

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 原直子

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。原の所属研究室では、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、原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。

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。

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。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。

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。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。

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つたが、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すると、*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つた。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、さらに解析を行つた。

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つた。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、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つた。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つた。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。

fat-3; acl-4 二重変異体の運動機能の低下は、*acl-4* と高い相同性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、AGPAT6 が *acl-4* の機能を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。

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経伝達機能の低下を生じることを明らかにし、本酵素が神経機能に関与する可能性を見いだした。神経の形態形成や神経伝達機構において、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経機能への関与はわかつていなかった。本研究は、高度不飽和脂肪酸欠乏状態において GPAT 活性が減少すると神経機能に異常を来すということを明らかにし、神経機能における脂質の *de novo* 合成経路の重要性を提起した点で意義のある報告といえる。これらの成果は、博士（薬学）の値するものと評価できる。