

論文の内容の要旨

C. elegans を用いた 細胞内 II 型 PAF アセチルヒドロラーゼの生理機能解析

井上 貴雄

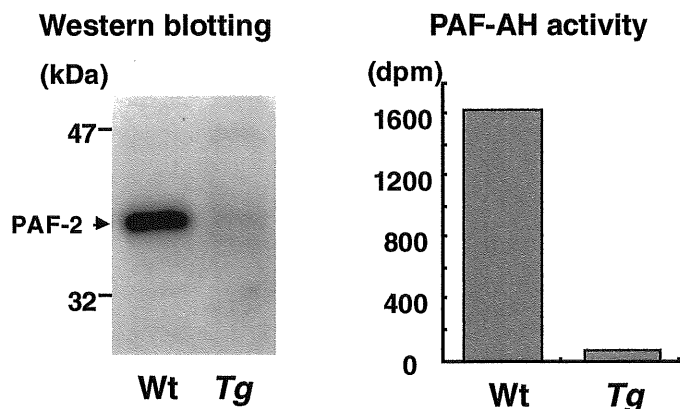
【序】

細胞内 II 型 PAF アセチルヒドロラーゼ (II 型 PAF-AH) は、N 末端にミリスチン酸を結合し、また、他の蛋白質とのホモロジーを持たない非常にユニークなホスホリパーゼである。本酵素はリン脂質性メディエーターである PAF (platelet activating-factor) のアセチル基を加水分解する酵素として、当教室において同定されたが、PAF を持たない生物種 *C. elegans* にも保存されていることから、PAF 以外のリン脂質を基質とし、より普遍的な生命現象に関与していることが予想された。私は修士課程において、*C. elegans* における II 型 PAF-AH、*paf-2* が胚発生において上皮細胞に特異的に発現していること、また、*paf-2* 欠損変異体は胚発生中期において上皮組織形成に異常を来し、胚性致死となることを見出した。本研究では、胚発生中期以降における *paf-2* の生理機能を解析するとともに、正常および *paf-2* 変異体の脂質を mass spectrometry により網羅的に解析し、本酵素の生理的基質の同定を試みた。

【方法と結果】

Heat-shock inducible RNAi による
paf-2 発現抑制系の確立

C. elegans における遺伝子発現抑制では RNAi が汎用されるが、double-strand RNA を外から導入する injection 法や feeding 法では、発現抑制の時期を厳密にコントロールすることが難しい。そこで、heat-shock プロモーターを用いて、*C. elegans* の細胞内で

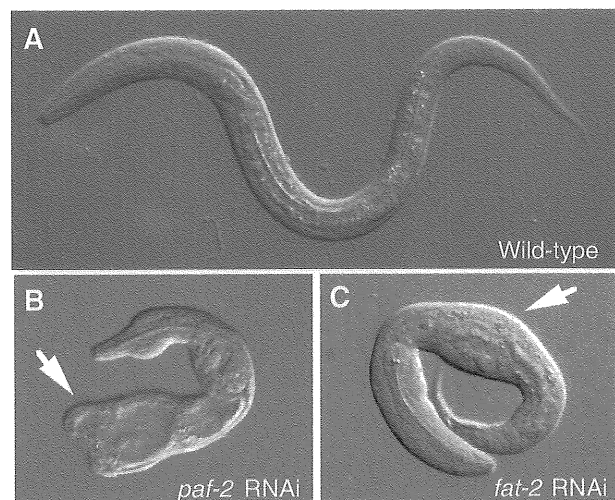


【Fig.1】 Heat-shock inducible RNAiによる*paf-2*の発現抑制

double-strand RNA を合成する遺伝子発現抑制系を検討した。まず、heat-shock プロモーターの下流に sense および antisense の *paf-2* を組み込み、これらのコンストラクトを *C. elegans* に co-injection した。さらに、得られたモザイク個体を UV で処理することにより、導入したトランスジーンをゲノムに組み込んだトランスジェニック体 (*Tg*) を作製した。この *Tg* を 4 齢幼虫において heat-shock 処理し、24 時間後 (成虫) における *paf-2* の発現をウェスタンブロットおよび PAF-AH 活性により検討した。この結果、*Tg* ではほぼ完全に *paf-2* の発現を抑制できることが明らかになった【Fig.1】。また、*Tg* ではほとんど PAF-AH 活性が検出されなかったことから、*C. elegans* における PAF-AH 活性は *paf-2* が担っていることが明らかになった【Fig.1】。

胚発生中期以降における *paf-2* の発現抑制

次に、上に示したトランスジェニック体 (*Tg*) を用いて、胚発生中期以降において *paf-2* の発現を抑制し、その表現型を解析した。胚発生後期において、*Tg* を heat-shock 処理したところ、胚性致死と 1 齢幼虫期における成長の停止が観察された。微分干渉顕微鏡および蛍光抗体染色を用いて *Tg* を詳細に解析した結果、上皮細胞のシート構造が部分的に壊れており、体の様々な部位に奇形を生じることが明らかになった【Fig.2】。この奇形を伴う形態異常は、上皮細胞の内側にある組織が、上皮組織の外側に押し出されたことが原因であると予想された。また、*Tg* の発生を 1 齢幼虫に同調させ、幼虫期において *paf-2* の発現を抑制したところ、成長の遅延、産卵数の減少が観察された。産卵数が減少したことから、生殖器官に注目して解析を行ったところ、*Tg* では卵母細胞が減少し、卵母細胞の形態に異常を示すことが分かった。この結果は、*paf-2* が成虫において生殖腺に強く発現している事実と合致していた。以上の結果から、*paf-2* は上皮組織の形成とその保持に加え、卵母細胞の形成にも関与していることが明らかになった。



【Fig.2】 *paf-2* RNAiに見られる形態異常(B)。脂肪酸不飽和化酵素: *fat-2*の発現を抑制した場合にも同様の表現型が観察される(C)。

Mass Spectrometry によるリン脂質組成の網羅的解析

以上の解析から、*C. elegans* における上皮組織形成および卵母細胞形成には、*paf-2* が制御する脂質分子を介した未知のメカニズムが存在すると考えられた。そこで次に、*paf-2* の標的となる脂質分子の同定を試みた。*paf-2* 変異体では、脂質代謝に何らかの異常が生じていると考えられるので、*paf-2* 変異体と野生株の脂質組成は異なっているはずである。そこで、これらの *C. elegans* における全脂質を抽出し、最近開発されつつあるソフトイオン化法による mass spectrometry を利用して、リン脂質の網羅的解析を行った。この結果、全く予想外なことに、*paf-2* 変異体では主に高度不飽和脂肪酸 (PUFA) の 1 つである EPA (エイコサペンタエン酸) を含

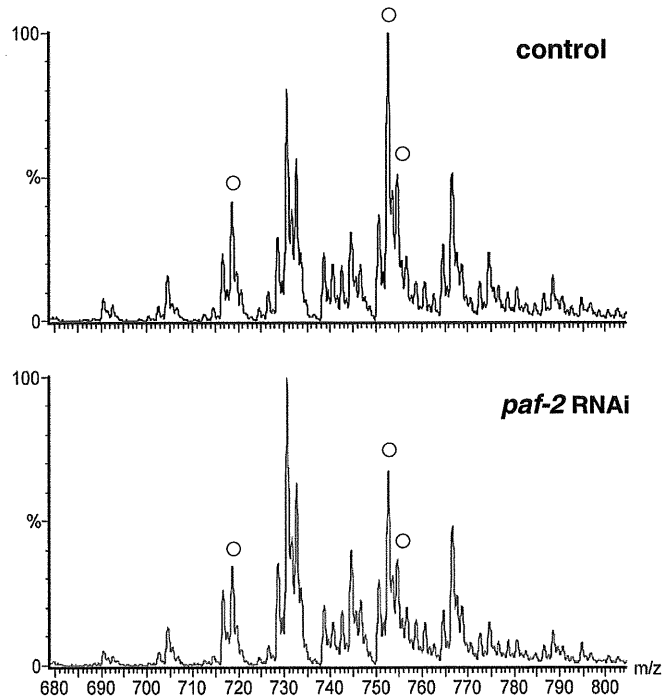
むホスファチジルコリン (PC) とホスファチジエタノールアミン (PE) が減少することを見出した【Fig.3】。

II型 PAF-AH は、PAF のアセチル基を含めた短鎖脂肪酸しか基質にできないことがこれまで報告されていたが、上の結果を受けて、もう一度 *in vitro* における II 型 PAF-AH の基質特異性について検討した。その結果、II 型 PAF-AH はグリセロール骨格の 1 位と 2 位の両方に PUFA を含むリン脂質を基質とすることが明らかになった。このことから、*C. elegans* において II 型 PAF-AH は、PUFA を含むリン脂質代謝を制御していることが示唆された。

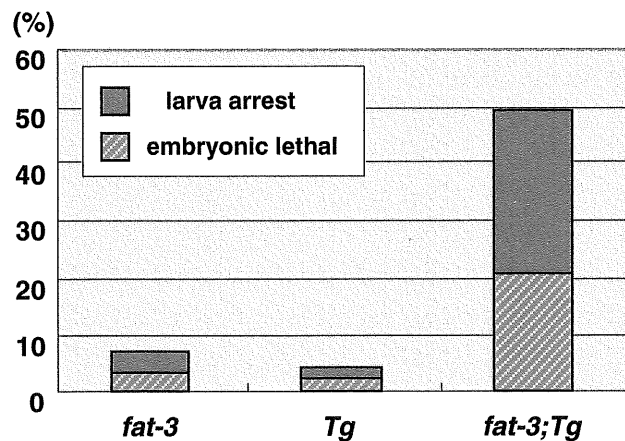
脂肪酸不飽和化酵素の発現抑制

paf-2 変異体において PUFA を持つリン脂質が減少していたことから、次に、脂肪酸不飽和化酵素の遺伝子を変化させ、その表現型を調べた。まず、feeding RNAi 法を用いて脂肪酸不飽和化酵素 (*fat-2*) の発現を抑制し、リン脂質中の PUFA 含有量を減少させた。この結果、不飽和化酵素を抑制した場合にも *paf-2* 変異体と同様に奇形を伴う幼虫が生じること【Fig.2】、成虫期においても *paf-2* 変異体と類似した卵母細胞の形成異常を示すことを見出した。さら

に、PUFA 含有量が穏やかに減少した *fat-3* 変異体と *paf-2* 変異体 (*Tg*) と交配して、二重変異体を作製したところ、胚性致死および幼虫期における成長の停止が、著しく増強されることが明らかになった【Fig.4】。この二重変異体では、形態に異常を示す幼虫が顕著に増加することから、上皮組織における異常が致死率に反映されたものと考えられる。以上の結果から、上皮組織を形成する過程に PUFA 含有リン脂質が関与していることが強く示唆され、*paf-2* が PUFA の代謝を制御していることがさらに支持された。



【Fig.3】 ESI-MS を用いた全リン脂質の網羅的解析。○は *paf-2* 変異体において減少したリン脂質の分子種を示している。



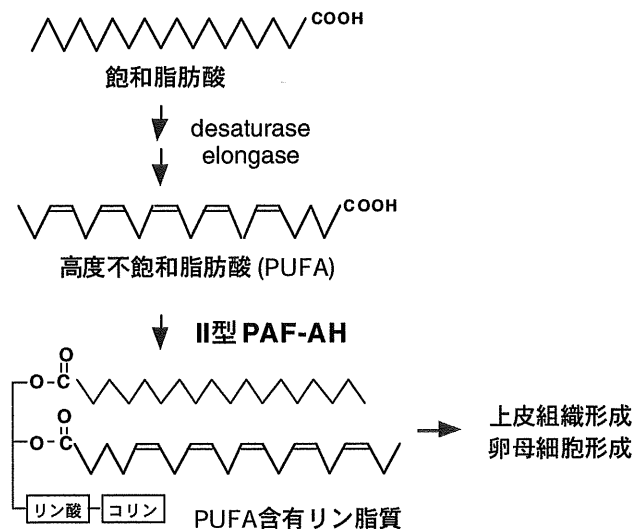
【Fig.4】 脂肪酸不飽和化酵素 (*fat-3*) の変異体と *Tg* (*paf-2* RNAi) の二重変異体では致死率が著しく上昇する。

【まとめと考察】

私は博士課程において、heat-shock プロモーターにより *in vivo* で RNAi を誘導する発現抑制系を構築し、*C. elegans* における II 型 PAF-AH、*paf-2* が上皮組織形成および卵母細胞形成において、必須であることを明らかにした。また、*paf-2* 変異体における脂質組成を mass spectrometry を用いて網羅的に解析することにより、*paf-2* が PUFA 含有リン脂質の代謝に関与することを見出した。さらに、*paf-2* と脂肪酸不飽和化酵素との遺伝学的解析から、*paf-2* 変異体における脂質変動と表現型が密接に関連することを明らかにした。以上の解析から、*paf-2* は PUFA 含有リン脂質の代謝に関与し、さらに PUFA 含有リン脂質が上皮組織の形成と維持、さらに卵母細胞の形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

II 型 PAF-AH は分解酵素として同定されたが、脂肪酸鎖をリゾリン脂質の水酸基に転移する活性もっており、リン脂質合成酵素としての側面を持つ。*C. elegans* において II 型 PAF-AH は、PUFA をリン脂質に導入し、リン脂質における PUFA の含有量を維持する機能を持つと考えられる【Fig.5】。

PUFA 含有リン脂質がなぜ上皮組織形成や卵母細胞形成に必要なのか、高等動物においても II 型 PAF-AH が同じような機能を果たしているのかが、今後の課題である。



【Fig.5】 II型 PAF-AH は PUFA をリン脂質に導入し、PUFA 含有リン脂質を合成していると考えられる。