

(論文内容の要旨)

ホスファチジルセリン (PS) は極性部位にセリンを有するグリセロリン脂質であり、脳などの神経系細胞に豊富に存在し、アポトーシスや細胞内シグナル伝達において重要な役割を果たす。1941 年、Folch らは脳から抽出した PS を酸加水分解し、得られたセリンを再結晶化した後、比旋光度を測定することにより、PS のセリンが L 体であることを示した。それ以来、生体内に存在する PS のセリン部分は L 体のみであると考えられてきた。しかし、Folch らの方法では再結晶化の際に微量成分は除去されるため、仮に D-セリンが少量存在していたとしても検出することは不可能であったと推察される。近年、分析技術の発達とともに、哺乳類からも数種の内在性 D-アミノ酸が発見され、それらが生理的に重要な役割を担っていることが示されている。D-セリンは脳内に多く存在し、記憶などに関与する NMDA レセプターのコアゴニストとして働く。一方、哺乳類に D-セリンを含む PS (D-PS) が存在する可能性については十分に検討されてこなかった。また、セリン以外のアミノ酸がリン脂質の塩基として存在する可能性についても従来の検討は不十分であり、それらを含む新規リン脂質が存在する可能性が考えられる。本研究は、種々のアミノ酸を有する新規グリセロリン脂質の存在を検討したものであり、その成果は以下のように要約される。

1. ラット大脳から PS を抽出、調製し、酸加水分解して得られた PS のセリン部分を逆相クロマトグラフィー (RP-HPLC) によって光学分割した。その結果、L-セリンに加えて D-セリンが検出され、その D/L 比は 0.9%であることが判明した。検出された D-セリンが PS に由来することを確認するため、ラット大脳から調製した PS をホスホリパーゼ D またはホスホリパーゼ C で処理し、得られたセリンおよびホスホセリンを RP-HPLC で分析した。その結果、D-セリンと D-ホスホセリンがそれぞれ検出され、それらの D/L 比はいずれも約 1%であった。以上の結果より、D-セリンが生体膜のグリセロリン脂質の塩基として存在することが示され、ラット大脳に存在する PS のおよそ 1%が D-PS であることが

明らかとなった。

2. 大脳に加え、ラットの心臓、脾臓、肺、精巣、肝臓、腎臓、小脳から調製した PS について解析を行った結果、さまざまな臓器・部位に D-PS が存在することが明らかとなった。その D/L 比は大脳が 0.9% で最も高く、次いで心臓 (0.7%)、脾臓 (0.5%) が高い比率を示し、腎臓では 0.05% と低いことが判明した。小脳の D-PS は検出限界以下であった。

3. タンパク質と脂質を含むラット大脳抽出液と L-[$^{14}\text{C}(\text{U})$]セリン、あるいは D-[$^3\text{H}(\text{G})$]セリンを 37°C でインキュベーションした後、薄層クロマトグラフィーにより PS を単離して、リン脂質に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。その結果、L-[$^{14}\text{C}(\text{U})$]セリンと同様、D-[$^3\text{H}(\text{G})$]セリンもリン脂質に取り込まれることが確認された。また、これらのセリンの取り込みは EDTA の添加によって完全に阻害されることが明らかとなった。この結果より、D-セリンのリン脂質への取り込みは塩基交換反応によって行われ、その反応は二価カチオンを必要とする酵素によって触媒されることが示唆された。

4. ブタ脳から抽出した脂質の酸加水分解物を RP-HPLC-エレクトロスプレー質量分析機を用いて分析したところ、L-セリン、D-セリンに加えて、L-スレオニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸が検出された。ラットの脳および肝臓から抽出した脂質の加水分解物にもスレオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸が検出された。またエレクトロスプレー質量分析機を用いた neutral loss scan によるラット脳の脂質分析において、ホスファチジルスレオニン、ホスファチジルアスパラギン酸、ホスファチジルグルタミン酸に由来すると考えられるスペクトルが得られた。さらに product ion scan を行った結果、これらのリン脂質に飽和脂肪酸としてステアリン酸が、不飽和脂肪酸としてオレイン酸やドコサヘキサエン酸が結合していることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

PS は生体膜の主要な構成成分であり、アポトーシスやシグナル伝達において重要な役割を果たす。近年の研究により、哺乳類の体内に遊離の D-セリンが存在することが示されたが、PS のセリン部分に関しては L 体のみが存在すると考えられてきており、D 体が存在する可能性については十分に検討されてこなかった。セリン以外のアミノ酸を塩基として含むリン脂質の存在についても十分な検討がなされてこなかった。本研究は、哺乳類に D-セリン、L-スレオニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸を塩基として含むリン脂質が存在することを明らかにしたものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. ラット大脳から抽出、調製した PS を酸加水分解、あるいはリン脂質を基質とする酵素で処理し、遊離したセリンを RP-HPLC で分析した。その結果、D-セリンを含む PS の存在が示され、その D/L 比は約 1%であることが明らかとなった。生体内に D-セリンを塩基として含有する PS が存在することをはじめて明らかにしたものであり、脂質生化学の新しい展開につながる研究成果として高く評価される。

2. ラットのさまざまな臓器・部位から抽出した PS を分析し、大脳のほか、心臓や脾臓などに D-PS が分布していることを見いだした。D-PS が種々の臓器・部位で機能している可能性を示唆する意義深い成果といえる。

3. ラット大脳抽出液と D- $[^3\text{H}(\text{G})]$ セリンを用いた分析により、D-セリンがリン脂質に取り込まれることを見いだした。またこの取り込みは EDTA を添加することにより、完全に阻害されることを明らかにした。これは生体内において D-PS が塩基交換反応によって合成されること、またその反応は二価カチオンを必要とする酵素によって触媒されることを示唆したものであり、脂質代謝生化学の観点から評価できる。

4. ブタおよびラットの臓器から抽出した脂質中に、スレオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸を塩基として含有するリン脂質が存在することを明らかにした。新しいアミノ酸含有リン脂質の存在を明らかにした点で高く評価される。

以上のように本論文は哺乳類に種々のアミノ酸を含有する新規リン脂質が存在することを明らかにしたものであり、生化学、分子生物学、脂質生化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 21 年 6 月 11 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。