

論文内容要旨

【序】

近年、リン脂質からアシル鎖が一本除かれたリゾリン脂質が特異的 G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を介して様々な生命現象に関与することが明らかにされ、第 2 世代の脂質メディエーターとして注目されている。生体内には様々な種類のリゾリン脂質が存在しているが、申請者が所属する研究室では、特にリゾホスファチジン酸 (LPA) およびリゾホスファチジルセリン (LysoPS) に着目した解析が行われている。これまでの研究から、LPA, LysoPS に対してそれぞれ 6 つ、4 つの GPCR が同定され (LPA₁₋₆, LPS₁₋₄)、また、LPA 産生酵素としてオートタキシン (ATX)、PA-PLA_{1α} および PA-PLA_{1β} の 3 種類が、LysoPS を産生する酵素として PS-PLA₁ が同定されている (図 1)。本論文で申請者は、(1) ATX-LPA₁ シグナルの新規生理機能、(2) PA-PLA_{1α} と PS-PLA₁ のユニークな基質特異性、に関する解析を行った。

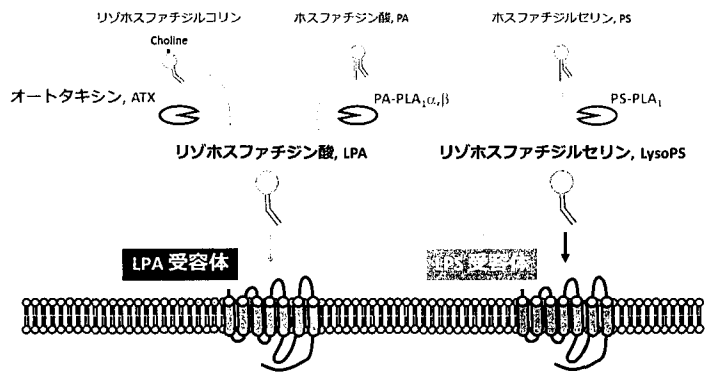


図 1 LPA および LysoPS の受容体とその産生酵素

【第 1 章：ATX-LPA₁ シグナルの軟骨形成における役割の解明】

LPA は特異的 GPCR を介して様々な活性を示す生理活性脂質である。現在までに 6 種類の LPA 受容体 (LPA₁₋₆) が同定されており、受容体ノックアウト (KO) マウスの研究も進められている。このうち、LPA₁ KO マウスは外見上の特徴として、鼻部のつぶれや両目間隔の広がりといった頭部の形態異常が報告されている (図 2)。このことから、LPA₁ シグナルが頭部形態形成に重要であることが示唆されている。しかし、LPA₁ シグナルの異常がどのように頭部形態異常に繋がるのか、その詳細なメカニズムは全く分かっていなかった。

近年、新たなモデル生物としてゼブラフィッシュが注目されている。ゼブラフィッシュの卵は体外に産み落とされ、透明で発生過程も早いことから、発生学の研究に多用されている。また、ゼブラフィッシュには受容体、産生酵素を含めたほとんどの LPA 関連遺伝子が保存されており、頭部形態形成における LPA シグナルの詳細を調べるうえで、有用なツールであると考えられる。そこで申請者は、LPA (ATX-LPA₁) シグナルの頭部形態形成に与える影響を知る手掛かりとして、ゼブラフィッシュにおける LPA₁, ATX の機能解析を行うことにした。

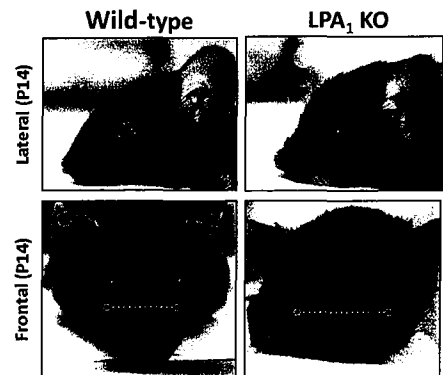


図 2 LPA₁ KO マウスの頭部形態異常
14日齢の野生型およびLPA₁ KOマウスの頭部の様子。LPA₁ KOマウスでは、鼻先のつぶれと両目間隔の開き (図中の点線) といった頭部形態異常が報告されている。

まず、Solnica-Krezel 博士と共同研究により、LPA₁ 遺伝子にナンセンス変異を持つ LPA₁ 変異ゼブラフィッシュを同定した (図 3A, B)。LPA₁ 変異体は LPA₁ KO マウスと同様に頭部形態異常を示した (図 3C)。頭部形態異常の原因が、頭部骨格の異常にあると考え、LPA₁ 変異ゼブラフィッシュ胚の骨格 (軟骨・硬骨) の観察を行ったところ、下あごの軟骨形態に異常が認められた (図 3D)。また、LPA₁ の発現抑制や LPA₁ 拮抗薬処理によっても下あごの軟骨形態異常が認められたことより、LPA₁ シグナルが軟骨形成に重要であることが示唆された。さらに、軟骨細胞特異的に EGFP を発現する *col2a1:EGFP* transgenic ゼブラフィッシュにおいて LPA₁ の発現抑制を行った結果、LPA₁ 発現抑制によって軟骨細胞の配置に異常が生じていることが明らかとなった (図 4)。

次に、発生期の骨形成における ATX の役割について検討を行った。その結果、ATX の発現抑制により LPA₁ の場合と同様に、軟骨形態の異常と軟骨細胞の配置異常を示すことが分かった (図 5)。

LPA₁ KO マウスの表現型を解析している過程で、 β_1 インテグリンの欠損マウスが LPA₁ KO マウスと同様の軟骨細胞の配列異常を示すことに気がついた。そこで、初代培養軟骨細胞を用いて LPA が軟骨細胞の接着に与える影響を検討した結果、LPA₁ シグナルが軟骨細胞の細胞外基質、特に、軟骨細胞の回りを取り囲むように存在することが知られている II 型コラーゲンへの接着能の上昇に関わっていることが分かった (図 6)。

本研究結果によって、軟骨細胞の近傍で産生された LPA が、LPA₁ を介して軟骨細胞の細胞外基質との接着能を調節し、正常な細胞の配列の制御に関わることを示唆した (図 7)。

本章の成果は、軟骨形成における ATX-LPA₁ シグナルの重要性および ATX の新規生理機能を示した初めての結果である。

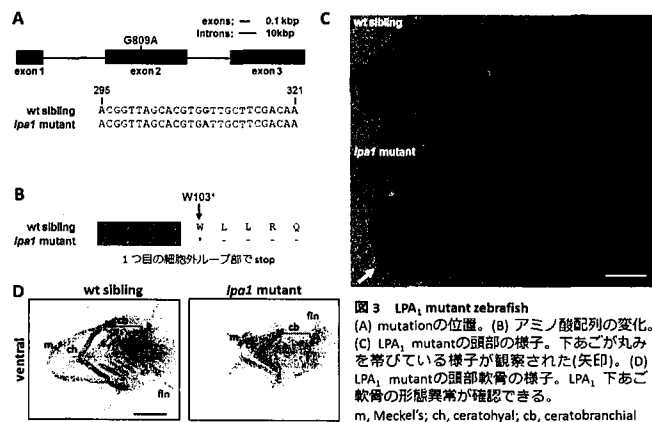


図 3 LPA₁ mutant zebrafish (A) mutation の位置。(B) アミノ酸配列の変化。(C) LPA₁ mutant の頭部の様子。下あごが丸みを帯びている様子が観察された(矢印)。(D) LPA₁ mutant の頭部軟骨の様子。LPA₁ 下あご軟骨の形態異常が確認できる。m, Meckel's; ch, ceratohyal; cb, ceratobranchial

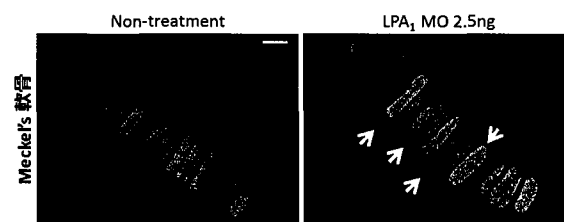


図 4 LPA₁ 発現抑制による軟骨細胞の配置異常 5 dpf における *col2a1:EGFP* transgenic zebrafish の下あごの様子。軟骨細胞の大きさが不均一で、きちんと配置されていないものが多い(白矢印)。

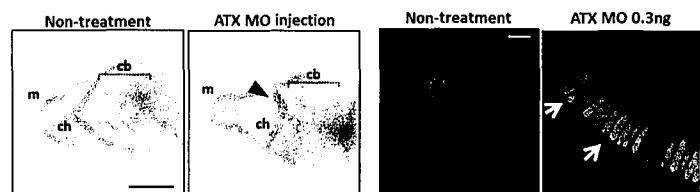


図 5 ATX 発現抑制による軟骨細胞の異常 左 5 dpf におけるアルシアンブルー染色の下あごの様子。右 5 dpf における軟骨部の軟骨細胞の様子。LPA₁ 発現抑制時と同様の表現型が観察された。

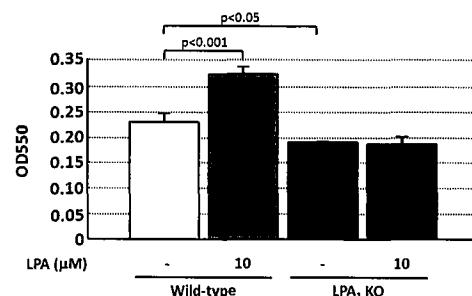


図 6 初代軟骨細胞の接着能へ与える LPA₁ シグナルの影響 96-well plate に II 型コラーゲンをコートし、初代軟骨細胞を播種後、1 時間接着させた。その後、plate に接着した細胞を固定・染色し、吸光度を測定して細胞の接着能を評価した。10 μM LPA で刺激すると、接着能が上昇した。この効果は、LPA₁ KO マウス由来の細胞では見られなかった。

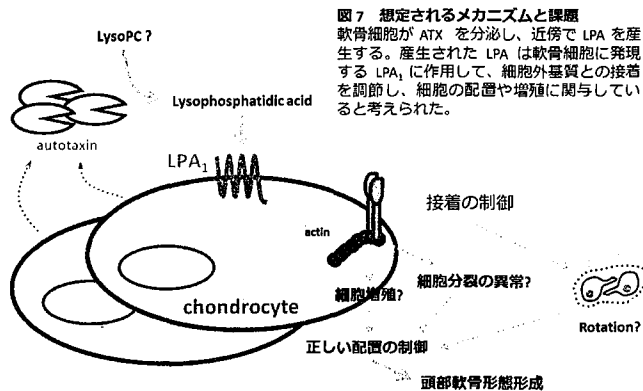


図7 想定されるメカニズムと課題
軟骨細胞が ATX を分泌し、近傍で LPA を産生する。産生された LPA は軟骨細胞に発現する LPA₁ に作用して、細胞外基質との接着を調節し、細胞の配置や増殖に関与していると考えられた。

【第2章：PA-PLA₁α と PS-PLA₁ の基質特異性におけるループ構造の関与】

ホスホリパーゼ A₁ (PLA₁) は、リン脂質の *sn*-1 の脂肪酸を加水分解する酵素である。分泌型の PLA₁ として、これまでに6種類の酵素が同定されているが、これらは構造的に腓リパーゼファミリーに属している。細胞外型の PLA₁ のうち、ホスファチジルセリン (PS) 特異的 PLA₁ (PS-PLA₁) とホスファチジン酸 (PA) 選択的 PLA₁α (PA-PLA₁α) は最近当研究室で同定され、生化学的解析から、それぞれ PS, PA を特異的に加水分解することが分かっている。PS と PA は構造的に非常に似ているが、これら酵素がどのようにして厳密に基質を認識しているのかはよくわかっていない。これまでに、結晶構造解析や変異体の実験結果から、リパーゼファミリーの基質認識には β5, β9, lid と呼ばれる3つのループ構造が重要であることが示唆されている。そこで申請者は、PS-PLA₁ と PA-PLA₁α の基質認識におけるループ構造の役割を検討するため、PA-PLA₁α とループ構造を置換した PS-PLA₁ 変異体を作製し、その基質特異性の変化を調べた。

作製した各種 PS-PLA₁ 変異体の PS, PA に対する酵素活性を測定したところ、すべての PS-PLA₁ 変異体で PS への酵素活性は維持されており (図 8A), PS-PLA₁ の PS の認識にはループ構造以外の部分が重要であることが示唆された。しかしながら、ループ構造を置換していくことで、PA への酵素活性は上昇してい

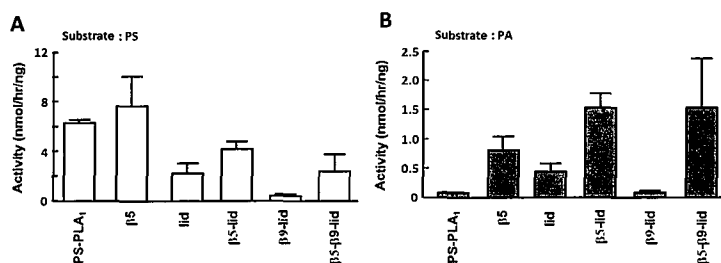


図8 PS-PLA₁変異体の基質特異性の変化
(A) PSへの特異性は、各PS-PLA₁変異体で大きく変化しなかった。
(B) 一方、PAへの特異性は、ループ構造を入れ替えることで、大きく上昇した。

たことから (図 8B), PA の認識にはループ構造が重要であることが分かった。PS-PLA₁ は、PS の他にも LysoPS を加水分解するリゾホスホリパーゼ活性を有することがわかっている。驚くことに、β5 ループを置換した PS-PLA₁ 変異体はすべて、PS への活性を示すものの LysoPS への酵素活性は失われることが明らかとなった。このことから、PS-PLA₁ の β5 ループはリゾホスホリパーゼ活性に不可欠な構造であることが明らかとなった (図 9)。本章の研究から、リパーゼファミリー分子の基質認識におけるループ構造の重要性、特にこれまであまり意義の分かっていなかった β5 ループの役割を示すことができた。

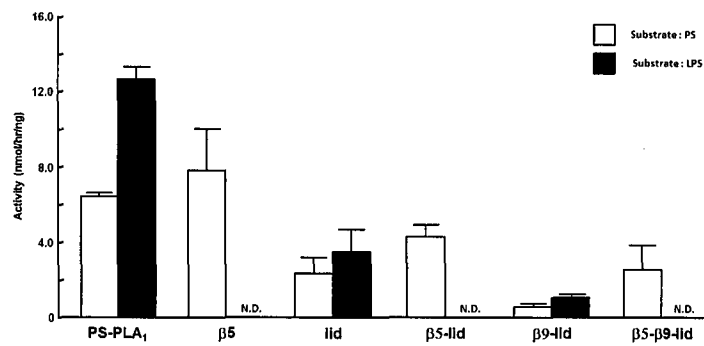


図9 β5ループのリゾホスホリパーゼ活性における重要性
PS-PLA₁のβ5ループを置換した変異体はすべて、PSへの活性は保ちつつLPSへの酵素活性を失った。

本論文の研究によって ATX, PA-PLA₁α および PS-PLA₁ に関する新たな知見が提示され、リゾリン脂質メディエーター産生酵素に関する研究がより発展していくものと期待される。

【発表論文】

Naoaki Arima, et al., *J. Lipid Res.* 53, 513–521 (2012).

審査結果の要旨

本論文は、近年注目されているリゾリン脂質メディエーター、特にリゾホスファチジン酸 (LPA) とリゾホスファチジルセリン (LysoPS) とその産生酵素であるオートタキシン、PA-PLA₁α および PS-PLA₁ に焦点を当てた研究である。第1章では、ATX-LPA₁ シグナルの軟骨形成における機能解析を行っている。申請者はまず、ゼブラフィッシュのアンチセンスモルフォリノオリゴによる遺伝子抑制系を利用し、ATX および LPA₁ が頭部の軟骨形成に関与していることを示唆した。さらに、ゼブラフィッシュの軟骨細胞を可視化し観察することで、ATX-LPA₁ シグナルが軟骨細胞の正常な配置の制御を担っていることを明らかにした。次に、軟骨細胞における ATX-LPA₁ シグナルの機能を明らかにするために、マウス初代軟骨細胞を用いて *in vitro* での解析を進め、LPA₁ が軟骨細胞の細胞外基質への接着能を調節し、細胞内骨格の再構成に重要であることを明らかにしている。この知見は、ATX および LPA₁ の新規生理機能を示した結果であり、大変意義のあるものである。第2章においては、PA-PLA₁α と PS-PLA₁ の基質認識の違いを解析している。申請者は、基質認識に関わるとされる β5, β9, lid の3つのループ構造を PS-PLA₁ と PA-PLA₁α との間で入れ替えた各種変異タンパクを作製し、その基質特異性の変化を検討していた。その結果、PS の認識にはこれらループ構造の寄与は少なく、これら以外の構造が重要であり、PA の認識にはループ構造が協調して働くことが示唆されている。また、β5 ループは PS-PLA₁ のリゾホスホリパーゼ活性に不可欠であることが明らかにされた。特に、PLA₁ 活性は示すが LysoPLA₁ 活性は示さない A93P 変異体は、申請者も述べているように、PLA₁ 活性と LysoPLA₁ の生理学的意義を解明する上で非常に興味深いツールとなるであろう。

本論文では、リゾリン脂質メディエーター産生酵素に関する解析を行い、この研究分野における新たな知見を見出している。また、実験が分かりやすくかつしっかりと構成され、また、考察および結論も実験結果によって十分にサポートされており、大変評価できる。よって、本論文に学位論文としての価値を認め、博士(薬学)の学位論文として合格とする。