

審査の結果の要旨

氏名 大場 陽介

生体膜の主要な構成成分であるリン脂質は、パルミチン酸のような飽和脂肪酸からアラキドン酸やドコサヘキサエン酸のような高度不飽和脂肪酸まで様々な脂肪酸が結合している。生体膜リン脂質の脂肪酸組成は膜タンパク質の適切な機能発現に重要であり、生体は内因性（生合成）および外因性（食餌等）の膜脂肪酸環境の変化に应答して、脂肪酸組成を変化させ適切な膜脂肪酸環境を維持していると考えられる。しかしながら、このような生体应答は、動物細胞においてほとんど明らかになっていない。小胞体ストレス应答（UPR）は、小胞体内腔における異常タンパク質の蓄積（小胞体ストレス）により活性化し、小胞体内のタンパク質恒常性維持に重要な生体应答である。UPRのセンサータンパク質のうち、IRE1は真核生物に高度に保存された分子であり、活性化状態ではXBP1のmRNAをスプライシングすることで活性化型転写因子XBP1sを産生し、小胞体ストレスに対応する様々な遺伝子の発現を誘導する。近年、UPRは膜リン脂質中の飽和脂肪酸の増加（膜飽和化）によっても誘導されることが明らかとなり、その活性化様式が異常タンパク質の蓄積と質的に異なることが示唆されている。しかし、UPR活性化が膜脂肪酸環境変化に対する適応应答なのか、またUPR活性化機構が異常タンパク質の蓄積時と異なるのかについては不明である。そこで本研究で大場は、哺乳動物細胞を用い、膜飽和化により誘導されるUPRの意義とその分子機構の解明を目指した。

まず、哺乳動物においてUPRを介した膜飽和化に対する应答機構が存在するか調べる目的で、HeLa細胞に対しIRE1を発現抑制し、膜飽和化による表現型に変化が見られるか検証した。培地に飽和脂肪酸であるパルミチン酸（16:0）を添加することにより膜飽和化を引き起こしたところ、それにより誘導される細胞死がIRE1を発現抑制すると顕著に亢進することを見いだした。次に、IREの下流で活性化する転写因子XBP1を発現抑制したところ、IRE1の発現抑制により見られた細胞死の増強はXBP1を発現抑制した場合には見られなかった。

このことより、膜飽和化時にはIRE1依存的、XBP1非依存的なストレス应答経路が活性化していることが考えられた。そこで大場は、DNAマイクロアレイ解析により膜飽和化時にIRE1依存的、XBP1非依存的に発現変動する遺伝子を探索した。その結果、PRKAG2（protein kinase, AMP-activated, gamma 2）遺伝子（AMPK γ 2）を同定した。この遺伝子は、小胞体内に異常タンパク質を蓄積させる薬剤であるツニカマイシンを処理した場合には、全く発現上昇しなかった。次に、AMPK γ 2遺伝子の発現上昇が膜飽和化に対する应答に重要であるか検証する目的で、AMPK γ 2を発現抑制した細胞に対してパルミチン酸を添加した。すると、IRE1を発現抑制した場合と同様にパルミチン酸による細胞死が亢進した。このことから、AMPK γ 2の発現が膜飽和化に対する適応に重要であることが示唆された。

AMPK γ 2はAMPK（AMP-activated protein kinase）複合体の構成因子の1つである。AMPK複合体は α 、 β 、 γ のヘテロ三量体からなり、 α サブユニットのThr172がリン酸化されることにより活性化状態となる。そこでAMPK複合体に着目し解析を行った結果、膜飽和化によりAMPK α のリン酸化が亢進し、このAMPK α のリン酸化はIRE1のRNAiにより抑制された。一方、XBP1のRNAiはAMPK

α のリン酸化に影響を与えなかった。次に、AMPK α のリン酸化に AMPK $\gamma 2$ の発現上昇が重要であるか検証した。AMPK $\gamma 2$ を発現抑制すると、IRE1 を発現抑制した場合と同様、膜飽和化時の AMPK α リン酸化亢進が抑制された。一方、AMPK $\gamma 2$ を細胞に過剰発現すると AMPK α のリン酸化は増加した。これらの結果から、膜飽和化時には、IRE1 を介して AMPK $\gamma 2$ が発現上昇した結果、AMPK α のリン酸化が亢進していることが示唆された。

次に、膜飽和化に対する IRE1、AMPK を介した細胞応答として細胞内の脂肪酸代謝に着目した。パルミチン酸を添加した細胞について細胞内の飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の割合を GC-MS により測定したところ、パルミチン酸添加により飽和脂肪酸の割合が増加した。そして、IRE1 や AMPK $\gamma 2$ 、AMPK α をそれぞれ発現抑制すると、その割合がさらに増加することがわかった。一方、XBP1 の発現抑制は影響を与えなかった。このことから、パルミチン酸添加時には IRE1 依存的 XBP1 非依存的な AMPK 経路の活性化を介して飽和脂肪酸の蓄積を減らす応答が起こっていると考えられた。

飽和脂肪酸を不飽和化する主要な酵素として高等動物では Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) が知られている。そこで、膜飽和化時における SCD1 の発現を調べた。その結果、細胞にパルミチン酸を加えると SCD1 の発現量が大きく増加することがわかった。そして、その増加は IRE1 の発現抑制によりみられなくなった一方、XBP1 の発現抑制はほとんど影響を与えなかった。また、IRE1 の発現抑制と同様に AMPK サブユニットの発現抑制によっても SCD1 の発現上昇はみられなくなった。以上の結果から、膜飽和化時には IRE1、AMPK 依存的に SCD1 が発現上昇し、飽和脂肪酸の不飽和化を促進することで、飽和脂肪酸の蓄積を減らし、膜飽和化に対して適応しているものと考えられた。

本研究において大場は、膜飽和化時に IRE1 依存的 XBP1 非依存的に発現上昇する遺伝子として AMPK $\gamma 2$ を同定した。また、IRE1 依存的な AMPK $\gamma 2$ の発現上昇は下流で AMPK 経路を活性化すること、さらに、AMPK 経路の下流では SCD1 の発現上昇を介して飽和脂肪酸の不飽和化を促進し、膜飽和化に対して適応していることを明らかにした。本研究は哺乳動物細胞における膜脂肪酸の恒常性維持機構の一端を明らかにしたものであり、また IRE1 の XBP1 を介さないシグナル伝達機構を明らかにしたという点でも意義深い。

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。