

ミトコンドリア形態形成におけるリン脂質sn-1位脂肪酸リモデリングの意義の解明

著者	中永 景太
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第15778号
URL	http://hdl.handle.net/10097/58781

(要約)

論文題目

ミトコンドリア形態形成におけるリン脂質 *sn-1*
位脂肪酸リモデリングの意義の解明

東北大学大学院薬学研究科
生命薬科学専攻 分子細胞性化学
B1YD1023 中永 景太

<背景>

リン脂質はグリセロール骨格に2本脂肪酸と極性基が結合した構造を有する主要な細胞膜構成成分である。リン脂質の2本の脂肪酸は脱アシル化反応と再アシル化反応を繰り返す、いわゆるリモデリング反応を恒常的に受けている。このリン脂質のリモデリング意義は不明であるが、脱アシル化反応（ホスホリパーゼ A; PLA）や再アシル化反応（リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ; LPLAT）に対して阻害活性を有する化合物が細胞内小胞輸送やオルガネラ形態などに影響を与えることが報告されている。しかし、その詳細な分子メカニズムや関与する酵素群の実態は不明な点が多く残されている。一般に、リン脂質の *sn*-1 位と *sn*-2 位の2本の脂肪酸は種類が大きく異なり、また、リモデリングに関与する酵素群も異なっていることが予想される。近年、リン脂質 *sn*-2 位のリモデリングに関わる候補遺伝子が複数報告された。一方、*sn*-1 位の脂肪酸リモデリングのメカニズムは PI に関して一部、線虫で分かっているだけである。線虫においては、*sn*-1 位脂肪酸を切り出す酵素活性を有する細胞内型 PLA₁ (iPLA₁) が存在し、その欠損体線虫では、ホスファチジルイノシトール (PI) の *sn*-1 位の脂肪酸組成が変化することが報告され、PI の *sn*-1 位の脂肪酸のリモデリングに関与することが示唆されている。

哺乳類において、iPLA₁ には3種類のホモログ遺伝子 (iPLA₁α, β, γ) が存在するが、3種類の iPLA₁ の細胞内における基質特異性や細胞内機能はほとんど不明なままである。また、*sn*-1 位のリモデリングに関わるのかも分かっていない。そこで、本研究ではヒト iPLA₁ に着目して、その基質特異性と細胞内機能に関して解析を行った。

<方法>

iPLA₁は全身に発現しており、本研究で用いた HeLa 細胞にも発現が認められる。iPLA₁を過剰発現あるいはノックダウンした HeLa 細胞から酸性メタノールを用いてリゾリン脂質を回収した。リゾリン脂質は液体クロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (LC-MS) を用いて測定した。このとき 1-アシルリゾリン脂質と 2-アシルリゾリン脂質を区別して測定した。ミトコンドリアは *mitotracker* を用いて染色を行った。

<結果・考察>

まず、ヒト iPLA₁を細胞に過剰発現させて、細胞内リゾリン脂質の測定を行った。その結果、全くリゾリン脂質に変動は見られなかった。*in vitro*の酵素反応では活性が認められるが、細胞内では過剰発現させても iPLA₁の代謝産物である 2-アシルリゾリン脂質が増加しないことから、細胞内では産生された 2-アシルリゾリン脂質は速やかに代謝されていると考えた。そこで、細胞内のリゾリン脂質代謝反応のひとつである再アシル化反応に着目した。まず私は、2種類の異なる化合物を用いて、細胞内における再アシル化反応の阻害を試みた。2種類の化合物はそれぞれ異なる再アシル化経路のステップをターゲットとしている。この2種類の化合物を細胞に添加すると、ともに 1-アシルリゾリン脂質と 2-アシル型リゾリン脂質の蓄積が顕著に観察された。この結果は、この2種類の化合物がともに再アシル化反応の阻害剤として使用可能であることを示唆している。iPLA₁ノックダウン細胞において再アシル化反応を抑制すると、2-アシル型リゾリン脂質の蓄積が抑制された。一方で、1-アシルリゾリン脂質

は変化しないか、増加傾向が見られた。iPLA₁ を過剰発現した時は、ノックダウンした時とは反対に、再アシル化反応を抑制した時に見られる 2-アシルリゾリン脂質の蓄積が増強された。以上の結果から、細胞内では iPLA₁ によって産生された 2-アシルリゾリン脂質は速やかに再アシル化されている (*sn*-1 位リモデリング) ことが分かった。また、3 種類の iPLA₁ ではそれぞれ基質特異性も大きく異なることが分かった。

次に *sn*-1 位の脂肪酸リモデリングの機能解析を iPLA₁ の細胞内機能解析を行った。再アシル化反応を阻害した時、また 3 種類の iPLA₁ のうちひとつをノックダウンした時にミトコンドリアのフラグメント化が観察された。ミトコンドリアのフラグメント化を誘導すると、iPLA₁ は細胞内局在を変化させて、ミトコンドリアと共局在することが分かった。以上の結果より、iPLA₁ による *sn*-1 位の脂肪酸の切り出しとそれに引く続くアシル化反応 (*sn*-1 位脂肪酸のリモデリング反応) がミトコンドリアの形態を制御することが示された。また、この反応はミトコンドリア上、あるいはごく近傍で行っていることが予想されるので、ミトコンドリアの脂質環境に直接的に作用していると思われる。ごく最近、遺伝性痙性対麻痺の原因遺伝子として iPLA₁ が同定された。本研究により、iPLA₁ 欠損患者では *sn*-1 位のリモデリング不全がミトコンドリアの形態・機能異常を引き起こし、その結果、痙性対麻痺という病態を発症するメカニズムが想定された。