

論文内容の要旨

論文題目 リゾホスファチジン酸 - アシル CoA-
アシルトランスフェラーゼの解析

氏名 熊谷 圭悟

【第1章】

序論

生体内のリン脂質代謝には多くのアシルトランスフェラーゼが関与しているが、そのほとんどは現在でもクローニングされておらず、リン脂質脂肪酸鎖の調節機構の解析を困難にしている。最近、グリセロリン脂質の生合成に関わるアシルトランスフェラーゼについては、その一部が明らかにされつつある。リン脂質の生合成はグリセロール-3-リン酸を出発材料として、2本の脂肪酸鎖が連続して結合することにより始まる。この過程を担う酵素として、グリセロール-3-リン酸をアシル化するグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (GPAT) やリゾホスファチジン

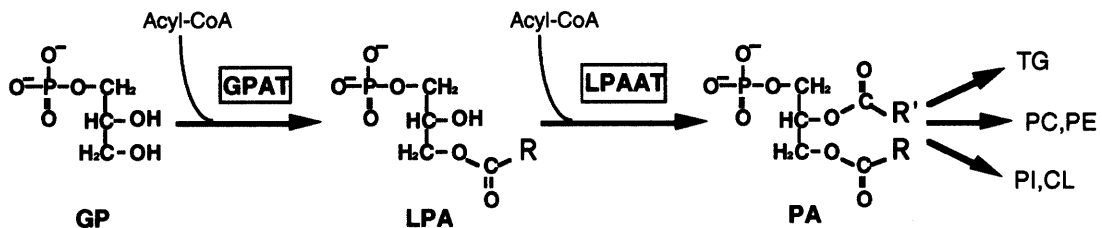


Fig.1 リン脂質 de novo 生合成経路

リン脂質の de novo 生合成は GP に 2 本の脂肪酸を導入し、生じた PA に各極性基を付加するという順序で行われる。LPAAT は LPA の sn-2 位に脂肪酸を導入する酵素である。

GP=glycerol-3-phosphate, PA=phosphatidic acid, TG=triacylglycerol, PC=phosphatidylcholine, PE=phosphatidylethanolamine, PI=phosphatidylinositol, CL=cardiolipin

酸 (LPA) をアシル化するリゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAAT) などがあるが、これらの一部はすでにクローニングされている。(Fig.1) 哺乳類では GPAT が 1 つ、LPAAT が 2 つクローニングされ、2 つの LPAAT は LPAAT $\alpha \cdot \beta$ と呼ばれている。GPAT や LPAAT などのアシルトランスフェラーゼ群にはアシルトランスフェラーゼモチーフと呼ばれる共通配列があることが報告された。アシルトランスフェラーゼモチーフをもつ遺伝子群をデータベース検索したところいくつかの新規遺伝子が見つかった。これらの遺伝子群は何らかのリン脂質代謝に関わるアシルトランスフェラーゼの候補であると考えられ、その解析を行った。

【第2章】

アシルトランスフェラーゼファミリーと遺伝子のクローニング

アシルトランスフェラーゼモチーフを持つ新規遺伝子をデータベース検索したところ、少なくとも 6 個の新規アシルトランスフェラーゼ様遺伝子が見つかった。これらの新規アシルトランスフェラーゼ様遺伝子の生化学的機能は全く分かっていなかった。(Fig.2, 四角で囲んだ遺伝子) 新規アシルトランスフェラーゼ様遺伝子の中には、 Ca^{2+} 結合ドメインである EF ハンドや、ユビキチン付加酵素の結合ドメインをもつものもあった。また、以前から、Taffazin というアシルトランスフェラーゼ様遺伝子が、Barth syndrome と呼ばれる遺伝性心筋症の原因遺伝子であることが分かっていた。これらの遺伝子群の機能を明らかにするために、動物細胞での過剰発現系を用いて活性を測定することにした。目的の遺伝子はマウス肝臓由来の cDNA ライブラリーから全長をクローニングした。pcDNA3 に組み込んだ後、CHO 細胞に発現させ、細胞から膜画分を調製して、これを酵素源として活性の測定を行った。活性の測定は、 $[^{14}C]$ ラベルされたアシル-CoA とリン脂質を加え 37°C でインキュベートし、ラベルされたリン脂質を TLC で分離し、目的のバンドに取り込まれた放射活性をイメージアナライザで定量することにより行った。その結果、2 つの遺伝子 (XP-036003, XP-004374) が LPAAT 活性を示し、LPAAT にはこれまで知られていた $\alpha \cdot \beta$ に加え、さらに 2 つのアイソザイムが存在することが明らかになり、 $\gamma \cdot \delta$ と命名した。各 LPAAT 間のホモロジーは、 α と β の間は約 40% のホモロジー、 γ と δ の間は約 60% のホモロ

ジーがあったが、 $\alpha \cdot \beta$ と $\gamma \cdot \delta$ の間では、全長で約 15% 以下の低いホモロジーしかなかった。したがって、LPAAT は $\alpha \cdot \beta$ を含むサブファミリーと $\gamma \cdot \delta$ を含むサブファミリーに分けられることが示唆された。また、myc タグを付加した LPAAT に対する免疫蛍光染色の結果から、これらのアイソザイムは全て ER 膜に局在していることが明らかになった。

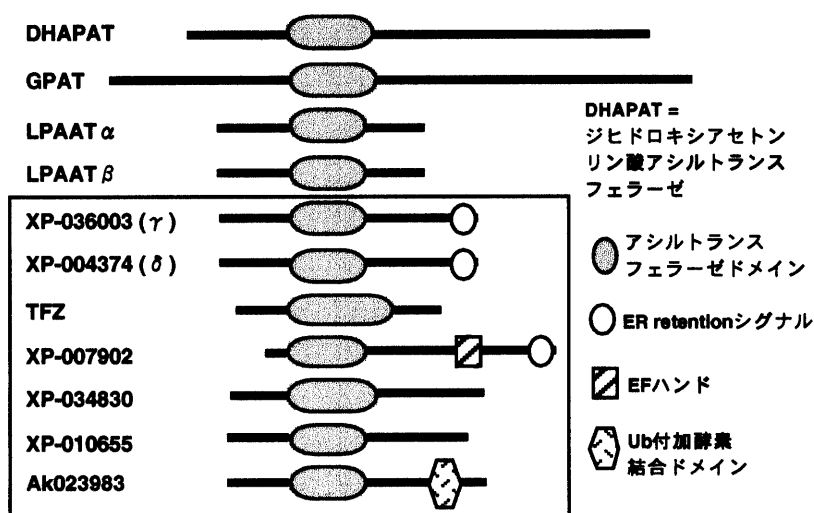


Fig.2 アシルトランスフェラーゼファミリー
アシルトランスフェラーゼモチーフを持つ遺伝子群を模式的に表した。アシルトランスフェラーゼドメインはほとんどの場合100アミノ酸程度の長さをもつ。これまでに機能が分かっていないものは四角で囲ってある。

【第3章】

LPAAT の酵素学的性状解析

LPAAT γ 、 δ にはリゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルエタノールアミンに対するアシルトランスフェラーゼ活性は全くなかった。(Fig3-1) この結果からも、LPAAT γ ・ δ が LPAAT のアイソザイムであることが示唆された。 β に関しては、僅かながらリゾホスファチジルイノシトールもアクセプターになることが明らかになった。LPA がアクセプターであることが明らかになったので、次に、LPA の *sn*-1 位がエステル結合になっているアシル型 LPA と、*sn*-1 位がエーテル結合になっているアルキル型 LPA に対する選択性についても検討した。その結果、 α ・ β はアシル型 LPA に比べてアルキル型 LPA を良い基質としないのに対して、 γ ・ δ はアシル型・アルキル型の区別を全くしないことが明らかになった。(Fig.3-2) 更に、LPAAT α ・ β と LPAAT γ ・ δ のアシル CoA に対する基質特異性を調べた。¹⁴C ラベルされたいくつかのアシル CoA を用いて活性測定を行ったところ、LPAAT α ・ β はこれまでの報告と同様にいずれのアシル CoA も基質とし、選択性が乏しかった。一方、LPAAT γ はアラキドノイル CoA やリノレオイル CoA などの多価不飽和脂肪酸に高い選択性を示した。 δ はオレオイル CoA に若干の選択性を示した。(Fig.3-3) ところで、*myc* で各 LPAAT の発現量を定量し、酵素当たりの活性を比べると、 γ ・ δ の比活性は α ・ β の 1/10 程度であることが明らかになった。しか

ころ、LPAAT α ・ β はこれまでの報告と同様にいずれのアシル CoA も基質とし、選択性が乏しかった。一方、LPAAT γ はアラキドノイル CoA やリノレオイル CoA などの多価不飽和脂肪酸に高い選択性を示した。 δ はオレオイル CoA に若干の選択性を示した。(Fig.3-3) ところで、*myc* で各 LPAAT の発現量を定量し、酵素当たりの活性を比べると、 γ ・ δ の比活性は α ・ β の 1/10 程度であることが明らかになった。しか

Fig.3-1

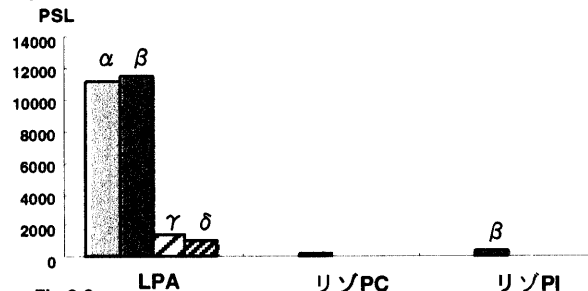


Fig.3-2

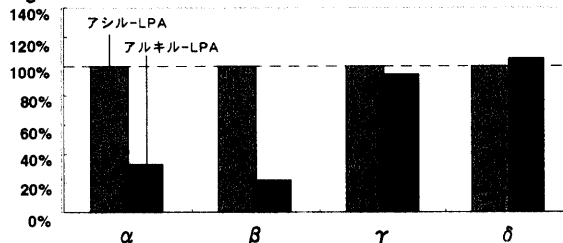


Fig.3-3

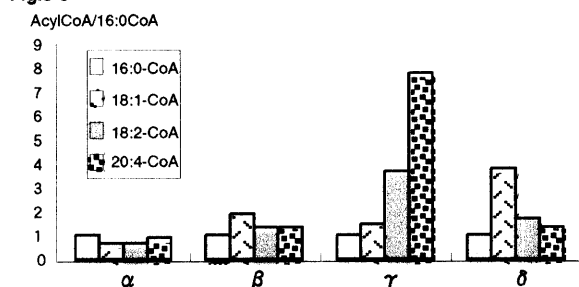


Fig.3-1 LPAATアイソザイムのアクセプターの基質特異性
ドナーにはアラキドノイルCoAを用い、表中の各アクセプターに対するアシルトランスフェラーゼ活性を測定した。
Fig.3-2アシル型LPAに対する選択性
縦軸は1-アシル型LPAを100%とした場合のアルキル型LPAの場合の比で表した。 α 、 β はアルキル型LPAをあまり良い基質としないことが分かる。
Fig.3-3 LPAATアイソザイムの基質選択性の比較
縦軸はパルミトイルCoAを100%とした時の反応速度の比である。非選択的な α ・ β とは対照的に γ ・ δ には基質選択性がある。

心臓 脳 脾臓 肺 肝臓 骨格筋 腎臓 精巣

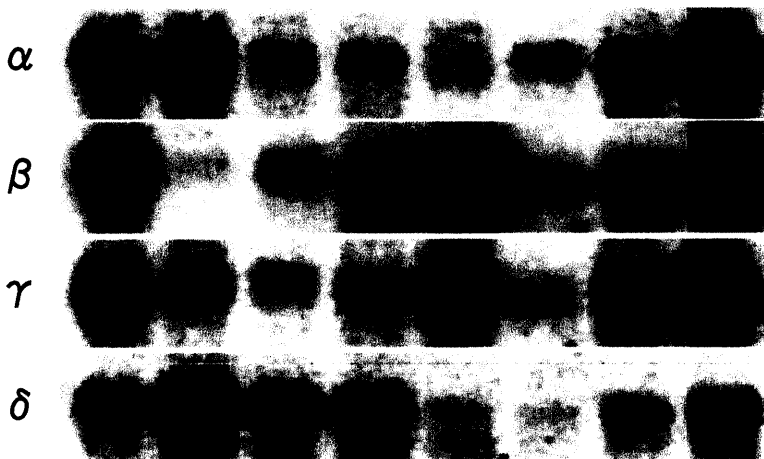


Fig.4 マウス各臓器でのLPAATの発現分布
臓器レベルでの発現解析では、古くからLPAAT活性が強いことが知られていた肝臓・腎臓・心臓・肺・脳といった臓器で多くのアイソザイムが重複して発現していることが分かった。

し、Km 値を算出してみると、 $\gamma \cdot \delta$ は $\alpha \cdot \beta$ と比べて LPA に対する Km 値が 1 オーダー程度低いことが明らかになった。 $\gamma \cdot \delta$ の活性はより基質濃度の低い状態の時に寄与率が高くなることが示唆された。

【第4章】

LPAAT アイソザイムの発現の解析

さらに、LPAAT アイソザイムの機能的差異を明らかにするため、LPAAT の発現について解析した。まず、最初に個体レベルでどの臓器に多く発現しているのかを、ノーザンブロットング解析によって検討した。その結果、いずれのアイソザイムも様々な臓器に発現していたが、肝臓・心臓・腎臓など古くから LPAAT 活性が強いといわれている臓器では、複数のア

イソザイムが重複して発現しており、かつ、個々の発現量も高いという結果になった。(Fig.4) 興味深いことに、 β と γ の発現パターンが非常に類似しており、いずれも肝臓・精巣・心臓・腎臓といった臓器に多く発現していた。また、 δ は脳において発現量が多く、他の3つのアイソザイムの発現レベルが高い肝臓・心臓・腎臓・精巣といった臓器での発現量は低いことが明らかになった。次に、培養細胞における発現について検討した。LPAAT の発現量は定量 PCR を用いて測定した。調べたほとんどの培養細胞において、LPAAT アイソザイムは4つとも発現しており、複数のアシルトランスフェラーゼが単一の細胞に同時に発現していることが示唆された。これらの細胞の中で、脂肪細胞に分化する能力を持った 3T3-L1 細胞に着目し、脂肪細胞に分化する時の LPAAT の発現について解析した。脂肪細胞への分化に伴い、3T3-L1 細胞中に多数の油滴が観察され、中性脂質の合成が盛んになっていることが確認された。定量 PCR の結果、3T3-L1 細胞が線維芽細胞から脂肪細胞に分化する際に、LPAAT β が約 20 倍に増加することが明らかになった。

(Fig.5) また、 γ も約 6 倍に増加していた。一方、この時、 δ は逆に発現が低下していた。

【第5章】

総括と考察

組織レベルでのリン脂質の新規生合成では、オレイン酸やリノール酸といった脂肪酸が sn-2 位に優先的に転移されるのに対して、ミクロソームレベルでの活性測定ではそのような基質選択性が見られないという問題が古くから知られていた。また、LPAAT $\alpha \cdot \beta$ はアシル CoA に対する選択性が乏しいことが報告され、組織内での基質選択性の問題は全く分かっていなかった。今回明らかになった γ や δ の基質選択性は、組織内でのリン脂質 *de novo* 生合成時に見られる基質選択性と近く、 γ や δ が *de novo* 生合成に関わっていることが示唆される。 $\gamma \cdot \delta$ の比活性は $\alpha \cdot \beta$ と

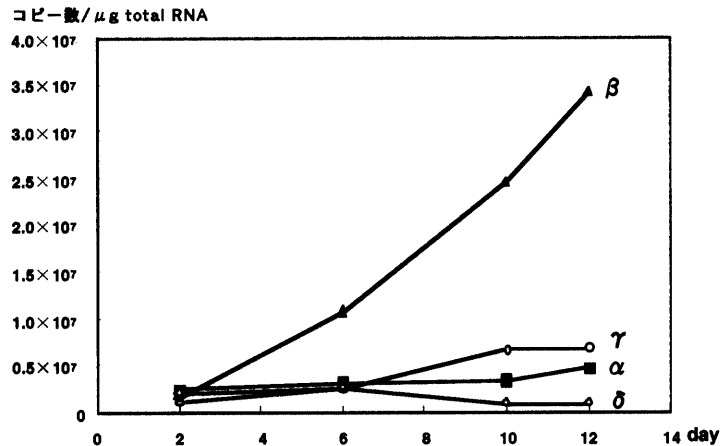


Fig.5 3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化時にみられる発現変動
3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化誘導は、細胞がコンフルエントになってから2日後に開始した。
各アイソザイムのmRNAの定量は定量PCRを用いて行った。

比べて低い、ミクロソームを用いた活性測定のようにかなり過剰な基質が存在するような状態ではなく、通常の細胞内のように基質濃度が低い状態において、 $\gamma \cdot \delta$ の寄与が高くなることがKmの結果から示唆された。脂肪細胞への分化時に β が著しく増加したが、トリアシルグリセロール合成のように *sn*-2位の脂肪酸種を選ぶ必要のない時には、選択性に乏しく反応速度の速い酵素である β を誘導してトリアシルグリセロール合成を促進しているものと考えられた。また、アルキル型のトリアシルグリセロールはリパーゼによる分解を受けにくいことが知られている。 β はアルキル型LPAをあまり良い基質としないという性質が明らかになったが、 β のこうした性質は脂肪細胞におけるトリアシルグリセロール合成に適していると考えられる。ノーザンブロッティングの結果では β と γ の発現パターンが類似していたが、脂肪細胞に分化した時にも β と γ が増加していた。 β と γ が多く発現していた臓器は脂肪の合成が盛んな臓器ばかりであり、 β とともに γ もトリアシルグリセロール合成に必要なのかもしれない。 β の発現誘導のメカニズムを理解するために転写開始点周辺について解析してみたところ、確かに、脂肪細胞への分化に重要な役割を担う転写制御因子であるC/EBP α やSREBP-1が結合する配列が見つかった。 δ は脳において発現が高かったが、脳のリン脂質は意外と多くのオレイン酸を含んでいることが知られている。脳特異的発現、オレオイルCoA選択性、脳リン脂質のオレイン酸の多さ、という3点の一致は大変興味深い。今回、脂肪細胞への分化時に β が増加することに注目してきたが、酵素学的によく似た性質を示した α はほとんど増えておらず、それぞれのアイソザイムは状況に応じて細かく使い分けられていると考えられる。