

[別紙1]

# 論文の内容の要旨

## 発生工学的手法による

## ホルモン感受性リパーゼの機能解析

大須賀 淳一

**はじめに** ホルモン感受性リパーゼ (HSL) は中性脂肪 (TG) やコレステロールエステル (CE) を水解する酵素である。HSL は主として、脂肪組織、骨格筋、心筋、副腎、精巣、卵巣に発現しているが、マクロファージや膵ベータ細胞にも少量ながら発現が認められている。その発現臓器から HSL はエネルギー代謝や熱産生、ステロイド合成、更には動脈硬化形成やインスリン分泌にも関与すると想定されてきた。

このリパーゼの特性はその名からも想像されるようにホルモン感受性である点である。カテコラミンやグルカゴン等の刺激によりアデニレートシクラーゼが活性化され、更に cAMP 依存性のプロテインキナーゼ A (PKA) が活性化される。これにより HSL がリン酸化され脂肪分解が促進すると考えられている。インスリンは反対に脂肪分解を抑制するとされる。インスリンはフォスフォジエステラーゼ 3B を活性化させて cAMP を 5'AMP へ異化し、PKA の活性化を抑制し HSL のリン酸化を抑制すると考えられている。従って、飢餓や糖尿病で見られる血中脂肪酸 (FFA) の上昇は、脂肪細胞での HSL の活性化により説明されてきた。こうした背景からも、HSL 活性は脂肪蓄積と密接に関連している可能性がある。

また、HSL は中性コレステロールエステル水解酵素 (NCEH) としての役割

も想定されてきた。副腎や卵巣は CE に富んだ臓器である。NCEH により水解されたコレステロールはステロイドの原料になるので、HSL はステロイド合成を調節する因子と考えられる。また精巣では精子細胞や精子に HSL は発現しているため、精子の成熟や機能に関与している可能性がある。更に大動脈やマクロファージの NCEH 活性はホルモン感受性であり、発現量は少ないものの HSL はマクロファージにも確認されている。マクロファージの NCEH 活性は抗 HSL 抗体で抑制されるので、HSL はマクロファージの NCEH の主要なものと考えられてきた。HSL をマクロファージに過剰発現させた場合、NCEH 活性は増加し細胞内の CE 量は減少したので、HSL は泡沫化や動脈硬化形成にも影響する可能性がある。

HSL は肥満や糖尿病、家族性複合型高脂血症の原因遺伝子の候補として解析されてきたが、これまで HSL の変異体の報告はない。また HSL を欠損した動物モデルの存在も知られていない。そこで、本研究は HSL の *in vivo* での役割を明らかにするため、ES 細胞を用いたジーンターゲティング法により HSL を欠損したマウスを作成し解析を行った。

**HSLKO の樹立** HSL 遺伝子のエクソン 5 の一部とエクソン 6 を neo cassette で置換するコンストラクトでジーンターゲティングを行なった。エクソン 6 は酵素活性中心を含むので、このエクソンの欠失により HSL は不活化されることを期待した。キメラと C57Bl/6 との交配で生まれたヘテロ変異体 (HSL<sup>+/-</sup>) を交配した結果、メンデルの法則に従い各遺伝型の個体を得られた。HSL のホモ変異体 (HSL<sup>-/-</sup>; 以下 HSLKO) は致死的ではなく、外見上の異常も認められなかった。

エクソン 8 のプローブによるノーザンブロットでは、野生型の傍精巣上体白色脂肪組織にある 3.3kb の mRNA は HSLKO では消失していたが、エクソン 1 のプローブでは短縮型の mRNA を認めた。イムノブロットでは、脂肪組織と精巣の HSL 蛋白は HSLKO では検出されなかった。更に、HSLKO の白色脂肪組織、褐色脂肪組織、精巣では NCEH 活性は完全に消失していたので、HSL は機能的に失活していると考えられた。しかし、予想に反しマクロファージの NCEH 活性は野生型と同等であった。

**HSL の精子形成に及ぼす影響** 雄の HSLKO は不妊であった。雄の HSLKO は雌と交配すると膾栓は形成したが妊娠させなかった。一方、雌の HSLKO は不妊ではなかったため、HSL は精子形成に不可欠であった。HSLKO の精巣重

量は野生型の約 70%に減少していた。野生型の精子数は片側の精巣上体当たり平均  $7.7 \times 10^6$ であったのに対し、HSLKO のは平均 94 と著明に減少し運動能のある精子は存在しなかった。野生型のマウスの精細管上皮は通常 12 層あるが、HSLKO では成熟した精子細胞が減少しているため 5-7 層に減少し空泡形成も認められた。一方、ライディッヒ細胞を含む精巣間質系には異常は認められなかった。HSLKO の血清テストステロン、LH、FSH は野生型と同等なので、雄 HSLKO の不妊の原因は低ゴナドトロピン血症によるものではなかった。HSL は精子細胞で発現しているため、精子細胞の成熟に HSL は関与しているものと推察された。また、血清コルチコステロンは野生型と HSLKO との間で差はなく、ACTH による刺激にも差は見られなかったため、副腎でのステロイド合成にも HSL 欠損の影響はないと考えられた。

**HSLKO の脂肪組織** HSL は脂肪組織に高発現しているため、脂肪組織の重量、形態や体重について検討したが、HSLKO の脂肪組織の表現型は予想に反し軽度であった。HSLKO の褐色脂肪組織 (BAT) の重量は野生型の約 1.7 倍であった。BAT の TG 含量は増加していたが、DNA 含量は変わらなかったため、HSLKO の BAT の脂肪細胞は肥大していると考えられた。組織学的にも BAT の脂肪細胞の断面積は約 5 倍に増加していることが確かめられた。白色脂肪組織 (WAT) の脂肪細胞の肥大はそれほど顕著ではないが、HSLKO では野生型の約 2 倍に肥大していた。ただし、WAT の重量は傍精巣上体、後腹膜、大腿部脂肪組織のいずれにおいても野生型と HSLKO の間で差は見られなかった。これは、脂肪細胞が組織全体で一様に肥大しなかったからである。体重は 24 週齢まで測定したが、雌雄とも HSL の有無による差はなかった。また、HSL により生成される FFA はエネルギー源や熱産生に利用されるため、HSLKO では酸素消費量や熱産生は減少すると予想された。しかし、野生型と HSLKO の間では摂食条件下での酸素消費量と呼吸商の差は認められなかった。更に、絶食と B3 アゴニスト投与の条件でも差はなかった。寒冷に暴露した際の体温の変化は、野生型と HSLKO の間で差はなかったため、HSL が欠損しても熱産生には影響がないことが明らかになった。

**脂肪組織のリパーゼ活性** HSL は脂肪細胞の TG をグリセロールと FFA に水解するので、その寄与について検討した。まず脂肪組織の可溶性分画の TG リパーゼ活性を測定した。脂肪組織には HSL と LPL の 2 種類の TG リパーゼが発現している。活性測定に用いる人工基質はトリオレインなので両リパーゼの

基質になり得る。ただし、LPL 活性を抑制するため、1M NaCl の存在下でトリオレイン水解活性を測定した。WAT では HSL の欠損により TG リパーゼ活性は 60% の減少にとどまった。一方、BAT では野生型と HSLKO との間で TG リパーゼ活性にはほとんど差は見られなかった。即ち、脂肪組織には HSL と LPL と異なる TG リパーゼが存在することが明らかになった。

次いで残存リパーゼ活性のホルモン感受性について検討した。傍精巣上体の WAT より脂肪細胞を単離してイソプロテレノール (ISP) 刺激によるグリセロールと FFA の放出を測定した。HSLKO の脂肪細胞は、非刺激時において野生型の約 50% のグリセロールと約 80% の FFA を放出した。この所見は TG リパーゼ活性が残存している結果と合致する。ISP 刺激により野生型の脂肪細胞からのグリセロールと FFA の放出は増加した。一方、HSLKO では FFA の放出は増加したが、グリセロールの放出は有意には増加しなかった。HSLKO の脂肪細胞では ISP 刺激による正味の脂肪分解はグリセロールと FFA の両者とも野生型より少なかった (23% vs 55%)。また *in vivo* での検討も行なった。12 時間絶食時の血漿のグリセロールと FFA は、HSLKO の方が野生型に比べ有意に低かった (40% vs 55%)。次に ISP を腹腔内投与して 15 分後の血漿グリセロールと FFA を測定した。HSLKO の血漿グリセロールと FFA は野生型に比べ少なかった (39% vs 66%)。ISP による血漿グリセロールの正味の増加は HSLKO では野生型の 39% であったが、FFA の増加は HSLKO でむしろ多く野生型の約 1.2 倍であった。

以上の結果から、HSL 以外の TG リパーゼが脂肪細胞に存在し、ホルモン感受性である可能性が示唆された。このため HSLKO は肥満にならなかったと考えられた。

**まとめ** 本研究は HSL 欠損の表現型を初めて明らかにした。HSL は精子細胞の成熟に不可欠であるが、ステロイド合成に必須のものではなかった。精子形成でのエネルギー代謝の重要性が確認された。今後、精子形成過程での HSL を含めたエネルギー代謝の研究が、男性不妊症の成因解明に役立つものと期待される。また、HSL は脂肪細胞内の中性脂肪を水解する唯一のものではなかった。この残存する TG リパーゼの同定は、脂肪分解機構や肥満の病態の解明に貢献するものと期待される。更に、HSL を欠損したマクロファージは野生型と同等の NCEH 活性を示したので、マクロファージの NCEH 活性は HSL とは異なる CE 水解酵素によることが示唆された。この酵素の同定は動脈硬化の治療の観点から重要と考えられる。