

氏名（本籍）	安藤 亜由美		
学位の種類	博 士（理学）		
学位記番号	博 甲 第 10023 号		
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査学術院	理工情報生命学術院		
学位論文題目	Studies on Age-related Changes of Lipid Metabolisms (脂質代謝の加齢変化に関する研究)		
主査	筑波大学教授	博士（理学）	中田 和人
副査	筑波大学教授	博士（医学）	千葉 智樹
副査	筑波大学教授	博士（理学）	石田 健一郎
副査	筑波大学助教	博士（理学）	石川 香

## 論 文 の 要 旨

加齢とともに起こる老化は細胞や臓器の機能を低下させ、我々の寿命に大きな影響を与えることが知られている。さらに近年では、この老化が神経変性疾患、認知症、糖尿病、不妊症やがんの多様な疾患群の誘導因子となることが報告されている。老化の原因としては、1) 寿命プログラム説（テロメア長によって細胞の寿命が規定される）、2) DNA 損傷説（加齢とともに生じたミトコンドリア DNA の突然変異により ATP 産生低下が誘導される）、3) 異常生体分子説（酸化タンパク質や糖鎖修飾タンパク質異といった異常タンパク質の蓄積によって代謝異常が誘導される）、4) 組織損傷説（コラーゲンやエラスチンの異常架橋による組織柔軟性の破綻などが誘導される）などが提案されているが、老化の分子基盤の全貌理解には至っていない。最近では、加齢による臓器の機能変化を把握するために、臓器に含まれる全ての RNA やタンパク質に関する定性的および定量的な情報を提供する網羅的解析が実施されるようになり、老化における遺伝子発現の変化や機能的なタンパク質の変動に関する成果が報告されるようになってきた。一方、脂質はシグナル伝達脂質や生理活性を発揮する脂質メディエーターとして機能することが知られているにも関わらず、加齢における脂質代謝変動の網羅的解析例は極めて少ないのが現状である。

このような状況の中、第1部において著者は、マウスの組織を用いて加齢依存的に変化する脂質群ならびに加齢依存的な脂質代謝の変化・転換を探索するため、若齢（9週齢）および加齢（114週齢）C57BL/6J マウスの4種類の組織（大脳皮質、大腿筋、肝臓、精巣周囲脂肪組織）の生体内脂質網羅的分析と代謝物網羅的分析を実施した。結果として、網羅的解析から各組織において1,000種類以上の分子を検出し、体内脂質、ならびに、脂質代謝の加齢依存的な変化を把握することに成功した。まず、先行研究と合致する代謝変動として、全臓器の加齢群に共通したカルジオリピン、アセチル-CoA、3-ヒドロキシ酪酸の減少、大脳皮質の加齢群におけるドリコール、長鎖ガングリオシド、スルファチドの増加とフォスファチジルセリンの減少、大腿筋の加齢群における短鎖・中鎖アシルカルニチン類の減少が、それぞれ確認できた。また、ヒト加齢群の先行研究と共通と合致する結果として肝臓におけるレチニルエステルの増加が観察された。興味深いことに、著者は大腿筋を除く加齢群の組織においてデオキシスフィンゴ脂質類（オキシセラミドとデオキシジヒドロセラミド）とエーテル結合型ジアシルグリセロールの変化を新たに見出すことに成功した。

加齢群の大脳皮質ではデオキシセラミドは減少し、デオキシジヒドロセラミドは増加していた。一方、加齢群の精巣周囲脂肪はデオキシセラミドとデオキシジヒドロセラミドの両方が増加していた。先行研究において、L-アラニン/L-セリン比を増加させるとデオキシスフィンゴ脂質も増加することが報告されているため、

著者は加齢マウスの組織における L-アラニンと L-セリンの濃度を分析した。その結果、加齢組織における L-アラニン/L-セリン比の変化は観察されなかった。特に、加齢群の精巣周囲脂肪ではデオキシセラミドとデオキシジヒドロセラミドの両方が増加しているため、L-アラニン/L-セリン比の増加を仮定したが、有意な増加は観察されなかった。これらの結果から著者は、精巣周囲脂肪組織でのデオキシセラミドとデオキシジヒドロセラミドの有意な増加は L-アラニン/L-セリン比の増加を介した新規合成ではなく、デオキシセラミドとデオキシジヒドロセラミドの蓄積を反映していると結論した。前述のように、加齢群の大脳皮質における L-アラニン/L-セリン比は変化しない。しかしながら、加齢群の大脳皮質では L-アラニンと L-セリンの濃度がそれぞれ有意に減少していることが分かった。この結果から著者は、加齢群の大脳皮質におけるデオキシセラミドの減少はデオキシスフィンゴ脂質の基質である L-アラニンの減少がデオキシセラミドの有意な減少によって誘導され、一方、加齢群の大脳皮質におけるデオキシジヒドロセラミドの有意な増加はスフィンゴ脂質合成経路におけるサルベージ経路による補充またはジヒドロセラミド不飽和化酵素の阻害によって誘導される可能性を示唆した。

加齢した哺乳類におけるエーテル結合ジアシルグリセロールの蓄積とそれらの生合成の根底にある機構はこれまでに報告されていないが、前述のように著者は大腿筋を除く加齢マウス組織においてエーテル結合型ジアシルグリセロールが増加することを見出した。一方、この脂質の基質であると予想されているエタノールアミン型プラズマローゲンの有意な減少も同時に検出した。これらの結果をもとに著者は、エタノールアミン型プラズマローゲンがフォスホリパーゼによりエタノールアミンリン酸が切断され、残ったエーテル結合型ジアシルグリセロールが有意に増加し、逆にエタノールアミン型プラズマローゲンの有意な減少が誘導される可能性を提唱するに至った。

第 2 部において著者は生体材料からエイコサノイド類を検出する方法の確立を行った。脂質は細胞膜構成や生理活性物質（脂質メディエーター）として機能することが知られている。特に、n-6 脂肪酸由来のエイコサノイド類は、炎症性サイトカイン生成を惹起し炎症促進的に作用し、一方、n-3 系脂肪酸由来のエイコサノイド類は抗炎症作用をもつことが知られている。このようにエイコサノイド類は重要な生体応答に寄与するものの、生体存在量が極めてわずかであるため、エイコサノイド類に関する基礎研究の遂行には、試料中に高濃度に含まれるタンパク質や中性脂質（リン脂質やグリセロールなど）の除去を含む煩雑な抽出処理が必要となり、サンプル調整段階で抽出状況の再現性の担保することが困難であった。そこで著者は、エイコサノイド類を正確に解析できるようにするために、ナノフロー液体クロマトグラフィー / 3 連 4 重極型質量分析計（nanoLC/MS/MS）リン脂質除去カラムを用いた検出方法の開発を行った。

著者はまず、生体試料からのリン脂質とタンパク質除去のため有機溶媒 2 種類を用い回収率を算出し、リン脂質除去フィルター処理に適した溶媒の選定を行った。その結果、メタノールがエイコサノイド類の抽出に適していることを突き止めた。次に、代替マトリクスを選定として、1) 測定対象が代替マトリクスに含まれないこと、2) 添加回収率が  $\pm 20\%$  を満たす条件を満たしたメタノールを選定した。最終的に著者は、この新たな方法を用いてラット全脳中のエイコサノイド類の濃度測定と添加回収試験を実施し、真度 82.2-117.6%、精度 15%以下にてエイコサノイド類の検出に成功した。

## 審 査 の 要 旨

著者は、実験動物マウスの臓器に含まれる多様な脂質と代謝物に関する網羅的な解析を実施し、加齢依存的にデオキシスフィンゴ脂質類（オキシセラミドとデオキシジヒドロセラミド）とエーテル結合ジアシルグリセロールが変動することを見出した。また、臓器における生化学解析を実施し、加齢とともに変動する脂質代謝の経路とそれらの分子基盤を提案した。これらの結果は、哺乳類の加齢における脂質代謝の生理的衰退による老化の分子機構を追求する上で極めて重要な成果である。さらに著者は、多価不飽和脂肪酸代謝物であるエイコサノイド類を検出するための新たな実験系の構築にも成功した。この検出法は、従来法と比較してエイコサノイド類を簡便かつ高感度に検出することができるため、脂質代謝の網羅的解析をさらに深化させる成果である。これらのことから、本研究は生物学領域ならびに生命科学領域において独創性に秀でており、学術的な価値が高いと評価された。

令和 3 年 1 月 25 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。