

審査の結果の要旨

氏名 今江 理恵子

ホスファチジルイノシトール (PI) は極性頭部にイノシトール環を有するリン脂質で、イノシトール環のリン酸化により、細胞増殖や小胞輸送、アクチン骨格の制御など、様々なシグナル伝達に関与する。また、PI は脂肪酸部分においても特徴的な構造を有しており、その多くが *sn*-1 位にステアリン酸 (18:0)、*sn*-2 位にアラキドン酸 (20:4) を持つ。このような PI の特徴的な脂肪酸組成は、PI が生合成された後、ホスホリパーゼにより脂肪酸鎖が切り出され、脂肪酸転移酵素により特定の脂肪酸鎖が再導入されることにより形成されると考えられている (脂肪酸リモデリング)。最近、当研究室において、線虫 *C. elegans* を用いた RNAi スクリーニングにより、PI の *sn*-2 位にアラキドン酸を選択的に導入する脂肪酸転移酵素として *mboa-7/LPIAT1* を同定した。一方、PI の *sn*-1 位についても、脂肪酸リモデリングによりステアリン酸が導入されることが示唆されているが、この過程に関与する酵素は未だ同定されていない。本研究において今江は、線虫における細胞内型ホスホリパーゼ A_1 の変異体の脂質組成を解析することにより、本酵素が PI の *sn*-1 位の脂肪酸組成を規定することを見出した。さらに、PI の *sn*-1 位に脂肪酸鎖を導入する脂肪酸転移酵素を同定した。

当研究室ではこれまで、細胞内型ホスホリパーゼ A_1 (*ipla-1*) の機能解析を行っており、本酵素が線虫において上皮系幹細胞 (seam 細胞) の非対称分裂を制御していることを明らかにしている。この現象にどのようなリン脂質代謝が関与するかを調べるため、まずマススペクトロメトリーを用いて *ipla-1* 変異体におけるリン脂質の脂肪酸組成を解析した。その結果、*ipla-1* 変異体では、ホスファチジルコリン (PC) やホスファチジルエタノールアミン (PE) の脂質組成には大きな変化は見られなかったが、PI の分子種が顕著に変化していることが分かった。線虫における PI の主要な分子種は、*sn*-1 位は哺乳動物と同様に 18:0 であるが、*sn*-2 位にはアラキドン酸 (20:4) ではなく EPA (20:5) が結合している。*ipla-1* 変異体では 18:0-20:5 の PI 分子種が減少し、代わりに 18:1-20:5 PI が増加していた。さらに、ガスクロマトグラフィーを用いて PI に結合した脂肪酸量を定量したところ、*ipla-1* 変異体では 18:0 の割合が減少しており、代わりに 18:1 が増加していた。一方で、PI の *sn*-2 位の主要な脂肪酸である 20:5 に関しては変化が見られなかった。このことから、*ipla-1* 変異体では PI の *sn*-1 位の脂肪酸が 18:0 から 18:1 へ入れ替わっていることが分かった。

これまでに、リン脂質の *sn*-2 位に脂肪酸鎖を導入する脂肪酸転移酵素が複数同定されている。ヒトにはこれらの分子と相同性を有する機能未知遺伝子が十数分子存在しており、当研究室ではこれら全ての分子について、線虫相同分子の欠損変異体を樹立している。今江は、これらの変異体のうち LPIAT2 と命名した分子の変異体が、*ipla-1* 変異体と非常に類似した脂質変動を示すことを見出した。すなわち、LPIAT2 変異体では、PI の *sn*-1 位の脂肪酸が 18:0 から 18:1 に入れ替わっており、*sn*-2 位に結合する 20:5 は変化していなかった。また、LPIAT2 変異体においても、PI 以外のリン脂質である PC や PE、ホスファチジルセリン (PS) の脂肪酸組成には大きな変化は見られなかった。以上の結果から、*ipla-1* ならびに LPIAT2 は PI の *sn*-1 位の脂肪酸組成を規定する分子であることが明らかになった。

次に、LPIAT2 が PI の *sn*-1 位に脂肪酸鎖を導入する脂肪酸転移酵素である可能性を検証するため、LPIAT2 を過剰発現させた線虫のマイクロソーム画分を用いて、*in vitro* における脂肪酸転移活性を測定した。その結果、LPIAT2 を発現させたマイクロソーム画分では、野生株と比較して 2-acyl lysoPI に対する 18:0 の導入活性が有意に増加した。その他のリゾリン脂質に対する脂肪酸転移活性はほとんど見られなかった。また、LPIAT2 変異体では 2-acyl lysoPI に対する 18:0 の脂肪酸転移活性が有意に減少していた。以上の結果から、LPIAT2 は PI を特異的に認識し、PI の *sn*-1 位に 18:0 を導入する活性を有する脂肪酸転移酵素であることが分かった。*ipla-1* についても、PI に対するホスホリパーゼ活性を持つことを確認している。

当研究室ではこれまで、*ipla-1* 変異体が上皮組織 (陰門) の形態異常や seam 細胞の非対称分裂の異常を示すことを明らかにしている。Seam 細胞は幼虫期に幹細胞様の非対称分裂を繰り返し、片方の

娘細胞のみが seam 細胞としての運命を維持する。Seam 細胞の核に GFP を発現する *scm::GFP* 発現株を観察すると、野生株の成虫では 16 個の seam 細胞の核がほぼ等間隔に並ぶのに対し、*ipla-1* 変異体では非対称分裂の異常により、*scm::GFP* の数や配置に異常が生じる。LPIAT2 変異体についても同様に解析を行ったところ、LPIAT2 変異体も *ipla-1* 変異体と同様に陰門の突出が観察され、上皮組織に何らかの異常が生じていると考えられた。さらに、seam 細胞の核に関しても、数および配置に異常が見られ、核の間隔が不均一になっている様子が観察された。

これまで、*ipla-1* 変異体における seam 細胞の異常が、逆行性小胞輸送を制御すると考えられる *tbc-3/RabGAP*、あるいは *mon-2/ArfGEF-like* の変異によって回復することを明らかにしているが、LPIAT2 変異体における seam 細胞の異常もこれらの変異で抑制されることが分かった。以上の結果から、*ipla-1* 変異体と LPIAT2 変異体における seam 細胞の非対称分裂異常は、逆行性小胞輸送を介する同様の分子機構で生じていることが示唆された。

本研究において今江は、PI の *sn-1* 位の脂肪酸組成を規定する分子として、*ipla-1* (ホスホリパーゼ A₁) と LPIAT2 (脂肪酸転移酵素) を同定した。1) *ipla-1* 変異体と LPIAT2 変異体は PI の *sn-1* 位の脂肪酸組成において同様の変動が見られること、2) *ipla-1* 変異体と LPIAT2 変異体は共に seam 細胞の非対称分裂に異常が生じること、3) これらの seam 細胞の異常は共に *tbc-3* および *mon-2* の変異によって抑圧されることから、*ipla-1* と LPIAT2 は協調的に PI の *sn-1* 位の脂肪酸リモデリングに関与し、この脂肪酸リモデリングにより生じる PI の脂肪酸組成が、小胞輸送を介する非対称分裂の獲得に重要な役割を果たすことが予想される。

最近、線虫受精卵の分裂過程において PIPs 産生酵素 (PI(4)P5-kinase) が母細胞内で非対称に局在することが報告されており、非対称分裂における PIPs の重要性が示唆されている。一方で、PIP₂ は各オルガネラ膜で特徴的な分布を示し、PIP₂ の偏在性が小胞輸送の重要な制御基盤であることが明らかにされている。「*ipla-1*、LPIAT2 欠損による PI の脂肪酸組成の変動」、「seam 細胞の非対称分裂異常」、「逆行性小胞輸送」の関連は現時点では不明であるが、PI の脂肪酸組成の変動が何らかの PIPs の代謝に影響を及ぼし、小胞輸送系に異常が生じた結果、非対称分裂の異常が引き起こされるのではないかと考えられる。

本研究は、生体膜リン脂質の *sn-1* 位の脂肪酸リモデリングの分子実体を初めて提唱するものであり、また、PI の *sn-1* 位の脂肪酸構造と小胞輸送、非対称分裂の関連を初めて示すものである。PI は様々な細胞機能の重要な制御因子であり、本研究はその *sn-1* 位の脂肪酸組成の生物学的重要性を見出したものとして意義深く、博士 (薬学) に充分値するものと判断した。