

審査の結果の要旨

氏名 熊谷圭悟

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り、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や、リゾホスファチジン酸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) 等がすでにクローニングされていた。これらのアシルトランスフェラーゼ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ていた。「リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼのアイソザイムの解析」と題した本論文では、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、いくつかの新規アシルトランスフェラーゼ様遺伝子を見出している。更に、これらの遺伝子群の解析の結果、既知の LPAAT アイソザイムである $\alpha \cdot \beta$ に加え、新規の LPAAT アイソザイム $\gamma \cdot \delta$ が存在することを初めて見出し、これら 4 つのアイソザイムが状況によって使い分けられていると述べている。

1. 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遺伝子をデータベース検索し、10 個の機能未知の新規アシルトランスフェラーゼ様遺伝子を見出した。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した。その結果、新規アシルトランスフェラーゼ様遺伝子群の中の 2 つが 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。相同性の比較から、4 つの 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、免疫蛍光染色の結果から、これら 4 つの LPAAT アイソザイムは全て ER 膜に局在していることを明らかにした。

2. LPAAT の酵素学的性状解析

LPAAT $\gamma \cdot \delta$ はリゾホスファチジルコリン等の他のリゾリン脂質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。この結果から、 $\gamma \cdot \delta$ が LPAAT のアイソザイムであることが示唆された。また、*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検討した。その結果、 $\alpha \cdot \beta$ はアルキル型 LPA を良い基質としないのに対して、 $\gamma \cdot \delta$ はアシル型・アルキル型の区別を全くしないことを明らかにした。各 LPAAT アイソザイムのアシル CoA に対する基質選択性を調べ、 $\alpha \cdot \beta$ はこれまでの報告と同様にアシル CoA に対する選択性が乏しいことを確認した。一方、 γ はアラキドノイル CoA やリノレオイル CoA 等の多価不飽和脂肪酸に高い選択性を示すこと、 δ はオレオイル CoA に若干の選択性を示すことを明らかにした。各 LPAAT アイソザイムの酵素量当たりの活性を比較した結果、 $\gamma \cdot \delta$ の比活性は $\alpha \cdot \beta$ の 1/10 程度だった。しかし、 K_m 値の解析から、 $\gamma \cdot \delta$ は $\alpha \cdot \beta$ と比べて LPA に対する K_m 値が 1 オーダー程度低いことを明らかにした。 $\gamma \cdot \delta$ 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ものと考えられた。

3. LPAAT アイソザイムの発現の解析

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を行った。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・腎臓などの 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高いレベルで発現していた。 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・腎臓に多く発現していた。 δ は脳において発現量が高かった。更に、培養細胞における発現量を定量 PCR を用いて測定し、単一の細胞に同時に複数の LPAAT が発現していることを明らかにした。培養細胞の中で、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。その結果、線維芽細胞から脂肪細胞に分化する際に、LPAAT β が選択的に増加することを明らかにし、脂肪細胞分化時のトリアシルグリセロール合成の促進に β が選択的に関与していることを示唆した。

以上を要するに、本研究は新規の LPAAT アイソザイムを見出し、各 LPAAT アイソザイムの機能的な違いを明らかにし、LPAAT β が選択的にトリアシルグリセロール合成に関与していることを、分子生物学的、生化学的、細胞生物学的に初めて明らかにした。以上の知見は LPAAT の生理学的な機能を解明する有益な情報を提供するとともに、これまで詳細な解析が困難だったリン脂質生合成の初期過程を理解する手がかりを与えており、博士（薬学）の学位論文として十分な価値があるものと認められる。