

## 審査の結果の要旨

氏名 岸 安 宏

リゾホスファチジン酸(LPA)は、*in vitro*で細胞増殖、細胞運動性の亢進など多彩な機能を発揮するユニークな生理活性脂質である。LPAの作用は、G蛋白質共役型受容体を介することが知られており、近年、LPA受容体ノックアウトマウスを用いた解析から、LPAが脳神経系の発達や生殖系の発育に必須であることが明らかになってきた。LPAは血清中に多く含まれていることが知られているが、当教室ではこれまで血清中のLPA産生経路を解析し、血清LPAは様々な経路で産生されることを明らかにした。また、血清中の主要なLPA産生酵素リゾホスホリパーゼD (lysoPLD)の同定を行った。lysoPLDは血中に数百 $\mu$ Mと高濃度で存在するリゾホスファチジルコリン(LPC)をLPAに変換する酵素であり、本酵素を精製した結果、lysoPLDは癌細胞運動性促進因子であるautotaxinと同一であることがわかった。最近、当教室では、lysoPLDノックアウト(KO)マウスの解析が行われ、KOマウスが胚致死であること、lysoPLDヘテロマウスはlysoPLD活性やLPAレベルが野生型の半分になるにもかかわらずほとんど表現型を示さないことがわかった。本研究で、岸は、生体内におけるLPCの産生経路を解析し、LPCは複数の経路で産生されることを明らかにした。さらに、このうち特定の経路で産生されたLPCだけがlysoPLDの基質となることを見出した。

### 血中には複数のLPC産生経路が存在する

当研究室では、これまでリポタンパク質代謝に関わり、*in vitro*でPLA<sub>2</sub>活性を持つことが知られているレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)が血中LPC産生に関与することをヒトLCAT欠損者から単離した血漿を用い示している。そこで、岸は、まずLCATノックアウト(KO)マウスを用い血漿中のLPC及びLPA産生を解析することにした。その結果、野生型、LCAT KOマウスの血漿LPCはそれぞれ約500 $\mu$ M、約200 $\mu$ Mであった。次に、岸は、LPA濃度、LPA産生能を調べたところ、LCAT KOマウス血漿中LPA濃度、及び、加温血漿中でのLPAの産生能は野生型と比較してほとんど低下していないことを明らかとした。また、LCAT KOマウスではLPC産生量が野生型に比べ著しく低下していたものの少量のLPCが有意に産生されていることがわかった。従って、LCAT非依存的なLPC産生経路が血中LPA産生に重要であるものと考えられた。

### LCAT非依存的な血中LPC産生経路では不飽和LPCが主に産生される

岸は、LCAT 非依存的な LPC 産生経路を知る手がかりとして、electrospray ionization mass spectrometry (ESI/MS) を用いて単離血漿中、あるいは血漿加温後の LPC、LPA の脂肪酸組成を解析した。その結果、単離血漿中の LPC は、野生型マウスでは、16:0 LPC や 18:0 LPC などの飽和 LPC が主要な LPC 分子種であったのに対し、LCAT KO マウスでは、16:0 や 18:0 といった飽和 LPC が大きく低下していた。一方、加温血漿後の LPC においては、野生型マウスでは、飽和・不飽和どちらの LPC も産生され、LCAT KO マウスでは、不飽和 LPC のみが増加した。さらに、産生される LPA は、野生型、LCAT KO マウスともに、ほとんどが 18:2, 20:4 を含む不飽和 LPA であった。このことから、lysoPLD は LCAT 非依存的な経路によって産生される不飽和 LPC を基質とし、不飽和 LPA を主に産生することがわかった。

### lysoPLDへの基質供給としてのLPC産生経路ではheparin結合性のPLA<sub>1</sub>が関与している

不飽和LPCはホスホリパーゼA<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>)の作用によりPCより産生される。血中のPLA<sub>1</sub>活性を有する分子として、肝性リパーゼ(HL)や内皮細胞リパーゼ(EL)が知られている。どちらの分子もトリアシルグリセロールを分解する活性の他、*in vitro*でPLA<sub>1</sub>活性を持つことが報告され、また、血管内皮細胞の細胞壁にヘパラン硫酸糖鎖を介し結合した状態で存在し、heparinを投与することにより血中へ遊離されることが知られている。そこで、岸は、heparin投与ラットから調製した血漿中のLPC、LPA産生を検討した。その結果、LPC及びLPAの産生能は、heparin投与により顕著に上昇し、主に 18:2, 20:4, 22:6 を含むLPCやLPAが産生されることがわかった。次に、岸は、不飽和LPCが、実際に、HLやELなどのリパーゼによって産生されているかどうかを確認するために、リパーゼ阻害剤xenicalの効果を検討した。xenicalは、HL、ELを含めたリパーゼを広く阻害するリパーゼ阻害剤である。その結果、加温血漿中にxenicalを添加するとLPCだけでなくLPAの産生も顕著に抑制された。以上のことから、血中のlysoPLDへの基質供給にはHLやELなどのheparin結合性のPLA<sub>1</sub>が重要であることが明らかとなった。

### HLの血中LPA産生への寄与

岸は、EL、HL各KOマウスを用いてこれら分子の血中のLPA産生への関与を検討した。岸は、まず、EL、HL各KOマウスから血漿を単離して、37℃で加温したところ、HL KOマウスではLPA産生量が著しく低下することがわかった。また、同時に、不飽和LPCの産生量も減少していた。このことから、HLが個体レベルで、血中のlysoPLDへの基質供給に寄与していることが明らかとなった。一方、EL KOマウスでは予想に反してLPA産生の低下は認められなかった。

以上のように、岸は、HL、EL が LPC を産生することにより血中 lysoPLD を介する LPA 産生に大きく寄与することを明らかにした。lysoPLD は不飽和 LPC をより良い基質とすることが *in vitro* の解析からわかっていたが、この基質特異性は *vivo* レベルでも保たれていることが分かった。さらに、岸は、これまでに、EL や HL、lysoPLD が発生胚、妊娠マウスの卵巣黄体、動脈硬化巣などにおいて高発現していることを見出している。これらの部位においてリパーゼと lysoPLD が協調的に機能している可能性があり、今後、EL と HL のダブル KO マウスと lysoPLD KO マウスを交配することにより不飽和 LPC 産生酵素と LPA 産生酵素の機能を個体レベルで示すことができる。

本研究は、生体内における LPC の産生経路を解析し、このうち特定の経路で産生された LPC だけが lysoPLD の基質となるという非常に新しい概念を提供したことから、薬学(博士)に充分値するものと判断した。