

## 審査の結果の要旨

氏名 古 泉 博 之

細胞内 I 型 PAF acetylhydrolase (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  $\beta$  からなる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ている。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。

「細胞内 I 型 PAF acetylhydrolase の微小管系および精子形成への関与」と題する本論文では、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、両方向よりの解析の結果、PAF-AH(I) が細胞内微小管系を調節に関与していることを見出し、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を明らかにしている。

### 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、目的遺伝子の発現を誘導できるようなテトラサイクリン-Off のシステムを用い、CHO 細胞において本酵素各サブユニットの発現誘導を行っている。

LIS1/ $\beta$  を過剰発現させると多核、多形核を持つ、正常な細胞より大きな細胞が多く出現することを見出された。これらの異常な細胞では、微小管形成、中心体構造が異常なことが明らかにされた。また細胞分裂期には、過剰数の mitotic spindle が形成され、染色体分離異常が生じることが明らかにされた。さらに myc タグをつけた LIS1/ $\beta$  を CHO 細胞に発現させると、一部、中心体に局在することが見出された。以上より、LIS1/ $\beta$  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初めて示唆された。

$\alpha 2$  過剰発現によっても微小管形成、中心体の異常が観察された。一方、 $\alpha 1$  では顕著な異常は見出されなかった。myc タグをつけた  $\alpha$  を CHO 細胞に発現させると、細胞質にしか存在しない。 $\alpha 2$  ノックアウトマウスの脳可溶性画分

をカラムで分画したところ、 $\alpha 1$  と LIS1/ $\beta$  はほとんど結合していないことが見出された。以上より、 $\alpha 2$  過剰発現では中心体で機能できる LIS1/ $\beta$  が細胞質に奪われるために異常が生じるが、 $\alpha 1$  過剰発現では LIS1/ $\beta$  を奪えないため、フェノタイプが弱くなる可能性が示唆された。

#### ノックアウトマウスを用いた個体レベルでの機能解析

本酵素の個体レベルでの解析を行うために本酵素の触媒サブユニット  $\alpha 1$  および  $\alpha 2$  のノックアウトマウスを作製し、解析を行っている。 $\alpha 1$  および  $\alpha 2$  のノックアウトマウス、ダブルノックアウトマウスいずれも正常に出生し、正常に成長した。また、非触媒サブユニットである LIS1/ $\beta$  ノックアウトマウスに見られるような脳構造の異常は見られなかった。

しかし、生化学的解析の結果、 $\alpha 2$  ノックアウトマウスにおいて可溶性画分の LIS1/ $\beta$  発現量が減少しており、分解されやすくなっていることが見出された。 $\alpha$  は可溶性画分のみが存在するのに対し、LIS1/ $\beta$  は可溶性画分のみならず不溶性画分にも存在し、可溶性画分においては本酵素複合体を形成し、不溶性画分では  $\alpha$  とは別の成分、おそらく中心体構成分子などと複合体を形成しているものと思われる。以上より、 $\alpha$  は細胞質において LIS1/ $\beta$  と結合することにより、中心体において機能する LIS1/ $\beta$  を調節している可能性が示唆された。

さらに、 $\alpha 1$  および  $\alpha 2$  それぞれのノックアウトマウスは生殖可能であるが、ダブルノックアウトマウスのオスでは不妊になることが見出された。このマウスでは精巣が野生型に比べ小さくなっており、組織切片の観察を行ったところ、精子形成の異常が観察された。本酵素が精子形成において重要な役割を果たしていることが初めて明らかにされた。

以上を要するに、本研究は、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、両方向よりの解析を行うことにより、PAF-AH(I) が細胞内微小管系を調節に関与していることを見出し、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を明らかにしている。また、 $\alpha$  ( $\alpha 2$ ) は LIS1/ $\beta$  と細胞質において相互作用することにより、この量的制御を行い、中心体において機能する LIS1/ $\beta$  を調節し得る可能性を持つことが示唆されている。以上の知見は、PAF-AH(I)の生理的意義を考える上で、意義深いものであり、博士（薬学）の学位として十分な価値があるものと認められる。