

審査の結果の要旨

氏名 山口 憲 孝

脳のしわができない先天性疾患であるミラー・ディーカー症の原因遺伝子として同定された Lis1 という分子は、細胞質ダイニンや中心体の制御因子として重要な働きをしており、細胞分裂や細胞移動などの現象に深く関与することが明らかになっている。一方、当研究室において、リン脂質性メディエーターの血小板活性化因子 (PAF) を分解する、細胞内 I 型 PAF アセチルヒドロラーゼ PAF-AH(I) という酵素をウシ脳から同定したところ、本酵素は、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ という互いによく似た触媒サブユニットがダイマーを形成し、そこに Lis1 が結合した複合体であることが判明した。すなわち、Lis1 はダイニンや中心体と結合していると同時に、細胞質において PAF-AH(I) という酵素に結合して存在していることが明らかになった。Lis1 はヘテロ欠損でも脳神経系の発達異常を招くこと、細胞に 5 倍程度過剰発現させただけでも中心体の分散化を引き起こすことなどから、細胞内において Lis1 量は厳密に制御される必要があると考えられる。一方、PAF-AH(I) の触媒サブユニットの過剰発現によっても同様のフェノタイプが見られるが、それが Lis1 を介したものかは不明であった。このような背景のもとに、山口憲孝は、本研究において、PAF-AH(I) 触媒サブユニットと Lis1 との結合の意義を解明するために以下の解析を行った。

まず山口憲孝は、PAF-AH(I) 触媒サブユニット ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$) 上における Lis1 結合部位の同定を試みた。 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ は、お互いに 60% 程度の相同性を有しているが、他の蛋白質との相同性は全くなく、また既知のドメイン構造も全く持たない非常にユニークな蛋白質である。*Drosophila* に約 40% の相同性をもつホモログが 1 つだけ存在しているが、*Drosophila* ホモログは Lis1 と結合しないことが知られている。そこで山口憲孝は、マウス $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ と *Drosophila* ホモログとのキメラ触媒サブユニットを作製し、Lis1 との結合を解析することにより Lis1 結合部位の同定を試みた。CHO 細胞に Lis1 と myc タグキメラ蛋白質を共発現し、抗 myc 抗体にて免疫沈降することにより Lis1 が共沈するかどうかによって判定した。

既に、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 共に Lis1 と結合できること、および $\alpha 1/\alpha 1$ ホモダイマーの結晶構造が明らかになっていることから、山口憲孝は、1) $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ で共通の配列であり、2) *Drosophila* ホモログとは異なること、3) 立体構造上表面に現れること、という指標のもとに、5 つの領域についてマウス $\alpha 2$ /*Drosophila* ホモログキメラを作製した。その結果、驚いたことに、相同性の高い N 末端側領域 (15-40 番目のアミノ酸) を *Drosophila* ホモログに置き換えたキメラのみが Lis1 と結合できず、残りのキメラはすべて Lis1 と結合することが判明した。さらに、この領域を 2 つに分けて、Lis1 結合部位を 29-40 番目に絞り込むことができ、続いて、この領域を 1 アミノ酸ずつ *Drosophila* ホモログの配列に入れ替えた結果、驚くべきことに、マウス $\alpha 2$ の 39 番目の Glu ただ一つを *Drosophila* の Asp に変換しただけで Lis1 と全く結合しなくなることが明らかとなった。 $\alpha 1$ でも 39 番目の Glu は保存されており、同様に Asp に入れ替えると Lis1 結合能が完全に消失した。

E39D 変異蛋白質は、野生型と同様にダイマーを形成し PAF-AH 活性も示したことから、この変異体の立体構造は大きく崩れていないことが予想された。

ところで、当研究室では、 $\alpha 2$ を CHO 細胞に過剰発現すると中心体の分散化、多型核化、微小管の形成異常等のフェノタイプが現れることを見出している。しかし、これが Lis1 を介したも

のかどうかは不明であった。山口憲孝は、Lis1 と結合できない $\alpha 2$ 変異体 (E39D) を利用することにより、この疑問を検証した。その結果、 $\alpha 2$ (E39D)の過剰発現細胞では多核化などの異常が全く起こらなかった。このことから、 $\alpha 2$ の過剰発現による細胞の異常には Lis1 との結合が重要であることが明らかになった。

次に、 $\alpha 2$ の過剰発現が Lis1 の細胞内局在に与える影響を検討した。Lis1 の N 末端側を EGFP にて標識した Lis1 を恒常的に発現する CHO 細胞を作製し、それに $\alpha 2$ を一過的に過剰発現させることにより Lis1 の局在を評価した。その結果、間期の細胞において Lis1 は中心体に局在しているが、野生型 (WT) $\alpha 2$ を過剰発現すると中心体への局在が消失することが判明した。一方、Lis1 と結合できない $\alpha 2$ (E39D)を過剰発現しても Lis1 の局在にほとんど変化は認められなかった。また、いずれの場合でも Lis1 の蛋白質レベルに変化はなかった。

さらに、 $\alpha 2$ による Lis1 の局在変化について、セルフリーの系を用いて解析した。まず、マウス脳をホモジナイズし、100,000 x g 遠心後に不溶性画分を得た。中心体構成成分および Lis1 はこの不溶性画分に回収される。この不溶性画分に $\alpha 2$ のリコンビナント蛋白質 (WT、E39D) を加え、インキュベーション後、再び 100,000 x g にて遠心し、可溶性画分と不溶性画分に分離し、各画分における Lis1 を解析した。その結果、 $\alpha 2$ (WT)リコンビナント蛋白質を添加すると Lis1 の可溶性画分への移動が有意に増加するが、 $\alpha 2$ (E39D)リコンビナント蛋白質の添加では、Lis1 の分配にほとんど変化は認められなかった。また、この時に、Lis1 と結合する中心体構成成分の一つである NUDEL の分配を調べると、リコンビナント蛋白質の添加と関係なく、大部分が不溶性画分に存在したままであった。このことから、 $\alpha 2$ リコンビナント蛋白質の添加により、中心体構成成分のうち Lis1 のみが可溶性画分へ移動していることが示唆された。

ところで、マウス脳の可溶性画分を 2 次元電気泳動すると、2 つの $\alpha 2$ のスポットが検出された。これらのスポットのうち、等電点の低い方はアルカリホスファターゼ処理により消失したことから、脳内において $\alpha 2$ の一部はリン酸化されていることが示唆された。実際、培養細胞に $\alpha 2$ を強制発現し、培地に ^{32}P リン酸を加えると、 $\alpha 2$ へのリン酸の取り込みが確認された。次に、 $\alpha 2$ のホスホアミノ酸分析を行った結果、Ser がリン酸化を受けることが判明したので、 $\alpha 2$ に存在する Ser についてそれぞれを Ala に置き換えた変異体を作製した結果、N 末端 Met に続く 2 番目の Ser がリン酸化部位であることが明らかとなった。2 番目の Ser のリン酸化は、既知のキナーゼモチーフとも合致せず非常にユニークである。この Ser は高等動物には保存されているが、*Drosophila* ホモログには保存されていない。

山口憲孝の研究を以下にまとめる。本研究において、PAF-AH(I)触媒サブユニットと Lis1 との結合には触媒サブユニットの 39 番目の Glu が非常に重要であることが初めて明らかになった。Glu39 は、立体構造上では活性中心の背面側に存在することから、Lis1 は活性中心の裏側に結合していると考えられる。さらに、過剰量の触媒サブユニットが細胞質に存在すると、中心体に存在する Lis1 量が減少して中心体の異常を招くことが示唆された。このことから、PAF-AH(I)が中心体の Lis1 量を調節する機能をもつのではないかと考えられた。

また、触媒サブユニットの 2 番目の Ser がリン酸化されることも初めて明らかとなった。立体構造上、Ser2 は Glu39 とは反対側に位置し、PAF-AH の活性中心を形成する hole に近い部位に存在する。従って、触媒サブユニットのリン酸化は、基質の認識や触媒活性の制御に関与する可能性があることがわかった。

以上の結果、山口憲孝には博士 (薬学) の学位を授与できると認められる。