

論文の内容の要旨

論文題目

Discovery of a novel lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity.

(和訳)

生体膜の非対称性および多様性に重要な
新規リゾリン脂質アシル基転移酵素ファミリーの発見

指導教員 清水 孝雄 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

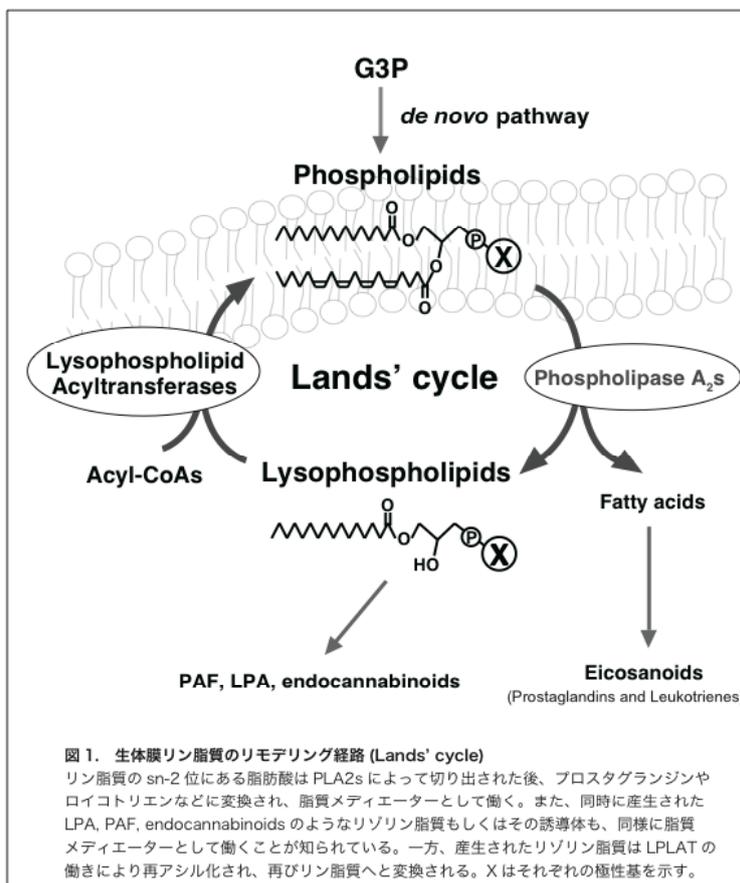
分子細胞生物学専攻

菱川大介

グリセロリン脂質は、生体膜の主要な構成成分としてだけでなく、生理活性脂質の前駆体および肺サーファクタントの主成分としても重要である事が知られている。グリセロリン脂質は、その *sn*-3 位に存在する親水基の種類によって、ホスファチジン酸(PA)、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジルグリセロール(PG)などに分けられる。これらのグリセロリン脂質はグリセロール3リン酸から、リゾ PA、PA、ジアシルグリセロール(DAG)などを経て、*de novo* で生合成される事が知られており、この経路は 1956 年に Kennedy らによって報告された事から Kennedy 経路と呼ばれている。また、生体膜のグリセロリン脂質は、以下にあげる2つの意味での非対称性を持つ事が知られている。1つ目は、膜の内側と外側を構成するグリセロリン脂質の非対称な分布であり、PC

やスフィンゴミエリンは細胞膜の外側に多く、PE や PS、PI などは細胞質側に多い。そして、もう1つの非対称性は、グリセロリン脂質の脂肪酸組成にある。グリセロール骨格の *sn*-1 位には主に飽和脂肪酸あるいはオレイン酸(C18:1)、2位にはアラキドン酸(20:4)を始めとした多価不飽和脂肪酸がエステル結合している。この非対称性や膜のリン脂質の多様性は、膜の曲率形成、柔軟性、流動性、生理活性脂質産生に関与すると考え

られている。この *sn*-1 位と *sn*-2 位における脂肪酸の種類の違いは、Kennedy 経路を介したリン脂質合成では完全には説明出来ない。これに対して、Lands らは 1958 年に、リン脂質の *sn*-2 位にある脂肪酸の交換反応があることを発見し、報告した。このリン脂質のリモデリングは、Kennedy 経路に対して、Lands 回路と呼ばれている(図 1)。



Lands 回路の発見から、リン脂質の *sn*-1 位と *sn*-2 位における脂肪酸組成の偏りは、ホスホリパーゼ A₂(PLA₂)とリゾリン脂質アシル基転移酵素(LPLAT, lysophospholipid acyltransferase)によるグリセロリン脂質の *sn*-2 位の脂肪酸の交換反応により維持されていると考えられてきた。また、*sn*-2 位に多く存在するアラキドン酸は、PLA₂によって切り出された後、プロスタグランジンやロイコトリエンといった生理活性脂質へと変換される。

これまで、PLA₂に関しては、様々な種類の PLA₂ 群の分子同定報告があり、その酵素学的解析や欠損マウスの表現系の解析が進んできたが、LPLATに関しては、数多くの部分精製報告はあるものの、その分子同定報告が少なく、*sn*-2 位の脂肪酸の代謝回転については多くの謎が残されたままであった。1997 年、我々の研究室などが、リゾ PA アシル基転移酵素 α (LPAAT α)を同定して以来、LPAAT α と β という 2 種類の Kennedy 経路に重要な LPLAT の報告がなされたが、Lands 回路における LPLAT は発見されていなかった。近年、我々の研究グループは、LPAAT α と相同性を持ち、LPAAT モチーフをそのアミノ酸配列内に持つ、2 種類のリゾ PC アシル基転移酵素 (LPCAT)、LPCAT1 と LPCAT2 を同定した。しかしながら、LPCAT1 と LPCAT2 はその mRNA 発現の組織分布がそれぞれ肺と免疫細胞に偏っている事から、他にも LPLAT が存在すると考え、私は新規リゾリン脂質アシル基転移酵素の同定に取り組んだ。

私はまず、DAG アシル基転移酵素 1(DGAT1)や、ヘッジホッグアシル基転移酵素 (HHAT)などを含むが、基質未同定の酵素を多く残しているタンパク質ファミリー、Membrane bound O-acyltransferase family (MBOAT family)に注目し、そのリゾリン脂質アシル基転移酵素活性を解析した。MBOAT ファミリーはそのアミノ酸配列内に LPAAT モチーフを持たない。解析の結果、MBOAT1,2,5 の3種類の酵素が、リゾリン脂質アシル基転移酵素活性を持つことが分かった。また、その基質特異性はそれぞれ異なっており、MBOAT1 はリゾ PE(LPE)、リゾ PS(LPS)にオレイン酸、MBOAT2 はリゾ PC(LPC)、LPEにオレイン酸を、また、MBOAT5 は LPC、LPE、LPS にアラキドン酸を始めとした多価不飽和脂肪酸を転移する活性を示した。そこで我々は、それぞれの酵素学的性質から、MBOAT1、MBOAT2、MBOAT5 を順に LPE アシル基転移酵素 1(LPEAT1)、LPCAT4、LPCAT3 と名付けた。定量的 RT-PCR 解析の結果、LPCAT3 mRNA はマウスにおいて、比較的広範囲な臓器で発現していたが、特に精巣や肝臓での高い発現が見られた。LPCAT4 は脳や精巣、卵巣などで高い発現が見られ、また、LPEAT1 に関しては、胃や大腸、精巣上体において高発現していた。以上の結果から私は、これらのリゾリン脂質アシル基転移酵素が、リゾリン脂質と脂肪

酸のどちらに対しても緩やかな基質認識パターンを持つ、多対多の対応で生体膜の非対称性や多様性を維持しているという新たな知見を得た。

次に、私はこれらの酵素の細胞内局在を、FLAG タグをつけたそれぞれの酵素を CHO 細胞に発現させることにより解析した。蛍光顕微鏡や遠心分画の結果、これらの酵素が小胞体に局在している事が明らかになった。また、興味深い事に、これらの酵素を発現させた細胞では、細胞内に脂質二重膜用の構造が過剰に蓄積していた。LPCAT3 発現 CHO 細胞において、この構造体を電子顕微鏡観察により解析した結果、Vector のみを発現させたコントロール細胞に比べて、脂質二重膜状のものが折り畳まれたような構造体が数多く観察された。

さらに私は、内在性の LPCAT3、LPCAT4、LPEAT1 の機能を解析する為に、特に LPCAT3 が高発現している B16 メラノーマ細胞においてそれぞれの遺伝子に対する siRNA を導入する事による、遺伝子ノックダウンの実験を行った。それぞれの遺伝子に対する siRNA は特異的に標的遺伝子の発現を B16 メラノーマ細胞において、20-30%にまで減少させた。LPCAT3-siRNA をトランスフェクションした B16 メラノーマ細胞はコントロールの細胞に比べて、アラキドン酸 CoA をドナーとして用いた場合、内在性の LPCAT, LPEAT, LPSAT 活性が 50%以下にまで減少した。また、LPCAT3-siRNA は、LPAAT、LPIAT、LPSAT には影響を与えなかった。しかしながら LPCAT4、LPEAT1 に対する siRNA は、それぞれの遺伝子発現は抑制したものの、それぞれが基質にするオレイン酸 CoA をアシル供与体に用いた場合でも、内在性の LPLAT 活性には変化が見られなかった。これは、B16 メラノーマ細胞において、LPCAT3 の発現や活性が高いためか、または未知の LPLAT の活性などにより、その活性低下が補われてしまった可能性が考えられる。さらに私は、mass spectrometry を用いて、LPCAT3-siRNA 導入 B16 メラノーマ細胞の膜リン脂質の組成を解析した。その結果、LPCAT3-siRNA 導入細胞はコントロールの B16 メラノーマ細胞に比べて多価不飽和脂肪酸を含む PC、PE、PS の量が減少傾向にあることが分かった。また、LPCAT3 がよい基質としない、パルミチン酸を sn-2 位に持つ PC、PE、PS の量には変化が見られなかった。

以上の結果から私は、新規 LPLAT である LPCAT3、LPCAT4、LPEAT1 を同定し、MBOAT が新しい LPLAT ファミリーであることを発見した。また、これらの酵素の mRNA 発現の組織分布および基質認識パターンがそれぞれ異なっている事は、様々な組織や細胞の生体膜において特徴的なリン脂質組成を生み出し、維持する事に寄与していると考えられる。また、特に LPCAT3 においては、アラキドン酸 CoA を主な基

質とする事から、アラキドン酸由来の生理活性脂質の前駆体リン脂質の量をコントロールしているという意味でも重要であると思われる。これらの酵素の更なる生体内での機能解析は、リン脂質代謝の解析に重要であり、また、これまで知られていなかった生体膜のリモデリングの持つ新しい発見につながると考えられる。