

論文の内容の要旨

論文題目 肺サーファクタント脂質の生合成メカニズム

及び生体における機能の解析

指導教員 清水 孝雄 教授

東京大学大学院医学系研究科

2007年4月進学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

原山 武士

細胞膜の主成分として知られるリン脂質は、極性基のみならず、脂肪酸（アシル基）にも多様性を持つ。この分子種の多様性がリン脂質の機能の多様性に寄与すると考えられるが、その形成メカニズムおよび生物学的意義に関しては明らかでない点が多く残されている。リン脂質多様性形成メカニズム及び生物学的意義を解析する一環として、本研究では生物学的機能が比較的理解されている肺サーファクタント脂質に着目した。

肺サーファクタントは主成分をジパルミトイルホスファチジルコリン

(DPPC) により構成される界面活性物質であり、肺胞の表面張力を低下させる作用がある。肺サーファクタントが完全に欠損すると、肺胞の虚脱により正常な呼吸が不可能となり、死にいたることが知られている。肺サーファクタントの機能については、多くの研究により理解が比較的進んでいるものの、なぜその主成分が DPPC なのか、DPPC がどのように合成されるかに関しては明らかになっていなかった。

本研究では、様々な組織における DPPC 量の決定に一般的な原則が存在するかを調べるため、基本情報として様々な組織における DPPC 含量を、質量分析計を用いて調べた。その結果、肺のみならず、脾臓、脳、腎臓が DPPC を多く含む組織として同定された。

PC の生合成、及び脂肪酸リモデリングにおいて、アシル基の組成を決定しうるステップとして、リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素 (LPAAT) 活性、リゾホスファチジルコリンアシル基転移酵素 (LPCAT) 活性のいずれかが考えられた。DPPC の存在量決定において、どちらの活性が重要であるかを調べるためにリゾリン脂質アシル基転移酵素 (LPLAT) 活性を測定する方法を開発した。基質となるリゾリン脂質及びアシル CoA を酵素源と混合したのち、反応産物を質量分析計で調べるという方法で、同時に複数の基質が含まれる反応の測定が可能となった。

この方法により、LPAAT 及び LPCAT 活性のうち、パルミトイル CoA 選択性

を組織ごとに調べた。組織ごとのパルミトイル CoA 選択的な LPAAT 活性と DPPC 量は相関を示さなかった。一方、DPPC を合成する LPCAT 活性は肺、脳、脾臓に高く、LPCAT 活性と DPPC 量は統計的に有意な相関が得られた。このことは LPCAT 活性のパルミトイル CoA 選択性が組織 DPPC 量の決定に関わりうることを示唆した。

この酵素活性を担う酵素として、過去の知見から LPCAT1 が候補として考えられた。LPCAT1 は様々な既知の LPCAT 酵素の中でパルミトイル CoA に選択性を最も強く持つ。過去に cDNA クローニングされた LPCAT1 がデータベース情報に由来したため、cDNA 末端の迅速増幅法を用いてこの遺伝子の正確な全長情報及びアイソフォームに関する情報を得た。その結果、N 末端の異なる 4 つのアイソフォームをコードすると思われる mRNA 情報が得られた。定量的 RT-PCR により、我々のグループが最初に報告したアイソフォームが最も肺で高く発現することがわかったため、以降の実験ではそれを用いた。

抗 LPCAT1 抗体を作成し、これを用いてウエスタンブロットを行うと、LPCAT1 は肺において最も高く発現していた。また LPCAT1 過剰発現細胞の LPCAT 活性を調べると、コントロール細胞と比較して上昇した活性はパルミトイル CoA に選択的であった。さらに、LPCAT1 過剰発現細胞の PC 脂肪酸組成を調べると、DPPC 量の上昇が見られた。これらの結果から、LPCAT1 が肺において LPCAT 活性により

DPPC を合成することが示唆された。

上記の仮説を検証するため、LPCAT1 欠損マウスを作製した。LPCAT1 欠損マウスの肺、脾臓における PC の脂肪酸組成を調べると、確かに DPPC が減少しており、この酵素の DPPC 量決定に関する重要性が示された。

LPCAT1 が肺サーファクタント合成に関わることを調べるために、この酵素の局在をタンパク質レベルで解析した。マウス肺のホールマウント免疫染色を行うと、肺胞上皮 II 型細胞（肺サーファクタントの産生細胞）様の染色パターンが得られ、この酵素が確かに肺サーファクタント合成に関わりうることがわかった。

LPCAT1 と肺サーファクタント PC の関与をより直接的な関与を調べるため、野生型マウスと LPCAT1 欠損マウスを用いて肺胞洗浄を行い、含まれる PC を質量分析計で解析した。得られた総イオン数には両群で差が見られなかったため、LPCAT1 が肺サーファクタントの総量決定に関係しないと考えられた。一方、PC の脂肪酸組成に着目すると、DPPC が減少した一方、二重結合を含むような分子種の増加が見られた。このことは LPCAT1 が正常な脂肪酸組成を持った肺サーファクタント脂質の合成に関わるということがわかった。

LPCAT1 欠損マウスは正常に呼吸が可能であり、出生直後での死亡率の変化は見られなかった。このことは LPCAT1 の欠損による PC 脂肪酸組成の変化が呼吸に

最低限必要な表面張力の低下には必ずしも必要でないことを示す。

一方、病態時において LPCAT1 欠損がマウスの生存に影響を及ぼすかを調べるため、急性肺障害モデルとして人工呼吸器関連肺傷害モデルを用いた。その結果、LPCAT1 欠損マウスは野生型マウスと比較して生存率の低下、エラスタンスの上昇、酸素飽和度の低下、浮腫の増悪が見られ、LPCAT1 がもたらす正常な肺サーファクタント脂質組成が急性肺障害に対して保護的に働くことが示唆された。

これらの実験はリン脂質多様性の意義解析の一環として最もよく理解されている脂質の1つである DPPC に着目して行った。その結果、LPCAT 活性による DPPC 量決定メカニズムが示唆された。今回用いたアプローチにより、DPPC のみならずより多種のリン脂質の脂肪酸組成決定に関わるメカニズムが明らかになると思われる。

また、リン脂質多様性決定メカニズムが明らかになるということは、各分子種の存在比を操作できることを示唆する。本実験では LPCAT1 の過剰発現、遺伝子欠損により DPPC の量の人工的な操作に成功した。このアプローチを用いて、生体において DPPC がどのような機能を持つのかを部分的に明らかにした。今後、同様の操作を他の酵素で行うことにより、リン脂質の多様性が少しずつ明らかになると思われる。

LPCAT1 欠損マウスの解析から、この酵素が肺サーファクタント PC の量でなく、脂肪酸組成決定に関与することがわかった。このマウスの樹立は肺サーファク

タント PC がなぜ DPPC を主に含むのかを明らかにできると考えられた。実際、このマウスが急性肺障害モデルに対して高い感受性を示したことから、正常な脂肪酸組成を持った肺サーファクタント PC が保護的な機能を持つことが示唆された。

対象を DPPC に限定した研究ではあるが、リン脂質多様性の獲得メカニズム、及びその意義を解析する方法論の確立、実践を行ったことは、今後より多くのリン脂質をターゲットとした研究の足がかりになると期待される。ポストゲノムの重要課題であるリポドミクスは脂質の多様性を解析する研究でもあり、今回の研究成果は重要な一歩であると考えられる。