

論文の内容の要旨

論文題目

C. elegans を用いた新規ミクロソーム型 グリセロール 3-リン酸アシルトランスフェラーゼの機能解析

氏名 原 直子

【序】

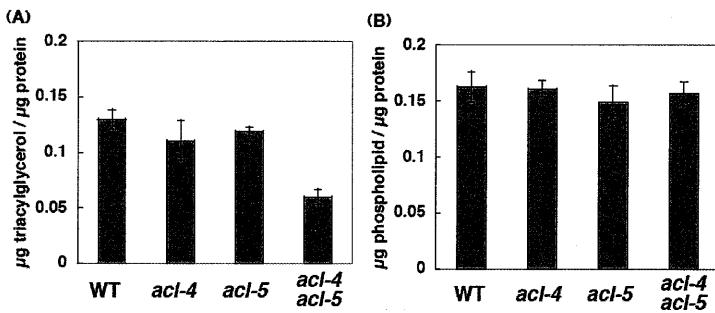
リン脂質やトリアシルグリセロールは、グリセロール骨格に脂肪酸が結合した構造を有しており、結合している脂肪酸の組合せによって様々な分子種が存在する。脂肪酸を導入する酵素はアシルトランスフェラーゼと呼ばれ、グリセロール 3-リン酸を出発物質として脂肪酸が順次導入されていく *de novo* 合成過程や、リン脂質あるいはトリアシルグリセロールが一旦合成された後に脂肪酸鎖が置き換わるリモデリング過程に関与していると考えられる。近年、アミノ酸配列の相同性から、既知のアシルトランスフェラーゼに高く保存されたコンセンサス配列を持つ分子が多数存在することがわかっているが（アシルトランスフェラーゼファミリー）、それらの分子が生体内において担っている酵素反応や、その生物学的意義に関しては不明な点が多い。当研究室では、高等動物と類似した脂質組成を有し、脂質関連遺伝子の保存性が高い線虫 *C. elegans* をモデル生物として、機能未知のアシルトランスフェラーゼ分子の解析を進めているが、本研究ではアシルトランスフェラーゼファミリーの中で、互いに高い相同性を示す *acl-4*、*acl-5* に着目し、それらの分子が関与する脂質代謝の同定および生理機能の解析を行った。

【方法と結果】

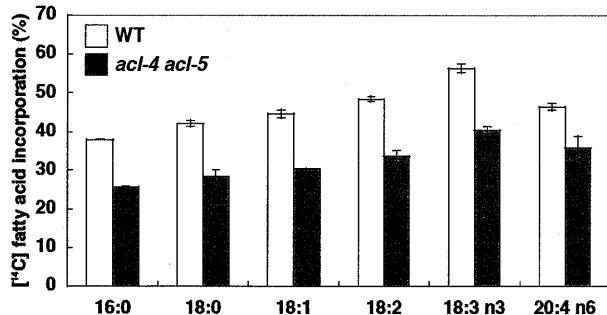
1. *acl-4*、*acl-5* の関与する脂質代謝の同定

acl-4、*acl-5* の関与する脂質代謝を明らかにするために、まず、*acl-4*、*acl-5* の単独変異体および *acl-4 acl-5* 二重変異体におけるリン脂質量、トリアシルグリセロール量を定量した。その結果、*acl-4*、*acl-5* の単独変異体ではリン脂質、トリアシルグリセロールとともに野生型と同程度の量を有していたが、*acl-4 acl-5* 二重変異体においてリン脂質量は変わらないものの、トリアシルグリセロールの量が半分程度に減少することが明らかとなった（Figure 1）。

続いて、これらの変異体においてトリアシルグリセロールの合成過程に異常があるかどうか検討するため、¹⁴Cで標識された脂肪酸の取り込みを解析した。食餌として添加した標識脂肪酸は、生体内に吸収され、リン脂質およびトリアシルグリセロール合成の基質として用いられるが、*acl-4 acl-5*二重変異体ではトリアシルグリセロールへの脂肪酸の取り込みが減少していることがわかった (Figure 2)。以上の結果より、*acl-4*、*acl-5*は個体レベルにおいてトリアシルグリセロール量を規定する分子であり、互いに協調的に機能することが明らかになった。



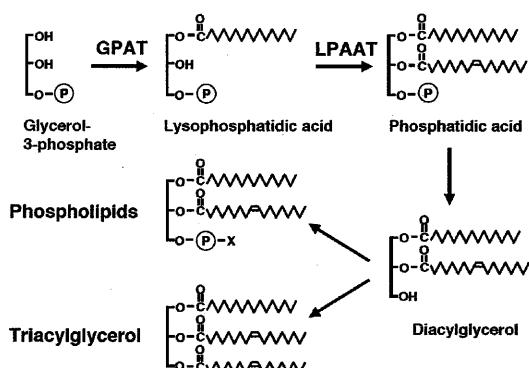
【Fig. 1】各変異体におけるトリアシルグリセロール量(A)およびリン脂質量(B)



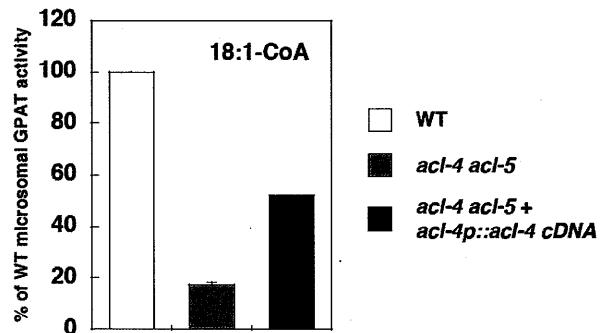
【Fig. 2】トリアシルグリセロールへの脂肪酸導入効率

2. *acl-4*、*acl-5*の関与する酵素反応の同定

次に、*acl-4*、*acl-5*の関与する酵素反応に関して解析を行った。リン脂質およびトリアシルグリセロールの合成過程では、グリセロール 3-リン酸を出発物質として、グリセロール 3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (GPAT)、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAAT) と呼ばれるアシルトランスフェラーゼによって、脂肪酸が導入される (Figure 3)。野生型および*acl-4 acl-5*二重変異体のミクロソーム画分を用いてアシルトランスフェラーゼ活性を検討したところ、*acl-4 acl-5*二重変異体ではミクロソームの GPAT 活性が顕著に低下しており、また *acl-4* の導入によりその活性が回復したことから、*acl-4* が GPAT 活性を有することが示された (Figure 4)。



【Fig. 3】リン脂質・トリアシルグリセロール合成経路
GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase;
LPAAT, lysophosphatidic acid acyltransferase



【Fig. 4】*acl-4 acl-5*変異体ではGPAT活性が減少し、*acl-4*の導入によりその活性は回復する

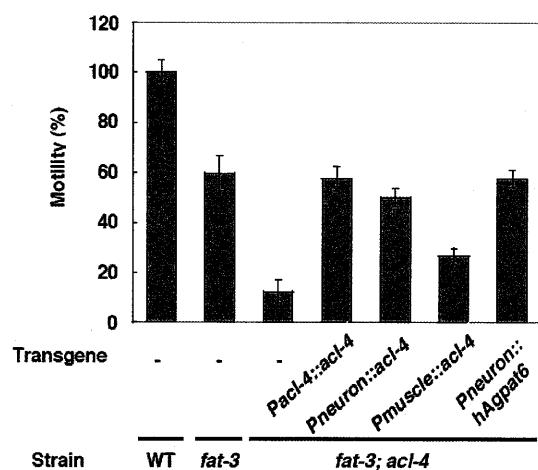
3. *acl-4*, *acl-5* の機能解析

acl-4, *acl-5* の機能を解析するため、まず、*acl-4*, *acl-5* の発現部位を調べたところ、*acl-4* は神経、筋、腸に、*acl-5* は腸のみに発現する分子であることがわかった。次に、*acl-4*, *acl-5* の単独変異体および *acl-4 acl-5* 二重変異体について表現型を解析したところ、いずれも通常の培養条件下では顕著な異常を示さなかったが、脂肪酸不飽和化酵素 *fat-3* の変異体との交配により高度不飽和脂肪酸欠乏状態になると、*fat-3; acl-4 acl-5* の三重変異体では幼虫期に致死となることがわかった。また、*fat-3; acl-4* 二重変異体では運動機能が著しく低下することを見出した。本研究では、*fat-3; acl-4* 二重変異体における運動機能の低下に着目し、さらに解析を行った。

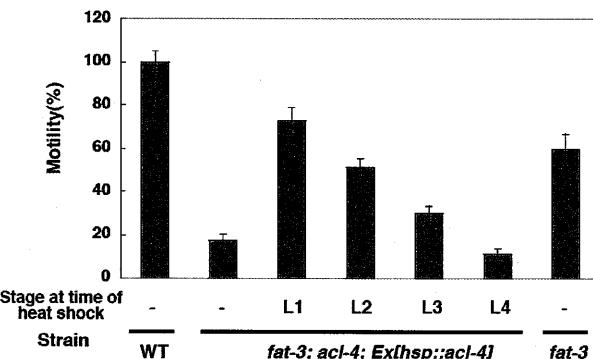
はじめに、*acl-4* の機能部位、機能時期を調べるため、*fat-3; acl-4* 二重変異体の移動距離を運動機能の指標として、*acl-4* 遺伝子導入によるレスキュー実験を行った。組織特異的プロモーターおよび時期特異的プロモーター（ヒートショックプロモーター）を用いて解析したところ、*acl-4* は主として神経で機能しており（Figure 5）、幼虫期初期からの*acl-4* の発現が運動機能に必要であることが明らかとなった（Figure 6）。線虫では幼虫期の初期に神経回路の形成が行われるため、*fat-3; acl-4* 二重変異体では神経形態に異常がある可能性が考えられた。

そこで、運動神経を蛍光標識して観察したところ、野生型、*acl-4* 単独変異体、*fat-3* 単独変異体では腹側から背側への軸索がまっすぐ伸長しているのに対し、*fat-3; acl-4* 二重変異体においては、大きく蛇行した形態が見られることが明らかとなった（Figure 7、矢印）。また、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬 aldicarb に対する感受性を解析したところ、*fat-3; acl-4* 二重変異体では薬剤に対して耐性を示し、運動神経におけるアセチルコリン放出過程にも異常を示すことが示唆された（Figure 8）。

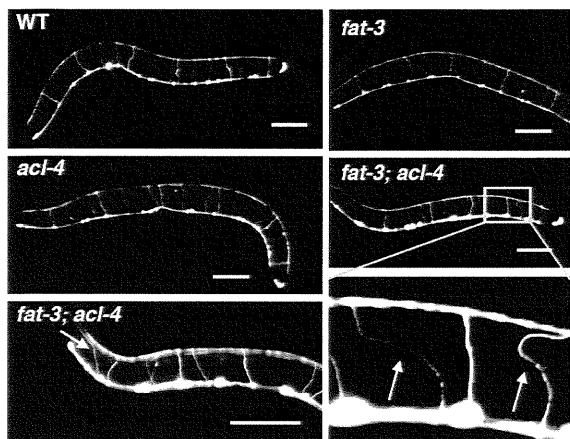
fat-3; acl-4 二重変異体の運動機能の低下は、*acl-4* と高い相同意を示す哺乳動物分子である AGPAT6 を神経に発現させることによっても回復したことから（Figure 5）、AGPAT6 が *acl-4* の機能を相補できることがわかった。AGPAT6 がマウス脳および海馬初代培養神経細胞において発現することを確認しており、本酵素が高等動物においても神経系で機能している可能性が示唆された。



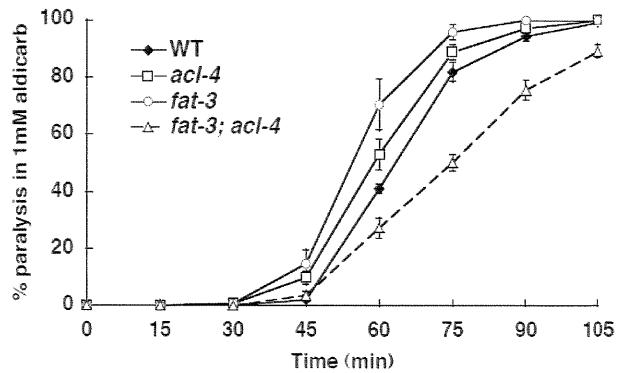
【Fig. 5】 神経特異的 *acl-4* の発現により、運動機能が回復する



【Fig. 6】 幼虫期初期（L1/L2）における *acl-4* の発現により、運動機能が回復する



【Fig. 7】各変異体における運動神経の形態
*fat-3; acl-4*二重変異体では腹側から背側への軸索走行に異常が見られる（矢印）
写真の右側が頭部、下側が腹側 Scale bars, 100 μ m



【Fig. 8】各変異体におけるaldicarb反応性

【まとめと考察】

リン脂質およびトリアシルグリセロールの合成過程における初発酵素であるグリセロール 3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (GPAT) は、ミトコンドリアとミクロソームにその活性を有することが知られていたが、これまでミクロソームにおける活性を担う分子は同定されていなかった。本研究では、線虫において *acl-4*, *acl-5* という二分子がミクロソームにおける GPAT 活性を担っていること、また、それらの分子が協調的に機能してトリアシルグリセロール合成量の規定に関わることを見いだした。

本研究ではさらに、高度不飽和脂肪酸欠乏条件下において、*acl-4* 遺伝子の欠損が神経形態の異常および神經伝達機能の低下を生じることを明らかにし、本酵素が神經機能に関与する可能性を見いだした。神經の形態形成時には、突起伸長のために膜成分が適切に供給される必要がある。また、神經伝達機構においても、シナプス小胞の形成、放出、リサイクリング過程において膜ダイナミクスが非常に重要な役割を果たしている。これらの過程には、様々な脂質代謝酵素や脂質結合タンパク質等が関与することが報告されているが、これまでリン脂質やトリアシルグリセロールの *de novo* 合成過程に関わる酵素の神經機能への関与はわかつていなかった。高度不飽和脂肪酸欠乏状態では、残存している不飽和度の低い脂肪酸を含有する脂質が神經機能を相補していると考えられるが、それに加えて神經細胞における GPAT 活性が減少すると、必要部位への脂質供給が不足し、神經機能に異常を来していることが予想される。

acl-4, *acl-5* と高い相同性を示す哺乳動物分子は二分子存在しており (AGPAT6, AGPAT8)、AGPAT6 が *acl-4* を相補したことからこれらの分子が機能的オーソログであると考えられる。今後、神經機能における脂質の *de novo* 合成経路の意義についてさらなる検討を進めていくたい。