

## 審査の結果の要旨

氏名 久保 卓也

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。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 が同定されている。更に全身での LPIAT1 欠損マウスでの解析から、LPIAT1 が胎生期における脳の形態形成に必須であることが明らかになっている。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。そこで本研究で久保は、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旨とした。

まず 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<sup>Flox/Flox</sup>*)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<sup>Flox/Flox</sup>*)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を含む PI が増加していた。

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。

また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 Oil Red O により染色したところ、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使用される 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た。

全身性 LPIAT1 欠損マウスの肝臓で見られた表現型について、肝細胞の 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<sup>Flox/Flox</sup>*)を作製し解析した。肝細胞特異的欠損マウス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。

肝臓は生体内において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する。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。そこで久保は、LPIAT1 欠損マウスにおいて、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 中のトリグリセリド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肝細胞特異的欠損マウスの腹腔内へ LPL 阻害剤を投与し、継時的に血漿中トリグリセリドを定量した。その結果、肝細胞特異的 LPIAT1 欠損マウス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た。

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 siRNA による発現抑制を行ったところ、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ノンターゲット siRNA 処理細胞 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。次に行った $[^{14}\text{C}]$  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においては、LPIAT1 発現抑制細胞においてトリグリセリド画分の放射活性減弱速度が低下していた。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。

本研究において久保は、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 が肝臓の糖代謝・脂質代謝という生理機能に重要であることを見出した。本研究は LPIAT1 の解析を通して、肝臓における PI の脂肪酸鎖と中性脂質代謝との関連を示した点で意義がある。

よって本論文は博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。