

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

新規マウス細胞質型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の同定と機能解析

指導教員 清水 孝雄 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成16年4月 入学

医学博士過程 分子細胞生物学専攻

氏名 大戸 貴代

ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) はグリセロリン脂質の *sn*-2 位エステル結合を加水分解する酵素である。細胞質型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) はほ乳類ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の一種であり、本研究を開始した 2002 年当時には cPLA<sub>2</sub>α、β、γ の 3 遺伝子が報告されていた。cPLA<sub>2</sub>α はアラキドン酸含有リン脂質に基質特異性を持ち、アラキドン酸代謝産物であるプロスタグランジン・ロイコトリエンの生体内での産生量を制御する酵素である。cPLA<sub>2</sub>β、γ の 2 遺伝子は 1990 年代半ばに EST データベース検索によって見いだされた分子種である。これら既知の cPLA<sub>2</sub> 遺伝子間で保存性が認められたエキソンの核酸配列をゲノムデータベース上で相同性検索することによって、新規の 3 遺伝子座が推定された。推定された配列を参考とし、cDNA クローニングを行い、マウス臓器由来 cDNA より 3 遺伝子すべての cDNA 配列を同定することに成功した。これらの新規 cPLA<sub>2</sub> 遺伝子をそれぞれ cPLA<sub>2</sub>δ、cPLA<sub>2</sub>ε、cPLA<sub>2</sub>ζ と命名した。いずれの遺伝子もその推定アミノ酸配列より、cPLA<sub>2</sub> の基本構造である C2 ドメイン及び触媒ドメインの構造が推測された。またその触媒ドメイン中には、既知分子での解析により活性中心と考えられているセリン/アスパラギン酸残基が保存されていた。また、cPLA<sub>2</sub>δ は妊娠後期の胎盤、cPLA<sub>2</sub>ε は甲状腺・骨格筋・脳、cPLA<sub>2</sub>ζ は甲状腺での明確な mRNA の発現をノーザンブロット解析によって明らかにした。特定の臓器でのみ発現が認められたことは、cPLA<sub>2</sub>α のコピキタスな発現とは対照的であり、非常に興味深いものである。続いて、cPLA<sub>2</sub>δ、ε、ζ の酵素活性を測定するために、HEK293 細胞を用いた一過性発現系を構築

した。この粗抽出液を用いて、PLA<sub>2</sub> 活性を測定した結果、いずれの分子も cPLA<sub>2</sub>α と同様に Ca<sup>2+</sup> 要求性の PLA<sub>2</sub> 活性を示した。特に cPLA<sub>2</sub>ζ に関してはホスファチジルコリン (PC) よりもホスファチジリエタノールアミン (PE) に対して強い PLA<sub>2</sub> 活性を示すことが分かった。さらに生細胞での新規 cPLA<sub>2</sub> 遺伝子群の局在変化を観察したところ、GFP 融合 cPLA<sub>2</sub>δ はイオノマイシン刺激により細胞質から核膜周辺への局在変化を示した。また、定常状態において、GFP 融合 cPLA<sub>2</sub>ε はその一部がリソソームの局在しており、GFP 融合 cPLA<sub>2</sub>ζ は細胞質に存在していた。以上のことより、cPLA<sub>2</sub>δ、ε、ζ は in vitro において実際に PLA<sub>2</sub> 活性を示すことが確認され、ノーザンブロット解析より発現が認められた臓器においてこれらの酵素が機能している可能性が示唆された。

続いて、ノーザンブロット解析で明らかにしたマウス臓器における mRNA 発現分布に加えて、16 種のマウス臓器・細胞群に関して定量的 PCR による発現解析を行い、新たに、cPLA<sub>2</sub>ζ が精巣上体の頭部領域に強く発現していることを見いだした。以後、精巣上体における cPLA<sub>2</sub>ζ の機能解析を中心に研究を進めた。精巣上体頭部領域での cPLA<sub>2</sub>ζ 遺伝子の mRNA 発現は精巣摘出手術を行うことで、定常状態の 20% 程度に低下し、この発現低下はジハイドロテストステロン (5α-DHT) の連日投与により回復することを明らかにした。ウサギ抗マウス cPLA<sub>2</sub>ζ ポリクローナル抗体による検出の結果、cPLA<sub>2</sub>ζ と考えられるシグナルが mRNA と同様の増減を示した。また、精巣摘出後の精巣上体組織抽出液の PLA<sub>2</sub> 活性は、cPLA<sub>2</sub>ζ の発現変動と同様のパターンでの増減を示した。これらの結果より、cPLA<sub>2</sub>ζ は雄性ホルモンにより直接的もしくは間接的に発現制御されていることが強く示唆された。さらに、精巣上体でのマウス cPLA<sub>2</sub>ζ は非常に高い分泌能をもつ上皮細胞に発現していることを組織免疫染色により明らかにした。加えて、生化学的解析の一端として内在的に発現している cPLA<sub>2</sub>ζ タンパク質の性質を推定すると、強固に脂質二重膜に結合している可能性が考えられた。精巣上体は精巣をでた精子の最終的な成熟過程を担っている器官であることから、精巣上体において cPLA<sub>2</sub>ζ が精子成熟に関与している可能性が考えられる。