

氏 名	さ さ き ま ゆみ 佐 々 木 真 弓
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3026 号
学位授与の日付	平 成 19 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Cloning of ABCA17, a novel rodent sperm-specific ABC (ATP-binding cassette) transporter that regulates intracellular lipid metabolism (細胞内脂質代謝調節に関わる齧歯類精子特異的な新規 ABC トランスポーター ABCA17 のクローニング)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 尾 一 和 教 授 篠 原 隆 司 教 授 乾 賢 一

### 論 文 内 容 の 要 旨

ABC トランスポーターは ATP の結合または ATP の加水分解により生ずるエネルギーを利用して基質の輸送などを行う、構造がよく保存された膜蛋白質のファミリーである。なかでも ABC トランスポーターの A サブファミリーに属する ABCA1 は high density lipoprotein (HDL) が欠失する Tangier 病の, ABCA4 は遺伝性黄斑部変性症 (Stargardt 病) の原因遺伝子であることが最近明らかにされ, A サブファミリーに属する分子は脂質膜輸送への関与が強く示唆されている。

本研究ではマウスゲノムライブラリーからヒト ABCA3 cDNA をプローブとしてスクリーニングすることにより, ABC トランスポーターの A サブファミリーに属する ABCA17 を新規に単離した。さらに, マウス精巣 cDNA ライブラリーのスクリーニングと RT-PCR, 3'-RACE 法を組み合わせることによりその完全長 cDNA 配列を決定した。ABCA17 蛋白質は 1,733 アミノ酸残基からなり, 肺胞 II 型細胞に特異的に発現する ABCA3 との間に最も高い 55.3% のアミノ酸一致を認め, ムラサキウニの精子に特異的に発現する sea urchin ABCA (suABCA) との間にも 36.7% の高いアミノ酸一致を認めた。次に, ABCA17 mRNA の組織発現分布についてノザンプロット法, リアルタイム PCR 法ならびに *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて検討した。その結果, ABCA17 mRNA はマウス精巣に特異的に発現し, 精巣内においては精母細胞と精子細胞に発現していることが明らかになった。さらに, ABCA17 蛋白質の C 末端 20 アミノ酸の合成ペプチドを抗原として ABCA17 を特異的に認識するウサギポリクローナル抗体を作成し, この抗体を用いて精巣の免疫組織化学染色を行ったところ, ABCA17 蛋白質は精子細胞及び精子の頭部に局在していることが明らかとなった。

そこで, ABCA17 蛋白質の機能を解析する目的で ABCA17 蛋白質を哺乳動物細胞に発現させたところ, ABCA17 蛋白質は小胞体に局在した。この細胞の粗膜画分に peptide N-glycosidase F あるいは endoglycosidase H を加えて反応させウエスタンブロットを行ったところ, いずれの酵素によっても分子量が 200kDa から 180kDa に移行したことから ABCA17 蛋白質は高マンノース型の N-糖鎖修飾を受けていると考えられた。次に, ABCA17 蛋白質を安定発現する哺乳動物細胞を作成し, [<sup>14</sup>C]acetate 存在下で培養することにより, 中性脂質ならびにリン脂質の *de novo* 合成を検討した。その結果, ABCA17 蛋白質安定発現細胞では細胞内のコレステロールエステル, 脂肪酸エステル, ならびに中性脂肪の有意な減少が認められた。

以上の結果から, 新規 ABC トランスポーター ABCA17 はマウス精子において脂質代謝調節に関与している可能性が示唆された。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ABC トランスポーターは ATP の結合または ATP の加水分解により生ずるエネルギーを利用して基質の輸送などを行う、構造がよく保存された膜蛋白質のファミリーである。本研究で申請者は, マウスの新規 ABC トランスポーター ABCA17

を単離し、その全長 cDNA 配列を決定した。

ノザンプロット、リアルタイム PCR ならびに *in situ* ハイブリダイゼーションの結果、ABCA17 mRNA は精巣の精母細胞と精子細胞に特異的に発現していた。次に、特異的抗体を作成し免疫染色を行ったところ、ABCA17 蛋白質は精子細胞および精子の頭部に局在していた。さらに、ABCA17 蛋白質の機能を明らかにする目的で、ABCA17 蛋白質を哺乳動物細胞に発現させたところ、ABCA17 蛋白質は小胞体に局在し、高マンノース型の *N*-糖鎖修飾を受けていた。そこで、ABCA17 蛋白質を安定発現する哺乳動物細胞を用いて、中性脂質ならびにリン脂質の *de novo* 合成を検討した結果、ABCA17 蛋白質発現細胞では細胞内のコレステロールエステル、脂肪酸エステル、トリアシルグリセロールが有意に減少していることが明らかになった。従って、ABCA17 蛋白質はマウス精子において脂質代謝調節に関与している可能性が示唆された。

以上の研究は、ABC トランスポーターの脂質代謝における機能の解明に貢献し、今後の精子研究に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成18年11月15日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。