

審査の結果の要旨

氏名 北井 祐人

生体膜リン脂質には飽和脂肪酸から高度不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid: PUFA) まで様々な脂肪酸が結合しており、多様な分子種から構成される。膜リン脂質の脂肪酸組成は生体膜の適切な機能発現に重要であり、生体は様々な膜環境の変化に应答してその恒常性を維持していると考えられる。PUFA の欠乏により生体膜脂肪酸組成の恒常性が破綻すると、知能、視覚、皮膚形成、生殖機能などに異常が生じる。この要因として、膜リン脂質中の PUFA が減少して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、分解などの可能性が考えられている。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。線虫 *C. elegans* は飽和脂肪酸から PUFA を合成できるモデル生物であり、その合成酵素 (*fat*, *elo* 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。そこで北井は本研究において、膜リン脂質の脂肪酸組成変化と機能的に関連する分子を探索するため、PUFA 合成酵素欠損体の表現型を増強させるエンハンサースクリーニングを行い、PUFA の欠乏状態により機能が減弱すると考えられる分子の同定を目指した。さらに、同定した分子が進化的に保存された脂肪酸組成感受性の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。

線虫は PUFA を合成するための脂肪酸不飽和化酵素を有している。PUFA を合成できない *fat-3 fat-1* 二重変異体は、神経機能や生殖機能、エンドサイトーシスなどに異常を生じる。北井は弱いエンドサイトーシス異常を示す *fat-3* 変異体を用い、この表現型を増強させるエンハンサー遺伝子を探索した。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 クローンが 23 遺伝子同定された。北井は、これらの中から膜脂肪酸組成に影響を受けやすいと考えられる膜タンパク質に注目し、まず、その局在を観察した。mCherry を付加した各遺伝子を大きくて細胞内局在を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 は野生株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る様子が観察された。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。線虫においてもこれら EMC 分子が協調的に機能しているかを調べるために、各 EMC 遺伝子 (*emc-1*~*emc-6*) の欠損変異体の表現型解析を行った。まず、細胞内局在について、mCherry を付加した各 EMC 分子を Coelomocyte に発現するトランスジェニック体を作製することにより解析した。トランスジェニック体が樹立できた EMC-4、EMC-5、EMC-6 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、線虫においても EMC 分子は協調的に機能しており、正常な細胞内局在 (小胞体膜) 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 遺伝子欠損変異体においても *emc-1* RNAi と同様にエンドサイトーシスの異常が観察され、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。そこで北井は、EMC 分子が高等動物においても脂肪酸組成感受性を持つかを検討するために、哺乳動物細胞を用いて解析した。HeLa 細胞に対して飽和脂肪酸であるパルミチン酸(16:0)を添加し、膜脂質の不飽和度を下げたところ、EMC6 のタンパク質量が減少することがわかった。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ことが示唆された。

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、パルミチン酸添加時と同様に EMC6 は分解し、かつ不飽和脂肪酸であるオレイン酸(18:1)の添加により分解は抑制された。これより、飽和脂肪酸の増加による脂肪酸組成変化が原因で EMC6 が分解することが示唆された。

飽和脂肪酸負荷による EMC6 の分解の生理的意義を調べるため、EMC6 を Doxycycline 添加依存的に安定発現する細胞株を作製し、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、飽和脂肪酸添加時も EMC6 が発現し続ける。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 安定発現細胞ではパルミチン酸添加時に SCD1 の mRNA レベル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 の分解は SCD1 のタンパク質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。

本研究において北井は、生体内の脂肪酸組成を自在に操作できる線虫を用い、*fat-3* 変異体の表現型に対するエンハンサースクリーニングをすることで、PUFA 欠乏状態において細胞内局在が変化するタンパク質 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 分子群が協調的に機能しており、正常な膜局在に PUFA を含む膜環境が必要であることを示した。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組成感受性分子として機能し、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。

よって本論文は博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。