

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790078
 研究課題名（和文） 細胞内型ホスホリパーゼ A1 ファミリーの精巣での役割の解明
 研究課題名（英文） functional analyses of the intracellular phospholipase A1 family in testes
 研究代表者
 有光 なぎさ (Arimitsu Nagisa)
 東京薬科大学・生命科学部・助教
 研究者番号：40408688

研究成果の概要(和文):グリセロリン脂質の sn-1 位のエステル結合の加水分解(phospholipase A₁ 活性: PLA₁ 活性)を触媒する PA-PLA₁ (iPLA₁αと名称変更)ファミリー (α, βおよびγ) の精巣での機能を解明するために欠損マウスの作製を行った。現時点で iPLA₁α 以外の iPLA₁β 及び iPLA₁γ 欠損マウスが作製できた。iPLA₁β 及び iPLA₁γ 欠損マウスは生存し、見かけ上目立った異常はなかった。交配実験より iPLA₁β 欠損オスは、不妊傾向であることを見いだした。

研究成果の概要 (英文): Phospholipases of the A₁ (PLA₁) cleave the sn-1 fatty acyl group from diacyl glycerophospholipids and produce a free fatty acid and an sn-2-lysophospholipid. The intracellular phospholipase A₁ (named iPLA₁ from 2009) family consists of three members, α, β, γ. To reveal the physiological functions of iPLA₁ family member, iPLA₁-β, -γ knockout mice (KO) were generated by gene targeting. iPLA₁-β and -γ KO mice were born and were apparently indistinguishable from wild-type mice. However, male iPLA₁-β KO mice were subfertile.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

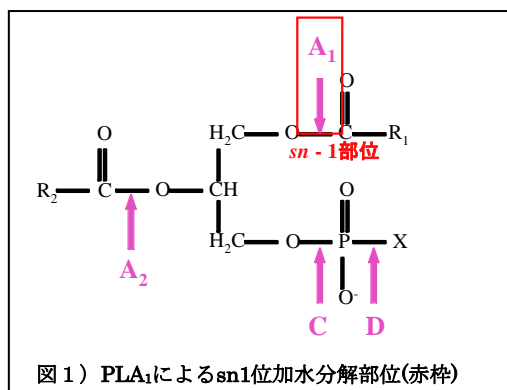
科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：発生生物学、遺伝子欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

グリセリン脂質の sn-1 位のエステル結合の加水分解 (図1、phospholipase A₁ 活性: PLA₁ 活性) に関与する iPLA₁-α はウシ精巣で高く PLA₁ 活性を持つものとして初めて精製、クローニングされた (Higgs et al. (1994) *PNAS* 91:9574)。

PLA₁ の構造的な特徴として中央部分にリパーゼコンセンサス配列 (Gly-x-Ser-X-Gly) と、C 末端側に機能未知 DDHD ドメインを有する。



この構造を持つ遺伝子はヒト、酵母、線虫、ショウジョウバエに至る種々の生物間で保存されている。また脳、精巣に特に高い PLA₁ の発現、活性があり、PLA₁ 活性はウシ未成熟精巣に比べ成熟精巣において活性が強くなることや、精細胞に局在するカゼインキナーゼと相互作用し、リン酸化されることなどが見出されてきた。このように PLA₁ 活性をもつ酵素が高く保存され、精子形成に重要な機能をもつと思われるが、個体レベルでの生理的条件下での機能解析はない。

2. 研究の目的

応募者のグループは、これまで小胞輸送に関わる因子を解析する過程において、小胞輸送に関わる事が示唆されているタンパク質 iPLA₁-β (小胞体の exit site に局在)と

iPLA₁-γ (ゴルジ体に局在)と iPLA₁-α (サイトゾル)が構造類似性によりファミリーを形成することを見出した(Tani et al. (1999) *JBC* 274, 20505, Nakajima et al. (2002) *JBC* 277, 11329)。細胞小胞輸送において小胞体上で合成されたタンパク質はコートタンパク質で覆われた輸送小胞内に選別され、細胞内を移動し、目的オルガネラのターゲット膜で小胞が脱コート化して膜融合することでオルガネラ内に輸送物が到達する。リン脂質は小胞の構成因子でもあるため、小胞形成から目的膜での融合過程にリン脂質の構造及び構成的変化が重要だと考えられる。精子形成時においても精祖細胞から成熟する過程で、リン脂質の関与する変化として細胞内器膜の構造的変化、構成的な変化が盛んに起きている(Jones et al. (1989) *J Androl* 10, 346) また、実際、性成熟過程に精巣内及び精漿内での PLA₁ 活性の増強が見られること(Higgs et al. (1998) *JBC* 273:5468)を考え合わせて、これらファミリータンパク質の精巣での機能について遺伝子欠損マウスを用いて解析する事にした。

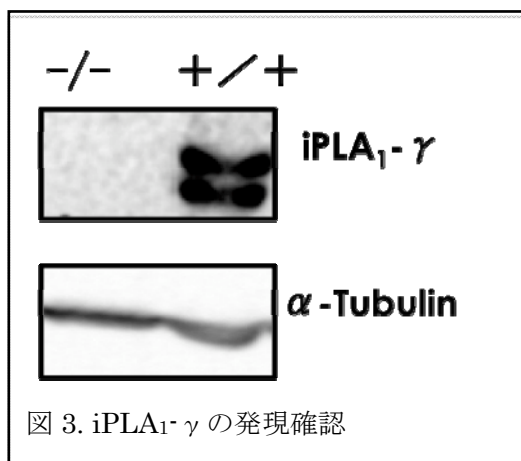
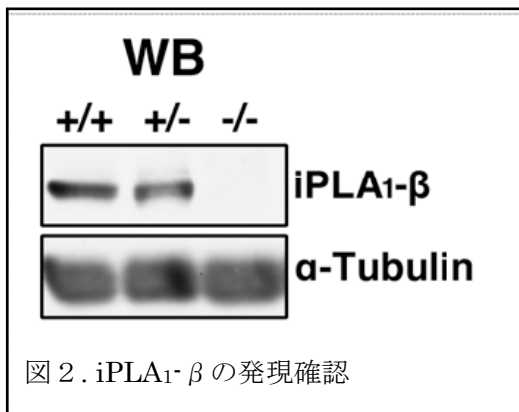
3. 研究の方法

iPLA₁ファミリーは中央部分にリパーゼコンセンサス配列を有する。この機能ドメインのリパーゼコンセンサス配列を欠損する、もしくは上流のエクソンを欠損させ、以降のエクソンを発現させないようにするベクターを用いて遺伝子欠損マウスの作製 (胎生致死になった場合でも解析できるように、Cre-loxPシステムを用い、時期、部位特異的欠損を行った。)を行った。全身発現性 Cre トランスジェニックマウスと交配し、全身で完全欠損した場合に胎生致死にならず生存してくるか否かを調べた。さらに、野生型マウスと交配させ、交配日翌朝のプラグ確認後、誕生してくる産仔数に野生型に比べて変化がみら

れるか調べた。この時、欠損型、同腹の野生型雄マウス精子を用いて試験管内受精実験により受精率の異常があるか否かを調べた。

4. 研究成果

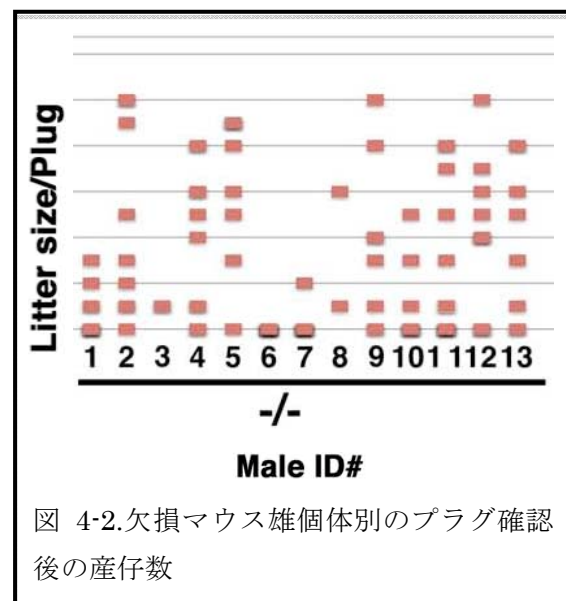
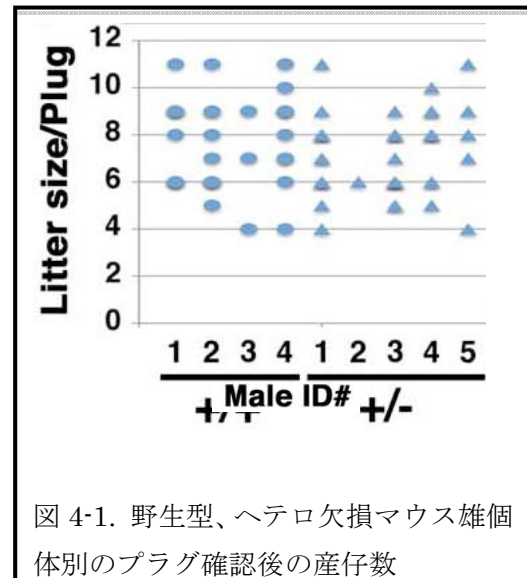
iPLA₁-βおよび iPLA₁-γについては、遺伝子欠損マウスが得られた(図2、3:ウェスタンブロッティング法によるタンパク質発現確認)。これらのマウスは野生型と同様に誕生、生育した。iPLA₁-αについては、ヘテロES細胞までは樹立できたが、ジャームライントランスミッターが得られなかったため、ベクター、ES細胞系統を変えて再度スクリーニングしている。



また、精巣での機能変化を調べるために、欠損マウスとの交配によって産仔数の変化があるかについて調べた。雄 iPLA₁-βについて

は、野生型メスマウスとの交配で得られる産仔数が得られない、もしくは少ない傾向が見られた(図4-1, 4-2)。

また、欠損雄マウス精子を用いて、試験管内



体外受精実験を行った結果、受精率が低い傾向であった。iPLA₁-γ欠損マウスについては、欠損マウス同士、野生型との交配でもほとんど差がない程度の仔が誕生している。これらの事から、iPLA₁-βが精巣において、重要な機能を持つ事を示すと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

投稿中

〔学会発表〕(計2件)

- ①. PA-PLA1 / iPLA1 α の精子形成過程における発現時期の同定 馬場有光なぎさ、多賀谷光男、谷佳津子
2009.10月22日、神戸ポートアイランド、第82回 日本生化学会大会
- ②. 細胞内型ホスホリパーゼA₁ファミリータンパク質の機能解析
佐藤精一、木樽猛、有光なぎさ、森川麗、青木淳賢、新井洋由、多賀谷光男、谷佳津子 2008.12月11日 神戸ポートアイランド、第81回 日本生化学会大会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有光 なぎさ (Arimitsu Nagisa)
東京薬科大学・生命科学部・助教
研究者番号：40408688

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：