トリアシルグリセロール合成に関与する
アシル基転移酵素の研究

2010 年 9 月

大阪市立大学大学院

工学研究科

平峯（ひらみね）　靖（やすし）

目次

序章 1

第 1 章　赤血球内でのマラリア原虫の増殖におけるジアシルグリセロールアシル基転移酵素の関与 15

1-1　目的 16
1-2　材料と方法 17
1-3　結果と考察
1-3-1. PfDGAT1 遺伝子の同定 19
1-3-2. PfDGAT1 遺伝子のマラリア原虫における発現 20
1-3-3. PfDGAT1 の DGAT 活性の検出 22
1-3-4. PfDGAT1 欠失のマラリア原虫増殖への影響 23
1-4　参考文献 26

第 2 章　ヒト小腸ジアシルグリセロールアシル基転移酵素の解析 29

2-1　目的 30
2-2　材料と方法 31
2-3　結果と考察
2-3-1. ヒト小腸ミクロソームの DGAT 活性 32
2-3-2. ヒト小腸 DGAT のアシル CoA 選択性および温度依存性 32
2-3-3. ヒト小腸 DGAT の 1,2-DAG および 1,3-DAG に対する選択性 36
2-4　参考文献 39

第 3 章　新規モノアシルグリセロールアシル基転移酵素遺伝子の同定 41

3-1　目的 42
3-2　材料と方法 42
3-3　結果
3-3-1. 新規 MGAT 遺伝子としてのマウス LPGAT1 の同定 44
3-3-2. マウス LPGAT1 遺伝子の発現分布 44
3-3-3. CHO 細胞で発現させた組み換え LPGAT1 の MGAT 活性 45

3-4　考察　47
3-5　参考文献　49

第 4 章　リゾホスファチジルグリセロールアシル基転移酵素 LPGAT1 の遺伝子ノックダウンによるマウス肝臓トリアシルグリセロール合成の抑制　51

4-1　目的　52
4-2　材料と方法　52
4-3　結果
4-3-1. *db/db* マウス肝臓における MGAT 活性と LPGAT1 発現　54
4-3-2. LPGAT1 shRNA アデノウイルスの構築　54
4-3-3. *db/db* マウス肝臓 LPGAT1 遺伝子の *in vivo* ノックダウン　55
4-4　考察　62
4-5　参考文献　64

総括　65

論文目録　67

謝辞　69

本論文中で使用する略語

ACAT	アシル CoA：コレステロールアシル基転移酵素
AGPAT	アシルグリセロールリン酸アシル基転移酵素
CHO 細胞	チャイニーズハムスター卵巣細胞
DAG	ジアシルグリセロール
DGAT	アシル CoA：ジアシルグリセロールアシル基転移酵素
LPGAT	リゾホスファチジルグリセロールアシル基転移酵素
MAG	モノアシルグリセロール
MGAT	アシル CoA：モノアシルグリセロールアシル基転移酵素
shRNA	ショートヘアピン RNA
TAG	トリアシルグリセロール

序章

脂質とは中性脂肪、脂肪酸、コレステロール、リン脂質、スフィンゴ脂質の総称である。それぞれの脂質はその物理的・化学的性質に応じて生体内で使い分けがなされており、その主な役割は、中性脂肪はエネルギー貯蔵、脂肪酸は生体維持のための直接的エネルギー源、コレステロールは細胞膜の構成成分およびホルモン合成の材料、リン脂質およびスフィンゴ脂質は細胞膜の構成成分、である。一方、動物の体内脂肪組織に蓄えられる脂質や食品中の油脂など、日常生活で「脂肪」と呼ぶものの 8－9 割は中性脂肪から構成されており、従って中性脂肪は我々にもっとも身近な脂質、ということができる。

トリアシルグリセロール（TAG）は中性脂肪の主成分であり、その役割としては脂肪組織におけるエネルギー貯蔵分子としての役割が代表的である(1)。栄養過多な現代人にとっては飢餓に備えてのエネルギー貯蔵の意義は低くなってしまっているものの、例えば冬眠する熊、砂漠に生息するラクダ、渡り鳥などの動物においてはTAGによるエネルギー貯蔵は生死を左右する極めて重要な物質である。一般に動物は脂肪組織中に貯蔵したTAGを必要に応じて酸化分解し、エネルギーとして利用している。一方、動物においては血中にもTAGが多量に存在し、これは小腸や肝臓において吸収・再合成されたTAGを末梢に配分する点で、生体の脂質代謝にとって極めて重要である。

その他の中性脂肪であるモノアシルグリセロール（MAG）、ジアシルグリセロール（DAG）は、TAG から脂肪酸の一部が失われたものであり、主に TAG 合成の前駆体として機能する。それ以外にも、例えばジアシルグリセロールについてはタンパク質リン酸化酵素（キナーゼ）と直接相互作用してその活性調節に関与するなど、シグナル伝達分子としての生理的役割も担っている。

本章では、中性脂肪の構造と種類、TAG の細胞内合成経路、ジアシルグリセロールアシル基転移酵素（DGAT）、モノアシルグリセロールアシル基転移酵素（MGAT）、動物における TAG 代謝について概説し、最後に本研究の目的と概要を述べる。

1　中性脂肪の構造と種類

中性脂肪（neutral fat）は、脂肪酸のグリセリンエステルを指す。脂肪酸グリセリンエステルには、エステル結合した脂肪酸の数に対応して、1 個＝モノアシルグリセロール、2 個＝ジアシルグリセロール、3 個＝トリアシルグリセロールが存在する。生体内に含まれる中性脂肪は大部分が TAG であり、特に動物の脂肪組織では 95%以上が TAG であることから、中性脂肪は TAG と同義とする場合も多いが、厳密には上記の 3 種類の混合物である。なお、「中性」とは、他に酸性・塩基性脂肪が存在するという意味ではなく、脂肪酸がグリセリンと結びついた結果中性になることに由来する。TAG はグリセロール骨格に 3 分子の

A　モノアシルグリセロール（MAG）

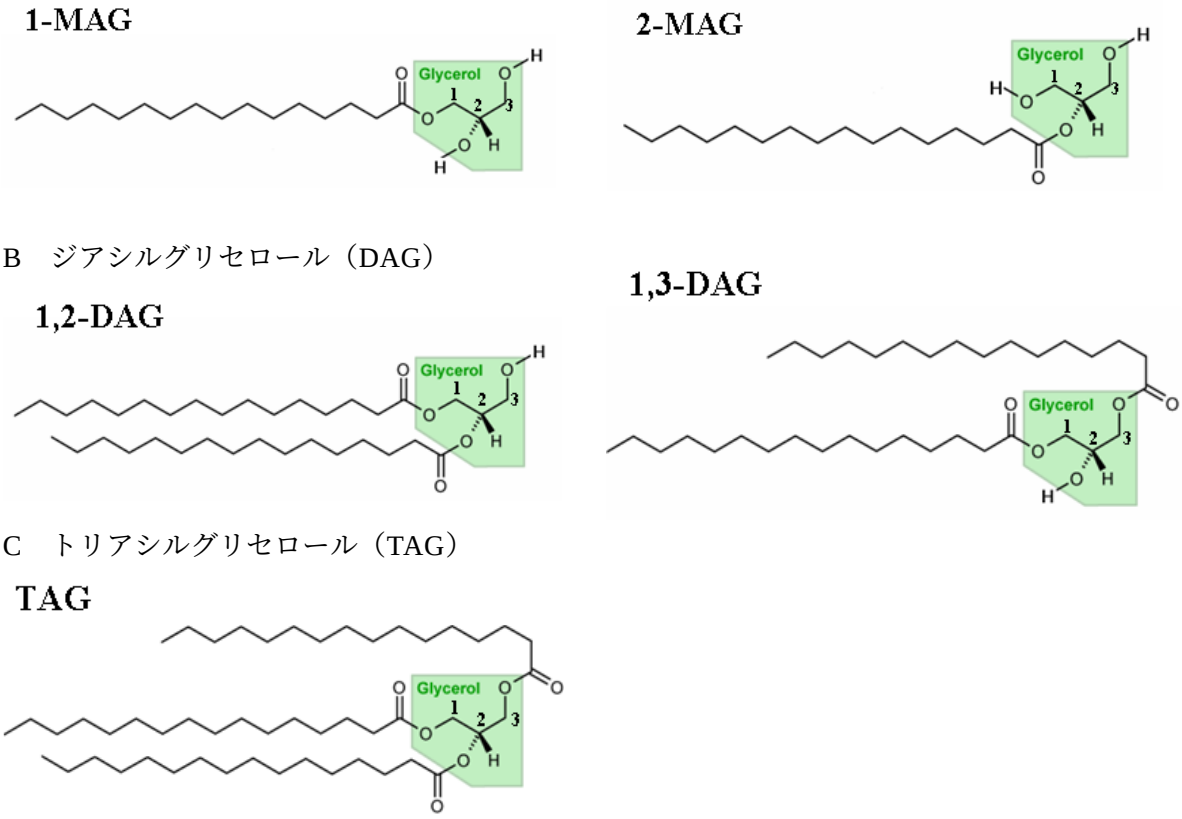


Figure 1.　中性脂肪の構造

脂肪酸がエステル結合したものであるが（Figure 1C）、MAG、DAG については、脂肪酸をエステル結合している炭素の位置によって、1-MAG、2-MAG（Figure 1A）、1,2-DAG、1,3-DAG（Figure 1B）という異性体が存在する。

次に中性脂肪を構成する脂肪酸の種類を述べる。脂肪酸は長鎖炭化水素の 1 価カルボン酸の総称である。脂肪酸の種類は炭素数および炭化水素鎖中の不飽和結合の場所・数によって決定され、炭素数と 2 重結合の数の組み合わせ（例 C16:0 =パルミチン酸、C18:1 =オレイン酸）で記述されることが多い。脂肪酸がコエンザイム A（CoA）と結合したアシル CoA についても、例えばパルミチン酸＋CoA の場合、パルミトイル CoA（C16:0）と表記される。

炭素鎖に 2 重結合あるいは 3 重結合を含有しない脂肪酸を飽和脂肪酸、炭素鎖に 2 重結合あるいは 3 重結合を含有する脂肪酸を不飽和脂肪酸という。個々の脂肪酸は 2 重結合の数（不飽和度）によって融点が異なるため、中性脂肪の性質は構成脂肪酸の不飽和度に大きく影響される。例えば、不飽和脂肪酸を多く含む TAG（オリーブ油やサフラワー油など）は室温で油状の液体だが、飽和脂肪酸の多い TAG（ココナッツ油やパーム核油）は室温で固体となる。また TAG は一般に有機溶媒によく溶けるが、ステアリン酸のような長鎖の飽和脂肪酸が多くなると、アルコール、石油エーテル、ジエチルエーテルなどにも難溶

Table 1.　本論文で使用する脂肪酸

脂肪酸	示性式	数値表記	（例）牛脂中の存在比
パルミチン酸	CH_3-$(CH_2)_{14}$-COOH	C16:0	26 %
ステアリン酸	CH_3-$(CH_2)_{16}$-COOH	C18:0	22 %
オレイン酸	CH_3-$(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7$-COOH	C18:1	39 %
リノール酸	CH_3-$(CH_2)_3(CH_2CH{=}CH)_2$-$(CH_2)_7$-COOH	C18:2	2 %
アラキドン酸	CH_3-$(CH_2)_3(CH_2CH{=}CH)_4$-$(CH_2)_3$-COOH	C20:4	<1%

になる。本論文で使用する脂肪酸は Table 1 のとおりである。

中性脂肪を構成する脂肪酸組成は生体の脂肪酸組成を反映しており、動物においてはステアリン酸、パルミチン酸など飽和脂肪酸が主であるのに対し、植物においてはオレイン酸、リノール酸のような不飽和脂肪酸が多い。したがって、動物性の中性脂肪は室温で固体であるものが多いのに対して、植物性の中性脂肪は室温で液体の場合がほとんどである。

2　TAGの細胞内合成経路

細胞内におけるTAGはグリセロールリン酸経路、およびモノアシルグリセロール経路の 2 つの主要な経路で合成されることが知られている[2]（Figure 2）。グリセロールリン酸経路においては、DAGはホスファチジン酸の脱リン酸化によって合成されるのに対し、モノアシルグリセロール経路においては、DAGはMGATによるMAGへのアシル基付加によって生成する。両方の経路は、DAGからTAGへの反応を共有しており、この反応をDGATが担っている。TAG合成には多数のステップがあり、各ステップを特定の酵素が触媒するが、DGATがTAG合成の律速酵素と考えられている。グリセロールリン酸経路は動物細胞の全ての組織に存在することから、TAG合成の一般的な経路と考えられているが、一方で小腸、肝臓、脂肪組織といった高いTAG合成活性を有する組織においては、モノアシルグリセロール経路もTAG合成に一定の寄与をしていると考えられている。特に小腸においては、後述のとおり食餌中のTAGが主にMAGの形で吸収されることから、モノアシルグリセロール経路がTAG合成の主経路であることが知られている。

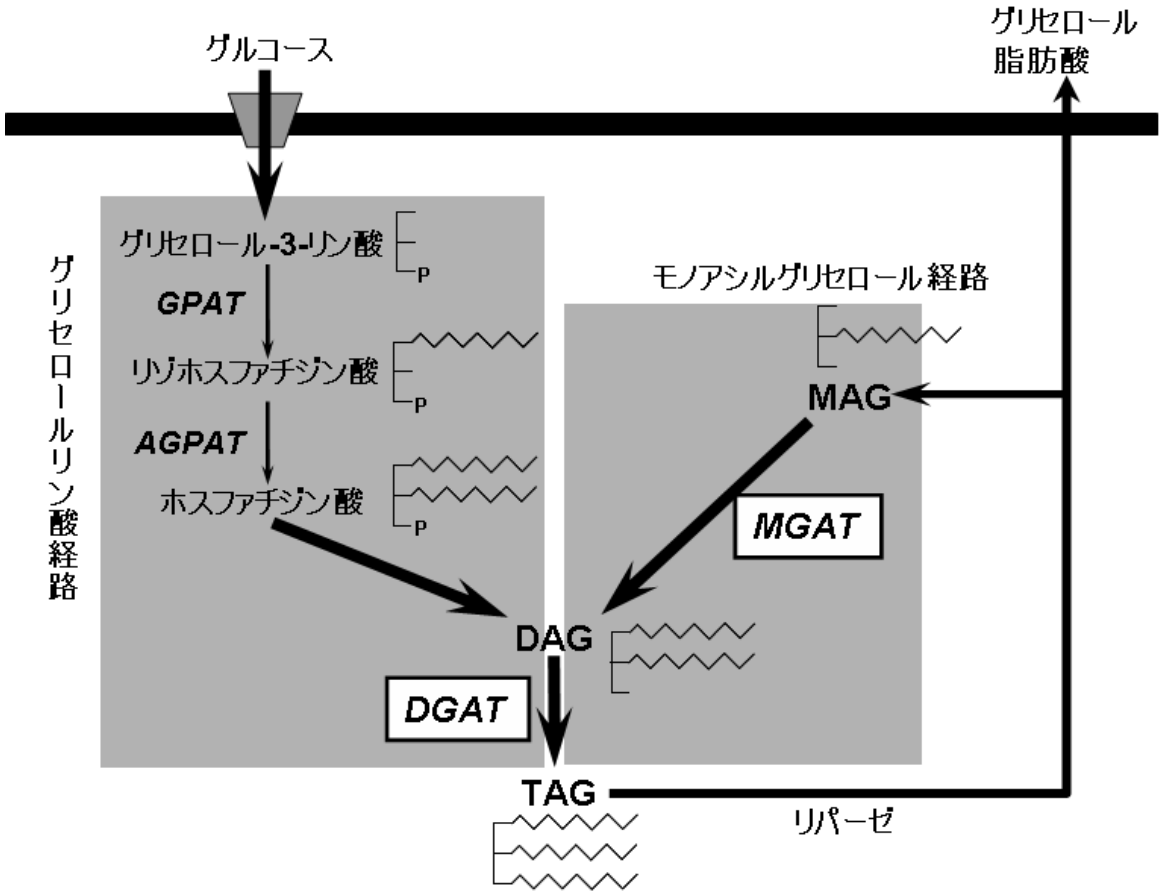


Figure 2.　TAG 合成経路：グリセロールリン酸経路とモノアシルグリセロール経路

GPAT=グリセロールリン酸アシル基転移酵素

AGPAT=アシルグリセロールリン酸アシル基転移酵素

3　ジアシルグリセロールアシル基転移酵素（DGAT）

ジアシルグリセロールアシル基転移酵素（DGAT）は、1,3 または 1,2-DAG をアシル基アクセプター、アシル CoA をアシル基ドナーとして、TAG を合成する（Figure 3）。その機能は、細胞内においてグリセロールリン酸経路およびモノアシルグリセロール経路で生成した DAG をアシル化し、TAG を合成する役割を担う。

TAG合成の最終ステップを担う重要な酵素であることから、DGATの酵素活性については 1960 年代から研究が行われていたが、膜タンパク質であることから精製が難しく、初めてDGAT遺伝子が同定されたのは 1998 年（DGAT1 遺伝子）のことである[3]。引き続いてDGAT2 遺伝子がクローニングされ[4]、以来この 2 つのDGAT遺伝子を中心に多くの研究が行われている[5]。

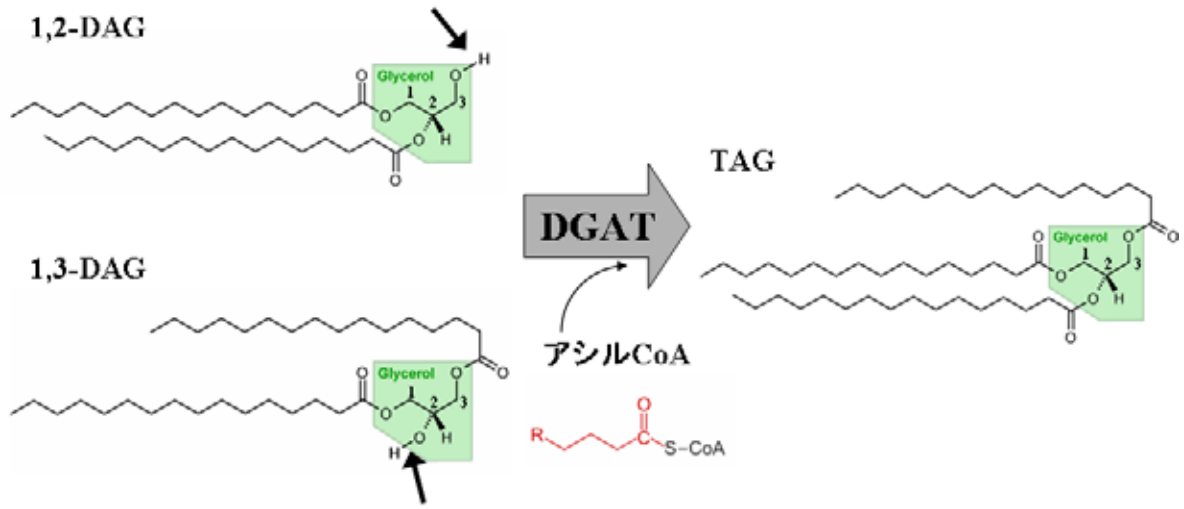


Figure 3.　DGAT 反応

（→）の部位がアシル化を受ける。

DGATファミリーとしてはこれまでDGAT1、DGAT2 が同定されているが、哺乳類[3,4]だけでなく、植物[6,7]、真菌[8]、マイコバクテリウム[9]まで幅広く存在することが報告されている。タンパク質の結晶構造は明らかにされていないが、DGAT1 は 6-12 個の膜貫通領域を持つ 498 アミノ酸からなる酵素[3]、DGAT2 はN末端側に 1 個の膜貫通領域を持つ 388 アミノ酸からなる酵素[4]であり、アミノ酸配列上の相同性は低い。哺乳動物における組織分布は、DGAT1 遺伝子は全ての組織に普遍的に発現しているのに対し[3]、DGAT2 遺伝子は肝臓と脂肪組織での発現が高いのが特徴である[4]。

DGAT1 とDGAT2 について各遺伝子のノックアウトマウスによる研究成果が報告されている。DGAT1 ノックアウトマウスは正常に成育し、TAG合成能にも異常がないものの、高脂肪食負荷によって肥満を誘導した場合、野生型マウスに比べて有意に体重増加が少なく[10]、また高いインスリンおよびレプチン感受性を示す[11]。このことは、DGAT1 が脂肪細胞のTAG合成を介して、肥満・インスリン抵抗性の発症に寄与する可能性を示している。一方、DGAT2 ノックアウトマウスは生体内脂質レベルの異常低下（lipopenia）およびそれに伴う皮膚の異常を示し、生後まもなく死亡することから[12]、生存に必須な機能を担っていると考えられる。ハエおよび植物においては、ハエDGAT1 遺伝子の変異でegg chamber のアポトーシスが起こること[13]、シロイヌナズナのDGAT1 遺伝子（*tag1*）の変異によって種子の形成に障害が起こる[14,15,16]ことが報告されており、これらの生物では発生の比較的早い段階でDGAT1 オーソログが重要な機能を果たすと考えられる。一方、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*および分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*はゲノム中にDGAT遺伝子（*dga1*）を 1 つしか保持していないが、この遺伝子を欠失しても表現型に影響がないことから[17,18,19]、酵母においてはDGATの機能、すなわちTAG合成は重要でないと考えられる。

4　モノアシルグリセロールアシル基転移酵素（MGAT）

モノアシルグリセロールアシル基転移酵素（MGAT）は、1 または 2-MAG をアシル基アクセプター、アシル CoA をアシル基ドナーとして、1,2-DAG または 1,3-DAG を合成する（Figure 4)。その機能は、膵臓リパーゼまたは細胞内リパーゼによる TAG の加水分解によって生成した MAG をアシル化し、DAG を合成する役割を担う（＝モノアシルグリセロール経路)。生成した DAG は、前述した DGAT によって更にアシル化を受け、TAG に変換される。

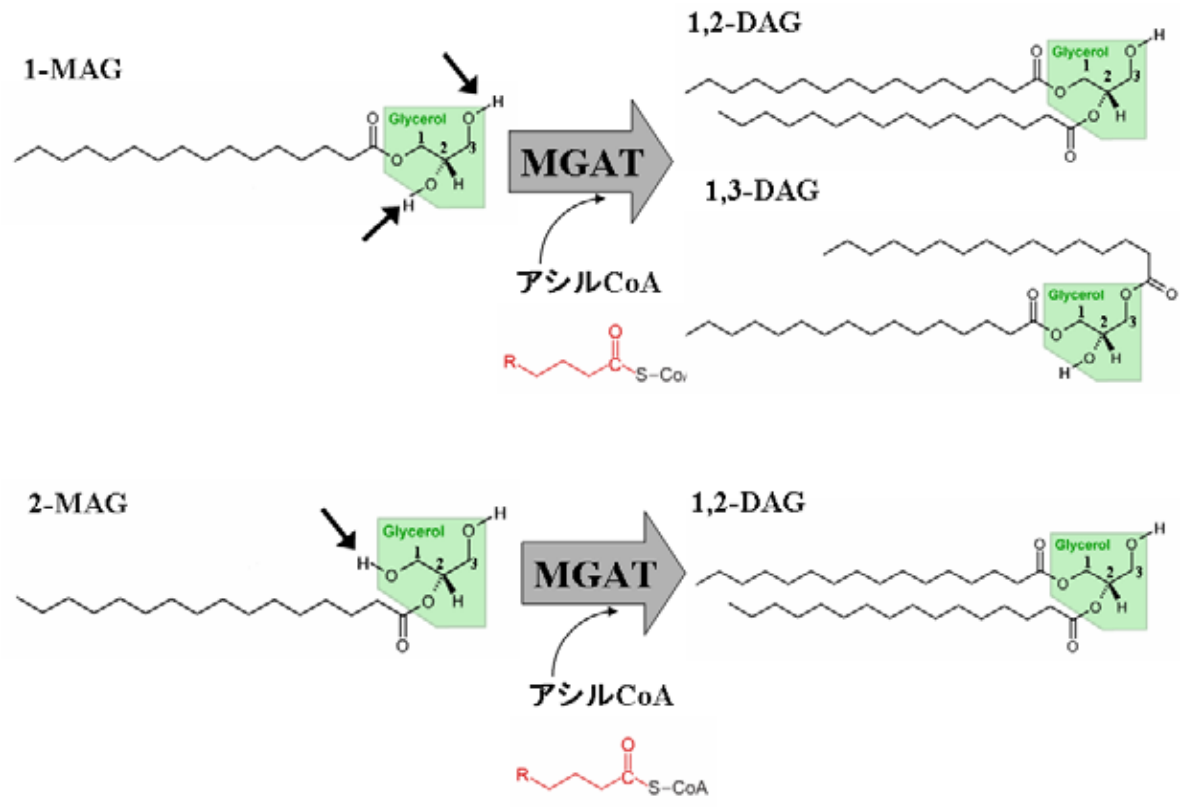


Figure 4.　MGAT 反応
（→）の部位がアシル化を受ける。

MGATのタンパク質精製は 1980 年代から試みられており、ラット小腸[20]、ラット肝臓[21,22]、ラット脂肪組織[23]、植物[24]、昆虫[25]、鳥[26]を材料としてMGATの部分精製が報告されていた。部分精製したMGATを用いて、脂質コファクターの要求性、熱およびプロテアーゼに対する感受性、基質特異性などが調べられたが、MGAT遺伝子は長い間同定されない状態が続いていた。2002 年、DGAT2 遺伝子との相同性から最初のMGAT遺伝子が同定され、MGAT1 遺伝子と名づけられた。これまでに、MGAT1、MGAT2、MGAT3 の 3 つ

のMGAT遺伝子が報告されている。

MGAT1 遺伝子は胃、腎臓、脂肪組織などで発現が認められるが、小腸では発現していない[27]。MGAT2 遺伝子については、DGAT2 [28,29]、MGAT1[30] 遺伝子との相同性に基づいて同定された遺伝子である。ヒトにおいては、MGAT2 遺伝子は小腸、肝臓、胃、腎臓、結腸、脂肪組織で高発現しているが、マウスにおいてMGAT2 遺伝子発現は小腸に限定されている[28]。最近、MGAT2 ノックアウトマウスが高脂肪食負荷条件でも肥満や耐糖能異常、高コレステロール、脂肪肝などを発症しにくいことが報告された[31]。このことは、MGAT2 がマウス小腸における脂肪吸収に大きく関与していることを示唆しており、過剰な脂肪吸収に由来する肥満・代謝異常に対する有望な治療薬ターゲットになる可能性がある。MGAT3 遺伝子はMGAT1 およびMGAT2 遺伝子と相同性があるが、ヒト小腸でのみ発現が認められ、マウスでは発現が検出されないことから、ヒト小腸での脂肪吸収に関与すると考えられている[32]。

5　動物におけるTAG代謝

動物の生体内における TAG 代謝について概説する（Figure 5）。

食物として取り込まれた TAG は、小腸内で胆汁酸の働きによってまずミセル化を受ける。ミセル化した TAG は膵リパーゼの働きによって、腸管内で MAG（主として 2-MAG）と脂肪酸に加水分解された後、小腸上皮細胞に吸収される。吸収された MAG は小腸細胞内でモノアシルグリセロール経路に入り、MGAT の働きによって DAG へ、DAG は DGAT の働きによって TAG へと再合成される。再合成された TAG は小腸細胞内においてリポ蛋白の一種であるカイロミクロンに組み込まれ、体液中に分泌される。カイロミクロンは末梢組織に TAG を供給して少しずつ小さくなりながら、カイロミクロンレムナントと呼ばれる粒子に変換され、最終的には肝臓に吸収される。肝臓においては、カイロミクロン TAG は最終的な加水分解を受け、生成した脂肪酸はアシル CoA として *de novo* TAG 合成の材料となる。肝臓中のグリセロールリン酸経路では、グリセロール骨格にアシル基が付加されて DAG が合成され、DGAT によって TAG が合成される。肝臓中には寄与度は不明であるものの、モノアシルグリセロール経路も存在し、TAG の加水分解で生じた MAG を基質として MGAT により DAG が合成され、DGAT により TAG ができる。

肝臓で合成されたTAGは、別途合成されたコレステロール、コアタンパク質（アポB-100、アポE）等とともに、リポ蛋白の一種であるVLDL（Very Low Density Lipoprotein）に組み込まれて血中に分泌される。VLDLはカイロミクロンと同様、末梢組織にTAGを供給しながら体内を循環し、最終的にLDLの形で肝臓に回収される。

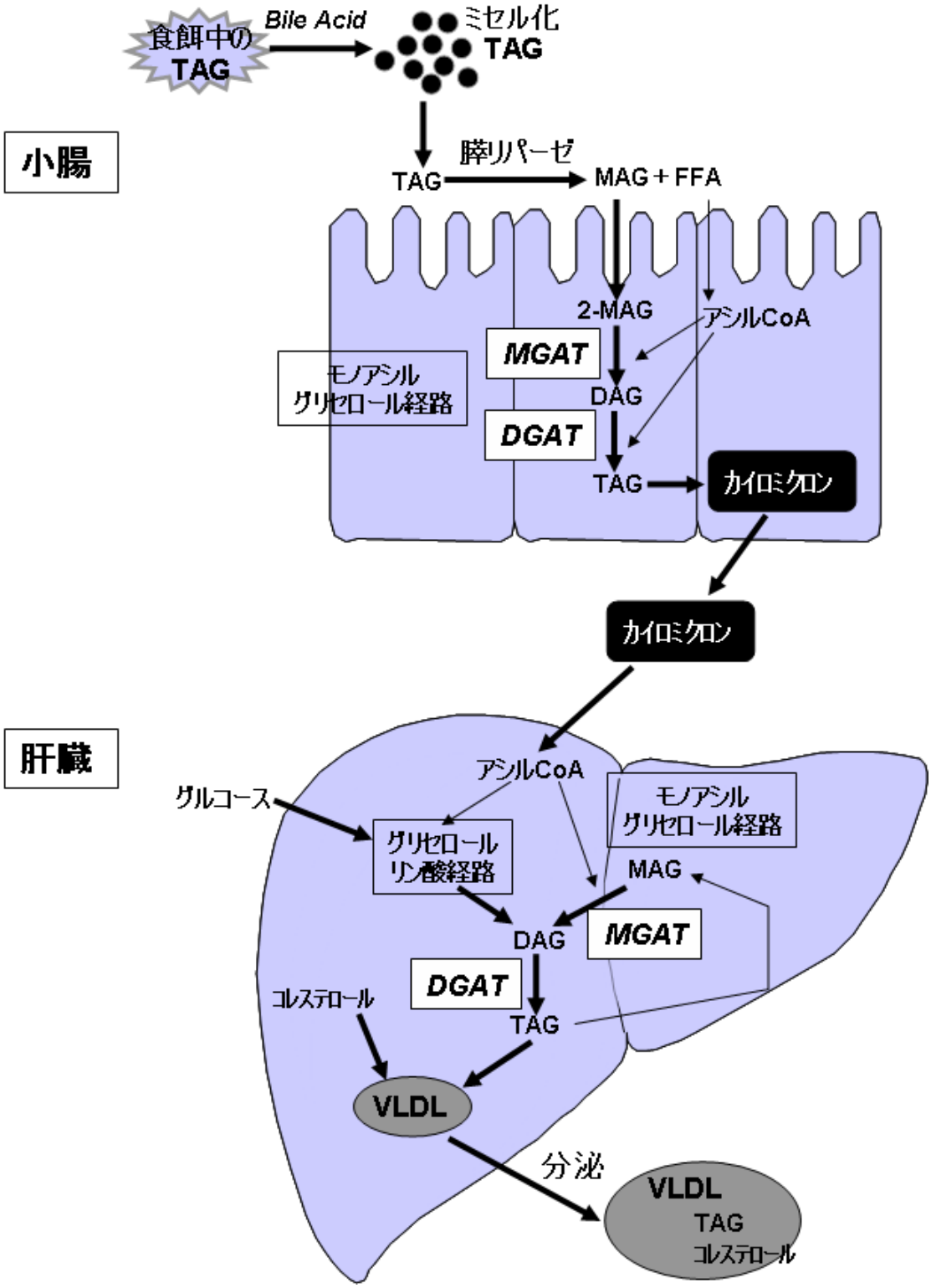


Figure 5.　動物における TAG 代謝

6　本研究の目的と概要

これまで述べてきたとおり、TAG 合成を司る DGAT は生物にとって非常に重要な酵素である。一方で、第 1 章で述べるマラリア原虫のように、そのゲノム中に DGAT 様配列を含むにもかかわらず、実際にその配列が DGAT をコードしているのかどうか、DGAT が生存や増殖などに必要であるかについて明らかになっていない生物も存在する。そこで第 1 章ではまず、マラリア原虫の DGAT 遺伝子の同定およびマラリア DGAT 遺伝子の欠失株の取得を行い、マラリア DGAT 遺伝子の機能解析を実施した。

一方、動物においては、小腸や肝臓における TAG 合成を担うのが DGAT および MGAT であることから、小腸や肝臓における DGAT および MGAT の機能を調べることは、動物の脂質代謝のメカニズムを理解する上で極めて重要であると考えられる。しかしながら、例えば小腸で機能する DGAT 分子種、肝臓 MGAT 活性の責任分子、肝臓 TAG 合成における MGAT の寄与度など、不明な点も多いのが現状である。

そこで、第 2 章ではヒト小腸における DGAT の機能解析を行い、第 3 章ではマウス肝臓で発現する新規 MGAT 遺伝子の同定を行った。第 4 章では、3 章にて同定した新規 MGAT 遺伝子がマウス肝臓で TAG 合成に実際に寄与していることを、shRNA を用いたノックダウン実験により明らかにした。

最後に、本研究で得られた研究成果について総括した。

○第 1 章

熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* は、赤血球内増殖過程においてユニークな TAG 代謝と輸送を行うことが示唆されている。一方、*P. falciparum* はそのゲノム中にただ 1 つの DGAT 候補 ORF を含んでいるが、この候補配列が DGAT をコードするのかどうか、さらにこの DGAT の生理的な意義については不明であった。そこで、この DGAT 候補 ORF についてまず発現を調べたところ、赤血球内増殖過程で TAG 合成が活発な時期であるトロホゾイト、シゾント期において、3.6 kb の mRNA として発現していることがわかった。また、CHO-K1 細胞で過剰発現させ、この ORF が DGAT をコードすることを確かめた。更に 2 重組換えの手法を用いてマラリア DGAT 配列を欠失した株を作製し、この株が増殖能を失うことを見出すことにより、マラリア DGAT が増殖過程に必須であることを示した。

○第 2 章

ヒト小腸から調製したミクロソームが DGAT 活性を有することを確認した。ヒト小腸 DGAT のアシル CoA 選択性および反応の温度依存性を検討したところ、組換えヒト DGAT1

と一致した。次にヒト小腸 DGAT が 1,2-DAG か 1,3-DAG のどちらを基質として好むかについて、1-MAG あるいは 2-MAG を基質とした MGAT アッセイを行うことによって調べた。2-MAG をアシル基アクセプターとして反応させた場合、1,2-DAG および TAG が生成するのに対し、1-MAG をアシル基アクセプターとした場合には 1,3-DAG が主産物であり、TAG はほとんど生成しなかった。これらの結果は、ヒト小腸 DGAT 活性が主に DGAT1 によって担われていること、また主として 1,2-DAG を基質として TAG を合成することを示唆するものと考えた。

○第 3 章

MGAT は小腸での TAG 合成に主要な役割を果たすことが知られているが、他の組織、例えば肝臓での TAG 合成への寄与は不明であった。新規な MGAT 候補遺伝子としてマウス cDNA ライブラリーよりアシルトランスフェラーゼモチーフをもつ遺伝子をクローニングしたところ、既知のリゾホスファチジルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（LPGAT1）遺伝子と同一のものであった。LPGAT1 のアシルトランスフェラーゼ活性を検討した結果から、LPGAT1 は新規な MGAT であると結論した。マウスにおける LPGAT1 遺伝子の発現分布を調べたところ、特に肝臓での発現が高いことがわかった。肝臓は比較的高い MGAT 活性を有する臓器であることがわかっているが、一方でこれまで同定されている MGAT でマウス肝臓において高発現しているものはなかったことから、LPGAT1 は肝臓での MGAT 活性を担う酵素である可能性を考えた。

○第 4 章

マウス肝臓の MGAT 活性を検討したところ、肥満／糖尿病モデルマウスである *db/db* マウスでコントロールの *db/m* マウスよりも高く、この活性亢進は肝臓 LPGAT1 遺伝子の発現レベルと一致した。*db/db* マウスの脂質代謝における LPGAT1 の役割を明らかにする目的で、short hairpin RNA（shRNA）を用いてマウス肝臓 LPGAT1 遺伝子のノックダウンを試みた。LPGAT1 shRNA アデノウイルスを *db/db* マウスに感染させたところ、肝臓の LPGAT1 遺伝子の選択的な発現抑制と、MGAT 活性および LPGAT 活性の低下が認められた。興味深いことに、shRNA アデノウイルス感染したマウスでは顕著な血清 TAG とコレステロールレベルの低下が認められ、また肝臓中のコレステロール含量の増加が認められた。これらの結果は、新規な MGAT である LPGAT1 が *db/db* マウスにおいて肝臓の TAG 合成と分泌に寄与していることを示すものと考えた。

7　参考文献

(1) R.A. Coleman, D.P. Lee, Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation, Prog. Lipid Res. 43 (2004) 134-176.

(2) R.M. Bell, R.A. Coleman, Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes, Annu. Rev. Biochem. 49 (1980) 459-487.

(3) S. Cases, S.J. Smith, Y.-W. Zheng, H.M. Myers, S.R. Lear, E. Sande, S. Novak, C. Collins, C.B. Welch, A.J. Lusis, S.K. Erickson, R.V. Farese Jr., Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95 (1998) 13018-13023.

(4) S. Cases, S.J. Stone, P. Zhou, E. Yen, B. Tow, K.D. Lardizabal, T. Voelker, R.V. Farese Jr., Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members, J. Biol. Chem. 276 (2001) 38870-38876.

(5) R.L. Meegalla, J.T. Billheimer, D. Cheng, Concerted elevation of acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity through independent stimulation of mRNA expression of DGAT1 and DGAT2 by carbohydrate and insulin, Biochem. Biophys. Res. Commun. 298 (2002) 317-323.

(6) P. Bouvier-Nave, P. Benveniste, P. Oelkers, S.L. Sturley, H. Schaller, Expression in yeast and tobacco of plant cDNAs encoding acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, Eur. J. Biochem. 267 (2000) 85-96.

(7) D.H. Hobbs, C. Lu, M.J. Hills, Cloning of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis thaliana* and its functional expression, FEBS Lett. 452 (1999) 145-149.

(8) K.D. Lardizabal, J.T. Mai, N.W. Wagner, A. Wyrick, T. Voelker, D.J. Hawkins, DGAT2 is a new diacylglycerol acyltransferase gene family. Purification, cloning and expression in insect cells of two polypeptides from *Mortierella ramanniana* with diacylglycerol acyltransferase activity, J. Biol. Chem. 276 (2001) 38862-38869.

(9) H.M. Alvarez, A. Steinbuchel, Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60 (2002) 367-376.

(10) S.J. Smith, S. Cases, D.R. Jensen, H.C. Chen, E. Sande, B. Tow, D.A. Sanan, J. Raber, R.H. Eckel, R.V. Farese Jr., Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat, Nat. Genet. 25 (2000) 87-90.

(11) H.C. Chen, S.J. Smith, Z. Ladha, D.R. Jensen, L.D. Ferreira, L.K. Pulawa, J.G. McGuire, R.E. Pitas, R.H. Eckel, R.V. Farese Jr., Increase insulin and leptin sensitivity in mice lacking acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1, J. Clin. Invest. 109 (2002) 1049-1055.

(12) S.J. Stone, H.M. Myers, S.M. Watkins, B.E. Brown, K.R. Feingold, P.M. Elias, R.V.

Farese Jr., Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice, J. Biol. Chem. 279 (2004) 11767-11776.

(13) M. Buszczak, X. Lu, W.A. Segraves, T.Y. Chang, L. Cooley, Mutations in the midway gene disrupt a *Drosophila* acyl coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase, Genetics 160 (2002) 1511-1518.

(14) C. Lu, M.J. Hills, *Arabidopsis* mutants deficient in diacylglycerol acyltransferase display increased sensitivity to abscisic acid, sugars, and osmotic stress during germination and seedling development, Plant Physiol. 129 (2002) 1352-1358.

(15) J. Zou, Y. Wei, C. Jako, A. Kumar, G. Selvaraj. D.C. Taylor, The *Arabidopsis thaliana* TAG1 mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene, Plant J. 19 (1999) 645-653.

(16) J.-M. Routaboul, C. Benning, N. Bechtold, M. Caboche, L. Lepiniec, The TAG1 locus of *Arabidopsis* encodes for a diacylglycerol acyltransferase, Plant Physiol. Biochem. 37 (1999) 831-840.

(17) D. Sorger, G. Daum, Synthesis of triacylglycerols by the acylcoenzyme A:diacyl-glycerol acyltransferase Dga1p in lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, J. Bacteriol. 184 (2002) 519-524.

(18) P. Oelkers, D. Cromley, M. Padamsee, J.T. Billheimer, S.L. Sturley, The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast, J. Biol. Chem. 277 (2002) 8877-8881.

(19) Q. Zhang, H.K. Chieu, C.P. Low, S. Zhang, C.K. Heng, H. Yang, *Schizosaccharomyces pombe* cells deficient in triacylglycerols synthesis undergo apoptosis upon entry into the stationary phase, J. Biol. Chem. 278 (2003) 47145-47155.

(20) F. Manganaro, A. Kuksis, Purification and preliminary characterization of 2-monoacylglycerol acyltransferase from rat intestinal villus cells, Can. J. Biol. 63 (1985) 341-347.

(21) B.G. Bhat, E.S-G. Bardes, R.A. Coleman, Solubilization and partial purification of neonatally expressed rat hepatic microsomal monoacylglycerol acyltransferase, Arch. Biochem. Biophys. 300 (1993) 663-669.

(22) B.G. Bhat, P. Wang, R.A. Coleman, Hepatic monoacylglycerol acyltransferase is regulated by sn-1,2-diacylglycerol and by specific lipids in triton X-100 /phospholipid-mixed micelles, J. Biol. Chem. 269 (1994) 13172-13178.

(23) S.C. Jamdar, W.F. Cao, Properties of monoacylglycerol acyltransferase in rat adipocytes, Arch. Biochem. Biophys. 296 (1992) 419-425.

(24) A.W. Tumaney, S. Shekar, R. Rajasekharan, Identification, purification, and characterization of monoacylglycerol acyltransferase from developing peanut cotyledons, J. Biol. Chem. 276 (2001) 10847-10852.

(25) E.L. Arrese, B.I. Rojas-Rivas, M.A. Wells, Synthesis of sn-1,2-diacylglycereol by monoacylglycerol acyltransferase from Manduca sexta fat body, Arch. Insect. Biochem. Physiol. 31 (1996) 325-335.

(26) N. Mostafa, B.G. Bhat, R.A. Coleman, Adipose monoacylglycerol:acyl- coenzyme A acyltransferase activity in the white-throated sparrow (Zonotrichia albicollis): Characterization and function in a migratory bird, Lipids 29 (1994) 785-791.

(27) C.E. Yen, S.J. Stone, S. Cases, P. Zhou, R.V. Farese,Jr., Identification of a gene encoding MGAT1, a monoacylglycerol acyltransferase, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (2002) 8512-8517.

(28) C.E. Yen, R.V. Farese, Jr., MGAT2, a monoacylglycerol acyltransferase exressed in the small intestine, J. Biol. Chem. 278 (2003) 18532-18537.

(29) J.F. Lockwood, J. Cao, P. Burn, Y. Shi, Human intestinal monoacylglycerol acyltransferase: differential features in tissue expression and activity, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 285 (2003) E927-E937.

(30) J. Cao, J.F. Lockwood, P. Burn, and Y. Shi, Cloning and functional characterization of a mouse intestinal acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase, MGAT2, J. Biol. Chem. 278 (2003) 13860-13866.

(31) C.E. Yen, M. Cheong, C. Grueter, P. Zhou, J. Moriwaki, J.S. Wong, B. Hubbard, S. Marmor, R.V. Farese Jr., Deficiency of the intestinal enzyme acyl CoA:monoacylglycerol acyltransferase-2 protects mice from metabolic disorders induced by high-fat feeding, Nature Medicine 15 (2009) 442-446.

(32) D. Cheng, T.C. Nelson, J. Chen, S.G. Walker, J. Wardwell-Swanson, R. Meegalla, R. Taub, J.T. Billheimer, M. Ramaker, J.N. Feder, Identification of acyl coenzyme A:monoacylglycerol acyltransferase 3, an intestinal specific enzyme implicated in dietary fat absorption, J. Biol. Chem. 278 (2003) 13611-13614.

第 1 章

赤血球内でのマラリア原虫の増殖における
ジアシルグリセロールアシル基転移酵素の関与

1-1　目的

定期的な発熱、激しい貧血、脾臓の腫大で特徴づけられるマラリアは、原生動物の住血胞子虫類である *Plasmodium* 属（熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum*、三日熱マラリア原虫 *P. vivax*、四日熱マラリア原虫 *P. malariae* 等）の原虫を寄生病原体とする病気で、熱帯地域を中心として現在なお世界的に広く蔓延している疾患である。マラリアによる発熱は、ハマダラカを介して人体に侵入したマラリア原虫が肝臓での潜伏期を経た後、赤血球内で増殖サイクルを繰り返すことにより引き起こされる（Figure 1-1）。

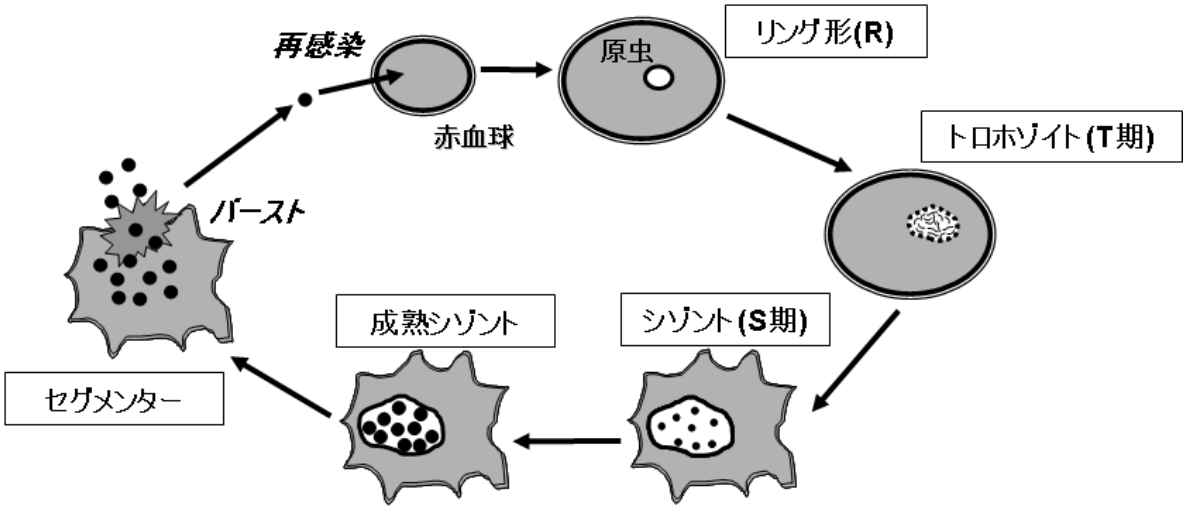


Figure 1-1.　マラリア原虫の生活環

赤血球に侵入したマラリア原虫は、増殖サイクルを遂行するために脂質を利用すると考えられており、熱帯熱マラリア原虫*P. falciparum*が赤血球内で増殖する際、脂質含量が増加することが報告されている[1,2,3]。赤血球自身には脂質の合成・輸送・分解活性はないため、マラリア原虫が生存のために独自の脂質代謝および輸送系を有していることが示唆されるが[1,4]、その詳細や意義、すなわち脂質がなぜ必要なのかという点についてはよくわかっていない[4,5]。

一方、最近の研究によって、マラリア原虫は増殖の特定の時期に急激なTAG合成を行っていることが明らかとなった[6,7]。このことは、脂質のうちでも特にTAGがマラリアの増殖・生存に重要な役割を果たしている可能性を示唆する。その場合、TAG合成の最終ステップはDGATによって触媒されることから、マラリア原虫のDGATの存在が予想される。現在までにマラリアDGATの候補遺伝子として、*P. falciparum*のゲノム中にORF が 1 つ見つかっているが（PlasmoDB：http://plasmodb.org/plasmo/）、これが実際にDGATをコードするのかどうかについては確認されていなかった。そこで本研究においては、*P. falciparum*のDGAT候補（PfDGAT1）が実際にDGAT活性を有するかどうかを調べ、更に 2 重組換えの手法によってPfDGAT1 遺伝子のORFを欠損した原虫株を作出し、増殖能に対する影響を調べた。

1-2　材料と方法

材料

遊離脂肪酸非含有ウシ血清アルブミン、1,2-ジオレオイルグリセロール、1,2,3-トリオレイン、ガンシクロビル、プロテアーゼ阻害剤カクテルはシグマアルドリッチ社より購入した。[^{14}C]パルミトイルCoA（55 mCi/mmol）はアマシャム社、Ham's F-12 培地およびリポフェクトアミン 2000 試薬はインビトロジェン／ギブコ社、シリカゲル 60 TLCプレートはメルク社より購入した。WR99210 はDr. Jacobus and Schiehser （Jacobus Pharmaceutical, NJ）より提供いただいた。熱帯熱マラリア原虫株は、Honduras-1 [8]、3D7 および Dd2 [9] 株を使用した。原虫細胞の培養はマイコプラズマ汚染を確認しながら定法に従って実施した。同調培養は既報の方法に従った[6,8,9]。

プラスミド構築

哺乳細胞における転写効率を上げることを目的として、PfDGAT1 遺伝子配列の使用コドンが哺乳動物のコドン利用率に適合するよう、かずさDNA研究所によるCodon Usage Database (http://www.kazusa. or.jp/codon/)を使用してPfDGAT1 遺伝子配列を再設計した。この配列にしたがってPfDGAT1 遺伝子をDNA合成し、pBluescript II-SK(+)（タカラバイオ社）に組み込んだ。*Mlu*I–*Not*I消化断片をpAP3neoベクター（タカラバイオ社）にサブクローニングし、pAP3neo-humanized PfDGAT1 プラスミドを得た（Figure 1-2）。pHHT-tk-1-(5R1 + 3R)PfDGAT1 の構築のために、3D7 株とHonduras-1 株のゲノムDNAを鋳型として、PfDGAT1 の 5'側 529 bp断片と 3'側 950 bp断片とをPCR増幅した。5'側 *Sac*II–*Spe*I 断片、3' 側 *Eco*RI-*Avr*II 断片を、pHHT-tk [10] プラスミドの改変体である pHHT-tk-1 ベクターに組み込んだ。

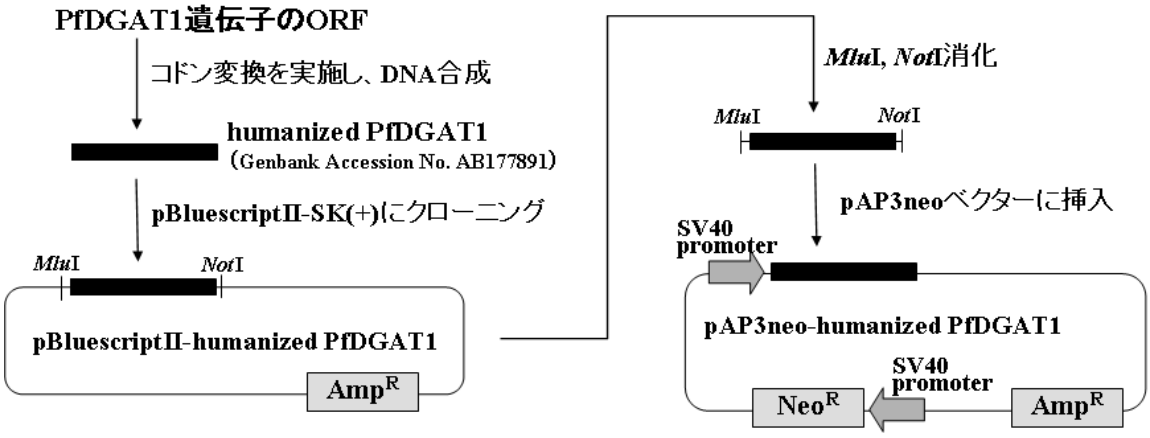


Figure 1-2.　pAP3neo-humanized PfDGAT1 プラスミドの構築

ノーザンブロットおよび半定量的RT-PCR

ノーザンブロットおよび半定量的RT-PCRについては、既報の方法に従った[9]。各増殖ステージの原虫からのRT-PCR産物について、PfDGAT1 と配列が一致することを確認した。

トランスフェクション

熱帯熱マラリア原虫株であるDd2 株を赤血球に感染させ、既報の方法に従ってpHHT-tk-1-(5R1 + 3R)PfDGAT1 導入と第 1 段階のWR99210 選択を行った [10,11]。トランスフェクション後 20-23 日で最初のリング原虫が出現した。WR99210 選択下で 57、65、105、142、160 日間生存した細胞について、第 2 段階の薬剤耐性選択として、4 μMガンシクロビル含有培地[10]で 5-10 日間培養した。最後にWR99210 選択に戻し、10-15 日間培養を行った。pHHT-tk-1-(5R1 + 3R)PfDGAT1 がエピソームformかあるいはintegrated formのいずれで存在しているかを検出する目的で、薬剤選択の各ステージの細胞から回収したDNAを以下のプライマーセットでPCR増幅した。エピソームform；(a) 5-R1-DGAT1-F/5' PfCAM-R (b) 3'PfHRP2-F/3R-DGAT1-R、integrated form；(c) 5-R6-DGAT1-F/5'PfCAM -R (d) 5-R-DGAT1-F/5'PfCAMR (e) 3'PfHRP2-F/3-R1-DGAT1-R (f) 3'PfHRP2-F/3-R2-DGAT1-R。PCRはAdvantage 2 PCRキットで行い、PCR条件は（95℃-5 分）×1 サイクル、（91℃-0.5 分、53℃-0.5 分、61℃-3 分）×35-40 サイクルとした。Integrated form増幅用のプライマーを用いた時のPCR産物の塩基配列解析によって、Dd2 ゲノム中のPfDGAT1 遺伝子が破壊されていることを確認した。CHO-K1 細胞のトランスフェクションは、6 μgのpAP3neo-humanized PfDGAT1 あるいはpAP3neo-1 プラスミド（ベクター）をリポフェクトアミンと混合し、6 穴プレートに 4×10^5 cells/ウェルで巻き込んだセミコンフルエント細胞に添加後、24 時間培養した。コントロールとして、DNA不含のリポフェクトアミン液で同様に処理したCHO-K1 細胞（Mock）および未処理の細胞（CHO）を作製した。

DGAT活性測定

DNA処理、Mock処理、未処理のCHO-K1 細胞をそれぞれPBSで 2 回洗浄して回収し、0.1 mL 細胞溶解液（50 mM Tris–HCl (pH 8.0)、250 mM スクロース、1 mM EGTA、プロテアーゼ阻害剤カクテル）に懸濁した。ソニケーション後の細胞溶解液を 800×*g*で遠心し、上清をDGAT活性測定に供した[6]。今回の実験では、マグネシウム濃度は 10 mM、反応は 20℃、20 分とした。結果は 3 連の実験を 3 回実施した平均値で示した。

1-3　結果と考察

1-3-1. PfDGAT1 遺伝子の同定

BLAST サーチを行ったところ、熱帯熱マラリア原虫の第 3 番染色体上に DGAT 遺伝子と相同性の高い ORF（1962 bp）が見出された。コードするアミノ酸配列を比較したところ、この ORF から翻訳されるタンパク質は哺乳動物、ハエ、線虫、植物の DGAT1 と 24-30%の相同性を示し、DGAT2 とは有意な相同性がなかった。このことから、この遺伝子をマラリア DGAT1 遺伝子、つまり PfDGAT1 遺伝子とした（GenBank/ EMBL Accession No. AB177890）。PfDGAT1 遺伝子のコードするアミノ酸配列を Figure 1-3 に示す。

Figure 1-3.　PfDGAT1 アミノ酸配列

Pf=*Plasmodium falciaprum*、Hs=*Homo sapiens*、Mm=*Mus musculus*

Putative FFA binding site

Putative DAG binding site

DGAT ファミリーで保存されているアミノ酸

1-3-2. PfDGAT1 遺伝子のマラリア原虫における発現

3 つの原虫細胞株、3D2、Dd2、Honduras-1 を非同調条件で培養した細胞について、PfDGAT1 遺伝子プローブでノーザン解析を実施した結果、3.6 kbのシングルバンドが認められたことから（Figure 1-4A）、熱帯熱マラリア原虫におけるPfDGAT1 遺伝子の発現が確認できた。次にHonduras-1 株の同調培養系を用いてノーザン解析を行ったところ、PfDGAT1 遺伝子の発現はトロホゾイト／シゾント期に最も高くなることがわかった（Figure 1-4B）。また、Dd2 株の同調培養系から回収したトータルRNAを用いて、各増殖期でのPfDGAT1 の発現を半定量的RT-PCRで検討した。Figure 1-4Cに示すとおり、全ての増殖ステージにおいて予想されるサイズのPCR産物が検出され、その発現量は増殖後期、つまりトロホゾイト、シゾント、セグメンター期で有意に高かった。このPfDGAT1 遺伝子の上昇パターンは原虫のマイクロアレイ解析の結果と一致し[12]、また原虫細胞のTAG合成[6,7,13]・DGAT活性[6]の変動とも一致した。

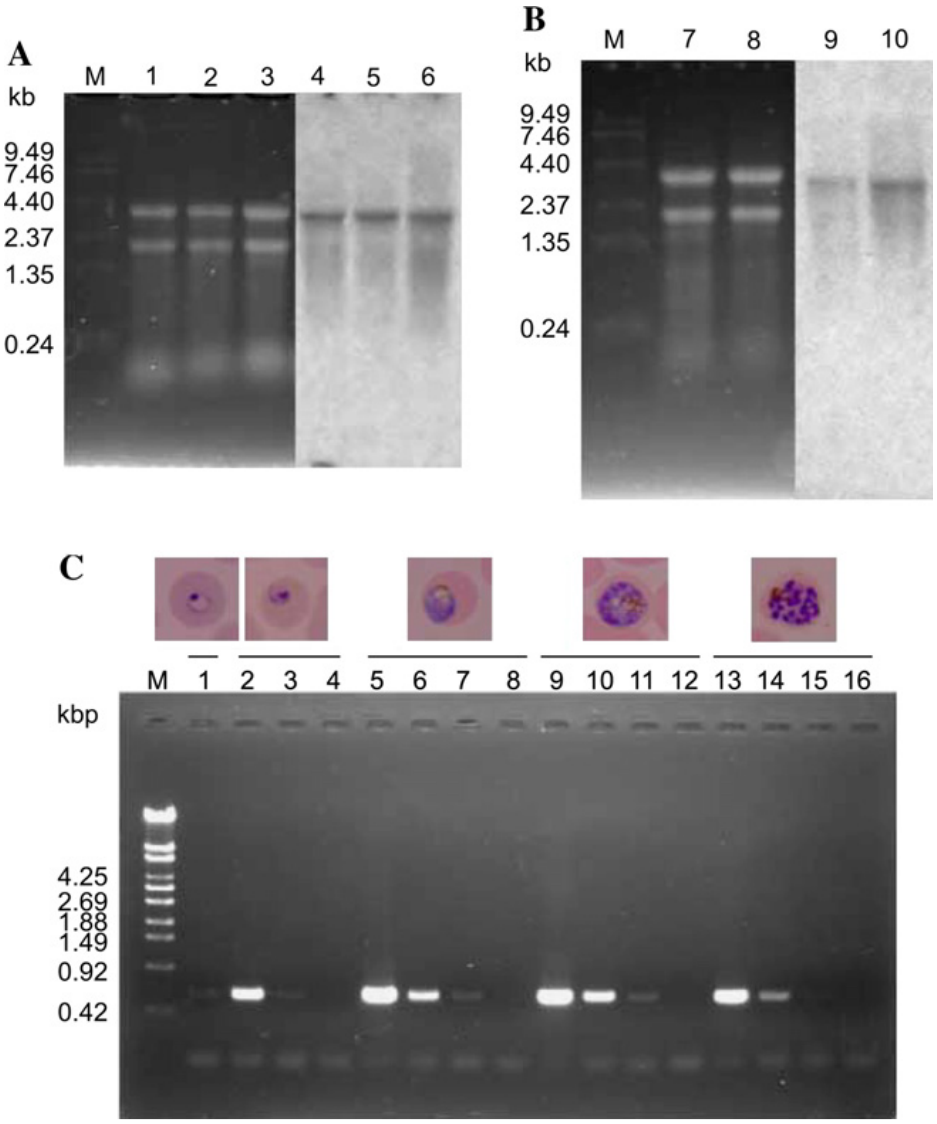


Figure 1-4. *P. falciparum* の赤血球内増殖過程における PfDGAT1 遺伝子発現

(A)非同調培養系のマラリア原虫株 Honduras-1（レーン 1,4）、3D7（レーン 2,5）、Dd2（レーン 3,6）株より調製した RNA（10 μg/レーン）を電気泳動した。EtBr 染色（レーン 1,2,3）および PfDGAT1 遺伝子の ORF をプローブとしたノーザンブロット（レーン 4,5,6）を実施した。

(B)同調培養した Honduras-1 株の RNA について、EtBr 染色（レーン 7,8）および PfDGAT1 遺伝子の ORF をプローブとしたノーザンブロット（レーン 9,10）を実施した。レーン 7,9 はリング期リッチ（5.11% リング、1.00% トロホゾイト、0.12% シゾント）、レーン 8,10 はトロホゾイト／シゾント期リッチ（0.18% リング、2.55% トロホゾイト、0.67% シゾント）。

(C)半定量的 RT-PCR。同調培養した Dd2 株から回収した RNA を適宜希釈し、RT-PCR に供した（レーン 1；リング、レーン 2,3,4；young トロホゾイト、レーン 5,6,7,8；成熟トロホゾイト、レーン 9,10,11,12；シゾント、レーン 13,14,15,16；セグメンター）。各サンプルの希釈率は、レーン 1,2,5,9,13；希釈なし、レーン 3, 6, 10, 14；10 倍希釈、レーン 4, 7, 11, 15；100 倍希釈、レーン 8, 12, 16；1000 倍希釈。（上段）各ステージの原虫の形態、(M)は分子量マーカー。

1-3-3. PfDGAT1 のDGAT活性の検出

PfDGAT1 遺伝子が DGAT 活性をもつタンパク質をコードするかどうか検討するために、PfDGAT1 遺伝子を CHO-K1 細胞で発現させるためのプラスミドを構築した。原虫細胞と哺乳動物では使用コドンが異なるため、PfDGAT1 遺伝子は哺乳動物細胞での転写効率が低くなると予想し、コドンを哺乳動物用に置き換えた PfDGAT1 配列 DNA を人工合成した（A+T 率；76.9%→61.5%）。Humanized PfDGAT1 遺伝子を導入した CHO-K1 細胞は、空ベクターである pAP3neo-1 を導入した CHO-K1 細胞に比べて有意に高い DGAT 活性を示した（232 ± 22 pmol/min/mg-protein 対 102 ± 9 pmol/min/mg-protein）。pAP3neo-1 を導入した CHO-K1 細胞の DGAT 活性は、Mock 処理細胞(149 ± 29 pmol/min/mg-protein)、未処理細胞(120 ± 9 pmol/min/mg-protein)と同程度であったことから、CHO-K1 細胞の内在性 DGAT 活性を反映していると考えられた（Figure 1-5）。これらの結果から、PfDGAT1 遺伝子は確かに DGAT をコードしていると考えられた。

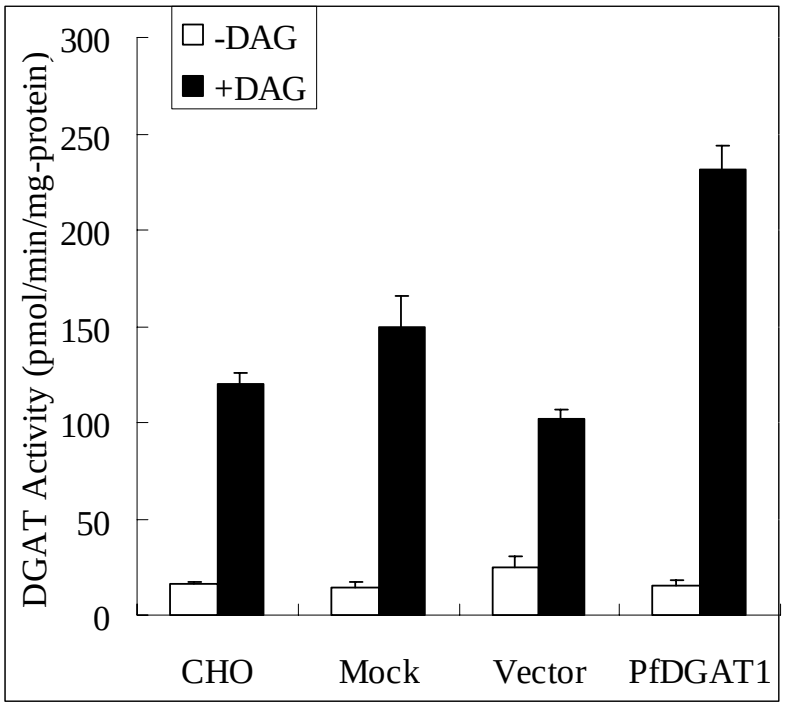


Figure 1-5. PfDGAT1 の DGAT 活性

無処理(CHO)、Mock 処理(Mock)、pAP3neo-1 導入(Vector)、pAP3neo-humanized PfDGAT1 導入(PfDGAT1)の CHO-K1 細胞の DGAT 活性を測定した（□：DAG なし、■：DAG 添加）。活性値は平均±SEM(n=3)にて示す。

1-3-4. PfDGAT1 欠失のマラリア原虫増殖への影響

PfDGAT1 が他の生物のDGATと同様にDGAT活性を有することがわかったが、一方で多細胞生物においては複数のDGAT遺伝子が存在するのに対し、*P. falciparum*では１種類のDGAT遺伝子しか存在しない。そこで、PfDGAT1 の生理的な役割を検討するために、pHHT-tk プラスミド[10]を用いた 2 重組換えの手法を用いて、PfDGAT1 遺伝子を欠失した原虫細胞株の作出を試みた。pHHT-tk-1-(5R1 + 3R)PfDGAT1 を導入したDd2 株についてまずWR99210 により選択をかけ、57、65、105、142、160 日後にガンシクロビル選択を 5-10 日間実施し、最後にWR99210 のみを含む培地で 10-15 日培養した（Figure 1-6A,Bに原理を示す）。第 1 段階のWR99210 選択の 57 および 65 日目においては、導入プラスミドは大部分エピソームとして保持されていたが、105 日目では、integrated formを検出するためのプライマーセットのうち、2 種類（Figure 1-6A、プライマーe,f）の組み合わせでPCR産物が検出されたことから、ガンシクロビル処理前に一部の原虫で既に組換えが起こっていることが確かめられた。142 日目においては、WR99210 あるいはガンシクロビル選択後の細胞から回収したDNAは、エピソームformおよびintegrated formの混合であった（Figure 1-6C、a-f、レーン 2,3）。Integrated formから増幅されるPCR産物は、ガンシクロビル選択後の細胞から回収したDNAを鋳型とした時により多く検出された。次に、PfDGAT1 遺伝子を欠失した原虫細胞を濃縮するために、ガンシクロビル選択後の細胞を再びWR99210 選択に戻した。しかしながら、WR99210 に戻した後 15 日間培養しても原虫細胞の増加は認められなかった。この結果から、遺伝子導入には技術的な問題はなく、pHHT-tk-1-(5R1 + 3R)PfDGAT1 は原虫ゲノムPfDGAT1 と 2 重組換えを起こしたものと推察できる。にもかかわらず、integrated formを保有していてWR99210 下で増殖可能であるはずの原虫は、薬剤選択によって濃縮されて来なかった（Figure 1-6B,C）。このことは、PfDGAT1 遺伝子を欠失した*P. falciparum*は、赤血球内で増殖不可であることを示したと考えた。

PfDGAT1 遺伝子の欠失によって原虫が増殖能を失ったことから、PfDGAT1 は原虫の赤血球内増殖に必須であると考えられる。これまでに原虫のゲノム中にはただ 1 つのPfDGAT1 遺伝子しか見つかっておらず、他にDGAT活性を有する可能性のある遺伝子、例えば酵母および植物においてDAGからTAGを合成することが報告されているphospholipid:DAG アシルトランスフェラーゼは原虫ゲノム中には存在しないこと[7,13]から、原虫におけるTAG合成の責任分子はPfDGAT1 であり、PfDGAT1 により合成されるTAGは原虫の赤血球内増殖に重要な役割を果たすと考えられる。*P. falciparum*と同じ単細胞真核生物である酵母（*S. cerevisiae*および*S. pombe*）も、DGAT遺伝子としてはDGAT1 遺伝子ファミリーのオーソログである*dga1* のみをゲノム中に持っているが[14,15,16]、*dga1* のnull-mutantは表現型が現れない、すなわち生存および増殖に影響がないという点で、原虫PfDGAT1 の役割とは異なっていると推察される。同様に、哺乳動物、ハエ、植物においてはDGAT遺伝子を破壊しても特定の組織のみでしか表現型が現れない[17-23]ことからも、原虫DGATの機能が特殊であると考えられた。

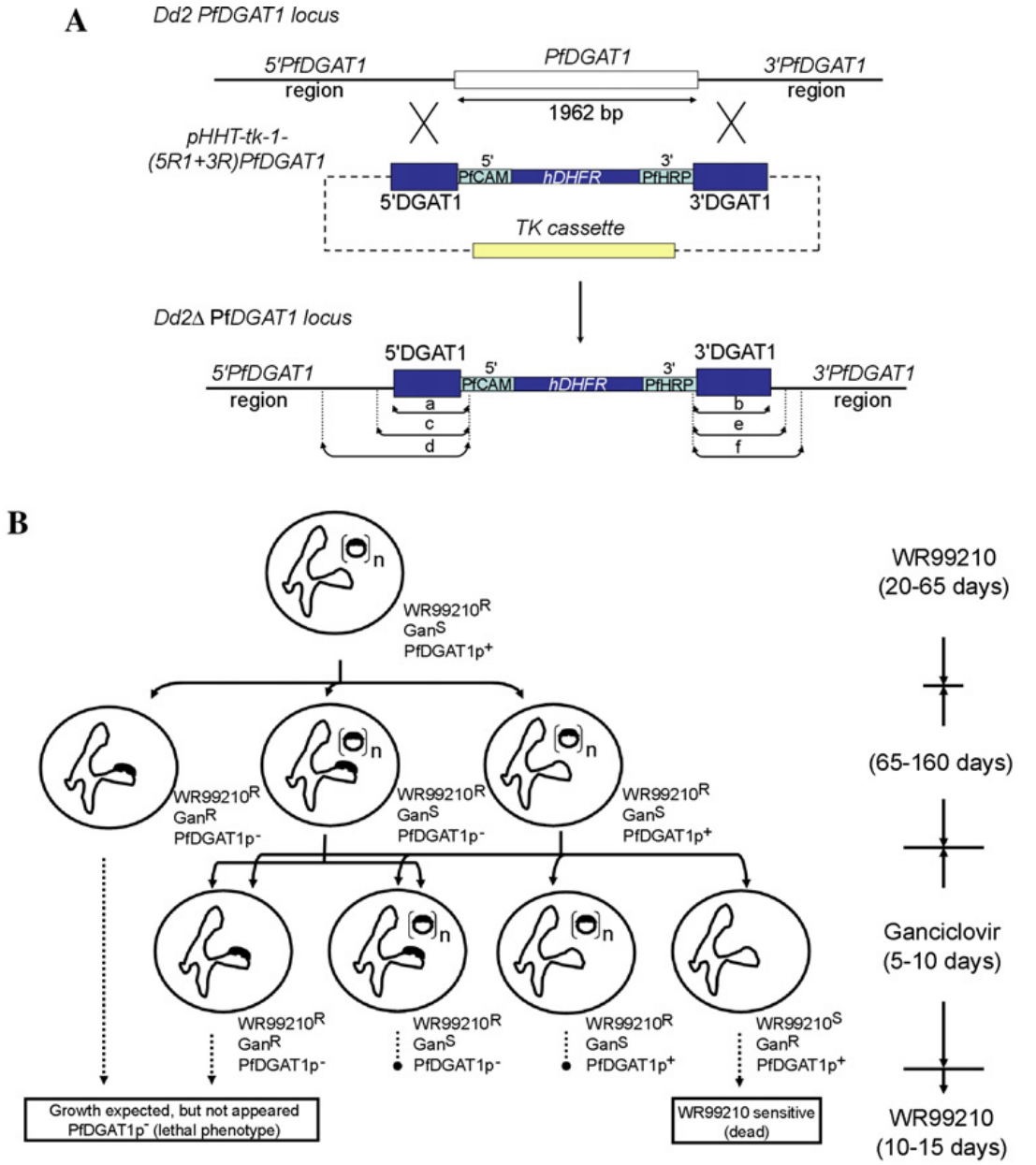

A
Dd2 PfDGAT1 locus
5'PfDGAT1 region
PfDGAT1
3'PfDGAT1 region
1962 bp
pHHT-tk-1-(5R1+3R)PfDGAT1
5'
3'
PfCAM
hDHFR
PfHRP
5'DGAT1
3'DGAT1
TK cassette
Dd2Δ PfDGAT1 locus
a
b
c
d
e
f
B
WR99210R GanS PfDGAT1p+
WR99210R GanR PfDGAT1p-
WR99210R GanS PfDGAT1p-
WR99210R GanS PfDGAT1p+
WR99210R GanR PfDGAT1p-
WR99210R GanS PfDGAT1p-
WR99210R GanS PfDGAT1p+
WR99210S GanR PfDGAT1p+
Growth expected, but not appeared PfDGAT1p- (lethal phenotype)
WR99210 sensitive (dead)
WR99210 (20-65 days)
(65-160 days)
Ganciclovir (5-10 days)
WR99210 (10-15 days)
C
5'PfDGAT1 region
3'PfDGAT1 region
a c d b e f
M1 M2 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4
kbp
2.69
1.88
1.5
0.92
0.42
0.5
0.1

Figure 1-6.　2 重組換えによる PfDGAT1 遺伝子の破壊実験

(A)2 重組換えの原理。PfDGAT1 遺伝子を含む *P. falciparum* の第 3 染色体、pHHT-tk-1-(5R1+3R) PfDGAT1 プラスミド、組換え後の PfDGAT1 部位の構造を図で示す。a-f の各プライマーセットにより PCR 増幅される部位を矢印で示す。

hDHFR：ジヒドロ葉酸還元酵素（抗マラリア薬である WR99210 に対して耐性を付与）

TK：ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ（ガンシクロビルを添加するとガンシクロビル 3 リン酸に変換され、細胞の DNA 合成が阻害されて細胞死が起こる）

(B)薬剤選択の各過程において期待される、原虫の表現型を模式図で示す。

太線：DHFR の発現ユニット

(n)：エピソームの多コピー状態

上付き R あるいは S：WR99210 あるいはガンシクロビル（Gan）に対する抵抗性（R）あるいは感受性（S）

＋あるいは－：PfDGAT1 遺伝子が存在（＋）あるいは欠失（－）

(C)PfDGAT1 のエピソーム form あるいは integrated form を区別するための PCR 解析の結果。1-4 の各レーンは

(1) ネガティブコントロール：形質転換なしの細胞からの DNA（50 ng）

(2) WR99210 による第 1 段階選択後の細胞からの DNA（50 ng）

(3) WR99210 およびガンシクロビル選択後の細胞からの DNA（50 ng）

(4) プラスミド DNA(pHHT-tk-1-(5R1+3R)PfDGAT1)（1 ng）

を鋳型として使用した。矢印で示した PCR 産物のサイズは 575、1070、614、995、1143、1160 bp である（それぞれプライマーセット a-f に対応）。(M)は分子量マーカー。

1-4　参考文献

(1) G.G. Holz Jr., Lipids and the malaria parasite, Bull. World Health Organ. 55 (1977) 237-248.

(2) H.J. Vial, M.J. Thuet, J.R. Philippot, Phospholipid biosynthesis in synchronous *Plasmodium falciparum* cultures, J. Protozool. 29 (1982) 258-263.

(3) H.J. Vial, M.J. Thuet, J.L. Broussal, J.R. Philippot, Phospholipid biosynthesis by *Plasmodium knowlesi*-infected erythrocytes: the incorporation of phospholipids precursors and the identification of previously undetected metabolic pathways, J. Parasitol. 68 (1982) 379-391.

(4) H.J. Vial, M.L. Ancelin, Malarial lipids, in: I.W. Sherman (Ed.), Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection, ASM Press, Washington, DC, 1998, pp. 159-175.

(5) T. Mitamura, N.M.Q. Palacpac, Lipid metabolism in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: possible new targets for malaria chemotherapy, Microbes Infect. 5 (2003) 545-552.

(6) N.M.Q. Palacpac, Y. Hiramine, F. Mi-ichi, M. Torii, K. Kita, R. Hiramatsu, T. Horii, T. Mitamura, Developmental-stage-specific triacylglycerol biosynthesis, degradation, and trafficking as lipid bodies in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte, J. Cell Sci. 117 (2004) 1469-1480.

(7) O. Vielemeyer, M.T. McIntosh, K.A. Joiner, I. Coppens, Neutral lipid synthesis and storage in the intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*, Mol. Biochem. Parasitol. 135 (2004) 197-209.

(8) T. Mitamura, K. Hanada, E.P. Ko-Mitamura, M. Nishijima, T. Horii, Serum factors governing intraerythrocytic development and cell cycle progression of *Plasmodium falciparum*, Parasitol. Int. 49 (2000) 219-229.

(9) K. Hanada, N.M.Q. Palacpac, P.A. Magistrado, K. Kurokawa, G. Rai, D. Sakata, T. Hara, T. Horii, M. Nishijima, T. Mitamura, *Plasmodium falciparum* phospholipase C hydrolyzing sphingomyelin and lysocholinephospholipids is a possible target for malaria chemotherapy, J. Exp. Med. 195 (2002) 23-34.

(10) M.T. Duraisingh, T. Triglia, A.F. Cowman, Negative selection of *Plasmodium falciparum* reveals targeted gene deletion by double crossover recombination, Int. J. Parasitol. 32 (2002) 81-89.

(11) K.W. Deitsch, C.L. Driskill, T.E. Wellems, Transformation of malaria parasites by the spontaneous uptake and expression of DNA from human erythrocytes, Nucleic Acids Res. 29 (2001) 850-853.

(12) K.G. Le Roch, Y. Zhou, P.L. Blair, M. Grainger, J.K. Moch, J.D. Haynes, P. De La

Vega, A.A. Holder, S. Batalov, D.J. Carucci, E.A. Winzeler, Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle, Science 301 (2003) 1503-1508.

(13) P. Nawabi, A. Lykidis, D. Ji, K. Haldar, Neutral-lipid analysis reveals elevation of acylglycerols and lack of cholesterol esters in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes, Eukaryot. Cell 2 (2003) 1128-1131.

(14) D. Sorger, G. Daum, Synthesis of triacylglycerols by the acylcoenzyme A:diacyl-glycerol acyltransferase Dga1p in lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, J. Bacteriol. 184 (2002) 519-524.

(15) P. Oelkers, D. Cromley, M. Padamsee, J.T. Billheimer, S.L. Sturley, The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast, J. Biol. Chem. 277 (2002) 8877-8881.

(16) Q. Zhang, H.K. Chieu, C.P. Low, S. Zhang, C.K. Heng, H. Yang, *Schizosaccharomyces pombe* cells deficient in triacylglycerols synthesis undergo apoptosis upon entry into the stationary phase, J. Biol. Chem. 278 (2003) 47145-47155.

(17) S.J. Stone, H.M. Myers, S.M. Watkins, B.E. Brown, K.R. Feingold, P.M. Elias, R.V. Farese Jr., Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice, J. Biol. Chem. 279 (2004) 11767-11776.

(18) S.J. Smith, S. Cases, D.R. Jensen, H.C. Chen, E. Sande, B. Tow, D.A. Sanan, J. Raber, R.H. Eckel, R.V. Farese Jr., Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat, Nat. Genet. 25 (2000) 87-90.

(19) H.C. Chen, S.J. Smith, Z. Ladha, D.R. Jensen, L.D. Ferreira, L.K. Pulawa, J.G. McGuire, R.E. Pitas, R.H. Eckel, R.V. Farese Jr., Increase insulin and leptin sensitivity in mice lacking acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1, J. Clin. Invest. 109 (2002) 1049-1055.

(20) M. Buszczak, X. Lu, W.A. Segraves, T.Y. Chang, L. Cooley, Mutations in the midway gene disrupt a *Drosophila* acyl coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase, Genetics 160 (2002) 1511-1518.

(21) C. Lu, M.J. Hills, *Arabidopsis* mutants deficient in diacylglycerol acyltransferase display increased sensitivity to abscisic acid, sugars, and osmotic stress during germination and seedling development, Plant Physiol. 129 (2002) 1352-1358.

(22) J. Zou, Y. Wei, C. Jako, A. Kumar, G. Selvaraj, D.C. Taylor, The *Arabidopsis thaliana* TAG1 mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene, Plant J. 19 (1999) 645-653.

(23) J.-M. Routaboul, C. Benning, N. Bechtold, M. Caboche, L. Lepiniec, The TAG1 locus of *Arabidopsis* encodes for a diacylglycerol acyltransferase, Plant Physiol. Biochem. 37 (1999) 831-840.

第 2 章

ヒト小腸
ジアシルグリセロールアシル基転移酵素の解析

2-1　目的

動物の小腸においては、食物中の脂肪に含まれるTAGは膵臓リパーゼによって加水分解され、可溶性の遊離脂肪酸と 2-MAGに変換される。これらは小腸細胞によってすみやかに吸収され、MGATによって 1,2-DAGになる。1,2-DAGは、DGATによって更にアシル化を受け、最終的にTAGになる。TAGは小腸細胞においてタンパク質や他の脂質と共にカイロミクロンへと組みこまれ、全身に運ばれた後に末梢組織でエネルギー源として利用される。現在までに、2 種類のDGAT遺伝子、DGAT1(1)、DGAT2(2) 遺伝子が同定されている。ヒト小腸においてはDGAT1 遺伝子が高発現しているが、一方でDGAT2 遺伝子の発現は低い。また、げっ歯類およびCaco-2 細胞（ヒト小腸由来細胞）を用いた解析で、脂質の吸収にDGAT1 が重要であることが報告されている(3)。更に、DGAT1 ノックアウトマウスにおいて小腸DGAT活性はほとんど消失し(4)、同マウスでは食後のカイロミクロンレベルの低下および小腸への脂質の蓄積が観察される(5)。これらのことから、DGAT1 はヒトおよびマウス小腸における脂質の吸収に重要であることが示唆される。しかしながら、実際のヒト小腸由来のDGATを用いた詳細な酵素解析については、これまでに報告がない。

本章では、ヒト小腸 DGAT について、組換えヒト DGAT1 との酵素的性質（アシル CoA 選択性、温度依存性）の比較を行い、更に、1-MAG あるいは 2-MAG をアシル基アクセプターとして用いることにより、1,2-DAG あるいは 1,3-DAG に対する選択性を検討した。

2-2　材料と方法

材料

ヒト小腸ミクロソーム（ロット番号 045277720010、10 人の混合、20.8 mg/mL）はKAC株式会社より購入した。ヒト脂肪ミクロソーム（ロット番号 04537127、1 mg/mL）はTissue Transformation Technology社より購入した。ヒトDGAT1 発現ミクロソームは以下のように調製した。ヒトDGAT1 のORFを含むDNA断片をpAP3neoプラスミド（タカラバイオ）のマルチクローニング部位に挿入し、作製したpAP3neo-ヒトDGAT1 プラスミドをCHO-K1 細胞に導入した。形質転換細胞から、文献記載[6]の方法により、ミクロソーム画分を調製し、分注したサンプルを-80℃に保存した。

DGAT 活性測定

DGAT反応は、0.5 mM 1,2-DAG、30 μM [^{14}C]パルミトイルCoA（アマシャム社）、0.25 M スクロース、1 mM EDTA、20 mM $MgCl_2$、100 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1.8 μM ウシ血清アルブミンを含有する 0.15 mL反応バッファーで行った。DGAT反応は上記バッファーにミクロソーム（21 μg/サンプル）を添加することにより開始し、室温で 0-15 分反応させた。反応後、0.2 mLヘプタンおよび 0.1 mL H_2Oを添加してボルテックスし、一定量の有機溶媒層を回収した。有機溶媒層を真空エバポレーターで乾燥させた後、抽出した脂質をエタノールで溶解した。脂質をシリカゲルTLCプレートにスポットし、ヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸（75:25:1、v/v）で展開した。TLCプレートをイメージングプレート（富士フィルム）に 1 晩以上暴露し、TAG相当のスポットの放射活性をBAS-2500 システム（富士フィルム）により定量化した。DGAT活性は、mgタンパク質あたりのTAGモル数で計算した。結果は、3 回の測定結果についての平均±SEMにて表示した。

MGAT 活性測定

5 μgのミクロソームを 0.15 mLの反応バッファー（24 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50 mM KCl、8 mM $MgSO_4$、1.25 mg/mL ウシ血清アルブミン、1 mM DTT、0.1 mM MAG（1- or 2-モノパルミトイルグリセロール、シグマ社））に懸濁し、30 μM [^{14}C]パルミトイルCoA (アマシャム社)を加えて反応開始した。室温で 5-10 分反応後、0.3 mLヘプタン／イソプロパノール／H_2O（80:20:2、v/v）を添加して反応停止した。脂質の抽出および定量化はDGAT活性測定と同様に行った。MGAT活性は、mgタンパク質あたりのDAGモル数で計算した。結果は、3 回の測定結果についての平均±SEMにて表示した。

2-3　結果と考察

2-3-1. ヒト小腸ミクロソームの DGAT 活性

ヒト小腸ミクロソームを 1,2-DAG とアシル CoA と反応させると、時間依存的な TAG 分子の合成が認められた（Figure 2-1）。このことから、ヒト小腸ミクロソームは DGAT 活性を有すること、使用したミクロソームは酵素活性を保持していることが確かめられた。

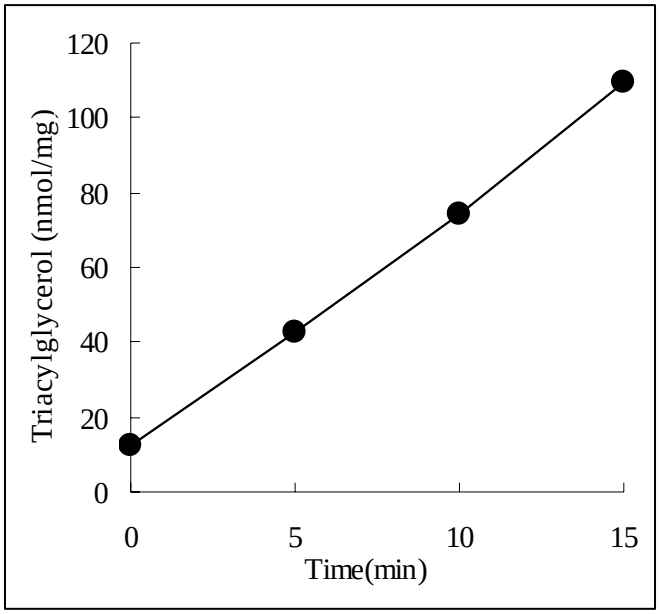


Figure 2-1.　ヒト小腸ミクロソームの DGAT 活性

1,2-DAG をアシル基アクセプターとした DGAT アッセイを実施し、0-15 分間で生成した TAG モル数を定量化した。

2-3-2. ヒト小腸 DGAT のアシル CoA 選択性および温度依存性

ヒト小腸 DGAT のアシル CoA 選択性を検討するために、アシル基ドナーとしてパルミトイル CoA (C16:0)、ステアロイル CoA (18:0)、オレオイル CoA (C18:1)、リノレオイル CoA (C18:2)、アラキドニル CoA (C20:4)を用いた DGAT アッセイを行った。その結果、ヒト小腸 DGAT は、パルミトイル CoA およびオレオイル CoA に対して顕著な選択性を示した（Figure 2-2A）。このアシル CoA 選択性は組換えヒト DGAT1 のアシル CoA 選択性とよく一致した（Figure 2-2B）。

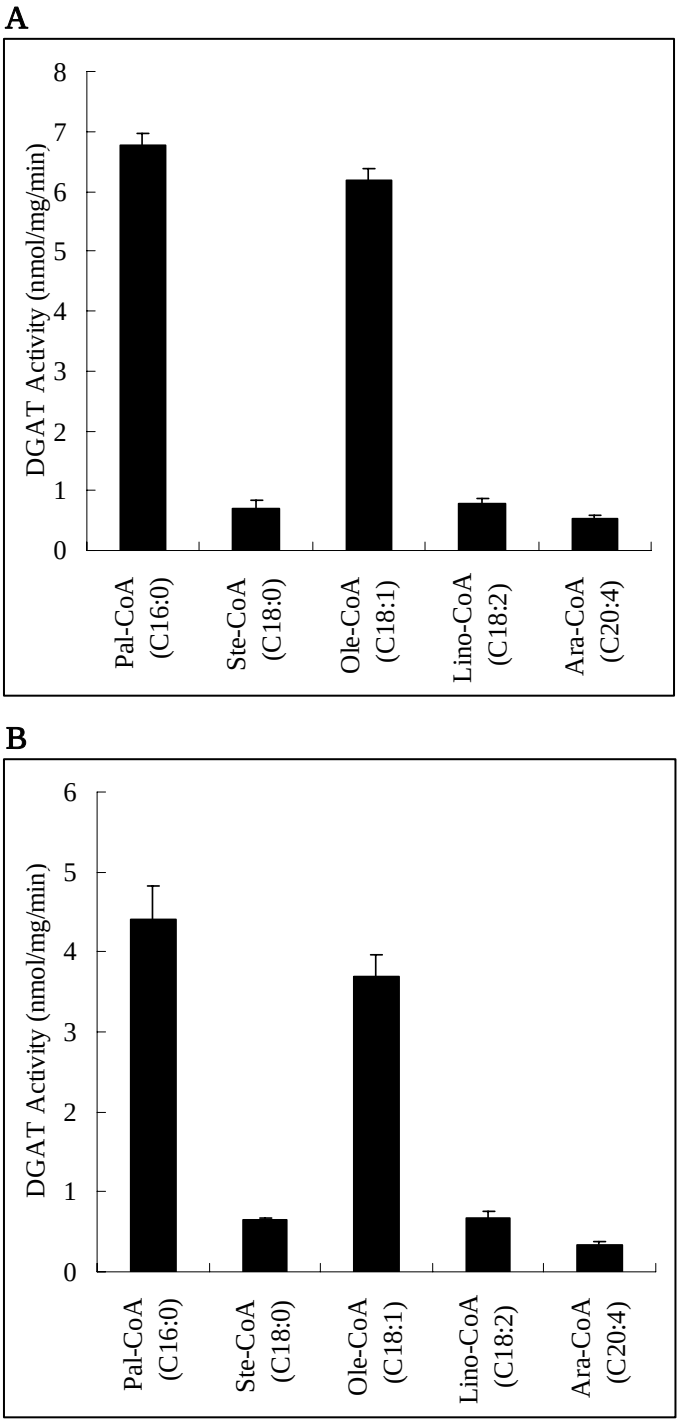


Figure 2-2.　アシル CoA 選択性

ヒト小腸ミクロソーム DGAT(A)およびヒト DGAT1 を導入した CHO-K1 細胞ミクロソーム(B)を酵素源とし、パルミトイル CoA (C16:0)、ステアロイル CoA (18:0)、オレオイル CoA (C18:1)、リノレオイル CoA (C18:2)、アラキドニル CoA (C20:4)をアシル基ドナーとして DGAT アッセイを実施した。活性値は平均±SEM(n=3)にて示す。

次に、DGAT活性を 20℃と 37℃で比較した。37℃におけるヒト小腸DGAT活性は 20℃における活性の約２倍であり、この温度依存性は組換えヒトDGAT1 と同様であった（Figure 2-3A,B）。一方、ヒト脂肪組織ミクロソームでは、37℃におけるDGAT活性は 20℃の時の 4.5 倍であり、ヒト小腸DGATおよび組換えDGAT1 と明らかに異なっていた（Figure 2-3C）。これまでに、ヒト小腸においてはDGAT1 遺伝子が高発現していること[1]、また、DGAT2 遺伝子の発現レベルは脂肪組織で高く小腸で低いことが示されている[2]。また、２つのMGAT遺伝子、MGAT2 およびMGAT3 遺伝子はヒト小腸で発現しており[7,8]、かつ各酵素は*in vitro*でDGAT活性をもっていることが示されているが[3]、これらの酵素のDGAT活性はDGAT1 に比べて極めて低いことが分っている。これらの知見から、ヒト小腸におけるDGAT活性の本体は、DGAT1 が主に担っていると考えた。

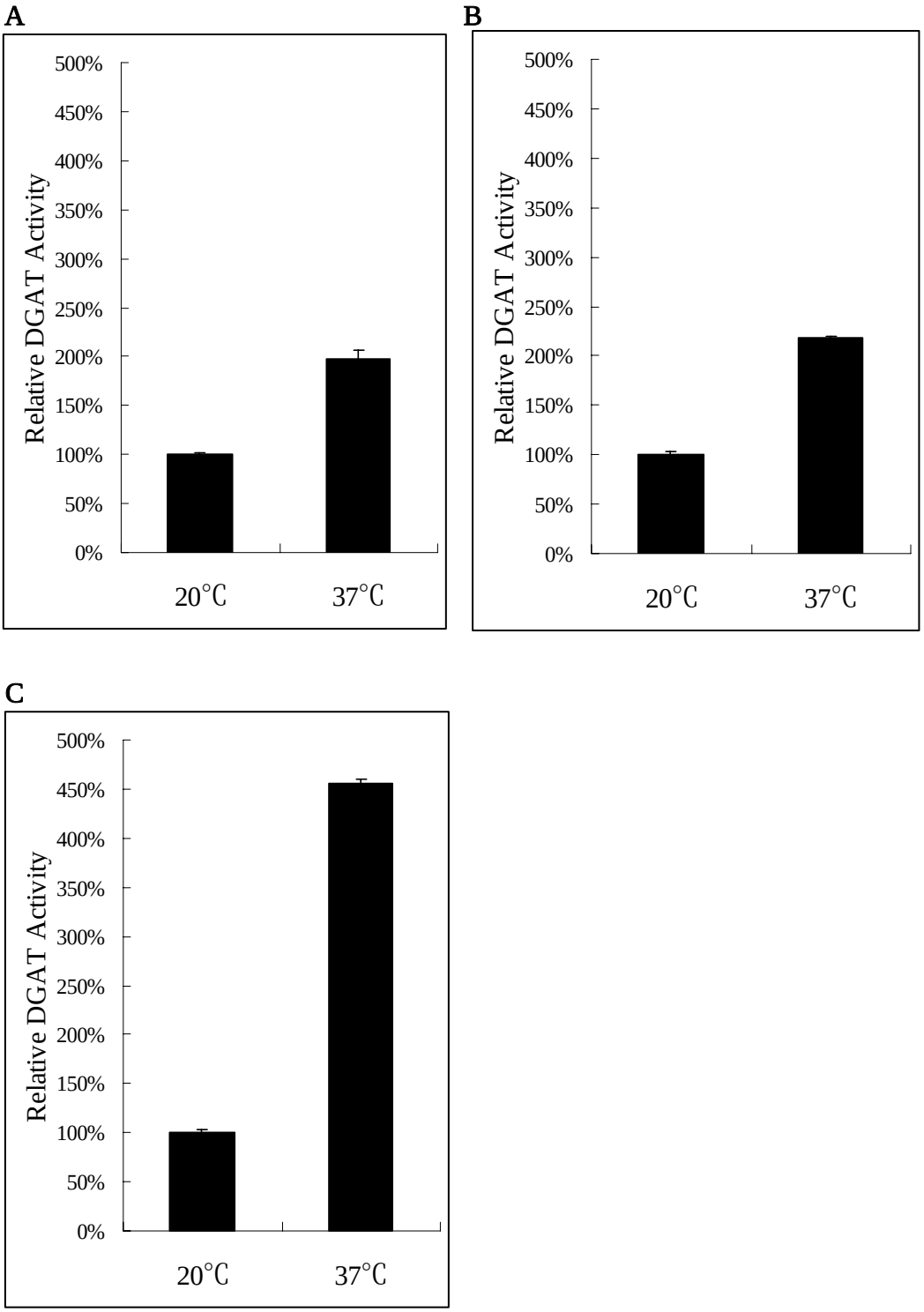


Figure 2-3. DGAT 活性の温度依存性

ヒト小腸 DGAT(A)、組換えヒト DGAT1(B)、ヒト脂肪組織 DGAT(C)を酵素源とし、パルミトイル CoA (C16:0)をアシル基ドナーとして、20℃と 37℃で DGAT アッセイを実施した。活性値は平均±SEM(n=3)にて示す。

2-3-3. ヒト小腸 DGAT の 1,2-DAG および 1,3-DAG に対する選択性

食餌中 TAG の加水分解によって生じた 2-MAG は、小腸 MGAT によって 1,2-DAG に変換され、次に DGAT がこの 1,2-DAG をアシル化して TAG に変換することから、小腸において 1,2-DAG は DGAT の良い基質になることは間違いない。一方で、食餌中には TAG の他に DAG も含まれ、その大部分は 1,3-DAG であることから（自然に存在する DAG の約 75%が 1,3-DAG）、小腸 DGAT が 1,3-DAG を基質とするかどうかについても興味がもたれる。そこで、ヒト小腸 DGAT が 1,2-DAG と 1,3-DAG のどちらに選択性が高いかについて検討を行った。検討の方法は以下のように工夫した。

DGAT アッセイの基質である DAG は水への溶解度が非常に低いため、単純に 1,2-DAG と 1,3-DAG を基質として比較した場合、DGAT 活性の測定結果が単に基質の溶解性や基質のミクロソーム DGAT への近づきやすさを反映し、基質選択性を正しく反映しない可能性がある。そこで、この可能性を否定するために、小腸ミクロソームの有する MGAT 活性を利用することとした。つまり、ヒト小腸ミクロソームを MAG およびアシル CoA と反応させた場合、まず MGAT により DAG 分子が作られ、次にこの DAG 分子がミクロソーム上で直ちに DGAT の基質として供給される。この場合には水溶性の高い MAG を基質として利用し、MGAT により形成された DAG はミクロソーム上でバッファーへの溶解を介さずに DGAT に渡されるため、DGAT 活性が DAG の溶解度に影響されないことになる。本実験では、DGAT の基質となる DAG について、アシル基の付加位置以外の条件を同じにするために、アシル基アクセプターとして 1-あるいは 2-モノパルミトイルグリセロール（1-MPG、2-MPG）、アシル基ドナーとしてパルミトイル CoA を使用した。1-MPG あるいは 2-MPG をアシル基アクセプターとして、ヒト小腸ミクロソームの MGAT アッセイを行った時の、1,2-ジパルミトイルグリセロール（1,2-DPG、Figure 2-4A）、1,3-ジパルミトイルグリセロール(1,3-DPG、Figure 2-4B）、1,2,3-トリパルミトイルグリセロール(1,2,3-TPG、Figure 2-4C）の生成量の時間依存性を Figure 2-4 に示す。

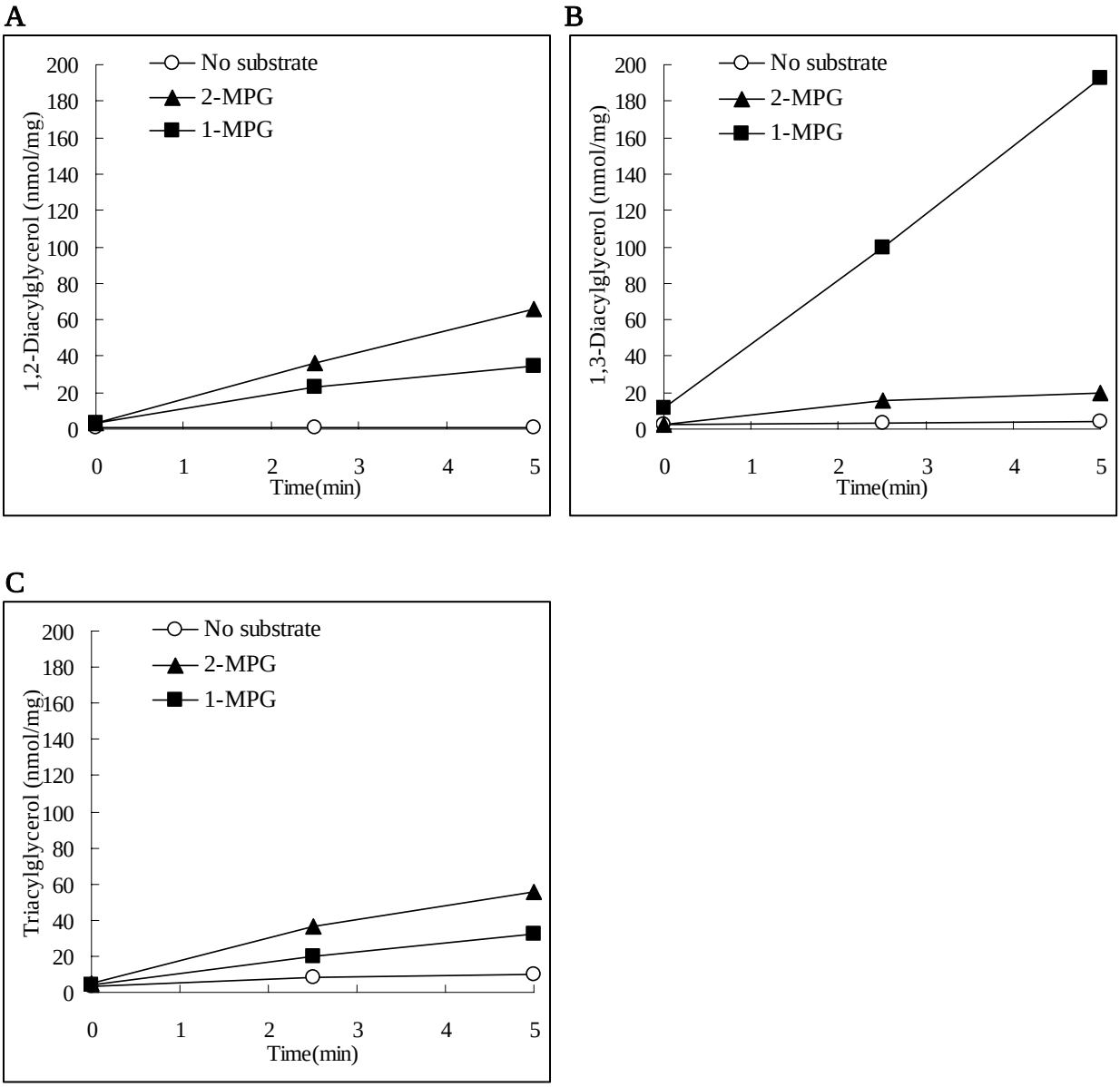


Figure 2-4.　ヒト小腸ミクロソームによる MAG の時間依存的なアシル化

DMSO（○）、2-MPG（▲）、1-MPG（■）をアシル基アクセプターとしてヒト小腸ミクロソームの MGAT アッセイを実施し、生成した 1,2-DAG（A）、1,3-DAG（B）、1,2,3-TAG（C）の分子数を定量化した。活性値は平均±SEM(n=3)にて示す。

Figure 2-5 に、各アッセイにおける 1,2-DPG、1,3-DPG、1,2,3-TPG の生成量の比較を示す。2-MPG をアシル基アクセプターとして用いた場合、主な酵素反応産物は 1,2-DPG（12.8 nmol/mg/min）と 1,2,3-TPG（9.1 nmol/mg/min）であった（Figure 2-5A）。一方、1-MPG をアシル基アクセプターとして用いた場合、1,3-DPG（37.6 nmol/mg/min）が主要な酵素反応産物であり（Figure 2-5B）、この量は 2-MPG を基質とした場合の 1,2-DPG よりもはるかに多いものであったにもかかわらず、1-MPG アッセイで生成した TPG（4.5 nmol/mg/min）は、2-MPG アッセイで生成した TPG 分子の約半分であった。すなわち、2-MAG を基質とした場合、2-MAG は MGAT によりアシル化されて 1,2-DAG になり、この 1,2-DAG は直ちに DGAT の基質となって TAG に変換される。それに対し、1-MAG を基質とした場合、1-MAG は MGAT により 1,2-DAG または 1,3-DAG と変換されるが、1,3-DAG は小腸 DGAT の基質となりにくいために、1,3-DAG が蓄積すると考えられる。つまり、ヒト小腸 DGAT の基質選択性は、1,2-DAG>1,3-DAG であると結論できる。

これらの知見より、ヒト小腸 DGAT は主に DGAT1 により活性が担われていること、また、主として 1,2-DAG を基質として TAG を合成すると考えた。

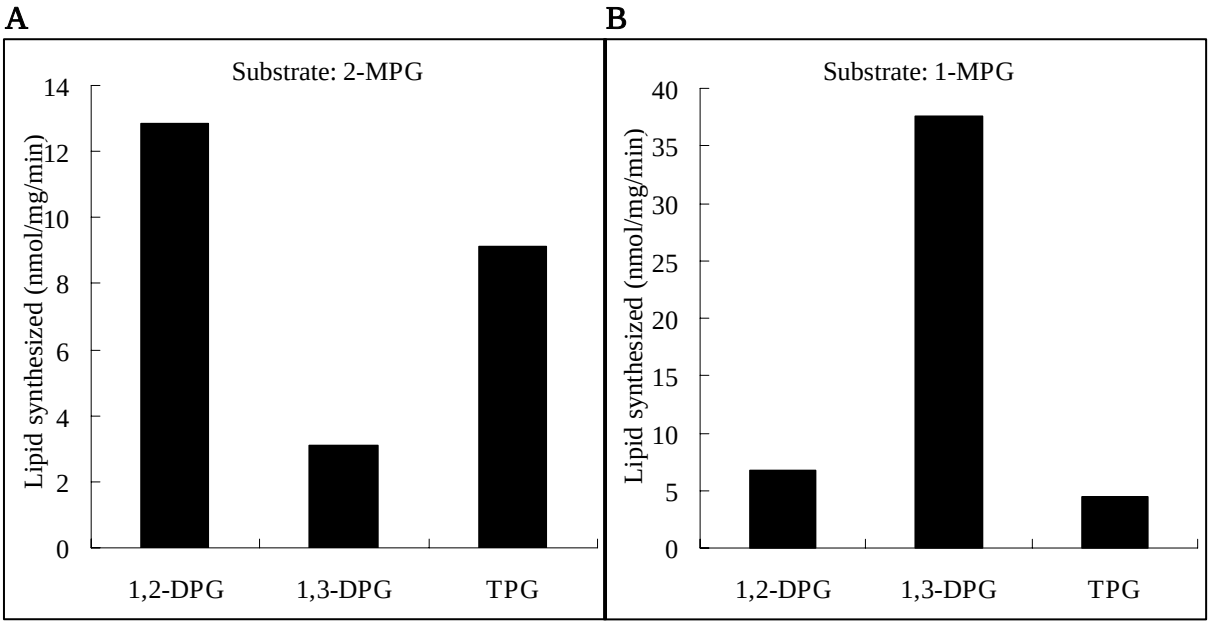


Figure 2-5. MPG アイソマーに対する MGAT アッセイ産物の定量的解析

2-MPG（A）、1-MPG（B）をアシル基アクセプターとしてヒト小腸ミクロソームの MGAT アッセイを実施し、各反応産物中の 1,2-DPG、1,3-DPG、TPG（1,2,3-TPG）の量を示した。活性値は平均±SEM(n=3)にて示す。

2-4　参考文献

(1) S. Cases, S.J. Smith, Y. Zheng, H.M. Myers, S.R. Lear, E. Sande, S. Novak, C. Collins, C.B. Welch, A.J. Lusis, S.K. Erickson, R.V. Farese Jr., Identification of a gene encoding an acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95 (1998) 13018-13023.

(2) S. Cases, S.J. Stone, P. Zhou, E. Yen, B. Tow, K.D. Lardizabal, T. Voelker, R.V. Farese Jr., Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members, J. Biol. Chem. 276 (2001) 38870-38876.

(3) D. Cheng, J. Iqbal, J. Devenny, C.H. Chu, L. Chen, J. Dong, R. Seethala, W.J. Keim, A.V. Azzara, R.M. Lawrenc, M.A. Pellymounter, M.M. Hussain, Acylation of acylglycerols by acyl Coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1): Functional importance of DGAT1 in the intestinal fat absorption, J. Biol. Chem. 283 (2008) 29802-29811.

(4) S.J. Smith, S. Cases, D.R. Jensen, H.C. Chen, E. Sande, B. Tow, D.A. Sanan, J. Raber, R.H. Eckel, R.V. Farese Jr., Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking DGAT, Nat. Gen. 25 (2000) 87-90.

(5) K.K. Buhman, S.J. Smith, S.J. Stone, J.J. Repa, J.S. Wong, F.F. Knapp Jr., B.J. Burri, R.L. Hamilton, N.A. Abmurad, R.V. Farese, Jr., DGAT1 is not essential for intestinal triacylglycerol absorption or chylomicron synthesis, J. Biol. Chem. 277 (2002) 25474-25479.

(6) S.C. Jamdar, W.F. Cao, Properties of monoacylglycerol acyltransferase in rat adipocytes, Arch. Biochem. Biophys. 296 (1992) 419-425.

(7) C.E. Yen, R.V. Farese Jr., MGAT2, a monoacylglycerol acyltransferase exressed in the small intestine, J. Biol. Chem. 278 (2003) 18532-18537.

(8) D. Cheng, T.C. Nelson, J. Chen, S.G. Walker, J. Wardwell-Swanson, R. Meegalla, R. Taub, J.T. Billheimer, M. Ramaker, J.N. Feder, Identification of acyl coenzyme A:monoacylglycerol acyltransferase 3, an intestinal specific enzyme implicated in dietary fat absorption, J. Biol. Chem. 278 (2003) 13611-13614.

第 3 章

新規モノアシルグリセロールアシル基転移酵素遺伝子の同定

3-1　目的

動物の小腸において、食餌中のTAGは膵臓リパーゼによって加水分解され、2-MAGと遊離脂肪酸になる。生成した2-MAGと遊離脂肪酸は直ちに小腸上皮細胞によって吸収され、MGATの働きによってDAGが再形成される。次に、DAGはDGATによって更にアシル化を受け、TAG分子が合成される。合成されたTAGはタンパク質や他の脂質とともにカイロミクロンへと組み込まれてリンパへと放出され、末梢組織において脂質源として利用される。一方、MGATは、脂肪組織や肝臓といったTAGが活発に加水分解され、脂肪酸の再利用が行われている組織においても活性があることがわかっている。MGATはそれらの組織において、TAGの加水分解で生じた脂肪酸のうち、*de novo*合成ができない多価不飽和脂肪酸を選択的にTAGに組み込むことによって、不飽和脂肪酸を保持する機能があると考えられている。しかしながら、モノアシルグリセロール経路がそれらの組織においてどの程度TAG合成に寄与しているのか、またMGAT分子種のうちどれがTAG合成に重要であるのか、といった点についてはよくわかっていない。本章においては、まず新規なMGAT遺伝子の同定を試み、リン脂質の合成に関与するLPGAT1 遺伝子（lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1）[1]がMGAT活性を有すること、またLPGAT1 遺伝子はマウス肝臓において高発現していることを見出した。

3-2　材料と方法

マウス LPGAT1 cDNA のクローニング

アシルトランスフェラーゼファミリーに保存されているアミノ酸配列モチーフを有するマウスcDNA配列をNCBIデータベースから見出して検索を実施したところ、この遺伝子は既知のLPGAT1 遺伝子と同一であることがわかった[1]。マウス脂肪組織cDNAライブラリー（Biochain社）から、PCRプライマー(forward；5'-CCACTGAGACAGGACCGAC-3'、reverse；5'-ATGTAGCAAGTCCAAGTCAA-3')を用いてLPGAT1 遺伝子の全長コーディング領域を増幅した。PCRは、Ex-Taqポリメラーゼ (タカラ社)を使用し、50 サイクルの増幅（94℃-30 秒、60℃-30 秒、72℃-60 秒）を実施し、1.2 kbのcDNA産物を取得した。このフラグメントをpT7-Blueベクター（Novagen社）にサブクローニングし、塩基配列を決定した。

ノーザンブロット

マウスLPGAT1 遺伝子の全長cDNA配列を鋳型にし、ランダムプライムキット（タカラ社）を用いて[α-^{32}P]dCTP標識LPGAT1 プローブを合成した。合成したLPGAT1 プローブを用いて、正常マウス組織poly-A RNAブロット（Biochain社）をハイブリダイズした。

ハイブリダイゼーションは、DIG Easy Hyb（ベーリンガー社）キットを用い、50℃、オーバーナイトで実施した。ハイブリダイズしたメンブレンを 0.1% SDS含有 2×SSCバッファーで室温にて 2 回洗浄、次に 0.1 % SDS含有 0.1×SSCバッファーで 50℃にて 1 回洗浄し、余分な放射標識プローブを除去した。メンブレンをイメージングプレートに暴露し、放射標識シグナルをBAS-2500 システム（富士フィルム社）にて解析した。

FLAG タグ LPGAT1 の CHO 細胞における強制発現

マウス LPGAT1 cDNA をプライマー（forward；5'-CCAGAATTCATGGCCGTGACCGTG-3'、reverse；5'-CCAAAGCTTCAATTCCTAAAATAGACAATGG-3'）で PCR 増幅し、増幅された 1.1 kb フラグメントを pCMV-Tag2B ベクター（Stratagene 社）にサブクローニングした。作製した FLAG タグ LPGAT1 プラスミドを、リポフェクトアミン PLUS キット（Invitrogen 社）を用いて CHO 細胞に導入した。安定発現細胞を単離するために、FLAG タグ LPGAT1 プラスミドを導入した CHO 細胞を 400 μg /mL GENETICIN（ギブコ社）含有培地で 7 日間培養し、限界希釈法にてクローンを分離した。取得した安定発現細胞、または一過性発現細胞（形質転換 24 時間後）を氷冷 PBS にて回収・遠心し、ペレットを 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)、250 mM スクロース、1 mM EGTA、1 mM DTT、プロテアーゼ阻害剤カクテル（シグマ社）からなるバッファーにて溶解した。Lysate を氷上にてソニケーションし、-80℃で凍結保存した。

MGAT 活性測定

MGAT活性の測定は定法に従って実施した。つまり、細胞Lysateあるいはミクロソーム、50 mM ADA(N-(2-acetamido) iminodiacetic acid)(pH 6.4)、2.5 mM $MgCl_2$、1.25 mg/mL ウシ血清アルブミン、1 mM EDTA、30 μM [^{14}C]パルミトイルCoA（アマシャム社）、0.4% CHAPSに前もって懸濁しておいた 1/10 容量の 1 mM MAG (sn-2-モノオレオイルグリセロールあるいは*rac*-1-モノオレオイルグリセロール、シグマ社)からなる 0.15 mLのバッファーで、25℃にて反応を行わせた。反応はパルミトイルCoAの添加で開始し、0.3 mL ヘプタン／イソプロパノール／H_2O (80:20:2、v/v)の添加で停止させた。反応終了後、反応液に 0.2 mLのヘプタンと 0.1 mL H_2Oを加えてボルテックスし、遠心後有機溶媒層を回収し、真空エバポレーターで乾燥させた。抽出した脂質をシリカゲルTLCプレート（150 Å、ワットマン社）にスポットし、ヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸（75:25:1、v/v）にて展開した。TLCプレートをイメージングプレートに感光させ、DAGの放射活性をBAS-2500 システム（富士フィルム社）にて測定した。MGAT活性はmgタンパク質あたりのDAGモル数から計算した。

3-3　結果

3-3-1. 新規 MGAT 遺伝子としてのマウス LPGAT1 の同定

既知のアシルトランスフェラーゼファミリーで保存されているモチーフとの相同性を指標に、マウスにおける新規MGAT遺伝子の候補遺伝子をNCBIデータベースから見出した。そこで、マウス脂肪組織cDNAライブラリーから、本候補遺伝子を含む 1.2 kbのcDNAフラグメントをPCR法によりクローニングした。塩基配列を解析した結果、この遺伝子はアシルトランスフェラーゼモチーフを有する 370 アミノ酸からなる 43 kDaのタンパク質をコードし、既知のLPGAT1 遺伝子と同一であった[1]。LPGAT1 は種々のリゾホスファチジルグリセロール（LPGs）を基質として認識し、ホスファチジルグリセロールを合成することが既に報告されているが（Figure 3-1）、本酵素がDAGやMAGといった中性脂質を認識するかどうかについては不明であった。

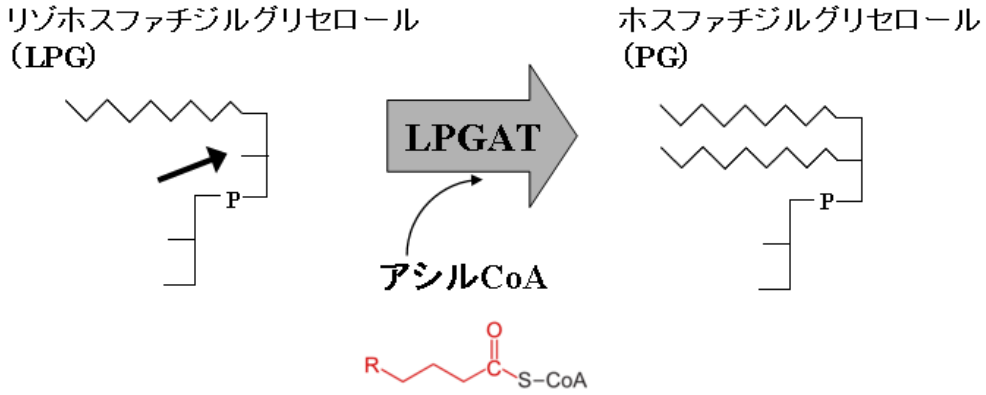


Figure 3-1.　LPGAT 反応
（→）の部位がアシル化を受ける。

3-3-2. マウス LPGAT1 遺伝子の発現分布

マウスLPGAT1 遺伝子発現の組織分布をノーザン解析によって分析した。ヒトでのデータと同様[1]、2 種類のRNAスプライシングアイソフォームが検出された。マウスLPGAT1 遺伝子は、心臓、腎臓、肝臓、皮膚、小腸、胸腺といった組織で発現が認められた。ヒトでの発現と異なり、マウスLPGAT1 遺伝子は肝臓において最も高発現していた（Figure 3-2）。

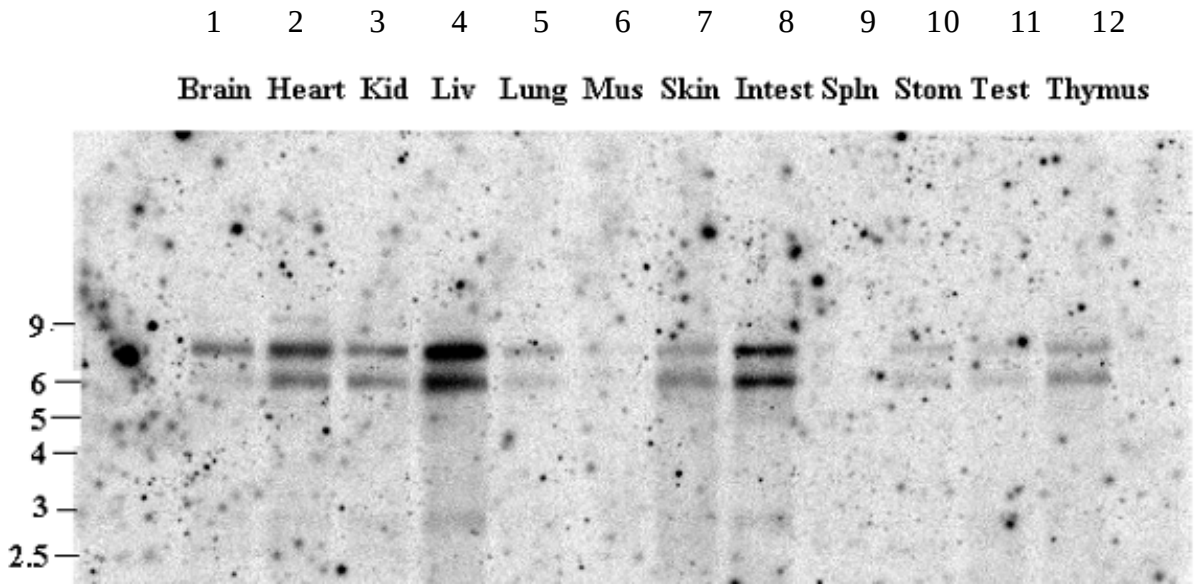


Figure 3-2. マウス LPGAT1 遺伝子発現の組織分布

マウス組織における LPGAT1 遺伝子の発現分布をノーザンブロットによって解析した。

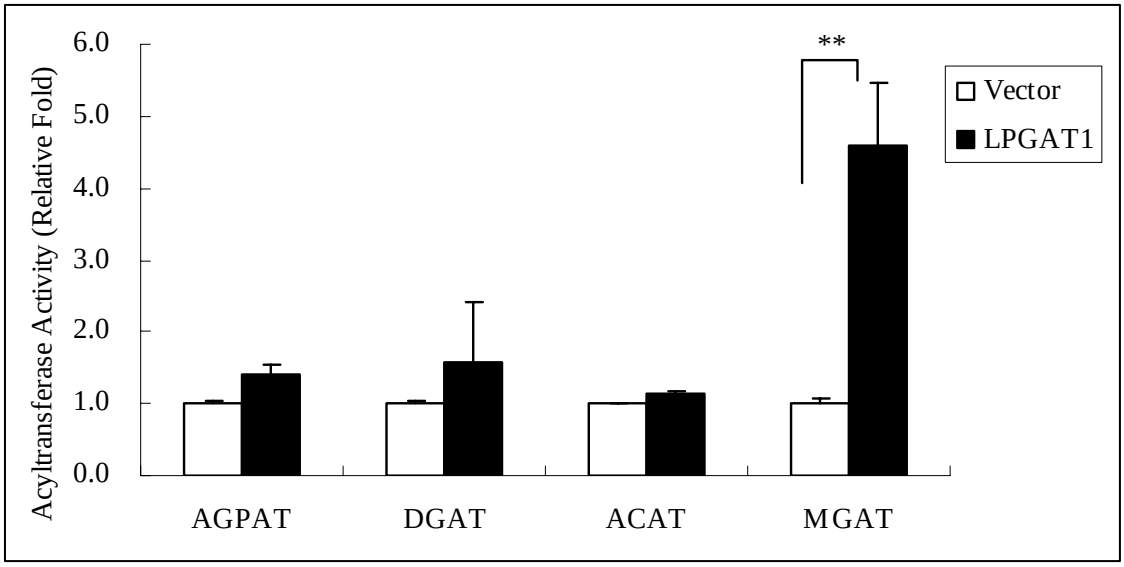
レーン 1、脳；レーン 2、心臓；レーン 3、腎臓；レーン 4、肝臓；レーン 5、肺；レーン 6、骨格筋；レーン 7、皮膚；レーン 8、小腸；レーン 9、脾臓；レーン 10、胃；レーン 11、精巣；レーン 12、胸腺

3-3-3. CHO 細胞で発現させた組換え LPGAT1 の MGAT 活性

LPGAT1 遺伝子によってコードされるタンパク質のアシル基転移酵素活性を検討するために、LPGAT1 遺伝子を CHO 細胞に一過的に発現させた細胞抽出液について、アシルグリセロールリン酸アシル基転移酵素（AGPAT）、DGAT、アシル CoA:コレステロールアシル基転移酵素（ACAT）、MGAT 活性、を測定した。LPGAT1 遺伝子を導入した細胞において、ベクターを導入した細胞に比べて AGPAT、DGAT、ACAT 活性の上昇は認められなかったものの、MGAT 活性は約 5 倍上昇した（Figure 3-3A）。

次に、LPGAT1 の MGAT 活性の基質選択性を調べるために、アシル基アクセプターとして 1-MAG あるいは 2-MAG を使用して MGAT アッセイを実施した。その結果、既知の MGAT と同様、LPGAT1 は 2-アイソマー（2-MAG）に対して選択性が高いと考えられた（Figure 3-3B）。

A



B

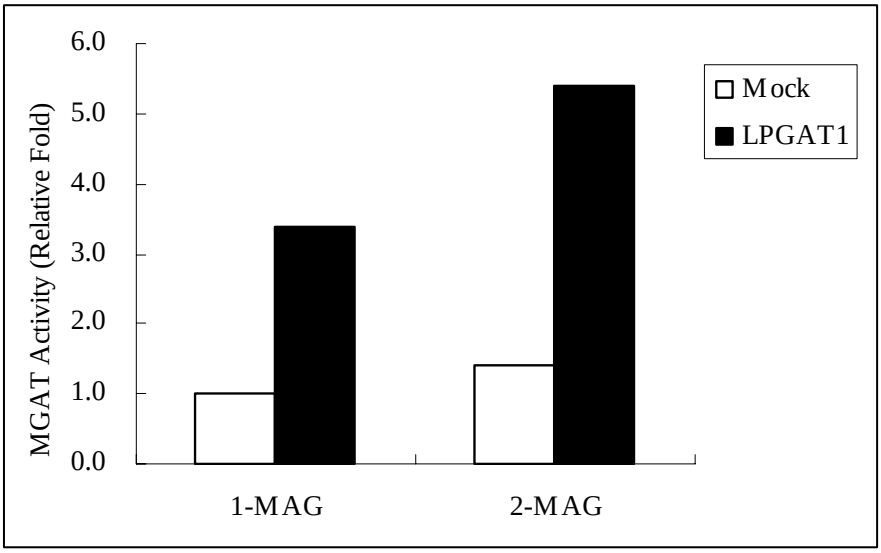


Figure 3-3. LPGAT1 の *in vitro* MGAT 活性および基質選択性

(A)CHO細胞に空ベクターあるいはマウスLPGAT1 遺伝子を導入し、細胞抽出液のアシルトランスフェラーゼ活性（AGPAT、DGAT、ACAT、MGAT活性）を調べた。反応は、アシル基ドナーとして[^{14}C]パルミトイルCoA、アシル基アクセプターとしてリゾホスファチジン酸、DAG、コレステロール、MAGを用い、それぞれホスファチジン酸、TAG、コレステロールエステル、DAGの生成により酵素活性を測定した。活性値は平均±SEM(n=3)にて示す。ベクター導入群との有意差はStudentのt-testにより検定した（**P<0.01）。

(B) LPGAT1 のアシル基アクセプター選択性（1-MAGあるいは 2-MAG）。30 μM [^{14}C]パルミトイルCoA、0.1 mM 1-MAGあるいは 2-MAGを用いてMGATアッセイを行った。

3-4　考察

小腸以外の組織におけるMGAT遺伝子を探索することを目的として、アシルトランスフェラーゼモチーフを有する候補遺伝子をマウスcDNAライブラリーから同定したところ、この遺伝子は既知のLPGAT1 遺伝子と同一のものであった[1] （Figure 3-4）。LPGAT1 はリゾホスファチジルグリセロール（LPG）を基質として、ミトコンドリア内膜の必須構成成分であるカルジオリピン（CL）の前駆体であるホスファチジルグリセロール（PG）を合成すると考えられているが（Figure 3-5）、本酵素がDAGやMAGといった中性脂質を認識するかどうかについては不明であった。そこで、このLPGAT1 遺伝子をCHO細胞に発現させたところ、ベクターコントロールに比べて 5 倍のMGAT活性を示し、一方で他のアシルトランスフェラーゼ活性AGPAT、DGAT、ACATについては差が認められなかった（Figure 3-3A）。更に、既知のMGAT、つまりMGAT1[2]、MGAT2[3,4]、MGAT3[5]と同様、LPGAT1 はアシル基アクセプターとして 1-MAGより 2-MAGを好むことがわかった（Figure 3-3B）。このことは、LPGAT1 が他のMGATと同様の酵素的性質を有することを示唆する。本結果、および第 4 章に示すノックダウン実験の結果から、LPGAT1 遺伝子は新規なMGAT遺伝子であると結論した。また、ノーザン解析の結果、マウスLPGAT1 遺伝子は心臓、腎臓、小腸を含む多くの組織に発現しており、肝臓で最も高発現していた（Figure 3-2）。肝臓は比較的高いMGAT活性を有する臓器であることがわかっているが、一方でこれまで同定されているMGAT遺伝子でマウス肝臓において高発現しているものはなかったことから、LPGAT1 は肝臓でのMGAT活性を担う酵素である可能性がある。

```
  1  MAITLEEAPW LGWLLVKALM RFAFMVVNNL VAIPSYICYV IILQPLRVLD
 51  SKRFWYIEGI MYKWLLGMVA SWGWYAGYTV MEWGEDIKAV SKDEAVMLVN
101  HQATGDVCTL MMCLQDKGLV VAQMMWLMDH IFKYTNFGIV SLVHGDFFIR
151  QGRSYRDQQL LLLKKHLENN YRSRDRKWIV LFPEGGFLRK RRETSQAFAK
201  KNNLPFLTNV TLPRSGATKI ILNALVAQQK NGSPAGGDAK ELDSKSKGLQ
                *
251  WIIDTTIAYP KAEPIDIQTW ILGYRKPTVT HVHYRIFPIK DVPLETDDLT
301  TWLYQRFVEK EDLLSHFYET GAFPPSKGHK EAVSREMTLS NLWIFLIQSF
351  AFLSGYMWYN IIQYFYHCLF
```

Figure 3-4.　ヒトLPGAT1 のアミノ酸配列（参考文献[1]より転載）

下線：アンカー配列、枠：アシルトランスフェラーゼモチーフ、＊：*N*-グリコシレーション部位

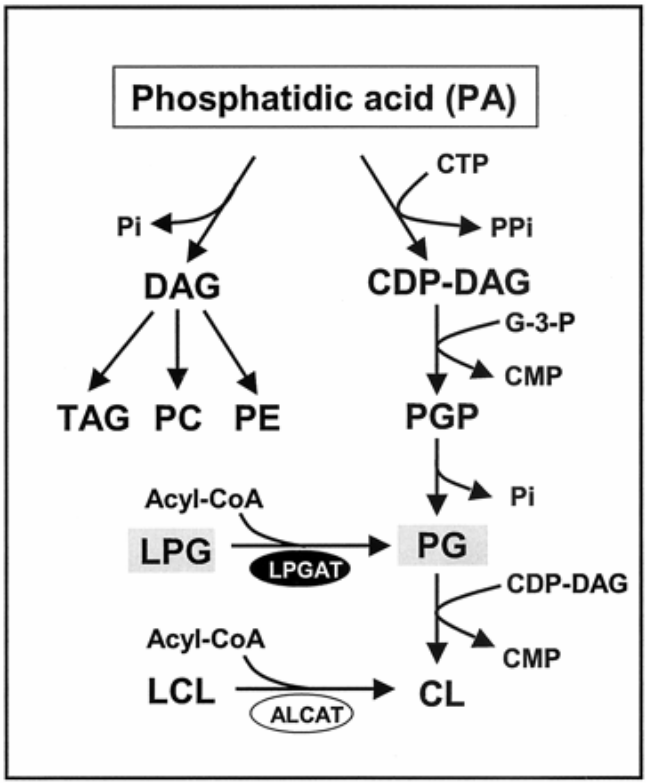


Figure 3-5.　ホスファチジン酸からのカルジオリピン合成経路（参考文献[1]より転載）

PA=ホスファチジン酸

PGP=ホスファチジルグリセロールリン酸

PG=ホスファチジルグリセロール

LPG＝リゾホスファチジルグリセロール

CL=カルジオリピン

LCL=リゾカルジオリピン

3-5　参考文献

(1) Y. Yang, J. Cao, and Y. Shi, Identification and characterization of a gene encoding human LPGAT1, an endoplasmic reticulum-associated lysophosphatidylglycerol acyltransferase, J. Biol. Chem. 279 (2004) 55866-55874.

(2) C.E. Yen, S.J. Stone, S. Cases, P. Zhou, R.V. Farese,Jr., Identification of a gene encoding MGAT1, a monoacylglycerol acyltransferase, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (2002) 8512-8517.

(3) C.E. Yen, R.V. Farese, Jr., MGAT2, a monoacylglycerol acyltransferase exressed in the small intestine, J. Biol. Chem. 278 (2003) 18532-18537.

(4) J. Cao, J. Lockwood, P. Burn, Y. Shi, Cloning and functional characterization of a mouse intestinal acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase, MGAT2, J. Biol. Chem. 278 (2003) 13860-13866.

(5) D. Cheng, T.C. Nelson, J. Chen, S.G. Walker, J. Wardwell-Swanson, R. Meegalla, R. Taub, J.T. Billheimer, M. Ramaker, J.N. Feder, Identification of acyl coenzyme A:monoacylglycerol acyltransferase 3, an intestinal specific enzyme implicated in dietary fat absorption, J. Biol. Chem. 278 (2003) 13611-13614.

第 4 章

リゾホスファチジルグリセロールアシル基転移酵素 LPGAT1 の遺伝子ノックダウンによる マウス肝臓トリアシルグリセロール合成の抑制

4-1　目的

第 3 章において、LPGAT1 は新規な MGAT 遺伝子であり、マウス肝臓で高発現していることを見出した。そこで第 4 章では、肝臓 MGAT である LPGAT1 遺伝子の脂質代謝における役割を検討する目的で、脂質異常を呈する肥満／糖尿病モデルである *db/db* マウスを用いて、肝臓 LPGAT1 遺伝子の選択的ノックダウン実験を行った。LPGAT1 遺伝子に対する shRNA 発現アデノウイルスを構築して *db/db* マウスに感染させ、肝臓 MGAT 活性、LPGAT1 遺伝子発現レベル、血中／肝臓中 TAG およびコレステロールのレベルを調べた。

4-2　材料と方法

動物

全ての動物実験は、大日本住友製薬の動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。肥満／糖尿病モデルである *db/db* マウス（7 週齢、オス）を日本クレアから購入した。マウスは通常の飼育条件（22±3℃、明期：8:00-20:00）で飼育し、餌は普通食、自由摂食・自由飲水とした。

マウス肝臓からのミクロソーム調製

マウスから肝臓を摘出し、既報の方法[1]に従ってミクロソーム画分を調製した。調製したサンプルは-80℃にて保存した。

MGAT／DGAT 活性測定

第 2 章記載の方法と同様に行った。

定量的 RT-PCR

回収した CHO 細胞あるいは切除した肝臓より RNA 精製キット（キアゲン社）を用いて、キット添付のプロトコールに従って RNA を調製した。回収した RNA を、酵素キット（Power SYBR Green PCR Master Mix）および ABI Prism 7900-HT Sequence Detector（PE Applied Biosciences）を用いた定量的 RT-PCR に供した。LPGAT1 遺伝子の解析用の PCR プライマーおよびプローブは、Primer Express あるいは Oligo Software を用いて設計した。

LPGAT1 shRNA 発現アデノウイルスの構築

マウス LPGAT1 遺伝子のノックダウンのための shRNA 配列（5'-GTTTAGAATGTAAGTCAAACGTGTGCTGTCCGTTTGATTTGCATTCTAAGCCTTTTT-3'）を、pcPURU6i カ

セット（タカラ社）のクローニング部位に挿入した。作製したプラスミドを *Eco*RI、*Bam*HI で消化し、得られたフラグメントをコスミドベクターpAxcwit2（ニッポンジーン社）の *Swa*I 部位に挿入した。LPGAT1 shRNA アデノウイルス（AxmU6shRmLPGAT1）およびマウス Lamin shRNA アデノウイルス（AxmU6shRmlamin）をベクター添付のプロトコールに従って構築した。*In vivo* 実験の空ベクターコントロールとして、U6 プロモーターのみを含むアデノウイルスの構築も行った。得られたアデノウイルスを HEK-293 細胞に感染させた後、ウイルスを塩化セシウムによる 2 回の遠心で精製した。ウイルスの粒子濃度は 260 nm の吸収で測定した。

ウェスタンブロット

FLAG タグ-マウス LPGAT1 の安定発現 CHO 細胞に対し、マウス LPGAT shRNA アデノウイルス、あるいはマウス Lamin shRNA アデノウイルスを感染させた。感染細胞から膜画分を調製し、抗 FLAG M2 抗体によるウェスタンブロットにより FLAG タグタンパク質の発現を検出した。

動物実験

*db/db*マウスは食欲抑制ホルモンであるレプチンの受容体に変異を持ち、過食によって肥満／糖尿病、および脂質代謝異常を示すモデルである。*db/db*マウスおよびコントロール *db/m*マウス（7 週齢）を日本クレア社から購入した。7 日間の馴化期間の後、*db/db*マウスの体重および血中TAGレベルを測定し、群間の平均が同じになるように個体を群わけした。LPGAT1 shRNAあるいはコントロールアデノウイルスを希釈し、尾静脈からマウスに注射した（6×10^{10} 粒子／個体）。注射後、体重を経時的にモニターし、摂食量を 1 週間に 2 回測定した。5 日あるいは 16 日後、麻酔下で腹部大静脈から全採血し、摘出組織の重量を測定して直ちに-80℃で凍結した。血清TAG、コレステロール、遊離脂肪酸（FFA）、HDLコレステロール濃度は、和光のキットを用いて測定した。肝臓脂質の測定については、約 50 mg の肝臓組織を 0.5 mLヘキサン／イソプロパノール（3:2、v/v）中でホモジナイズ後、上清 0.1 mLを 40℃で 1 時間以上乾燥させた。抽出した脂質をエタノールに溶解し、脂質（TAG、コレステロール）量を上記と同様に測定した。

統計解析

In vitro 実験については、値は 2 回以上の独立した実験の平均値、あるいは平均値±SEM で表した。*In vivo* 実験については、値は 1 測定項目あたり 5 検体以上についての平均値±SEM で表した。群間の有意差は Student の t-test で検定し、P 値が 0.05 未満について有意と判定した。

4-3　結果

4-3-1. *db/db* マウス肝臓における MGAT 活性と LPGAT1 発現

肝臓の MGAT 活性を *db/db* マウスとコントロール *db/m* マウスで比較したところ、*db/db* マウス肝臓の MGAT 活性は *db/m* マウスの 1.5 倍であった（Figure 4-1A）。同様に、*db/db* マウス肝臓における LPGAT1 の発現は *db/m* マウスの 2 倍であり、MGAT 活性とパラレルであった（Figure 4-1B）。

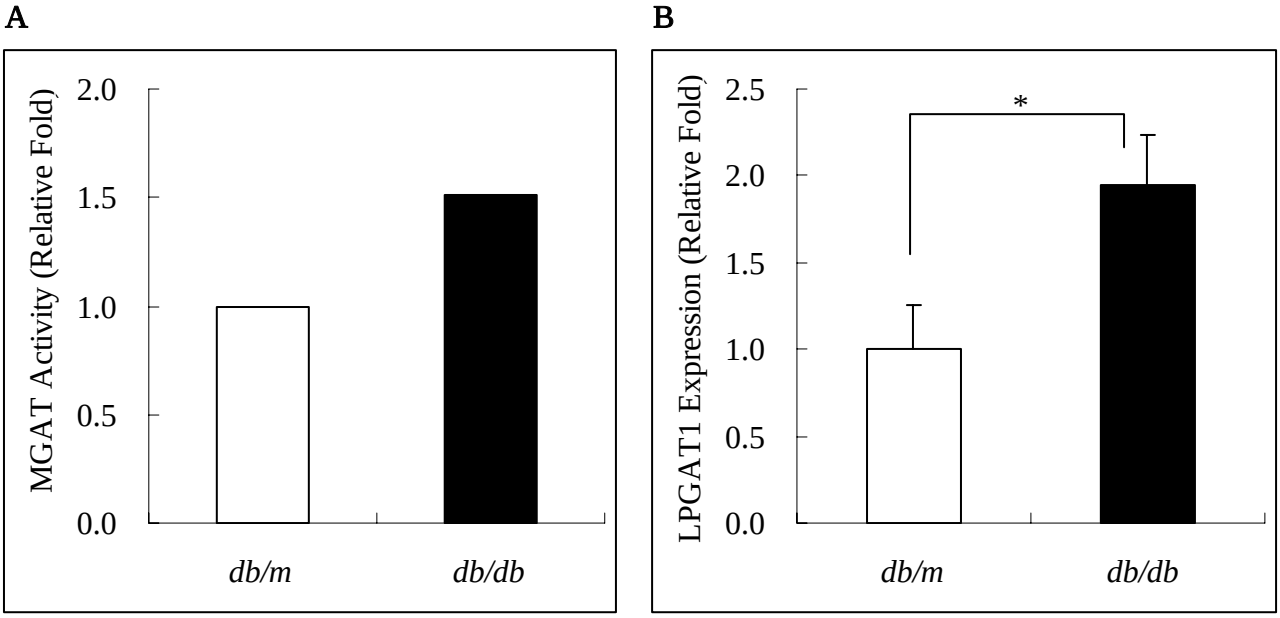


Figure 4-1.　*db/m* および *db/db* マウス肝臓における MGAT 活性と LPGAT1 遺伝子発現

(A) *db/m* あるいは *db/db* マウス肝臓よりミクロソームを調製し、30 μM [^{14}C]パルミトイルCoAおよび 0.1 mM 2-MAGを用いてMGATアッセイを行った。

(B) *db/m* あるいは *db/db* マウス肝臓よりトータル RNA を調製し、定量的 RT-PCR により LPGAT1 遺伝子の発現を測定した。値は平均値±SEM（n=5）で示し、2 群間の有意差は Student の t-test により検定した（*P<0.05）。

4-3-2. LPGAT1 shRNA アデノウイルスの構築

db/db マウスの脂質代謝における LPGAT1 遺伝子の役割を検討する目的で、アデノウイルスベクターを用いた LPGAT1 遺伝子のノックダウンを試みた。LPGAT1 遺伝子に対する shRNA を発現するアデノウイルスを構築し、マウス LPGAT1 安定発現 CHO 細胞に感染させた。ウェスタン解析の結果、マウス Lamin shRNA（ネガティブコントロール）感染では LPGAT1 タンパク質の量に影響がなかったのに対し、LPGAT1 shRNA アデノウイルス感染ではウイルス量に比例して LPGAT1 タンパク質の量が減少した（Figure 4-2）。この

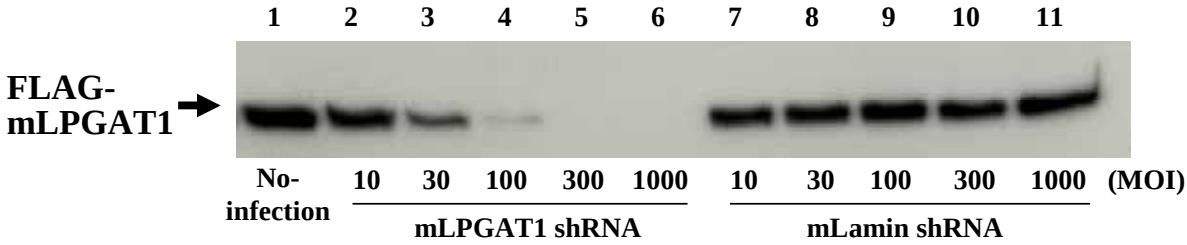


Figure 4-2. LPGAT1 shRNA アデノウイルスによる LPGAT1 遺伝子発現の抑制

FLAG タグ-マウス LPGAT1 遺伝子を安定発現する CHO 細胞に対し、マウス LPGAT1 shRNA アデノウイルスあるいはマウス Lamin shRNA アデノウイルスを種々の MOI で感染させた。細胞から膜画分を調製し、抗 FLAG M2 抗体によるウェスタンブロットにより FLAG タグ-マウス LPGAT1 タンパク質を定量化した。

ことから、LPGAT1 shRNA アデノウイルスは特異的かつ顕著に LPGAT1 遺伝子の発現を抑制することが確かめられた。

4-3-3. *db/db* マウス肝臓 LPGAT1 遺伝子の *in vivo* ノックダウン

LPGAT1 遺伝子の*in vivo*ノックダウン実験にあたり、LPGAT1 shRNAアデノウイルスの感染粒子数を決定した。空ウイルスの尾静脈注射を行ったところ、1 匹あたり 6×10^{10} 粒子のウイルスまでは影響が認められなかったが、それ以上のウイルスを注射すると顕著な体重低下および摂食量の低下が認められた（データは省略）。よって、以下の*in vivo*ノックダウン実験においては、1 匹あたり 6×10^{10} 粒子のLPGAT1 shRNAアデノウイルスを使用することと決定した。また、アデノウイルスの感染部位を検討したところ、ほぼ肝臓特異的であり（データは省略）、既報の結果と一致した[2]。

8 週齢のオス *db/db* マウスに LPGAT1 shRNA アデノウイルスを尾静脈注射した。ネガティブコントロールとして、コントロール群には空ウイルスを注射した。両群のマウスとも、感染後 5 日および 16 日に解析に供した。

LPGAT1 遺伝子の mRNA レベルは、LPGAT1 shRNA アデノウイルス感染 5 日後でコントロール比 17%、感染 16 日後でコントロール比 8%に低下した。一方、感染 5 日後の DGAT1 遺伝子の mRNA レベルは変化せず、感染 5 日後および 16 日後の DGAT2 遺伝子の mRNA レベルも変化が認められなかった（Figure 4-3A,B）。この結果より、LPGAT1 shRNA アデノウイルスは *db/db* マウス肝臓の LPGAT1 遺伝子発現を 16 日間以上、特異的に抑制したと考えられた。

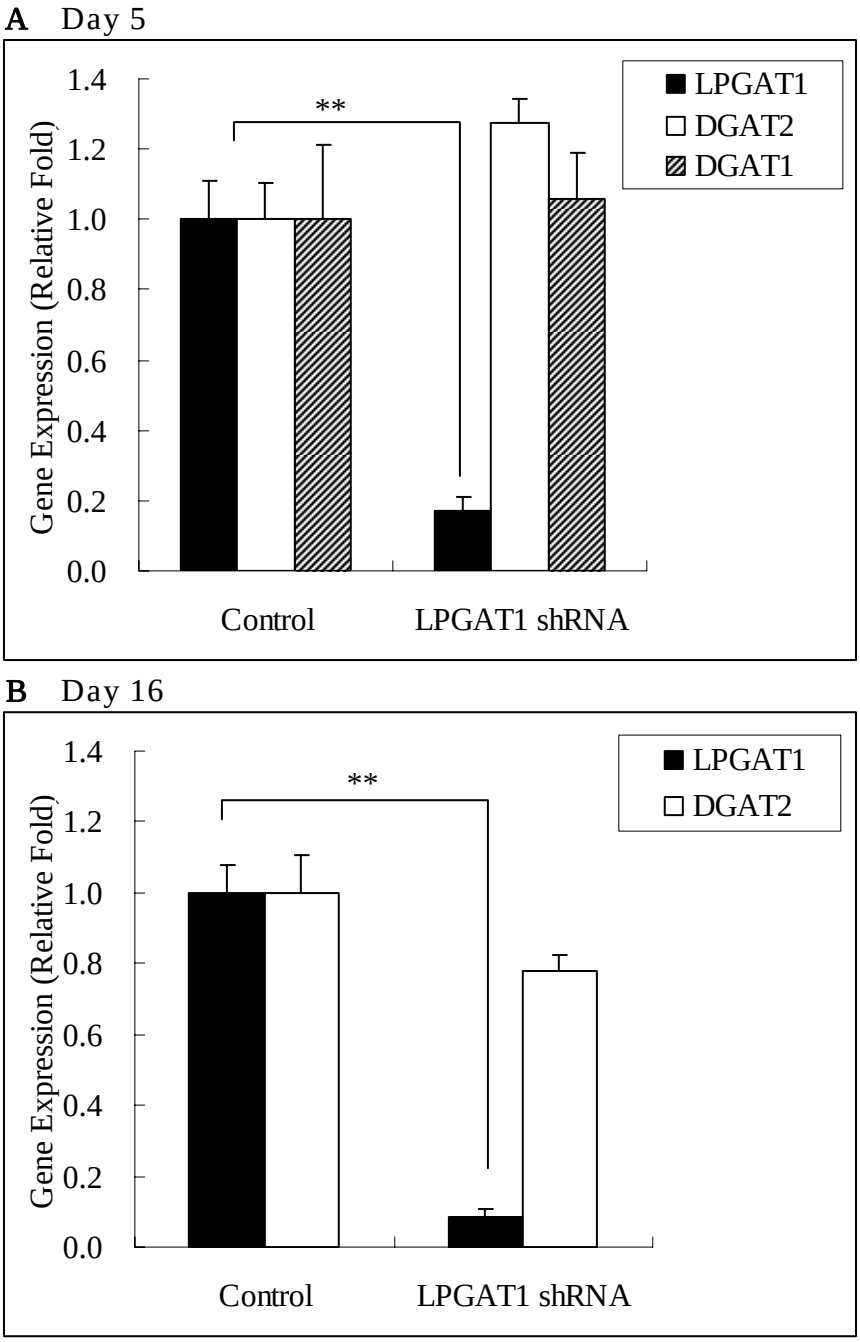


Figure 4-3. *db/db* マウスへの LPGAT1 shRNA アデノウイルス感染による肝臓 LPGAT1 のノックダウン効果

db/db マウスにコントロール（Control）あるいは LPGAT1 shRNA アデノウイルスを静脈内注射した。ウイルス感染後 5 日後（A）、16 日後（B）にマウスを解剖し、肝臓における各遺伝子の発現を定量的 RT-PCR にて解析した。値は平均値±SEM（n≧4）で示し、群間の有意差は Student の t-test により検定した（**P<0.01）。

酵素アッセイの結果、LPGAT1 shRNA アデノウイルスによる LPGAT1 mRNA の抑制によって、肝臓 MGAT 活性および肝臓 LPGAT 活性がいずれも有意に低下していることが確かめられた（Figure 4-4A,B）。一方で、肝臓 MGAT および LPGAT 活性の低下の程度が LPGAT1 mRNA レベルの低下から予想されるより小さいものであったことは、LPGAT1 以外の酵素が肝臓 MGAT および LPGAT 活性に寄与している可能性を示唆する。

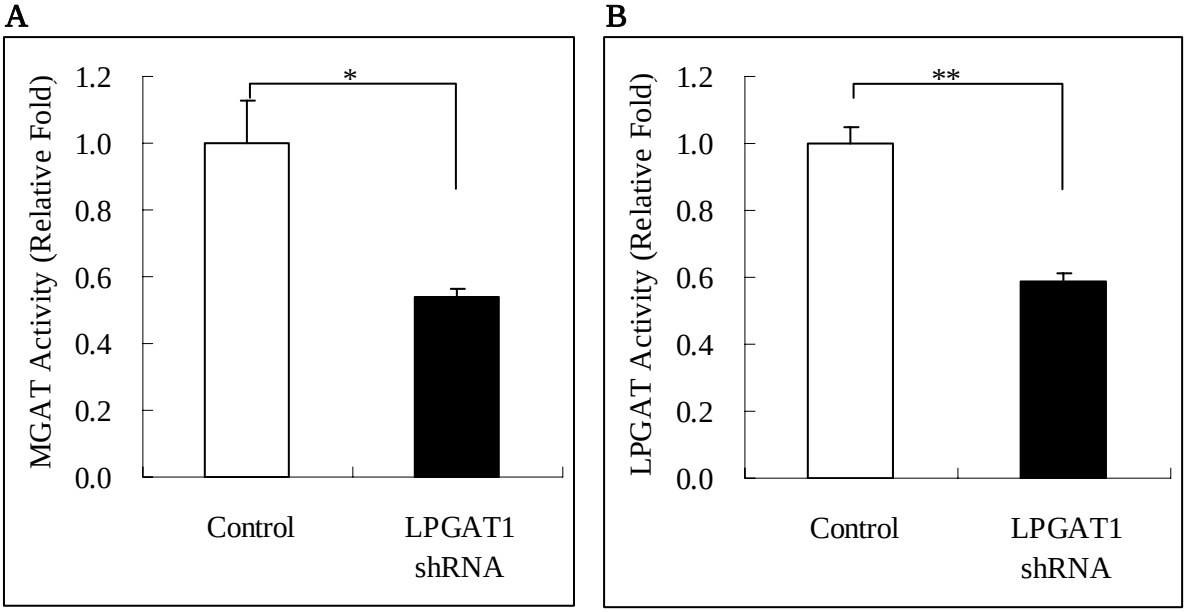


Figure 4-4. LPGAT1 shRNA アデノウイルス感染 *db/db* マウスにおける肝臓 MGAT 活性および LPGAT 活性

コントロール（Control）および LPGAT1 shRNA アデノウイルスを感染させた *db/db* マウスの肝臓の MGAT 活性（A）、LPGAT 活性（B）を示す。値は平均値±SEM（n=5）で示し、群間の有意差は Student の t-test により検定した（*P<0.05、**P<0.01）。

ウイルス感染後の摂食量および体重を経時的に検討した。ウイルス感染 2 日後、コントロールおよび LPGAT1 shRNA アデノウイルス感染マウスいずれについても僅かな（15%）の摂食量低下が認められたが、2 日目以降の摂食量は感染前のレベルまで回復した。実験期間中を通じて、LPGAT1 shRNA アデノウイルス感染マウスの摂食量はコントロールマウスと比べて差が認められなかった（Figure 4-5A）。体重については、LPGAT1 shRNA アデノウイルス感染マウスの体重はコントロールマウスに比べて僅かではあるが有意に減少していた（Figure 4-5B、Table 4-1）。肝臓および副睾丸周囲脂肪組織の重量は、感染 16 日後において 2 群で差が認められなかった（Table 4-1）。

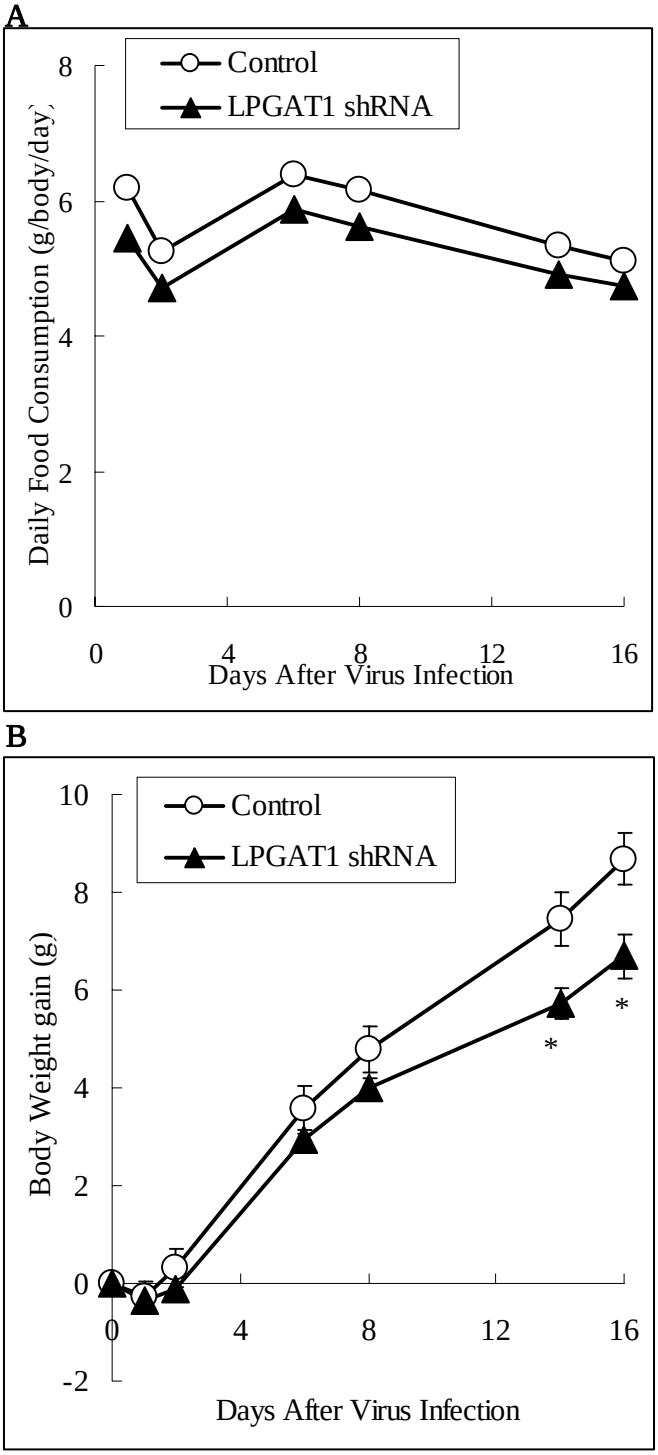


Figure 4-5. LPGAT1 shRNA アデノウイルス感染 *db/db* マウスの摂食量および体重

コントロール（Control）あるいは LPGAT1 shRNA アデノウイルスに感染させた *db/db* マウスの 16 日間の摂食量（A）、体重（B）を示す。値は平均値±SEM（n=5）で示し、群間の有意差は Student の t-test により検定した（*P<0.05）。

Table 4-1.　LPGAT1 shRNA アデノウイルス感染 *db/db* マウスの体重および組織重量

Parameters	Control	LPGAT1 shRNA	P value
BW, day 0 (g)	37.3 ± 0.5	36.2 ± 0.5	0.158
BW, day 16 (g)	45.5 ± 0.6	43.2 ± 0.4 **	0.005
BW gain (g)	8.2 ± 0.4	7.0 ± 0.3 *	0.026
Liver weight (g)	3.94 ± 0.23	3.83 ± 0.19	0.716
Epididymal fat weight (g)	1.87 ± 0.10	1.99 ± 0.08	0.384

値は平均値±SEM（n=5）で示す。

次に、LPGAT1 shRNA アデノウイルス感染マウスにおける脂質プロファイルを検討した。興味深いことに、LPGAT1 shRNA アデノウイルス感染によって、血清 TAG および総コレステロールレベルの顕著かつ有意な低下が認められ、遊離脂肪酸も有意な低下が認められた（Figure 4-6A,B,C）。一方、血清 HDL コレステロールレベルには有意な作用は認められなかった（Figure 4-6D）。

更に、LPGAT1 shRNA アデノウイルス感染によって肝臓中の脂質含量が影響を受けるかどうか検討する目的で、肝臓 TAG およびコレステロールレベルを調べた。その結果、血清中の脂質プロファイルとは異なり、肝臓中の総コレステロールレベルは LPGAT1 shRNA アデノウイルス感染群で有意に上昇しており、*db/db* マウス肝臓にコレステロールが蓄積していることが示唆された（Figure 4-7B）。また、LPGAT1 shRNA アデノウイルス感染群で肝臓 TAG レベルも上昇傾向であったが、コントロール群との差は有意ではなかった（Figure 4-7A）。

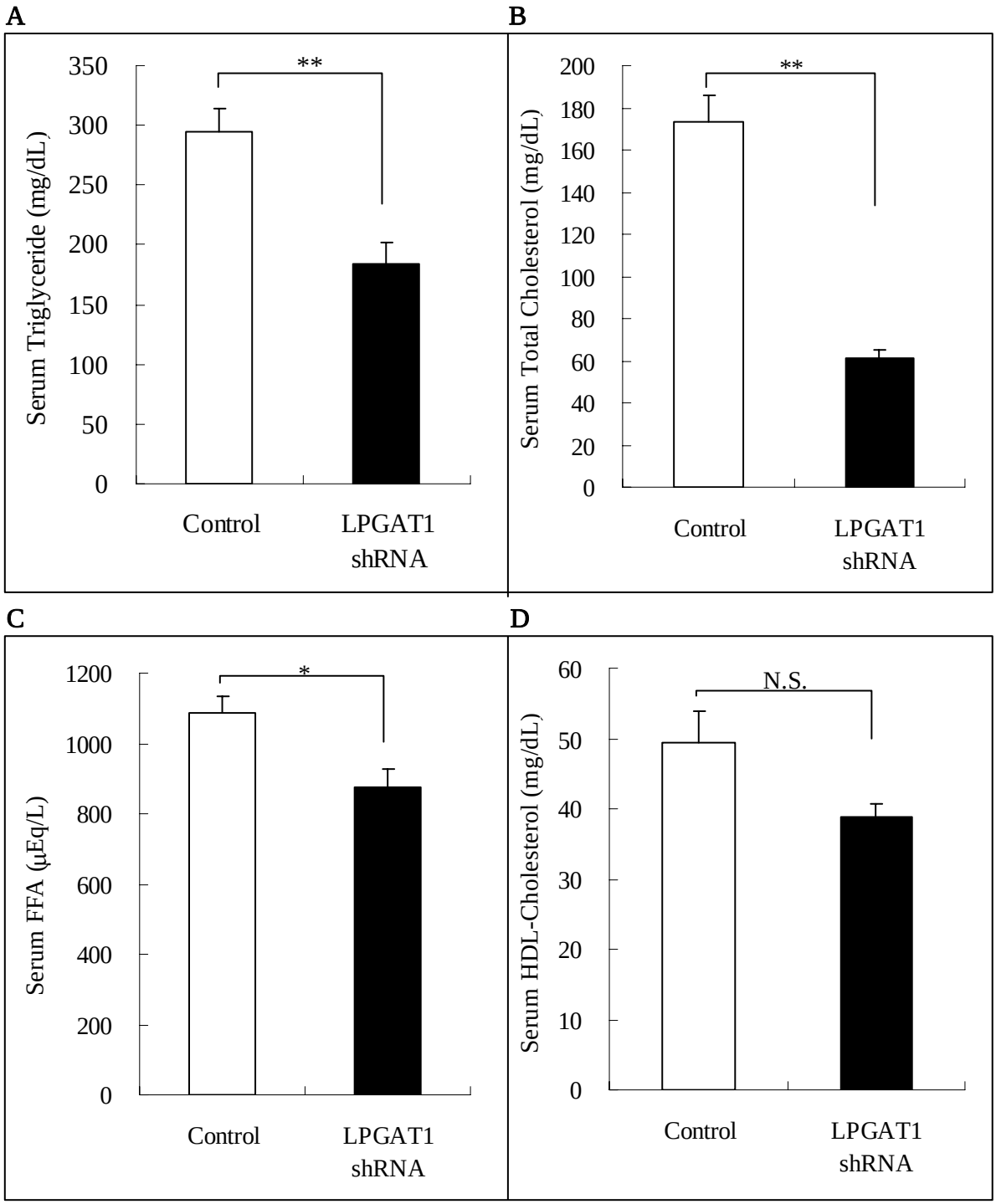


Figure 4-6. LPGAT1 shRNA アデノウイルス感染 *db/db* マウスの血清脂質濃度

コントロール（Control）あるいは LPGAT1 shRNA アデノウイルスに感染させた *db/db* マウスにおける、血清 TAG（A）、総コレステロール（B）、遊離脂肪酸（C）、HDL コレステロール（D）濃度を示す。値は平均値±SEM（n=5）で示し、群間の有意差は Student の t-test により検定した（*P<0.05、**P<0.01）。

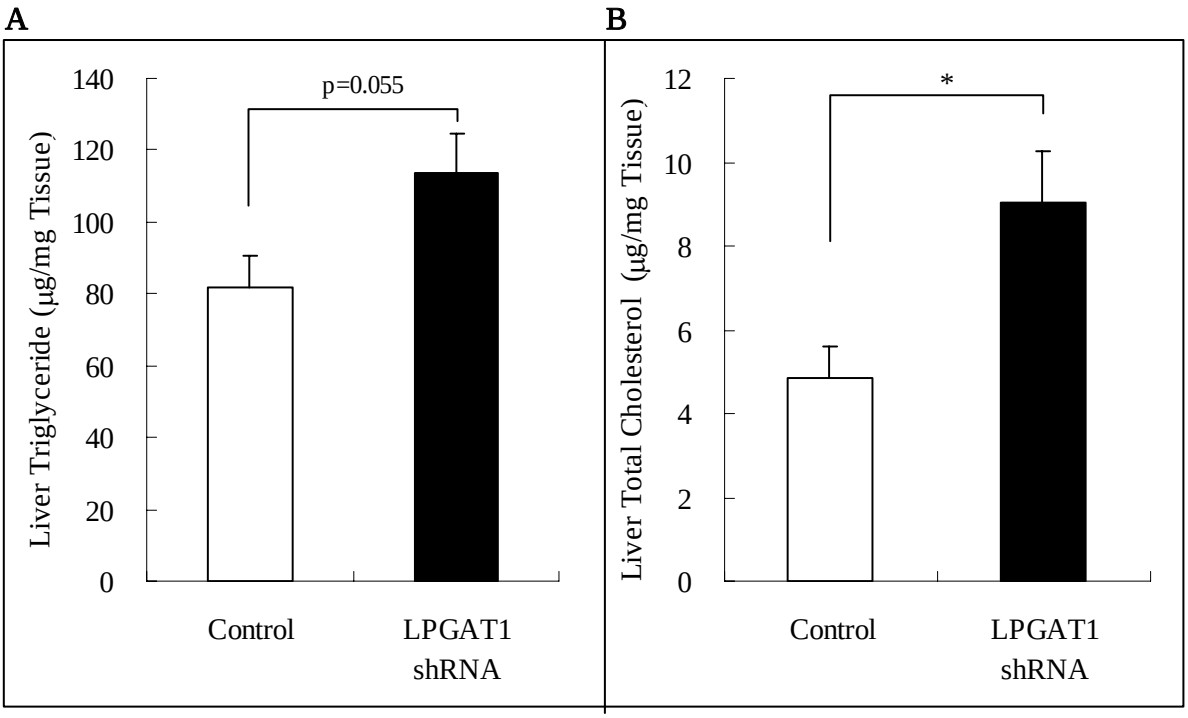


Figure 4-7. LPGAT1 shRNA アデノウイルス感染 *db/db* マウスの肝臓脂質含量

コントロール（Control）あるいは LPGAT1 shRNA アデノウイルスに感染させた *db/db* マウスにおける、肝臓中の TAG（A）、総コレステロール（B）含量を示す。値は平均値±SEM（n=5）で示し、群間の有意差は Student の t-test により検定した（*P<0.05）。

4-4　考察

本研究において、*db/db*マウス肝臓におけるLPGAT1 遺伝子の発現はコントロールマウスに比べて 2 倍高く、この発現亢進は*db/db*マウス肝臓のMGAT活性と一致していることが見出された（Figure 4-1）。他のMGAT遺伝子については、MGAT1 遺伝子はマウス肝臓において発現していることが報告されているが、その発現レベルはきわめて低く[3]、本研究においても*db/db*マウス肝臓のMGAT1 遺伝子発現を検討したが、コントロールと比べて上昇が認められなかった（データは省略）。MGAT2 遺伝子については、マウス小腸では高発現が認められているものの、肝臓では発現していない[4,5]。MGAT3 遺伝子はヒト小腸のみで発現することが報告されており、マウス肝臓では発現していない[6]。つまり、*db/db*マウス肝臓でのMGAT活性の上昇は、肝臓におけるLPGAT1 遺伝子の発現上昇によるものである可能性が高い。更に、LPGAT1 shRNAアデノウイルス感染によって、*db/db*マウス肝臓のLPGAT1 遺伝子発現が顕著に抑制されたが、この時肝臓のMGAT活性の有意な低下が認められた（Figure 4-4A）。

以上の結果、および第 3 章で示したようにLPGAT1 が*in vitro*でMGAT活性を有していることは、マウス肝臓においてLPGAT1 がMGATとして機能していることを示すものである。一方、LPGAT1 タンパク質は*in vitro*でLPGAT活性を持っていることが報告されており[7]、本研究においてもLPGAT1 ノックダウンマウスの肝臓でLPGAT活性の低下が確認できた（Figure 4-4B）。この解釈としては、LPGAT1 タンパク質が生理的条件に応じてMGATあるいはLPGATとして機能する可能性が考えられる。つまり、組織中のMAGの濃度が高い条件ではLPGAT1 はMGATとして機能し、リゾホスファチジルグリセロール濃度が高い条件ではLPGATとして機能する。この可能性については今後の解析を待つ必要があるが、一方でLPGAT1 のMGATとしての酵素的性質、つまりアシルCoAに対する選択性や酵素反応速度解析などについても検討を行う必要がある。

肝臓は生体内における TAG 代謝に重要な役割を果たしていることから、肝臓の MGAT 活性も全身の TAG 代謝に影響を及ぼしている可能性があるが、これまで肝臓の MGAT 活性を担う酵素が同定されていなかったため、その寄与はよくわかっていなかった。そこで、我々は肝臓 MGAT 活性が主として LPGAT1 によるということを初めて示したので、RNAi 技術を用いて肝臓 MGAT の脂質代謝への寄与を検討した。*db/db* マウスは肥満／糖尿病モデルでありながら同時に脂質代謝異常（高脂血症）を呈すること、肝臓で LPGAT1 遺伝子発現の上昇および MGAT 活性の亢進が認められることから、肝臓 MGAT（LPGAT1）ノックダウンの影響を検討するのに適したモデルであると考えた。そこでまず、LPGAT1 shRNA アデノウイルスを構築し、このウイルスが *in vitro* で LPGAT1 発現を抑制すること（Figure 4-2）、*in vivo* で肝臓 LPGAT1 遺伝子発現および MGAT/LPGAT 活性を抑制すること（Figure 4-3、Figure 4-4）を確認した。LPGAT1 shRNA アデノウイルスは *db/db* マウスの摂食量に影響を与えなかったが、体重は僅かに低下させた（Figure 4-5）。肝臓およ

び副睾丸周囲脂肪組織の重量は LPGAT1 shRNA アデノウイルス感染によって変化がなかったことから（Table 4-1）、体重低下は皮下脂肪などの組織の寄与によるものと考えられる。

興味深いことに、LPGAT1 shRNAアデノウイルス感染によって*db/db*マウスの血清TAGおよびコレステロールレベルが顕著に低下し、遊離脂肪酸についても有意な低下が認められた（Figure 4-6A,B,C）。LPGAT活性はTAG合成およびコレステロール合成に関与しないことから、これらの脂質プロファイルの変化は肝臓MGAT活性の低下に起因するものと考えられた。具体的には、LPGAT1 shRNAアデノウイルスによって肝臓MGAT活性が低下すると、肝臓TAG合成が阻害される。肝臓TAGはコレステロールとともにVLDLに組み込まれて血中に分泌されるため、TAG合成の阻害はVLDLの形成低下となって反映される。すると血中に分泌されるVLDLが少なくなり、結果として血清中のTAGとコレステロールのレベルが低下すると考えられる。この仮定が正しいとすると、VLDL分泌低下の結果として、TAG合成経路とは独立して合成される肝臓コレステロールが肝臓中に蓄積することになるが、今回の実験において肝臓コレステロール含量の有意な増加が認められたことから（Figure 4-7B）、この仮説を支持すると考えた。一方、肝臓TAGについては僅かな増加が認められたものの、コレステロールに比べて程度が小さく、有意な増加ではなかった（Figure 4-7A）。これは、モノアシルグリセロール経路とグリセロールリン酸経路の２つの経路のうち、前者で合成されるTAGは分泌に、後者で合成されるTAGはTAG蓄積に主として使われる、という可能性を示唆する。この場合、LPGAT1 shRNAアデノウイルスはモノアシルグリセロール経路由来のTAG分泌を主に阻害することによってVLDL分泌を阻害し、一方で肝臓TAG蓄積には影響しないことになる。ラット肝臓を用いた解析で、DGATには 2 つのタイプがあり、1 つは主にTAG蓄積に、もう 1 つはTAG分泌に主に関与する、という報告[8]はこれを支持するものであるが、MGATにもこのような使い分けが存在するかどうかは今後の検討課題である。

DGAT1 ノックアウトマウスでは血清TAGレベルは正常であり[9]、またアンチセンスオリゴヌクレオチドによってDGAT2 をノックダウンした肥満マウスでは、血清TAGと肝臓TAG量がいずれも有意に低下することが報告されている[10]。しかしながら、いずれのマウスにおいても、血清および肝臓のコレステロールレベルは変化が認められていない。これに対して、本報告における肝臓LPGAT1 のノックダウンでは、血清TAGと血清コレステロール両方について大きな低下が認められることから、肝臓LPGAT1（MGAT）のユニークな役割が示唆される。

結論として、本研究では LPGAT1 がマウス肝臓で高発現する唯一の MGAT であることを見出した。さらに *db/db* マウスにおける肝臓 LPGAT1 の特異的ノックダウン実験の結果、血清 TAG と血清コレステロールが顕著に低下することを明らかにした。この結果は、LPGAT1 は生体内で MGAT として機能すること、そしてマウス肝臓からの TAG 分泌に関与することを示すものである。

4-5　参考文献

(1) S.C. Jamdar, W.F. Cao, Properties of monoacylglycerol acyltransferase in rat adipocytes, Arch. Biochem. Biophys. 296 (1992) 419-425.

(2) J.F. Rippmann, C. Schoelch, T. Nolte, H. Pavliska, A. Marle, H. Es, . Prestle, Improved lipid profile through liver-specific knockdown of liver X receptor α in KKAy diabetic mouse, J. Lipid Res. 50 (2009) 22-31.

(3) C.E. Yen, S.J. Stone, S. Cases, P. Zhou, R.V. Farese,Jr., Identification of a gene encoding MGAT1, a monoacylglycerol acyltransferase, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (2002) 8512-8517.

(4) C.E. Yen, R.V. Farese, Jr., MGAT2, a monoacylglycerol acyltransferase exressed in the small intestine, J. Biol. Chem. 278 (2003) 18532-18537.

(5) J. Cao, J. Lockwood, P. Burn, Y. Shi, Cloning and functional characterization of a mouse intestinal acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase, MGAT2, J. Biol. Chem. 278 (2003) 13860-13866.

(6) D. Cheng, T.C. Nelson, J. Chen, S.G. Walker, J. Wardwell-Swanson, R. Meegalla, R. Taub, J.T. Billheimer, M. Ramaker, J.N. Feder, Identification of acyl coenzyme A:monoacylglycerol acyltransferase 3, an intestinal specific enzyme implicated in dietary fat absorption, J. Biol. Chem. 278 (2003) 13611-13614.

(7) Y. Yang, J. Cao, Y. Shi, Identification and characterization of a gene encoding human LPGAT1, an endoplasmic reticulum-associated lysophosphatidylglycerol acyltransferase, J. Biol. Chem. 279 (2004) 55866-55874.

(8) M.R. Owen, C.C. Corstorphine, V.A. Zammit, Overt and latent activities of diacylglycerol acyltrasnferase in rat liver microsomes: possible roles in very-low-density lipoprotein triacylglycerol secretion, Biochem. J. 323 (1997) 17-21.

(9) K.K. Buhman, S.J. Smith, S.J. Stone, J.J. Repa, J.S. Wong, F.F. Knapp Jr., B.J. Burri, R.L. Hamilton, N.A. Abmurad, R.V. Farese, Jr., DGAT1 is not essential for intestinal triacylglycerol absorption or chylomicron synthesis, J. Biol. Chem. 277 (2002) 25474-25479.

(10) Yu, X. X., S. F. Murray, S. K. Pandey, S. L. Booten, D. Bao, X. Song, S. Kelly, S. Chen, R. McKay, B. P. Monia, and S. Bhanot, Antisense oligonucleotide reduction of DGAT2 expression improves hepatic steatosis and hyperlipidemia in obese mice, Hepatology 42 (2005) 362-371.

総括

TAG は生体にとって重要な分子であり、その合成は DGAT および MGAT によって担われている。その生理的重要性から DGAT および MGAT については多くの研究報告がなされているが、遺伝子が同定されたのが比較的最近であることもあり、活性や機能が未知の生物種や、また哺乳動物の各組織における責任分子、TAG 合成への寄与度など、不明な点も多い。そこで本論文では、これらの不明点について種々の検討を加え、DGAT／MGAT 研究の進展に寄与することを目的とした。

第 1 章ではまず、熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* の DGAT 遺伝子の同定およびマラリア DGAT 遺伝子の機能解析を実施した結果について述べた。*P. falciparum* はそのゲノム中にただ 1 つの DGAT 様 ORF を含んでいるが、この配列が DGAT をコードするのかどうか、さらにこの DGAT がマラリアにとって必要な酵素であるかどうかは不明であった。そこで、この DGAT 様遺伝子（PfDGAT1）について検討した結果、赤血球内増殖過程で TAG 合成が活発な時期に発現が亢進すること、また CHO-K1 細胞で過剰発現させると有意に DGAT 活性が上昇することを確かめた。また 2 重組換えの手法を用いて PfDGAT1 遺伝子を欠失した株を作製したところ、この株は増殖能を失うことがわかった。これらのことから、マラリア原虫の PfDGAT1 遺伝子は DGAT をコードしており、マラリア増殖過程に必須であることを明らかにした。

熱帯地域を中心として世界的に広く蔓延しているマラリア（年間 150 万－270 万人が死亡、WHO 推計）の対策は人類の喫緊の課題であるが、キニーネやクロロキンなどの既存の治療薬は副作用や耐性株などの問題があり、よい治療薬がないのが現状である。本章の成果は、マラリア原虫における TAG 代謝の理解に貢献するだけでなく、マラリアの DGAT を選択的に抑制する化合物の取得によって、マラリアの治療薬の開発につながると期待される。

第 2 章では、ヒト小腸の DGAT 活性に関する検討を行った結果について述べた。ヒト小腸ではモノアシルグリセロール経路がドミナントであり、MGAT 活性が重要であることが知られているが、DGAT 活性については詳細な解析が行われていない。そこで、まずヒト小腸から調製したミクロソームの DGAT 活性を確認し、ヒト小腸 DGAT のアシル CoA 選択性および反応の温度依存性を検討した。その結果、ヒト小腸 DGAT のアシル CoA 選択性および反応の温度依存性は組換えヒト DGAT1 と一致した。次にヒト小腸ミクロソームを用いて MGAT アッセイを行ったところ、2-MAG をアシル基アクセプターとして反応させた場合、1,2-DAG および TAG が生成するのに対し、1-MAG をアシル基アクセプターとした場合には 1,3-DAG が主産物であり、TAG はほとんど生成しないことがわかった。これらの結果から、ヒト小腸 DGAT 活性は主に DGAT1 によって担われており、また主として 1,2-DAG を基質として TAG を合成すると考えた。つまり、ヒト小腸 DGAT は、モノアシ

ルグリセロール経路で合成される 1,2-DAG を主な基質とし、食餌中の主要な DAG である 1,3-DAG は基質として利用しない可能性を考えた。

第 3 章では、新規な MGAT 遺伝子の同定を行った結果について述べた。MGAT 活性は小腸だけでなく肝臓でも検出できることが知られているが、これまでマウス肝臓で高発現が報告されている MGAT 分子種はなかった。今回、新規な MGAT 候補として同定した LPGAT1 は、*in vitro* で MGAT に特徴的な活性を有し、かつマウス肝臓での発現が高いことがわかった。

第 4 章では、第 3 章で見出した新規 MGAT である LPGAT1 について、*in vivo* ノックダウンを行うことにより、脂質代謝への影響を検討した結果について述べた。脂質異常を呈する *db/db* マウスに対して LPGAT1 shRNA アデノウイルスを感染させたところ、肝臓の LPGAT1 遺伝子の選択的な発現抑制と、MGAT 活性および LPGAT 活性の低下が認められた。興味深いことに、shRNA アデノウイルスに感染したマウスでは顕著な血清 TAG とコレステロールレベルの低下が認められた。この結果から、LPGAT1 はマウス肝臓において実際に MGAT として機能し、肝臓における TAG 合成と肝臓からの VLDL 分泌に一定の寄与をしていることが明らかとなった。

第 3、4 章の結果は、これまで 3 種類同定されている MGAT（MGAT1, MGAT2, MGAT3）遺伝子に加えて新たな MGAT 分子種を同定した点だけでなく、この LPGAT1（MGAT）がマウス肝臓において実際に MGAT 活性を担っており、更に血中 TAG やコレステロールの調節に関与していることを見出した点で非常に重要である。本研究によって、全身の脂質代謝における肝臓 MGAT 活性の重要性が認識され、MGAT 研究が更に進展するものと期待できる。

近年血液中の脂質レベルの増大、つまり高 TAG 血症あるいは高コレステロール血症が、糖尿病、高血圧又は喫煙などとともに、虚血性心疾患や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の危険因子の１つである、と考えられるようになった。全身の脂質レベルに影響を及ぼす肝臓 MGAT 遺伝子の同定は、血中脂質の増大に密接に関連する前記疾患の治療薬／予防薬の開発に寄与できると考えた。

論文目録

○第１章

Nirianne Marie Q Palacpac*, Yasushi Hiramine*(*equal contribution), Shintaro Seto, Ryuji Hiramatsu, Toshihiro Horii, and Toshihide Mitamura.

Evidence that Plasmodium falciparum diacylglycerol acyltransferase is essential for intraerythrocytic proliferation.

Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.321, p1062-1068, 2004.

○第２章

Yasushi Hiramine, and Toshizumi Tanabe.

Characterization of acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase (DGAT) enzyme of human small intestine.

Lipids, in contribution.

○第３章、第４章

Yasushi Hiramine, Hisayo Emoto, Shunsuke Takasuga, and Ryuji Hiramatsu.

Novel acyl-coenzyme A: monoacylglycerol acyltransferase plays an important role in hepatic triacylglycerol secretion.

Journal of Lipid Research, Vol.51, p1424-1431, 2010.

謝辞

本論文の作成にあたり、ご指導・ご鞭撻を賜りました、大阪市立大学大学院工学研究科・田辺利住 教授に心から感謝の意を表します。また、有益なご助言とご指導を頂きました、大阪市立大学大学院工学研究科・長崎健 教授、同・北村昌也 教授に心より感謝致します。

本研究を遂行するに当たり、多大なるご指導とご教示を賜りました国立国際医療センター（現）・三田村俊秀 先生、大日本住友製薬・平松隆司 氏、大阪市立大学大学院工学研究科・田辺利住 教授に深く感謝致します。

また、新規 MGAT 遺伝子の同定およびマウス shRNA 実験をご担当いただきました大日本住友製薬・江本尚代 氏、秋田大学大学院医学系研究科・高須賀俊輔 氏に心から感謝致します。更に本研究に際しまして、惜しみないご協力および有益なご助言を頂きました、大日本住友製薬・研究本部の皆様に感謝致します。

最後に本研究を全面的に支援していただいた家族・友人に心より感謝し、本論文を終わらせて頂きます。