

21. 生体膜リン脂質脂肪酸の多様性と生物学的意義の解明

青木 淳賢

東京大学 大学院薬学系研究科 衛生化学教室

Key words : リン脂質分子種, 脂肪酸, リゾリン脂質, アシルトランスフェラーゼ, 質量顕微鏡

緒言

生体膜脂質の主成分であるリン脂質は 1,500 種以上の分子種からなる。すなわち、極性頭部に加え、10 種類以上存在する脂肪酸がさまざまな組み合わせで取り込まれている。これら多種のリン脂質分子種それぞれの機能を解明することは現在の脂質生物学の難題かつ挑戦的課題である。様々な研究手法が発達した現在でも、脂質は機能解析が困難な研究対象である。タンパク質や核酸とは異なり脂質は、(1) 組織・細胞レベルの可視化ツールが無い、(2) 生合成過程、特に、含有する脂肪酸種の異なるリン脂質分子種の形成・産生機構が不明であり、そのため、特定のリン脂質分子の発現変動を容易に達成できないこと、が大きな理由である。(1) に関して、近年、組織切片レベルでリン脂質を可視化できるツール、質量顕微鏡 (イメージング MS) が開発された。我々のグループは、質量顕微鏡技術をいち早く取り入れ、組織の細胞レベルでの各リン脂質分子種の可視化に取り組んでいる。このような解析から、一つの細胞に複数のリン脂質分子種が発現しているのではなく、各リン脂質分子種は細胞特異的に発現していることが判明してきた。(2) に関して我々は、リン脂質の *sn*-1 位に脂肪酸を導入する新規手法を開発し、この手法を用い、*sn*-1 位にパルミチン酸 (16:0)、ステアリン酸 (18:0)、オレイン酸 (18:1) をそれぞれ導入する 3 種のリン脂質合成酵素 (リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ、LPLAT)、LPCAT1、LPGAT1、LPEAT2 を同定した [1]。

我々は、質量顕微鏡技術と同定された LPLAT 分子の KO 個体を組み合わせることで、*sn*-1 位にパルミチン酸 (16:0)、ステアリン酸 (18:0)、オレイン酸 (18:1) を持つリン脂質が、どの細胞に発現し、どのような機能を持つのか、すなわち、リン脂質分子種多様性の意義という脂質生物学の究極の問い、に答を導けるのではないかと考えた。本研究では、まず、我々が最近同定に成功した 3 種類の LPLAT 分子の KO マウス、KO ゼブラフィッシュの表現型解析と質量顕微鏡を用いたリン脂質発現細胞同定を通じ、16:0、18:0、18:1 をそれぞれ *sn*-1 位に持つリン脂質分子種の個体レベルでの機能と発現細胞の同定を行う。さらに、培養細胞レベルで KO 細胞のオルガネラに着目することにより、オルガネラレベルでのリン脂質分子種の機能解明と網羅的プロテオミクスによるリン脂質分子種の標的的同定を目指す。

方法および結果

目的に掲げた、研究のうち、3 種類の LPLAT 分子、LPCAT1、LPGAT1、LPEAT2 の KO マウスの解析、ゼブラフィッシュ変異体作製と機能解析を実施し、表 1 に示すさまざまな表現型を得た。このうち、ここでは、最近論文が accept されたゼブラフィッシュ LPGAT1 の表原型について詳細に説明する [2]。

表 1. 解析した LPLAT とその機能

| | 導入脂肪酸 | 極性頭部特異性 | KO マウス (表現型) | KO fish (表現型) | KO cell (表現型) |
|--------|--------|---------|---|-------------------------|----------------|
| LPGAT1 | 18 : 0 | PC、PE、P | ○ (体小、突然死) ○ 網膜異常 ○ 心不全 ○ 筋力低下 | ○ (胚発生異常) ○ (精子生殖異常) | ○ (ミトコンドリア断片化) |
| LPEAT2 | 18 : 1 | PC、PE | ○ (神経突起) | ○ (浮き袋の異常) | ○ (?) |
| LPCAT1 | 16 : 0 | PC | ○ (肺機能) | ○ (?) | ○ (?) |

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。

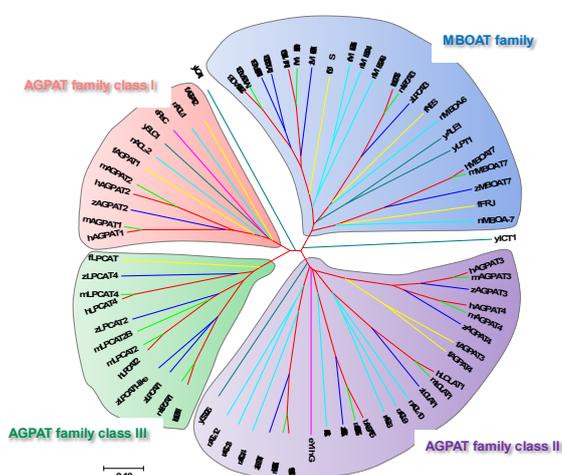


図 1. 各モデル生物に保存されている LPLAT 分子

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。

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 (図 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 (図 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 (図 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 (図 4)。

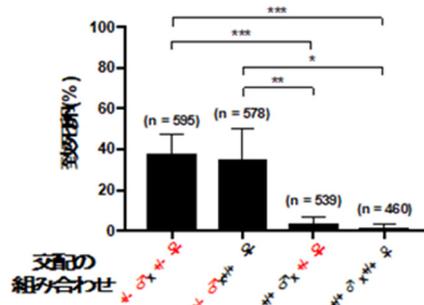


図 2. 各交配の組み合わせにおける致死卵の出現割合

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA, Holm's multiple comparison test)。

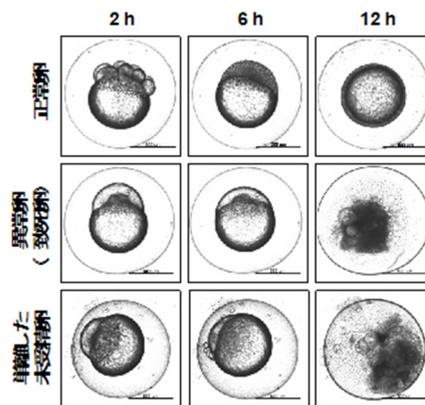


図 3. ヘテロ欠損個体の雄を交配に用いた際に出現する異常卵のタイムプラスイメージ解析
野生型の雄から単離した未受精卵と同様に異常卵は細胞分裂を開始しないまま致死となった。最上部には交配後時間 (未受精卵単離後時間) が示されている。

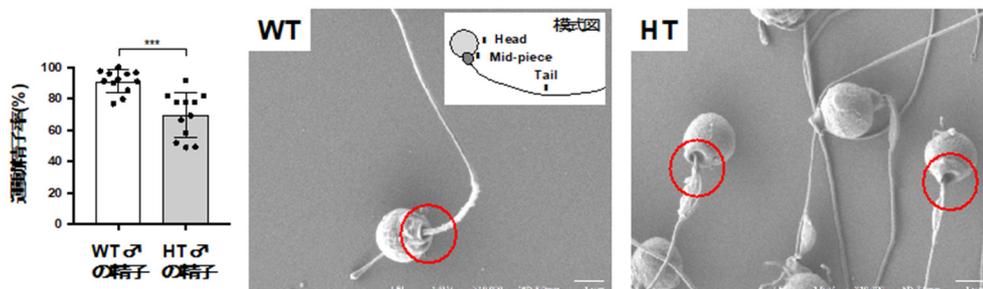


図 4. 野生型 (WT) 個体、*lpgat1* ヘテロ欠損 (HT) 個体から採取した精子の運動能測定結果と走査型電子顕微鏡の結果

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。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ (Unpaired two-tailed t-test)。

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 (図 5)。

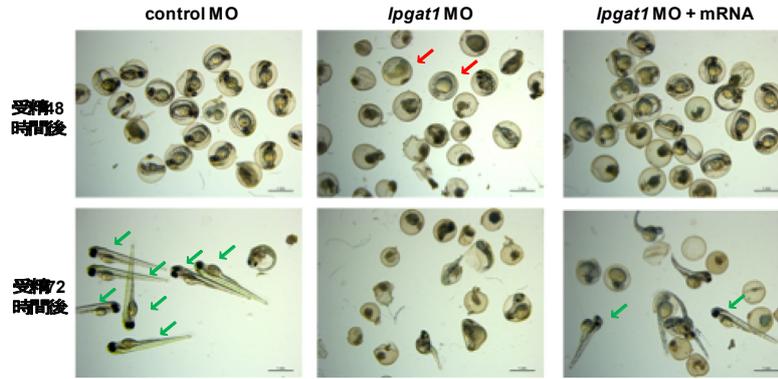


図 5. *lpgat1* 発現抑制胚の様子。

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) は全く観察されない。

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 (図 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 (図 7)。

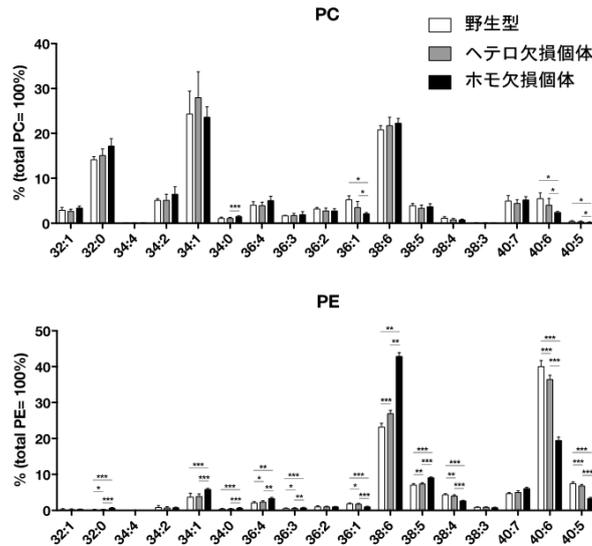


図 6. *lpgat1* 発現抑制胚の様子。受精 7 日後の稚魚における全身のリン脂質分子種組成解析。PC と PE の結果を抜粋して表示。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA、Bonferroni's multiple comparison test)。

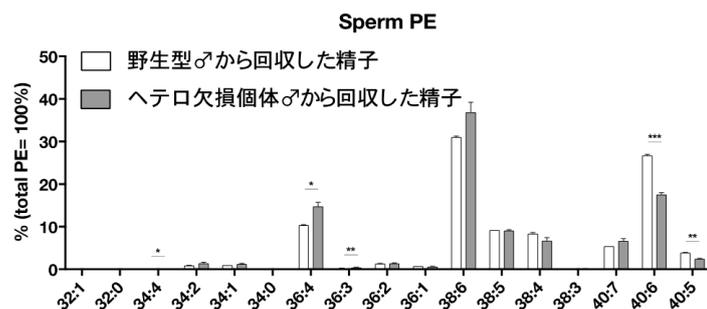


図 7. 雄から回収した精子のリン脂質分子種組成解析。

PE の結果を抜粋して表示。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$
(Unpaired, two-tailed t test)。

考 察

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。

共同研究者・謝辞

本研究の主な共同研究者は、東京大学大学院薬学系研究科衛生化学教室博士課程 3 年の柴田剛明君（東北大学大学院薬学研究所所属）、東京大学大学院薬学系研究科衛生化学教室助教の川名裕己君である。

文 献

- 1) Valentine WJ, Yanagida K, Kawana H, Kono N, Noda NN, Aoki J, Shindou H. Update and nomenclature proposal for mammalian lysophospholipid acyltransferases, which create membrane phospholipid diversity. *J Biol Chem.* 2022 Jan;298(1):101470. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101470. Epub 2021 Dec 7. PMID: 34890643
- 2) Shibata T, Kawana H, Nishino Y, Ito Y, Sato H, Onishi H, Kano K, Inoue A, Taketomi Y, Murakami M, Kofuji S, Nishina H, Miyazawa A, Kono N, Aoki J. Abnormal male reproduction and embryonic development induced by downregulation of a phospholipid fatty acid-introducing enzyme *Lpgat1* in zebrafish. *Sci Rep.* 2022 May 4;12(1):7312. doi: 10.1038/s41598-022-11002-4. PMID: 35508627