部位	結合様式
アシル化			
ミリスチン酸 (C14:0)	$\alpha$ i, $\alpha$ o, $\alpha$ t サブユニット, Src, Fyn, Lyn, Arf, GAP-43,	N末端グリシン	アミド結合
パルミチン酸 (C16:0)	Gs, Gq, G12, G13 サブユニット, Fyn, Lyn, Ras	N末端システイン	チオエステル結合
プレニル化			
ファルネシル基 (C15)	$\gamma$ サブユニット, ラミン, Ras	C末端システイン	チオエーテル結合
ゲラニルゲラニル基 (C20)	$\gamma$ サブユニット, Rab	C末端システイン	チオエーテル結合
グリコシル PI(GPI)	Thy-1, N-CAM, TCR $\beta$ , CD55/DAF CD48 など	C末端カルボキシル基	アミド結合 (エタノールアミンによる)

いために、細胞膜移行が起こらなくなり PLC も活性化されない。αs の 3 番目を同様に変更させると膜移行も AC の活性化もおこらない。

低分子量 G 蛋白質の Arf はミリスチン酸の修飾を受ける。PLD の活性化作用はミリスチル化された方が修飾されない Arf に比べ約 1000 倍強い。PTK も脂質修飾され、Src はミリスチン酸を、Lyn, Fyn にはミリスチン酸とパルミチン酸の両脂肪酸で二重修飾されている。また、長期増強に關与する GAP-43 はパルミチン酸を介して膜と結合している。

#### b) プレニル化(prenylation)

イソプレノイド脂質の炭素数15のファルネシル基あるいは炭素数20のゲラニルゲラニル基が、C末端側の4番目のシステインに安定なチオエーテル結合をしている。3量体G蛋白質のγサブユニットは、コンセンサス配列のCAAX(X;任意のアミノ酸)のC末端アミノ酸Xの種類で修飾され方が違う。弱い酸性アミノ酸であればファルネシル基が、疎水性アミノ酸であればゲラニルゲラニル基が結合する。このプレニル化後に膜に移行し、AAXの3個のアミノ酸が切断され、プレニルシステインのカルボキシル基がメチル化を受ける。

低分子量G蛋白質のRabファミリーはC末端側にある2つのシステイン残基がゲラニルゲラニル化されている。RasはC末端側のシステイン残基にファルネシル基が、N末端側のシステイン残基にパルミチン酸が結合しており、両者が膜と相互作用する。

#### c) GPI アンカー

GPIは細胞表面において細胞外蛋白質とのアンカーの役割をしている。GPIアンカー蛋白質は60以上もあり、アルカリホスファターゼ、5'ヌクレオチダーゼ、コリンエステラーゼがよく知られているが、そのほかにも表面抗原(Thy-1, CD48)、細胞接着因子(N-CAM)、補体制御因子(CD55/DAF, CD59)や受容体(T cell receptor β; TCRβ)など細胞応答に關連するものがある。GPIアンカーは、PIの6位のグルコサミンに3分子のマンノースがグリコシ

ド結合し、それがエタノールアミンリン酸を介して蛋白質のC末端と酸アミド結合している。したがって、GPI生成不全は、機能的に重要な蛋白質を正常な状態で膜表面に発現できないことによる様々な膜機能障害をもたらす。発作性夜間血色素尿症(proxymal nocturnal hemoglobinuria; PNH)はその代表例である。GPIを分解する酵素には細菌のPI-PLC、トリパノゾーマのGPI-PLC、ヒト・ウサギ血清中のGPI-PLDなどがある。

## VI. おわりに

細胞膜脂質が情報伝達システムに密接に關与していることが明かになり、従来の膜脂質に対する概念はこの10年間で一変した。細胞機能において、分泌などの迅速応答のみならず増殖、分化、アポトーシスなどの中・長期応答にも数多くのセカンドメッセンジャーあるいはメディエーターを介して蛋白質リン酸化と連係し、効率的なシグナル伝達が営まれている。ノックアウトを含めた分子遺伝学的手法により、膜脂質シグナリングの分子レベルでの解析が急速に進展することになり、機能との關連がより具体的に理解されるのもそう遠い先のことではなさそうである。

執筆の機会を与您いただきました高田明和教授にお礼申しあげます。

## 文 献

- 1) 野澤義則(1991)細胞膜脂質の機能的側面—機能脂質. 科学 61, 341-348
- 2) 野澤義則(1995)脂質からみた生体膜, 生体膜—新しい膜学への招待—(宇井理生, 香川靖雄, 春日雅人, 野澤義則編)pp 1-61, 講談社サイエンスティフィク
- 3) Hokin, M. R. & Hokin, L. E. (1953) J. Biol. Chem. 203, 967-977
- 4) Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. Science 258, 607-614
- 5) Thorn, P., Moreton, R. & Berridge, M. (1996) Multiple, coordinated Ca<sup>2+</sup>-release events underlie the inositol trisphosphate-induced local Ca<sup>2+</sup> spikes in mouse pancreatic acinar cells. EMBO

- J. **15**, 999-1003.
- 6) Exton, J. H. (1990) Signaling through phosphatidylcholine breakdown. *J. Biol. Chem.* **265**, 1-4
  - 7) 村上 誠, 井上圭三, 工藤一郎 (1996) ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>. *実験医学* **14**, 1999-2005
  - 8) Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H. & Inoue, K. (1994) Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* **370**, 216-218
  - 9) Lin, L. L., Wartmann, M., Lin, A. Y., Knopf, J. L., Seth, A. & Davis, R. J. (1993) cPLA<sub>2</sub> is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* **72**, 269-278
  - 10) Kramer, R. M., Roberts, E. F., Um, S. L., Borsch-Haubold, A. G., Watson, S. P., Fisher, M. J. & Jakubowski, J. A. (1996) p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>(cPLA<sub>2</sub>) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* **271**, 27723-27729
  - 11) Rhee, S. G. & Choi, K. D. (1992) Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase isozymes. *J. Biol. Chem.* **267**, 12393-12396
  - 12) Noh, D.-Y., Shin, S. H. & Rhee, S. G. (1995) Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1242**, 99-114
  - 13) 坂野喜子, 野澤義則 (1996) ホスホリパーゼ C の多様性. *実験医学* **14**, 1992-1998
  - 14) Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J. & Sigler, P. B. (1995) Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* **83**, 1037-1046
  - 15) Essen, L.-O., Perisic, O., Cheung, R., Katan M. & Williams, R. L. (1996) Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C $\delta$ . *Nature* **380**, 595-602
  - 16) Rhee, S. G. & Bac, Y. S. (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* **272**, 15045-15048
  - 17) Ji, Q. S., Winnier, G. E., Niswender, K. D., Horstman, D., Wisdom, R., Magnuson, M. A. & Carpenter, G. (1997) Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma 1 in mammalian growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* **94**, 2999-3003
  - 18) Van Dijk, M. C. M., Muriana, F. J. G., de Widt, J., Hilkmann, H. & Van Blitterswijk, W. J. (1997) Involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in platelet-derived growth factor-induced activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in Rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **272**, 11011-11016
  - 19) 中島 茂, 坂野喜子, 野澤義則 (1995) 細胞活動におけるホスホリパーゼ D の役割と活性調節機構. *蛋白質核酸酵素* **40**, 877-888
  - 20) Exton, J. H. (1997) New developments in phospholipase D. **272**, 15579-15582
  - 21) Taki, T. & Kanfer, J. (1979) Partial purification and properties of a rat brain phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **254**, 9761-9765
  - 22) Okamura, S. & Yamashita, S. (1994) Purification and characterization of phosphatidylcholine phospholipase D from pig lung. *J. Biol. Chem.* **269**, 31207-31213
  - 23) Hammond, S. M., Jenco, J. M., Nakashima, S., Cadwallader, K., Gu, Q.-M., Cook, S., Nozawa, Y., Prestwich, G. D., Frohman, M. A. & Morris, A. J. (1997) Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. *J. Biol. Chem.* **272**, 3860-3868
  - 24) Colley, W. C., Sung, T.-C., Roll, R., Jenco, J., Hammond, S. M., Altschuller, Y., Bar-Sagi, D., Morris, A. J. & Frohman, M. A. (1997) Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Current Biology*, **7**, 191-201
  - 25) Brown, A. A., Gutowski, S., Moomaw, C. R., Slaughter, C. & Sternweis, P. C. (1993) ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* **75**, 1137-1144
  - 26) Bowman, E. P., Uhlinger, D. J., & Lambeth, J. D. (1993) Neutrophil phospholipase D is activated by a membrane-associated Rho family small molecular weight GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* **268**, 21509-21512
  - 27) Ojio, K., Banno, Y., Nakashima, S., Kato, N., Watanabe, K., Lyster, D. M., Miyata, & Nozawa, Y. (1996) Effect of *Clostridium difficile* toxin B on IgE receptor-mediated signal transduction in rat basophilic leukemic cells: inhibition of phospholipase D activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 591-596
  - 28) Luo, J. Q., Liu, X., Hammond, S. M., Colley, W. C., Feig, L. A., Frohman, M. A. Morris, A. J. & Foster, D. A. (1997) RalA interacts directly with the Arf-responsive, PIP<sub>2</sub>-dependent phospholipase D1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 854-859
  - 29) Ohguchi, K., Banno, U., Nakashima, S. & Nozawa, Y. (1996) Regulation of membrane phospholipase D by protein kinase C in HL60 cells. Synergistic action of small GTP-binding protein RhoA. *J. Biol. Chem.* **271**, 4366-4372
  - 30) Abousalham, A., Liossis, C., O'Brien, L. & Brindley, D. N. (1997) Cell-permeable ceramides prevent the activation of phospholipase D by ADP-ribosylation factor and RhoA. *J. Biol. Chem.* **272**, 1069-1075

- 31) Chung, J. K., Sekiya, F., Kang, H. S., Lee, C., Han, J. S., Kim, S. R., Bac, Y. S., Morris, A. J. & Rhee, S. G. (1997) Synaptojanin inhibition of phospholipase D activity by hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **272**, 15980-15985
- 32) Liscovitch, M. & Chalifa, V. (1994) Signal-activated phospholipase D. In *Signal-Activated Phospholipases* (M. Liscovitch ed.) R. G. Landes Company, pp. 31-63
- 33) Banno, Y., Tamiya-Koizumi, K., Oshima, H., Morikawa, A., Yoshida, S & Nozawa, Y. (1997) Nuclear ADP-ribosylation factor (ARF)- and oleate-dependent phospholipase D (PLD) in rat liver cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 5208-5213
- 34) 岡崎俊郎, 沢井宏文, 堂前尚親 (1996) スフィンゴリエリンサイクル, *実験医学* **14**, 23-28
- 35) Testi, R. (1996) Sphingomyelin breakdown and cell fate. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 468-471
- 36) Hannun, Y. A. (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **274**, 1855-1859
- 37) 伊集院社 (1997) イノシトールリン脂質代謝の新しい仲間たち, *蛋白質核酸酵素* **42**, 385-393
- 38) Vanhaesebroeck, B., Leervers, S. J., Panayotou, G. & Waterfield, M. D. (1997) Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 267-272
- 39) 坂根郁夫 (1997) ジアシルグリセロールキナーゼ遺伝子ファミリーの多様な構造, *生化学* **69**, 176-181
- 40) 矢富 裕 (1996) 血小板におけるスフィンゴ脂質の機能と代謝, *血栓止血誌* **7**, 219-226
- 41) Olivera, A. & Spiegel, S. (1993) Sphingosin-1-phosphate as a second messenger in cell proliferation induced by PDGF and CS mitogens. **365**, 557-560
- 42) 勾坂敏朗 (1996) イノシトール情報伝達系におけるイノシトールポリリン酸 5-ホスファターゼの役割とその意義, *実験医学* **14**, 2026-2031
- 43) Moolenaar, W. H. (1995) Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J. Biol. Chem.* **270**, 12949-12959
- 44) Mori, M., Aihara, M., Kume, K., Hamanoue, M., Kohsaka, S. & Shimizu, T. (1996) Predominant expression of platelet-activating factor receptor in the rat brain microglia. *J. Neurosci.* **16**, 3590-3600
- 45) Zu Heringdorf, D. M., Van Koppen, C. J. & Jakobs, K. H. (1997) Molecular diversity of sphingolipid signalling. *FEBS Lett.* **410**, 34-38