

審査の結果の要旨

氏名 大 戸 貴 代

本研究は、新規細胞質型ホスホリパーゼ A₂ (cPLA₂) の探索・同定と機能解析を目的とした研究であり、下記の結果を得ている。

1. 既知 cPLA₂ 分子間で保存性が認められるエクソン核酸配列をゲノムデータベース上での探索に用いることで、3つの cPLA₂ 遺伝子を推定した。推定された3つの新規分子をマウス臓器由来cDNAよりRT-PCRと5'、3'-RACEによってクローニングし、それぞれ cPLA₂δ、cPLA₂ε、cPLA₂ζと命名した。この新規 cPLA₂ 遺伝子群は、マウス第2染色体(2E5)上に0.3 MbにわたってcPLA₂βとともに遺伝子クラスターを形成して存在しており、いずれの遺伝子もその推定アミノ酸配列には、cPLA₂の基本構造であるC2ドメイン及び活性に必須であることが知られているセリン/アスパラギン酸残基を含む触媒ドメインが認められた。
2. 新規 cPLA₂ 遺伝子 (cPLA₂δ、cPLA₂ε、cPLA₂ζ) のマウス臓器における mRNA 発現分布を northern blot によって解析した。その結果、cPLA₂δは妊娠後期の胎盤での発現が認められた。cPLA₂εは甲状腺・骨格筋・精巣での強い発現と、脳、胃での発現が、cPLA₂ζは甲状腺、胃および前立腺、大腸での発現が認められた。
3. ヒト胎児腎臓細胞 (HEK293 細胞) における一過性発現系を構築し、その細胞破砕液を用いて新規 cPLA₂ 遺伝子 (cPLA₂δ、cPLA₂ε、cPLA₂ζ) の酵素活性を測定した。いずれの分子も Ca²⁺ 要求性の PLA₂ 活性を示し、また cPLA₂ζはホスファチジルコリン (PC) よりもホスファチジルエタノールアミン (PE) に対して強い PLA₂ 活性を示した。
4. チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-K1 細胞) に一過性発現させた GFP 融合 cPLA₂δは、イオノマイシン刺激によって細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させると cPLA₂αと同様に細胞質から核膜周辺への局在変化を示した。また、定常状態で GFP 融合 cPLA₂εは一部がリソソームに、GFP 融合 cPLA₂ζは細胞質に存在していた。しかし、GFP 融合 cPLA₂ε、GFP 融合 cPLA₂ζはいずれもイオノマイシン刺激による局在変化は認められなかった。
5. 定量的 PCR により、2. で未測定であった臓器を中心に mRNA 発現分布解析を行ったところ、新たに cPLA₂ζが精巣上体の頭部領域に強く発現していることがわかった。
6. cPLA₂ζの精巣上体頭部領域における発現は精巣摘出手術を行うことで定常状態の約 20% 程度に低下し、精巣摘出手術によるこの mRNA 発現の低下は、雄性ホルモンであるジヒドロテストステロン (5α-DHT) の連日投与によって、偽手術群と同程度の発現で維持されていた。
7. 精巣摘出手術を行ったマウス個体での精巣上体頭部領域における cPLA₂ζタンパク

8. cPLA₂ζ の精巣上体での発現細胞を特定するため、ウサギ抗マウス cPLA₂ζ ポリクローナル抗体によるマウス精巣上体での免疫染色を行った。その結果、精巣上体の Initial Segment 領域、頭部、体部の上皮細胞でシグナルが認められた。

以上、本論文はゲノムデータベース上での相同性探索によって推定したマウス cPLA₂δ、cPLA₂ε、cPLA₂ζ の同定と機能解析を進め、これらの新規 cPLA₂ 遺伝子群が機能的に発現している可能性を示した。特に cPLA₂ζ は精巣上体において、雄性ホルモンによる直接的もしくは間接的な発現制御を受けていると考えられ、今後のさらなる機能解析が雄性生殖系における脂質代謝メカニズムとその生理的意義の解明に貢献するものと考えられる。cPLA₂δ、cPLA₂ε に関しても、同様に発現臓器／発現細胞での解析を進めることで脂質代謝の新たな機能が解明されることが期待される。したがって、本研究は学位の授与に値するものと考えられる。