

## 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

分子細胞生化学 中永 景太

#### <背景>

ジアシルリン脂質はグリセロール骨格に2本脂肪酸とリン酸を含む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。グリセロール骨格の *sn-1* 位には主に飽和脂肪酸と単価不飽和脂肪酸、*sn-2* 位には多価不飽和脂肪酸がエステル結合している。このようなジアシルリン脂質の脂肪酸の非対称性は主にリモデリング反応によって形成される。リモデリング反応とは、ホスホリパーゼ  $A_{1/2}$  ( $PLA_{1/2}$ ) によってジアシルリン脂質の *sn-1* 位、*sn-2* 位の脂肪酸が切れ、2-アシル、1-アシルリゾリン脂質が産生される。産生されたリゾリン脂質はリゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ (LPLAT) によって脂肪酸が導入されて再びジアシルリン脂質に変換される。このリモデリング反応は古くから知られていたが、その詳細な分子メカニズムや関与する酵素群の実態は長らく不明なままであった。しかし、近年、*sn-2* 位のリモデリングを担う候補分子が数多く報告され、*sn-2* 位のリモデリングメカニズムと生体内機能が徐々に明らかになりつつある。一方、*sn-1* 位のリモデリングはホスファチジルイノシトール (PI) に関して線虫で一部分かっているだけである。線虫では *iPLA1* が PI の *sn-1* 位の脂肪酸を切り出し、*acl-8, 9, 10* が脂肪酸を導入する。哺乳類には3種類の *iPLA1* が存在する (*iPLA1 $\alpha$* ,  *$\beta$* ,  *$\gamma$* )。このうち、*iPLA1 $\alpha$*  と *iPLA1 $\gamma$*  は *in vitro* の酵素反応において様々な種類の脂質に作用することが分かっている。一方、*iPLA1 $\beta$*  はこれまで酵素活性は検出されていない。興味深いことに、ごく最近、遺伝性痙性対麻痺の原因遺伝子として *iPLA1 $\alpha$*  と *iPLA1 $\gamma$*  が同定された。遺伝性形成対麻痺とは下肢の痙攣と筋力低下を主症状とする神経変性疾患である。このように *iPLA1* は個体レベルで重要な機能を担っていると考えられるが、生体内で *iPLA1* はどんな脂質を切っているのか、脂質を切ることでどんな細胞内機能を発揮しているのかはほとんど分かっていない。また *sn-1* 位のリモデリングとの関与も不明なままです。そこで本研究では *iPLA1 $\alpha$*  と  *$\gamma$*  に着目して、その脂質代謝機構と細胞内機能解析を行った。

## <結果・考察>

まず  $iPLA_1\alpha$ 、 $\gamma$ は細胞内でどのような脂質を切っているのか調べる目的で、過剰発現した時の細胞内リゾリン脂質量を測定した。リゾリン脂質の測定は液体クロマトグラフィー/マススペクトロメトリーを用いて行った。その結果、 $iPLA_1$ を過剰発現させても全く細胞内のリゾリン脂質量に変化は見られなかった。過剰発現しても  $PLA_1$ の産生物である 2-アシルリゾリン脂質が増加しないことから、産生された 2-アシルリゾリン脂質が速やかに再アシル化反応を受けて消去されていると考えた。そこで、私は細胞内の再アシル化反応を阻害することを考えた (Figure 1)。CI-976 は単離したゴルジ膜上の LPLAT 活性を阻害することが報告されている。私は CI-976 を細胞に投与した時のリゾリン脂質を測定したところ、様々な 1-アシルと 2-アシルリゾリン脂質 (LPC, LPE, LPI, LPG, LPS) が劇的に増加した。この結果は、CI-976 が 1-アシルと 2-アシルリゾリン脂質に対する LPLAT の活性を幅広く阻害したことを示唆している。ところで、CI-976 はもともとコレステロールアシルトランスフェラーゼの阻害剤として合成された。そのため、CI-976 の特異性は高くない。そこで、別の方法で再アシル化反応を止めることを試みた。LPLAT は主に acyl-CoA の脂肪酸を利用して再アシル化反応を行うため、acyl-CoA の合成を止めることでも LPLAT 活性を抑制できるのではないかと考えた。Triacsin C は 5 つの acyl-CoA 合成酵素のうち 4 つを阻害することができる。私は Triacsin C を処理した時の細胞内 acyl-CoA 濃度を測定したところ、acyl-CoA の濃度が大きく低下することが分かった。このことから、acyl-CoA 依存的な LPLAT 反応はほぼ完全に抑制されていると予想される。次に、細胞に Triacsin C で処理した時のリゾリン脂質を調べた。その結果、 $PLA_1$ の代謝産物である 2-アシルリゾリン脂質の蓄積が顕著に観察された。この結果は CI-976 の時と非常に類似している。

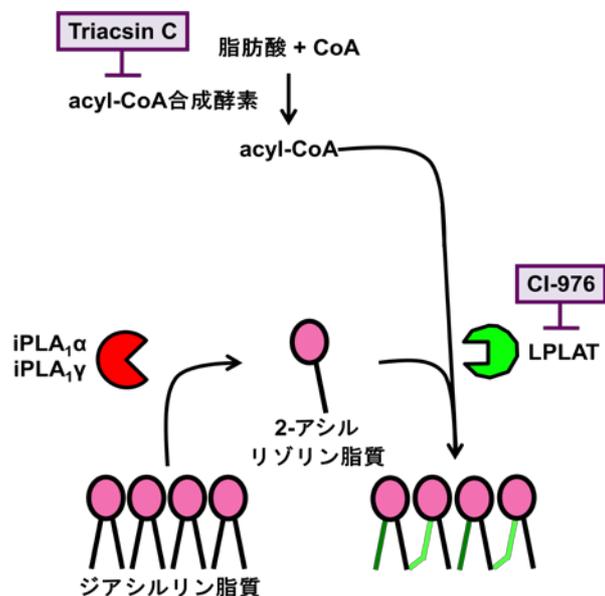


Figure 1. *sn*-1位の脂肪酸リモデリング機構  
 $iPLA_1\alpha$ あるいは $iPLA_1\gamma$ によって産生された2-アシルリゾリン脂質は、CI-976-sensitiveなLPLATによってacyl-CoA依存的に再アシル化される。CI-976とTriacsin CはそれぞれLPLAT、acyl-CoA合成酵素を阻害する。

CI-976 あるいは Triacsin C によって増加した 2-アシルリゾリン脂質に iPLA<sub>1</sub>α と γ が関与するのか調べた。iPLA<sub>1</sub>α ノックダウン細胞に CI-976 あるいは Triacsin C を処理すると、2-アシル型リゾリン脂質の蓄積が減少した。1-アシルリゾリン脂質は変化しないか、あるいは増加傾向にあった。iPLA<sub>1</sub>α 過剰発現細胞に CI-976 あるいは Triacsin C を処理すると、ノックダウンの時とは反対に 2-アシルリゾリン脂質の蓄積が増強された。このとき 1-アシルリゾリン脂質は変化しなかった。iPLA<sub>1</sub>γ に対しても同様の実験を行ったところ、ノックダウンにより 2-アシルリゾリン脂質の蓄積が減少した。過剰発現した時には 2-アシル LPE のみ増加が見られた。2-アシルリゾリン脂質に対する影響は γ に比べて α で顕著に見られたため、細胞内の主要な sn-1 位の脱アシル化酵素は iPLA<sub>1</sub>α であると考えられる (Figure 1)。

次に、sn-1 位のリモデリングの細胞内機能について解析を行った。細胞内では、ミトコンドリアは常に融合と分裂を繰り返し、網目状のネットワーク構造が観察される。これまで、CI-976 を細胞に投与するとミトコンドリアがフラグメント化することが報告されている。興味深いことに、Triacsin C 処理した場合にもミトコンドリアのフラグメント化が認められた。このことからリゾリン脂質の再アシル化反応がミトコンドリアの形態形成に重要であることが予想される。そこで次にミトコンドリアの形態形成における脱アシル化反応の関与を調べた。iPLA<sub>1</sub>α のノックダウン細胞では control と比べて変化は認められなかったが、iPLA<sub>1</sub>γ をノックダウンした場合、CI-976 や Triacsin C と類似したミトコンドリアのフラグメント化が観察された。PLA<sub>2</sub> 阻害剤 (MAFP) を細胞に加えた時には、ミトコンドリアの形態に異常は見られなかった。以上の結果より、iPLA<sub>1</sub>γ 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 位の脂肪酸リモデリング反応) がミトコンドリアの形態を制御することが示唆された。iPLA<sub>1</sub>γ の細胞内局在を調べたところ、通常の培養条件下では iPLA<sub>1</sub>γ は主に細胞質、ゴルジ体に局在が認められた。一方、CI-976 を投与した時には iPLA<sub>1</sub>γ はドット状の局在を示し、その多くがミトコンドリアと共局在した。このことから、iPLA<sub>1</sub>γ はフラグメント化したミトコンドリアに集まって、そこでリモデリングを行っていることが考えられる。iPLA<sub>1</sub>γ はミトコンドリアが融合した後、速やかにミトコンドリアから離れるため、通常の培養条件下ではミトコンドリアへの局在がほとんど見られなかったのかもしれない。一方、iPLA<sub>1</sub>α は細胞質にのみ局在し、ミトコンドリアへの局在は観察されなかった。このように iPLA<sub>1</sub>γ と iPLA<sub>1</sub>α では細胞内局在が大きく異なるため、iPLA<sub>1</sub>α のノックダ

ウンではミトコンドリアに影響が見られなかったと考えられる。

CI-976はミトコンドリアのフラグメント化に加えて、ゴルジの tubulation 化、トランスフェリン (Tf) の細胞内輸送阻害を引き起こすことが知られている。PLA<sub>2</sub>阻害剤は CI-976 によるゴルジの tubulation 化を抑制し、また、Tf の細胞内輸送を阻害する。このことから、sn-2 位の脂肪酸代謝がこの2つの細胞内現象に重要であると考えられる。しかし、一部の PLA<sub>2</sub>阻害剤は PLA<sub>1</sub>活性も阻害することが報告されており、PLA<sub>2</sub>阻害剤の結果の一部は、PLA<sub>1</sub>阻害によるものである可能性が考えられる。そこで、iPLA<sub>1</sub>のゴルジの tubulation 化と Tf の細胞内輸送における関与を調べた。その結果、iPLA<sub>1</sub>をノックダウンした細胞において、ゴルジの tubulation 化、Tf の細胞内輸送には全く影響を与えなかった。この結果は、ゴルジの tubulation 化、Tf の細胞内輸には sn-1 の脂肪酸代謝は関与しないことと同時に、sn-2 位の脂肪酸代謝が重要であることを強く示唆している。

本研究により細胞内では、iPLA<sub>1</sub>αと iPLA<sub>1</sub>γによって産生された2-アシルリゾリン脂質は、速やかに CI-976-sensitive な LPLAT によって acyl-CoA 依存的に再アシル化される sn-1 位のリモデリング経路の存在が明らかとなった。また、iPLA<sub>1</sub>γを介した sn-1 位のリモデリングはミトコンドリアの形態形成を担うこと示唆された。これまで 30 種類以上の遺伝性痙性対麻痺の原因遺伝子が同定されている。原因遺伝子の中にはミトコンドリアの機能に重要な分子が含まれており、ミトコンドリアの機能不全が病態発症の原因のひとつであると考えられている。iPLA<sub>1</sub>γ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異常、さらにはそれに付随して起こると予想される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。ミトコンドリアの融合促進剤や脂肪酸を加える事で acyl-CoA の濃度を高め、sn-1 位のリモデリングを促進する方法が病態の治療に有効である可能性がある。

論文提出者: 中永 景太

論文審査委員 (主査): 青木 淳賢

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

リン脂質は細胞膜の主要な構成成分である。リン脂質のグリセロール骨格の *sn*-1 位と *sn*-2 位に結合した 2 本の脂肪酸はホスホリパーゼ  $A_{1/2}$  による脱アシル化反応とアシルトランスフェラーゼによる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。本研究は、細胞内型ホスホリパーゼ  $A_1$  (iPLA<sub>1</sub>) に着目して、これまでほとんど不明であった *sn*-1 位の脂肪酸のリモデリングの分子機構とその細胞内機能の一端を明らかにした。iPLA<sub>1</sub> の代謝産物である 2-アシルリゾリン脂質は非常に不安定であり、また細胞内ではアシルトランスフェラーゼによる代謝を受けるため、2-アシルリゾリン脂質を細胞レベルで測定することは非常に困難であった。しかし、本研究では①pH を下げることで、不安定な 2-アシルリゾリン脂質の 1-アシルリゾリン脂質への転移反応を抑制したこと、②液体クロマトグラフィー・マススペクトロメトリーを用いて 2-アシルと 1-アシルリゾリン脂質を区別して測定を行ったこと、③阻害剤を用いて、細胞内におけるリゾリン脂質のリン脂質への代謝を阻害したこと、iPLA<sub>1</sub> 依存的な 2-アシルリゾリン脂質の産生を細胞レベルで捉えることに成功した。これは iPLA<sub>1</sub> の *sn*-1 位脂肪酸リモデリングにおける関与を細胞レベルで明確に示した初めての知見である。また、3 種類存在する iPLA<sub>1</sub> (iPLA<sub>1</sub> $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) は異なった基質特異性を示すことが分かった。本研究で用いたリゾリン脂質の解析手法は非常に独創的であり、今後さらなるリモデリングのメカニズム解明に繋がることを期待される。

さらに iPLA<sub>1</sub> $\gamma$  はミトコンドリアに局在すること、iPLA<sub>1</sub> $\gamma$  を介した *sn*-1 位のリモデリングはミトコンドリアの形態形成に重要であることを明らかにした。リン脂質のリモデリングがミトコンドリアの形態形成に関わることはこれまで全く知られておらず、脂肪酸リモデリングの新しい細胞内機能を発見したことは評価に値する。近年、iPLA<sub>1</sub> $\gamma$  は遺伝性痙性麻痺の原因遺伝子であることが報告されたが、詳細は不明なままであった。本研究により、iPLA<sub>1</sub> $\gamma$  の欠損患者では、*sn*-1 位の脂肪酸リモデリング不全がミトコンドリアの形態異常と機能低下を引き起こし、その結果、病態発症に繋がる可能性が考えられる。このように本研究成果はヒト遺伝的疾患の原因解明にも繋がる可能性のある成果であり、社会的にも意義が大きい。よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。