

論文の内容の要旨

論文題目: The role of DPPC in the inflammatory response of macrophages
(生体マクロファージにおける DPPC の機能解析)

氏名: 大木 悠佑

【序論】

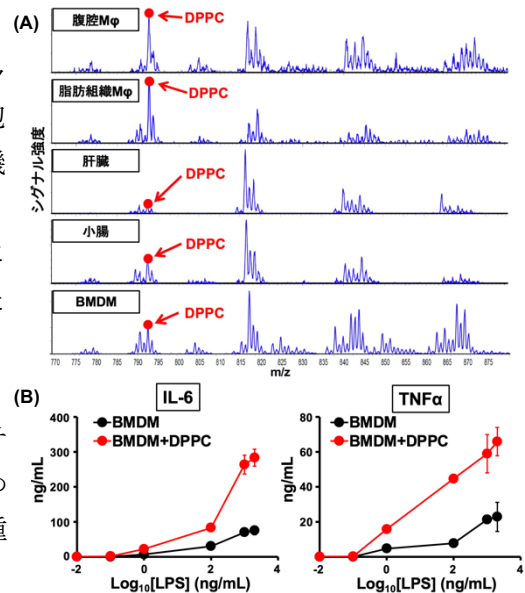
生体膜の主要な構成成分であるリン脂質は、極性頭部と2本の脂肪酸の組み合わせにより、1000種を超える多様な分子種が生体内に存在している。一方で、細胞は細胞種ごとに特徴的なリン脂質分子種組成を持ち、自身の機能に適した独自の膜環境を形成していると考えられる。しかし、リン脂質の代謝系は複雑であるため、どのようにして細胞種に特徴的な膜環境が生み出されるのか、またその膜環境がどのように細胞機能に寄与しているのか、不明な点が多く残されている。

私は修士課程において、①飽和脂肪酸であるパルミチン酸を2本持つという特徴的な脂肪酸組成を持つ dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) がさまざまな細胞種の中で、特に、生体から単離したマクロファージ (Mφ) に豊富に存在すること (図 1A)、②骨髄由来培養 Mφ (BMDM) は DPPC レベルが低いが、DPPC を導入するとリポ多糖 (LPS) による炎症応答が顕著に増強されること (図 1B) を明らかにした。これらのことから、DPPC は Mφ が異物侵入を効率的に感知・排除するために特化した生体膜環境に寄与することが想定された。しかし、内因性 DPPC の関与、また、DPPC の炎症応答増強作用の分子機構は不明である。私は博士課程において、生体内 Mφ における DPPC 産生酵素の同定し、生体内 Mφ の炎症応答における DPPC の重要性を明らかにすることを目指した。

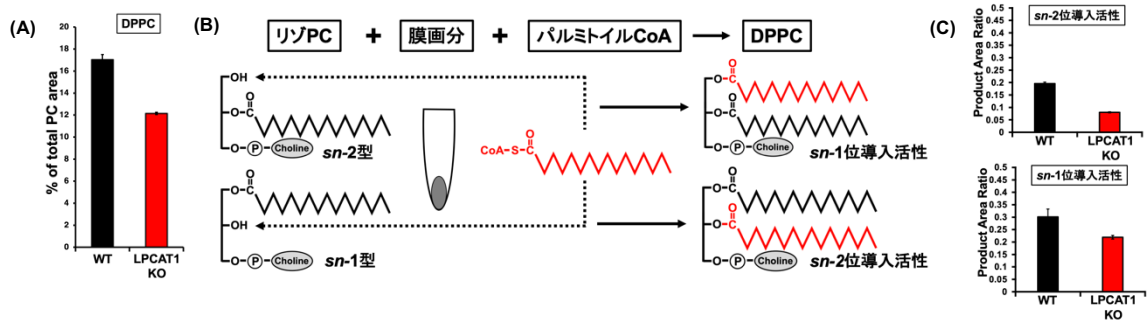
【方法と結果】

1. LPCAT1 KO Mφ では DPPC 合成活性が残存し DPPC も高レベルで存在する

新規合成されたリン脂質は、ホスホリパーゼによって脂肪酸が切り出され、リゾリン脂質アシル基転移酵素により別の脂肪酸が導入される。近年の研究から、このリン脂質脂肪酸リモデリング反応が膜リン脂質の脂肪酸組成に大きく寄与していることが判明してきた。Mφ における DPPC 産生酵素として、まず、肺サーファクタント中の DPPC の産生を担うリゾリン脂質アシル基転移酵素 LPCAT1 (lysophosphatidylcholine acyltransferase 1) に着目した。LPCAT1 KO マウス由来腹腔 Mφ の DPPC 量と LPS 応答性を調べた結果、LPCAT1 KO では DPPC 量は WT の7割程度に減少したものの (図 2A)、LPS 刺激応答は WT と同等レベルであった (図 5B)。また、リゾ PC の sn-1 位または2位にパルミチン酸を導入するアシル基転移酵素活性 (図 2B) (DPPC 合成活性) は KO Mφ で減弱していたが、依然として高い酵素活性が残存していた (図 2C)。以上の結果から、LPCAT1 とは異なるリゾリン脂質アシル基転移酵素が DPPC 産生に寄与していることが示唆された。



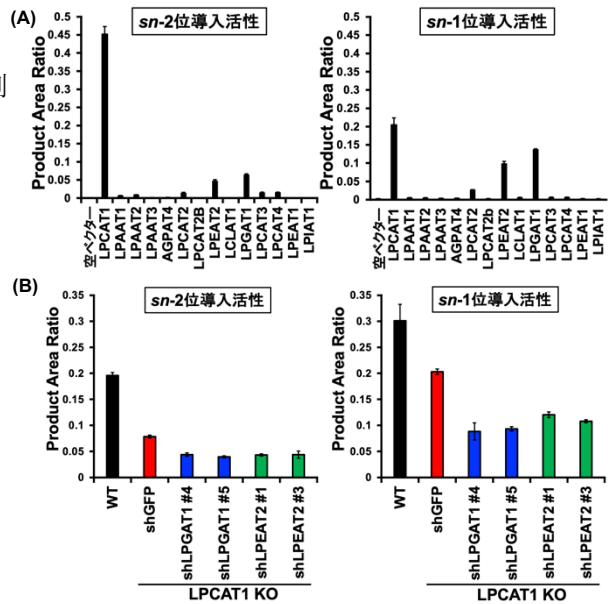
【図 1】(A)Mφ、肝臓、小腸の PC のマススペクトル。
(B) DPPC を導入した BMDM の LPS 応答性。



【図2】(A)LPCAT1 KO MφのDPPC量。(B)DPPC合成活性測定系。(C)LPCAT1 KO MφのDPPC合成活性。

2. LPGAT1, LPEAT2 は DPPC 合成活性を有する

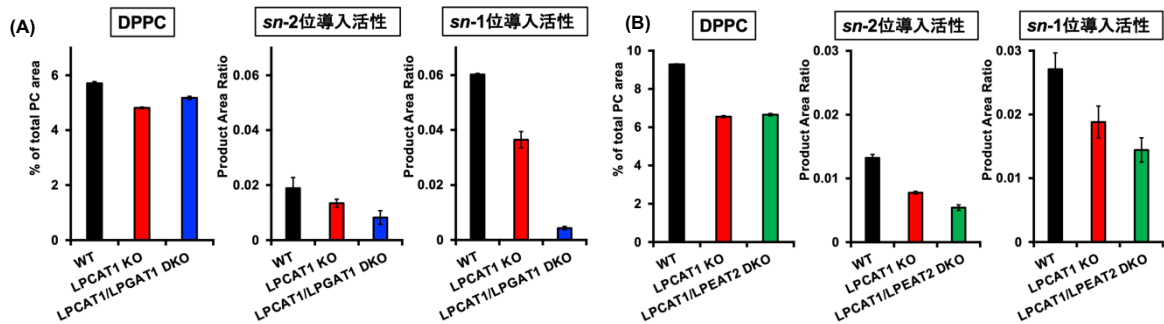
次に、HEK293T 細胞にマウスゲノムに存在する全 14 種のリゾリン脂質アシル基転移酵素を過剰発現させ、その膜画分を用いて DPPC 合成活性を測定することにより、DPPC 産生に参与するリゾリン脂質アシル基転移酵素を探索した。その際、内在の LPCAT1 の影響を排除するため、LPCAT1 KO HEK293T 細胞を樹立し用いた。その結果、LPCAT1 に次いで、LPGAT1、LPEAT2 が高い DPPC 合成活性を有し、特に sn-1 位導入活性が高いことが明らかとなった (図 3A)。また、LPCAT1 KO 腹腔 Mφ において、レンチウイルス系を用い LPGAT1、LPEAT2 の発現を抑制したところ、DPPC 合成活性が顕著に減弱した (図 3B)。これらの結果から、生体内マクロファージにおいて、LPGAT1、LPEAT2 が DPPC 合成を担っていることが示唆された。



【図3】(A)各LPLATのDPPC合成活性。(B)LPCAT1 KO MφにLPGAT1、LPEAT2を発現抑制した際のDPPC合成活性。

3. LPCAT1/LPGAT1、LPCAT1/LPEAT2 二重欠損 (DKO) マウスでは DPPC が減少しない

次に私は、LPCAT1/LPGAT1 DKO マウス、LPCAT1/LPEAT2 DKO マウスを作成し、それぞれの腹腔 Mφ の解析を行なった。その結果、いずれの DKO Mφ でも DPPC の減少は 7 割程度であり、LPCAT1 の単独 KO と変化がなかった (図 4A, B)。しかしながら、DKO Mφ の DPPC 合成活性を測定すると、LPCAT1 単独 KO と比較して、LPGAT1 との DKO では 8 割、LPEAT2 との DKO で

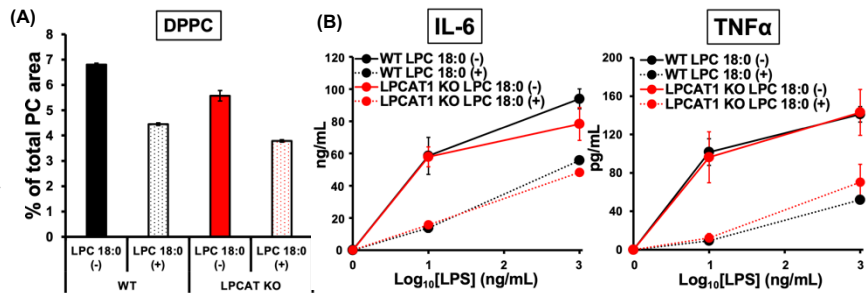


【図4】(A)LPCAT1/LPGAT1 DKO MφのDPPC量とDPPC合成活性。(B)LPCAT1/LPEAT2 DKO MφのDPPC量とDPPC合成活性。

は2割活性減弱が見られた(図4A, B)。以上の結果から、LPGAT1、LPEAT1は生体内MφのDPPC合成活性に寄与するものの、DPPC産生には関与せず、リン脂質リモデリング経路以外のDPPC産生系の関与が強く示唆された。

4. ステアリン酸含有リゾPCの添加によってDPPCが減少しLPS応答性が減弱する

次に、さまざまな脂肪酸やリゾリン脂質を添加することで、DPPCを減らすことができないか検討した。その結果、ステアリン酸含有リゾPC(LPC 18:0)を添加することで、WT、LPCAT1 KOともにそれぞれ70%程度まで



【図5】(A)LPC 18:0を添加した際のDPPC量。(B)LPC 18:0を添加後のLPS応答性。DPPCが減少した(図5A)。これらの細胞に対してLPS刺激をした結果、放出される炎症性サイトカイン量が顕著に減少した(図5B)。

【まとめと考察】

本研究において私は、DPPC合成活性を有する酵素として、これまで報告されていたLPCAT1に加えて、LPGAT1、LPEAT2を見出した。しかしながら、LPCAT1/LPGAT1とLPCAT1/LPEAT2のDKOマウスの解析から、DPPC産生活性は顕著に減弱していたものの、DPPC量は減少しなかった。リン脂質リモデリング経路はリン脂質脂肪酸組成の主たる決定因子であるが、一部の細胞種特異的なリン脂質分子種が、新規合成経路において産生されることが知られている。生体内MφのDPPC産生には両者の経路が寄与していると考えられ、現在新規合成経路の解析を進めている。一方で、私はLPC 18:0の添加により生体内MφのDPPC量を減少させることに成功し、DPPCが炎症応答を正に制御している事を明らかにした。リン脂質合成は、各反応過程に複数の合成酵素と多様な基質が関わり、複雑な代謝ネットワークを形成している。したがって、LPC 18:0の添加により、リン脂質代謝ネットワークが再編成された結果、DPPCが減少したと推測される。今後メタボローム解析により、LPC 18:0によるDPPC減少メカニズムを詳細に検討することにより、新たな生体内リン脂質分子種の操作法の開発が期待できる。

LPC 18:0を添加したWT Mφと、LPCAT1 KO Mφでは、いずれもDPPC量の減少がみられたのにも関わらず、LPS応答性に劇的な違いがみられた。その理由として、影響を受けたDPPCの細胞内局在の違いが考えられる。LPSの受容体であるTLR4の活性化は主に形質膜で起こり、脂質ラフトと呼ばれる脂質マイクロドメインが重要であることが報告されている。DPPCはその物性から、脂質ラフトの形成を促進するため、Mφの炎症応答におけるDPPCの作用メカニズムとして、形質膜における脂質ラフト様膜ドメインの関与が考えられる。一方、小胞体は脂質合成の中心であり、大部分のリン脂質が存在する。LPCAT1も小胞体に存在しており、そのKOによって小胞体に存在するDPPCは減少するが、膜全体の2%に過ぎない形質膜のDPPCに対する影響は小さいと予想される。それに対して、LPC 18:0の添加は、形質膜のDPPCを効率的に減少させている可能性がある。現在、脂質の局在を可視化するツールができつつあり、これによりDPPCの細胞内局在を解析することで、より詳細な作用メカニズムを解明していきたい。