

京都大学	博士 (工学)	氏名	水 藤 拓 人
論文題目	Studies on the roles of polyunsaturated fatty acids for thermal adaptation (多価不飽和脂肪酸の温度適応における役割に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>生物が様々な環境温度のもので生存する温度適応の分子機構については、未だ不明な点が数多く残されている。細胞膜中の多価不飽和脂肪酸の増加は、膜流動性の調節を介して低温適応と密接に関与すると考えられるが、多価不飽和脂肪酸が如何に生理機構を制御するのかは未だ明らかではない。本論文では多価不飽和脂肪酸をはじめとする脂質と温度適応との関係を明らかにすることを目的とし、温度適応に重要な要素の一つである行動性体温調節の多価不飽和脂肪酸による制御機構の解析を行なった。本論文はその研究成果をまとめたものであり、4章からなっている。</p> <p>第1章では、温度適応に対する多価不飽和脂肪酸の役割を明らかにするため低温・高水圧である湖底環境に生息する琵琶湖固有種のハゼ科魚類であるイサザ (<i>Gymnogobius isaza</i>) に着目し、湖岸に生息する近縁種のウキゴリ (<i>Gymnogobius urotaenia</i>) との間の脂質組成の比較解析を実施した。イサザにおいて淡水魚での含有量が低いとされていたエイコサペンタエン酸 (EPA) などの多価不飽和脂肪酸が脂質中に豊富に存在することを明らかにした。特に貯蔵脂質であるトリアシルグリセロール中の EPA 量がウキゴリでは全脂肪酸中の 1.2% であるのに対して、イサザでは 10.5% であった。また LC-MS/MS を用いた解析からトリアシルグリセロール中の EPA はグリセロール骨格中の sn-1(3)位に存在することを明らかにした。さらに多価不飽和脂肪酸を含有するトリアシルグリセロールの生成機構を明らかにするため、前駆体であるジアシルグリセロールの sn-3 位に脂肪酸を転移しトリアシルグリセロールを合成するジアシルグリセロールアシル転移酵素 DGAT(<i>acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase</i>) をコードする2種の遺伝子 (DGAT1 および DGAT2) をイサザから単離し、トリアシルグリセロール合成酵素欠損酵母を用いた生化学的解析を行った。EPA 含有培地での培養実験からトリアシルグリセロール中の EPA 量が DGAT1 を発現させた酵母では DGAT2 に対して 2.4 倍多く存在したことから、DGAT1 が EPA に対する基質選好性を有することを明らかにした。以上の結果、低温適応したイサザは近縁種のウキゴリなどの他の魚類と比較して環境中などから摂取した多価不飽和脂肪酸を積極的に脂質中に蓄積させる機構を持つことを明らかにした</p> <p>第2章では、多価不飽和脂肪酸が体温調節機構に与える影響についてキイロショウジョウバエ (<i>Drosophila melanogaster</i>) を用いた解析を行った。リン脂質中のリノール酸などの多価不飽和脂肪酸量が増加するような低温飼育によって温度勾配装置上での体温調節行動が変化することを見出し、多価不飽和脂肪酸が体温調節機構を制御する可能性を見出した。ショウジョウバエは多価不飽和脂肪酸を生合成出来ないためリノール酸を合成する <i>Caenorhabditis elegans</i> <math>\Delta 12</math> 脂肪酸不飽和化酵素 (FAT-2) 遺伝子を導入した個体を作製することで、組織・細胞種特異的な FAT-2 発現実験系を構築し多価不飽和脂肪酸の体温調節行動における役割について解析を行った。FAT-2 を全身で発現した個体ではリノール酸量の顕著な増加を示したことからショウジョウバエ個体にお</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	水 藤 拓 人
<p>いて FAT-2 が機能的に発現することを明らかにした。さらに組織特異的な FAT-2 の発現実験から、神経組織特異的に FAT-2 を発現させた個体において強い低温選択性を示した。続いて温度受容に関与する神経細胞との連関を探索した結果、TRPA1 チャンネル発現神経細胞での FAT-2 発現のみでも低温選択行動が誘導されることが明らかとなった。TRPA1 チャンネルはアリルイソチオシアネート (AITC) などの化学物質や温度上昇に応答するカチオンチャンネルであり、刺激に対する神経細胞内への <math>\text{Na}^+</math> や <math>\text{Ca}^{2+}</math> などのカチオン流入を通して神経細胞を活性化させる。FAT-2 の発現によって神経細胞の活性化が制御される可能性を検証するため TRPA1 チャンネル発現神経細胞での生体内カルシウムイメージングを行った。FAT-2 の発現により TRPA1 発現神経細胞での AITC に対する応答は変化しなかったが、温度変化による神経細胞の活性化の最大値が上昇した。以上の結果から多価不飽和脂肪酸が TRPA1 発現神経細胞の温度に対する活性化を制御することにより体温調節行動を変化させることを見出した</p>			
<p>第3章では、共生細菌が体温調節機構に影響を与える可能性を検討した。胚を次亜塩素酸処理することによって共生細菌を排除したショウジョウバエ無菌飼育個体を作製し、温度勾配上での温度選択性を通常飼育個体と比較した。通常飼育個体では <math>19.6^{\circ}\text{C}</math> を平均値とした選択温度分布をとるのに対して無菌飼育個体では高温選択性を示し、<math>3.7^{\circ}\text{C}</math> 高い <math>23.3^{\circ}\text{C}</math> を平均値とした選択温度分布をとった。また細菌の再添加によって <math>20.1^{\circ}\text{C}</math> を平均値とした選択温度分布に回復したことから、共生細菌が体温調節機構に影響を与えることを見出した。続いてショウジョウバエにおける共生細菌叢を解析した結果、<i>Orbus sp.</i>、<i>Providencia rettgeri</i> および <i>Lactobacillus plantarum</i> などを主とする細菌叢の構成を明らかにした。さらに体温調節機構に影響を与える細菌を同定するためショウジョウバエ個体から共生細菌の単離を行い 11 種の細菌を単離した。単離した細菌の無菌飼育個体への添加実験からショウジョウバエの温度選択に影響を与える細菌を同定し、細菌種特異的に体温が制御されることを見出した。さらに細菌による行動性体温調節の免疫応答との関連を探索したところ Toll 経路の活性化によって温度選択性が制御されることを見出した。</p>			
<p>第4章では、共生細菌が産生する代謝産物の宿主の生理機能への影響を検討した。共生細菌存在下と無菌飼育下における脂質メタボロームの比較解析を行ったところ哺乳類での体温調節に関与する生理活性脂質の変化は見られなかったが、第3章の共生細菌叢解析でも見出された <i>Lactobacillus plantarum</i> などが産生する多価不飽和脂肪酸由来の代謝産物である 10-hydroxy-cis-12-octadecanoic acid (HYA) をはじめとする水酸化脂肪酸がショウジョウバエ個体内に存在することを明らかにした。さらにこれら脂肪酸代謝産物はエネルギー代謝を制御することを見出した。</p>			

## (論文審査の結果の要旨)

本論文は、多価不飽和脂肪酸をはじめとする脂質と温度適応との関係を明らかにすることを目的とし、温度適応に重要な要素の一つである行動性体温調節の多価不飽和脂肪酸による制御機構の解明を目標とした研究であり、得られた主な成果は次の通りである。

1. 低温環境に生息する琵琶湖固有魚イサザにおいて多価不飽和脂肪酸が脂質中に多く存在することを見出した。さらに貯蔵脂質であるトリアシルグリセロールに多価不飽和脂肪酸を転移するジアシルグリセロールアシル転移酵素の機能を明らかにした。
2. ショウジョウバエをモデルとした体温調節行動解析から低温曝露が多価不飽和脂肪酸含有脂質の増加と選択温度を低下させることを見出した。続いて多価不飽和脂肪酸合成遺伝子を導入したショウジョウバエ個体を作成し、組織・細胞種特異的に多価不飽和脂肪酸量の制御を可能とする実験系を構築した。結果、多価不飽和脂肪酸が TRPA 1 チャネル発現神経細胞において神経細胞の活性化を増強することで体温調節行動を制御することを明らかにした。
3. 無菌ショウジョウバエ個体と通常飼育個体の比較解析から共生細菌が温度選択性に影響を与えることを見出した。さらに細菌叢解析と単離細菌の添加実験から宿主の選択温度を変化させる細菌種を同定した。
4. 脂質代謝産物の網羅的解析からショウジョウバエ共生細菌が宿主のエネルギー代謝に影響を与える多価不飽和脂肪酸由来の水酸化脂肪酸を産生することを見出した。

以上のように、本論文は温度適応や体温調節の制御機構における新規な知見を多く含むものであり、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成31年2月20日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、無期限に当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。