

新規リン脂質 *sn*-1 位アシル基転移酵素の同定と解析

分子細胞生化学分野
川名 裕己

【背景・目的】

リン脂質の脂肪酸配置にはリゾリン脂質に対してアシル CoA からの脂肪酸の転移を触媒するリゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ (LPLAT) が重要な働きを担い、これまでに *in vitro* の活性評価から十数種類の遺伝子が単離されている。これまで多くの LPLAT 分子が 1-アシル型リゾリン脂質の *sn*-2 位に脂肪酸を導入している分子として特徴づけられる。一方で 2-アシル型リゾリン脂質の *sn*-1 位への導入活性が知られる分子は哺乳類では LCLAT1 (LYCAT) のみであり、*sn*-1 位導入 LPLAT の同定は進んでいない。このように *sn*-1 位導入 LPLAT の同定が進んでいない原因としてその活性検証に必要な不可欠な 2-アシル型のリゾリン脂質が化学的に不安定であり、*in vitro* での活性評価が十分に行えなかったことが挙げられる。私の研究室では先行研究により不安定な 2-アシル型リゾリン脂質を酸性溶媒中で安定的に取り扱う方法を報告した (JLR 2014)。私はこの方法を応用し、2-アシル型リゾリン脂質を用いた *sn*-1 位アシル基導入活性評価系を構築し、LPCAT1 分子をモデル分子としてこの評価系の有用性を示した (投稿中)。既存の *sn*-1 位導入酵素である LCLAT1 だけでは全ての *sn*-1 位導入酵素活性を十分に説明できないことから未同定の *sn*-1 位導入 LPLAT 分子の存在が示唆されていた。また、私は培養細胞において LPLAT 反応の阻害する化合物を探索する過程において培養細胞が内在性にリゾリン脂質に対して強い *sn*-1 位アシル化活性を持つ可能性を見出した。そこで本研究では *sn*-1 位アシル化 LPLAT 活性評価系を用いて *sn*-1 位にアシル基導入活性を示す LPLAT 分子の探索を行い、同定した LPLAT 分子の性状解析並びに機能解析を行った (Figure1)。

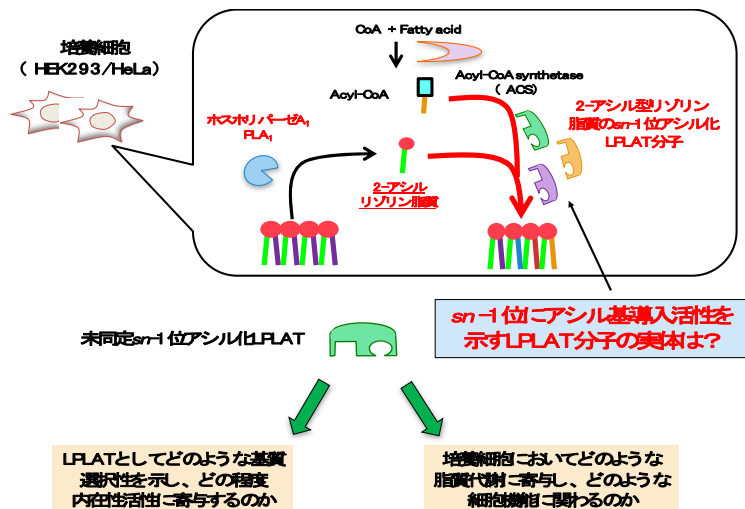


Figure1 本研究の目的

【方法・結果】

まず初めにヒト培養細胞において候補分子となる 11 種の LPLAT 分子の発現抑制時の 2-アシル型リゾリン脂質の増加を捉えることで *sn-1* 位アシル化 LPLAT の同定を試みた。しかしながら単独の LPLAT の発現抑制では 2-アシル型リゾリン脂質の増加は捉えられなかった。さらに複数の LPLAT

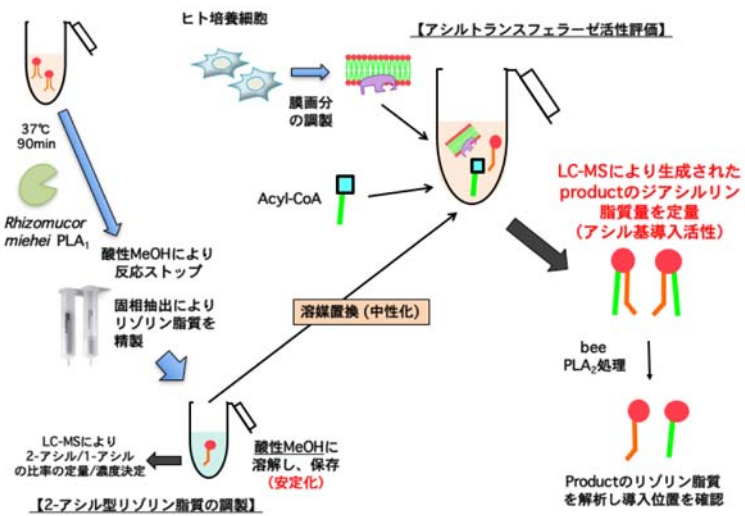


Figure 2 *sn-1* 位アシル化 LPLAT 活性の評価

発現抑制時のリゾリン脂質解析も行なった。2-アシル型リゾリン脂質の増加傾向が観察される条件もあったが劇的な 2-アシル型リゾリン脂質の変動は観察されなかった。

そこでより直接的に *sn-1* 位アシル化 LPLAT の活性を評価する実験系で検討を行なった。高純度の 2-アシル型リゾリン脂質を調製する方法を検討し、得られた 2-アシル型リゾリン脂質を用いた *sn-1* 位アシル化 LPLAT の活性評価系を構築した (Figure2)。この評価系を用いることで未同定の *sn-1* 位アシル化 LPLAT の探索を進めた。ヒト培養細胞において既知 LPLAT が属する Family 分子 11 種類の遺伝子に対して siRNA を用いた発現抑制を行い、膜画分を調製して 2-アシル型 LPC を用いた *sn-1* 位導入活性を評価した。すると LPGAT1 を発現抑制した時に *sn-1* 位導入活性が大きく減弱し。

(Figure3)。

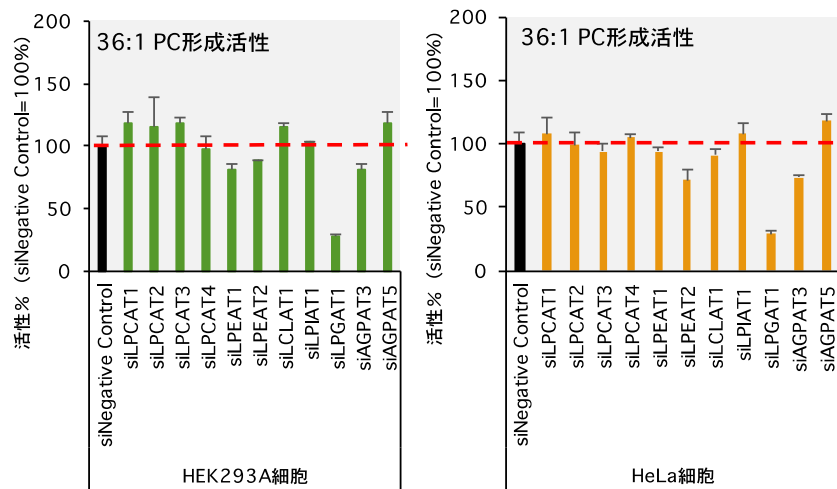


Figure 3 LPLAT 発現抑制時の *sn-1* 位アシル化 LPLAT 活性の評価

	基質	LPC	LPE	LPI	LPS	LPG	LPA
<i>in vitro</i> LPGAT1 の活性	18:0 CoA	活性あり	活性あり	活性あり	活性あり	活性あり	非常に 弱い
	18:1 CoA	弱い が 活性あり	弱い が 活性あり	非常に 弱い	弱い が 活性あり	弱い が 活性あり	活性検出 できない
	16:0 CoA	活性あり	活性あり	活性あり	活性あり	活性あり	非常に 弱い

リゾリン脂質はいずれも
2-アシル型を好む傾向



Table1 LPGAT1の *in vitro* LPLAT活性のまとめ

次に LPGAT1 過剰発現細胞から膜画
分を調製し、2-アシル型、1-アシル型リ
ゾリン脂質を基質として活性を評価す
ると LPA 以外の 2-アシル型リゾリン
脂質を認識して飽和型のアシル CoA
(ステアрил CoA/18:0-CoA) を好み、
sn-1 位へのアシル基導入活性が確認さ
れた (Table1)。LPGAT1 は培養細胞
が有する LPC、LPE、LPS に対する *sn*-
1 位導入活性の大部分を担い、
LPGAT1 発現抑制細胞のリン脂質解
析から 36:1 の脂肪酸鎖を有するリン
脂質の形成に特異的に関わることがわ
かった (Figure 4)。培養細胞レベルで
は飽和脂肪酸含有リン脂質の中でもス
テアリン酸含有リン脂質の形成に重要
であることが想定された。さらに
LPGAT1 発現抑制細胞においてミト
コンドリアを染色、観察するとミトコ
ンドリア形態の断片化が観察された。
以上から LPGAT1 の機能として産生
する飽和脂肪酸含有リン脂質がミトコ
ンドリアの形態制御に大きく寄与する
可能性が示唆された。

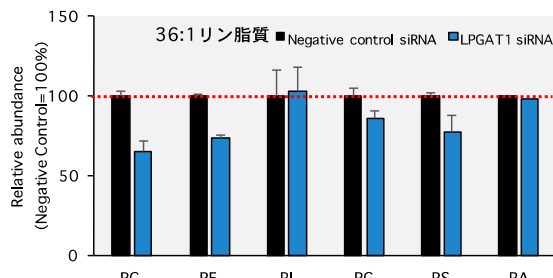
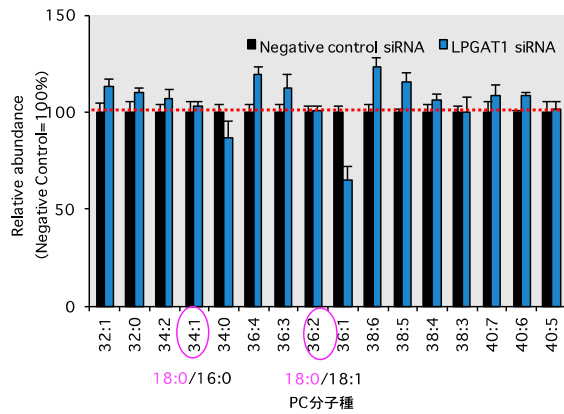


figure 4 LPGAT1発現抑制細胞のリン脂質解析

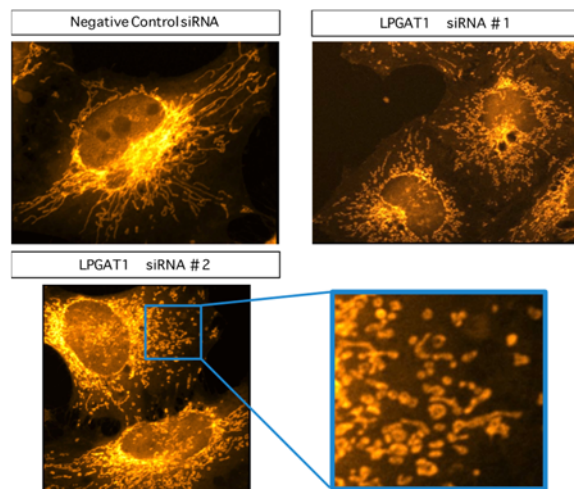


Figure 5 LPGAT1発現抑制細胞のミトコンドリア形態

【考察・今後の展望】

既存の *sn*-1 導入 LPLAT である LCLAT1 が LPI に対する活性への寄与が大きい一方で我々が同定した LPGAT1 は LPC、LPE、LPS といった LCLAT1 では説明がつかない *sn*-1 位導入活性を担い、既存の酵素とは異なるリン脂質群の代謝活性に重要な分子であることが示唆された。また細胞レベルではリン脂質 *sn*-1 位の代謝反応あるいは特異的な脂肪酸鎖を有するリン脂質形成がミトコンドリアの形態を制御する可能性が明らかとなった。今後、LPGAT1 を欠損した細胞や動物の解析からリン脂質の *sn*-1 位代謝機構の生理的な意義が明らかにできると考えられる。また飽和脂肪酸含有リン脂質がミトコンドリア機能を修飾する点から飽和脂肪酸含有リン脂質の摂取によるミトコンドリア機能改善などの食品化学やミトコンドリア関連疾患の治療などへの応用も期待される。

論文審査結果の要旨

論文提出者: 川名 裕己

論文審査委員 (主査): 松沢 厚

論文題目: 新規リン脂質 *sn*-1 位アシル基転移酵素の同定と解析

リン脂質の脂肪酸配置には非対称性が存在することが知られている。すなわち、グリセロール骨格の *sn*-1 位には飽和型脂肪酸が主に結合し、*sn*-2 位には不飽和型脂肪酸が主に結合している。リン脂質の脂肪酸部決定機構にはホスホリパーゼ A (PLA) によるリゾリン脂質の産生とリゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ (LPLAT) によるリゾリン脂質のアシル化が重要な働きを持ち、これらの分子による脂肪酸部の編集機構は脂肪酸リモデリング機構として知られている。これまでに *sn*-2 位のリモデリング機構を司る分子やその機能が明らかにされつつある一方で、*sn*-1 位のリモデリング機構の反応そのものや関わる分子の同定はわずかであり、解析は進んでいない。本研究では *sn*-1 位アシル基導入反応を評価する実験系を構築して、*sn*-1 位アシル基導入 LPLAT の探索を行い、同定された LPGAT1 の生化学的解析やリン脂質代謝への影響の検討、さらに細胞レベルでの機能の解析を行った。

まず、*sn*-1 位アシル基導入反応評価系の構築のために *in vitro* PLA₁ 反応や精製方法の検討を行い、酸性化溶媒中で保存することでこれまで難しかった 2-アシル型リゾリン脂質の大量調製に成功した。この 2-アシル型リゾリン脂質とアシル CoA を基質として培養細胞由来の膜画分の活性評価を行うと内在性の強い *sn*-1 位アシル基導入活性を確認できた。次にこの内在性活性の分子の実態に迫る目的で LPLAT 分子が属する AGPAT/MBOAT family の LPLAT 分子 11 種を培養細胞で発現抑制した時の膜画分の *sn*-1 位アシル基導入活性を評価した。すると LPGAT1 を発現抑制した時に顕著な *sn*-1 位アシル基導入活性の低下を観察したことから LPGAT1 を *sn*-1 位アシル基導入 LPLAT 分子の候補として見出した。LPGAT1 の直接の *sn*-1 位アシル基導入活性の評価を行うために LPGAT1 を過剰発現した細胞より膜画分を調製して様々なリゾリン脂質やアシル CoA を基質として活性の評価を行った。LPGAT1 は 2-アシル型リゾリン脂質を好み、リゾホスファチジルコリン (LPC)、リゾホスファチジルエタノールアミン (LPE)、リゾホスファチジルセリン (LPS)、リゾホスファチジルグリセロール (LPG) を主に認識して飽和型アシル CoA からの飽和脂肪酸を *sn*-1 位に導入する活性を有することが明らかになった。内在性の LPGAT1 の脂質代謝能を解析する目的で LPGAT1 を発現抑制した HeLa 細胞の活性を評価するとパルミチン酸 (16:0) を導入する活性の変動はわずかであったがステアリン酸 (18:0) を導入する活性は大きく低下した。また発現抑制した HeLa 細胞ではホスファチジルコリン (PC) などで

ステアリン酸を含有の 36:1 リン脂質の減少が観察された。予備的知見だが LPGAT1 の欠損マウスの血清中 PC の解析から顕著にステアリン酸含有リン脂質が低下している傾向も示された。このことから内在性に LPGAT1 はステアリン酸をリン脂質の *sn*-1 位に導入し、ステアリン酸含有リン脂質の形成に置いて重要な機能を持つことが明らかになった。さらに細胞レベルでの機能探索を目的として LPGAT1 発現抑制細胞のオルガネラ形態を観察すると発現抑制細胞ではミトコンドリアが断片化することが明らかとなった。発現抑制細胞では分裂因子 Drp1 のミトコンドリアへの集積が亢進しており、断片化には分裂因子の機能亢進が想定された。近年、ステアリン酸がミトコンドリア形態に影響をする知見も報告されており、このステアリン酸の作用は LPGAT1 により形成されるステアリン酸含有リン脂質を介してミトコンドリア形態を直接的に制御する新たなメカニズムの存在を示唆する結果であると考えられた。

本研究は、これまで明らかにされてこなかった *sn*-1 位アシル基導入 LPLAT 分子として LPGAT1 を見出し、リン脂質の *sn*-1 位のステアリン酸化を担う重要な分子であることを示した初めての知見である。また LPGAT1 より形成されるステアリン酸含有リン脂質はミトコンドリア機能を制御する可能性も示唆された。このことからステアリン酸含有リン脂質を通じたミトコンドリア機能改善を期待した創薬や研究展開も期待でき、非常に興味深い研究成果である。よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として合格と認める。

(1620 文字)