

## 論文の内容の要旨

論文題目 マウス網膜組織における脂質転移酵素 LPCAT1 の機能解析

氏名 齋藤 雅倫

網膜は光刺激を受容し、電気生理シグナルへの変換を行う視覚機能の中枢を担う組織であり、視覚機能と脂質の関係性についてはこれまでに数々の興味深い報告がなされている。Docosahexaenoic acid (DHA) に代表される多価不飽和脂肪酸は、視覚シグナル伝達の活性化や視細胞の発生や形体形成、機能維持に重要な役割を果たしていると考えられている。

リン脂質は生体膜を構成する主成分であり、その多様性はリゾリン脂質転移酵素によって獲得される。lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) は、リゾリン脂質であるリゾホスファチジルコリン (LPC) からホスファチジルコリン (PC) を生成する酵素として知られている。2010 年に入り、網羅的遺伝子の解析から LPCAT1 が網膜で顕著な発現増加を示し、同遺伝子の変異タンパク質をコードする突然変異体マウス (*rd11*) では視覚機能が低下する事が報告された。また、網膜組織での高い発現や糖尿病患者でその発現量が低下する事が報告されている。しかし、*rd11* マウスでは LPCAT1 以外の遺伝子にも変異が生じていることから、LPCAT1 単独の作用を検証している確証が得られていない。

そこで、本研究では当研究室で樹立された LPACT1 の単独欠損マウスを用いて LPCAT1 が網膜組織に及ぼす影響の解明に着手した。

LPCAT1 を含む 43 種類の脂質代謝関連酵素の発現様式を、胎生 14 日から 3 週齢までの 4 点で PCR アレイを用いて測定したところ、41 種類の酵素で 3 週齢での相対的発現強度が最も高くなっており、生体膜リン脂質の生合成と多様性の獲得に関わる酵素が成熟した網膜の機能強く関連している事が推測された。

LPCAT1 mRNA の発現変動を胎生 18 日、生後 0 日、8 日、2 週齢、3 週齢、成体の 6 点で測定したところ、胎生期に比べ生後 8 日から発現量が経時的に上昇した。LPCAT1 は肺にも高い発現が確認されており、呼吸に必須な肺サーファクタントの合成に寄与する事が伺われる。LPCAT1 は肺組織で高い発現量を示す事が知られているが、その発現変動の様子は出生の前後で発現量のピークを迎え、網膜組織での発現パターンとは異なる結果となった。

抗 LPCAT1 抗体を用いた網膜の免疫組織染色より、LPCAT1 が網膜の外節、内節、神経節細胞層、そして各層の間隙に存在する内網状層、外網状層に存在し、抗ロドプシン抗体との二重染色により LPCAT1 が外節、内節に強く発現している事が示された。LPCAT1 欠損マウスでは生後 3 週目から総タンパク質量と桿体細胞を含む外顆粒層の減少、眼球サイズの縮小が確認された。

また、LPCAT1 の欠損により網膜組織を構成する細胞群の構成の変化を、免疫組織染色及びウェスタンブロッティングにより検証した結果、3 週齢以降の LPCAT1 欠損マウスでロドプシンの発現が低減し

ており、その差は 5 週齢でより顕著になった。ロドプシン産生に寄与する桿体細胞以外の網膜細胞は LPCAT1 欠損マウスにおいても発現しており、LPCAT1 の欠損に伴う影響は桿体細胞に限局していた。

LPCAT1 の欠損に伴う桿体細胞の消失メカニズムを解析するため、フローサイトメーターによるアネキシン V とヨウ化プロピジウムの二重染色で死細胞群の割合を測定したところ、3 週齢以降の LPCAT1 欠損マウスでアポトーシスが誘導された細胞集団の割合が増加していた。また、免疫組織染色による活性型 Caspase-3 の発現を解析した結果、4 週齢以降の LPCAT1 欠損マウスで活性型 caspase-3 の陽性率が有意に増加していた。

視細胞に細胞死を誘導するシグナルとして、光刺激の存在が報告されており、LPCAT1 欠損マウスの遮光環境下における視細胞の形成を検証した。遮光環境下で 5 週間飼育したところ、通常の飼育環境下と同様に LPCAT1 欠損マウスにおいて総タンパク量、外顆粒層の減少に伴うロドプシン産生の消失が確認され、LPCAT1 欠損に伴う視細胞への細胞死誘導シグナルは光刺激非依存的であると考えられた。

質量分析機を用いたリン脂質解析より、LPCAT1 欠損マウスでは 32:0-PC (DPPC, Dipalmitoylphosphatidylcholine; LPCAT1 の主反応産物) と DHA を含むと想定される 44:12-PC や 44:12-PE (ホスファチジルエタノールアミン)、44:12-PS (ホスファチジルセリン) の割合が減少していた。視細胞の細胞死は脂質組成バランスの破綻で生じる事が知られており、LPCAT1 欠損に伴う脂質組成の変化が、LPCAT1 欠損マウスにおける外顆粒層の細胞死を誘導した可能性が考えられた。

本研究から、LPCAT1 が生後 8 日からマウス網膜で発現上昇を示し、視細胞の分化、成熟に関与する

可能性が示され、LPCAT1 の欠損により、少なくとも 3 週齢から外顆粒層に異常が生じる事が確認された。LPCAT1 欠損マウスの網膜では、DPPC の存在割合は 2 週齢から、DHA を含有する 44:12-PC の存在割合は 3 週齢から、44:12-PE や 44:12-PS の存在割合は 4 週齢から減少傾向にあり、4 週齢から caspase-3 活性が亢進している事より、時系列的に LPCAT1 欠損に起因した脂質組成の変化が caspase-3 依存的な外顆粒層の細胞死を誘導した可能性が考えられた。