

審査の結果の要旨

氏名 齊藤 友理

多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid: PUFA) は、アラキドン酸 (20:4)、EPA (20:5)、DHA (22:6) などに代表されるような二重結合を複数含む脂肪酸の総称である。生体において PUFA が欠乏すると、神経機能、皮膚形成、生殖機能などに異常が生じることが知られており、その病態の一部は PUFA 由来の脂質メディエーターの欠乏により説明されている。一方、PUFA の多くは生体膜リン脂質の脂肪酸鎖として存在しており、PUFA 含有リン脂質が病態の原因と関連する可能性も考えられる。しかし、動物細胞において、生体膜リン脂質における PUFA の機能についてはほとんど明らかになっていなかった。そこで、齊藤は PUFA をリン脂質からほとんど欠損させた細胞を作製しその表現型の分子メカニズムを解明することで、動物細胞における PUFA 含有リン脂質の細胞生物学的機能の解明を目指した。

修士課程において、齊藤は PUFA をリン脂質から欠乏させた細胞「PUFA 欠乏細胞」の作製を目指した。培地からの PUFA の供給を断ち、PUFA 欠乏時に産生される PUFA の一種、ミード酸の合成を阻害することで、PUFA 欠乏細胞の作製に成功した。更に、PUFA 欠損細胞の形態を観察した結果、細胞膜が局所的に膨張する細胞膜ブレブという構造が細胞の辺縁部に多数発生していること、細胞膜ブレブの部位でアクチン骨格が消失していることを明らかにした。以上の結果から、PUFA がアクチン骨格制御に寄与していることが示唆された。

博士後期課程において齊藤は、細胞膜ブレブの分子メカニズムを解明することを目指し更なる研究を続けた。まず、PUFA がどのような形でアクチン重合制御に寄与しているかを調べた。PUFA 欠乏細胞に PUFA の一種である 20:4 アラキドン酸を添加すると、細胞膜ブレブを持つ細胞の数が大きく減少した。脂肪酸がリン脂質に導入される際には CoA 体への変換が必要とされるが、triacsin C でこの変換を阻害すると細胞膜ブレブ減少は抑制された。細胞膜直下のアクチン骨格は、膜リン脂質の一種 PI(4,5)P₂ により制御される。実際 PI(4,5)P₂ の産生酵素である PIP5K1 γ をノックダウンすると、PUFA 欠乏細胞と同様に細胞膜ブレブが発生したことから、PI(4,5)P₂ が細胞膜ブレブ形成に関与している可能性が考えられた。PI(4,5)P₂ は他のリン脂質と比較して特徴的な脂肪酸鎖を有しており、sn-2 位にアラキドン酸を持つ分子種が圧倒的に多い。そこで、アラキドン酸を持つ PI(4,5)P₂ (18:0/20:4 PI(4,5)P₂) を PUFA 欠乏細胞に取り込ませると、細胞膜ブレブが消失した。一方、脂肪酸鎖が PUFA ではない PI(4,5)P₂ (18:1/18:1 PI(4,5)P₂) では細胞膜ブレブは消失しなかった。以上の結果から、PUFA 含有 PI(4,5)P₂ が細胞膜直下でのアクチン骨格制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に、PUFA 欠乏細胞では PUFA 含有 PI(4,5)P₂ が減少することで、アクチン骨格制御に関与するタンパク質の機能が損なわれ細胞膜ブレブが発生すると仮定、そのタンパク質の同定を目指した。PI(4,5)P₂ により細胞膜直下のアクチン骨格を制御する主要な分子機構として、ezrin/radixin/moesin(ERM)タンパク質による制御と focal adhesion(FA)を介した制御が知られている。そこで、ERM タンパク質の一種 ezrin と FA 構成タンパク質 vinculin を siRNA を用いてノックダウンすることで、どちらの制御機構がより細胞膜ブレブ発生に関与するか検討した。

その結果、vinculin をノックダウンした時により細胞膜ブレブが見られたことから、FA の関与が考えられた。更に、PUFA 欠乏時の FA 構成タンパク質の FA 局在を観察したところ、特に vinculin の FA 局在が減弱していた。vinculin は FA 局在時 PI (4, 5)P2 と結合することから、vinculin が focal adhesion 上の PI (4, 5)P2 へ結合できず、vinculin の機能が抑制され細胞膜ブレブを生じる可能性が考えられた。以上の結果から、PUFA 鎖の有無が vinculin の PI (4, 5)P2 認識に影響を与えるかを調べるために、PI (4, 5)P2 認識に関わるとされる vinculin の残基番号 884-1066 の C 末端ドメイン (vinculin884-1066) を調製し、PI (4, 5)P2 を含むリポソームとの共沈降実験を行った。その結果、vinculin884-1066 が、PUFA を含まない PI (4, 5)P2 からなるリポソームよりも、PUFA 含有 PI (4, 5)P2 からなるリポソームに好んで結合することが明らかとなった。以上のことから、PI (4, 5)P2 の PUFA が減少することで vinculin の PI (4, 5)P2 結合能が低下し、アクチン骨格に異常が生じることが示唆された。

続いて、NMR を用いて PI (4, 5)P2 の PUFA 鎖と相互作用する vinculin のアミノ酸残基の同定を試みた。脂質二重膜の周りを膜骨格タンパク質 (MSP) が取り囲んだ平面膜モデルである nanodisc に PI (4, 5)P2 1 分子を再構成し、vinculin 884-1066 との相互作用を NMR により解析した。その結果、PUFA 含有 PI (4, 5)P2 を入れた nanodisc を増加させた時に vinculin 884-1066 の C 末端数残基に顕著な化学シフト変化が見えた一方で、PUFA を含まない PI (4, 5)P2 を入れた nanodisc の場合は、この化学シフト値変化量は減少した。また TEMPO-PC を導入した nanodisc を添加した際に、C 末端数残基で膜からの常磁性緩和促進効果が観測された。以上の結果から、vinculin の C 末端が PUFA 含有 PI (4, 5)P2 との結合に関与することが示唆された。そこで、同定されたアミノ酸残基を変異させた vinculin が機能的かどうかを確かめる為、PUFA 欠乏細胞の細胞膜ブレブ形成を抑制できるか検証した。vinculin ノックダウンにより細胞膜ブレブが生じるが、siRNA resistant vinculin を ARPE19 細胞に安定発現させることで抑制された。しかし、C 末端 4 残基 (P1063-Q1066) を欠失した siRNA resistant vinculin (vinculin C4Δ) を発現させ、内在の vinculin をノックダウンしても細胞膜ブレブ発生は抑制されなかった。以上のことから vinculin の PI (4, 5)P2 の PUFA 鎖認識部位であることが示唆される C 末端 4 残基がアクチン重合に重要であることが明らかとなった。

本研究において齊藤は、PUFA を含む PI (4, 5)P2 がアクチン骨格の制御に重要であること、vinculin の C 末端残基が PUFA 鎖を認識することで PUFA 含有 PI (4, 5)P2 に好んで結合することを明らかにした。本研究は、リン脂質 PUFA 鎖のアクチン骨格制御に関する機能を、初めて解明したものである。興味深いことに、乳がんを始めとした一部のがんでは 20:4 を持つ PI が減少し、PUFA を持たない PI が増加する結果が得られている。また乳がん細胞の vinculin を欠損させることで、転移しやすくなることも移植実験から示されている。本研究で見出された vinculin による PI (4, 5)P2 の PUFA 鎖認識を考えると、PI (4, 5)P2 脂肪酸組成変化が vinculin の機能異常を引き起こしがんの悪性化に関わっている可能性が新たに示唆される。

本研究は膜リン脂質脂肪酸鎖が細胞機能に重要であることを分子レベルで解明した点で非常に稀有であり、本論文は博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。