

# 論文の内容の要旨

論文題目

ホスファチジルイノシトール特異的脂肪酸転移酵素 LPIAT1 の機能解析

氏名 李 賢哲

## 【序】

ホスファチジルイノシトール (PI)は、イノシトール環にリン酸基が付加されたポリホスホイノシタイド (PIPs)の前駆体であり、PIPs 結合蛋白質の時空間的制御、細胞の増殖、遊走、細胞骨格制御、小胞輸送など様々な生命現象に関与するリン脂質である。PI は極性頭部だけでなく脂肪酸鎖についても特徴的な構造を持つことが知られており、その大部分は *sn*-1 位にステアリン酸 (18:0)、*sn*-2 位にアラキドン酸 (20:4)を有する。しかしながら、PI が何故このような特徴的な脂肪酸組成を持つのか、その生物学的意義はこれまで明らかになっていない。

私は修士課程において、線虫 *C. elegans* を用いた RNAi スクリーニングにより、PI にアラキドン酸を導入する脂肪酸転移酵素、*mboa-7* を同定した (Lee *et al*, *Mol. Biol. Cell*, 2008)。私は博士課程において、哺乳動物における PI 脂肪酸分子種の生物学的意義を明らかにするため、マウスにおける *mboa-7* の相同分子 (LPIAT1; Lysophosphatidylinositol acyltransferase 1) に着目し、LPIAT1 欠損細胞ならびに LPIAT1 欠損マウスを用いて、機能解析を行った。

## 【方法と結果】

### 1. LPIAT1 欠損マウスの脳は PI および PIPs の脂肪酸組成が変化する

LPIAT1 欠損マウスでは各臓器においてアラキドン酸を PI へ導入する脂肪酸転移活性が完全に欠失している。そこで、表現型が強く見られる脳に着目し（後述）、PI の脂肪酸組成が変化しているか、ガスクロマトグラフィーおよびマススペクトロメトリーを用いて詳細に調べた。その結果、LPIAT1 欠損マウスの脳では野生型に比べて PI 中のアラキドン酸 (20:4n-6) の量が有意に減少しており、不飽和度の低い脂肪酸やドコサヘキサエン酸 (DHA; 22:6) を持つ分子種に置き代わっていた。また、LPIAT1 欠損マウスの脳における PIPs の脂肪酸組成についても調べた結果、アラキドン酸量が減少しており、PI と同様の脂肪酸組成の変化が起こっていた。以上の結果から、LPIAT1 欠損マウスの脳では、PI に加えて PIPs の脂肪酸組成も変化していることが分かった。

### 2. LPIAT1 欠損細胞における PIPs 量の変化

PIP<sub>s</sub> の脂肪酸組成の変化が PIP<sub>s</sub> の量に影響を与えるか調べるため、マウス胎児線維芽細胞 (MEF) を用いて PIP<sub>s</sub> 量の測定を行った。MEF をイノシトールを含まない培養液で 12 時間培養した後、トリチウム標識したイノシトールを添加し、24 時間後にラベルされた PI および PIP<sub>s</sub> の量を HPLC を用いて計測した。その結果、LPIAT1 欠損 MEF 細胞では PI の量には変化はなかったが、PIP<sub>s</sub> のうち、イノシトール環の 3 位がリン酸化された PI3P の量が増加していることが分かった。また、神経初代培養細胞を用いた同様の実験においても PI3P 量が増加している傾向にあった。以上のことから、LPIAT1 の欠損による PI の脂肪酸組成の変化が、PI3P の合成、あるいは PI3P の分解に影響を与える可能性が考えられた。

### 3. LPIAT1 欠損神経細胞におけるアラキドン酸の動態

LPIAT1 の脂肪酸代謝における寄与を細胞レベルで調べるため、神経初代培養細胞に放射標識したアラキドン酸を加え、その動態を調べた。その結果、PI へのアラキドン酸の取り込みが 34% 減弱し、相補的に PC への取り込みが増加した。また、放射標識後にチェイスすると、野生型マウス由来の細胞では PI におけるアラキドン酸量が次第に減少するのに対し、LPIAT1 欠損マウス由来の細胞

ではほとんど変化しなかった。このことから、LPIAT1 欠損神経細胞では PI におけるアラキドン酸の代謝回転が抑制されていることが明らかになった。

#### 4. LPIAT1 欠損マウスは脳皮質の層構造形成に異常を示す

脳の層構造は胚発生後期に生じた神経細胞の脳室側から脳皮質の表層側への順次的な移動により構築される。これまでの解析から、LPIAT1 欠損マウスでは脳皮質の層構造が乱れており、全体的に萎縮していることが分かっていた。脳皮質の層構造の異常の原因として、LPIAT1 欠損マウスにおいて神経細胞の移動が異常である可能性が考えられた。そこで、胚発生後期である E15.5 に生じる神経細胞を BrdU で標識し、E18.5 における BrdU ポジティブな細胞の脳皮質における分布を調べた。その結果、LPIAT1 欠損マウスの脳皮質では BrdU ポジティブな細胞が野生株に比べ、より脳室側に多く分布しており、神経細胞の移動が遅延していることが分かった。

脳皮質の萎縮の原因として、LPIAT1 欠損マウスの脳皮質において、①神経細胞の分化が異常である可能性、および、②神経細胞の細胞死が亢進している可能性、が考えられる。神経細胞への分化についてマーカー分子 ( $\beta$  III-tubulin, Tbr1 & MAP2) の抗体染色で調べた結果、LPIAT1 欠損マウスでは神経細胞の分化は正常であった。また、BrdU ポジティブな細胞の数には顕著な差はなかったことから、LPIAT1 の欠損は神経細胞の増殖には影響していないと考えられた。次に、TUNEL アッセイを行った結果、LPIAT1 欠損マウスの脳皮質ではアポトーシスが過剰に起こっていることが分かった。以上のことから、LPIAT1 欠損マウスの脳皮質では神経細胞移動の異常により層構造の乱れが、アポトーシスの亢進により萎縮が引き起こされることが示唆された。

#### 5. LPIAT1 欠損により神経突起が減退する

LPIAT1 欠損マウスの神経系における異常を細胞レベルで解析するため、初代培養神経細胞の形態を観察した。その結果、LPIAT1 欠損マウス由来の神経細胞では神経突起を持つ細胞の割合が有意に減少していることが分かった。また、野生株由来の神経細胞に比べ、神経突起の長さが有意に短いことが分かった。このことから、神経細胞の突起伸展の異常が LPIAT1 欠損マウスの脳皮質の形態異常の一因である可能性が示唆された。

## 【総括】

本研究において私は、① 哺乳動物 LPIAT1 が PI へのアラキドン酸の導入に寄与しており、生体膜における PI の脂肪酸組成を規定すること、② PI の脂肪酸組成の変化に伴って PIPs の脂肪酸組成も変化すること、③ LPIAT1 欠損細胞では PI3P の量が増加していること、④ LPIAT1 の欠損により神経細胞の移動や細胞死、突起伸展に異常を来し、その結果、脳において著しい形態異常を示すことを明らかにした。PI3P はエンドサイトーシスなどの小胞輸送やオートファジーに重要な役割を担う PIPs として知られている。線虫の LPIAT1 欠損変異体において *mtm-3* (PI3P 3-phosphatase) を発現抑制すると、顕著に成長が抑制されるという結果を得ており、LPIAT1 の欠損によって PI3P の増加に高感受性になっていることが示唆される。一方、最近 PI の PI3P へのリン酸化を担うキナーゼである Class III PI 3-キナーゼの欠損マウスが大脳皮質の層構造形成に異常を来すという報告がなされている。LPIAT1 の欠損によって起こる PI3P 量の増加と脳の表現型との関係は現時点では不明であるが、LPIAT1 の欠損によって、PI の脂肪酸組成が変化することで PI3P 量の厳密な制御機構が破綻し、このことが大脳皮質の層構造形成に異常を来す原因なのではないかと考えている。

今後、なぜ PI のアラキドン酸量の減少が PI3P 量の増加を招くのか、それがどのように脳の表現型と結びつくのかを明らかにすべく、LPIAT1 欠損マウスや細胞を用いて研究を進めていきたい。