

哺乳動物細胞内に存在するPAFアセチル  
ヒドロラーゼの構造と機能に関する研究

服部光治

博士學位論文

哺乳動物細胞内に存在する PAF アセチル  
ヒドロラーゼの構造と機能に関する研究

1996年

服部 光治

## 目 次

略号	1
第1章 序論	2
図表	6
第2章 PAF アセチルヒドロラーゼ lb 各サブユニットの cDNA クローニング	
第1節 序	8
第2節 各サブユニットの部分アミノ酸配列の決定	9
第3節 各サブユニットの cDNA クローニング	11
図表	17
第3章 PAF アセチルヒドロラーゼ lb 各サブユニットの 発現及びリコンビナント蛋白質の作製	
第1節 序	32
第2節 各サブユニットの大腸菌及び動物細胞における発現	33
第3節 リコンビナント $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットの精製	36
図表	41
第4章 PAF アセチルヒドロラーゼ lb の触媒サブユニットに おける活性セリン残基の同定	
第1節 序	47
第2節 [ $^3\text{H}$ ]-DFP を用いた活性セリン残基の同定	48
第3節 セリン残基置換による活性セリン残基の確認	51
図表	54
第5章 PAF アセチルヒドロラーゼ lb 各サブユニットに 対する抗体の作製と、サブユニット構造に関する解析	
第1節 序	60
第2節 各サブユニットに対する抗体の作製	61
第3節 DFP 取り込みに関する検討	64
第4節 サブユニット構造に関する検討	66
図表	70

第6章	PAF アセチルヒドロラーゼの $\alpha$ サブユニットは Miller-Dieker 症候群の原因遺伝子産物である	
第1節	序	83
第2節	Miller-Dieker 症候群の原因遺伝子 LIS1 と PAF アセチルヒドロラーゼ lb $\alpha$ サブユニット	84
第3節	PAF アセチルヒドロラーゼ lb $\alpha$ サブユニット の構造に関する考察	87
	図表	90
第7章	総括	97
	図表	100
	参考文献	103
	謝辞	110

本論文で用いた略号、記号は以下のとおりである。下記以外のものは IUPAC-IUB の生化学命名委員会勧告に従った。

PAF	platelet-activating factor
AH	acetylhydrolase
Tris	tris(hydroxymethyl) aminomethane
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate
DFP	diisopropyl fluorophosphate
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
HPLC	high performance liquid chromatography
FPLC	fast protein liquid chromatography
DEAE	diethyl aminoethyl
Ig	immunoglobulin
PC	phosphatidyl choline
DTT	dithiothreitol
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
FCS	fetal calf serum
PBS	phosphate buffered saline
TTBS	Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20
IPTG	isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactoside
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
PCR	polymerase chain reaction
BS <sup>3</sup>	bis(sulfosuccinimidyl) suberate
HRP	horseradish peroxidase
CBB	Coomasie brilliant blue

# 第 1 章

## 序 論

血小板活性化因子(Platelet-activating factor、PAF)は、リン脂質骨格をもつメディエーターであり、その化学構造は 1-*O*-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine である(図 1-1) (1, 2)。細胞膜を構成するリン脂質との最大の違いは、その 2 位に長鎖脂肪酸鎖ではなくアセチル基をもつことであり、このアセチル基は PAF の生物活性に不可欠である。PAF は、その名が示すとおり、強力な血小板活性化能をもつ物質として最初同定された(3)が、その生物活性は多種多様にわたっており、好中球やマクロファージの活性化、血管透過性亢進、気道過敏性増大などがよく知られている(reviewed in Refs. 4-6)。一方、最近になって PAF が脳神経系においても作用していることを示唆する事例が多数報告されはじめている。例えば PAF (7) 及び PAF 受容体(8)は正常ラット脳にも存在しており、細胞内カルシウム濃度の制御に関与しているとされている。また、PAF が培養神経細胞の分化を促すこと(9-11)、脳形態形成時に PAF の産性が増大していること(12)、初代培養したラット小脳顆粒細胞が PAF を産生し、それがカルシウムイオノフォア処理によって増大すること(13)、ヒト脳初代培養細胞をアセチルコリンで刺激すると PAF を産生すること(14)、PAF が神経突起先端部の成長円錐(Growth cone)の退縮(Collapse)を促すこと(15)などの報告は、PAF が脳神経系の構築に重要な役割を演じていることを強く示唆している。また、海馬における長期増強(LTP)形成時に、後シナプスから放出されて前シナプスの性質変化を促す、いわゆる逆行性メッセンジャーが PAF であるとする報告(16)は PAF が記憶の形成など脳の高次機能に必須である可能性も示唆している。その他にも、PAF

が肝臓、腎臓、心臓、眼組織でも生理的機能に關与することを示唆する報告が多数なされており、PAF は哺乳動物にとって極めて重要なメディエーターであることは疑いない。

PAF はリン脂質であるので、その合成と分解は一連の酵素群によって行われている(図 1-2)。PAF の合成には大きく分けて *de novo* 経路と *salvage* 経路の二つがあることが知られており、通常は *salvage* 経路によって合成されていると考えられることが多い(reviewed in Refs. 17, 18)。salvage 経路とは、細胞膜に存在する 1-*O*-アルキル型リン脂質の 2 位がホスホリパーゼ A<sub>2</sub> によって加水分解されたあと、アセチルトランスフェラーゼによってアセチル基が付加されて PAF を生じる経路である。アセチルトランスフェラーゼは PAF の合成及び生理作用を考える上で重要な酵素であるが、膜に強く結合している酵素であるうえに、非常に失活しやすいなどの理由で研究はあまり進んでおらず、生化学的にはごく予備的な報告が散見されるにすぎない(19-21)。一方、PAF の分解については、PAF 特異的な一種のホスホリパーゼ A<sub>2</sub> である、PAF アセチルヒドロラーゼがそのすべてを担っている(図 1-2)。ホスホリパーゼ C や D の PAF 分解における寄与は、今まで調べられた限りでは、全て無視できる範囲であるとされている(17, 18)。PAF のアセチル基を加水分解する酵素の存在は、PAF の化学構造決定の 2 年後、1981 年に早くも報告され(22)、カルシウムイオン非依存性であることから、既知のホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 群酵素ではないことが示唆されていた。その後この酵素は PAF アセチルヒドロラーゼと名付けられ(23)、血中に存在する「細胞外タイプ」と細胞質に存在する「細胞内タイプ」が存在することが明らかとなった(24, 25)。この両者は酵素学的性質が大きく異なり、全く別個の酵素である。このうち、「細胞外タイプ」の酵素については、University of Utah の Prescott らのグループによって精製が行われ(26, 27)、その性質が詳細に調べられた(28-32)。

この酵素はようやく昨年(1995年)になって遺伝子クローニングが報告された(33)。細胞外 PAF アセチルヒドロラーゼのリコンビナント蛋白質は PAF が増悪化に深く関与すると考えられている Septic shock などの病態に対する治療薬として期待されている(34)。これに対して、「細胞内タイプ」の PAF アセチルヒドロラーゼに関しては、発見後 10 年間ほとんど研究が進展することがなかった。その原因として、1980 年代には、PAF は血中や細胞外液中でのみ作用すると考えられることがほとんどだったので、細胞内の PAF アセチルヒドロラーゼに注目する理由が希薄であったことや、細胞内タイプの PAF アセチルヒドロラーゼは失活が早いので精製が困難であったことが挙げられる。しかし、多くの場合、PAF は細胞外に放出されるよりも細胞内や細胞膜上にとどまることが発見され(35-39)、PAF が当初考えられていた以上に多種多様な生物作用をもつことが明らかになるにつれて、PAF 量の調節機構をより詳しく知ることが重要になっており、「細胞内タイプ」の PAF アセチルヒドロラーゼの実態及びその活性調節機構を把握することが極めて重要になってきている。

このような点を踏まえ、私は本学修士課程において、哺乳動物細胞内には複数の PAF アセチルヒドロラーゼアイソフォームが存在することを初めて見出し、そのうち脳において最も主要な活性を担うアイソフォーム 1b の完全精製に成功した(40)。これは「細胞内タイプ」の PAF アセチルヒドロラーゼが精製された世界で最初の例である。精製した PAF アセチルヒドロラーゼ 1b は、SDS-PAGE 上での分子量が 45kDa、30kDa、29kDa である三つのサブユニット(本論文ではそれぞれ  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  サブユニットと呼ぶ)からなるヘテロトリマー構造をしている(図 2-1)(40、41)。このうち、 $\alpha$  サブユニットだけを分離しても *in vitro* での酵素活性には影響がないことから、 $\alpha$  サブユニットは触媒活性以外の機能を有していると考えた(42)。また、各サブユニットの

部分アミノ酸配列を決定した結果、これらのサブユニットはいずれも新規の蛋白質であることも明らかとなった。

本研究では、細胞内 PAF アセチルヒドロラーゼ 1b の生理的機能の解明を目指し、まずその構造を明らかにするために各サブユニットの cDNA クローニングを行った(42-44)。さらに各サブユニットの発現実験を行い、 $\beta$  及び  $\gamma$  サブユニットが酵素活性をもつことを見出した。また、各サブユニットの生理的機能を探るツールとしてモノクローナル抗体及びポリクローナル抗血清の樹立も行った。また、研究の過程で、本酵素の触媒サブユニットである  $\beta$  及び  $\gamma$  サブユニットが、非常にユニークな構造を持つセリンエステラーゼである可能性が示唆されたので、活性セリン残基の同定も行った(43)。この実験はまた、将来的に本酵素のドミナントネガティブを作製するためにも必要であると考えた。また特筆すべきこととして、 $\alpha$  サブユニットは、ヒトの先天性脳形態形成不全の一種である Miller-Dieker 症候群(45-48)の原因遺伝子産物(49-52)であることを見出した(42)。このことは、 $\alpha$  サブユニットが本酵素において何らかの重要な機能を持っていることを示すとともに、PAF が脳形態形成における情報伝達にも関与していることを強く示唆しており、その後、他グループの研究にも多くの影響を与えている。また、本論文の最後に、予備的な知見とともに、PAF 及び PAF アセチルヒドロラーゼがどのようにして神経細胞移動に関与し得るかについて考察を加えた。

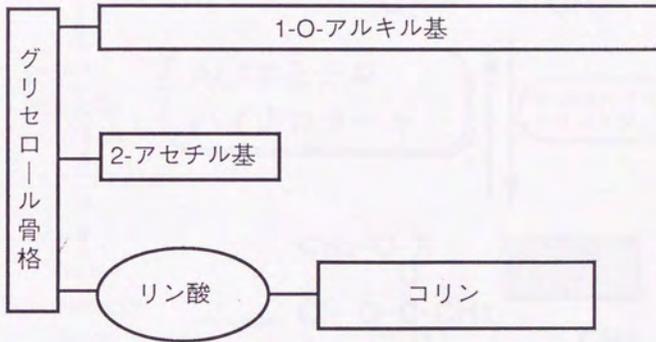
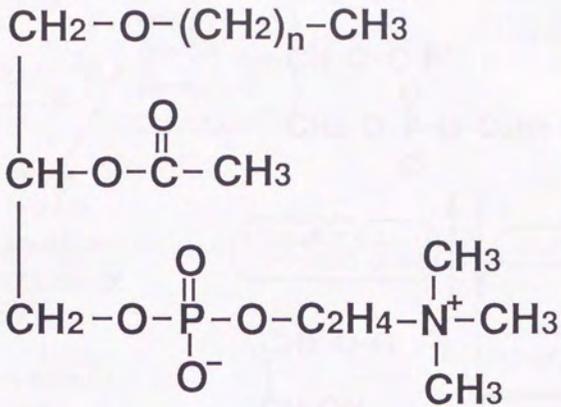


図1-1 血小板活性化因子 (PAF) の化学構造 (上) と、その模式図 (下)。通常、1-O-アルキル基のnは15か17である。



## 第 2 章

### PAF アセチルヒドロラーゼ Ib 各サブユニットの cDNA クローニング

#### 第 1 節 序

私が修士課程においてウシ脳細胞質可溶性画分から精製に成功した PAF アセチルヒドロラーゼ Ib は、SDS-PAGE 上での分子量が 45kDa ( $\alpha$  サブユニット)、30kDa ( $\beta$  サブユニット)、29kDa ( $\gamma$  サブユニット) である三つのサブユニット一つずつからなるヘテロトリマー構造をしている (図 2-1) (40)。いまだかつてサブユニット構造をもつホスホリパーゼ群酵素は他に知られておらず、この点だけとっても本酵素は非常にユニークである。また、このように複雑な構造をもつことから本酵素は生体内で何らかの活性調節を受けている可能性が高いと考えられる。私は既に修士課程において、 $\alpha$  サブユニットを他の二つのサブユニットから分離しても *in vitro* での酵素活性には影響がないことから、 $\alpha$  サブユニットは直接の触媒活性以外の機能をもつであろうこと (41、42)、及び触媒活性は  $\beta$  及び  $\gamma$  サブユニット (若しくはそのどちらか) が担っていること (40、53) を見出してきた。しかし今後本酵素の構造や活性調節機構、さらには生理的機能を解明していくためにも、各サブユニットの一次構造を知ることが不可欠である。そこで私は、精製酵素をもとに部分アミノ酸配列を決定し、各サブユニットの cDNA クローニングを行った。本章ではその結果について記すとともに、得られた一次構造について考察を加えた。

## 第2節 各サブユニットの部分アミノ酸配列の決定

### 第2節-1 材料

PAF アセチルヒドロラーゼ 1b は4匹分のウシ脳(約1,200g)から精製した(方法後述)。ウシ脳は精製開始当日に屠殺されたものを東京芝浦臓器より購入し、氷中で輸送した。ブチルトヨパールは東ソーより、DEAE セファロースはファルマシアより、ヒドロキシアパタイト、硫酸化セルロファインは生化学工業より購入した。エンドプロテイナーゼ Lys-C はベーリンガーマンハイムより購入した。Vydac の HPLC 用カラムはセンシュー化学より購入した。その他の試薬類は和光純薬の特級レベルのものを使用した。

### 第2節-2 方法

#### (A) PAF アセチルヒドロラーゼ 1b の精製(40、42、53)

操作はすべて氷上もしくは 4°Cで行った。ウシ脳から間脳、小脳、クモ膜血管、及びゴミ等をピンセットを用いて除き、SET バッファー(10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA、250mM sucrose)中で洗浄した後、重さにして2倍量の同バッファーを加え、Waring blender を用いてホモジナイズ(2分×5回)した。続いて10,000gで15分し上清を回収し、さらに100,000gで1時間遠心することにより、可溶性画分を得た。これを出発材料とし、硫酸アンモニウム沈殿(45-60%ppt を回収)、ブチルトヨパール、DEAE セファロース、ヒドロキシアパタイト各カラムクロマトグラフィによって PAF アセチルヒドロラーゼ 1b 粗精製画分を得た(40、53)。これを硫酸化セルロファインカラムクロマトグラフィによって分画すると、 $\alpha$ サブユニットだけがカラムに吸着し、 $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットはヘテロダイマーを形成したままカラムを素通りする(42、53)。 $\alpha$ サブユニットは NaCl によって溶出され、ほぼ純粋な $\alpha$

サブユニット画分となる(図2-1、lane 3)。一方、素通りした $\beta/\gamma$ サブユニットヘテロダイマー画分は、透析後もう一度ハイドロキシアパタイトカラムによって分画することにより、完全に精製した(図2-1、lane 2)(53)。

(B) 各サブユニット蛋白の還元アルキル化及びHPLCによる精製

(A)で得た精製 $\alpha$ サブユニット(約200 $\mu$ g、1.5ml)に、最終濃度10mg/mlのDTTを加え37°Cで2時間インキュベーションすることにより還元し、さらに最終濃度0.6%の4-vinyl pyridineを加え室温で2時間反応させピリジルエチル化した。この反応液をHPLCシステム(カラムはVydac 304-1251(C4)、4.6mm $\times$ 250mm)によって分画した(図2-2、A)。

HPLCの運転設定は以下のとおりである。

Buffer A:0.1% TFA-H<sub>2</sub>O、Buffer B:0.1% TFA-acetonitrile

流速:1.0 ml/min

溶出:5% acetonitrileで10分wash後、5 $\rightarrow$ 50% acetonitrile  
の直線濃度勾配(1%/分で上昇)

検出:214 nm

$\beta/\gamma$ サブユニットヘテロダイマー画分(200 $\mu$ g、3ml)についても、全く同様に行い、 $\beta$ サブユニットと $\gamma$ サブユニットを分離した(図2-2、B)。

(C) エンドプロテイナーゼ Lys-Cによる限定分解

HPLCで精製した各サブユニット画分それぞれをLys-C Digestion buffer(25mM Tris-HCl(pH8.5)、100mM Urea、5% acetonitrile)に対して透析した。回収後、5 $\mu$ gのエンドプロテイナーゼLys-Cを加え、37°Cで18時間反応させた。反応液をHPLCによって分離し、214nmの吸光度をモニターしつつ、ピーク画分をそれぞれ分取した(図2-3、4、5)。HPLCの条件は、カラムをVydac 318-1251(C18)に変更した以外は、(B)の場合と同じである。

#### (D) アミノ酸配列の決定

(C) で分取したピーク画分のうち、単独ピークと考えられるものについて、ABI 社のモデル 477A 自動ペプチドシーケンサーを用いてアミノ酸配列を求めた。N 末端アミノ酸配列については、(B) で精製した各サブユニットの一部をそのままペプチドシーケンサーにかけることで求めた。

### 第 2 節—3 結果と考察

図 2—3、4、5 に各サブユニットをエンドプロテイナーゼ Lys-C により分解した後、HPLC によって分離した結果と、それぞれのピークからより得られた部分アミノ酸配列を示した。N 末端のアミノ酸配列については  $\alpha$  サブユニットについてのみ得られ(図 2—3)、 $\beta$  及び  $\gamma$  サブユニットについては得られなかった。これら二つのサブユニットの N 末端は何等かの修飾を受けていると思われる。本実験には、かなり豊富な量の精製蛋白を用いたので、正確で長くアミノ酸配列を読むことが可能であった。この配列をもとに、以下の cDNA クローニングを行った。

## 第 3 節 各サブユニットの cDNA クローニング

### 第 3 節—1 材料

cDNA ライブラリー構築のために用いたベクター pRc/CMV 及び pCRII は Invitrogen 社より、宿主大腸菌(コンピテントセル) Electro Max DH10B 及び DH5 $\alpha$  は BDL 社より購入した。PCR のプライマーに用いたオリゴヌクレオチドはサントリー生物医学研究所において合成していただいた。cDNA 合成キット Superscript Preamplification System は BRL 社より購入した。その他分子生物学関連実験試薬類は、タカラ社

及びファルマシア社製のものを用いた。

### 第3節-2 方法

#### (A) cDNA ライブラリーの構築

図2-6に構築の概要を図示した。死後間もないウシより大脳を取り出し、AGPC法(54)によって全RNAを抽出した。ここからOligotex-dT30(Super)(日本ロシュ)によってmRNA(polyA<sup>+</sup> RNA)を精製し、これとGIBCO社のcDNA合成キット(NotIプライマーアダプターを用いる)によってcDNAを合成した。BstXIアダプター付加後、NotI消化を行い、Quick Spin Column Linker 5(BMY社)を用いてアダプター断片を除いた。ここまでの、40ng/μlのcDNAが50μl得られた。このcDNA溶液3μlと、BstXI/NotI消化後精製したベクター-pRC/CMV(29ng/μl)1μlを混合し、タカラ社のライゲーションキットによってライゲーションを行った。これを用いてElectro Max DH10Bコンピテントセルをトランスフォーメーションし、206,000クローンの組み換え体を得た。

#### (B) cDNA ライブラリーのスクリーニング

各サブユニットのcDNAクローニングのために、MOPAC(mixed oligonucleotide primed amplification cloning)(55)及びPCRを利用したスクリーニング(56、57)を行った。第2節で得られたアミノ酸配列をもとにいくつかのmix primerを合成し、(A)で得られたcDNAを鋳型としてPCR(94°Cで1分、58°Cで2分、72°Cで2分、35サイクル)を行った。各サブユニットについて、用いたプライマーは図2-7(αサブユニット)、図2-8(βサブユニット)、図2-9(γサブユニット)に示した。増幅産物が得られた場合、そのDNA配列を求め、各サブユニットに相当するcDNA由来であることを確認した。次に、この増幅産物内部にある配列をもとに新たにプライマー(Specific primers、各サブユニットについて図2-7、8、9に記載)を合成し、cDNAライブ

ラリーのスクリーニングに用いた。スクリーニングは以下のように行った。まず(A)で作製した cDNA ライブラリーを 96 穴プレートに 50 クローン/well となるようにまきこみ、一夜静置培養を行った。横 12 列を 1 プールとして菌液を回収し、このうち 0.5 $\mu$ l を鑄型として Specific primers を用いて PCR(条件は上と同じ)を行い、増幅産物が確認できるプールの各 well についてさらに PCR を行い、ポジティブクローンを含む well を同定した。この well に含まれるクローンを LB 寒天培地にプレーティングし、各々のコロニーについて PCR(条件は上と同じ)を行い、クローン化した。クローン化したコロニーについて大量培養を行いプラスミドを精製し、ABI 社の自動シーケンサー 370A を用いて挿入 DNA 断片の配列を決定した。

### 第 3 節-3 結果と考察

#### (A) $\alpha$ サブユニットについて

得られた cDNA 配列とそれから推定される一次構造を図 2-10 に示した。本 cDNA の配列決定を終えた時点では、本サブユニットは新規の蛋白質と考えられたが、その後ヒトにおける先天性脳形態形成不全症候群の一種である、Miller-Dieker 症候群の原因遺伝子 (LIS1) (49-51) にコードされる蛋白質であることが明らかとなった(42)。このことに関しては 6 章で詳しく述べるので、ここでは省略する。

$\alpha$  サブユニット cDNA は全長が約 5.8kbp と非常に長く、特に 3' 非翻訳領域が約 3.7kbp もあることが特徴であると考えられる。また、7 章で詳しく述べるが、我々以外のグループによってヒト(51)及びマウス(58)からも本遺伝子のホモログがクローニングされており、種を越えて非常によく保存されていることが示されている。 $\alpha$  サブユニット cDNA の 3' 非翻訳領域には、ポリ A 付加シグナルと考えられる AATAAA が 8ヶ所存在する。本教室渡邊(川本)らによって、 $\alpha$  サブユニットの

mRNA には数種類の長さのものが存在する可能性が見い出されているが、複数のポリ A 付加シグナルが存在することと関係しているかもしれない。

cDNA から推定される  $\alpha$  サブユニットの一次構造は 410 残基からなる。計算上の分子量は 46667 (開始メチオニンを含む) であり、SDS-PAGE 上での分子量とよく一致していた。ただし、精製  $\alpha$  サブユニットの N 末端アミノ酸配列 (図 2-3) と照らしあわせると、開始メチオニンはプロセスされていると考えられる。また、この推定一次構造は精製蛋白から得られた部分アミノ酸配列を全て含んでいた。

$\alpha$  サブユニットの一次構造中には、非常に特徴的な構造として WD-40 リピート (59, 60) と呼ばれる正確に 42 残基ずつのくり返し構造が 7 回見い出された (図 2-11)。この構造ははじめ三量体 G 蛋白質の  $\beta$  サブユニットにおいて見い出された構造 (61) であることから、 $\beta$  トランスデューシンリピートとも呼ばれ (62)、今までおよそ 30 種類の蛋白質に見つかっている (60)。ただし本蛋白のように正確に 42 残基ずつ繰り返しているものはほとんどない。WD-40 リピート自体の機能はわかっていないが、この構造を持つ蛋白質のほとんどが複数の蛋白質からなる複合体の一部として機能すること、及びそれらの蛋白質の生理的機能に共通性が見い出せないことなどから、蛋白質間相互作用のために必要な構造 (“足場”) であると一般に考えられている (60)。SH-2 ドメインがリン酸化チロシンを認識する (63) ように、WD-40 リピートも何か特定の構造を認識すると考える説もあり、TPR モチーフ (64) や PH (Pleckstrin homology) ドメイン (65-67) がその候補に挙げられている (68, 69)。我々も、 $\alpha$  サブユニットと PH ドメインをもつ蛋白質が結合し得るか否かを *in vitro* で検討した結果、いくつかの PH ドメイン蛋白と相互作用を行う可能性を見出した (70) が、これについては 6 章で詳しく論じる。いずれにしても、 $\alpha$  サブユニットにおける WD-40 リ

ピートの機能については正確なことは不明である。一方、 $\alpha$ サブユニットの一次構造のうち、WD-40 リピートに含まれないN末端約100残基は既知の蛋白質と有意な相同性をもたない。この部分には、比較的等間隔に塩基性アミノ酸が連続して存在することを見出した(図2-11)が、このことが $\alpha$ サブユニットのヘパリン結合性(42、53)と関係あるのではないかと考えている。

#### (B) $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットについて

図2-12、13に $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットそれぞれのcDNA配列とそれから推定される一次構造を示した。非常に意外なことに、 $\beta$ サブユニットは229残基(計算される分子量が25,568)、 $\gamma$ サブユニットは232残基(計算される分子量が25,865)と、SDS-PAGE上での分子量(それぞれ約30kDa, 29kDa)と大きく異なるばかりか、SDS-PAGE上での分子量が大きい $\beta$ サブユニットのほうが、計算される分子量は小さいという結果になった。このことから一連の実験の過程で両者を取り違えた可能性や、ウシ脳から精製した $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットは何らかの修飾を受けていた可能性が考えられたが、発現実験(3章)及び抗体を用いた解析(5章)からそのどちらもあり得ないことが既に判明している。このようにそれぞれの蛋白質がもつ性質によって、計算される分子量と電気泳動上での分子量が異なることは稀にあることである。 $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニット両者の一次構造について、全体としては既知の蛋白質と有意な相同性は見い出せなかったが、両サブユニット間で63.2%の相同性、82.9%のsimilarityが見い出された(図2-14)。このことは、この両サブユニットの機能は基本的に共通性であるが何らかの役割分担をしていることを示していると考えるのが自然であろう。しかし、私は修士課程において、本酵素の阻害剤DFPを用いたラベリング実験から、 $\gamma$ サブユニットは実際の酵素活性を担うサブユニットであるが $\beta$ サブユニットは恐らく触媒活性には関係ないと考えた(40、53)ので、

この結果は予想外であった。そこでこれらのサブユニットの発現によってそれぞれの機能解析を行った結果を3章に記述した。また、本酵素はDFPによって非常に強く阻害されることからセリン残基を活性中心にもつ酵素であると考えられたが、一般にセリン酵素に見い出されるコンセンサス配列(Gly-Xaa-活性 Ser-Xaa-Gly) (72、73)が $\beta$ サブユニットにも $\gamma$ サブユニットに存在しなかった。そこで、活性セリン残基の同定とそれに関する考察を4章で行った。

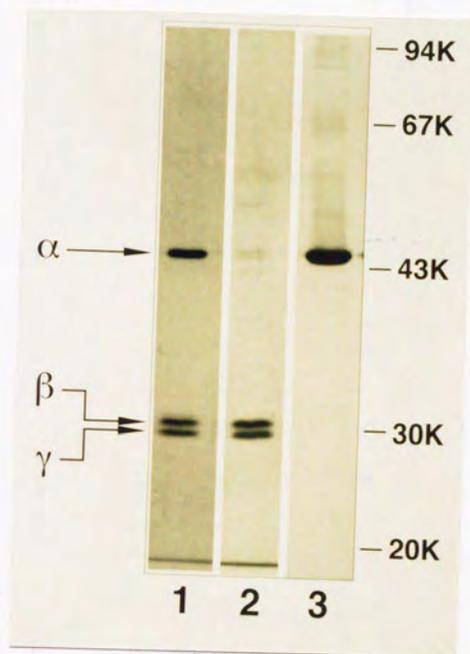


図2-1 各精製蛋白質のSDS-PAGEパターン。  
 12%アクリルアミドゲルを用い、銀染色を行った。  
 Lane 1:ウシ脳可溶性画分より精製したPAFアセチルヒドロラーゼb  
 Lane 2: 精製したβ/γサブユニット  
 Lane 3: 精製したαサブユニット

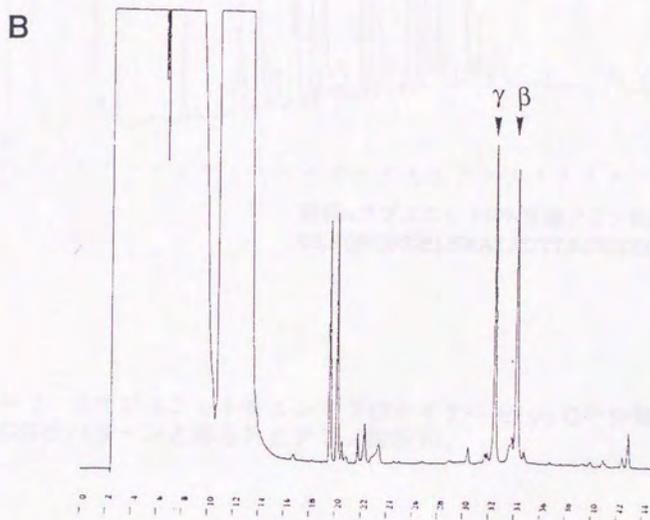
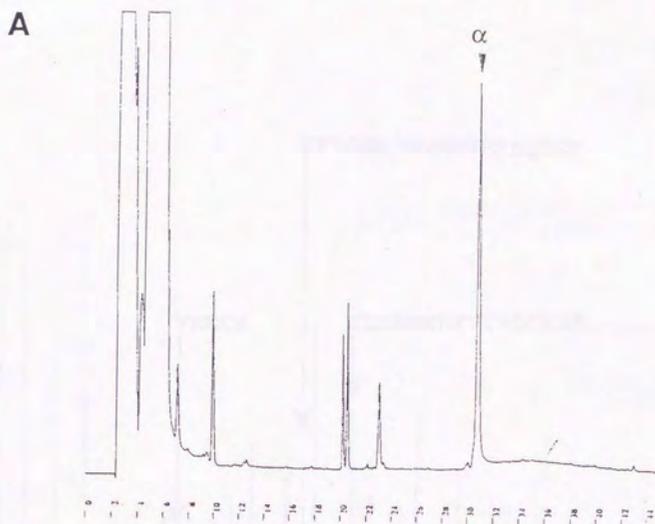
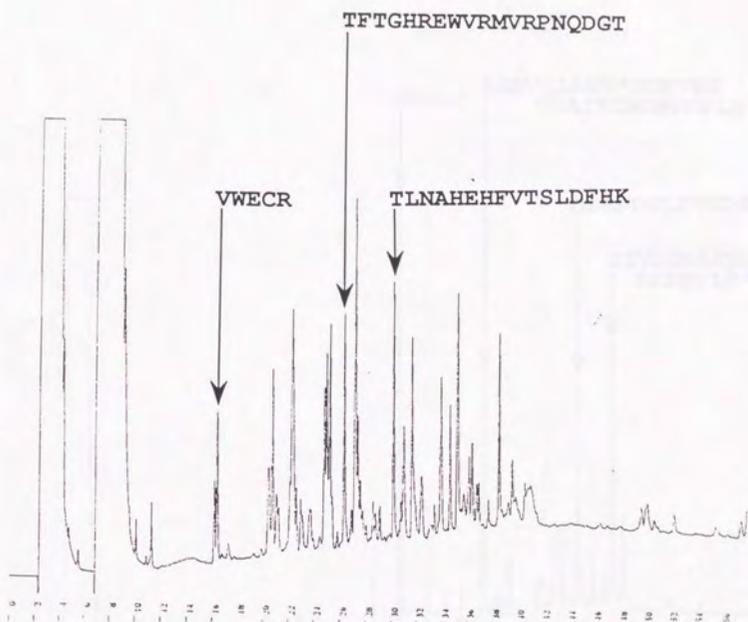


図 2-2 精製蛋白質を還元アルキル化後HPLCによって分離したもの  
 A:  $\alpha$ サブユニット。  
 B:  $\beta/\gamma$ サブユニット。



精製 $\alpha$ サブユニットのN末端アミノ酸配列：  
**VLSQRQRDELNRAIADYLRNSNGYEEAY**

図2-3  $\alpha$ サブユニットをエンドプロテイナーゼLys-Cで分解した後のHPLC溶出パターンと得られたアミノ酸配列。

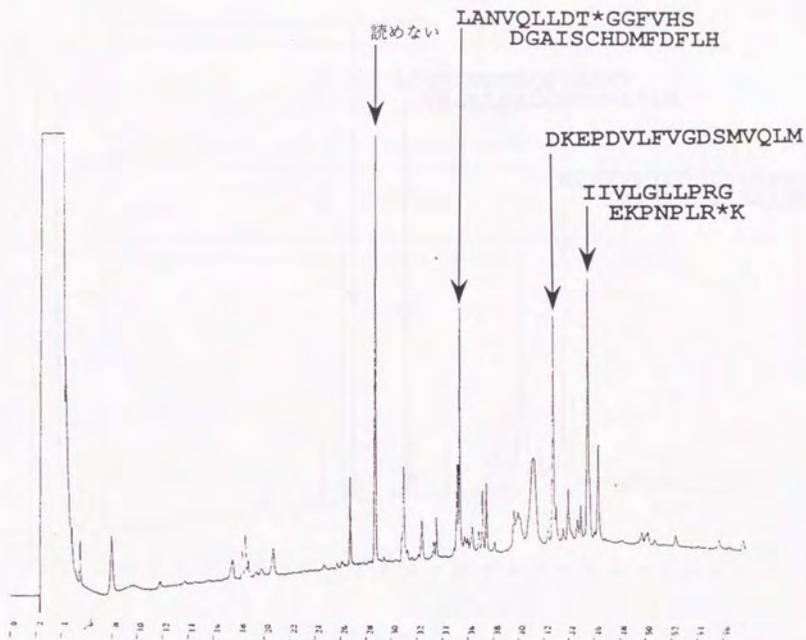


図2-4 βサブユニットをエンドプロテイナーゼLys-Cで分解した後のHPLC溶出パターンと得られたアミノ酸配列。

\*は自動シーケンサーにおいて同定できなかったアミノ酸残基を示す。

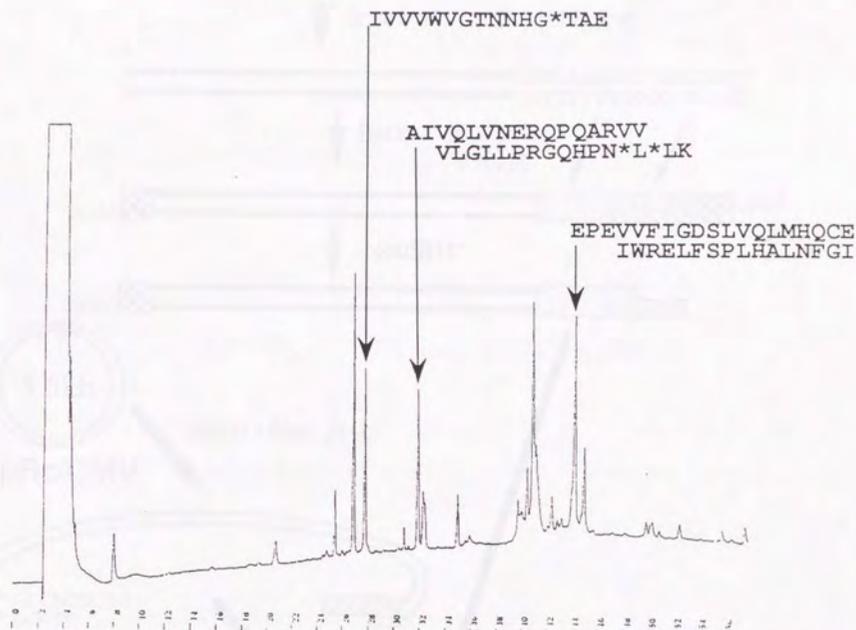


図2-5  $\gamma$ サブユニットをエンドプロテイナーゼLys-Cで分解した後のHPLC溶出パターンと得られたアミノ酸配列。

\*は自動シーケンサーにおいて同定できなかったアミノ酸残基を示す。

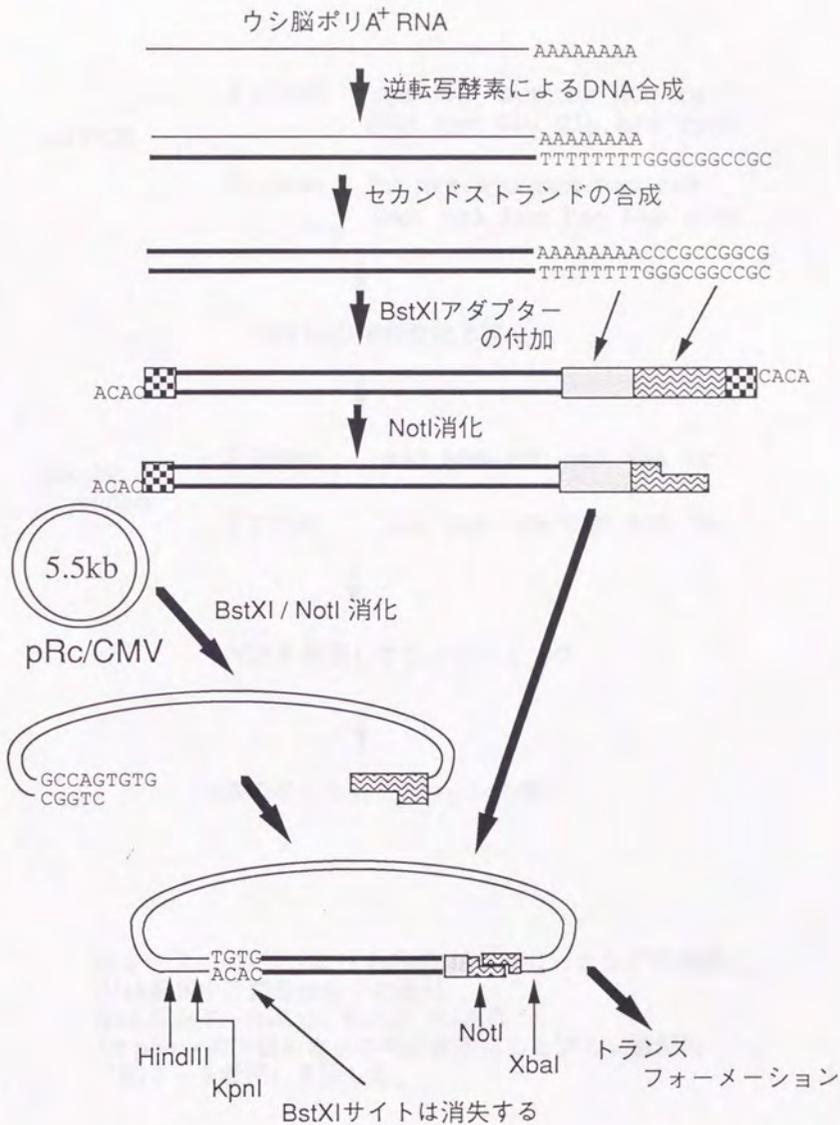


図 2-6 cDNAライブラリー合成のストラテジー

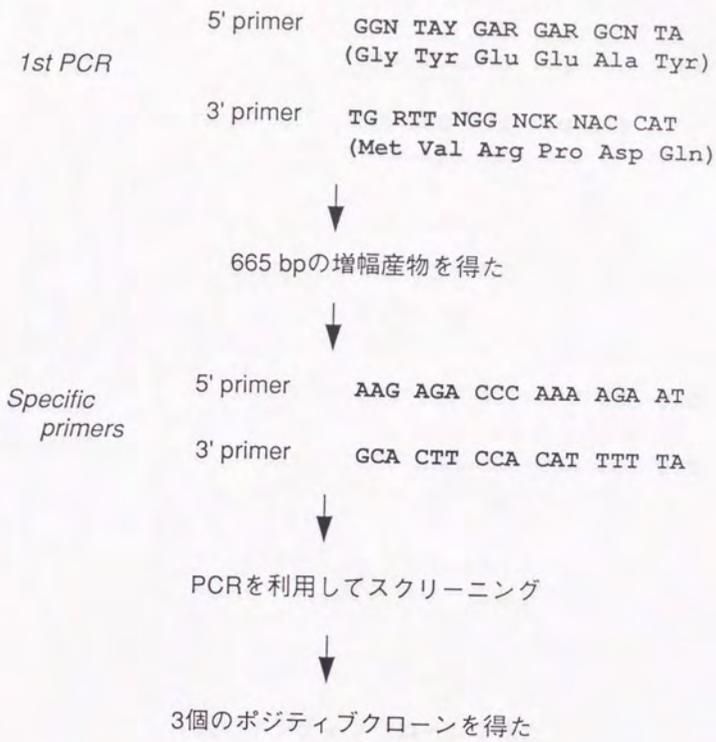


図 2-7 αサブユニットのcDNAスクリーニングの実際  
 DNA配列中の略号は以下の通り  
 N=A,C,G,T. R=A,G Y=C,T K=A,C  
 1st primerの下部のカッコ内に基本にしたアミノ酸配列  
 (図 2-3 参照) を示した。

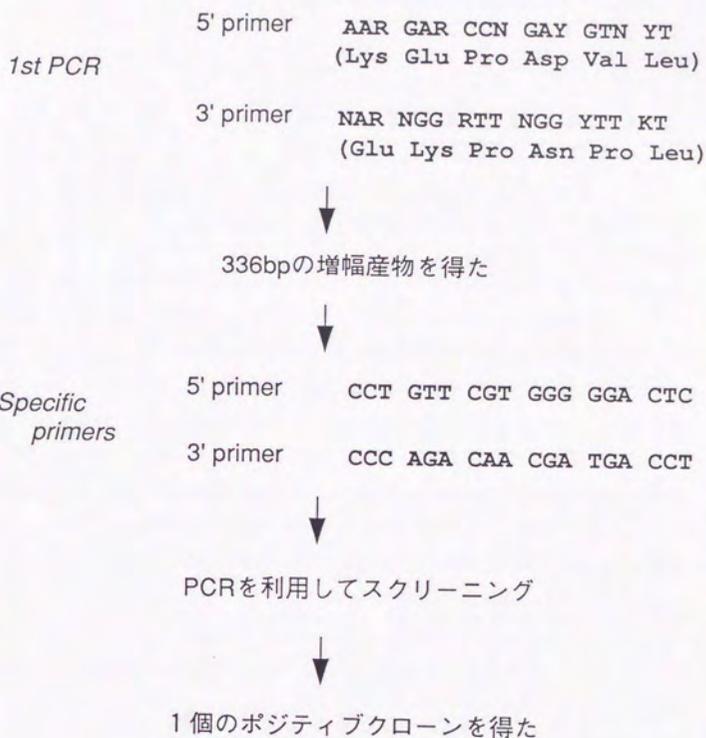


図2-8 βサブユニットのcDNAスクリーニングの実際  
DNA配列中の略号は以下の通り  
N=A,C,G,T R=A,G Y=C,T K=A,C  
1st primerの下部のカッコ内に基本にしたアミノ酸配列  
(図2-4参照)を示した。

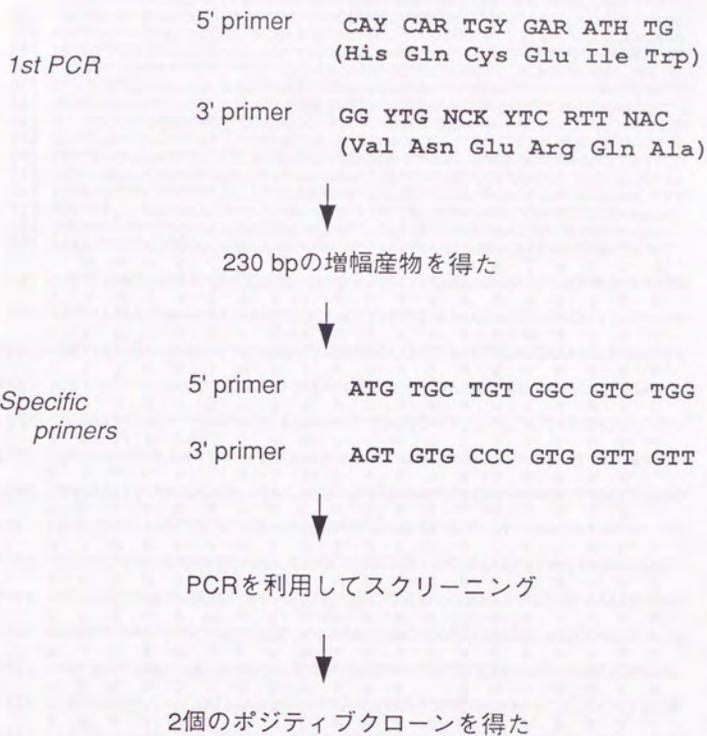


図 2-9  $\gamma$ サブユニットのcDNAスクリーニングの実際  
 DNA配列中の略号は以下の通り  
 N=A,C,G,T R=A,G Y=C,T K=A,C H=A,C,T  
 1st primerの下部のカッコ内に基本にしたアミノ酸配列  
 (図 2-5参照)を示した。

1 GCGGCCGCGACGGCCGTTGAGTGAGAGACCGGGAGGAGGGGGGACAGGCCGGGTAGGG  
 61 CGGTGCCCTCGCTCCCTCCTCCCTGGCCCGGGTTCGGGGGTGCCAGGGCCGCGCGCGC  
 121 TCCACCCGCGGCGCTTCCCGGGAAGGGATCGCCTTCCCTCCCTGGTGACTTAGCAAGAAA  
 181 AGTATTCCTGGGTAGGAAGGGCGTGGGGAGCAGGTCCGCTCTCAGATCTTGGGGAGAGGTT  
 241 TCGGCTCTCCTTCGCCCTGCCCGGGAGAGAGCTCCGCAGTCCCAACCCCGCCCGCGG  
 301 CTGGCCCTCAGGACCGGGCTCAAGCTCCCTCGGCAGTGTCCACCGCCGCTCAGGCGCTTC  
 361 FTGCCCCACCTGTCTTAGATGAGGATGACCTGAGAAGGATGGTCCAGCCTTCCCTGTC  
 421 GCCCCCTATGCGGTGGTTCAGCCCTGCACCCTGAGGAGGAGCGCCCTGACCCACC  
 481 GAAACATCCGCAGCATCCACCACCAAAATCCGGCAGGATTTCTTTTCTGCGGTGGCTC  
 541 CTTCAACGGGAGCTGCCTTTGACGTTGTAACACTGAGCTTCGAGGCCCTCAGCCATTC  
 601 CCTTCGAATCTCCCACTCGTATAGGAAACGCAGTGCCTGCCTTAACCTCCCAAGTGGAA  
 661 TGAACCTTACTTGTGAATATCTCCTGGTTACACGTTGGATTCACTTGTGAAAGATCAT  
 721 TTTCCCTCGGTGAAAGCCACTTAGTGGCTTATAATATAAAATCCAGGGGTTGCAAAAGC  
 781 TTTTGTATTTCCAGAGGAGGGACATAACCACTATATCGAATAAGCTGTATATACAGCC  
 841 AAAATGGTGTGTCCAGAGACAACGAGATGAATAAATCGAGCTATAGCAGATATATCTT  
     M V L S Q R Q R D E L N R A I A D Y L 19  
 901 CGTTCAAATGGCTACGAAGCCCATATTCAGTTTTTAAAAGGAAGCTGAATTAGATATG  
     R S N G Y E A A Y S V F K K E A E L D M 39  
 961 AATGAAGAATTAGATAAGAAATATGCTGGTCTTTGGAAAAAATGGCACTCTGTTATT  
     N E E L D K K Y A G L L E K K W T S V I 59  
 1021 AGATTACAAAAGAGGTATGGAATAGAATCAAAGTTAAATGAAAGCAAAAGAAATTT  
     R L Q K K V M E L E S K L N E A K E E F 79  
 1081 ACGTCGGTGGACCTCTTGGTCAGAAAAGAGACCCAAAAGATGGATTCCCGCTCCACCA  
     T S G G P L G Q K R D P K E W I P R P P 99  
 1141 GAAAAATATGCATTGAGTGCATAGGAGTCCAGTCACTCGAGTCAATTTCCAGTCTGTG  
     E K Y A L S G H R S P V T R V I F H P V 119  
 1201 TTCAGTGTATGGTCTCTGCTTCAGAGGATGCTACAATTAAGGTGGGATATGAGACT  
     F S V M V S A S E D A T I K V W D Y E T 139  
 1261 GGAGATTTTGAAGCAACTCTTAAGGGGCATACAGACTCTGTAGAGGATATTTTCATTTCGAC  
     G D F E R T L K G H T D S V E D I S F D 159  
 1321 CACAGTGGCAAGCTTCTGGCTTCATGTTCTGCAGATATGACCATTAAGCTATGGGATTTT  
     H S G K L L A S C S A D M T I K L W D F 179  
 1381 CAGGGCTTGAATGCATCAGAACCATGCATGGCCATGACCACATGTTTCTCAGTAGCC  
     Q G F E C I R T M H G H D H N V S V A 199  
 1441 ATCATGCCAATGGAGATCATATAGTGTCTGCCCAAGGGATAAAACTATAAAATGTGG  
     I M P N G D H I V S A R D K T I K M W 219  
 1501 GAAGTGCAAACTGGCTACTGTGTGAAGACATTCACAGGACACAGAGAATGGGTACGTATG  
     E V Q T G Y C V K T F T G H R E W V R M 239  
 1561 GTGCGGCCAAATCAAGACGGCACTCTGATAGCCAGCTGTCCAATGACCAGACTGTGCGT  
     V R P N Q D G T L I A S C S N D Q T V R 259  
 1621 GTATGGTTCGTAGCAACAAAGGAATGCAAGGCTGAGCTTCGAGAACATGAGCATGTGGTA  
     V W V V A T K E C K A E L R E H E H V V 279  
 1681 GAATGCATTTCTGGGCTCCTGAAAGCTCATATCTTCCATCTCGAAGCAACAGGATCT  
     E C I S W A P E S S Y S I S E A T G S 299  
 1741 GAGACTAAAAAAGTGGCAAACTGGGCCATCTTACTGTCCGGATCCAGGGACAAGACT  
     E T K K S G K P G P F L L S G S R D K T 319  
 1801 ATCAAGATGTTGGATGTGACTGTCATGTCCTTATGACCCCTGGTGGGTGCATGATAAC  
     I K M W D V S T G M C L M T L V G H D N 339  
 1861 TGGGTACGTGGAGTCTGTTCCATCTCGGGGGGAAGTTTATTTTGTGCGCTGATGAC  
     W V R G V L F H S G G K F I L S C A D D 359  
 1921 AAGACCTCGCCGTGTGGGATTACAAGAACAAGCGATGCATGAAGACCCCTCAATGCGCAT  
     K T L R V W D Y K N K R C M K T L N A H 379  
 1981 GAACTTTGTACCTCCTTGGATTTCCATAAGACGGCCCATATGTGGTACTGGCAGT  
     E H F V T S L D F H K T A P Y V V T G S 399  
 2041 GTAGATCAAACAGTAAAGGTGTGGGAGTGTGCTTATTGAGTCTCATTGGCCCTCCTC  
     V D Q T V K V W E C R \* 410

図2-10(前半) ウシ $\alpha$ サブユニットcDNA(5'非翻訳領域およびコーディング領域)の塩基配列と、それから推定されるアミノ酸配列。  
 核酸の塩基数を左に、N末端からのアミノ酸残基数を右に記した。

2101 CCTTTTCTCTGGATGCACTCTGATGATACCATGGTACGCCATCGAGCTGTGTTAA  
 2161 ATAAAATATGTCCTTTCACTGTAAAATATTCFGAATGAGATAGGCTATTAATGTTAC  
 2221 ACACAAAGTATTCATGCATGGTGAATCCAAATGGTACTGTAATTTACATACGTTGTC  
 2281 TAGAAGTACCATAGGGTTAAAAACCTGGGGTGGCATTGGTACACAGCGGCCAAGAAAGG  
 2341 CAGAAGTTGAATAAATTGAACTAGGGCACTAAACTGAAATAGTTGACAGTGTCACTTTTATG  
 2401 TTGGATTTATGATTCCTGTTTTCTTCTGCTGTCTGGTGGTGGCTGACTGTAGTGGCCCT  
 2461 ATTTGGGGGAAAGTGGTGGTATAGGGCTTTTTCTGAAATGGTATCTATGTAACATCA  
 2521 CTTAAGTGTGCTTATAAACTTCTTAAAGGATGTAGATAAAGGCTACAAATTCACAA  
 2581 TCTCTGAACCTCTATGTAATTAATGGGGATACATATTGGAATTTTTGTCTGACACACA  
 2641 TTTGCCAAATCAATGGGATACATTTGTTTTGGCAGCCTATCAAGCAAGGGCTAGTGGTAT  
 2701 CTTTATGTAAGAAAATGACTGTAATCTGAAATAAGAAAATCTCAGCAACTAATAACAA  
 2761 ATCATTTATTTCAATTTGGTCTTACTGCTTTGTAACAGSTTAAAAAACACTGTAATACT  
 2821 CTAAGCTTCTCTTTCCACACTAGACACTTCTAGTTGTTTCTCCACTACTATTAGACT  
 2881 GTATAGTGATGGATTCCCAAGTAGATTTAACTCTCCCATTTGAGTGTGTCAATGGTACAA  
 2941 ATCACTATTTGTTTTGATGTTTTTAGGGATGTGCAATGTGCAAAACATAATGCACAAAG  
 3001 AAATTTTGAAGAGGTTATGTTTGGCCATTTTAAAGGAGTGGGAGAAATAACAGCAGTTT  
 3061 TTCTTCAAATGAATCTGATATTCGATTTGAACTGTGTTTTTCAAGTTTTATAAAAAAGAC  
 3121 AGGTTTAAATGGCGGTGCATAAAAAATGACTGTGTTTTCCACTTTGTTTATATATAAA  
 3181 TGTTTATAGTATACAGCCCTATCTAATAGTGGATAGTCTGTATATGATATATATCAC  
 3241 ACAGCATACAACTCCATGCTTGGTCTGGGTTTTTGAAGAAAGTCTAAGACATAA  
 3301 ATAGAAATAACTTGTCTGTGAAATACCATGCTTTAGAACAATCTCTTTGATCCTCAAC  
 3361 GCTTCTGAAACTAGGCTGACTCTGGAAATTTTCCAGCTACAGAAAATCACTCTCGT  
 3421 TATCACCCCAACCCCAATTTGGCTGTTGAGCATTTTACACATCCCTGATATGTTGATA  
 3481 TTTGATCCAAAGTTACTACAAGTAGGTTAAAGAAATTTTATCTGTGACTTTGGAAAC  
 3541 AATATCCCATTCGAAATTAATAAATAATCCCACTGCTTAGCTAACCAACATTTTTTTTT  
 3601 AAGAAGTCTTTTTGAAAATTAATAGAACAAATGAAATAACAAGTTTAAACAAAGAAATTT  
 3661 ATCTTGGATTGCATTTATCCATTTGTGTAATACATGATTTTTTTTTATATCTTTTATG  
 3721 ATTCAGTGGAAATTTGTTCTGAAAAGACAAGGGTTAGAGTTAATGTGCTGTAGATA  
 3781 CACACACAGAAATAGGCCATATATTTACTAGAGCAGCTTTAGTCTTGTGTTATGTCCT  
 3841 TTTGTTGTTGGCTTGTGTTTTTAATAATCTCTGAGAGTGTCTCTGGAAGGAAAATG  
 3901 GTTTTGAAACTAATGACTATTTTGGAGCAAAAATGACAACTTAAGCTAATTTCTTAA  
 3961 ATACAGTAGGATAACTTTCAGGACAATATGGCTCACAACTGCTCACATTGAGAAGTC  
 4021 TTTTTTCTGTTCCCTTAGCTGTTCTGACTGGATTTTCTACAGAAGCTATGGAAGATT  
 4081 ATCTTTGTTCTGTTTGGTGTATTTCTGCTCTACTTTAAGAAATATAAATACATAGAA  
 4141 ATGGTGCACTTTAACATTTGTTGTACATGTATAAATGCTTTGATTTTAAATTCGTTT  
 4201 TAGCATGTAGCAACCGAATTTGTTCAAGGGTAAGCCACAACTCTAATAAATCACTCTAG  
 4261 ATACGACAAATAAAGGAAAAAAATGGTACCGATTTAGGAGGAAACAAGCCGCTGTCC  
 4321 TGGGTTTTCTGTGCAAGCTGCACTGACTTCCGACACAGGAGGAGCTGTCACTGTAA  
 4381 CCAAGTCACTCTGTTGGGAGCGCCACAGCCTGCTGCTTAGTTGAGTTACAGCAATC  
 4441 CTCACTTCCGAAGCAGCGAACCTGCAATCTCAGGGATGGTCTCACTGAGTCCAGTG  
 4501 TAACGAGCCCTGTTGAATAATGAGGGAGGGGAGAGTGATCCATCCAATAACCGAAGC  
 4561 AGATTTGACAGGTTTCTGCACTGTGTTGACACTGCCCTGTTGATGGCCCTTTCTTCC  
 4621 TGTTTTCTGTGTTTTCTCTGTCTGCTGCTAACCCCTGTCCTGGCTGGGATAAGTACAA  
 4681 TGATGAGGTTACTGGTTGGATTGTAAGTAGAGGAATTTAATTAATTTGTTTAGAGGTTCA  
 4741 CTGCTGCTTTGTCACTTTCTCAATCAAAATGGCCGCTTATTTAAGAAATTAAAAAGCTGGT  
 4801 AGAAGTGCATCTCAATGATGATGACCTTTTGTGTTGTGAAAAACAGACATCTCAGT  
 4861 GCCACCTGACATAACGTGCCAAGACGCTGCTGGCCGACCCCTGACCGTGGCAGCACCA  
 4921 GAAGCTGGTTTACAGATGGCTGGGGAAATAGTTGCTTTTGAATGGCATCTTGCACT  
 4981 TAGTAGGAGACTGAGACTGCTCTGTTTTGTCATTGTGGTGTGACCTGTTGTGTGCCAG  
 5041 AGCACTGCCGTAGAATCACTAGTGTAGCACGTCGTCGGGGCGTGGGGCTCTCTGTA  
 5101 GTCTCCGAAGCTCTAGCTTAGGCTACCAAGCCAGCTCTCTTACTGTGATGCCCTGCG  
 5161 TCTCCTGTTTGCTCTTTCTGTTTTCTATGTGAATCCAGATAAATCACTCGTTTAAATA  
 5221 GTTTTTTTTTTAAATTTAATTTAAAGAAAACTATTAGAAGAATATTCGTTTGTGTGAC  
 5281 AGTGGTGGCTTGATAATCCTTAAGCAACTGAAATAAAATTTGTCGAAGGAAACGGCACTG  
 5341 AAAAGATAGTTTATCTCTGTCCAGCTGTATATAAGTCCAGTGTGTTAACTAACTAGAT  
 5401 GATGCAAAAGAAATCACTCGTGAAGAGAAAGCAATGTACAAAATCGGTGAAAAAGGTT  
 5461 TCAGTTTTTCCAGTGGGTTGGGGGAGGCAAGCTGGATTACAACTCACTCTGCACT  
 5521 GAATGGCTTTAATCTTTCCACTTATCATGTAAGTAGCTGCTTCTGTGCTGCCCTA  
 5581 TCCCTCAGCGTCCCTAAAGCTCACTCTGAAGATGTTGAACAACAACACAACTCTCGA  
 5641 GTTTAGAAGTTGATCTGACTGACATGAAGGCAACGTTGATTTCAATGCGAACGAACA  
 5701 GTTACAGAGGTGGTATGGAGAAAAACCGTTCCCCAGATTGTAAGAGTTACTGAAGATA  
 5761 TTGACACAAT

図2-10(後半) ウシ $\alpha$ サブユニットcDNA(3'非翻訳領域)の塩基配列。  
 核酸の塩基数を左に記した。下線部はポリアデニレーションシグナル  
 (ATTA)を表す。

1 MVLSQRQ**RD**ELNRAIADYL**RS**NCYEE**LY**SVFKKE  
 35 AELDVNEELD**KKY**AGLLE**KK**WTSVIRLQ**KK**VME**L**  
 69 ESKLNEA**KLE**FTSGG**PLGQ**KRDPKEWIP**RP**PEKY**L**  
 104 **LS**GHRSPV**TRVI**FHPVFSVM**V**SASE**D**ATIKVWD**Y**ETGDFERT  
 146 **LK**GHTDS**VQD**ISFDH**S**GKLLASCS**AD**MTIKLWDF**Q**GFEC**IR**T  
 188 **MH**GHDHNVSS**V**AIMPNGDH**I**VSCS**ND**QTVRMWE**VQ**TSY**CV**RT  
 230 **FT**GHREW**VRM**VRPN**Q**GTL**I**ASCS**ND**QTVRVW**V**VATKE**CK**AE  
 272 LREHEHVVECISWAP**ESS**YS  
 292 **S**ISEATGSET**KK**SGK**P**GP**FL**LSGS**R**DKTIKMWD**V**STGM**CL**MT  
 334 **LV**GHDNW**VRG**VLFHSG**G**KFILSC**AD**DKTLRVWD**Y**KN**KR**CMRT  
 376 **LNA**HEHF**VT**SLDFH**KT**GPY**V**VTGS**V**DQTV**KV**WE**CR**\*

コンセンサス **L** **GH**    **V**    **V** **F**    **G**    **VV**SCS **D** **TV**KVWD  
                   **A**                    **I**                    **IL**TG                    **IR**L **E**  
   **L**                    **LA** **A**                    **L**

図2-11 αサブユニットに存在するWD-40リピート構造およびN末端側に存在する塩基性アミノ酸残基（緑）。WD-40リピート中で特に保存性の高い残基を赤、他の残基を青で示した。左の数字はN末端からの残基数を示す。

1 CTGGAAGCATCTCCACGCTGCGGTGATATGAACGCAGGATTGAGGGATGCGACGGAAAG  
 61 AAAGATAGAGGCCAAAGTCGCGCAGACTACATGCAAAACAAGGGCAGGGCAGAGAATAAA  
 121 GCAGAGAAGCTCGGAAGCCCGCCGAGGACACCTGGGGGCTAGTACCAAGCCCGCCGAGAA  
 181 AGGGAGAGCAAGCAGAAGCAAGCAAAGGCCCGGGCAGGATAGGGCGGGACTTCCGGAAATCC  
 241 ATTTGCTGAGTGGCAGGGGAAACCGGAAGTGGGGCGCTGCAGCGGGTGTGGGGCCGGA  
 301 GGAGGGACCGCCGGAGCGGGCCGCGGGGACTGAGCGAGCGACAGACGCGCCACCCGCG  
 361 GACGCCGACGCGCTGGGGGCCGACGGACCTGTGCTGAGTGTAGAATTGAGCCAAAG  
M S Q G 4  
 421 AGACTCAAACCCAGCAGCCATTCCACATGCGACGAGAAGATATTCAGGAGACGACAGATG  
 D S N P A A I P H A A E D I Q G D D R W 24  
 481 GATGTCTCAGCACAACAGATTTGTCTGGACTGCAAAGACAAAGAGCCGGATGTCTGT  
 M S Q H N R F V L D C K D K E P D V L F 44  
 541 CGTGGGGACTCCATGGTACAGTTGATGCGAGCAGTATGAGATATGGCGAGAGCTTTTTC  
 V G D S M V Q L M Q Q Y E I W R E L F S 64  
 601 TCCACTTCATGCATGAATTTTGGAAATGGGGGAGATACAACAAGACATGTTTATGGAG  
 P L H A L N F G I G G D T T R H V L W R 84  
 661 ACTAAAGAATGGAGAATGGAGAATATTAACCTAAGGTCATCGTTGTCTGGGTAGGAAC  
 L K N G E L E N I K P K V I V V W V G T 104  
 721 AAACAACCATGAAATACAGCAGAGGAAGTAGCAGGTGGAATCGAGGCCATCGTACAGCT  
 N N H E N T A E E V A G G I E A I V Q L 124  
 781 TATCAACACAAGCAGGACAGGCAAAAATCATTTGTTATGGGTTTGTACCTCGAGGTGA  
 I N T R Q P Q A K I I V L G L L P R G E 144  
 841 GAAGCCCAACCCCTTGAGGCAAAAGAATGCCAAGGTGAACAGCTCCTCAAGGTCTCCCT  
 K P N P L R Q K N A K V N Q L L K V S L 164  
 901 GCCGAAGCTGCCAACGTTTCAGCTCCTGGACACAGACGGGGCTTCGTGCACTCGGACGG  
 P K L A N V Q L L D T D G G F V H S D G 184  
 961 TGCCATCTCCTGCCACGACATGTTGATTTTCGTCATCTCACAGGAGTGGGYA K  
 A I S C H D M F D F L H L T G G G Y A K 204  
 1021 GATCTGCAAAACCCCTCCATGAACGTATGATGCGAGTTGTTGGAGGAAACACCTGAGGAAAA  
 I C K P L H E L I M Q L L E E T P E E K 224  
 1081 ACAAACCCACCATGCTGACTGGCTCCCGTCAGTGTACTAGCATCCCGACCTCCCTCAGA  
 Q T T I A \* 229  
 1141 TCAGTCTCTCACTGGCACTACAGAATCCTTCTCTTCTTAAGGCATTTGCATGTGCGA  
 1201 ATGTCTCTATCTAGTGTGTTGAAGGGGAGGAGGATCTAAACTGGTCTGTACATAGAAGG  
 1261 TTTGTTTACACAGGAAAAAATAGCCAAGGAAGATGGTTGTTAAATTCATTTGAAAC  
 1321 CAGAAGGGGACTTTTGTATATGTTGTGACACAGTCATGAAATATCACTGTTTTCCT  
 1381 AGGACAACATCAAGCCTAAGTACTGAACAAAATGAAGATGCTTGGCCTTCTTTGTATGG  
 1441 ATTATGTCATATATAAATGATAGAAATCACACCTACTTGGCTTTAAACAGATGTTTT  
 1501 TCCAGTTGTTAAGTTCATATTTAGTCTTTTGTGTTTGGCTTACTCATACATATCTC  
 1561 AATGTTGTAGCAACATATAGCATCAGATTGAACGTGCTTGTCTTATATCCCCCTCATCCCTCTCTTT  
 1621 CTATAGTCACTAGTGAATTTGTCCACTCTTAATCCTTCCATGCTTAGCAGTGAAAAAT  
 1681 AGGTTGGCCCACTTTGGGGGACTCTGTTGAGGATATATTTTATGCTGCTGAATATCA  
 1741 TGCTGTAATAGACCCATGCATGCAGCCTTTCCTCTATCCCCCTCATCCCTCTCTTTT  
 1801 CTGGGGTCCCTGTTGACATTACAAGCTTTTAAACACATTTTAACTAGGAGCTCTGTTG  
 1861 CTGGAAGTGTGAGTCCCCAGCCAGTACTCTTATGATGATATACTGCTGCTGAATCACTCAT  
 1921 TCCGTGTGGTGTCTGTGCTATAGTCTGTGTAGTGTCCATATTCAGAGTCTCTGATT  
 1981 GGTATGTTTGTGTTTCTCCCTTAAACCTGTTAACAGTPTTTCGCTTTTGGGGGAAAA  
 2041 AATTGGAACCTGCTTTCCAACTCCATAAGACCTGGCTTTTTCPTGGCTTAGTTTTTAA  
 2101 ATTATCAGTCCAGAAAAATTTGGCCTCTTCTCATGGGGAAACAGTGAACCTGCTCTTACG  
 2161 AATATACACTCACTTGATGCCCCCTATTTTGT

図 2-12 ウシβサブユニットcDNAの塩基配列とそれから推定されるアミノ酸配列。  
 核酸の塩基数を左に、N末端からのアミノ酸残基数を右に記した。

```

1 TGGTTTCTCCCCAGGACTGGCGCTAGATTTCCCCCGCTACTCTGGCCCTTCAGGAGC
61 GGAGGCGAGTGGCAAGATGAGTGGAGACGAGAACCAGCCAGCAAGCCCAGCCAGTGA
      M S G D E N P A S K P T P V Q 15
121 GGACGTGCAGGGTGACGGGCGCTGGATGTCCTGCACCATCGGTTGCTAGCCGACAGCAA
      D V Q G D G R W M S L H H R F V A D S K 35
181 AGATAAGGAACCCGAAGTCGTCTTCATCGGTGACTCCTGGTCCAGCTGATGCACCAGTG
      D K E P E V V F I G D S L V Q L M H Q C 55
241 CGAGATCTGGCGGGAGCTCTTTTCCCCTCTGCAGCACTTAACTTTGGCATTGGCGGTGA
      E I W R E L F S P L H A L N F G I G G D 75
301 CAGCACACAGCATGTGCTGTGGCGTCTGGAGAATGGAGAGCTGGAACACATCCGGCCCAA
      S T Q H V L W R L E N G E L E H I R P K 95
361 GATTGTGGTGGTCTGGGTTGGTACCAACAACCACGGGCACACTGCAGAGCAGGTGACTGG
      I V V V W V G T N N H G H T A E Q V T G 115
421 GGGCATCAAGGCCATAGTGCAGCTGGTGAACGAGCGGCAGCCCCAGGCACGGGTGCTGGT
      G I K A I V Q L V N E R Q P Q A R V V V 135
481 GCTGGGCCTGCTTCTCGGGCCAGCACCCCAACCCACTTCGAGAGAAAAACCGACGGGT
      L G L L P R G Q H P N P L R E K N R R V 155
541 GAATGAGCTGGTACGGGCAGCACTGGCCGGCCACCCTCGGGCCCACTTCTGGACGCAGA
      N E L V R A A L A G H P R A H F L D A D 175
601 CCCTGGCTTTGTGCACTCAGATGGTACCATCAGCCACCATGACATGTACGATTACCTGCA
      P G F V H S D G T I S H H D M Y D Y L H 195
661 CCTGAGCCGCTCGGGGTACACACCTGTTTCCGGGCCCTGCACTCCTTGCTTCTGCGTCT
      L S R L G Y T P V C R A L H S L L L R L 215
721 GCTAACCCAAGACCAGGGACAGGGTGGTCCCCCTGCCGGAACCCAGCCCTAAGCATC
      L T Q D Q G Q G G A P L P E P S P * 232
841 TGCTCTCCTACAACATTAATTTTCATTTTTCAGTC

```

図2-13 ウシ $\gamma$ サブユニットcDNAの塩基配列とそれから推定されるアミノ酸配列。  
 核酸の塩基数を左に、N末端からのアミノ酸残基数を右に記した。

β	MSQGDSNPAAIPHAAEDIQGDDRWMSQHNRVLDCKDKEP	40
γ	MS.GDENPASKPTPVQDVQGDGRWMSLHHRFVADSKDKEP	39
	活性セリン残基	
β	DVLFVGD <b>S</b> MVQLMQQYEIWRELFSPHALNFGIGGDTTRH	80
γ	EVVFIGD <b>S</b> LVQLMHQCELWRELFSPHALNFGIGGDSTQH	79
β	VLWRLKNGELENIKPKVIVVWVGTNNHENTAEVAGGIEA	120
γ	VLWRLNGELEHIRPKIVVWVGTNNHGHAEQVTGGIKA	119
β	IVQLINTRQPQAKIIVLGLLPRGEKPNPLRQKNAKVNQLL	160
γ	IVQLVNERQPQARVVVLGLLPRGQHNPPLREKNRRVNELV	159
β	KVSLPKLANVQLLDTDGGFVHSDGAISCHDMFDFLHLTGG	200
γ	RAALAGHPRAHFLDADPGFVHSDGTISHHDMYDYLHLSRL	199
β	GYAKICKPLHELIMQ <b>LL</b> EETPEEKQTTIA	229
γ	GYTPVCRALH <b>S</b> LLLRLLTQDQGGAPLPEPSP	232

図2-14 ウシβサブユニットとγサブユニットのアミノ酸配列比較。  
一致する残基を赤、異なるアミノ酸を青で示した。  
活性セリン残基に関しては第4章参照。

### 第 3 章

## PAF アセチルヒドロラーゼ lb 各サブユニットの発現 及びリコンビナント蛋白質の精製

#### 第1節 序

第2章に述べた cDNA クローニングの結果、 $\beta$  サブユニットと  $\gamma$  サブユニットは高い相同性を持つことが明らかとなったが、これは予想外の結果であった。なぜなら、私は修士課程において、本酵素を含めセリン酵素の阻害剤である DFP のトリチウム標識体を用いて本酵素のラベリングを行った結果、 $\gamma$  サブユニットにのみ活性セリン残基が存在すると思ったからである(40、53)。しかし、 $\beta$  と  $\gamma$  サブユニットの間の相同性の高さを考えると、 $\gamma$  サブユニットが触媒部位として機能する一方で  $\beta$  サブユニットはそれ以外の機能をもつとは考えにくい。そこで、本章ではこれらのサブユニットをそれぞれ単独で発現させることにより、 $\beta$  及び  $\gamma$  サブユニットが単独で触媒能を発揮し得るか否かを検討した。また、後述するように(5章)、本酵素各サブユニット蛋白質は免疫源性が弱く、ウシ脳からの精製蛋白質を用いた抗体作製は困難であったので、リコンビナント蛋白質を精製してこれを各種抗体作製のための免疫源とした。この精製リコンビナント蛋白質は、 $\beta$  及び  $\gamma$  サブユニットの活性セリン残基同定(4章)や、X 線構造解析(6章)の際にも用いた。

## 第2節 各サブユニットの大腸菌及び動物細胞における発現

### 第2節-1 材料

熱誘導性の発現ベクター pUC-pL-cl はサントリー生物医学研究所のご好意により供与していただいた。pET-21a ベクターは Novegen より購入した。各種オリゴヌクレオチドプライマーはサワディー社から購入したか、サントリー生物医学研究所のご好意により供与していただいた。2-[<sup>3</sup>H]-acetyl-PAF は Du-Pont-NEN 製のものを日本アイソトープ協会から購入した。その他の試薬類は、第2章に記したのものもしくは生化学用、特級レベルのものを使用した。

### 第2節-2 方法

#### (A) pUC-pL-cl ベクターを用いた、大腸菌における発現

各サブユニット cDNA のコーディング領域を PCR によって増幅した。用いたプライマーのうち、5'側のプライマーには EcoRI site (GAATTC) を、3'側プライマーには Sall site (GTCGAC) を付加しておいた。増幅産物を EcoRI/Sall 処理したあと精製し、同様の処理、精製を行った熱誘導性の発現ベクター pUC-pL-cl とライゲーションしたあと、宿主大腸菌 W3110 をトランスフォーメーションした。各サブユニットについて数種のトランスフォーマントをピックアップし、ベクターを回収して DNA シークエンシングを行い、正しい配列を含んでいるものを発現実験に用いた。

発現には SB 培地 (または terrific broth) (100 $\mu$ g/ml アンピシリンを含む) を用いた。初め各トランスフォーマントを 32°C で培養し、full-growth に近づいたところで培養温度を 42°C に上げ、さらに 2 時間培養を行った。5,000 から 10,000g 程度の遠心操作によって菌体を集めた。SET バッファー (10mM Tris-HCl (pH7.4), 1mM EDTA, 250 mM

Sucrose)で1回洗ったあと、同バッファーに菌体をサスペンドし、氷中で超音波処理(エッペンドルフチューブ中の場合は5秒×3回程度、50mlチューブの場合は5秒間隔で5分程度)を行い、菌体を破壊した。この液を100,000gで1時間遠心し上清を回収した。PAFアセチルヒドロラーゼ活性の測定は、100mM Tris-HCl (pH7.4), 4mM EDTA 中で、80 $\mu$ Mの2-[ $^3$ H]-acetyl-PAF (2000~4000dpm/nmol)を基質とし、37°Cでインキュベーションを行うことで測定した。

#### (B) pET-21a ベクターを用いた、大腸菌における発現

(A)と同様に、各サブユニットのコーディング領域をPCRによって増幅した。ただし、3'側プライマーに付加した制限酵素 site は NotI site とし、stop codon は含まないプライマーを用いた。これは、目的蛋白質のC末端にヒスチジン残基6つを含むタグ(His-Tag)を融合したものを発現させるためである。その他の操作は基本的に(A)と同じであるが、大腸菌の培養はすべて37°Cで行い、目的蛋白質の誘導は1~2mMのIPTGを添加することで行った。

#### (C) pRC/CMV ベクターを用いた、COS7 細胞における発現

COS7 細胞( $8 \times 10^6$ 個)をエレクトロポレーション用セルに入れ、各サブユニットのcDNAを含むpRC/CMVベクター45 $\mu$ gを加えた。220V、960 $\mu$ FDで数秒処理し、10%FCSを含むDMEM中で68時間培養した。PBSで2回washした後、EDTAで処理し細胞を回収した。遠心によって細胞を回収し、100 $\mu$ lのPBSにサスペンドし、超音波処理によって細胞を破壊した。15000rpmで15分遠心後上清を回収し、蛋白質質量及びPAFアセチルヒドロラーゼ活性を測定した。

### 第2節-3 結果と考察

#### (A) 大腸菌における発現

$\alpha$ サブユニットはpUC-pL-cl、pET-21 どちらにおける発現系において

もすべてが inclusion body となってしまうことが明らかとなっており、大腸菌での機能的な発現は実現できていない。グルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合蛋白質として発現させるとわずかながら可溶性に回収されるが、その効率は非常に低かった。

図3-1に、各サブユニットを pUC-pL-cl ベクターを用いて大腸菌に  $\beta$  及び  $\gamma$  サブユニットを発現させたときの PAF アセチルヒドロラーゼ活性及び、SDS-PAGE パターンを示した。一般に、大腸菌は PAF アセチルヒドロラーゼ活性をもつ酵素を全く持っていないことが知られているが、 $\beta$  もしくは  $\gamma$  サブユニット cDNA (コーディング領域のみ) をトランスフェクトすることにより、高いレベルの PAF アセチルヒドロラーゼ活性が可溶性画分に検出されるようになった。このことから、 $\beta$  及び  $\gamma$  サブユニットはどちらも単独で PAF アセチルヒドロラーゼを発揮し得ることが初めて明らかとなった。この結果は、私が修士課程において DFP は  $\gamma$  サブユニットのみに特異的に取り込まれることから推論した、 $\gamma$  サブユニットのみが本酵素の触媒ユニットであるとする説 (40、53) と矛盾する。しかし、2章において述べたように  $\beta$  サブユニットと  $\gamma$  サブユニットの一次構造には高い相同性が存在することから、 $\gamma$  サブユニットのみが活性を持つということはむしろ不自然とも考えられる。この矛盾を説明するために、次のような可能性が考えられた。①ネイティブに存在する PAF アセチルヒドロラーゼ lb ヘテロトリマーにおいては  $\beta$  サブユニットは活性を保持していない。②ネイティブなヘテロトリマーにおいても  $\beta$  サブユニットは活性を持っているが、何らかの理由で  $\beta$  サブユニットには DFP が取り込まれにくい。この点においては第5章第2節で詳しく解析したが、恐らく②の可能性が高いと考えている。

図3-2には、T7 タグ及び His タグをそれぞれ C 末端及び N 末端にもつ  $\beta$  及び  $\gamma$  サブユニットを発現させた大腸菌の可溶性画分と、それぞ

れを精製したもの(次節参照)の SDS-PAGE パターンを示した。これらのタグを付加してもなお PAF アセチルヒドロラーゼ活性は保持されていた(図3-3)。なおこれらのタグを付加することにより、 $\beta$ サブユニットの SDS-PAGE における泳動度はタグの分だけ遅くなったが、 $\gamma$ サブユニットはタグ付加以上に泳動度が遅れる現象がみられたが、その理由は不明である。

#### (B) COS7 細胞における発現

図3-4に各サブユニット cDNA 単独を、もしくはそれぞれのコンビネーションを一過性にトランスフェクトした COS7 細胞の PAF アセチルヒドロラーゼ活性を示した。この実験を行った時点ではまだ各サブユニットに対する抗体を樹立していなかったため、各例において蛋白の発現量がどのようになっているかを調べることはできなかった。また、細胞の可溶性画分をそのままアッセイにもちいたため、他の PAF アセチルヒドロラーゼアイソフォームの存在を無視できない。これらの点を考慮すると本実験の結果から何かを結論付けることは不可能であるが、次のような傾向が見られることがわかった。一つめは $\gamma$ サブユニットをトランスフェクトした場合は全ての例において活性が上昇しており、このことは $\gamma$ サブユニット単独で活性を発現していることを想像させる。一方、 $\beta$ サブユニットは単独では活性上昇をほとんど示さないが、 $\gamma$ サブユニットと同時にトランスフェクトすると相乗的に活性が上昇する傾向があった。このことは $\beta$ サブユニットは単独では速やかに分解されてしまうが、 $\gamma$ サブユニットとの共存下では安定性が増すということの意味しているのかもしれない。 $\alpha$ サブユニットは活性上昇にはあまり寄与していないように見えるが、興味深い点は、 $\alpha$ サブユニットと $\gamma$ サブユニットを同時にトランスフェクトすると活性上昇が抑えられる傾向があることである。当教室の萬谷によって、同様の傾向が昆虫細胞 sf9 における発現系においても見い出されてお

り、今後の検討が必要であろう。動物細胞における発現実験は現在当教室で解析が進行中であり、アセンブリーの機構などが明らかになることが期待される。

### 第3節 リコンビナント $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットの精製

#### 第3節-1 材料

大腸菌、ベクター等は本章第2節で用いたものを、カラムクロマトグラフィ用品については第2章で述べたものを用いた。

#### 第3節-2 方法

##### (A) pUC-pL-cl ベクターによる発現系からの精製

総ての方法は、 $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットについて同様である。pUC-pL-cl ベクターをもつ W3110 大腸菌の full growth カルチャー 20ml を 200ml の SB 培地に加え、32°C で 2 時間培養した。次に培養温度を 42°C に上昇させ、さらに 2 時間培養した。遠心によって菌体を回収し、SET バッファーで 1 回洗ったあと、再び遠心によって菌体をペレットにし、-20°C で 1 晩保存した。これを解凍し、SET バッファーにサスペンドし超音波処理で菌体を破壊後、100,000g で 1 時間遠心して可溶性画分を回収した。これを予め TEG バッファーで平衡化しておいた DEAE セファロースカラム (2.5x17cm) にアプライした。TEG バッファーでカラムを洗った後、400ml の NaCl 直線濃度勾配 (0→200mM) で溶出し、1 フラクション 6 ml で集めた。各フラクションの PAF アセチルヒドロラーゼを 2 章に記述した方法で測定し、活性画分をヒドロキシアパタイトカラムへアプライした。カラムは予め 10mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -KOH (pH6.8) -10% glycerol で平衡化しておいた。同バッファーで洗った後、400ml の  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  直線濃度勾配で溶出した。1 フラクション 6 ml で集め、PAF ア

セチルハイドロラーゼアッセイ及び SDS-PAGE を行った。

#### (B) pET-21a ベクターによる発現系からの精製

各サブユニット cDNA (pET-21a) をもつ BL21 大腸菌の full growth カルチャー (10ml) を 1 リットルの SB 培地に加え、37°C で 2 時間培養した後、最終濃度 1mM の IPTG を加えさらに 3 時間培養した。(A) と同様の方法で菌体を回収、洗浄し、破壊した。ただし、バッファーには SET ではなく、Binding バッファー (20mM Tris-HCl (pH7.9)、5mM イミダゾール、500mM NaCl) (73) を用いた。破壊後の菌液をエッペンドルフチューブに分注し、15,000rpm で 20 分遠心後、上清を回収した。この上清を 0.45 $\mu$ m のフィルターで濾過し、HisBind カラムにアプライした。HisBind カラム (2.5 x 8cm) の実施方法は添付プロトコールに従った。必要な場合は、この活性画分を TEG バッファーに対して透析し、(A) と同様の方法で DEAE セファロースカラムを行った。

### 第3節-3 結果と考察

本節でリコンビナント  $\beta$  及び  $\gamma$  サブユニットの精製を行った理由はいくつかある。一つめは、活性セリン残基同定の実験に用いるためである。このために単一の蛋白質 ( $\beta$  と  $\gamma$  サブユニットのヘテロダイマーでは不適) が大量に必要となるので、大腸菌からの精製を試みた。活性セリン残基の同定は 4 章に記述した。二つめは、両触媒サブユニットの性質の差異やサブユニット間の相互作用などを解析するためである。その結果は本節の最後及び 5 章に記述した。三つめは抗体作製の際の抗原として用いることである。7 章でも述べるように、本酵素の三つの各サブユニットの一次構造はどれも動物種間で非常によく保存されており、実際精製蛋白 10 $\mu$ g 程度をマウスやウサギに 10 回近く免疫しても十分な抗体価上昇は得られなかった。そこで、精製リコンビナント蛋白を大量に免疫することで抗体の樹立を試みた。その結果は 5 章

に記述したが、この方法によってはじめて抗体の樹立に成功した。図3-5及び6に、タグをつけていない $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットを精製したときのカラムパターンを示した。方法は全く同様であるにもかかわらず、 $\gamma$ サブユニットはかなり高純度で精製され、 $\beta$ サブユニットの純度はあまり高くなかった。これは $\gamma$ サブユニットがメジャーな蛋白とずれた位置にシャープなピークとして溶出された一方で、 $\beta$ サブユニットは比較的ブロードなピークとして溶出されたことが原因である。この結果には再現性があり、実験を行った際にカラムの理論段数などが異なっていたことが理由ではなく、 $\beta$ サブユニットの蛋白的性質によるものと考えている。 $\beta$ サブユニットはホモダイマー及びホモトリマーとして存在していることが示唆されている(44)(5章参照)ので、その違いがカラム上での挙動の違いとなり、結果としてブロードなピークとなっている可能性も考えられる。 $\beta$ サブユニットについては、さらに純度を上げるためブチルトヨパールカラムを試してみたがあまり効果はなかった。そこで、次にHisタグを付加したリコンビナント蛋白の精製を試みた。図3-2に、各精製段階でのリコンビナント $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットのSDS-PAGEパターンを示した。本方法は粗精製品を得るためには非常に簡便であるが、完全に精製するにはさらにもう1ステップ必要である、しかし、特に $\beta$ サブユニットの場合、現状ではこの方法以外に完全に精製する方法はない。

さて、これらのリコンビナント蛋白がどの程度ネイティブな蛋白質に近い構造をもっているかは大きな問題である。図3-3に、ウシ脳から精製したPAFアセチルヒドロラーゼIb及びそれから $\alpha$ サブユニットを除いたもの( $\beta/\gamma$ ヘテロダイマー)、さらに本章で得た精製リコンビナント蛋白のPAFアセチルヒドロラーゼ活性( $V_{max}$ )を比較した結果を示した。この結果からわかったことは、リコンビナントの $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニット(つまり $\beta/\beta$ または $\gamma/\gamma$ のホモダイマー(第

5章第4節参照))は、ネイティブの蛋白質よりも活性が弱いと思われることである。この結果の解釈には以下の三通りがあり得る。①リコンビナント蛋白質はネイティブな酵素と立体構造が微妙に異なる(または何らかの修飾が異なる)ために、ネイティブな酵素ほど活性を発揮できない。②精製リコンビナント蛋白の中には失活しているものが含まれている。③ $\beta/\beta$ または $\gamma/\gamma$ のホモダイマーは $\beta/\gamma$ のヘテロダイマーよりも活性が低い。このうち、①及び②は大腸菌における発現系を用いたことによる、いわゆる artefact であるが、もし③が正しいとすれば、サブユニットのアセンブリー如何によって活性が変化するという非常に興味深いことになる。そこで、 $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットの精製リコンビナント蛋白を混合してヘテロダイマーを形成できるかどうか、また逆に、精製 Ib から変性させずに $\beta$ もしくは $\gamma$ サブユニットを精製できるかということについて検討を重ねたが、未だに成功していない。この問題に関しては、大腸菌における発現系を用いるよりも動物細胞を用いた発現系を用いたほうがより真実に近い結果が得られると期待できるので、現在その線に沿って解析中である。

A

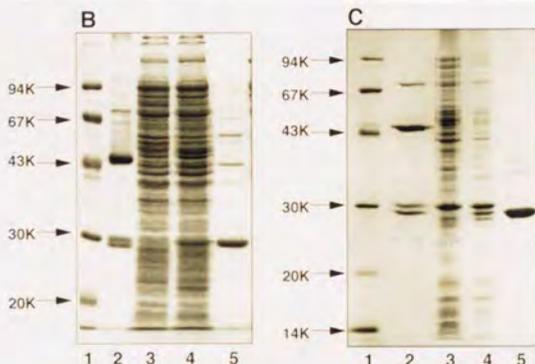
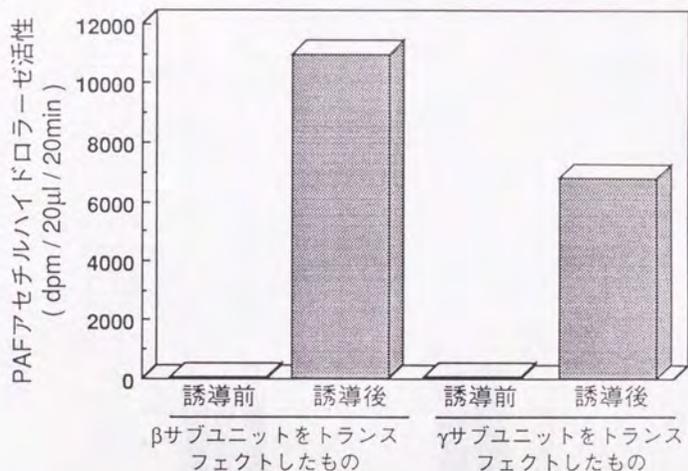


図3-1 β及びγサブユニット(タグのついていないもの)を大腸菌に発現させたときのPAFアセチルヒドロラーゼ活性とSDS-PAGEパターン。

A: 誘導前後の大腸菌可溶性画分のPAFアセチルヒドロラーゼ活性

B: SDS-PAGE. Bは12%、Cは13.5%アクリルアミドゲルを用い、ともに銀染色を行った。

Lane 1: 分子量マーカー

Lane 2: ウシ脳から精製したPAFアセチルヒドロラーゼlb

Lane 3: 誘導前の大腸菌可溶性画分

Lane 4: 誘導後の大腸菌可溶性画分

Lane 5: 部分精製したリコンビナント蛋白質



図 3-2 T7及びHisタグを付加した $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットの発現と精製。

A: タグ付加 $\gamma$ サブユニットの精製。12%SDS-PAGE後銀染色した。

Lane 1: 分子量マーカー。

Lane 2: 発現を誘導した大腸菌の可溶性画分。

Lane 3: HisBindカラムにアプライした際の素通り画分。

Lane 4: HisBindカラムにおけるWash画分。

Lane 5: HisBindカラムにおけるElution画分。

B: タグ付加 $\beta$ サブユニットの発現と精製。12%SDS-PAGE後銀染色した。

Lane 1: 発現誘導前の大腸菌BL21の可溶性画分。

Lane 2: 発現誘導後の同画分。

Lane 3: HisBindカラム後、DEAEセファロースカラムによって精製した画分。

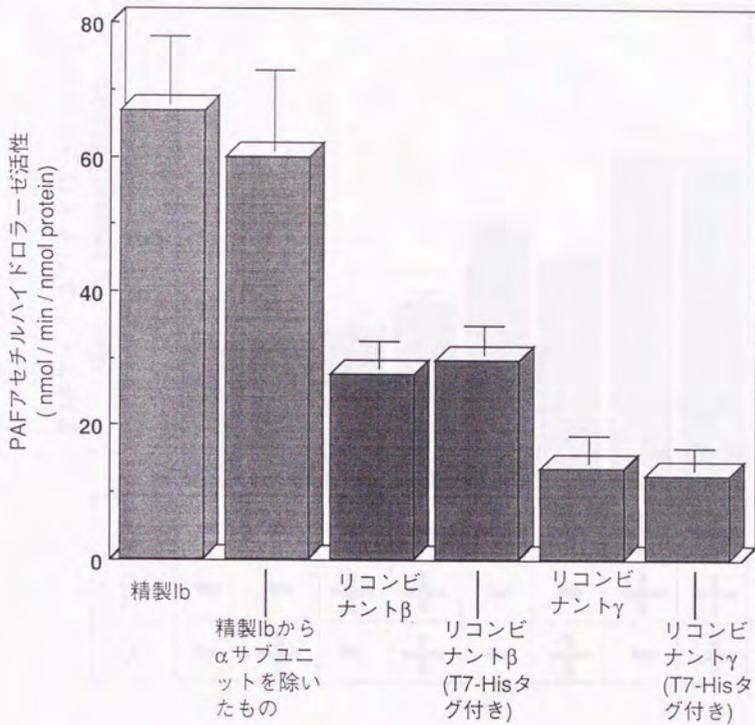


図3-3 ウシ脳から精製したPAFアセチルハイドロラーゼIbと大腸菌で発現させ精製したリコンビナント蛋白質の酵素活性比較。基質濃度は80 μMとした。各蛋白質の分子量は一次構造から計算されるものを用いた。

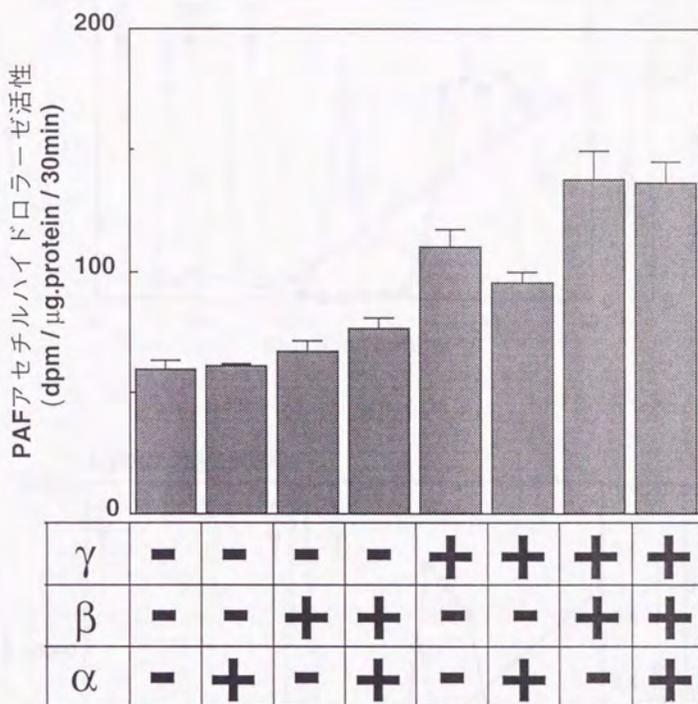


図3-4 COS7細胞に各サブユニットのcDNAを単独もしくは同時にトランスフェクションしたときの可溶性画分のPAFアセチルハイドロラーゼ活性。

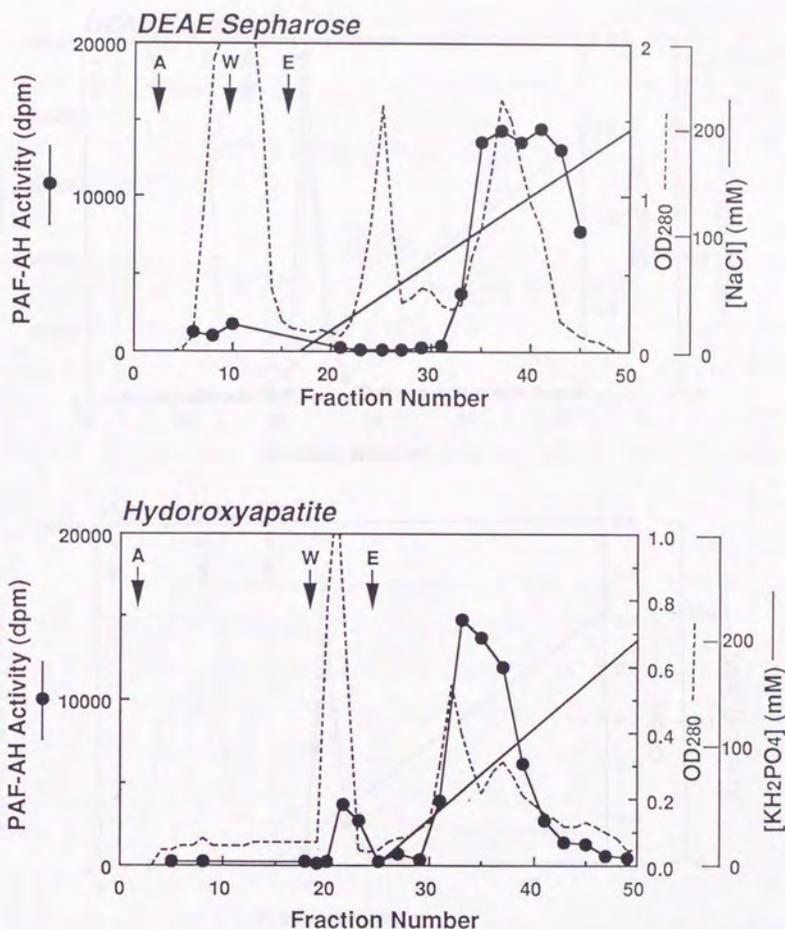


図3-5 リコンビナントβサブユニット蛋白の精製におけるカラムパターン。  
 A: アプライ W: 洗い E: 溶出  
 最も純度が高い画分のSDS-PAGEパターンを図3-1に示した。

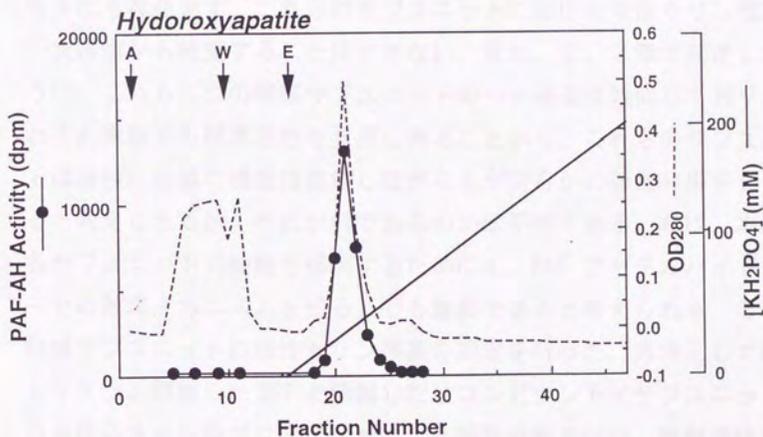
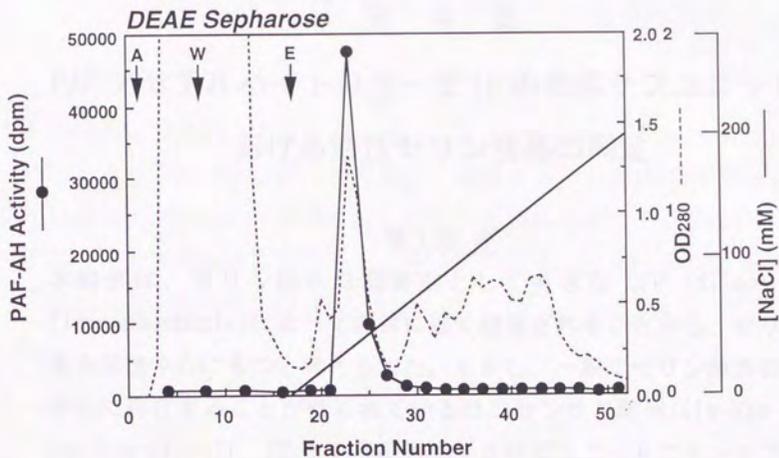


図3-6 リコンビナント $\gamma$ サブユニット蛋白の精製におけるカラムパターン。

A: アプライ W: 洗い E: 溶出

最も純度が高い画分のSDS-PAGEパターンを図3-1に示した。

## 第 4 章

### PAF アセチルヒドロラーゼ lb の触媒サブユニットに おける活性セリン残基の同定

#### 第 1 節 序

本酵素は、セリン酵素の阻害剤として有名な DFP (diisopropyl fluorophosphate) によって非常に強く阻害されることから、セリン残基を活性中心にもつと考えられた。しかし、一般にセリン酵素の活性中心に存在することが知られているコンセンサス配列 (Gly-Xaa-活性 Ser-Xaa-Gly) (71、72) という配列は、 $\beta$  サブユニットにも  $\gamma$  サブユニットにも存在せず、これらのサブユニットにおける活性セリン残基を一次構造から推定することはできない。また、2、3 章で記述したように、これら二つの触媒サブユニットの一次構造は類似しており、それぞれ単独でも酵素活性を発揮し得ることから、これらのサブユニットは活性に必要な構造は保持しながらも何らかの機能分担をしていると考えられるが、それが何であるのかは不明である。私は、本酵素各サブユニットの機能を解明するためにも、PAF アセチルヒドロラーゼの触媒メカニズムを知る上でも重要であると考えられる、これら触媒サブユニットの活性セリン残基を同定を行った。方法としては、トリチウム標識した DFP と精製したリコンビナント  $\gamma$  サブユニット蛋白を反応させた後プロテアーゼによる限定分解を行い、放射活性をもつペプチドを単離してそのアミノ酸配列を決定する方法 (図 4-1) (74、75) 及び site directed mutagenesis によるセリン残基の置換を用いた。

## 第2節 $[^3\text{H}]$ -DFP を用いた活性セリン残基の同定

### 第2節-1 材料

$[^3\text{H}]$ -DFP は Du-Pont-NEN から購入した。精製リコンビナント $\gamma$ サブユニット蛋白は、pUC-pL-cl を用いて発現させたもの(第3章第3節)を精製し、用いた。エンドプロテイナーゼ Lys-C 及び Glu-C はベーリンガーマンハイムより購入した。その他の試薬は和光純薬のアミノ酸分析用、生化学用のものを用いた。

### 第2節-2 方法と結果

200 $\mu\text{g}$  の精製リコンビナント $\gamma$ サブユニット蛋白(in 1.6ml of 50mM リン酸バッファー-10%グリセロール)に、17nmol の  $[^3\text{H}]$ -DFP (100  $\mu\text{Ci}$ ) を加え、2 時間室温で反応させた。未反応の活性セリン残基を残さないように、2 $\mu\text{mol}$  の未標識 DFP (in dimethyl sulfoxide) を加え、さらに室温で 2 時間反応させた。第2章第2節-2 (B) に記した方法で還元及びアルキル化及びエンドプロテイナーゼ Lys-C による分解を行った。分解後の反応液のうち 1/10 をまず HPLC (第2章第2節-2 (B) と同じ方法) にアプライし、214nm の吸光度をモニターしつつ、2分ごとにフラクションを集めた。このフラクションの放射活性を測定することにより、目的のペプチドが溶出される位置を調べておいた。次に残りの反応液全量をアプライし、各ピークを手動で集めた。放射活性をもつ画分を凍結乾燥したあと、Glu-C バッファー (25mM リン酸バッファー (pH7.8) -5%アセトニトリル) にサスペンドした。ここに 10 $\mu\text{g}$  のエンドプロテイナーゼ Glu-C を加え 25 $^{\circ}\text{C}$  で 24 時間インキュベーションした。この反応液を同様に HPLC で分離し、ピークを手動で集めた。放射活性をもつ単一ピークのアミノ酸配列を求めることで、活性セリン残基を決定した。なお、放射活性を持たないピークについても分解反応

を確認する理由でアミノ酸配列をもとめた。

### 第2節-3 結果と考察

私は、次のような理由で PAF アセチルヒドロラーゼ $\gamma$ サブユニットの活性セリン残基を同定することが必要であると考えた。①本酵素にはセリン酵素のコンセンサス配列 (Gly-Xaa-活性 Ser-Xaa-Gly) (71、72) が存在しないことから、既知のセリン酵素ファミリーに属さないユニークな酵素である可能性が高く、その触媒機構を解明することは酵素学的に興味深い。②本酵素の $\beta$ 及び $\gamma$ の二つの触媒サブユニットは既知の蛋白質と相同性を持たない一方でお互いには高い相同性を有するが、その高い相同性を有する部位が触媒活性に必要な部位なのか、触媒以外に必要な部位なのかを知ることが、両サブユニットの機能分担を考える上で有用な情報となる。③ $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットが、 $\alpha$ サブユニットと相互作用する部位を特定できれば今後の解析に有用であるが、そのためにも活性セリン残基の特定が不可欠である。

現在では、活性セリン残基の同定には部位特異的変異導入によってセリン残基を他のアミノ酸残基に変換し、その酵素活性を調べるのが一般的であるといえる(実際私も次節で行った)。しかし、そのためには前もって活性セリン残基をある程度推定できなければならない。セリン酵素の大部分には上の①で述べたコンセンサス配列が存在するのでこの場合は容易に活性セリン残基が推定できる。血漿に存在する PAF アセチルヒドロラーゼ (33、76) や、当研究室服部研之によって精製 (77)、クローニング (78) が行われた細胞内 PAF アセチルヒドロラーゼ II はともにセリン酵素であり、これらの活性セリン残基周辺にはコンセンサス配列が存在する。また、コンセンサス配列が存在しない場合でも、他のセリン酵素との相同性から推定が可能であったケースもある (79)。しかし、PAF アセチルヒドロラーゼ Ib の二つの触媒サブ

ユニットにおいては、コンセンサス配列が存在しないばかりか、既知の蛋白質と有意な相同性が見い出されないので、活性セリン残基を推定することは不可能であった。そこで私は放射標識された DFP を用いて活性セリン残基を推定する方法 (74, 75) を試みた (図 4-1)。

DFP はセリン酵素の活性セリン残基とのみ反応して共有結合を形成するが、活性セリン残基以外のセリン残基とは反応しない。その理由は、セリン酵素には、セリン、アスパラギン酸、ヒスチジンからなるいわゆる catalytic triad が存在し、これらの残基が電子リレーを行うことで活性セリン残基の OH 基だけは酸性水酸基となっているからである。DFP のこの性質を利用して、いくつかのセリン酵素において活性セリン残基が同定されている (75, 80)。

図 4-2 に精製リコンビナント  $\gamma$  サブユニットと  $[^3\text{H}]$ -DFP を反応させた後、エンドプロテイナーゼ Lys-C で限定分解し、HPLC で分離した結果を示した。放射活性のピークはほぼ一本のピークに回収された。このピークのアミノ酸配列を決定した結果、Glu<sup>38</sup> からはじまる (恐らく Lys<sup>95</sup> までの) ペプチドであることが明らかとなった。このペプチドはセリン残基を 3 つ含む (Ser<sup>47</sup>, Ser<sup>63</sup>, Ser<sup>76</sup>) と考えられるが、アミノ酸シーケンサーによる配列解析では、このうち Ser<sup>47</sup> までさえ到達できなかったため、この三つのうちどれが活性セリン残基であるかは判明しなかった。そこで、ここまでの実験を再度行い、同じように得られたピーク画分のペプチドをエンドプロテイナーゼ Glu-C で限定分解し、HPLC によって分離した (図 4-3)。その結果やはり放射活性は一本のピークに回収された。このピーク画分をアミノ酸シーケンサーで分析した結果、Val<sup>41</sup> から始まるペプチド (Glu<sup>56</sup> までと考えられる) であることが明らかとなった。もし Glu-C による限定分解が完全ならば、このペプチドはただひとつのセリン残基 (Ser<sup>47</sup>) を含むことになる。実際アミノ酸シーケンサーの 7 サイクルめ (Ser<sup>47</sup> に相当) のアミノ酸は

読み取れず、Ser<sup>47</sup>にDFPが結合している可能性が高いと考えられた。さらには、Glu<sup>56</sup>で確かに分解が起こっていることを示すペプチド配列(Ile<sup>57</sup>~Glu<sup>60</sup>)も別のピークから得られた(図4-3)。これらのことから、Ser<sup>47</sup>が $\gamma$ サブユニットの活性セリン残基である可能性が非常に高いと考えられた。そこで次節でこれを確認する目的で、 $\gamma$ サブユニットのSer<sup>47</sup>及びそれに相当する $\beta$ サブユニットのSer<sup>48</sup>に変異を導入し、活性が消失するか否かを検討した。

### 第3節 セリン残基置換による活性セリン残基の確認

#### 第1節 材料

site directed mutagenesis 用いたプライマーはサワディ社から購入した。その他の試薬、大腸菌は第2、3章に記述したもの、もしくはタカラ社、ファルマシア社の分子生物学研究用のものを用いた。

#### 第2節 方法

第2節で活性セリン残基の候補と考えられた $\gamma$ 及び $\beta$ サブユニットのSer<sup>47</sup>及びSer<sup>48</sup>をシステインに変換するために、以下のプライマーを合成した。

$\beta$  GCATCAACTGTACCATGCAGTCCCCCAGG

$\gamma$  GCTGGACCAAGCAGTCACCGATG

これらのプライマーは、各cDNAの活性セリン残基周辺におけるアンチセンスのうち、下線部の塩基がシステインのアンチコドンに対するものになっている。これと以下のプライマー(T7-SMA)(5'側に相当)を用いて、各cDNAコーディングを組み込んだpET-21a(第3章第2節-2(B))を鋳型としてPCRを行った。PCRにはpfuポリメラーゼを用いた。

T7-SMA GAAGCCCGGGCCACCATGGCTAGCATGACTGGTGGACAG

増幅産物を回収精製して新たなプライマーとし、3'側プライマーに以下の HisTag3 を用いて再度 PCR を行った。

HisTag3 TTAGCAGCCGGATCTCAGTGGTGG

増幅産物を回収精製し、EcoRI/SalI 処理した後再度精製した。同じ制限酵素処理した pET-21a と混合し、第3章第2節-2 (B)と同様の方法でライゲーション、トランスフォーメーション、シーケンシングによる確認、発現を行った。

### 第3節 結果と考察

図4-4に本節の結果をまとめた。通常、セリン酵素の活性セリン残基に変異を導入するときはシステイン残基に置換することが多い。システインは、セリンにおける水酸基をチオール基で置き換えた構造をしているので、最も全体の構造変化を引き起こさないと考えられるからである。 $\beta$ サブユニットにおける Ser<sup>46</sup> 及び  $\gamma$ サブユニットにおける Ser<sup>47</sup> をそれぞれシステインに変換した変異体では、Wild type とほとんど発現量は変化しないにもかかわらず、酵素活性は完全に消失していた。このことはこれらの残基が活性セリン残基であることを強く示唆している。もちろんこの変異導入によって高次構造が破壊されたために酵素活性が消失した可能性は本実験のみでは否定できない。しかし、以下の事実によってこれらが活性セリン残基であることは現在疑いないものとなっている。①当教室足立によってこのあとさらに多くの残基における変異体、及び欠失体が作製された。彼はさらにいくつかの観点 (DFP のとりこみ、ダイマー形成 (第5章参照)、抗体との反応性、PAF との結合性など) から、それらの変異が高次構造を崩すものであるか否かについて検討している。その結果からも本節で作製した変異体はネイティブな高次構造をほぼ完全に保っていることが示されている。② Virginia 大学の Derewenda 教授との共同研究により、本酵素

$\gamma$ サブユニットのX線構造解析が進行中である。それにより、Ser<sup>47</sup>は活性中心と考えられる位置に存在し、His<sup>192</sup>及びAsp<sup>195</sup>とcatalytic triadを形成していることがわかっている。これらの事実も含めて、 $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニット活性セリン残基はSer<sup>48</sup>及びSer<sup>47</sup>にまず間違いないと考えられる。

一般に活性セリン残基周辺にはGly-Xaa-活性Ser-Xaa-Glyというコンセンサス配列存在することが知られている(図4-5)(71, 72)。また、活性セリン残基はN末端から100残基から200残基にあること、さらにはcatalytic triadを形成するヒスチジン及びアスパラギン酸残基との間の距離も一定の範囲にあることも知られている(図4-6)(72, 81)。このことからほとんどのセリン酵素の活性部位はおそらく同一の起源をもつユニットであることが示唆されている。しかし、本章で行った活性セリン残基の同定及びこの後当教室足立によって決定されたcatalytic triadを形成するヒスチジン及びアスパラギン酸残基の同定の結果、PAFアセチルヒドロラーゼIbの二つの触媒サブユニットは多くのセリン酵素に見られるこの共通性をもっていないことがわかった(図4-5, 6)。同じPAFアセチルヒドロラーゼでも、ヒト血漿中に存在するもの(33, 76)、及び当教室服部研之によってクローニングされた細胞内PAFアセチルヒドロラーゼII型(77, 78)は、多くのセリン酵素と共通の性質を持っている(図4-5, 6)。これらのことから、PAFアセチルヒドロラーゼIbの二つの触媒サブユニットは、他のセリン酵素とは全く起源を異にし、恐らく立体構造も大きく異なっていると考えられる。現在解析最終段階にある3次元構造の結果もこの点を支持している。

このようにPAFアセチルヒドロラーゼIbだけが既知のセリン酵素と大きく異なる構造をもつ理由は明らかではない。しかし私は、この事実が、PAFアセチルヒドロラーゼIbが単なる分解酵素としてではな

く、何らかの複雑な活性制御(未だ明らかではないが)を通して、非常に重要な生体機能に関与している可能性を示唆していると考えている。それだからこそ、他のセリン酵素と構造を共有せず独自の進化を遂げたのではないかと考えることもできると思う。



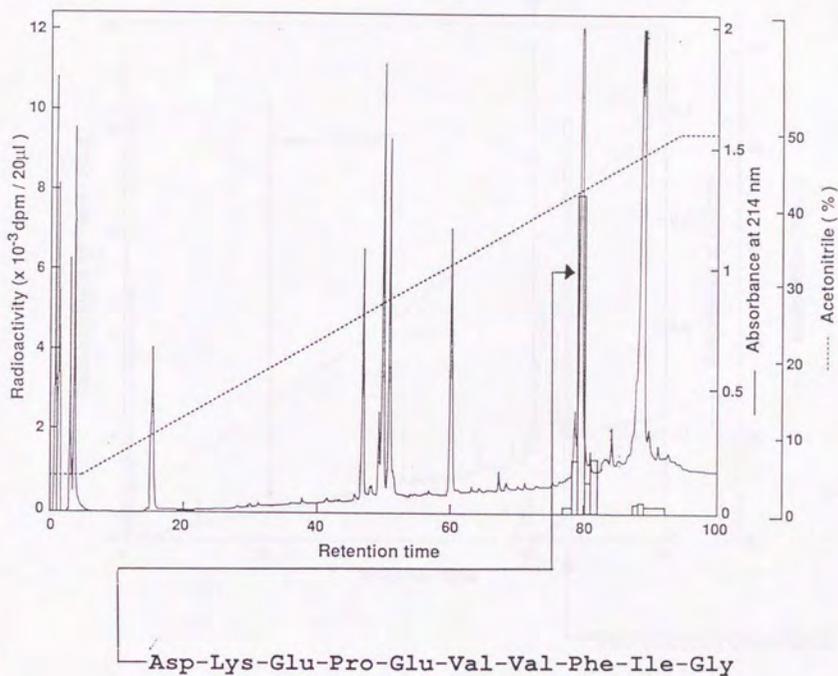


図4-2  $[^3\text{H}]\text{DFP}$ 処理後したリコンビナント $\gamma$ サブユニット蛋白をエンドプロテイナーゼLys-Cで限定分解後、HPLCで分離したときの溶出パターンと各ピークの放射活性。  
棒グラフが各ピーク画分の放射活性を示す。  
最も高い放射活性をもつピークのアミノ酸配列を図の下に示した。

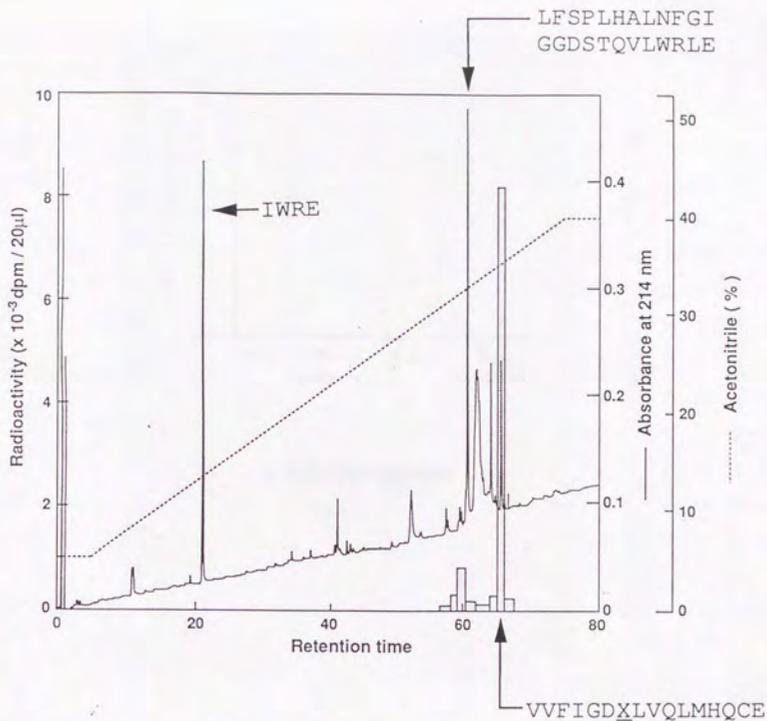


図4-3 図4-2の放射活性をもつピークをエンドプロテイナーゼGlu-Cで限定分解後、HPLCで分離したときの溶出パターンと各ピークの放射活性。棒グラフが各ピーク画分の放射活性を示す。各ピークのアミノ酸配列を図の中に示した。放射活性をもつペプチドのうち、同定できなかった残基(すなわちDFPによって修飾されていると考えられる)に下線をつけた。

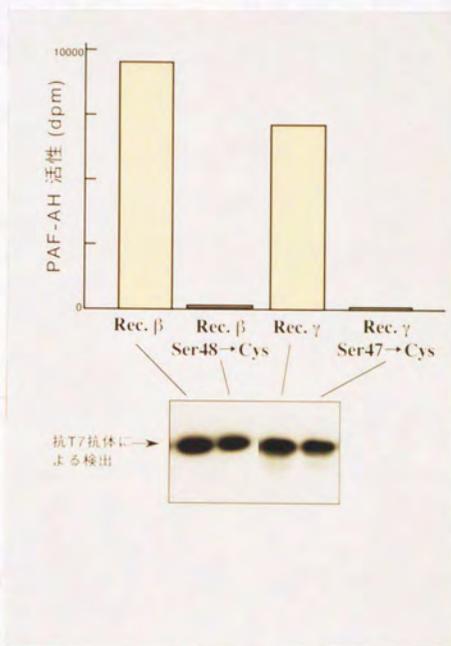


図4-4 活性セリン残基をシステイン残基で置換した変異体のPAFアセチルヒドロラーゼ活性。

上の棒グラフは大腸菌可溶性画分5 $\mu$ g相当を用いて20分、37 $^{\circ}$ CでインキュベーションしたときのPAFアセチルヒドロラーゼ活性を示す。下の図は、同じ画分100ng相当を用い、抗T7抗体を用いてイムノブロッティングを行った結果である。

ヘマグルチナーゼ	W	I	G	F	G	D	S	R	T	D	Q	S	N
cPLA2	T	Y	V	A	G	L	S	G	S	T	W	Y	M
細胞内PAF-AH(Ib)βサブユニット	V	L	F	V	G	D	S	M	V	Q	L	M	Q
細胞内PAF-AH(Ib)γサブユニット	V	V	F	I	G	D	S	L	V	Q	L	M	H
細胞内PAF-AH(II)	V	A	V	M	G	H	S	F	G	G	A	T	A
血漿PAF-AH	I	A	I	I	G	H	S	F	G	G	A	T	V
リゾPLA2	I	T	I	F	G	E	S	A	G	G	A	I	V
コレステロールエステラーゼ	I	T	L	F	G	E	S	A	G	G	A	S	V
アセチルコリンエステラーゼ	V	T	L	F	G	E	S	A	G	A	A	S	V
肝臓リパーゼ	V	H	L	I	G	Y	S	L	G	H	A	V	S
LCAT	V	F	L	I	G	H	S	L	G	C	L	H	L
膵臓リパーゼ	V	H	V	I	G	H	S	L	G	A	H	A	A
チオエステラーゼII	Y	N	A	M	G	F	S	Q	G	G	Q	F	L
カリクレイン	D	T	C	V	G	D	S	G	G	P	L	M	C
トリプシン	D	S	C	Q	G	D	S	G	G	P	V	V	C
エラスターゼ	S	S	C	N	G	D	S	G	G	P	L	N	C
コンセンサス配列					G		S		G				

↑  
活性セリン残基

図4-5 各種セリン酵素の活性セリン残基周辺のアミノ酸配列。最上上の段落にコンセンサス配列を持たない酵素を、中の段落に細胞内PAFアセチルヒドロラーゼの活性サブユニットを、下の段落に典型的なコンセンサス配列をもつ酵素を並べた。ヘマグルチナーゼはインフルエンザウイルス、細胞内PAFアセチルヒドロラーゼはウシ、リゾPLA2はラットの配列を用いている。それ以外はすべてヒトの配列を用いた。ただし、細胞内PAFアセチルヒドロラーゼについてはヒトでもここに示した配列は保存されている。LCAT: レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ

	活性部位を構成する アミノ酸残基の位置			残基間の距離	
	活性 Ser	Asp	His	Ser -Asp	Asp- His
細胞内PAF-AH(Ib) βサブユニット	48	193	196	145	3
細胞内PAF-AH(Ib) γサブユニット	47	192	195	145	3
細胞内PAF-AH(II)	236	259	314	23	55
血漿 PAF-AH	218	243	296	23	55
膵リパーゼ	152	176	263	24	87
リポプロテイン リパーゼ	132	156	241	24	85
トリグリセリド リパーゼ	144	203	257	59	54

図4-6 セリンエステラーゼの活性部位を構成するアスパラギン酸残基とヒスチジン残基の位置とその間の残基数。PAFアセチルヒドロラーゼIbの触媒サブユニットにおいて特徴的なところに網目をつけた。各残基の位置は、成熟型酵素のN末端からの残基数を表す。

## 第 5 章

### PAF アセチルヒドロラーゼ lb 各サブユニットに対する抗体の作製と、サブユニット構造に関する解析

#### 第 1 節 序

2章から4章までにおいて、PAF アセチルヒドロラーゼ lb 各サブユニットの一次構造を決定し、 $\beta$  及び  $\gamma$  サブユニットが触媒サブユニットであることを明らかにしてきた。しかし本酵素の生化学的な性質について次のような問題が未解決である。①本酵素の生体内分布やサブユニットのアセンブリー機構はどのようなものか？② $\alpha$  サブユニットの機能は何か？③PAF アセチルヒドロラーゼ lb ヘテロトリマーにおいて  $\beta$  及び  $\gamma$  サブユニットは常に活性を持っているのか？もしそうならなぜ DFP は  $\gamma$  サブユニットに優先的に取り込まれるのか？このような問題を解決していくためには、そのツールとしてよい抗体が是非とも必要となる。本章においてはまず、各サブユニットに対するモノクローナル及びポリクローナル抗体両方の作製及びそれを用いた若干の検討について記述した。第3節では、精製酵素及びリコンビナント蛋白への DFP の取り込みを検討し、ネイティブな酵素中で  $\beta$  及び  $\gamma$  サブユニットがどのように機能しているかについて考察した。第4節では、ネイティブな酵素及びリコンビナント蛋白を用いて、サブユニット間の相互作用、結合性について検討し本酵素のアセンブリー機構及びサブユニット構造をとる意義について考察した。

## 第2節 各サブユニットに対する抗体の作製

### 第2節-1 材料

$\beta$  及び  $\gamma$  サブユニットのリコンビナント蛋白の精製は第3章に示した。 $\alpha$  サブユニットを含む大腸菌の inclusion body はサントリー生物医学研究所の安達栄樹博士より御供与していただいた。免疫に用いた SPF マウス及びウサギは日本生物材料(株)より購入した。モノクローナル抗体のサブタイプ決定には Amersham の Isotyping kit を用いた。その他の試薬器具類は免疫学研究用若しくは生化学用のものを用いた。

### 第2節-2 方法

#### (A) 抗 $\gamma$ モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞の樹立

精製リコンビナント  $\gamma$  サブユニット(第3章第3節)約 100 $\mu$ g を complete adjuvant と混合し、BALB/c マウス(メス)の腹腔に注射した。これをおおむね2週間おきに少なくとも6回行った。ELISA 法によって血清中の抗体価が上昇(100,000 倍に希釈してもコントロール血清と差が認められる程度)していることを確認できたマウスより脾細胞を取り出し、polyethylene glycol (PEG) を用いた細胞融合法(82、83)によって、マウス由来ミエローマ細胞 PA1 (84) と細胞融合を行った。融合後、脾細胞  $1 \times 10^7$  個あたり1枚の 96 穴プレートにまきこんだ。各 well について ELISA 及びイムノブロットィングを行い、陽性クローンを同定した。

#### (B) 各サブユニットに対するポリクローナル抗血清の作製

$\alpha$  サブユニットについては大腸菌 W3110 に発現させたときに生じる inclusion body を、 $\beta$  及び  $\gamma$  サブユニットについては、第3章で精製したリコンビナント蛋白(タグの付加されていないもの)を免疫に用いた。ウサギは New Zealand 白色種を用い、背中に皮下注射を行った。

一回の免疫には少なくとも 200 $\mu$ g から 1mg 程度の各サブユニット蛋白に相当する量を免疫した。抗体価の上昇は ELISA によって確認した。

### 第2節-3 結果と考察

私は修士課程におけるときも、ウシ脳から精製した PAF アセチルヒドロラーゼ 1b 各サブユニットを免疫することで抗体の作製を複数回試みたが、どうしても得ることができなかった。当時はその理由が全くわからなかったが、現在、本酵素の一次構造は哺乳動物種間で非常に高く保存されていることがわかっており(7章参照)、本酵素の低免疫原性と関係あるのではないかと考えている。しかし、本酵素の生化学的解析を行うためにも、*in vivo* での本酵素の機能を調べるためにも、各サブユニット特異的抗体の作製は急務であった。そこでリコンビナント蛋白質を大量に免疫することで抗体価上昇を試みた結果、 $\gamma$  サブユニットに対するモノクローナル抗体を2株(1F4と6D3、ともに IgG1)及び各サブユニットに対するポリクローナル血清を樹立することができた。これらの抗体を用いたイムノブロットィングの結果を図5-1に示した。しかし、度重なる試行にもかかわらず、私自身は $\beta$ 及び $\alpha$ サブユニットに対するモノクローナル抗体を得ることはできなかった。(本年になって当教室増山が、免疫不全マウスに免疫することで $\beta$ サブユニットに対するモノクローナル抗体樹立に成功した。)不思議なことには、脾臓を摘出したマウスの血清抗体価は充分上昇していた場合でも、細胞融合を行うと全くポジティブクローンが全く検出されないことである。この原因は明らかではないが、本実験に用いた培養細胞にとって本酵素に対する抗体が毒性を持つ可能性も考えている。さらに非常に不思議なことは、 $\beta$ サブユニットと $\gamma$ サブユニットは60%以上の相同性を持つにもかかわらず、この両者を認識する抗体(ポリクローナル血清も含めて)は未だに全く得られないことである。両

者に共通する部分は3次構造中で内部に深く折り込まれているか( $\gamma$ サブユニットのX線構造解析の結果(85)はこれを支持していないと思われる)、共通部分に対する抗体は何等かの理由によって作られないと考えられるが、この問題は現在全く未解決である。共通部分に対するペプチド抗体の作製を試みると面白いのではないかと思うが、今後の課題である。

本節で作製した抗体を用いた、各サブユニットの分布などの免疫学的検討は本教室の渡邊(川本)によって行われ、彼女の修士論文に詳しく書かれている(86)ので本論文ではその結果を詳しくは述べないが、臓器分布は各サブユニットで大きく異なり、また、同じ臓器でも動物種間によって差違が見られる。このことは、本酵素各サブユニットがヘテロトリマーをつくらず単量体もしくはホモ複合体で存在している場合があることを示すとともに、それも状況に応じて刻々と変化していることを示唆していると考えられる。現在、当教室において培養細胞を用いて本酵素蛋白の存在量及び状態、さらにアセンブリーの機構に関する研究が進行中であり、この問題に対する答えも遠からず得られると期待している。

### 第3節 DFP 取り込みに関する検討

#### 第3節-1 材料

[ $^3\text{H}$ ]DFP (37.0 Mbq, 0.17 mM) 及びエンハンサー-EN<sup>3</sup>HANCE は Du-Pont-NEN より購入した。HPLC に用いた器具試薬類は第2章に記述したものと同一のものを用いた。PAF アセチルヒドロラーゼ 1b 及びその $\alpha$ サブユニットは第2章に記述した方法で精製した。リコンビナント $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニット蛋白は第3章に記述した方法で精製した。その他の試薬類はすべて生化学用もしくは和光純薬の特級レベルのものを使用した。

### 第3節-2 方法

[<sup>3</sup>H]DFPによるラベリングは次のように行った。精製蛋白質(特に高塩濃度であったり、特殊な溶媒でなければよい)に[<sup>3</sup>H]DFP溶液(in propylene glycol)を最高で1/10量加え、室温で30分、時折ボルテックスしながら放置した。SDS-PAGEのサンプリングバッファーを加え反応を止め、SDS-PAGEを行った。CBB染色後、エンハンサーで30分処理し、水洗後乾燥した。オートラジオグラフィ(-80°Cで1週間程度)を行い、DFPの取り込みを調べた。また、HPLCによる分離は、ラベリング後の反応液をそのまま試料とし、第2章第2節に記したのと同じ方法で行った。

### 第3節-3 結果と考察

一般に、DFPはセリンを活性中心とする酵素(主としてエステラーゼ、プロテアーゼ)の活性セリン残基と特異的に反応してこれを不活化することが知られている。DFPのこの性質を利用して、活性セリン残基をもつサブユニットの同定や活性セリン残基の同定が行われている(80, 81)。私も修士課程において精製PAFアセチルヒドロラーゼIbについて同様の実験を行った結果、 $\gamma$ サブユニットにのみ活性セリン残基が存在すると結論づけた。しかし、第4章までに述べたように、 $\beta$ サブユニットは $\gamma$ サブユニットと高い相同性を有し、実際リコンビナントの $\beta$ サブユニットはPAFアセチルヒドロラーゼを持っていた。このことから、ネイティブなPAFアセチルヒドロラーゼIbのヘテロトリマー中では $\beta$ サブユニットは機能していない可能性が考えられた。そこで本節ではDFPによるラベリング条件の再検討を行うとともに、HPLCによってDFPと反応した蛋白量の定量を試みた。図5-2にはいろいろな条件でDFPラベリングを行った結果を示した。この結果から、

ネイティブなPAFアセチルヒドロラーゼIb中の $\beta$ サブユニットにもDFPが結合し得るが、 $\gamma$ サブユニットの方に優先的に取り込まれることが示唆された。また、図5-3ではDFPと反応した蛋白量をHPLCによって定量した結果を示した。この結果わかったことは、DFPと反応する速度が、リコンビナント $\beta$ サブユニットとリコンビナント $\gamma$ サブユニットで異なっているということである。これらのことから、 $\gamma$ サブユニットは $\beta$ サブユニットに比べてDFPと反応しやすいという性質をもつことが強く示唆された。しかし、第3章第3節で述べたように、リコンビナントの $\beta$ サブユニットと $\gamma$ サブユニットのPAFアセチルヒドロラーゼ活性を比べると、 $\beta$ サブユニットの方が活性が強い。一般に、DFPとセリン酵素の反応性は酵素活性とは比例せず、その触媒部位とDFPの構造がどの程度フィットするかに依存すると考えられる。ネイティブなヘテロ複合体において $\beta$ と $\gamma$ サブユニットがどの程度全体の酵素活性に寄与しているか(その割合が条件によって変動することも充分考えられるが)は、本実験から推論することはできず、今後の課題である。

#### 第4節 サブユニット構造に関する検討

##### 第4節-1 材料

BS<sup>3</sup>はPierce社から購入した。セントリカット及びセントリコンは一一社から購入した。スーパーロース12FPLC用ゲル濾過カラムはファルマシア社から購入した。HRP標識二次抗体及び蛍光発色キットはAmersham社から購入した。抗 $\alpha$ サブユニット(LIS1遺伝子産物)モノクローナル抗体は現在Weizmann Institute(イスラエル)に所属するO. Reiner博士(LIS1遺伝子の発見者)から御供与していただいた。

#### 第4節-2 方法

##### (A) $\alpha$ サブユニットと $\beta/\gamma$ サブユニットの再結合

$\alpha$ サブユニット及び $\beta/\gamma$ ヘテロダイマーはウシ脳から第2章第2節に記した方法で精製した。リコンビナントの $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットは第3章第3節に記した方法で精製した。再結合を調べるためには、ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィ上での溶出位置のずれを観察した。ハイドロキシアパタイトは第2章第2節の方法と同様に行った。

##### (B) クロスリンキング

各サンプルは全て、クロスリンキングバッファー(100mM リン酸バッファー(pH8.0)、10%グリセロール)に透析するか、もしくは1N NaOHとpH試験紙を用いてpHを8.0程度に調節した。最終濃度2mMになるようにBS<sup>3</sup>を加え、室温で30分インキュベーションした後、SDS-PAGEを行った。イムノブロットィングの場合には、CBB染色の場合の1/10量をSDS-PAGEにアプライして行った。

##### (C) ゲル濾過によるみかけの分子量測定

サンプルはまず、セントリカットまたはセントリコンを用いて500 $\mu$ g/ml以上の濃度にまで濃縮した。バッファーは10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH(pH6.8)-10%グリセロールを用い、流速は0.3ml/minで行った。

##### (D) ウシ脳可溶性画分のイムノブロットィングによる分析

ウシ脳可溶性画分は第2章第2節に述べた方法で調整した。DEAE セファロース及びハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィは第3章のリコンビナント蛋白精製と場合と基本的に同じ条件で行った。ただしカラムサイズはどちらの場合も2.5 x 18cmで行った。

#### 第4節-3 結果と考察

私は修士課程において、PAF アセチルヒドロラーゼ lb 画分をヘパリ

ンセファロースまたは硫酸化セルロファイナカラムにアプライすることで、 $\alpha$ サブユニットが他の二つのサブユニットから分離することを見出した。もし、 $\alpha$ サブユニットが本酵素において調節的機能をもっているならば、この結合は可逆的である可能性が高いと考えられる。そこで本節ではまず、分離した $\alpha$ サブユニットが再び $\beta/\gamma$ サブユニットと結合できるか否か検討した。方法としては、ハイドロキシアパタイトカラムにおける溶出位置が $\alpha$ サブユニットと結合することで変化することを利用した(図5-9も参照)。その結果、図5-4に示したように、全てではないが、 $\alpha$ サブユニットと $\beta/\gamma$ サブユニットは再結合可能であることが明らかとなった。この事は、実際に細胞内においてもこのような会合/解離が起こっており、それによって何らかの機能調節が行われている可能性を示唆している。現在、培養細胞を用いた抗体染色を試みており、これによって実際に会合/解離が行われているかを知ることができるかもしれない。一方、プレリーミナリーには、リコンビナントの $\beta$ または $\gamma$ サブユニット蛋白と、脳から精製した $\alpha$ サブユニットは結合できないという結果を得た。何らかの条件下ではこれら単独のサブユニットとも結合できるという可能性も残されているが、もし $\beta/\gamma$ のヘテロダイマーだけが $\alpha$ サブユニットと結合できるとするならば、このことも本酵素の機能調節に重要であると考えられる。現在さらに詳しい解析を続行中である。

$\alpha$ サブユニットは $\beta/\gamma$ サブユニットヘテロダイマーと再結合できることがわかったが、リコンビナントの $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットを混合することでヘテロダイマーを形成させることができればさらに今後の解析が容易であると考えられる。そのためには $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットがそれぞれモノマーで存在することが前提となる。そこで、二つの方法、すなわちクロスリンク及びゲル濾過法によってこれらリコンビナントの $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットがモノマーなのか否かを検討した。また、

脳からの精製酵素においても同様の操作を行い、比較解析を行った。図5-5に、PAF アセチルヒドロラーゼ lb 及びリコンビナントの $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットをクロスリンカー-BS<sup>3</sup>で処理後 SDS-PAGE を行った結果を示した。lb をクロスリンカー処理すると、 $\alpha$ サブユニット(45kDa)のバンドはほぼ完全に消失し、新たに約 80kDa 及び約 110kDa のバンドが観察された。110kDa のバンドは lb の三つのサブユニットがクロスリンクされた結果生じたものであることが予想されたが、それは図5-6に示したイムノブロットィングの結果からも示された。すなわち、110kDa のバンドは $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ のどのサブユニットに対する抗体とも反応したからである。一方、80kDa のバンドは $\alpha$ 及び $\gamma$ サブユニットに対する抗体とのみ反応したことから、 $\alpha$ と $\gamma$ サブユニットがクロスリンクされた結果生じたバンドである可能性が示唆された。しかし、 $\alpha$ と $\beta$ サブユニットのみがクロスリンクされたバンドは観察されなかった。この結果が、「 $\alpha$ サブユニットと $\gamma$ サブユニットは直接相互作用しているが $\alpha$ と $\beta$ サブユニットは直近には存在しない」ということを示していると考えられることも可能である。しかし一般に、二つの蛋白質がクロスリンクされるか否かは、両者が直近に存在する以外にも、いくつかの要因(クロスリンクに必要な残基の有無や、クロスリンカーがちょうどフィットする構造かどうかなど)を必要とするので、断言することはできない。BS<sup>3</sup>以外のクロスリンカー(DSS、EGS、Sulfo-EGS、全て Pierce 社製)を用いて同様の実験を行ったが、どのサブユニットもほとんどクロスリンクされないという結果であった。この点を解決するには他の方法を用いた解析が必要かもしれない。また図5-6より、 $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットにおいては、かなりの割合がクロスリンクされずに元の位置にバンドが残る一方で、 $\alpha$ サブユニットのバンドはほとんど全てが高分子量にシフトしていることがわかった。精製した $\alpha$ サブユニット単独をクロスリンカー処理すると、やはり全てが高分子量

にシフトすることから (data not shown)、 $\alpha$  サブユニットは単独で存在するとアグリゲイトする性質があるのではないかと考えている。

図5-5に示したように、リコンビナントの $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットは、クロスリンカー処理によって新たに約60kDaのバンドを生じることから、ともにホモダイマーを形成していることが強く示唆された。また、図5-6の結果より、リコンビナントの $\beta$ サブユニットはさらに約80kDaのバンドをわずかながら生じていることから、ホモトリマーを形成しているものも存在する可能性も示唆された。第3章第3節に述べたように、リコンビナントの $\beta$ サブユニットは $\gamma$ サブユニットに比べてカラムクロマトグラフィ上でシャープなピークではなくブロードに溶出される。ホモダイマーとホモトリマーが混在していることが原因かもしれない。

上のクロスリンク実験の結果は、リコンビナント $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットの中にはホモダイマーを形成しているものがあることを強く示唆しているが、モノマーとして存在しているものがある可能性を否定してはいない。そこで各精製サンプルについて、ゲルろ過カラムによってみかけの分子量を算出した(もしダイマーとモノマーが混在するならば、ピークが二本観察されるか、もしくはみかけの分子量が両者の中間の値をとることが予想される)。私が修士課程において示したように、PAFアセチルヒドロラーゼIbのみかけの分子量は約100kDaであり、 $\alpha$ サブユニットを分離すると約60kDaになる(図5-7、A及びB)。一方、リコンビナントの $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットのみかけの分子量はともに約60kDaであることから(図5-7、C及びD)、両サブユニットは専らホモダイマーとして存在していることが強く示唆された。また、 $\beta$ サブユニットには主要なピーク以外にも高分子量より小さなピークが認められる(図5-7、D)が、これがホモトリマーのピークであるかもしれない(単にコンタミネーションしている別の蛋白質である可能

性もある。クロスリンク実験の場合とバッファーや pH が違うのでこの両者を比較することは難しい)。

以上の結果から、 $\beta$  及び  $\gamma$  サブユニットは、それぞれホモ複合体を形成する性質をもつことが判明した。ここで生じる問題は、実際の哺乳動物細胞内でもこのようなホモダイマーは存在するか否かということである。例えばやはり三つのサブユニットからなる酵素である Rab ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼの場合、そのうち二つは単独でも存在可能だが、他の一つは、動物細胞内は単独で存在せず、大量発現させても速やかに分解されていることが知られている。そして、このサブユニットの存在量が全体の複合体の存在量を規定していると考えられている。PAF アセチルヒドロラーゼ 1b においても同様なことがおきているであろうか？ または、ホモダイマーとヘテロダイマーに何らかの機能的差違が存在し、細胞はそのバランスを変化させることで機能調節をしているのかも知れない。このような点の解明を目指して、まず、ウシ脳可溶性画分をカラムクロマトグラフィによって分画し、各フラクションを各サブユニット特異的抗体によってイムノブロッティングによって解析した。図 5-8 に、ウシ脳可溶性画分を DEAE セファロースカラムによって分画したフラクションについて行った結果を示した。この場合、私が修士課程において見出したように、PAF アセチルヒドロラーゼ活性は二つのピーク (I と II) に分かれる。イムノブロッティングの結果より、 $\alpha$ 、 $\gamma$  サブユニットはともにピーク I の画分に存在しているが、そのパターンには多少の違いがある。次にこの画分を集め、ヒドロキシアパタイトカラムによって分画した。通常ヒドロキシアパタイトカラムを行うとき、コンディショニングバッファーの  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -KOH 濃度は 10mM であるが、この条件ではカラムを素通りする活性があることがあるので、本実験においては  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -KOH 濃度を 5mM からスタートした。また、溶出のグラジエント勾配を

緩やかにし、さらに1フラクションの液量を減らす(すなわち細かくわけ)事で、わずかな溶出位置の差も判別できるよう工夫した。結果を図5-9に示したが、PAF アセチルヒドロラーゼ活性は3本の大きなピークに分かれた。このうち、一番後ろのピーク( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -KOH 濃度約150mMで溶出される)は、私が精製した1bに相当する画分であるが、イムノプロットの結果からも、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットが存在していることがわかる(抗体の反応性が違うため、サブユニットの存在量を論じる事はできない)。また、真ん中のピーク( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -KOH 濃度約50mMで溶出される)はいわゆる1a画分であり、 $\beta/\gamma$ のヘテロダイマー(すなわち1bから $\alpha$ サブユニットがはずれたもの)であると考えられる。最も初めに、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -KOH 濃度約20mMで溶出されるピークは、この実験によってはじめて見出した画分であり、イムノプロットの結果からそのほとんどが $\gamma$ サブユニットであることがわかった。この溶出位置はリコンビナント $\gamma$ サブユニットの溶出位置(図3-6参照)に非常に近いことも、この画分が $\gamma$ サブユニットのホモダイマーからなっていることを示唆している。また、リコンビナント $\beta$ サブユニットが溶出される位置である付近にも、ピークにはなっていないがごくわずかながら、 $\beta$ のホモダイマーと思われる画分が存在する。これらの結果から、ウシの脳内にも $\beta$ もしくは $\gamma$ のホモダイマーが存在し、そしてヘテロダイマー( $\beta/\gamma$ 、すなわち1a)、さらにはヘテロトリマー( $\alpha/\beta/\gamma$ 、すなわち1b)が存在する事がわかった。ただし、これらが同一の細胞由来なのか、それとも個別の細胞はどれか一つしかもたないのかについては不明である。さらに、これらのサブユニットの組み合わせがどういった意味をもつのか、どういった機能の違いがあるのかについては現在まったく不明である。サブユニットの組み合わせによって基質特異性が異なったり、細胞内局在性が異なる可能性が考えられるので、今後培養細胞を用いた系で調べてみたい。第4章

で述べたように、活性セリン残基を置換して酵素活性を除いた変異体を遺伝子導入することによってドミナントネガティブ効果が得られれば、解決への糸口になるかもしれない。

以上本節の結果から、① $\alpha$ サブユニットは $\beta/\gamma$ ヘテロダイマーと可逆的に会合/分離を行う可能性があること② $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットはホモダイマーを形成する性質があること③そのようなホモダイマーが哺乳動物細胞中にも存在していることが明らかとなった。また、プレリミナリーな結果としては、 $\beta$ 、 $\gamma$ のホモダイマーは $\alpha$ サブユニットとは結合できないという知見も得た。これらの事実から本酵素の生理的意義に迫るべく、現在解析を続けている。

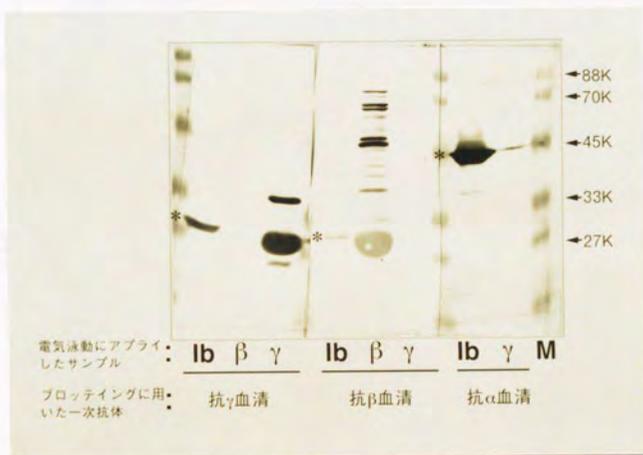


図5-1 各サブユニットに対するウサギ抗血清を用いたイムノブロットイング。12%SDS-PAGEによってウシ脳から精製したPAFアセチルヒドロラーゼlb、部分精製したリコンビナントβ及びγサブユニットを分離後、ニトロセルロース紙に移した。5%スキンミルク-TBSでブロッキング後、500倍の各抗血清を一次抗体とし、アルカリホスファターゼ標識抗ウサギIgGを二次抗体としてプロットイングを行った。発色はBioRad社のキットを用いて行った。アスタリスク(\*)がそれぞれのサブユニット由来のバンドを表す。

A



B

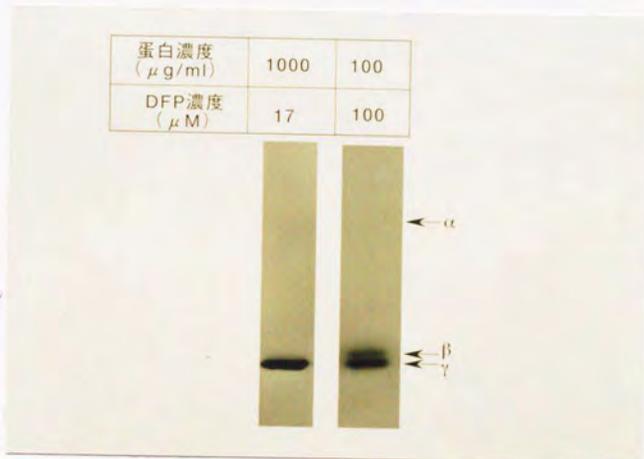


図5-2 様々な条件下におけるDFPラベリング実験。

A: ウシ脳から精製したlb酵素及びβ、γ各リコンビナント蛋白質をそれぞれ蛋白濃度100 $\mu\text{g/ml}$ 、DFP濃度17 $\mu\text{M}$ で室温30分反応させた後、SDS-PAGE、オートラジオグラフィを行ったもの。lbにおいては、殆どがγサブユニットに取り込まれている一方でβサブユニットにもわずかながら取り込まれている。両リコンビナント蛋白にはほぼ同程度取り込まれている。

B: ラベリング条件を変えて行ったもの。左のレーンはAに比べ蛋白濃度を10倍にしているが、この条件下ではβサブユニットにはほとんど取り込まれない。右のレーンでは、Aに比べてDFP濃度が約6倍になっており、βサブユニットにもかなり取り込まれている。

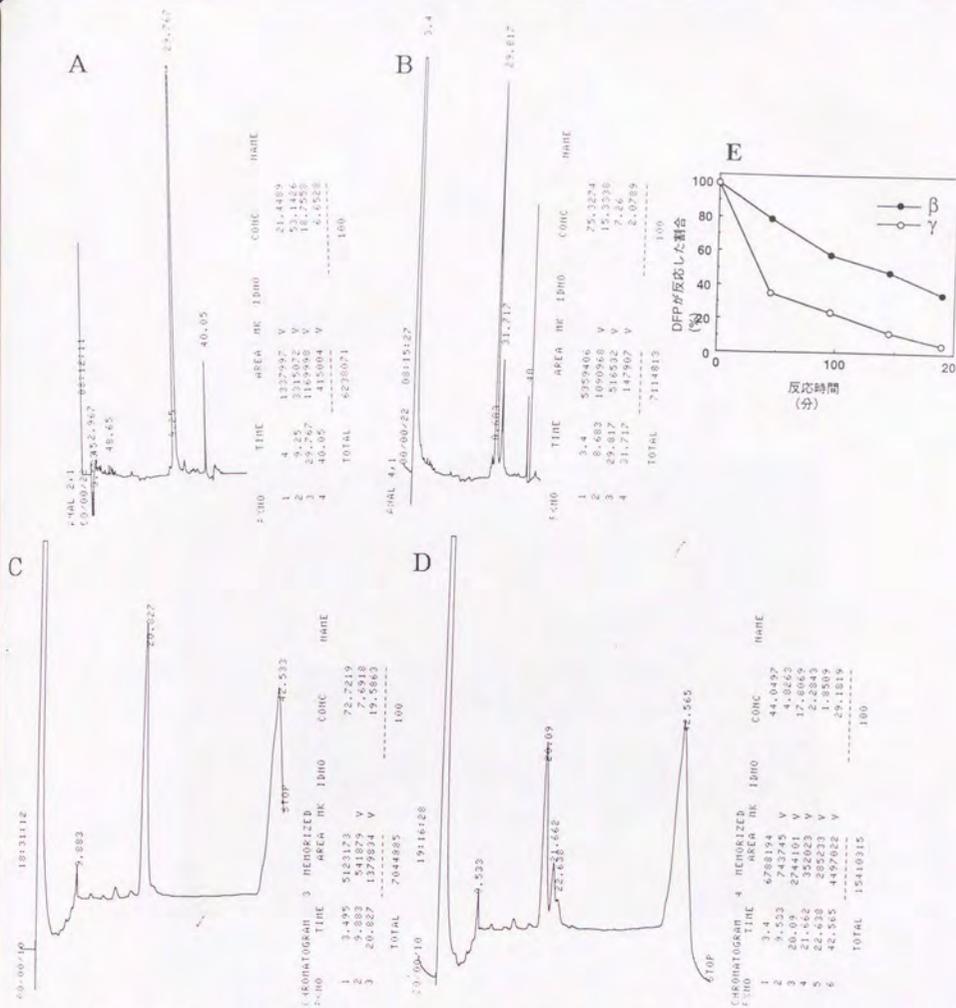


図5-3 HPLCによるDFPとリコンビナント蛋白の反応の定量。

A~D: HPLC溶出パターンの例。

A: リコンビナントβサブユニット(DFPと反応させる前)

B: 2mM DFP、45分、0°C処理したリコンビナントβサブユニット  
(29.7minのピークが未反応、31.7minのピークがDFPと反応したβサブユニット)

C: リコンビナントγサブユニット(DFPと反応させる前)

D: 2mM DFP、45分、0°C処理したリコンビナントγサブユニット  
(20.7minのピークが未反応、22.2及び23.2minのピークがDFPと反応したβサブユニット)

E: DFPとの反応性のタイムコース

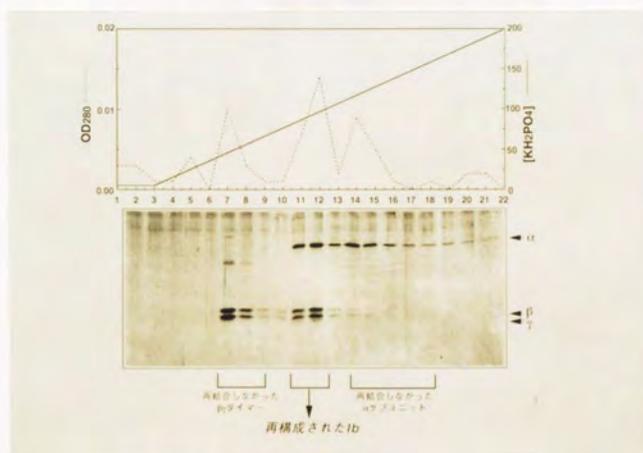


図5-4 ハイドロキシアパタイトカラムによる、 $\alpha$ サブユニットと $\beta/\gamma$ ダイマーとの再結合の検討。精製した $\alpha$ サブユニット(240 $\mu$ g)と $\beta/\gamma$ ダイマー(170 $\mu$ g)を混合し、ハイドロキシアパタイトカラム(1.0 x 8cm)にアプライした。溶出はリン酸カリウムの直線的グラジエント(50mlずつ)で行い、5mlずつフラクションを集めた。上のグラフは吸光度とリン酸カリウム濃度をあらわし、下の図は各フラクションを12%SDS-PAGE(銀染色)で分析したものである。

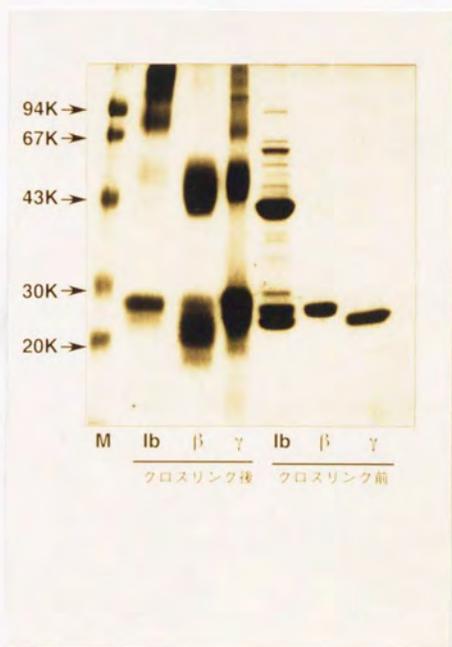


図5-5 BS<sup>3</sup>によるクロスリンク実験。PAFアセチルヒドロラーゼlb、及びリコンビナントのβ及びγサブユニットをBS<sup>3</sup>とインキュベーション後12%SDS-PAGEによって分離し、CBB染色した。

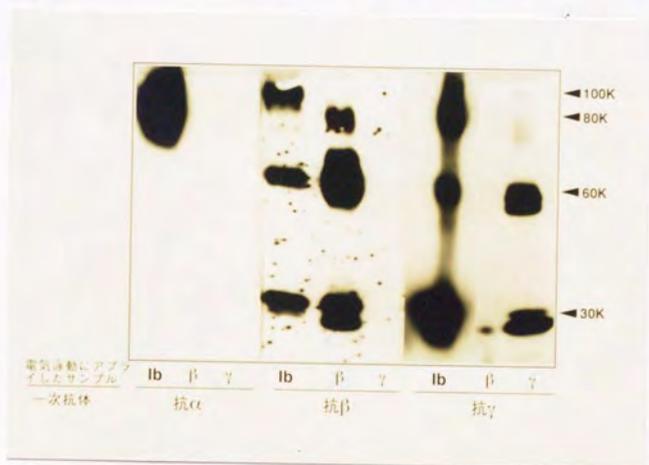


図5-6 BS<sup>3</sup>によるクロスリンキング後、イムノブロッティングを行ったもの。12%SDS-PAGEまでは図5-6と同様に行った後ニトロセルロース紙にトランスファーした。5%スキนมilク-TTBSでブロッキング後、gサブユニットに対してはモノクローナル抗体1F4、他は抗血清を用いてブロッティングした。二次抗体はHRP標識抗マウス（またはウサギ）IgGを用い、発色はAmersham社のECLキットを用いた。

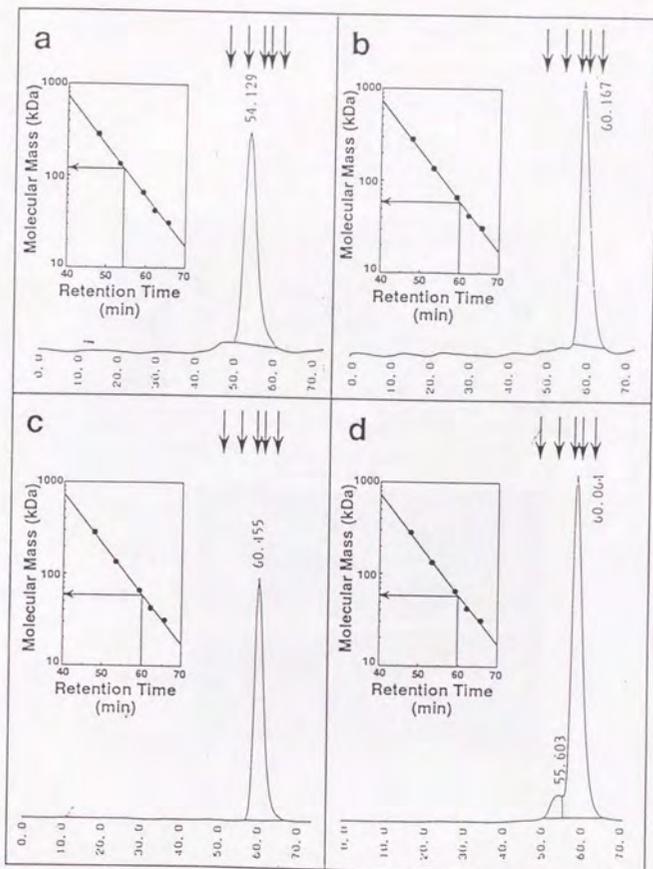


図5-7 スーパーロース12FPLCゲル濾過カラムによる見かけの分子量算出。

a: ウシ脳から精製したPAFアセチルヒドロラーゼlb

b: lbから $\alpha$ サブユニットを除いたもの

c: リコンビナント $\beta$ サブユニット

d: リコンビナント $\gamma$ サブユニット

矢印は分子量マーカーの溶出位置 (左から290kDa、140kDa、67kDa、43kDa、32kDa) を示し、挿入図は見かけの分子量算定を表す。

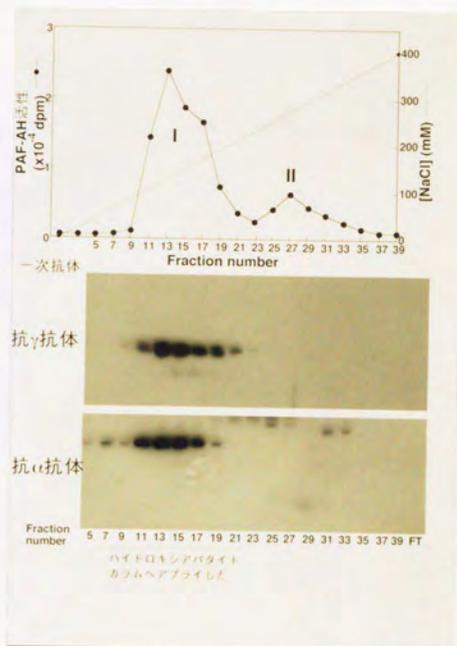


図5-8 ウシ脳可溶性画分をDEAEセファロースカラムクロマトグラフィで分画したあと、イムノブロッティングを行ったもの。  
 各フラクションをSDS-PAGE後、ニトロセルロース紙にトランスファーし、抗γモノクローナル抗体1F4またはウサギ抗α血清を一次抗体としてブロッティングを行った。

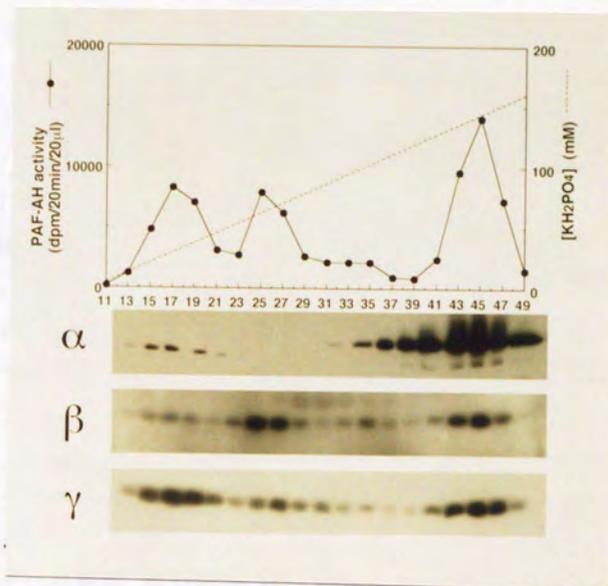


図5-9 DEAEセファロースカラムにおけるpeak I画分をヒドロキシアパタイトクロマトグラフィで分画したあと、イムノブロッティングを行ったもの。

各フラクションをSDS-PAGE後、ニトロセルロース紙にトランスファーし、抗 $\gamma$ モノクローナル抗体1F4、抗 $\beta$ モノクローナル抗体（当教室増山による）、及び抗 $\alpha$ モノクローナル抗体（O.Reiner博士より）を一次抗体としてブロッティングを行った。

## 第 6 章

### PAF アセチルヒドロラーゼ Ib の $\alpha$ サブユニットは Miller-Dieker 症候群の原因遺伝子産物である

#### 第 1 節 序

第 5 章までに述べてきたように、細胞内 PAF アセチルヒドロラーゼ Ib は  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の三つのサブユニットからなり、このうち  $\beta$  及び  $\gamma$  サブユニットは触媒活性をもつことがわかっている。一方、 $\alpha$  サブユニットは  $\beta/\gamma$  ヘテロダイマーと可逆的に結合することから、本酵素の生理的意義において何らかの調節的役割を演じていることが示唆されるが、その詳細は不明である。 $\alpha$  サブユニットの cDNA クローニングを行った結果、本サブユニットは WD-40 リピートという興味深い構造をもつことがわかったが、この構造の機能も不明であることから、一次構造から  $\alpha$  サブユニット (そして本酵素の) の生理的機能に迫るのは難しいかと思えた。しかし、 $\alpha$  サブユニットの一次構造が明らかになった約半年後、Nature 誌に掲載された Reiner らの論文 (51) が私達には非常に衝撃的であった。彼らはこの論文で、ヒトの先天性の脳形態形成不全の一種で、いくつかの家系に頻発することから遺伝性ではないかと思われていた病態、Miller-Dieker 症候群の原因遺伝子をつきとめ、それにコードされるであろう蛋白質の一次構造を発表した。彼らは純粋に遺伝学的手法でこの遺伝子を同定したため、その産物がどのような機能をもつのかについて全く予想することはできなかった。しかし、その一次構造はウシの PAF アセチルヒドロラーゼ Ib  $\alpha$  サブユニットと 1 残基を除いて完全に一致していたのである。このことは、私がクローニングした PAF アセチルヒドロラーゼ  $\alpha$  サブユニットの遺伝子はウシにおける LIS1 遺伝子のホモログであること、すなわち PAF アセ

チルヒドロラーゼ $\alpha$ サブユニットの欠損が Miller-Dieker 症候群という病態の発症につながることを意味している。本章では、 $\alpha$ サブユニット及び PAF アセチルヒドロラーゼと Miller-Dieker 症候群の関連についてまとめ、考察した。また、 $\alpha$ サブユニットの構造と機能に関して考えられる可能性についても考察した。

## 第2節 Miller-Dieker 症候群の原因遺伝子 LIS1 と

### PAF アセチルヒドロラーゼ Ib $\alpha$ サブユニット

図6-1にウシのPAFアセチルヒドロラーゼIb $\alpha$ サブユニットとヒトにおける Miller-Dieker 症候群原因遺伝子 LIS1(滑脳症を意味する英語の lissencephaly から名付けられた)から予想される産物のアミノ酸配列比較及び、cDNA における塩基配列の相同性を示した。両者はアミノ酸配列において410残基中1残基を除いて完全に一致しているだけでなく、cDNA の非翻訳領域における核酸配列も非常に高い相同性を示しており、ウシとヒトにおいて対応する遺伝子であることは疑いがないと言える。なお、このあと全く別のグループによってマウスの LIS1/PAF アセチルヒドロラーゼ Ib  $\alpha$ サブユニット遺伝子がクローニングされた(58)。それによると、マウスとウシはアミノ酸配列が完全に一致(すなわちヒトとは1残基のみ異なる)しており、今まで報告されている蛋白質の中でも最もよく保存されている蛋白質の一つであると位置付けられている。

Miller-Dieker 症候群は、脳の形態形成不全の中でも滑脳症と呼ばれる一群の病態の一つに分類される。滑脳症の発症率は数十万人に一人程度であり、そのうち Miller-Dieker 症候群は10~20%を占めるといわれている(48-50)。この滑脳症は脳の形態形成の中でも比較的後期にあたる神経細胞移動という現象が正常に行われなかったために生じる病態である(図6-2)。哺乳動物の脳の発生過程では、脳室層にお

いて細胞分裂を終えた神経芽細胞が次々と表層側に移動して皮質層を形成する(図6-3)。この神経細胞移動という現象は分子的にはほとんど解明されておらず(reviewed in ref. 87, 88)、NCAM や L1 などの細胞接着因子(89, 90)、actin や astrotactin などの細胞骨格成分(91-93)、その他 N 型カルシウムチャンネル(94) や NMDA 受容体(95) などが関与することが間接的に示されているにすぎない。グリア細胞がレールの役目をすると考えられるグループが多い一方で、グリア細胞は無関係とする考え方も根強い(96)。Miller-Dieker 症候群など滑脳症の患者ではこの細胞移動過程に異常があるために皮質層が肥厚せず、結果として脳回(いわゆる脳のしわ)が形成されず、表面がのっぺりとした脳をもって生まれる(図6-4)。Miller-Dieker 症候群は、脳の他にも顔面にも特徴的な奇形を伴う病態で、ほとんどは生後1年以内に死亡する。この病態はいくつかの家系でよく見出されることから、劣勢遺伝である可能性がかなり以前から疑われていた。1990年になって、患者の90%以上において、17番染色体短腕の最もテロメアに近い部位(p13.3 部位)に部分欠失が認められることが発見され、この部位に原因遺伝子が存在するのではないかと考えられた(48, 49)。一方、三量体 G 蛋白質  $\beta$  サブユニット(典型的な WD-40 リポート蛋白質)と相同性をもつ蛋白質を検索した別のグループがある未知の遺伝子をクローニングしたが、これが17番染色体 p13.3 部位にマッピングされることから Miller-Dieker 症候群の原因遺伝子ではないかと考えた(51)。そして、Reiner らは実際に複数の患者において異なったタイプでこの遺伝子が欠損していることを見出し、これが Miller-Dieker 症候群の原因遺伝子であると結論し、この遺伝子を LIS-1(滑脳症を表す英語の lissencephaly からとった)と名付けた(51)。その後別のグループによって、Miller-Dieker 症候群患者の脳ではこの LIS1 遺伝子産物の発現がほとんど見られないことも報告された(97)。以上のような事実か

ら、LIS1/PAF アセチルヒドロラーゼ 1b  $\alpha$ サブユニット遺伝子の欠損によって Miller-Dieker 症候群が発症すると考えられた。

さて、なぜ PAF アセチルヒドロラーゼ 1b の  $\alpha$ サブユニットが欠損すると Miller-Dieker 症候群が発症するのであろうか。これはすなわち、PAF アセチルヒドロラーゼ及び PAF が神経細胞移動という現象にどのような形で関与するかということであるが、神経系における PAF の機能の研究はまだ始まったばかりである上に、神経細胞移動は分子的にはほとんど未知と言ってよい現象である。第1章にも記したように、PAF は *in vitro* において神経細胞の分化を促したり、growth cone を退縮させたりする効果があることが報告されているし、それ以外にも PAF が神経細胞に対して何らかの効果を表すことを示唆する報告は多い。しかし問題であるのは、これらは全て外因性の PAF によって刺激する実験であるが、PAF 受容体は脳において神経細胞にはほとんど発現しておらず、主としてミクログリア細胞に高発現しているということである(98)。このことは、脳神経細胞における PAF の機能を考えるとき、PAF が細胞外の受容体に結合し、細胞内の情報伝達系が動くというモデルはあてはまらないということを意味している。さらには、PAF はリン脂質であり、しかもその合成にかかわる酵素群についてクローニング等一切なされていないため、蛋白性のメディエーターにおいてよく行われる実験、すなわち遺伝子導入による過剰発現や、抗体染色及び *in situ* ハイブリダイゼーションによる存在部位(時期)、機能部位(時期)の特定などの手段がとれない。それゆえに、実際の脳において PAF がいつ、どの部位でどの程度産生され、どの程度存在しているのかという基本的な情報が全く存在していない。これらの事実を考えあわせると、「PAF の神経細胞移動における関与」を論じるのは時期尚早すぎるのかもしれない。しかし私は、特に神経系においては PAF が、インターロイキンや各種栄養因子のように細胞外伝達物質と

してではなく、サイクリック AMP やイノシトールリン酸のような細胞内伝達物質として機能しているのではないかと考えている。現在「細胞内 PAF 受容体」を想定しているグループは少数派であるが、例えば PAF によって活性化されるキナーゼや、PAF と結合することによって核へ移行して転写活性化を行う因子が存在している可能性がないとはいえない。PAF は膜に存在するリン脂質から 2 段階で生成できるので、細胞膜近くの情報を他の場所へ伝達するためにはメリットがあるとも考えられる。そのような因子が存在するとすると、細胞内 PAF アセチルヒドロラーゼはその情報を Shut off する酵素としての機能を果たしていると考えられるだろう。 $\alpha$ サブユニットは PAF によって機能を調節されている蛋白質との結合に必要なのかもしれない。今後、two hybrid system などを用いて $\alpha$ サブユニットと相互作用を行う蛋白質の検索を行っていくことが、本酵素を含むシグナル伝達経路の解明につながるかも知れない。

### 第3節 PAF アセチルヒドロラーゼ 1b $\alpha$ サブユニットの 構造に関する考察

第2章及び本章で述べたきたように、 $\alpha$ サブユニットはその構造中に WD-40 リピート (59, 60) という特徴的なくり返し構造をもつ (図 2-11, p27)。WD-40 リピートをもつ代表的な蛋白質の構造模式図と考えられている機能を図 6-5 に示したが、蛋白によってリピートの数や位置はまちまちであり、また、各蛋白質中のリピート間で保存されている残基も様々である。最近、三量体 G 蛋白質の立体構造が相次いで報告されたが (99-101)、その結果から、三量体 G 蛋白質  $\beta$  サブユニットはプロペラのような構造をしており、WD-40 リピートはその羽に相当する部分を構成していることが明らかとなっている。また、 $\alpha$ サブユニットとの相互作用には 7 回の WD-40 リピートのうち主として N 末

端側の3回分が重要であることもわかっており、残りのリピートを使って他の蛋白質との相互作用を行っている可能性も示唆されている。PAF アセチルヒドロラーゼ Ib の  $\alpha$  サブユニットの WD-40 リピートも基本的には同様の構造をとると考えられるが、7回のリピートのうち4番目のリピートのあとに約30残基からなる挿入配列があり、この部分の意義は興味深い。この挿入配列部位は水溶性が高く、セリン、スレオニン残基に富んでいるので、リン酸化を受けて何らかの機能変化を誘導する部位ではないかと想像している(実際、細胞内では  $\alpha$  サブユニットの一部はリン酸化されているらしい(102))。

WD-40 リピートが結合する相手として、PH (pleckstrin homology) ドメインが候補の一つとして挙げられている(68)ので、いくつか PH ドメインをもつ蛋白質を選び、 $\alpha$  サブユニットとのニトロセルロース上における結合を調べてみた(図6-6)(70)。その結果、 $\alpha$  サブユニットは細胞骨格成分の  $\beta$  -スベクトリンとかなり強く結合することを見出した。このような結合が実際に起きているか否かは不明であるが、このような細胞骨格成分と相互作用することによって本酵素の局在性を調節している可能性も考えられる。また、最近、PH ドメインの機能に関しては、イノシトールリン脂質を結合するドメインであるとか(93, 94)、ダイマー形成に必要であるとか(95)、特定の膜画分との結合に必要である(96)とか、リン酸化されたセリン/スレオニン残基を含む配列に結合する(66)などの知見もあり、立体構造(97)からも、必ずしも WD-40 リピートの相手としてのみ捉えるのは間違いであると考えられるほうが多い。今後は、いろいろな可能性を考えつつ、例えば yeast two-hybrid system などを用いて  $\alpha$  サブユニットと相互作用する蛋白質を検索することが必要であろう。

現在  $\gamma$  サブユニット蛋白質の X 線構造解析が進行中である。現在考えられる  $\gamma$  サブユニットの立体構造モデルを図6-7に示したが、第4

章でも述べたように、本サブユニットは既知のセリンエステラーゼとは共通の構造をもたず、むしろ三量体 G 蛋白質の  $\alpha$  サブユニットや低分子量 G 蛋白質とトポジカルに類似した構造をもつことが明らかとなった。これがどういう意味をもつのかは今後の検討を待つしかないが、PAF アセチルヒドロラーゼ 1b も、G 蛋白質のように、様々な蛋白質との相互作用や自身の構造変化によってシグナル伝達において重要な役割を担っていることを示唆していると考えている。また、 $\alpha$  サブユニットの立体構造を解析する事で触媒サブユニット ( $\beta/\gamma$  サブユニット) との相互作用する部位などを特定できれば、本酵素の機能を理解するための有用な情報となるだろう。

ヒトLIS-1産物  
ウシPAF-AH  $\alpha$

```

1  MVLVSRQRDELNRAIADYLRNNGYEEAYSVFKKEAELDMNEELDKKYAGLLE
1  -----V-----

53  KKWTSVIRLQKKVMELESKLNAAKEEFTSGGPLGQKRDPKEWIPRPPEKYA
53  -----

104  LSGHRSPVTRVIFHPVFSVMVSASEDATIKVWDYETGDFERT
104  -----

146  LKGHTDSVQDISFDHSGKLLASCADMTIKLWDFQGFEICIRT
146  -----

188  MHGHDHNVSSVAIMPNGDHIVSCSNDQTVRMWEVQTSYCVRT
188  -----

230  FTGHRWVRMVRPNQDGTLIASCNSNDQTVRVVVVATKECKAE
230  -----

272  LREHEHVVECISWAPESSYS
272  -----

292  SISEATGSETKKSGKPGPFLLSGSRDRTIKMWDVSTGMCLMT
292  -----

334  LVGHDNWVRGVLFFHSGGKFIKSCADDKTLRVWDYKKNKRCMT
334  -----

376  LNAHEHFVTSLDFHKTGPYVVVTGSVDQTVKWECCR*
376  -----

```

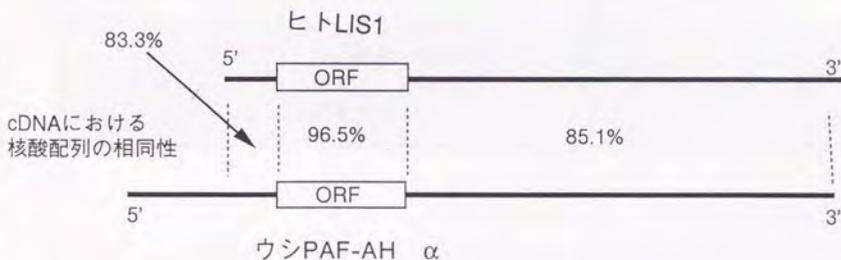


図6-1 ヒトLIS-1産物とウシPAFアセチルヒドロラーゼIbの $\alpha$ サブユニットの amino 酸配列及びcDNA核酸配列の比較。amino 酸配列はWD-40リピートがわかるように配列した。ハイフンは同一amino 酸を示す。

ORF: open reading frame

発生過程	現象	異常によって生じる病態
(1) 初期誘導過程 (胎生2～6週)	神経板形成に始まり、 神経管形成、終脳や間 脳の形成、交連板形成 まで	無脳症 全前脳胞症 脳梁欠損症 など
(2) 脳室クモ膜下腔 の発生 (胎生3～6週)	脈絡叢、クモ膜下腔形成	水頭症 など
(3) 細胞増殖 (胎生7～8週)	未分化細胞が分裂増 殖して神経芽細胞と なる	小脳形成不全 など
(4) 神経細胞移動 (胎生6～40週)	神経芽細胞が分裂増殖し 神経細胞となりDNA合成 能を失う。	水無脳症 裂脳症 など
	神経細胞が表層へ 移動し、皮質板が 肥厚する。	滑脳症 (Miller-Dieker症候群) など

図 6 - 2 ヒトの脳の発生過程と先天異常

表層(外側)

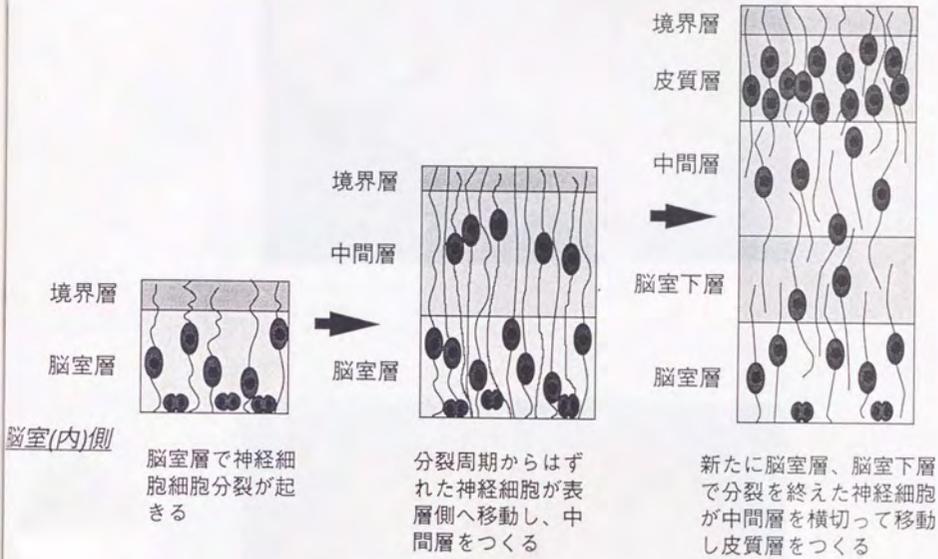


図 6 - 3 大脳形成における神経細胞移動のモデル図

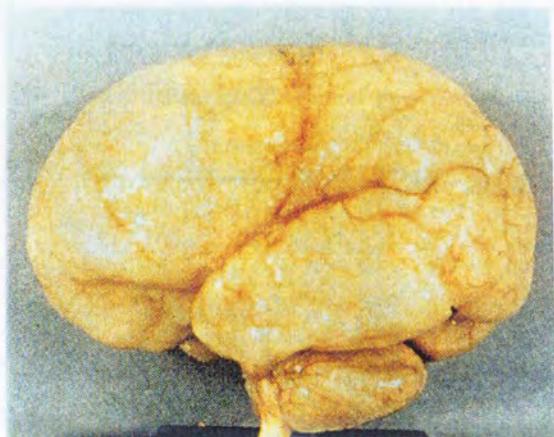
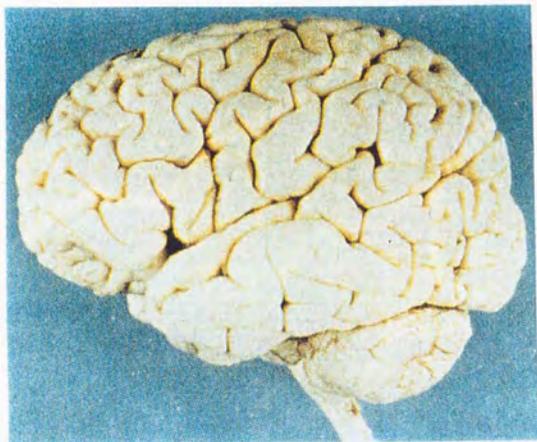


図6-4 正常なヒトの脳（上）と、Miller-Dieker症候群患者の脳（下）。  
Miller-Dieker症候群患者においては、脳回がほとんど認められない

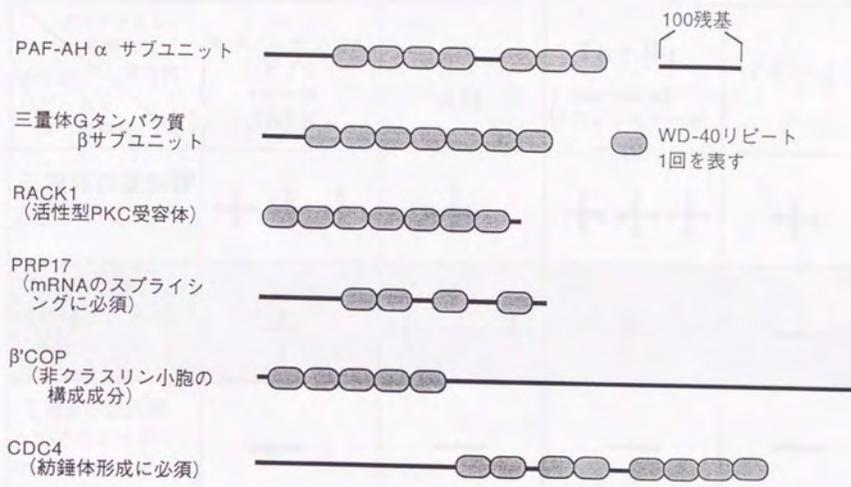


図6-5 WD-40リピートをもつ蛋白質の構造と機能の例

PHドメイン を持つ WD-40 リピートを 持つ蛋白質	$\beta$ -アドレナジック レセプター キナーゼ ( $\beta$ ARK)	スペクトリン $\beta$ 鎖	Tec IIa (Src-related チロシンキナーゼ)	ダイナミン
三量体G蛋白質 $\beta$ サブユニット	+++	+	+++	+
PAFアセチル ヒドロラーゼ $\alpha$ サブユニット	+	+++	+	—
三量体G蛋白質 $\gamma$ サブユニット (WD-40を持たない)	—	—	—	—

図6-6 PAFアセチルヒドロラーゼ $\alpha$ サブユニットとPHドメインをもつ蛋白質との結合性。

PHドメインを持つ蛋白質のリコンビナント蛋白質をSDS電気泳動後、ニトロセルロース紙にトランスファーし、 $\alpha$ サブユニットをoverlayした。その後、抗 $\alpha$ 血清を用いて検出した。

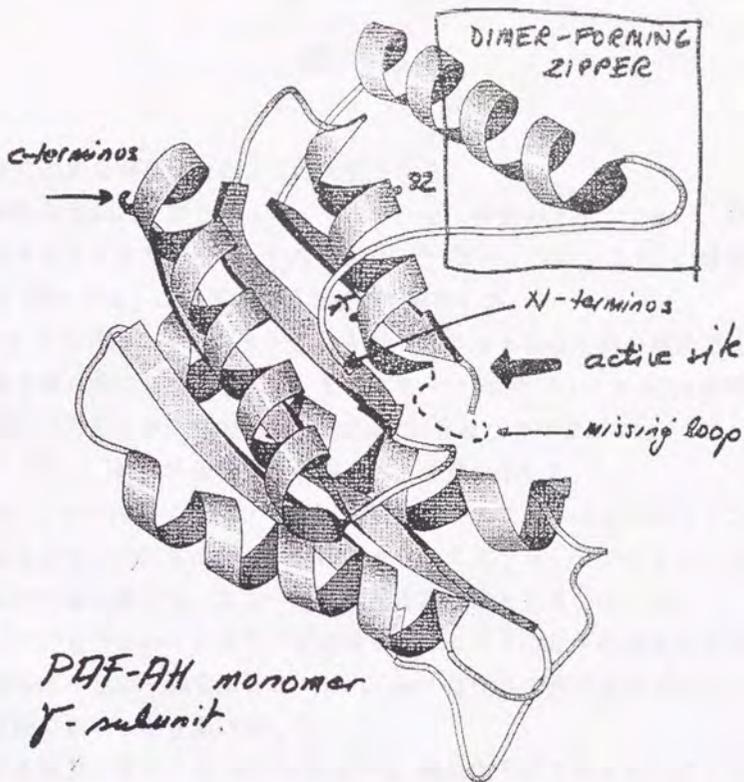


図6-7 X線構造解析から得られた $\gamma$ サブユニットの立体構造モデル。  
 missing loopと記した部位の構造はまだ決定していない。右上の四角で囲んだ部  
 分は、ダイマー形成に必要なジッパー構造であると推定している。

## 第 7 章

### 総 括

本研究の主な内容は次のように大別できる。

①細胞内型の PAF アセチルヒドロラーゼに複数のアイソフォームが存在することを見出し、そのうちの一つ(アイソフォーム 1b)の精製及び cDNA クローニングに世界で初めて成功した。

②PAF アセチルヒドロラーゼ 1b がサブユニット構造を持つ酵素である事を明らかにした。そして、そのうち一つ( $\alpha$ サブユニット)は触媒活性には恐らく無関係であり、他の二つ( $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニット)はともに(恐らく独立に)触媒活性を担うことを見出した。

③PAF アセチルヒドロラーゼ 1b の触媒サブユニットはともにセリン残基を活性中心にもつが、いわゆるセリンエステラーゼファミリーの酵素とは全く異なる、ユニークな構造を持つことを見出した。

④PAF アセチルヒドロラーゼの $\alpha$ サブユニットはヒトの先天性の脳形態形成不全の一種である Miller-Dieker 症候群の原因遺伝子(LIS1)の産物であることを見出した。

私が本研究に着手した 1991 年時点では、細胞内 PAF アセチルヒドロラーゼについては単独の酵素であるかどうかもわかっておらず、いくつかの酵素学的知見が報告されていた(22-25)だけであり、正確な分子量さえもわかっていなかった。ヒト血漿中の PAF アセチルヒドロラーゼ(細胞外型)については精製が報告され(27)、生化学的及び酵素学的性質が詳しく調べられていた(26、28-32)が、cDNA クローニングは行われておらずその構造については全く不明であった。しかし、そのころから、PAF 及び PAF 様リン脂質(脂肪酸鎖が酸化修飾を受け水溶性が増したリン脂質など)が細胞内外で様々な生物活性をもつことが

次々と報告されはじめ、このようなリン脂質性メディエーターの代謝経路を解明することの重要性は非常に高まった。PAF アセチルヒドロラーゼについては、この5年間で本研究及び、当研究室服部研之による細胞内PAF アセチルヒドロラーゼII型の精製及びcDNAクローニング(77、78)、Tjoelkerらによる血漿PAF アセチルヒドロラーゼのcDNAクローニング(33)などにより、その構造はほぼ明らかとなったが、PAF合成系の酵素については依然として分子的には不明であり、今後の研究が待たれるところである。特に細胞内におけるPAF(またはPAF様リン脂質)の機能を考える上では、PAF代謝経路の分子的な解明は不可欠であろう。

図7-1に現在考えられるPAFアセチルヒドロラーゼIbの構造模式図を示した。第6章に記したように、X線構造解析の結果から、 $\gamma$ サブユニットは三量体G蛋白質の $\alpha$ サブユニットやp21Rasに類似した立体構造をもつことが明らかとなっている。また、PAFアセチルヒドロラーゼの $\alpha$ サブユニットとG蛋白質の $\beta$ サブユニットはともにWD-40リピートを7回もち、N末端にリピート外配列をもつという点で類似している(図6-5)。これらが何を意味しているかは不明であるが、本酵素もG蛋白質と同様にサブユニットの分離/会合を行い、それぞれがまた他の蛋白質と相互作用する事によって複雑なシグナル伝達系を構成することを示唆しているのではないかと考えている。PAFアセチルヒドロラーゼIbのサブユニット全ての一次構造が、動物種間で驚くほど良く保存されている(図7-2)という事実(58、86、108、109)は、本酵素がいろいろな細胞成分と相互作用して、その活性などが微妙に調節されていることを意味しているのではないかと考えている。なぜならば、単なる分解酵素はもちろん、ホスホリパーゼA2群の酵素でも本酵素ほど種間で保存されている蛋白質は全く無いからである。最後に、本酵素の機能的な位置付けを、神経細胞移動を例にとりて考

察してみたい(図7-3)。本酵素がその存在量を調節している PAF が、はたして細胞外に放出されて別の細胞に作用する(もしくは細胞膜にとどまり、隣接した細胞に作用する(110、111))のか、または細胞内にとどまるのかについては全く不明である。しかし私は、PAF が細胞内において何らかの機能をもつという可能性が高いのではないかと考えている。現在、細胞内における PAF 受容体を想定するグループも存在するが(16、112-114)、その実態は全く明らかではない。その上 PAF はリン脂質であるために、細胞内の局在性を調べる事が非常に難しい。しかし私は例えば PAF を結合して活性化されるキナーゼや、性質変化を起こす細胞骨格系蛋白などが存在するかもしれないと考えている。また、三量体 G 蛋白質との類似性を考えると、「PAF アセチルヒドロラーゼ 1b そのものが細胞内 PAF 受容体である」という可能性も考えられる。つまり、PAF アセチルヒドロラーゼ 1b に PAF が結合することによってサブユニット構造の変化が引き起こされ、それによって例えば  $\alpha$  サブユニットが遊離して他の細胞成分に作用するということがある。これらの可能性はどれも実験的な裏付けはなく、他にも様々な経路を想像することができるが、とにかくこのような細胞内メッセンジャーとして PAF が機能する事で、最終的な遺伝子発現の誘導や、細胞骨格または膜蛋白質などのダイナミズムの変化によって、神経細胞移動などが引き起こされるのではないかと考えている。今後、本酵素の各サブユニットの機能をさらに解析し、分子生物学的、遺伝学的検討を行うことで、PAF を中心とする未知なるシグナル伝達経路の解明につながると考えている。

【本文終わり】

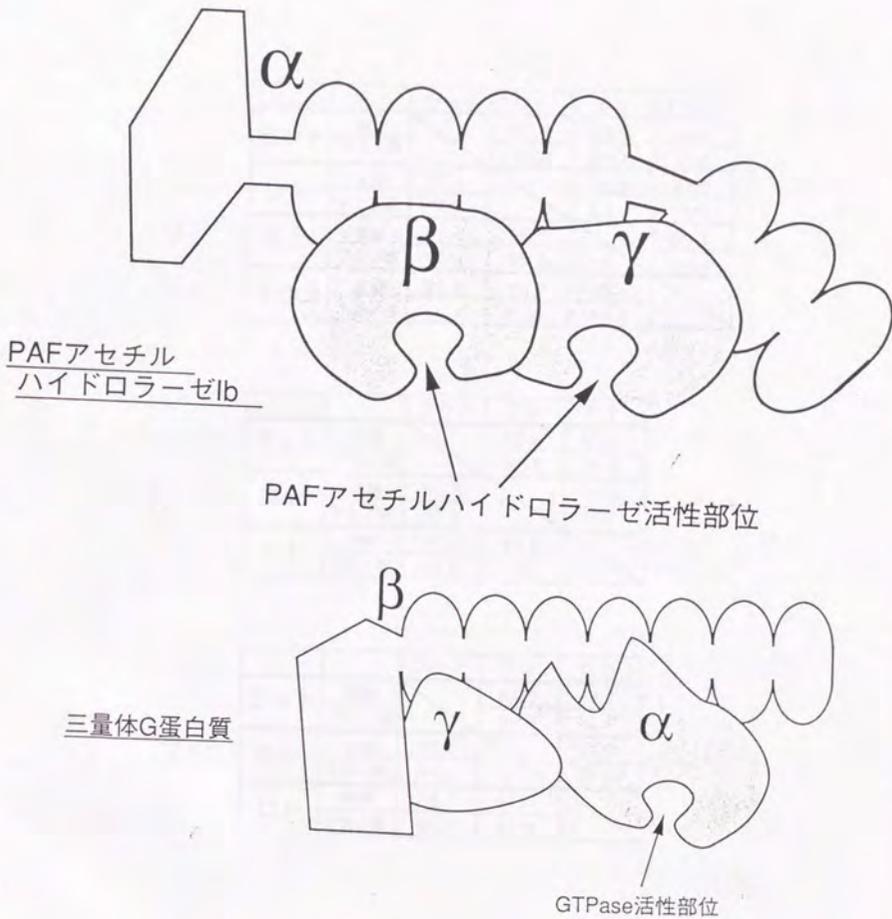


図7-1 PAFアセチルハイドロラーゼIbの構造模式図(上)と、三量体G蛋白質との比較。

卵型はWD-40リピート一回を表わす。三量体G蛋白質においては、 $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットはWD-40リピート部分で結合し、 $\beta$ と $\gamma$ サブユニットはWD-40リピート以外の部分で結合していることがわかっているが、PAFアセチルハイドロラーゼIbにおいては、WD-40リピートがどの程度サブユニット間相互作用に寄与しているかは不明である。

α

		ラット	ウシ	ヒト	マウス
ラット	核酸	100	95.4	95.6	98.6
	アミノ酸		100	99.8	100
ウシ	核酸	95.4	100	96.8	94.7
	アミノ酸	100		99.8	100
ヒト	核酸	95.6	96.8	100	95.1
	アミノ酸	99.8	99.8		99.8
マウス	核酸	98.6	94.7	95.1	100
	アミノ酸	99.8	100	99.8	

β

		ラット	ウシ	ヒト
ラット	核酸	100	92.8	91.4
	アミノ酸		99.6	99.6
ウシ	核酸	92.8	100	94.2
	アミノ酸	99.6		100
ヒト	核酸	91.4	94.2	100
	アミノ酸	99.6	100	

γ

		ラット	ウシ	ヒト
ラット	核酸	100	86.6	88.7
	アミノ酸		94.8	96.1
ウシ	核酸	86.6	100	91.1
	アミノ酸	94.8		97.0
ヒト	核酸	88.7	91.1	100
	アミノ酸	96.1	97.0	

(%)

図7-2 PAFアセチルヒドロラーゼIb各サブユニットの、哺乳動物種間における相同性。  
当研究室川本(渡辺)の修士論文より転載した。

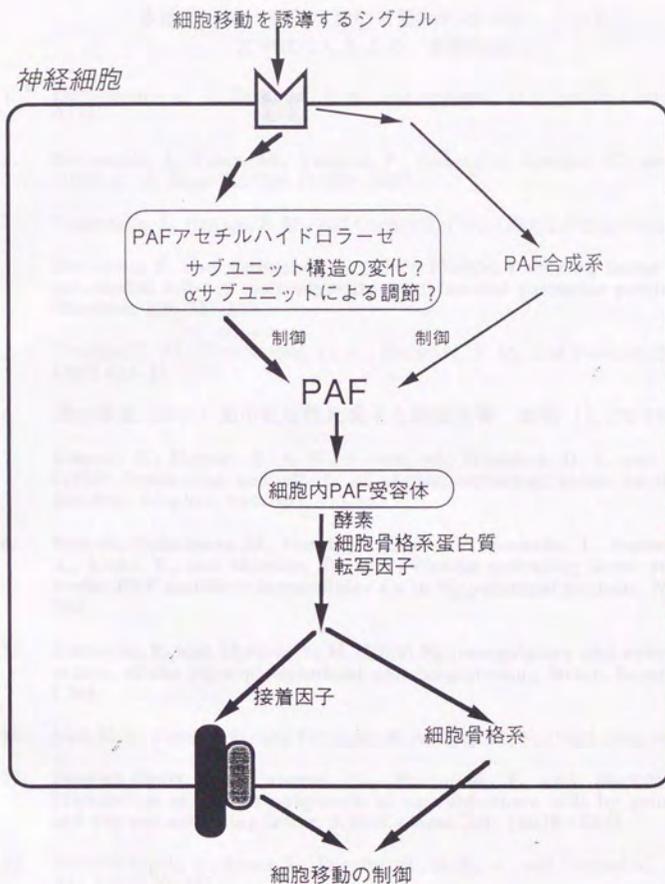


図7-3 PAFアセチルヒドロラーゼ1bの機能的な位置付け。  
 詳しくは本文参照。神経細胞移動を例にとって表したが、本酵素はかなり普遍的に存在していることから、この図に描いたようなシグナル伝達経路は様々な細胞において起こっていると考えている。

## 参 考 文 献

本論文と特に関係が深いと思われるものについては、  
太字体にした上で、表題も記した

1. Demopoulos, C. A., Pinckard, R. N., and Hanahan, D. J. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 9355
2. Benveniste, J., Tence, M., Varenne, P., Bidault, J., Bouleet, C., and Polonsky, J. (1979) *C. R. Acad. Sci. Ser. D.* **289**, 1037
3. Benveniste, J., Henson, P. M., and Cochrane, C. G. (1972) *J. Exp. Med.* **136**, 1356
4. **Bussolino, F. and Camussi, G. (1995) Platelet-activating factor produced by endothelial cells: A molecule with autocrine and paracrine properties. *Eur. J. Biochem.* **229**, 327-337**
5. Venable, E. M., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., and Prescott, S. M. (1993) *J. Lipid Res.* **34**, 691
6. 清水孝雄 (1994) 血小板活性化因子と細胞応答 炎症 **14**, 175-183
7. Kumar, R., Harvey, S. A. K., Kester, M., Hanahan, D. J., and Olson, M. S. (1988) Production and effects of platelet-activating factor in the rat brain. *Biochim. Biophys. Acta* **963**, 375-383
8. Bito, H., Nakamura, M., Honda, Z., Izumi, T., Iwatsubo, T., Seyama, Y., Ogura, A., Kudo, Y., and Shimizu, T. (1992) Platelet-activating factor receptor in rat brain: PAF mobilizes intracellular Ca in hippocampal neurons. *Neuron* **9**, 285-294
9. Kornecki, E. and Ehrlich, Y. H. (1988) Neuroregulatory and neuropathological actions of the ether-phospholipid platelet-activating factor. *Science* **240**, 1792-1794
10. Ved, H. S., Gustow, E., and Pieringer, R. A. (1991) *J. Neurosci. Res.* **30**, 353
11. Herrick-Davis, K., Camussi, G., Bussolino, F. and Baglioni, C. (1991) Modulation of neurite outgrowth in neuroblastoma cells by protein kinase C and platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* **266**, 18620-18625
12. Francescangeli, E., Freisz, L., Dreyfus, H., Boila, A., and Gorraci, G. (1993) *NATO ASI Series* **70**, 373
13. Yue, T-L, Lysko, P. G., and Feuerstein, G. (1990) Production of platelet-activating factor from rat cerebellar granule cells in culture. *J. Neurochem.* **54**, 1809-1811
14. Sogos, V., Bussolino, F., Pilia, E. and Gremo, F. (1990) Acetylcholine-induced production of platelet-activating factor by human fetal brain cells in culture. *J. Neurosci. Res.* **27**, 706-711
15. Clark, G. D., McNeil, R. S., Bix, G. J., and Swann, J. W. (1995) Platelet-activating factor produces neuronal growth cone collapse. *NeuroReport* **6**, 2569-2575

16. Kato, K., Clark, G. D., Bazan, N. G., and Zorumski, C. F. (1994) *Nature* 367, 175
17. Snyder, F. (1995) Platelet-activating factor: the biosynthetic and catabolic enzymes. *Biochem. J.* 305, 689-705
18. Snyder, F. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1254, 231-249
19. Ninio, E., Breton, M., Bidault, J., and Colard, O. (1991) *FEBS let.* 289, 138
20. Uemura, Y., Lee, T-L., and Snyder, F. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 8268
21. Ihara, Y., Frenkel, R. A., and Johnston, J. M. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* 304, 503
22. Blank, M. L., Lee, T-L., Fitzgerald, V., and Snyder, F. (1981) A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (a hypotensive and platelet-activating lipid). *J. Biol. Chem.* 256, 175-178
23. Blank, M. L., Hall, M. N., Cress, E. A., and Snyder, F. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113, 666
24. Yanoshita, R., Kudo, I., Ikizawa, K., Chang, H. W., Kobayashi, S., Ohno, M., Nojima, S. and Inoue, K. (1988) Hydrolysis of platelet-activating factor and its methylated analogs by acetylhydrolase. *J. Biochem.* 103, 815-819
25. Stafforini, D. M., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., and McIntyre, T. M. (1991) *Lipids* 26, 979
26. Stafforini, D. M., McIntyre, T. M., Carter, E., and Prescott, S. M. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 4215
27. Stafforini, D. M., Prescott, S. M., and McIntyre, T. M. (1987) Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: purification and properties. *J. Biol. Chem.* 262, 4223-4230
28. Stremmler, K. E., Stafforini, D. M., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., and McIntyre, T. M. (1989) An oxidized derivative of phosphatidylcholine is a substrate for the platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma. *J. Biol. Chem.* 264, 5331-5334
29. Stafforini, D. M., Elstad, M. R., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., and Prescott, S. M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 9682-9687
30. Stremmler, K. E., Stafforini, D. M., Prescott, S. M., and McIntyre, T. M. (1991) Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: oxidatively fragmented phospholipids as substrates. *J. Biol. Chem.* 266, 11095-11103
31. Tarbet, E. B., Stafforini, D. M., Elstad, M. R., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., and Prescott, S. M. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 16667-16673
32. Yamada, Y., Stafforini, D. M., Imaizumi, T., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., and Prescott, S. M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10320
33. Tjoelker, L. W., Wilder, C., Eberhardt, C., Stafforini, D. M., Dietsch, G.,

- Schimpf, B., Hooper, S., Trong, H. L., Cousens, L. S., Zimmerman, G. A., Yamada, Y., McIntyre, T. M., Prescott, S. M. and Gray, P. W. (1995) Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 374, 549-553
34. Bazan N. G. (1995) A signal terminator. *Nature* 374, 501-502
  35. Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Mehra, M., and Prescott, S. M. (1990) Endothelial cell-associated platelet-activating factor: a novel mechanism for signaling Intercellular Adhesion. *J. Cell. Biol.* 110, 529-540
  36. Riches, D. W., Young, S. K., Seccombe, J. F., Henson, J. E., Clay, K., and Henson, P. M. (1990) The subcellular distribution of platelet-activating factor in stimulated human neutrophils. *J. Immun.* 145, 3062-3070
  37. Ninio, E., Leyravaud, S., Bidault, J., Jurgans, P., and Benveniste, J. (1991) *Int. Immun.* 3, 1157
  38. Lorant, D. E., Patel, K. D., McIntyre, T. M., McEver, R. P., Prescott, S. M., and Zimmerman, G. A. (1991) Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J. Cell Biol.* 115, 223-234
  39. Bussolino, F. and Camussi, G. (1995) *Eur. J. Biochem.* 229, 337
  40. Hattori, M., Arai, H. and Inoue, K. (1993) Purification and characterization of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J. Biol. Chem.* 268, 18748-18753
  41. Inoue, K., Arai, M. and Hattori, M. (1994) PAF acetylhydrolase from mammalian tissues. *J. Lipid Mediators Cell Signaling* 10, 13-16
  42. Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H. and Inoue, K. (1994) Miller-Dieker lissencephaly encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 370, 216-218
  43. Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H. and Inoue, K. (1994) The catalytic subunit of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase is a novel type of serine esterase. *J Biol. Chem.* 269, 23150-23155
  44. Hattori, M., Adachi, H., Aoki, J., Tsujimoto, M., Arai, H. and Inoue, K. (1995) Cloning and expression of a cDNA encoding the  $\beta$ -subunit (30-kDa subunit) of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J. Biol. Chem.* 270, 31345-31352
  45. Miller, J. Q. (1963) Lissencephaly in two siblings. *Neurology* 13, 841-847
  46. Dieker, H., Edwards, R. H., Rhein, G., Chou, S. M., Hartman, H. A., and Opitz, J. M. (1969) *Birth Defects* 5, 53
  47. Jones, K. L., Gilbert, E. F., Kaveggia, E. G., and Opitz, J. M. (1980) *Pediatrics* 66, 277
  48. Dobyns, W. B., Curry, C. J. R., Hoyme, H. E., Turlington, L., and Ledbetter, D. H. (1991) Clinical and molecular diagnosis of Miller-Dieker syndrome. *Am J.*

49. Ledbetter, S. A., Kuwano, A., Dobyns, W. B., and Ledbetter, D. H. (1992) Microdeletions of chromosome 17p13 as a cause of isolated lissencephaly. *Am. J. Hum. Genet.* **50**, 182-189
50. Dobyns, W. B., Reiner, O., Carrozzo, R., and Ledbetter, D. H. (1993) Lissencephaly: a human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13. *JAMA* **270**, 2838-2842
51. Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustinella, F., Dobyns, W. B., Caskey, C. T., and Ledbetter, D. H. (1993) Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein  $\beta$ -subunit-like repeats. *Nature*, **364**, 717-721
52. Reiner, O., Albrecht, U., Gordon, M., Chianese, K. A., Wong, C., Gal-Gerber, O., Sapir, T., Siracusa, L. D., Buchberg, A. M., Caskey, T. and Eichele, G. (1995) Lissencephaly gene (LIS1) expression in the CNS suggests a role in neuronal migration. *J. Neurosci.* **15**, 3730-3738
53. 服部光治 (1993) 生体内における酸化リン脂質分解反応の解析 修士論文
54. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY.
55. Lee, C. C., Wu, X., Gibbs, R. a., Cook, R. G., Muzhy, D. M., and Caskey, C. T. (1988) *Science* **239**, 1288
56. Kwiatkowski, T., Zoghbi, H. Y., Ledbetter, S. A., Ellison, K. A., and Chinault, A. C. (1990) *Nuc. Acid Res.* **18**, 7191
57. Isola, N. R., Harn, H. J., and Cooper, D. L. (1991) *BioTechniques* **11**, 580
58. Peterfy, M., Gyuris, T., Basu, R., and Takacs, L. (1994) Lissencephaly-1 is one of the most conserved proteins between mouse and human: a single amino-acid difference in 410 residues. *Gene* **150**, 415-416
59. van der Voorn, L. and Ploegh, H. L. (1992) *FEBS Let.* **307**, 131
60. Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R. M., and Smith, T. F. (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**, 297-380
61. Fong, H. K. W., Hurley, J. B., Hopkins, R. S., Miake-Lye, R., Johnson, M. S., Doolittle, R. F., and Simon, M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2162
62. Duronio, R. J., Gordon, J. L., and Boguski, M. S. (1992) *Proteins* **13**, 41
63. Mayer, B. J. and Baltimore, D. (1993) *Trends Cell Biol.* **3**, 8
64. Goebel, M. and Yanagida, M. (1991) *Trends Biol. Sci.* **16**, 173
65. Musacchio, A., Gibson, T., Rice, P., Thompson, J., and Saraste, M. (1993) The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. *Trends Biol. Sci.* **18**, 343-348

66. Gibson, T. J., Hyvonen, M., Musacchio, A., and Saraste, M. (1994) PH domain: the first anniversary. *Trends Biol. Sci.* 19, 349
67. Cohen G. B., Ren, R., and Baltimore, D. (1995) Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* 80, 237-248
68. Wang, D-S., Shaw, R., Winkelmann, J. C., and Shaw, G. (1994) Binding of PH domains of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase and  $\beta$ -spectrin to WD40/ $\beta$ -transducin repeat containing regions of the  $\beta$ -subunit of trimeric G-proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 29-35
69. Neer, E. J. (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80, 249-257
70. Wang, D-S., Shaw, R., Hattori, M., Arai, H., Inoue, K., and Shaw, G. (1995) Binding of pleckstrin homology domains to WD40/ $\beta$ -transducin repeat containing segments of the protein product of the Lis-1 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 622-629
71. Brenner, S. (1988) The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature* 334, 528-560
72. Derewenda, Z. S. and Derewenda, U. (1991) *Biochem. Cell. Biol.* 69, 842-851
73. pET system manual. (Novagen technical Bulletin)
74. Main, A. R. (1964) *Science* 144, 992
75. Vlasak, R., Muster, T., Lauro, A. M., Powers, J. C., and Palese, P. (1989) *J. Virol.* 63, 2056
76. Tjoelker, L. W., Eberhardt, C., Unger, J., Trong, H. L., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Stafforini, D. M., Prescott, S. M. and Gray, P. W. (1995) Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad. *J. Biol. Chem.* 270, 25481-25487
77. Hattori, K., Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H. and Inoue, K. (1995) Purification and characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase II from bovine brain. *J Biol. Chem.* 270, 22308-22313
78. Hattori, K., Adachi, H., Tsujimoto, M., Hattori, M., Aoki, J., Arai, H. and Inoue, K. manuscript in preparation.
79. Sharp, J. D., Pickard, R. T., Chiou, X. G., Manetta, J. V., Kovacevic, S., Miller, J. R., Varshavsky, A. D., Roberts, E. F., Striffler, B. A., Brems, D. N., and Kramer, R. M. (1994) *J. Biol. Chem.* 260, 23250-23254
80. Juahainen, M. and Dolphin, P. J. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 7032
81. Derewenda, Z. S. (1994) Structure and function of lipases. *Adv. Protein. Chem.* 45, 1-52
82. Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, New York.

83. モノクローナル抗体 谷口 克編(1988) 実験医学 6, 10
84. Tamatani, T. and Miyasaka, M. (1990) *Int. Immunol.* 2, 165-171
85. Ho, J. and Derewenda, Z. S., personal communication.
86. 渡邊(川本) 真知子 (1996) PAF アセチルヒドロラーゼ lb の生体内分布 修士論文
87. Lauffenburger, D. A. and Horvitz, A. F. (1996) Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369
88. Rakic, P. and Caviness Jr, V. S. (1996) Cortical development: view from neurological mutants two decades later. *Cell* 14, 1101-1104
89. Choung, C. M., Croissin, K. L., and Edelman, G. M. (1987) *J. Cell Biol.* 104, 331
90. Linder, J., Rathjen, F. G., and Schachner, M. (1983) *Nature* 305, 427
91. Mitchison, T. J., and Cramer, L. P. (1996) Actin based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84, 371-379
92. Fishell, G., and Hatten, M. E. (1991) *Development* 113, 755
93. Zheng, C., Heintz, N., and Hatten, M. E. (1996) *Science* 272, 417
94. Komuro, H., and Rakic, P. (1992) *Science* 257, 806
95. Komuro, H., and Rakic, P. (1993) *Science* 260, 95
96. Lois, C., Garcia-Verdugo, J., and Alvarez-Builla, A. (1996) *Science* 271, 978
97. Mizuguchi, M., Takashima, S., Kakita, A., Yamada, M. and Ikeda, K. (1995) Lissencephaly gene product: Localization in the central nervous system and loss of immunoreactivity in Miller-Dieker Syndrome. *Am. J. Pathology* 147, 1142-1151
98. 清水孝雄ら、personal communication.
99. Wall, A. M., Coleman, D. E., Lee, E., Iniguez-Liuhi, J. A., Posner, B. A., Gilman, A. G., and Sprang, S. R. (1995) *Cell* 83, 1047
100. Lambright, D. G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N. P., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. (1996) *Nature* 379, 311
101. Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D. G., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. (1996) *Nature* 379, 369
102. Sapir, T., Leeor, A., and Reiner, O. (1996) New facet of LIS1 gene product function: interaction with microtubules. manuscript submitted.
103. Cifuentes, M. E., Delaney, T. and Rebecchi, M. J. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 1945
104. Yagisawa, H., Hirata, M., Kanematsu, T., Watanabe, Y., Ozaki, S., Sakuma, K., Tanaka, H., Yabuta, N., Kamata, H., Hirata, H. and Nojima, H. (1994) *J. Biol. Chem.*

105. Ellis, M. V., Carne, A., and Katan, M. (1993) *Eur. J. Biochem.* 213, 339
106. Davis, L. H. and Bennett, V. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 4409
107. Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J., and Sigler, P. B. (1994) Crystal structure at 2.2Å resolution of pleckstrin homology domain from human dynamin. *Cell* 79, 199-209
108. Adachi, H., Tsujimoto, M., Hattori, M., Arai, H., and Inoue, K. (1995) cDNA cloning of human cytosolic platelet-activating factor acetylhydrolase  $\gamma$ -subunit and its mRNA expression in human tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214, 180-187
109. Albrecht, U., Abu-Issa, R., Ratz, B., Hattori, M., Aoki, J., Arai, H., Inoue, K., and Eichele, G. (1996) Expression and activity of platelet-activating factor acetylhydrolase subunits during brain development reveal a link between Miller-Dieker syndrome, neuronal migration and PAF metabolism. manuscript submitted.
110. Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Mehra, M., and Prescott, S. M. (1990) *J. Cell. Biol.* 110, 529
111. Lorant, D. E., Patel, K. D., McIntyre, T. M., McEver, R. P., Prescott, S. M., and Zimmerman, G. A. (1991) *J. Cell. Biol.* 115, 223
112. Marcheselli, V. L. and Bazan, N. G. (1994) *J. Neurosci. Res.* 37, 54
113. Bazan, N. G., Fletcher, B. S., Herschman, H. S., and Mukherjee, P. K. (1994) *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 5252
114. Komatsu, H., Nagasawa, M., and Okumoto, T. (1993) *Int. J. Immunopharmac.* 15, 737

## 謝 辞

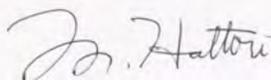
本研究を終始御指導くださいました東京大学薬学部衛生化学裁判化学教室の井上圭三教授、新井洋由助教授、青木淳賢助手にこころより深く感謝いたします。また、特に本研究初期に有益な助言をいただき、その後も本研究を応援して下さった工藤一郎昭和大学薬学部教授及び東京都臨床医学研究所炎症部門室長梅田真郷博士に深く感謝いたします。

PAF アセチルヒドロラーゼ Ib 各サブユニットの cDNA クローニングをはじめ、非常に多くの実験を実質的に行っていただき、他にも多くの実験を手伝っていただきました、理化学研究所辻本雅文博士及び安達栄樹博士に深く感謝いたします。

6年間にわたる研究室での生活をともにし、有益な助言をはじめとして有形無形のサポートをしていただきました東京大学薬学部衛生化学裁判化学教室の皆さんに感謝いたします。特に本研究に直接関り、一部実験を共同で行った、松沢厚修士、服部研之修士、渡邊真知子修士、足立知也学士、堀尾(瀧本)佐知子学士、古泉博之学士、石井淳子学士、増山淳子学士に感謝いたします。

本研究を行うあいだ、常に応援して下さった両親に感謝します。最後に、本研究を陰から支え励ましてくれた妻、妃佐子に心より感謝いたします。

平成8年4月



服 部 光 治



