

審査の結果の要旨

氏名 田中 陸人

生体膜の主要な構成成分であるリン脂質は、パルミチン酸のような飽和脂肪酸からアラキドン酸やエイコサペンタエン酸のような高度不飽和脂肪酸 (PUFA, polyunsaturated fatty acid) まで様々な脂肪酸が結合している。生体膜リン脂質の脂肪酸組成は膜タンパク質の適切な機能発現に重要であり、生体は膜環境の変化に応答して、脂肪酸組成を変化させ適切な膜環境を維持していると考えられる。しかしながら、このような生体応答は、動物細胞においてほとんど明らかになっていない。

線虫 *C. elegans* は、高等動物と同様に PUFA を有し、飽和脂肪酸から PUFA を合成するための一連の酵素(脂肪酸不飽和化酵素、伸長酵素)を持つ。さらに、これら PUFA 合成系の遺伝子を欠損させることにより脂肪酸組成をコントロールすることが可能である。修士課程において田中は、PUFA 欠乏時どのような生体応答が起きているかを明らかにするために、PUFA 合成系の遺伝子を欠損した *fat-3 fat-1* 変異体 (不飽和結合が3つ以上の脂肪酸を合成できない) の遺伝子発現変動解析を行った。その結果、PUFA 欠乏状態において小胞体ストレス応答のセンサー分子である *ire-1* が活性化している事を見いだしていた。博士後期課程において田中は、PUFA 欠乏時における小胞体ストレス応答分子 *ire-1* 活性化の意義の解明を目指した。

PUFA 欠乏状態における *ire-1* の活性化の生理的意義を明らかにするために、*fat-3 fat-1* 変異体にさらに *ire-1* を欠損させた *ire-1; fat-3 fat-1* 変異体の表現型解析を行った。その結果、*ire-1; fat-3 fat-1* 変異体では成虫期に産卵口(vulva) が破裂し死に到る表現型(burst vulva)を示す個体が顕著にみられた。この表現型は *ire-1; fat-3 fat-1* 変異体に *ire-1* プロモーター下で *ire-1* を発現するコンストラクトを導入することによりほぼ抑制されることを見出した。

次に田中は、組織特異的プロモーターの下流で *ire-1* が発現するコンストラクトを *ire-1; fat-3 fat-1* 変異体に導入し、burst vulva の表現型の回復を見ることで、どの組織の *ire-1* が重要であるかを調べた。線虫の主要な組織である腸および上皮に *ire-1* を発現させたところ、腸特異的に *ire-1* を発現させた場合は、表現型の回復は部分的であったが、上皮特異的に *ire-1* を発現させると表現型はほぼ完全に回復した。さらに上皮細胞の一種である seam cell のみに *ire-1* を発現させても表現型はほぼ完全に回復することを示した。

田中は、組織特異的レスキュー実験から seam cell における *ire-1* の機能が重要である事を示唆した。seam cell は線虫の側面に並ぶ上皮細胞であり成虫になる直前の L4 幼虫期において融合し、一つの多核細胞になる。この seam cell は vulva の構造を支持しており、seam cell に異常が見られると burst vulva を示す事が知られている。そこで田中は、vulva 付近の seam cell の形態を seam cell とその周りの上皮細胞の細胞間接着(アピカルジャンクション)に局在する分子 AJM-1 の抗体染色により観察した。その結果、野生株では、体軸にそった2本の線状の AJM-1 の染色が見られ、*fat-3 fat-1* 変異体においても野生株と同様の染色像が見られた。しかし、*ire-1; fat-3 fat-1* 変異体では体軸にそった2本の線状の染色像が交差、または分岐しており、seam cell が異常な形態を示していた。この seam cell の形態異常は seam

cell 特異的に *ire-1* を発現させることにより回復した。以上の結果から、*ire-1* は PUFA 欠乏時に seam cell の形態維持に重要な役割を担っていることを明らかにした。

次に、PUFA 欠乏時の *ire-1* の機能に脂質代謝が関与するか調べた。その結果、GC-MS による脂肪酸組成解析により、*ire-1; fat-3 fat-1* 変異体では野生株、*fat-3 fat-1* 変異体に比べて、飽和脂肪酸であるパルミチン酸が顕著に蓄積していることを見いだした。まず、生体内のパルミチン酸の不飽和化が変化しているか、¹⁴C ラベルしたパルミチン酸を培地に添加し、線虫内で代謝されたラベル脂肪酸を TLC で分離、検出した。その結果、*fat-3 fat-1* 変異体では添加したパルミチン酸が効率よく不飽和化されたのに対して、*ire-1; fat-3 fat-1* 変異体ではパルミチン酸の不飽和化が減弱している事が明らかになった。

また、パルミチン酸はパルミチン酸選択的な不飽和化酵素(*fat-5*)により代謝される事が知られている。そこで、定量 PCR により *fat-5* の発現を調べたところ、*fat-5* は *fat-3 fat-1* 変異体において野生株の約 15 倍発現しており、さらにこの発現上昇は *ire-1* の欠損により顕著に抑制された。これらの結果から、*ire-1* は PUFA 欠乏時において *fat-5* の発現を上昇させることにより、パルミチン酸の蓄積を抑制している事を示唆した。

さらに、*ire-1; fat-3 fat-1* 変異体で見られたパルミチン酸の蓄積が *burst vulva* の表現型に関係しているかを検証した。*ire-1; fat-3 fat-1* 変異体に *fat-5* を強制発現させ、パルミチン酸の代謝を促進させたところ、*burst vulva* は顕著に抑制された。一方、パルミチン酸を培地に添加すると、*burst vulva* は増強された。これらのことから、*ire-1; fat-3 fat-1* 変異体で見られた *burst vulva* はパルミチン酸の蓄積により引き起こされている事を示唆した。

ire-1 はフォールディングが異常なタンパク質が小胞体内に蓄積すると、転写因子である *xbp-1* を活性化し、小胞体内の異常タンパク質の蓄積を抑制する遺伝子の転写を促進することが知られている。そこで田中は、PUFA 欠乏時における *ire-1* の機能に *xbp-1* が関与するか調べた。予想外な事に、*xbp-1; fat-3 fat-1* 変異体では、*ire-1; fat-3 fat-1* 変異体で見られた *burst vulva* や seam cell の形態異常、パルミチン酸の蓄積といった表現型が見られなかった。さらに、*xbp-1* の欠損は *fat-3 fat-1* 変異体における *fat-5* の発現上昇にも影響しなかった。これらの結果から、PUFA 欠乏時の *ire-1* による飽和脂肪酸代謝制御は *xbp-1* を介さない経路である事を明らかにした。

本研究において田中は、PUFA 欠乏時に *ire-1* が活性化し、飽和脂肪酸の不飽和化酵素である *fat-5* の mRNA 発現を制御していることを明らかにした。また、この *ire-1* による *fat-5* の発現上昇は *xbp-1* 非依存的であることも明らかにした。さらに、*ire-1* の欠損による飽和脂肪酸の蓄積が seam cell の形態異常を引き起こしていることを示した。本研究は、*ire-1* が *xbp-1* 非依存的に脂肪酸恒常性維持機構として重要な役割を担っていることを見いだしたものとして意義深く、博士(薬学)に十分に値する研究である。