

審査の結果の要旨

氏名 河野 望

生体膜のリン脂質二重構造は細胞の様々な機能の発現や調節に重要な役割を果たしている。感染、炎症等様々な病態時において、活性酸素が産生されることが知られており、この活性酸素は生体膜のリン脂質を酸化し、酸化リン脂質を生成する。酸化リン脂質は生体膜の物理化学的性質、および膜タンパク質の機能に影響を与え、病態の進展に関与することが示唆されている。酸化ストレスにより傷害を受けた生体膜の修復機構において、ホスホリパーゼ A₂ による酸化リン脂質の分解が関与すると考えられているが、その分子実態、および酸化リン脂質分解反応の生体における重要性はいまだ不明である。

細胞内 II 型 PAF アセチルヒドロラーゼ [PAF-AH (II)] は、血小板活性化因子 (PAF) の 2 位のアセチル基を加水分解する酵素として当研究室で精製、クローニングされた。本酵素は N 末端がミリストイル化されており、セリンエステラーゼのコンセンサス配列を有するものの、他の細胞内タンパク質と相同性を示さない、非常にユニークなホスホリパーゼである。当研究室ではこれまでに、PAF-AH (II) は PAF のみならず、リン脂質の 2 位の不飽和脂肪酸が酸化・開裂して生じる、いわゆる酸化リン脂質も効率よく加水分解できること、PAF-AH (II) 過剰発現細胞は酸化ストレスによる細胞死に対して耐性になることを明らかにしており、本酵素が酸化ストレスに対する防御機構として働いていることが示唆されている。しかしながら、本酵素の個体レベルでの機能はほとんど明らかになっていない。

本研究で河野は PAF-AH (II) 欠損マウスを作製し、生理的、病理的条件下における本酵素の機能を解析した。

PAF-AH (II) ノックアウトマウスの作製

マウス PAF-AH (II) の遺伝子は 4 番染色体に位置し、11 のエクソンから構成されている。河野は、活性セリンを含む第 8、9 エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換したターゲティングベクターを作製し、常法により PAF-AH (II) ノックアウトマウスを作製した。作製した PAF-AH (II) 欠損マウスでは、mRNA、タンパク質レベルともに本酵素の発現が消失しており、肝臓、腎臓の PAF-AH 活性も完全に消失していることがわかった。しかしながら、この欠損マウスはメンデルの法則に従って得られ、

正常に発育し、外見上顕著な異常は示さなかった。

PAF-AH (II)欠損マウス胎児繊維芽細胞は酸化ストレスに対して感受性である

河野は、PAF-AH (II)の機能を知る手がかりとして、PAF-AH (II)欠損マウスから胎児繊維芽細胞を単離し、ストレス刺激に対する感受性を細胞の生存率で評価した。その結果、酸化ストレス刺激である *tert-butylhydroperoxide* (*t*-BuOOH)を一過的に処理する条件において、PAF-AH (II)欠損マウスの細胞は野性型マウスの細胞より低濃度の *t*-BuOOH で細胞死が起こることを見出し、酸化ストレスに対して感受性であることを明らかにした。

PAF-AH (II)欠損マウスでは LPS 誘導急性腎不全からの回復が遅延する

PAF-AH (II)は主に上皮細胞に発現しており、上皮細胞の発達した腎臓、肝臓等の臓器で発現が高いことがわかっている。そこで河野は、PAF-AH (II)欠損マウスに対して、肝臓、腎臓の病態モデルを試し、本酵素の病的条件下における機能を探索した。はじめに河野は、リポポリサッカライド (LPS)誘導急性腎不全モデルを行った。野性型マウスに LPS を腹腔投与すると、血中の腎障害マーカーである BUN (Blood Urea Nitrogen)値が投与後 12 時間をピークに一過的に上昇し、投与後 24 時間には通常のレベルまで回復した。一方、PAF-AH (II)欠損マウスでは投与後 12 時間では野性型マウスと同様の BUN 値の上昇が見られたが、その後の回復が有意に遅れ、投与後 24 時間においても、高い BUN 値を示した。そこで河野は、LPS 投与後 24 時間の腎臓の組織像を観察した。その結果、PAF-AH (II)欠損マウスの腎臓では、野性型マウスに比べて、より強い尿細管上皮細胞の傷害が観察された。以上の結果から、PAF-AH (II)欠損マウスでは特に LPS による腎障害からの回復時に異常を来し、腎障害が延長することがわかった。

PAF-AH (II)欠損マウスでは CCl₄ 誘導肝障害からの回復が遅延する

LPS 誘導急性腎不全において、抗酸化剤の前処理により腎不全が緩和されることから、酸化ストレスの関与が示唆されている。そこで河野は、より直接的に脂質過酸化が関与する他の病態モデルとして、四塩化炭素 (CCl₄) による肝障害モデルを行った。野性型マウスに CCl₄を腹腔投与すると、肝障害マーカーである血中 GPT 値が投与後 48 時間をピークとして、顕著に上昇した。その後 GPT は減少し、正常な値まで回復が見られた。PAF-AH (II)欠損マウスでは投与後 48 時間以降の GPT 値が野性型マウスに比べ有意に高く、CCl₄ による肝障害からの回復においても遅延が認めら

れた。

PAF-AH (II)欠損マウスは Fe-NTA による腎障害に対して耐性である

Fe-NTA (ferric nitrilotriacetate) は鉄とそのキレート剤の混合物であり、マウスに投与すると酸化ストレスによる腎障害を引き起こすことが知られている。河野は腎臓の酸化ストレスモデルとして Fe-NTA による腎障害を行った。Fe-NTA をマウスに投与したところ、野性型マウスでは BUN 値の持続的な上昇がみられたが、PAF-AH (II) 欠損マウスでは BUN 値の上昇がほとんど見られなかった。次に河野は、Fe-NTA 投与後 120 時間後の腎組織像を観察した。その結果、野性型マウスでは腎尿細管の顕著な壊死が観察されたが、PAF-AH (II)欠損マウスではそのような障害がまったく起こっておらず、ほぼ正常な腎組織像を示すことがわかった。これらの結果から、PAF-AH (II)欠損マウスは Fe-NTA による腎障害に耐性であるという予想外な現象を見出した。

PAF-AH (II)欠損マウスはグルタチオンの分解過程に異常がある

マウスに投与した三価の Fe-NTA は糸球体濾過を受け、原尿中において二価に還元される。二価の Fe-NTA はヒドロキシラジカルを生成し、尿細管上皮細胞に障害を与え、結果として腎障害を引き起こす。原尿中には尿細管管腔でグルタチオンが分解されることにより生成する cysteinylglycin や cysteine が存在しており、これらの物質が三価の Fe-NTA を二価に還元する。すなわち、腎尿細管における活発なグルタチオン代謝が Fe-NTA による腎障害に重要である。そこで河野は、PAF-AH (II)欠損マウスにおけるグルタチオン代謝を調べたところ、野性型マウスに比べてグルタチオンの分解が遅くなっており、これが Fe-NTA の腎障害に耐性となる原因であると考えられた。

以上のように河野は、PAF-AH (II)欠損マウスが酸化ストレスによる組織障害からの回復に異常を来すことを見出し、本酵素が酸化ストレスに対する防御機構として機能していることを個体レベルで初めて明らかにした。また富山大医学薬学研究部との共同研究により、神経特異的 PAF-AH (II)過剰発現マウスは脳虚血ストレスに耐性になることを明らかにしている。以上の結果より、PAF-AH (II)はおそらく酸化ストレスにより生じた酸化リン脂質を加水分解することで、生体膜の機能を回復させていると予想される。また河野は、Fe-NTA 投与による腎臓の病態モデルの解析から、PAF-AH (II)が腎のグルタチオン代謝に関与するという本酵素の新しい生理機能を見

出した。

本研究は、個体レベルで PAF-AH (II)の機能を生理的、病理的側面から解析することにより、PAF-AH (II)が酸化ストレスに対して防御的に機能することを示し、また PAF-AH (II)がグルタチオン代謝に関与するといった非常に新しい概念を提供したことから、薬学（博士）に充分値するものと判断した。