

論文の内容の要旨

論文題目： Physiological role of phosphatidylinositol selective acyltransferase LPIAT1
(ホスファチジルイノシトール特異的脂肪酸転移酵素 LPIAT1 の生理機能解析)

氏名 久保 卓也

【序】

ホスファチジルイノシトール(PI)は生体膜を構成するリン脂質の一つであり、極性頭部のイノシトール環のリン酸化体を介して様々な細胞機能に関与することが知られている。PIは他のリン脂質と比べて特徴的な脂肪酸鎖を持っており、そのほとんどが *sn*-1 位にステアリン酸 (18:0)、*sn*-2 位にアラキドン酸 (20:4 n-6)を含む分子種で構成されている。当研究室ではこれまでに線虫 *C. elegans* を用いた RNAi スクリーニングにより、PI の *sn*-2 位にアラキドン酸を導入する酵素 LPIAT1 を同定している。更に LPIAT1 欠損マウスを作製し、LPIAT1 が胎生期における脳の形態形成に必須であることを明らかにした。一方で、LPIAT1 欠損マウスは生後 1 ヶ月以内にほぼ全ての個体が致死になることから、成体マウスにおける LPIAT1 機能については解析が困難であった。本研究で私は、LPIAT1 コンディショナル欠損マウスの解析を通して成体における PI の特徴的な脂肪酸組成の生物学的意義を明らかにすることを目指した。

【方法・結果】

1. 成体マウスでの全身性 LPIAT1 欠損は脳の形態異常を示さない

成体マウスでの LPIAT1 の機能を明らかにするために、Cre/LoxP システムを用いてタモキシフェン投与により全身で LPIAT1 を欠損するコンディショナル欠損マウス (*Ubc-Cre-ERT2, Lpiat1^{Flox/Flox}*) を作成した。タモキシフェン投与による LPIAT1 の欠損を確認した 4 週間後に様々な臓器を摘出し主要なリン脂質の脂肪酸組成を LC-MS により調べた。その結果、対照マウス (*Lpiat1^{Flox/Flox}*) で見られるアラキドン酸を含む PI が欠損マウス臓器において顕著に減少している一方で、不飽和度の低い脂肪酸、あるいはドコサヘキサエン酸 (22:6) を含む PI が増加していることが分かった。

次に各臓器の形態を HE 染色により観察を行った。その結果、脳においては、対照マウスと比較して顕著な形態異常は見られなかった。このことから LPIAT1 は胎生期の脳の形態形成においては重要な役割を果たすが、成体での脳の形態維持には大きく寄与しないことが明らかになった。

2. 全身性 LPIAT1 欠損成体マウスの肝臓において中性脂質の蓄積とグリコーゲンの減少が見られる

他の臓器においても観察を行ったところ、肝臓において脂肪肝様の空胞が多く存在する様子が見出された。中性脂質を染める Oil Red O により染色を行ったところ、LPIAT1 欠損マウスの肝臓

では中性脂質が蓄積していることが分かった。更に肝臓におけるグリコーゲンの検出に頻用される Periodic acid – Schiff (PAS) 染色を行ったところ、LPIAT1 欠損マウスでは染色が弱く、グリコーゲンが減少していることが明らかになった。

3. 肝特異的 LPIAT1 欠損マウス(LKO)においても同様の表現型が見られる

全身性 LPIAT1 欠損マウスの肝臓で見られた表現型について、肝臓の LPIAT1 の寄与を調べるために、肝細胞特異的 LPIAT1 欠損マウス(*Albumin-Cre, Lpiat1^{Flox/Flox}* 以下 LKO)を作製し解析を行った。LKO の肝臓における主要なリン脂質の脂肪酸組成を LC-MS により調べたところ、全身性 LPIAT1 欠損成体マウスと同様に PI の脂肪酸組成が変化していた。次に LKO の肝臓における Oil Red O 染色を行ったところ、全身性欠損マウスと同様に中性脂質が蓄積していることがわかった。さらに生化学的な定量から肝臓においてトリグリセリドが増加していた。グリコーゲンについても PAS 染色及び、生化学的な定量から全身性欠損マウスと同様に減少していることがわかった。以上の結果から、肝実質細胞における LPIAT1 欠損が脂肪肝およびグリコーゲンの減少という表現型を引き起こすことが判明した。

4. LPIAT1 LKO の肝臓からのトリグリセリドの分泌は低下しない

肝臓は生体内において脂肪組織とともにトリグリセリドを合成する主要な臓器であり、血中に超低密度リポタンパク質 (VLDL)としてトリグリセリドを分泌している。分泌された VLDL 中のトリグリセリドは末梢組織のリポタンパク質リパーゼ(LPL)により分解される。そこで私は、LPIAT1 LKO での肝臓におけるトリグリセリドの蓄積の原因として、肝臓からのトリグリセリドの分泌が低下している可能性を検証した。

肝臓からの VLDL の分泌量を測定するには、LPL 阻害剤投与により VLDL の分解を抑制することによる方法が頻用される。そこで、6 時間絶食させた対照マウス及び LKO マウスの腹腔内へ LPL 阻害剤である P-407 を投与し、継時的に血漿中トリグリセリドを定量することにより、肝臓から血中へのトリグリセリド分泌速度を計算した。その結果、LKO でのトリグリセリド分泌はほぼ対照マウスと同程度であり、分泌低下は生じていなかった。この結果から、肝臓へのトリグリセリドの蓄積に分泌過程は寄与しないと考えられる。

5. LPIAT1 発現抑制細胞では肝細胞内でのトリグリセリドの分解が阻害されている

次に肝臓でのトリグリセリドの蓄積を細胞レベルで解析するために、ヒト肝細胞由来培養細胞 Huh-7 を用いて解析を行った。Huh-7 において LPIAT1 を発現抑制したところ、欠損マウスと同様にトリグリセリドが細胞内に蓄積した。トリグリセリドの蓄積の原因として合成の亢進あるいは分解の低下が考えられた。そこで、 $[^{14}\text{C}]$ グリセロールを用いてトリグリセリドの代謝を解析した。LPIAT1 発現抑制 Huh-7 細胞において、2 時間という短時間のグリセロールのインキュベーション

ではコントロール (ノンターゲット siRNA 処理) に比べてトリグリセリド画分の放射活性にほとんど変化が見られなかった。このことから LPIAT1 発現抑制細胞においてトリグリセリド合成能は影響を受けないと考えられる。一方、24 時間のインキュベーションでは LPIAT1 発現抑制によりトリグリセリド画分の放射活性が有意に増加していた。この結果は、LPIAT1 発現抑制によりトリグリセリドが増加する結果と一致した。次に、 $[^{14}\text{C}]$ グリセロールを 24 時間インキュベーションした後、 $[^{14}\text{C}]$ グリセロールを含まない培地に交換するパルスチェイス実験を行ったところ、トリグリセリド画分の放射活性減弱速度が LPIAT1 発現抑制細胞において低下していた。以上の結果から、LPIAT1 発現抑制により肝細胞内に蓄積したトリグリセリドの分解過程が阻害されていることが明らかになった。すなわち、LPIAT1 欠損マウスでの脂肪肝の形成は、肝細胞内でのトリグリセリドの分解が減弱していることが原因であると予想された。

【まとめと考察】

私は本研究において、成体肝臓における LPIAT1 のトリグリセリド分解への寄与を明らかにし、LPIAT1 が肝臓の生理機能に重要であることを見出した。細胞内でのトリグリセリドは細胞質とリソソームとにおいて分解され、主に二つの経路が存在する。最近細胞質に蓄積したトリグリセリドの分解にオートファジーが関与することが報告されている。オートファジーには PI3P が必須であることから、PI の脂肪酸組成変化が PI3P のレベルや機能に関与する可能性が考えられる。

グリコーゲン蓄積量の減少のメカニズムについては現在不明である。これまでに細胞内トリグリセリドを分解する ATGL というリパーゼの発現抑制により、トリグリセリドレベルが増加するがと共にグリコーゲンが減少することが報告されている。これはトリグリセリド分解阻害により細胞内へエネルギー供給が不足し、解糖系が活性化した結果であると理解されている。LPIAT1 欠損肝臓においても、トリグリセリド分解が阻害された結果グリコーゲンが減少している可能性を考えている。