

審査の結果の要旨

氏名

李賢哲

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。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ち、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、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明らかになっていない。李賢哲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。この研究を発展させ、博士課程においてマウスにおける *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、機能解析を行い、以下の点を明らかにした。

まず、李は、作製した 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ことを確認した。さらに、表現型が強く見られる脳に着目し、PI の脂肪酸組成を調べた結果、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ることを明らかにした。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、PI と同様の脂肪酸組成の変化が起こっていることを明らかにした。

次に、李は、マウス胎児由来の線維芽細胞 (MEF)を用いて PIPs 量の測定を行った。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、PIPs 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を見出した。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を示した。

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大脳皮質の表層側への順次的な移動により構築される。LPIAT1 欠損マウスでは大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。李は、大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

ある可能性を考えた。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大脳皮質における分布を調べた。その結果、LPIAT1 欠損マウスの大脳皮質では 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を見出した。次に、神経細胞への分化についてマーカー分子の抗体染色を行い、LPIAT1 欠損マウスでは神経細胞の分化は正常であることが判明し、また、BrdU ポジティブな細胞の数には顕著な差を認めなかったことから、LPIAT1 の欠損は神経細胞の増殖には影響していないことを示した。さらに、TUNEL アッセイを行った結果、LPIAT1 欠損マウスの大脳皮質ではアポトーシスが過剰に起こっていることを見出した。以上のことから、李は、LPIAT1 欠損マウスの大脳皮質では神経細胞移動の異常により層構造が乱れ、さらにアポトーシスの亢進により萎縮が引き起こされることを示した。

最後に、李は、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を見出した。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も見出した。このことから、李は、神経細胞の突起伸展の異常が LPIAT1 欠損マウスの大脳皮質の形態異常の一因である可能性を示唆した。

以上、李は、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。これらの成果は、PI の脂肪酸鎖の生理機能を明らかにするとともに、脳形態形成における PI の脂肪酸の意義を明らかにした点で、博士（薬学）に値すると判断した。