

ゼブラフィッシュを用いた生体膜リン脂質脂肪酸リモデリング酵素の機能解析

分子細胞生化学分野 柴田 剛明

【背景・目的】

細胞膜の主成分であるグリセロリン脂質（以下、リン脂質）は、グリセロール骨格の *sn*-1 位と *sn*-2 位に脂肪酸（アシル基）が、*sn*-3 位にリン酸基と極性基から成る極性頭部が結合した構造を持つ。極性基と脂肪酸の組み合わせにより、生体内には 1,000 種類以上のリン脂質分子種が存在し、その一部は特定の細胞やオルガネラに偏在し固有の機能を持つことが明らかになっている。このような多様なリン脂質分子種の機能を解明するためには、それぞれのリン脂質分子種の産生に関わる酵素群を明らかにする必要がある。それら酵素群の中で私は、リゾリン脂質アシル基転移酵素（Lysophospholipid acyltransferase; LPLAT）に着目した。LPLAT はリゾリン脂質に脂肪酸を導入してリン脂質を合成する活性を有するリン脂質産生の最終段階の酵素であり、ヒトゲノムには 14 種類の LPLAT 遺伝子 (*LPLAT1-14*) が存在することがわかっている。

これまでに遺伝子ノックアウト（KO）マウスを中心とした解析から、LPLAT12/LPCAT3 が C20:4（アラキドン酸）含有リン脂質の産生を通じて小腸における正常な中性脂質輸送に、LPLAT3/AGPAT3 が C22:6（DHA）含有リン脂質の産生を通じて正常な網膜の層構造の形成や精子形成に寄与することが明らかにされた。しかし、14 種類の LPLAT の多くは、基質特異性などの生化学的機能や個体レベルでの機能が未解明である。一般に、マウスを用いた生理機能解析は遺伝子多重欠損体作出が容易ではない、発生期の解析の難易度が高いなどの欠点がある。よって、哺乳類と類似の脂質組成や LPLAT 保存性を有するモデル生物を導入することで LPLAT 研究が加速できると考えられる。

本研究ではまず、マウスに次ぐ新たなモデル生物を検討した。哺乳類とのリン脂質分子種組成の類似性、LPLAT の保存性を指標に幅広いモデル生物を探索した結果、ゼブラフィッシュが LPLAT とリン脂質分子種を解明するためのモデル生物として有用であることを見出した。本研究ではさらに、当研究室において培養細胞やマウス個体レベルでリン脂質の *sn*-1 位に C18:0（ステアリン酸）を導入する LPLAT として見出された LPLAT7/LPGAT1 に着目し、CRISPR/Cas9 法を用いて *lpgat1* KO ゼブラフィッシュを作製しその生理機能解析を実施した。

【方法・結果】

(1) LPLAT の機能解析に適した新たなモデル生物の探索

マウスに次ぐ新たなモデル生物を考察するにあたり、代表的なモデル生物（マウス、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、線虫、酵母、大腸菌）について、LC-MS/MS を用いたリン脂質分子種組成解析と、LPLAT 分子の保存性の解析を行った。ショウジョウバエ、線虫、酵母、大腸菌のリン脂質分子種組成は哺乳類と大きく異なっていた。一方で、ゼブラフィッシュのリン脂質分子種組成は哺乳類と高い相関性を示した。また、ゼブラフィッシュでは C22:6 (DHA) 含有リン脂質が哺乳類より特に豊富であることもわかった。

NCBI データベースに登録されているヒト LPLAT のホモログを抽出、ヒト LPLAT の相同配列を BLAST で検索、文献調査から、各

モデル生物に保存されている LPLAT 分子をリストアップした。すると、ゼブラフィッシュでは 14 種類中 13 種類の LPLAT が保存されているのに対してショウジョウバエ以下では多くの LPLAT は保存されていなかった (Fig. 1)。また、主要な LPLAT 分子 (LPLAT3/AGPAT3、LPLAT8/LPCAT1、LPLAT12/LPCAT3) についてヒトとゼブラフィッシュオルソログ間での酵素活性を比較するとほぼ同等の *in vitro* 酵素活性パターン (基質選択性) を示した。興味深いことに、ヒト LPLAT12 が強い C20:4 導入活性を有したのに対し、ゼブラフィッシュ LPLAT12 はそれに加えて C22:6 を導入する活性も有していた。以上の結果から、ゼブラフィッシュは LPLAT が哺乳類との間で高度に保存されていると共に、リン脂質組成も他のモデル生物に比べ哺乳類と相同であるため、LPLAT 研究のモデル生物として有用であると結論づけた。

(2) ゼブラフィッシュを用いた LPLAT7/LPGAT1 の機能解析

次にゼブラフィッシュを用いた LPLAT の機能解析を行った。CRISPR/Cas9 法でさまざまなゼブラフィッシュ LPLAT 欠損個体を作製している過程で、*lpgat1* ヘテロ欠損個体の雄の生殖異常、ホモ欠損個体がほとんど得られない、という二つの表現型を見出

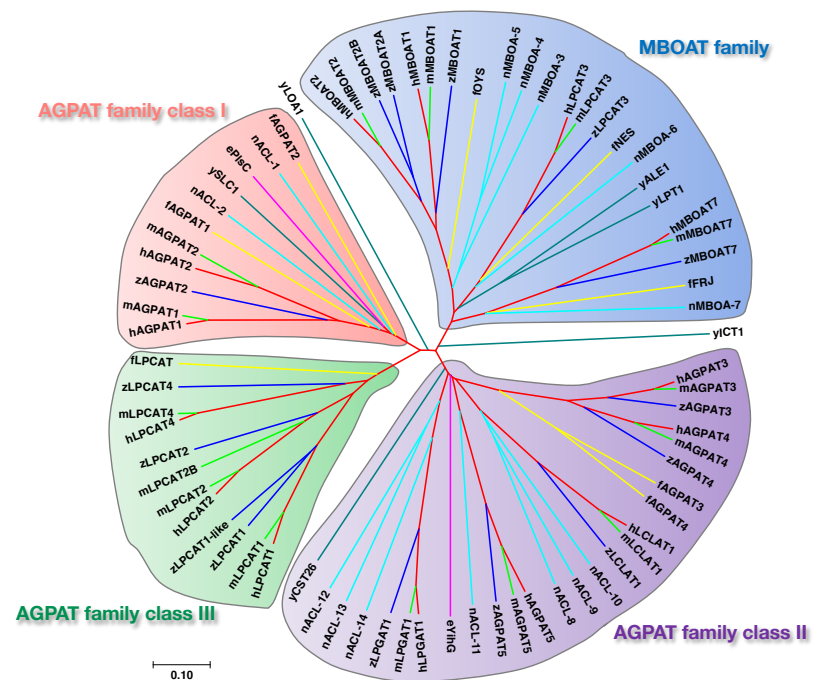


Fig. 1. 各モデル生物に保存されているLPLAT分子。h; human (ヒト), m; mouse (マウス), z; zebrafish (ゼブラフィッシュ), f; fruit fly (ショウジョウバエ), n; nematode (線虫), y; yeast (酵母), e; E.coli. bacteria (大腸菌)。系統樹はアミノ酸配列から作成。スケールバー: 10%のアミノ酸相違。

した。ヘテロ欠損個体の雄を交配に用いると致死卵が半数弱観察され、ヘテロ欠損個体の雌では同様の異常は観察されなかった (Fig. 2)。致死卵は、卵割を開始せず未発生のまま致死となっており、未受精卵であることが疑われた (Fig. 3)。

そこでヘテロ欠損個体の精子を調べると、野生型に比べて運動精子数が少なく、走査型電子顕微鏡解析の結果、4割の精子の形態に異常があることがわかった (Fig. 4)。

また、*lpgat1* ホモ欠損個体を作成するため、ヘテロ欠損個体同士の

交配を行なった。すると、ホモ欠損個体の出現割合はメンデル則から予想される割合より少なく、また、時間経過と共に段階的に致死となり、成魚まで生存することが出来なかった。交配後 2 週間後に存在するホモ欠損個体はわずか、5%以下と極めて少なく、ホモ欠損個体の致死性の詳細を解析することは困難であった。そこで、モルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を用いた *lpgat1* 遺伝子抑制を行った。*lpgat1* を 2 種類の MO を用い発現抑制するとどちらの MO を用いた場合でも受精後 48 時間以降で発生遅延、色素産生異常に加え、短体長、体軸の湾曲等の奇形が観察され、その後致死となった。興味深いことに、これらの発生異常は MO と *lpgat1* mRNA の同時導入により顕著に抑制された (Fig. 5)。

最後に *lpgat1* 欠損個体のリン脂質組成を LC-MS/MS により解析した。受精後 7 日の稚魚 1 匹か

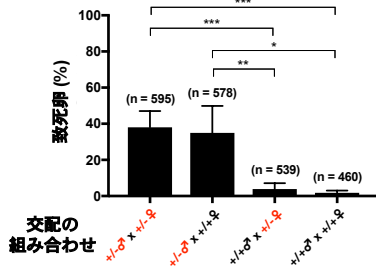


Fig. 2 各交配の組み合わせにおける致死卵の出現割合。

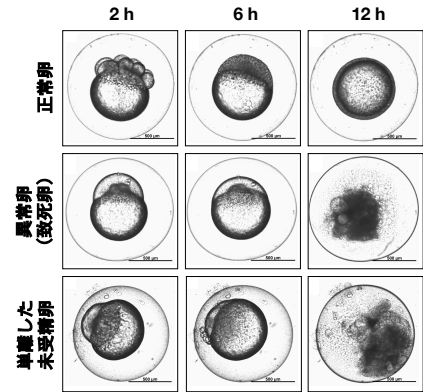


Fig. 3 ヘテロ欠損個体の雄を交配に用いた際に出現する異常卵のタイムラプスイメージング解析。野生型の雌から単離した未受精卵と同様に異常卵は細胞分裂を開始しないまま致死となった。最上部には交配後時間 (未受精卵単離後時間) が示されている。

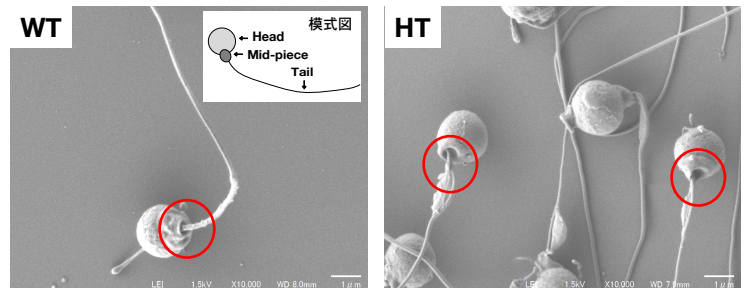
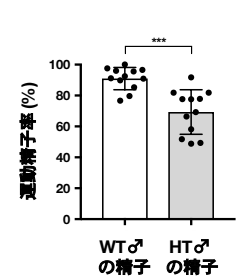


Fig. 4 野生型 (WT) 個体、*lpgat1*ヘテロ欠損 (HT) 個体から採取した精子の運動能測定結果と走査型電子顕微鏡解析の結果。赤丸で囲んだMid-piece部位がWTではTailに巻きついているのに対して、HTでは37%の精子で緩んだ構造をしていた。

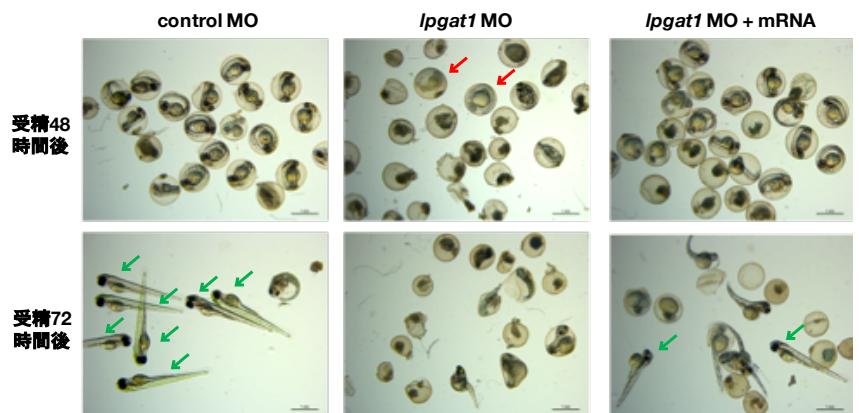


Fig. 5 *lpgat1*発現抑制胚の様子。受精直後にMOをインジェクションした。*lpgat1* MO導入群では受精48時間後で色素産生異常を伴う発生遅延 (赤矢印) 等が観察される。受精72時間において*lpgat1* MO導入群では正常個体 (緑矢印) は全く確認されない。

らリン脂質を回収して分析すると、PC、PE、PS、PAにおいてステアリン酸 (C18:0) を含有すると考えられるリン脂質分子種 (C36:1、C38:4、C40:6、C40:5) が顕著に減少していた (Fig. 6)。また、ヘテロ欠損個体から回収した精子についてリン脂質組成解析を行うと、C18:0 含有 PE 分子種 (C38:4、C40:6、C40:5) が減少していた (Fig. 7)。

【考察・今後の展望】

本研究ではまず、生体内に存在する多様なリン脂質分子種、多種類の LPLAT 分子の機能を解明する上でゼブラフィッシュは有用なモデル生物であることを示した。また、実際、LPLAT 分子の一つである *Lplat7/Lpgat1* が胚発生過程や精子の形成に極めて重要な役割を持つことを明らかにした。また、*Lpgat1* 欠損個体では C18:0 含有リン脂質が顕著に減少していることから、本酵素が C18:0 含有リン脂質産生に関与することが強く示唆された。興味深い

ことに、ヒトの不妊男性の精液中では、*lpgat1* ヘテロ欠損ゼブラフィッシュの精子と同様に、C18:0 含有 PE が顕著に減少することが報告されており、*lpgat1* ヘテロ欠損ゼブラフィッシュはヒト不妊症のモデルとなるかもしれない。

lpgat1 ホモ欠損個体は成体まで成長せず、また、*lpgat1* 発現抑制胚も顕著な発生異常を示したことから、*Lpgat1* とその産物が発生とその後の成長に必須な役割を持つことが明らかとなった。*lpgat1* の発現抑制により発生段階に異常が生じるメカニズムは現時点では不明であるが、当研究室の解析により *LPGAT1* KO 培養細胞は増殖遅延を示すことが見出されており、*Lpgat1* とその産物が通常の細胞増殖に影響を与えている可能性がある。

一般に魚類では DHA などのオメガ 3 脂肪酸含有リン脂質が豊富である。哺乳類のオルソログとは異なり、ゼブラフィッシュ *Lplat12/Lpcat3* は強い DHA 導入活性を有しており、このことがゼブラフィッシュでの DHA 含有分子種が多いことの一因であるかもしれない。今後、ゼブラフィッシュをモデル生物とした LPLAT 分子、リン脂質分子種の意義解明が加速することが期待される。

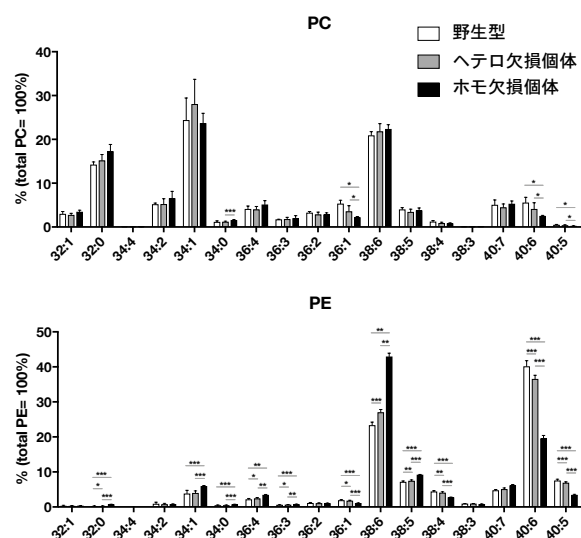


Fig. 6 受精7日後の稚魚における全身のリン脂質分子種組成解析。PCとPEの結果を抜粋して表示。

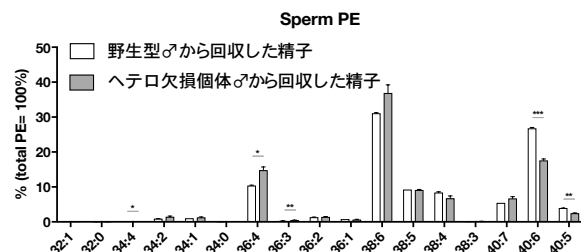


Fig. 7 雄から回収した精子のリン脂質分子種組成解析。PEの結果を抜粋して表示。

論文審査結果の要旨

論文提出者：柴田 剛明

論文審査委員（主査）：斎藤 芳郎

論文題目：ゼブラフィッシュを用いた生体膜リン脂質脂肪酸リモデリング酵素の機能解析

リン脂質は、生体内に 1,000 種類以上の分子種が存在し、組織、細胞、オルガネラごと、また、生物種ごとに特徴的な組成で組み合わせることで、それぞれ特有の生理機能を有する多様な生体膜を形成する。リン脂質分子の多様性は主として、膜タンパク質であるリゾリン脂質アシル基転移酵素 (LPLAT) により形成されると考えられている。柴田剛明氏は、ヒトのリン脂質分子種の多様性を反映する哺乳類よりも下等なモデル生物を探索し、この生物における LPLAT の機能について酵素発現による生化学的解析や遺伝子欠損による個体レベルの解析を実施した。大腸菌、酵母、線虫、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウス、ヒトのサンプルからリン脂質分子種組成を LC-MS/MS 解析を行い、各リン脂質分子種組成の比較から、ゼブラフィッシュは哺乳類と高いリン脂質組成の相関を示したが、それ以下の系統樹の生物では相関は弱かった。また、遺伝子レベルでは、ゼブラフィッシュでは哺乳類に存在する LPLAT14 種のうち、13 種類が保存されていた。主要な LPLAT 分子について、この酵素を培養細胞に発現させ膜画分を調製し、安定同位体標識した種々の基質（アシル CoA、リゾリン脂質）を用いたアシル基転移活性を測定したところ、ヒトとゼブラフィッシュとで酵素活性を比較するとほぼ同等の *in vitro* 酵素活性を示すことを確認した。LPLAT12 (LPCAT3) ではヒト型にはないドコサヘキサエン酸 (DHA) をリン脂質に導入する活性を示し、DHA が魚類で多いという特徴ことを説明する分子基盤と考えられた。本研究に加えて、柴田剛明氏は、CRISPR/Cas9 法で LPLAT7 を欠損させたゼブラフィッシュを作製した。その結果、ホモ欠損個体では性成熟手前の受精後 3 ヶ月までにすべて致死となることが判明した。ヘテロ欠損の雄個体を交配に用いると、受精が正常に完了しない胚が高頻度に出現した。ヘテロ欠損個体由来の精子を単離して顕微鏡下で観察すると、奇形と運動能低下を示すことがわかった。また、LC-MS/MS 解析からステアリン酸を持つリン脂質が顕著に減少していた。以上の研究結果は、ゼブラフィッシュがヒトを含む哺乳類のリン脂質分子種の多様性を反映するよいモデル生物であることを示す研究成果である。また、個体レベルの解析から、ステアリン酸含有リン脂質を産生する LPLAT7 が雄性生殖機能や稚魚期の成長に重要であることを見出し、特定のクラスのリン脂質分子種が生命現象を司ることを実証した。

以上、柴田剛明氏が本研究を通じて確立したゼブラフィッシュを用いた LPLAT 解析のプラットフォームを用いることで、今後特定の脂肪酸を持つ膜リン脂質機能の全容が明らかになるものと期待される。

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。