

論文の内容の要旨

論文題目

生体膜脂肪酸鎖組成感受性蛋白質の解析

氏名 北井 祐人

生体膜を構成するリン脂質には、パルミチン酸のような飽和脂肪酸からアラキドン酸やDHAといった高度不飽和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid: PUFA) まで様々な脂肪酸が結合している。生体膜脂肪酸鎖は、食餌由来の脂質などの外的要因や生体内での生合成の変化などの内的要因によっても絶えず影響を受けている。この脂肪酸鎖組成は生体膜の物性を規定する主要な因子であるとともに、膜のダイナミクスや膜タンパク質の機能に大きく寄与していると考えられている。PUFAは生体にとって必須の脂肪酸であり、哺乳類ではPUFAの欠乏により神経機能(知能発達、視覚)、上皮形成、生殖機能などに異常が生じる。これらの病態の一部はプロスタグランジン等の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が、PUFAはその多くが生体膜リン脂質の脂肪酸鎖として存在しているため、PUFA欠乏時の病態が生体膜機能の異常により生じている可能性も考えられる。線虫*C. elegans*は高等動物と同様にPUFAを有するモデル生物である。線虫においてPUFA合成の最初の段階を担う酵素である*fat-2*は生存に必須であり、線虫においてもPUFAの必要性は保存されていると考えられる。線虫にはシクロオキシゲナーゼやリポキシゲナーゼが存在せず、PUFA由来の脂質性メディエーターは産生されないと考えられることや、PUFA合成を担う酵素(*fat*遺伝子)を欠失させることで様々な脂肪酸欠乏状態を作出可能であることから、PUFA含有リン脂質の機能を個体レベルで評価できることが期待される。Wild-typeの線虫ではPUFAが生体内で合成されるが、PUFA合成を担う酵素

を欠損する *fat-3 fat-1* 二重変異体では、二重結合が 3 つ以上の脂肪酸が合成できない PUFA 欠乏状態となる。線虫の PUFA 欠乏変異体においては、哺乳類と同様に神経機能、上皮形成、生殖機能に異常が生じ、また、エンドサイトーシス機能に異常が生じる。一方、細胞レベルにおいて、生体膜二重層を構成するリン脂質中の PUFA を欠乏した膜環境では、生体膜の流動性が低下することによる膜タンパク質の構造変化、機能減弱、局在変化、分解などが起こる可能性が考えられる。しかし、実際にどのような膜タンパク質が膜リン脂質の脂肪酸鎖組成により影響を受けるのかについてはほとんど明らかになっていない。私は本研究において、生体膜脂肪酸鎖組成の変化に対して感受性の高い分子を探索するため、線虫 PUFA 欠乏変異体を用いてエンドサイトーシス異常の表現型に対するエンハンサー遺伝子を探索した。さらに、同定した分子が進化的に保存された脂肪酸鎖組成感受性を持つタンパク質であるかを検証するため、哺乳動物細胞を用いた解析も行った。

線虫におけるエンドサイトーシス機能は CUP (coelomocyte uptake defective) という表現型で評価することができる。線虫の体壁筋に分泌配列を付加した GFP を発現させると、GFP は擬体腔へと放出され、擬体腔に存在するスカベンジャー細胞である coelomocyte によりエンドサイトーシスされる。Wild-type では、coelomocyte のみに蛍光が観察されるが、エンドサイトーシスに異常が生じると GFP が coelomocyte には取り込まれず、擬体腔に GFP の蓄積が起こる。この GFP の蓄積は、実体顕微鏡レベルで容易に判別することができ、high throughput スクリーニングを行うのに適した表現型である。この CUP の表現型は Wild-type の線虫では見られないが、PUFA を十分に合成できない *fat-3* 変異体では弱い CUP を示す。さらに、*fat-3 fat-1* 二重変異体では CUP の表現型がさらに増強し、変異体が合成できる脂肪酸最終産物の不飽和度が低いほどエンドサイトーシス異常の表現型が強くなる。

生体膜脂肪酸鎖組成の変化に対して感受性の高い分子を同定するため、*fat-3* 変異体が示す CUP の表現型に対するエンハンサー遺伝子を探索した。すなわち、PUFA の欠乏状態により機能が減弱し、これによりエンドサイトーシス能に軽微な低下が起こるようなタンパク質 X が存在すると仮定する。ここにさらに RNAi により発現を低下させると、Wild-type ではまだ残っているタンパク質 X の発現により、CUP の表現型は弱いが、*fat-3* 変異体では、機能減弱した上にさらに発現低下することにより、強い CUP の表現型が出るだろうという発想である。そこで、発現抑制により *fat-3* 変異体のみでエンドサイトーシス異常を増強する遺伝子群を探索した。線虫全ゲノム 19,000 遺伝子を対象に RNAi スクリーニングした結果、*fat-3* 変異体において著しいエンドサイトーシス異常を引き起こす RNAi クローンを 23 遺伝子同定した。これらの中から膜脂肪酸鎖組成に

影響を受けやすいと考えられる膜タンパク質に着目し、まず、その細胞内局在を観察した。mCherry を付加した各遺伝子を、大きくて細胞内局在が観察しやすい細胞である *coelomocyte* に発現させ、細胞内局在を調べた結果、PUFA 欠乏により EMC-1 (ER membrane protein complex 1) という膜タンパク質の局在が変化することが分かった。EMC-1 は Wild-type において小胞体様に局在したが、*fat-3 fat-1* 二重変異体ではリソソームの内腔に存在していた。これより、EMC-1 は生体膜の脂肪酸環境の変化により局在が影響を受ける分子であることが示唆された。

EMC分子は、酵母においてEmc1p~Emc6pが複合体を形成して小胞体膜に局在し、小胞体関連分解に関与する複合体として同定された。そこで、線虫において他のEMCサブユニットについても解析を行った。細胞内局在について、mCherry を付加したEMC-4、EMC-5、EMC-6が*coelomocyte* に発現するトランスジェニック体を作製したところ、これらEMC分子はいずれも小胞体様に局在した。また、*fat*変異体においてEMC-4、EMC-5、EMC-6はEMC-1と同様にリソソームの内腔に局在が変化した。さらに*fat*変異体におけるEMC-4~6の局在は、PUFA添加により小胞体様に回復した。以上から、線虫においてEMC分子は正常な小胞体膜への局在にPUFAを含む膜環境が必要であることが示唆された。さらに、どのEMC分子欠損変異体においても*emc-1 RNAi*と同様にCUPが観察され、EMC複合体がエンドサイトーシス機能にも関与することが示唆された。

EMC分子は酵母からヒトまで進化的に広く保存されており、高等動物においてはEMC10まで報告されている。次に、EMC分子が高等動物においても脂肪酸鎖組成感受性を持つかを検討した。HeLa細胞に対して飽和脂肪酸を添加したところ、EMC6のタンパク質量が減少する一方でEMC6のmRNA量には変化が見られず、飽和脂肪酸の負荷によりEMC6はタンパク質分解が促進される可能性が示唆された。ヒト細胞内における飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸のバランスは脂肪酸不飽和化酵素SCD1 (Stearoyl-CoA desaturase 1)により規定される。そこでSCD1阻害剤処理により細胞内脂肪酸の飽和/不飽和の比を増加させたところ、飽和脂肪酸添加時と同様にEMC6は減少し、かつ不飽和脂肪酸であるオレイン酸の添加により減少は抑制された。これより、EMC6の減少は飽和脂肪酸の増加による脂肪酸鎖組成変化が原因であることが示唆された。

飽和脂肪酸負荷によるEMC6の減少の生理的意義を調べるため、Doxycycline添加依存的にEMC6が安定発現する細胞を作製し、飽和脂肪酸負荷時の表現型を解析した。この細胞においては、飽和脂肪酸添加時にもEMC6の発現量を維持することができる。通常、細胞に対して飽和脂肪酸負荷を与えると、そのストレスを軽減させるためにSCD1が発現上昇することが知られている。一方、EMC6安定発現細胞では飽和脂肪酸添加時にSCD1の

mRNA量には影響を与えないものの、タンパク質が減少することがわかった。このSCD1の発現減少はプロテアソーム阻害剤MG132処理により抑制されたことから、EMC6安定発現細胞ではプロテアソーム依存的にSCD1が分解していることがわかった。以上の結果より、飽和脂肪酸負荷時のEMC6の減少はSCD1のタンパク発現レベルを維持するために必要であることが示唆された。

本研究において私は、PUFA欠乏状態である *fat-3* 変異体の表現型に対するスクリーニングを行うことで、PUFA欠乏状態において細胞内局在が変化するタンパク質としてEMC-1を同定した。また、EMC-1、EMC-4、EMC-5、EMC-6がいずれもPUFA欠乏により小胞体からリソソーム内腔に局在変化するを見出した。従って、線虫においてEMC分子が脂肪酸鎖組成変化に対して感受性を持つことが明らかになった。また、進化的に広く保存されているEMC分子の中で、少なくともEMC6は高等動物においても脂肪酸鎖組成感受性を持ち、飽和脂肪酸負荷により減少すること、そしてSCD1の発現制御の一端を担っていることが示唆された。これまで生体膜の脂肪酸組成変化は膜タンパク質の機能や安定性に影響を与えると考えられていたが、本研究によりその顕著な一例が明らかになった。