

## 論文の内容の要旨

論文題目 細胞内 I 型 PAF acetylhydrolase の微小管系  
および精子形成への関与

氏名 古泉 博之

### 【序文】

細胞内 I 型 PAF アセチルヒドロラーゼ (PAF-AH(I)) は血小板活性化因子 PAF を加水分解する酵素として当研究室で同定された。本酵素は、互いに 60% の相同性を持つ触媒サブユニット  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  と、非触媒サブユニットである  $\beta$  からなり、3 量体 G 蛋白質に立体構造上よく似た複合体を形成している。 $\beta$  が脳形態形成期の神経細胞移動異常により生じる Miller-Dieker 症候群の原因遺伝子産物 LIS1 と同一であることから、PAF-AH(I) が、神経細胞移動において重要な役割を持っていることが予想された。しかし、実際、PAF-AH(I) が細胞内でどのターゲットに作用しているか、 $\alpha$  と LIS1/ $\beta$  はどのように関与しているのか、またどのような生理的機能を持っているかという点に関してほとんど明らかになっていない。私は、過剰発現細胞を用いた細胞レベル、ノックアウトマウスを用いた個体レベルでの解析を行った。その結果、PAF-AH(I) は細胞内微小管系を調節していることが示唆され、さらに個体レベルでは精子形成において重要な機能を果たしていることが明らかになった。

### 【方法と結果】

#### 過剰発現細胞を用いた細胞レベルでの機能解析

本酵素の細胞レベルでの機能を探るため、各サブユニットを恒常的に過剰発現させた細胞株の樹立を試みたが、高発現を示すクローンは得られず、この酵素の過剰発現は細胞の生育にと

って有害であると予想された。そこで、目的遺伝子の発現を誘導できる Tet-Off system を用いた。CHO 細胞において、テトラサイクリンを培地中より除くことにより各サブユニットそれぞれ内在性のものに対して約5倍の過剰発現を誘導できる細胞株を得た。

LIS1/ $\beta$ 、 $\alpha 2$  の発現誘導を行うと、通常の細胞よりも大きい、多核、多形核を有する異常細胞が出現することを見いだした (Fig.1B, C)。 $\alpha$ -tubulin 抗体を用いて微小管の免疫蛍光染色を行ったところ、正常細胞では核の近傍に微小管形成中心(MTOC)が観察される (Fig.1A) のに対し、LIS1/ $\beta$ 過剰発現細胞では MTOC が消失し (Fig.1B)、 $\alpha 2$  過剰発現細胞では正常細胞のものより拡がった MTOC や、2 個以上の MTOC を持つものが観察された (Fig.1C)。 $\alpha 1$  過剰発現細胞では顕著な核形態異常、微小管形成異常は見られなかった。

微小管形成中心である中心体のマーカー、 $\gamma$ -tubulin の抗体を用いて免疫蛍光染色を行ったところ、正常細胞では、核のすぐ近傍に 1 つまたは 2 つの中心体が見られる (Fig.2A) のに対し、LIS1/ $\beta$ 過剰発現細胞では核から離れ、多数、細胞質中に散在しており (Fig.2B)、 $\alpha 2$  過剰発現細胞では中心体が散在するか、核の近傍でなく細胞の縁の方に存在するものが観察された (Fig.2 C)。 $\alpha 1$  過剰発現細胞では顕著な中心体の異常は観察されなかった。



Control /  $\alpha$ -tubulin, DAPI      LIS1/ $\beta$ overexpression /  $\alpha$ -tubulin, DAPI       $\alpha 2$  overexpression /  $\alpha$ -tubulin, DAPI

Fig.1 LIS1/ $\beta$ 、 $\alpha 2$ 過剰発現による微小管構造異常



Control /  $\gamma$ -tubulin      LIS1/ $\beta$ overexpression /  $\gamma$ -tubulin       $\alpha 2$  overexpression /  $\gamma$ -tubulin

Fig.2 LIS1/ $\beta$ 、 $\alpha 2$ 過剰発現による中心体構造異常

核形態の異常は、細胞分裂の異常により生じていることが予想されたので、細胞分裂期の様子を観察したところ、LIS1/ $\beta$ や $\alpha 2$  過剰発現細胞では過剰数の mitotic spindle が形成される結果、染色体分離異常が生じることが分かった (Fig.3)。

次に、PAF-AH(I)の細胞内における局在を見るために myc-tag をつけた各サブユニットを CHO 細胞に発現させ myc 抗体で免疫蛍光染色を行ったところ、LIS1/βは細胞質に存在する他、 $\gamma$ -tubulin の局在と一致し、一部、中心体に局在することが明らかになった (Fig.4)。一方、 $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2 ではこのような局在は見られず、細胞質に一様に存在していた。

以上より、LIS1/βは中心体構成分子と相互作用することにより細胞内微小管系を調節している可能性が示唆された。さらに $\alpha$ は細胞質において LIS1/βと結合することにより、中心体において機能する LIS1/βの制御を行っているのではと考えられた。

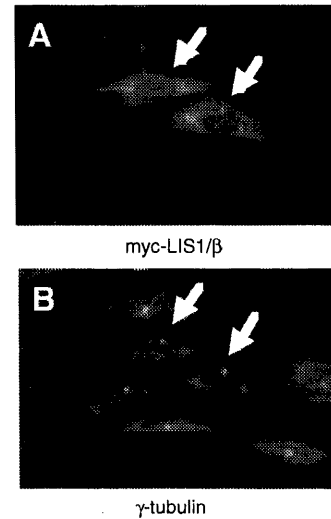


Fig.4 LIS1/Rの一部は

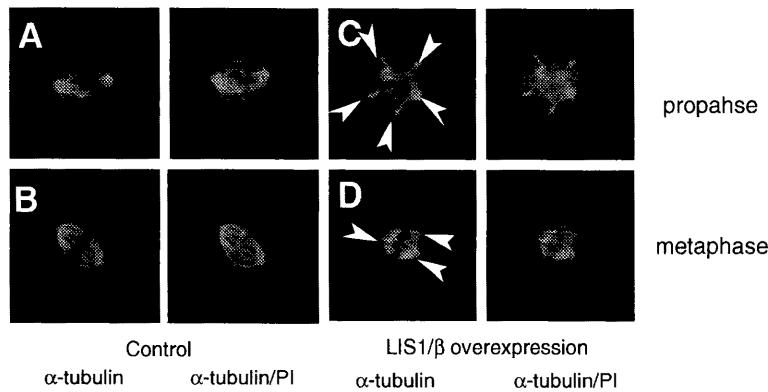


Fig.3 LIS1/β過剰発現による細胞分裂異常

### ノックアウトマウスを用いた個体レベルでの機能解析

さらに PAF-AH(I)の個体レベルにおける生理的機能を解析するために、触媒サブユニット $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2 のノックアウトマウスを作成した。 $\alpha$ 1<sup>-/-</sup>マウス、 $\alpha$ 2<sup>-/-</sup>マウス、 $\alpha$ 1<sup>-/-</sup>  $\alpha$ 2<sup>-/-</sup>マウスいずれもメンデルの法則に従い、正常に出生し、見かけ上、正常に成長した。どのマウスにおいても脳構造の顕著な異常は少なくとも adult では観察されなかった。

まずはじめに、ノックアウトマウスの生化学的解析を行った。PAF-AH(I)の $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2 は可溶性画分にのみ検出されるのに対し、LIS1/βは可溶性画分のみならず、不溶性画分にも検出される。可溶性画分のこれらのサブユニットは I 型 PAF-AH としての complex を形成していると思われるが、不溶性画分の LIS1/βは $\alpha$ とは結合しておらず、何らかの別の成分、恐らくは中心体構成分子などと結合しているものと予想される。 $\alpha$ 2、 $\alpha$ 1 ノックアウトマウスにおいて

LIS1/βの発現を調べたところ、α2ヘテロ、α2ホモ欠損マウスにおいて、可溶性画分のLIS1/βがα2量依存的に減少していることが見出された。一方、不溶性画分においてLIS1/βの発現量には変化は見られなかった。mRNAレベルではむしろ上昇傾向にあったことから、蛋白翻訳後に分解されていると考えられた。またα1ノックアウトマウスではLIS1/βの発現量に変化は見られなかった (Fig.5)。

以上の結果より、α、特にα2は、恐らく細胞質においてLIS1/βと結合することにより細胞内におけるLIS1/βを安定化し、細胞質のLIS1/βの量を規定している可能性が初めて示唆された (Fig.6)。

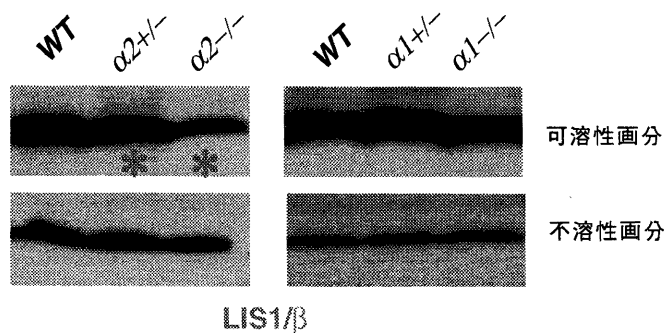


Fig.5 α2<sup>-/-</sup>マウスではLIS1/βの可溶性画分の発現量が低下する

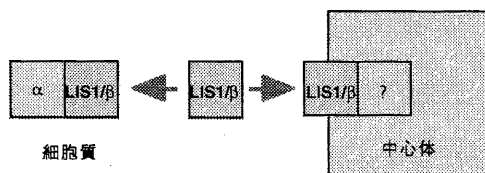
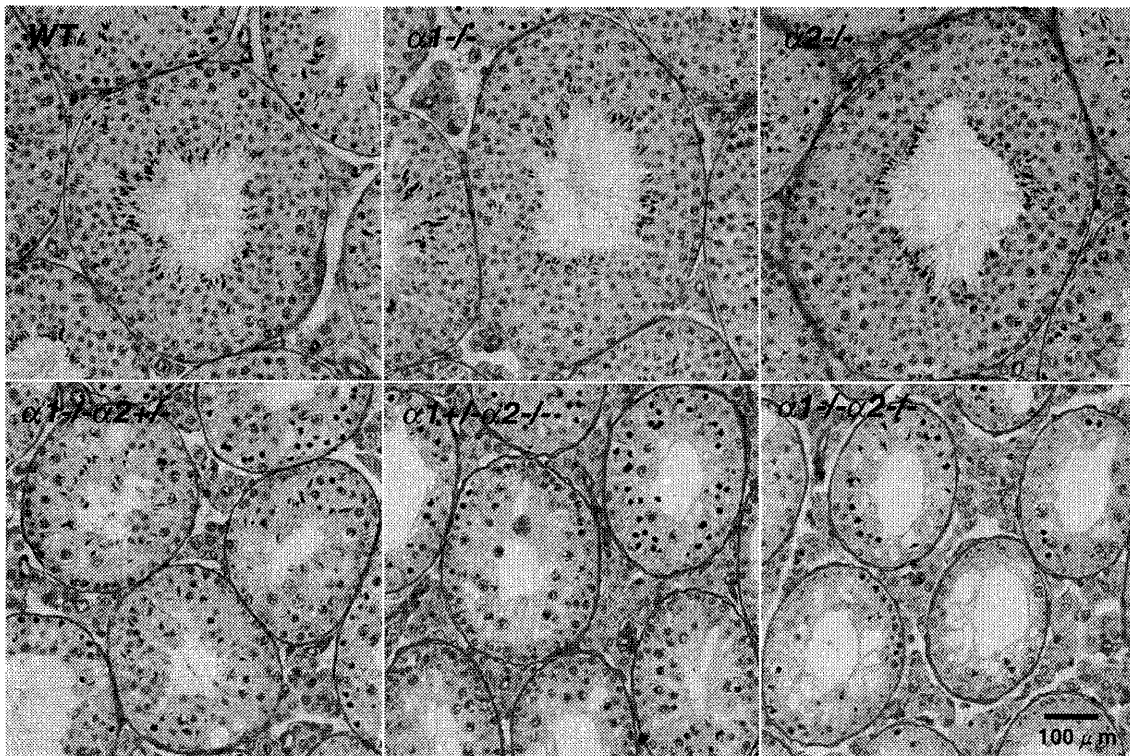


Fig.6 αはLIS1/βとの結合を介して、可溶性画分におけるLIS1/β量を規定している (仮説)

周期的に精子形成が行われており、まず、精原細胞が精母細胞に分化し、減数分裂をへて、精子細胞が生じ、形態形成後、精細管内腔に放出される。α1<sup>-/-</sup>マウス、α2<sup>-/-</sup>マウスの精巣では、何ら異常は認められず、精子形成も正常に行われていた。一方、α1<sup>-/-</sup>α2<sup>-/-</sup>マウスでは、精細管は顕著に細くなっており、精細胞の数も極端に減少していた (Fig.7)。精原細胞の数は変わっていないようだが、精母細胞の減数分裂以降に急激に減少しており、精子はほとんどつくられていない。α1<sup>+/-</sup>α2<sup>-/-</sup>マウスでもダブルノックアウトの時とほぼ同様なフェノタイプが観察され、やはり精子形成はほとんど行われていない。一方、α1<sup>-/-</sup>α2<sup>+/-</sup>マウスでは精子は少ないながらも形成されており、生殖能力もあった。

実際α、特にα1は、精巣に高発現しており、以上より、少なくともマウスにおいてはPAF-AH(I)触媒サブユニットが精子形成において重要な働きをしていることが初めて明らかになった。

一方、交配を重ねていく過程でα1<sup>-/-</sup>α2<sup>-/-</sup>マウスではオスが不妊であることを見いだした (メスは妊娠可能)。その精巣を調べてみると、野生型に比べ極端に小さいことが分かった。そこで、精巣を固定し、組織切片を観察した。哺乳類の精巣は精細管と呼ばれる細い管の集合体から成っている。精細管内では外側から内腔にむかって



**Fig.7** PAF-AH(I) $\alpha$ サブユニットノックアウトマウスの精巣のフェノタイプ  
 生後、5~7ヶ月齢のマウスの精巣をBouin固定し、PAS-hematoxylin染色を行った。

【まとめと考察】

私は本研究において $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  のノックアウトマウスを作成したが、どちらのマウスでも異常は見られなかった。しかし、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  ともに欠損すると脳には異常が見られないものの、精巣に異常が発生することを初めて見出した。一方、LIS1/ $\beta$ ノックアウトマウスがすでに作成されており、ヘテロ欠損マウスでは神経細胞層構造にわずかに異常が見られるものの、見かけ上、正常に成長する。またホモ欠損では胚致死になることが報告されている。以上の知見を考慮すると、PAF-AH(I)では、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  の欠損より LIS1/ $\beta$ 欠損の方が重篤なフェノタイプを呈することが分かる。今回、精巣に見られたような異常が LIS1/ $\beta$ ノックアウトマウスで見られるかどうかは分かっていないが、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  が欠損すると、一部の特殊な細胞（おそらく微小管の発達した細胞）でのみ、微小管系の調節、細胞分裂に異常が生じ、LIS1/ $\beta$ 欠損では全ての細胞において異常が生じるものと考えられる。LIS1/ $\beta$ は中心体に存在するなど細胞内微小管系を直接、制御していると考えられるが、 $\alpha$ （特に $\alpha 2$ ）は恐らく LIS1/ $\beta$ との結合を介して、LIS1/ $\beta$ の量的制御に関わっているものと現在考えている。 $\alpha$ が LIS1/ $\beta$ のタンパク量だけでなく、質的な違いにも関与してくるのか、また $\alpha 1$  と $\alpha 2$  がどのように使い分けられているのか、触媒活性がどのように関与してくるのかということが今後の課題である。