

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	生体膜リン脂質の網羅的解析技術の開発とリン脂質多様性形成機構に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	浜野文三江
Author(English)	Fumie Hamano
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:乙第4201号, 授与年月日:2021年11月30日, 学位の種別:論文博士, 審査員:和地 正明,小畠 英理,八波 利恵,平沢 敬,柳田 保子
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:乙第4201号, Conferred date:2021/11/30, Degree Type:Thesis doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

生体膜リン脂質の網羅的解析技術の開発と リン脂質多様性形成機構に関する研究

東京大学大学院医学系研究科ライフサイエンス研究機器支援室

浜野 文三江

審査員主査 和地 正明

略語一覧 3

第1章 序論.....	5
1-1. 背景	5
1-2. 生体膜リン脂質	7
1-3. リゾリン脂質アシル基転移酵素と疾患	17
1-4. 本研究の目的.....	22
第2章 ガスクロマトグラフィー水素炎イオン化検出法による哺乳類組織中の脂肪酸組成解析 23	
2-1. 序文	23
2-2. 実験材料.....	27
2-3. 試薬調整.....	28
2-4. ソフトウェア.....	29
2-5. 統計	30
2-6. 実験方法.....	30
2-7. データ解析	36
2-8. 注意事項.....	41
2-9. 応用例に用いるマウスおよびマウス組織.....	41
2-10. 結果	42
2-11. 考察	46
2-12. まとめ	48
第3章 液体クロマトグラフィー質量分析法によるマウス網膜リン脂質分子種網羅的解析 52	
3-1. 序文	52
3-2. 実験材料・実験方法.....	56
3-3. 結果	60
3-4. 考察	79
3-5. まとめ	85
第4章 リゾリン脂質アシル基転移酵素 LPCAT2 の基質認識機構予測	86
4-1. 序文	86
4-2. 実験材料・実験方法.....	91
4-3. 結果	95
4-4. 考察	115
4-5. まとめ	119
第5章 総括.....	126
5-1. 総括	126
5-2. 今後の課題と展望	129

謝辭	131
参考文献	132

略語一覽

AGPAT: 1-acylglycerol-3-phosphate-*O*-acyltransferase

CD73: cluster of differentiation 73

CDP-DAG: cytidine diphosphate-diacylglycerol

CHO: Chinese hamster ovary

CL: cardiolipin

CoA: coenzyme A

DAG: diacylglycerol

DHA: docosahexaenoic acid

EPA: eicosapentaenoic acid

FA: fatty acid

FAME: fatty acid methyl ester

FFA: free fatty acid

G3P: glycerol-3-phosphate

GC-FID: gas chromatography-flame ionization detector

LC-MS: liquid chromatography-mass spectrometry

LPA: lysophosphatidic acid

LPAAT3: lysophosphatidic acid acyltransferase3

LPC: lysophosphatidylcholine

LPCAT1: lysophosphatidylcholine acyltransferase1

LPCAT2: lysophosphatidylcholine acyltransferase2

LPCAT3: lysophosphatidylcholine acyltransferase3

LPE: lysophosphatidylethanolamine

LPLAT: lysophospholipid acyltransferase

LPS: lysophosphatidylserine

MBOAT: membrane bound-*O*-acyltransferase

m/z: mass-to-charge ratio

ONL: outer nuclear layer

OS: outer segment

PA: phosphatidic acid

PAF: platelet-activating factor

PC: phosphatidylcholine

PDB: Protein Data Bank

PE: phosphatidylethanolamine

PI: phosphatidylinositol

PS: phosphatidylserine

PUFA: polyunsaturated fatty acid

rd: retinal degeneration

RPE: retinal pigment epithelium

sn -: stereospecific numbering

TAG: triacylglycerol

VLC-PC: very long chain-phosphatidylcholine

VLC-PE: very long chain- phosphatidylethanolamine

VLC-PUFA: very long chain-polyunsaturated fatty acid

第1章 序論

1-1. 背景

生体膜を構成する主成分であるグリセロリン脂質（リン脂質）は、グリセロール骨格の *sn*-1 位および *sn*-2 位に脂肪酸（アシル基）、*sn*-3 位に極性基を持つ（Fig. 1-1A）¹。脂肪酸と極性基の組み合わせにより、生体内には 1000 種類以上のリン脂質の分子種が存在すると考えられている。生体膜のリン脂質組成は多様性に富み、組織や細胞、細胞小器官で異なっているが、その生物学的意義については明らかではない。しかし近年、がん、生活習慣病、網膜変性、急性肺障害などの様々な病態時に生体膜リン脂質組成の変化や恒常性の破綻がみられ、疾患や生体機能異常との関連が示唆されている。生体膜リン脂質分子種多様性の形成機構と生物学的意義を知ることが、生体膜リン脂質の機能を明らかにし、疾患のメカニズムの理解や治療法の発見にもつながる可能性がある^{2,3}。

リン脂質の生合成経路は 2 つあり、一つは解糖系中間物から新しくリン脂質が作られる *de novo* 経路 (Kennedy pathway)⁴で、もう一つは合成されたリン脂質がホスホリパーゼ A_{1/2} により脂肪酸が切り出され、リゾリン脂質（アシル基を 1 つだけ持つリン脂質）となったのちに、特異性の異なるリゾリン脂質アシル基転移酵素 (LPLAT) 群の作用により再度アシル基が導入され、リン脂質に変換されるリモデリング経路 (Lands' cycle)である(Fig. 1-2)⁵。リモデリング経路によりリン脂質のアシル基の交換が行われ、リン脂質の多様性が生み出されていると考えられている。現在までに 14 種類の LPLAT がクローニングされている(Fig. 1-3)。LPLAT の過剰発現細胞や遺伝子欠損マウスの解析から LPLAT が生体膜リン脂質組成に関与していることが分かってきている²。所属研究室にて発見、単離された酵素の一つであるリゾホスファチジン酸アシル基転移酵素 3 (LPAAT3) 欠損マウスではドコサヘキサエン酸 (DHA) 含有ホスファチジルコリン (PC) 量が減少し、網膜と精子の形態異常が観察され、特定のリン脂質の機能が生体レベルで示唆された^{6,7}。

組織、細胞、細胞内小器官におけるリン脂質組成がどのように形成され維持されているのか、また病態時や加齢による変動などを網羅的に調べていくことが、リン脂質分子種多様性の意義の理解に繋がると考えられる。その際、各 LPLAT の発現や活性が様々なリン脂質組形成を説明できると考えられ、LPLAT の分子メカニズムや遺伝子欠損マウスを用いた解析が重要となる。

そこで本研究では、リン脂質分子種多様性の意義の理解を目指し、マウス組織における生体膜リン脂質網羅的解析技術の開発と LPLAT による基質認識機構理解のため、以下に示す 3 つの課題に取り組んだ。

(第 2 章)

ガスクロマトグラフィー水素炎イオン化検出法 (GC-FID) による哺乳類組織中の脂肪酸組成解析

(第 3 章)

液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) によるマウス網膜リン脂質分子種網羅的解析

(第 4 章)

リゾリン脂質アシル基転移酵素 LPCAT2 の基質認識機構予測

1-2. 生体膜リン脂質

リン脂質の構造

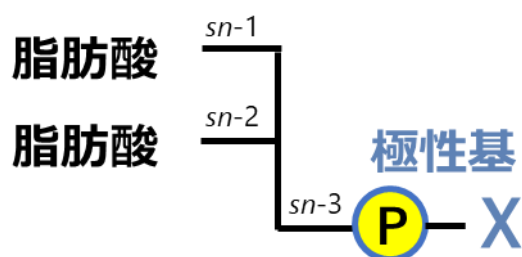
代表的なリン脂質であるグリセロリン脂質(リン脂質)はグリセロール骨格の *sn* -1 位および *sn* -2 位に脂肪酸(アシル基)が結合し、*sn* -3 位に極性基 (リン酸基 + X) が結合した両親媒性の構造を持つ(Fig. 1-1A)¹。リン脂質は極性基の種類によってクラスに分けられる。例えば代表的なリン脂質クラスであるホスファチジルコリン (PC) の *sn* -3 位には「リン酸基 + コリン」が結合しており、また別のリン脂質クラスであるホスファチジルエタノールアミン (PE) の *sn* -3 位には「リン酸基 + エタノールアミン」が結合している。リン脂質は、極性基に加えて、結合する脂肪酸 (アシル基) にも多様性を持つ。*sn* -1 位と *sn* -2 位の脂肪酸プロファイルに違いがあることが知られている。*sn* -1 位には飽和脂肪酸または一価不飽和脂肪酸が含まれる傾向があるが、*sn* -2 位には多価不飽和脂肪酸を含む様々な脂肪酸がみられる。また脂肪酸の結合様式にも、エステル結合の他にエーテル結合やビニルエーテル結合の種類がある。極性基、脂肪酸、結合様式の組み合わせより、生体には 1000 種類以上のリン脂質分子種が存在すると考えられている。リン脂質の分子種はクラス名と結合している 2 本の脂肪酸によって表される^{8,9}。Fig. 1-1B に *sn* -1 位にパルミチン酸 (16:0、1 つ目の数字は炭素数、2 つ目の数字は二重結合の数を表す) と *sn* -2 位にアラキドン酸 (20:4) をもつホスファチジルコリンを示した。この分子種は PC 16:0/20:4 または PC 36:4 (2 本の脂肪酸炭素数と二重結合の合計) と表す (Fig. 1-1B)。

リン脂質生合成経路

リン脂質の生合成経路は 2 つあり、一つは解糖系から新しくリン脂質が作られる *de novo* 経路(Kennedy pathway)である⁴ (Fig. 1-2)。解糖系中間体のグリセロール 3-リン酸

(G3P) は G3P アシル基転移酵素 (GPAT) によってアシル鎖が導入されリゾホスファチジン酸 (LPA、アシル基を 1 つだけ持つホスファチジン酸 (PA)) に変換される。その LPA は LPA アシル基転移酵素 (LPAAT) によりアシル基が追加されて PA となる。PA はジアシ

A)



リン脂質クラス名称	略称	極性基 X
ホスファチジルコリン	PC	コリン
ホスファチジルエタノールアミン	PE	エタノールアミン
ホスファチジルセリン	PS	セリン
ホスファチジリンイノシトール	PI	イノシトール
ホスファチジルグリセロール	PG	グリセロール
ホスファチジン酸	PA	—H
カルジオリピン	CL	ホスファチジルグリセロール

B)

ホスファチジルコリン (PC 36:4) の構造

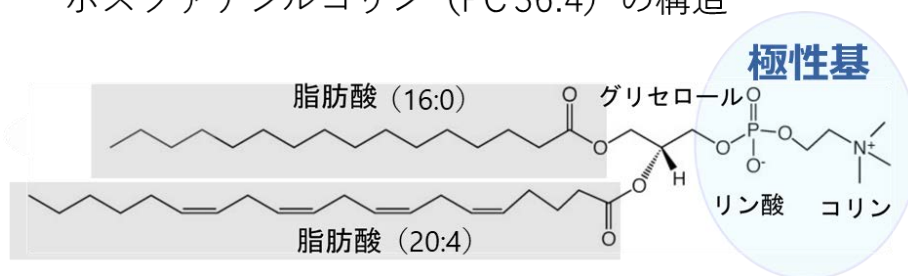


Fig. 1-1 リン脂質の構造と名称

A (上) はリン脂質の構造。リン脂質はグリセロール骨格 (黒線) の *sn*-1 位と *sn*-2 位に 2 つの脂肪酸 (アシル鎖) を持ち、*sn*-3 位に極性基 (リン酸基 + X) が結合する。A(上) の P(黄色の丸) はリン酸基を示す。A (下) に極性基 X とリン脂質のクラス名称の関係を示した。B. ホスファチジルコリン (PC 36:4) の構造。PC 36:4 の 36 は 2 本のアシル鎖の合計の炭素数であり、4 は 2 本のアシル鎖の二重結合の合計の数を示す。この PC 36:4 は他の構造異性体と区別するために、アシル鎖を分けて PC 16:0/20:4 と表記する場合もある。

ルグリセロール (DAG) もしくはシチジン二リン酸-DAG を経て、PC、PE、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルグリセロール (PG) 、カルジオリピン (CL) のような各クラスのリン脂質に変換される。しかし、この *de novo* 経路だけでは PA 以外のリン脂質の *sn* -2 位の脂肪酸は入れ替わることがなく、リン脂質分子種の多様性や *sn* -1 位と *sn* -2 位の非対称性を説明するには不十分であった。

もう一つの経路であるリモデリング経路(Lands' cycle)は 1958 年に Lands によって提唱された⁵。この経路では、一旦合成されたリン脂質からホスホリパーゼ A_{1/2} によって脂肪酸が切り出され、リゾリン脂質が生成される。このリゾリン脂質に対し、特異性の異なる LPLAT 群によってアシル CoA からアシル基が導入され再度リン脂質に変換される。このアシル基の交換(リモデリング反応)により、リン脂質の多様性が生み出されることになる(Fig. 1-2)²。

リゾリン脂質アシル基転移酵素

リモデリング経路に関わる酵素の 1 つであるホスホリパーゼ A_{1/2} は水溶性タンパク質であり、クローニングが進み多くの遺伝子が報告されている^{10,11}。しかし LPLAT は膜局在性タンパク質であることから、精製が困難で、分子同定が進まなかった。ゲノムプロジェクトが進んだことで、多くの LPLAT が同定され、現在ではヒトやマウスで 14 種類もの酵素が同定されている^{2,12} (Fig. 1-3)。これらの酵素は基質であるリゾリン脂質とアシル CoA (脂肪酸の活性型) をある程度緩く広範囲に認識する²。すなわち一つの酵素が複数の脂肪酸やリゾリン脂質を異なる *K_m* と速度で基質とすることができる。この基質認識性の緩さと二つの基質の濃度により、10 数種のアシル転移酵素で、1000 を超えるリン脂質分子種多様性を生み出していると考えられている。LPLAT 酵素群は大きく分けて 2 つファミリーを形成している。1 つは AGPAT (1-acylglycerol 3-phosphate *O*-acyltransferase) ファミリーで、もう一つが MBOAT (membrane bound *O*-acyltransferase) ファミリーである²。

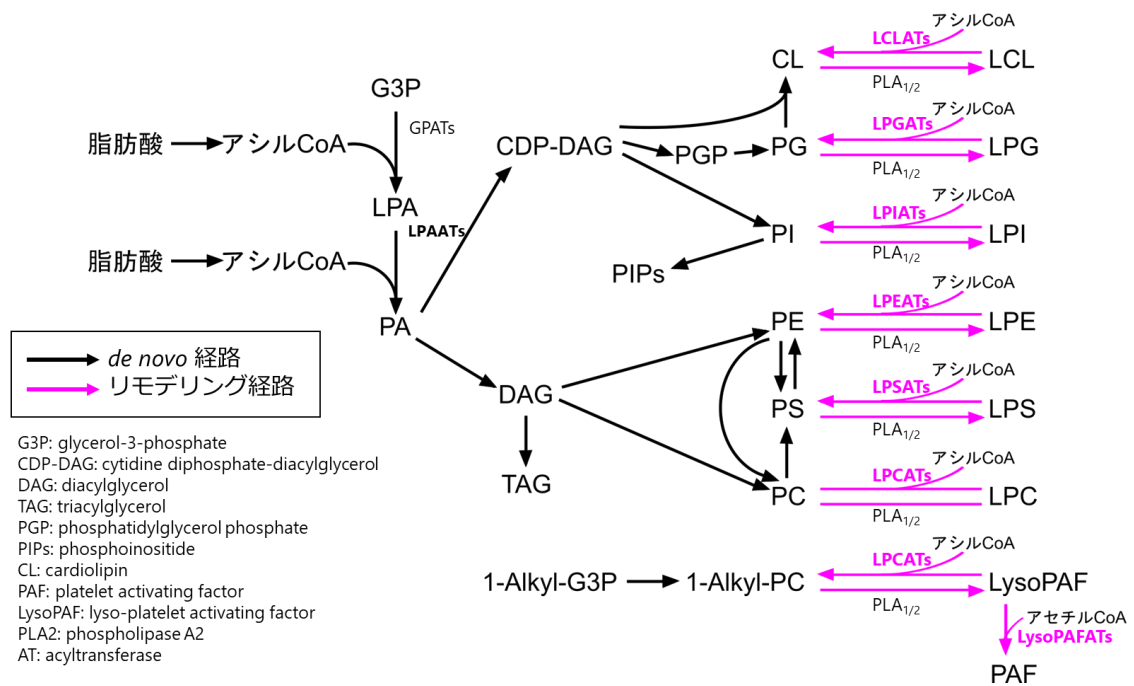


Fig. 1-2 リン脂質生合成経路

リン脂質の生合成には2種類の経路がある。1つは解糖系から新しくリン脂質が作られる *de novo* 経路（黒矢印）で、もう一つは合成されたリン脂質がホスホリパーゼ A1 またはホスホリパーゼ A2 (PLA_{1/2}) により脂肪酸が切り出され、リゾリン脂質に変換されたのち、リゾリン脂質アシル基転移酵素により新しい脂肪酸（アシル基）が導入されるリモデリング経路（ピンク矢印）である。

	ファミリー	LPLAT名称	生成物	HUGO symbol	その他の名称
de novo 経路	AGPAT	LPAAT1	PA	AGPAT1	LPAAT α
		LPAAT2	PA	AGPAT2	LPAAT β
		LPAAT3	PA, PI	AGPAT3	LPAAT γ
		LPAAT4	PA	AGPAT4	LPAAT δ
		AGPAT5		AGPAT5	LPAAT ϵ
リモデリング経路	AGPAT	LPEAT2	PE	LPCAT4	AYTL3, AGPAT7
		LCLAT1	CL, PG, PI	LCLAT1	ALCAT1, AGPAT8
		LPCAT1	PC, PE, PAF	LPCAT1	AYTL2, AGPAT9/10
		LPCAT2	PC, PE, PAF	LPCAT2	AYTL1, lysoPAFAT
		LPGAT1	LPG	LPGAT1	NET8, KIAA0205
	MBOAT	LPCAT3	PC, PE, PS	LPCAT3	OACT5, MBOAT5
		LPCAT4	PC, PE, PA	MBOAT2	OACT2
		LPEAT1	PE, PS	MBOAT1	OACT1
		LPIAT1	PI	MBOAT7	LENG4, MBOAT7

Fig. 1-3 リゾリン脂質アシル基転移酵素

これまでに同定されている *de novo* 経路とリモデリング経路に関わる LPLAT 酵素群。リモデリング経路の酵素は AGPAT ファミリーと MBOAT ファミリーの両方から発見されている。

Valentine WJ, et al. *Adv Exp Med Biol.* (2020)1274:5-27 より改変²。

AGPAT ファミリーには種を超えて保存される AGPAT モチーフ 1~4 が存在する。

AGPAT ファミリーに属する GPAT1、LPAAT1 およびリゾホスファチジルコリンアシル基転移酵素（LPCAT）1 を用いた点変異体解析によりこれらの AGPAT モチーフが検討された¹³⁻¹⁶。モチーフ 1 には活性中心の H-X-X-X-X-D の配列がある。また所属研究室より LPCAT1 のモチーフ 2 がアシル CoA との結合に重要であることが報告された¹³。AGPAT ファミリー酵素の構造解析については、近年 LPAAT 活性を有する好熱菌 *Thermotoga maritima* PlsC の結晶構造解析がなされ、脂質二重膜の片側のリーフレットに局在するモノトピックなタンパク質であることが報告された¹⁷。

MBOAT ファミリーについてもモチーフの解析がなされ A~D の 4 つのモチーフが報告されている¹⁸。MBOAT ファミリーに属する酵素のアクセプター基質はリゾリン脂質の他にタンパク質、ペプチド、コレステロール、トリアシルグリセロールやジアシルグリセロールなどがあり、酵素はそれぞれにアシル基を転移する活性を有している¹⁹。MBOAT ファミリーの構造解析はクライオ電子顕微鏡を用いた研究が進み、膜貫通型タンパク質であることが報告されている²⁰⁻²²。しかしながら、同ファミリーのリゾリン脂質アシル基転移酵素の構造解析に関する報告はない。

リゾリン脂質アシル基転移活性を持つ酵素が全く異なるファミリーに属し、生体膜での局在も AGPAT ファミリーに属す酵素 2 つがモノトピック型と報告され^{17,23}、MBOAT ファミリーは膜貫通型と予測されている。リン脂質分子種多様性を生み出すために、これら二つのファミリーがどのように協調し働いているのか、興味深く、それぞれの酵素の反応メカニズムなどさらなる研究が必要である。

リン脂質の生物学的機能と分子種多様性

リン脂質の機能として最初に挙げられるのは、生体膜の形成である。生体膜は主にリン脂質とタンパク質との混合物で構成され、リン脂質の極性基を外側にし、疎水性のアシル鎖

(脂肪酸)部分を内側に向い合せるように秩序だって合わさり二重層を形成している。このような構造をとることで、親水性の物質が簡単に出入りすることが出来ず、細胞の内と外を隔て、また細胞内オルガネラを区切ることが可能となる。この生体膜構造は 1972 年に Singer, S.J と Nicolson, G.L によって「流動モザイクモデル」と提唱され、生体膜には流動性があり、膜に存在するタンパク質は生体膜に浮かぶように漂っていると考えられるようになった²⁴ (Fig. 1-4)。この流動モザイクモデルではリン脂質分子種多様性についての言及はされていなかったが、現在は分析技術の発展により、生体膜リン脂質分子種多様性が明らかとなってきた。タンパク質の溶媒ともいえるリン脂質が分子種多様性を持つことは、膜タンパク質の局在や機能に影響を及ぼすと考えられる^{25,26}。生体膜の境界としての役割においても、リン脂質分子多様性により膜の柔軟性が変化し、解離や融合に影響が出ると考えられる²⁷⁻³⁰ (Fig. 1-5)。

生体膜リン脂質は、生体膜の形成だけでなく、脂質メディエーターの代謝前駆体としての役割を持つことが知られている³¹。膜リン脂質由来の脂質メディエーターには、プロスタグランジン (PGs)、ロイコトリエン (LTs)、ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (HETEs)、血小板活性化因子 (PAF)、LPA などがある³¹。リン脂質由来の脂質メディエーター生合成にはリン脂質リモデリング回路が使用される (Fig. 1-6)。PGs、LTs、HETEs は生体膜に存在するリン脂質からホスホリパーゼ A₂ によって切り出されたアラキドン酸から合成される。切り出された残りのリゾリン脂質が 1-アルキル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン (リゾ PAF) の場合、リゾリン脂質アシル基転移酵素である LPCAT1 または LPCAT2 によりアセチル基が転移されることで PAF が生じる^{13,32}。また、リゾホスファチジルコリン (LPC) にオートタキシシン (Lysophospholipase D) が作用すると LPA が産生される³¹。アラキドン酸由来の脂質メディエーターはエイコサノイド (eicosa は、ギリシャ語で 20 の意味) と呼ばれ炎症応答、免疫応答、細胞の分化および増殖などに関与することが知られている。またアラキドン酸以外にも生体膜から切り出された DHA やエイコサペンタエン酸 (EPA) の代謝物

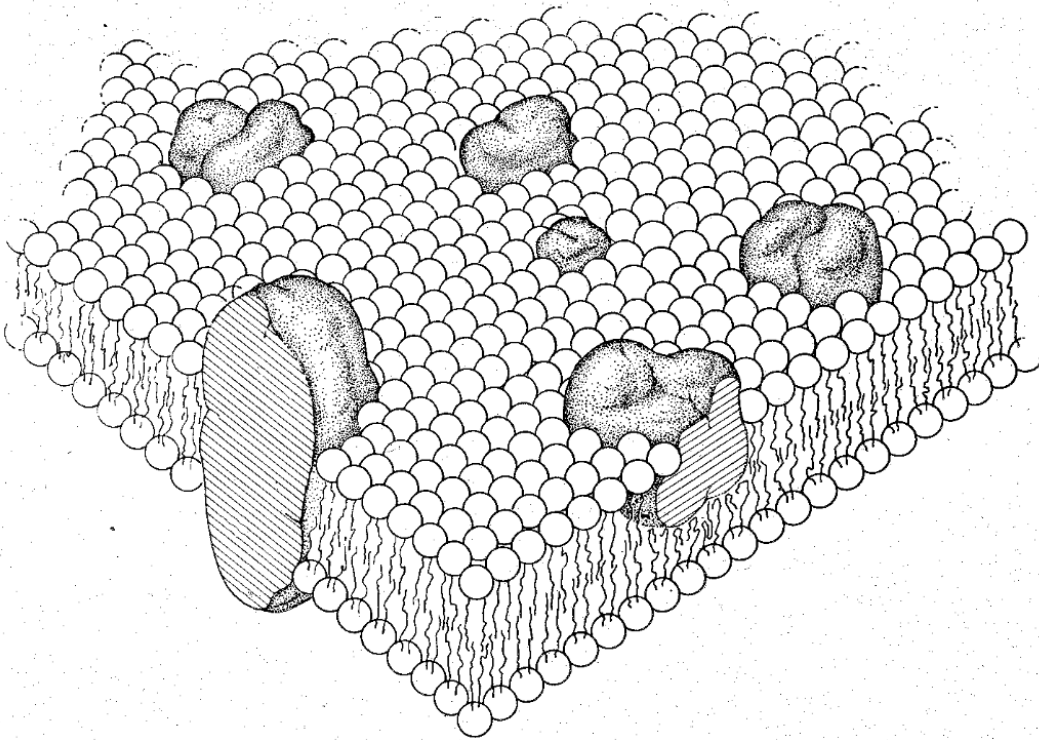


Fig. 1-4 細胞膜の流動モザイクモデル

1972年に発表された Singer と Nicolson による流動モザイクモデル。生体膜の構造はリン脂質が集合してできた二重膜の中に、タンパク質がモザイクのように埋め込まれており、埋め込まれたタンパク質は生体膜上を自由に動けるというモデル。

Singer, S.J & Nicolson, G.L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membrane. *Science* (1972)175:720-731 より転載²⁴。

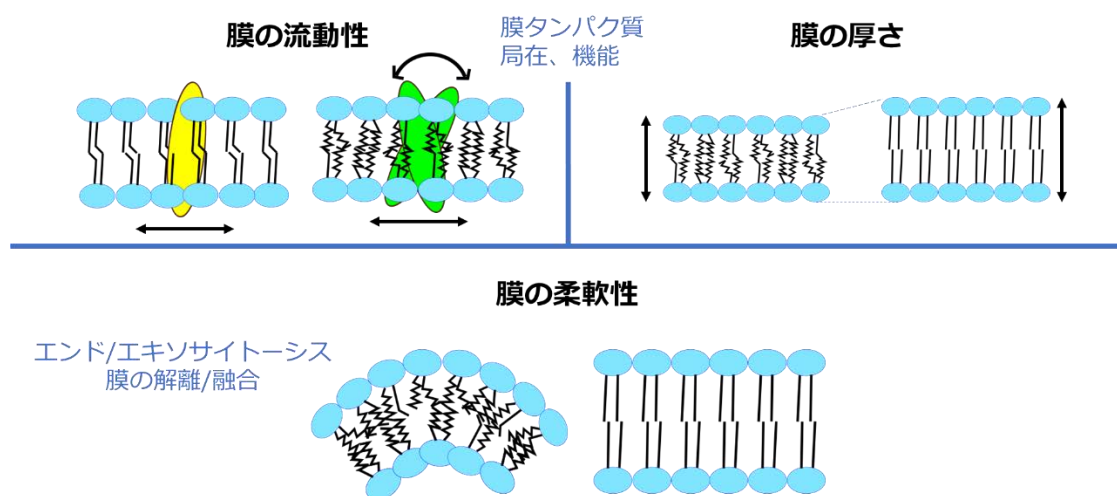


Fig. 1-5 リン脂質構成脂肪酸組成による生体膜の影響

多価不飽和脂肪酸を多く含む膜と飽和や一価不飽和脂肪酸に富んだ膜では、膜の流動性、厚さ、柔軟性などが異なる。多価不飽和脂肪酸を多く含む流動性の高い膜では、膜タンパク質の横方向の拡散やコンフォメーション変化がしやすい。また脂肪酸組成により膜の厚さも変化する。膜の厚さは膜タンパク質の局在を決定する要因となる。多価不飽和脂肪酸が含まれることで、膜の曲率や柔軟性が増し、エンド/エキソサイトーシスの膜の解離や融合が促進される。

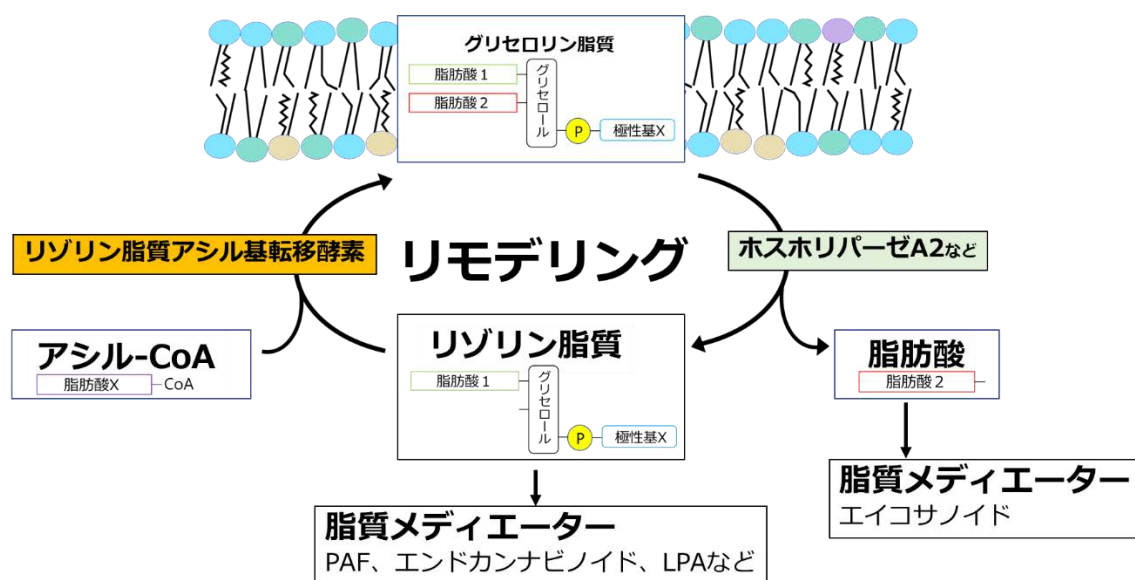


Fig. 1-6 リモデリング回路と脂質メディエーター産生

生体膜からホスホリパーゼ類によって切り出された脂肪酸はエイコサノイドなどの脂質メディエーターに変換される。リゾリン脂質は再びリゾリン脂質アシル基転移酵素によって再アシル化され膜リン脂質として戻る。リゾリン脂質の中には PAF や LPA のように脂質メディエーターとして機能するものも存在する。

にも生理活性機能が見出されている^{33,34}。脂質メディエーターの代謝前駆体としてもリン脂質の分子多様性は重要と考えられる。

1-3. リゾリン脂質アシル基転移酵素と疾患

AGPAT および MBOAT ファミリーに属する LPLAT の同定が進み、これらの酵素の生理的条件下および病態における機能に関して研究が進められている²。いくつかの LPLAT 欠損マウスを用いた研究では、特定のリン脂質分子種の減少が観察され、そのリン脂質組成の変化と欠損マウス表現型との関連性が調べられている。また疾患における遺伝子発現プロファイルからヒト疾患と LPLAT の関連性が数多く報告されるようになった。各酵素および特定のリン脂質分子種の機能的役割が示唆され、疾患のメカニズム解明、早期発見のためのバイオマーカーや治療法の開発につながる可能性がある。第二章で脂肪酸組成分析の遺伝子欠損マウスサンプルとして使用した LPCAT2、LPCAT3、LPAAT3 と、第四章で構造解析予測を LPCAT2 とともにを行った LPCAT1 についてこれまでの知見を概観する。

LPCAT1

肺サーファクタントは呼吸機能に不可欠な物質で、主成分は脂質であり、その約半分が単一の分子種、ジパルミトイル PC (PC16:0/16:0) である。PC16:0/16:0 は肺胞内で単層を形成し、表面張力を低下させ、ガス交換を促進して、肺胞空間を保つ働きを持つ^{35,36}。新生児呼吸窮迫症候群は早産児に見られ、サーファクタントの欠如によって引き起こされる³⁷。肺における PC16:0/16:0 合成の責任酵素が AGPAT ファミリーに属する LPCAT1 である^{38,39}。LPCAT1 は炭素数 16 程度の長鎖鎖飽和脂肪酸を基質として好む。LPCAT1 欠損マウスは肺サーファクタント中の PC16:0/16:0 量が低下し、過換気肺障害で激しい炎症を起こした。マウス LPCAT1 は肺に高発現し、肺サーファクタント中に十分な PC16:0/16:0 を産生する機能を持つことが報告された。またヒト LPCAT 1 ホモログも肺に発現し PC16:0/16:0 を生合成することが示唆されている⁴⁰⁻⁴²。

また近年ヒト LPCAT1 はがんとの関連が多く報告されている。胃がん、肝がんなどのがん部において発現が高く、それに伴い PC16:0/16:1 量の増加と LPC16:0 の減少が観察されている^{43,44}。また 2019 年の Junfeng Bi らの報告から、LPCAT1 は様々ながんで高く発現しており、LPCAT1 の合成する 2 つの飽和脂肪酸を持つ PC ががんの増殖シグナルに必要であることが示唆された⁴⁵。

LPCAT1 はカルシウム非依存的な PAF 合成能を持つことが知られているが¹³、LPCAT 欠損マウスにおける呼吸器障害やがん細胞に対する PAF の寄与は不明である。

LPCAT2

AGPAT ファミリーに属する LPCAT2 は LPCAT1 と同様に PAF 合成能を有するが、カルシウムが活性には必須である。LPCAT2 はマクロファージや好中球といった炎症性細胞に高く発現し、ATP や PAF、またリポ多糖 (LPS) などによって、秒単位、分単位、また時間単位のリゾ PAF アセチル基転移活性 (PAF 合成活性) 上昇がみられる^{32,46,47}。PAF は血小板の活性化、気道収縮、血圧低下、全身性アナフィラキシー、神経障害性疼痛などを引き起こす G タンパク質共役型受容体である PAF 受容体を活性化する強力な炎症誘発性脂質メディエーターである⁴⁸。LPCAT2 欠損マウスでは PAF 産生量の低下が観察され、神経障害性疼痛が軽減し、ミクログリアにおいて産生される PAF がオートクリンのように作用し疼痛につながっていると提唱された⁴⁹。

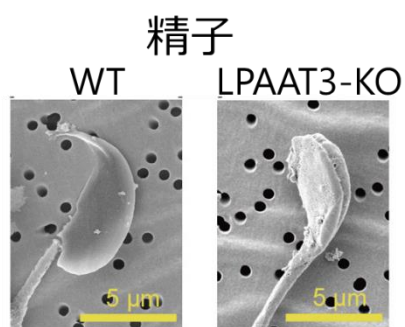
また LPCAT2 はリゾリン脂質アシル基転移活性も持ち、アラキドン酸 (20:4) やパルミチン酸 (16:0)、DHA (22:6) など幅広い基質選択性を示す^{32,41}。しかし、LPCAT2 欠損マウスでは、リン脂質組成に顕著な変化が見られなかったことから⁴⁹、LPCAT2 のリゾリン脂質アシル基転移活性の生物学的役割は不明のままではある。近年 LPCAT2 が脂肪滴の膜上に局在し、PC を産生しているとの報告もあり^{50,51}、今後 LPCAT2 の新たな生物学的役割が明らかになる可能性がある。

LPCAT3

LPCAT3 は MBOAT ファミリーに属し、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) に対しアラキドン酸 (20:4) やオレイン酸 (18:1)、リノール酸 (18:2) を転移する活性を *in vitro* のアッセイで確認されている^{52,53}。所属研究室で作製した LPCAT3 欠損マウスは新生児致死を示し、生後 2 日目から 1 週間の間に死亡した。このマウスの膜リン脂質中のアラキドン酸量は著しく減少していた。また小腸上皮細胞にトリアシルグリセロール (TAG) の蓄積が観察され、上皮細胞が機能不全を起こすことで、栄養障害が起き新生児期に死亡することが示された。LPCAT3 によって合成されるアラキドン酸豊富な細胞膜は、腸における食事由来の脂質をリポタンパクに変換するのに必須であることがわかった^{54,55}。LPCAT3 にはがん⁵⁶、動脈硬化⁵⁷やインシュリン感受性⁵⁸、腸上皮細胞分化⁵⁶との関連の報告もある。LPCAT3 が脂質ホメオスタシスに重要な役割を持ち、LPCAT3 欠損による脂質ホメオスタシスの破綻が様々な疾患に繋がることが示されている。

LPAAT3

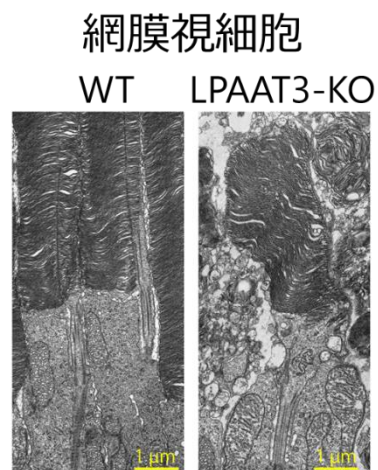
AGPAT ファミリーである LPAAT3 は *de novo* 経路に関わる酵素である^{59,60}。LPAAT3 欠損マウスでは、いくつかの組織において DHA 含有リン脂質が特異的に減少し、DHA 含有リン脂質の生合成に LPAAT3 が中心的な役割を果たしていることが示唆された^{7,61}。DHA を含むリン脂質は精巣、網膜、脳、心臓などに豊富に存在する。LPAAT3 欠損マウスの精巣と網膜において、DHA 含有リン脂質の特異的かつ顕著な減少に伴い、視覚機能と雄性生殖機能が失われることが分かった (Fig. 1-7)。雄性不妊は精子形態異常によるものであった。これは精子形成に必要な細胞質成分のセルトリ細胞による除去の過程が不十分であったためと考えられた。視覚機能障害では、網膜視細胞 disc の構造異常が原因と考えられた。これ



精子形態異常

雄性生殖不妊

Hishikawa-lizuka, Y. et al. *J. Biol. Chem.* 292. (2017) 12065-12076.



視細胞外節形態異常

視覚機能異常

Shindou H. et al. *J. Biol. Chem.* 292. (2017) 12054-12064.

Fig. 1-7 LPAAT3 欠損マウスの表現型

LPAAT3 欠損マウスでは雄性生殖不妊と視覚機能異常を示し、それぞれ精子形態異常と視細胞外節形態異常が原因と考えられた。LPAAT3 欠損マウスの精子では精子の頭部が折れ曲がり、表面に膜状のものが付着していた⁷。LPAAT3 欠損マウスの網膜では視細胞外節 (disc) の構造および配置が異常であった⁶。WT, wild type, 野生型、KO, knockout、遺伝子欠損型。

らの機能になぜ DHA 含有リン脂質が必要で、他の多価不飽和脂肪酸分子種では代替が効かないのか。DHA 含有リン脂質の特長的な生物機能について、更なる研究が必要である。

1-4. 本研究の目的

本研究ではリン脂質分子種多様性の意義と形成機構の解明を目指し、その一端として、マウス組織における脂肪酸網羅的解析と生体膜リン脂質網羅的解析の技術開発、および LPLAT によるリン脂質多様性形成機構の理解のため、以下に示す3つの課題に取り組んだ。

ガスクロマトグラフィー水素炎イオン化検出法による哺乳類組織中の脂肪酸組成解析

GC-FID 法による総脂質、リン脂質画分、および中性脂質画分の脂肪酸一斉定量法を新たに作成した。この方法を用いて各種 LPLAT 欠損マウスのリン脂質中の脂肪酸定量し、組織リン脂質組成に対する LPLAT の寄与の評価を目指した。

液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) によるマウス網膜リン脂質網羅的解析

発達段階や病的状況における網膜リン脂質組成の決定を目指した。またセルソーターにより分画した網膜細胞を LC-MS を用いてリン脂質解析することで網膜細胞の系統ごとのリン脂質組成比較を目指した。

リゾリン脂質アシル基転移酵素 LPCAT2 の基質認識機構予測

ホモロジーモデリングと点変異体解析を組み合わせることにより AGPAT ファミリーに属するリゾホスファチジルコリンアシル基転移酵素 2 (LPCAT2) の基質認識機構予測を目指した。

第2章 ガスクロマトグラフィー水素炎イオン化検出法による哺乳類組織中の 脂肪酸組成解析

2-1. 序文

脂肪酸（脂肪族カルボン酸）は、その鎖長（短鎖、中鎖、長鎖、極長鎖）と分子内二重結合の数（飽和、一価、多価不飽和）によって分類される。哺乳類では、脂肪酸は主にリン脂質、トリグリセリド、コレステロールなどにエステル化された形で存在する。リン脂質は生体膜の主要な構成要素として、トリグリセリドは濃縮されたエネルギー貯蔵物質としてそれぞれ重要であり、コレステロールエステルはコレステロール代謝に役割を果たしている⁶²⁻⁶⁵。

膜リン脂質の脂肪酸分子種多様性の分子的基盤と生物学的意義は長年にわたって明確ではなかったが、最近の研究から、異なる脂肪酸をリン脂質に転移する活性を持ついくつかのリゾリン脂質アシル基転移酵素が生体において重要な役割を果たしていることが明らかになった²。これらの報告では、リゾリン脂質アシル基転移酵素欠損マウスの表現型解析が、さまざまな組織における脂質プロファイリングとともに行われている。解析には、液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）を用いたリン脂質分子種プロファイリング（比較／差分分析）と、ガスクロマトグラフィー水素炎イオン化検出法（GC-FID）を用いた脂肪酸組成の絶対定量という2つの方法が採用された。これらのうち、LC-MS法がリン脂質を分子種ごとに定量・比較するのに対し、GC-FID法は総脂質、リン脂質および中性脂質に含まれる脂肪酸を脱エステル化して脂肪酸分子種ごとに定量・比較するという補完関係にある。GC-FIDは、様々な脂肪酸を検出するための最も古典的かつ堅牢な技術の一つである。GCは揮発性の化合物しか分析できないため、解析対象となる化合物は事前に誘導体化する必要があるが、脂肪酸は一般的にはメチル化し脂肪酸メチルエステル（FAME）とすることで、

GC 装置内で加熱時に揮発可能な形態とする (Fig. 2-1)。従来のメチル化プロトコルは、高温で誘導体化反応を行っており^{66,67}、これには時間が掛かるだけでなく、手順が煩雑で、大量のサンプルを扱うためには安全で簡便な技術が必要であった。そこで、温和な加熱で迅速に誘導体化できる方法が確立され^{68,69}、現在はキットとして市販されている (Fig. 2-2)。GC の検出器としては、FID が FAME の検出に適している。FID はサンプル中の炭素数に比例した応答を示し、広い線形ダイナミックレンジを持つため、FAME を含む様々な有機化合物の高感度検出に適している。FID に代わるより高感度な検出法として MS を用いた検出法 (GC-MS など) があるが、安定性やダイナミックレンジ、導入・維持コストなどの点では FID が有利である。第二章では、GC-FID を用いてマウス組織の脂肪酸を定量するための全プロトコルを作成した。このプロトコルでは、脂質中のエステル型脂肪酸と非エステル型遊離脂肪酸 (FFA) の合計である総脂肪酸の定量、および固相抽出⁷⁰ を組み合わせることにより中性またはリン脂質画分中のエステル型脂肪酸の一斉定量が可能となった。

また、実際にその方法を用いて、野生型マウスとリゾリン脂質アシル基転移酵素欠損マウス組織中のリン脂質の脂肪酸組成の決定を試みた。

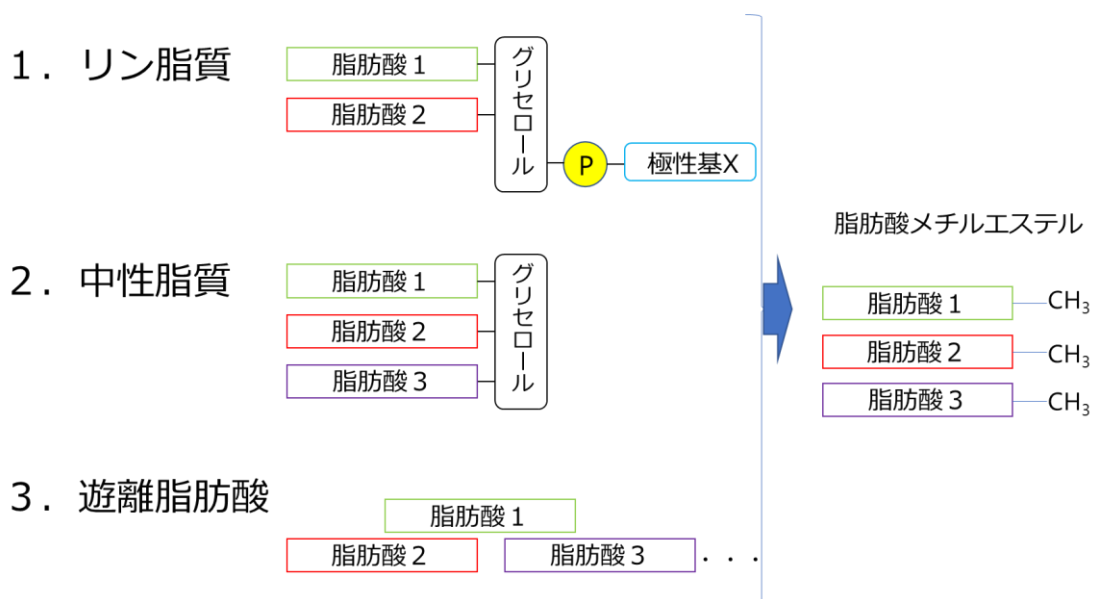
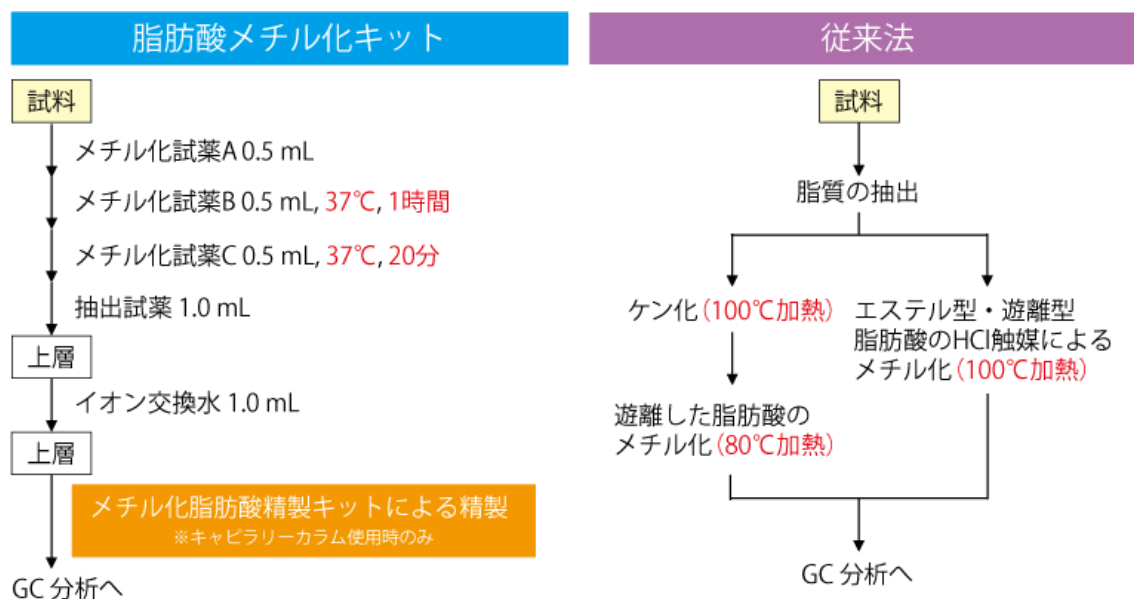


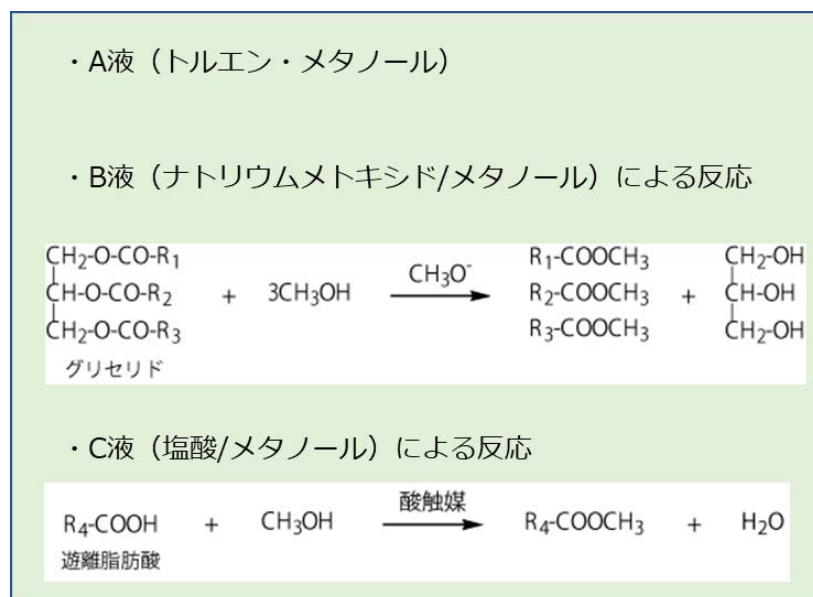
Fig. 2-1 生体内脂肪酸の形態とガスクロマトグラフィー解析

哺乳類の組織において、脂肪酸は主にリン脂質、中性脂質などのエステル型の形態で存在し、また一方で非エステル型である遊離脂肪酸としても存在している。ガスクロマトグラフィーを用いた脂肪酸解析では、エステル型、非エステル型脂肪酸のいずれも誘導体化しておく必要がある。一般的な誘導体化はメチル化であり、脂肪酸は脂肪酸メチルエステルとして分析される。またアシル CoA はコエンザイム A に脂肪酸がチオエステル結合した構造であり、アシル CoA のアシル鎖もメチル化反応で脂肪酸メチルエステルに変換される。

A)



B)



ナカライテスク HP より引用(一部改変)

<https://www.nacalai.co.jp/products/entry/d010005.html>

Fig. 2-2 ナカライテスク脂肪酸メチル化キットの手順

A はキットを用いたメチル化方法の手順(左)と従来のメチル化法手順 (右)。B はキットに含まれる試薬とメチル化反応式。

2-2. 実験材料

GC 解析用標準試薬

- Supelco 37-component FAME mix (Sigma-Aldrich, catalog number: CRM47885) (検量線用の段階希釈については 2-3.試薬調整参照)
- *cis*-4,10,13,16-Docosatetraenoic acid methyl ester [DTA (C22:4n-6) FAME] (Cayman, catalog number: 10006866)
- *cis*-7,10,13,16,19-Docosapentaenoic methyl ester [DPA (C22:5n-3) FAME] (Sigma-Aldrich, catalog number: 47563-U)
- 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z-Docosapentaenoic methyl ester [DPA (C22:5n-6) FAME] (Nu-Chek Prep, Inc., catalog number: U-102-M)
- Tricosanoic acid (C23:0 脂肪酸) (Sigma-Aldrich, catalog number: T6543) (2-3.試薬調整参照)

脂質抽出/固相抽出/脂肪酸メチル化/脂肪酸メチルエステル精製試薬およびキット

- クロロホルム (試薬特級) (FUJIFILM Wako, catalog number: 038-02606)
- ジクロロメタン (試薬特級) (FUJIFILM Wako, catalog number: 135-02441)
- アセトン (試薬特級) (FUJIFILM Wako, catalog number: 016-00346) (for GC syringe washing)
- ヘキサン (試薬特級) (FUJIFILM Wako, catalog number: 085-00416)
- 2-プロパノール (試薬特級) (FUJIFILM Wako, catalog number: 166-04836)
- 酢酸 (試薬特級) (FUJIFILM Wako, catalog number: 017-00256)
- ジエチルエーテル (試薬特級) (FUJIFILM Wako, catalog number: 055-01155)
- 28% アンモニア水 (FUJIFILM Wako, catalog number: 016-03146)
- Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS 10x) (Sigma-Aldrich, catalog number: D1408)
- 超純水 (MilliQ)

- ・ 脂肪酸メチル化キット (Nacalai Tesque, catalog number: 16962-04)

メチル化試薬 A

メチル化試薬 B

メチル化試薬 C

- ・ 抽出試薬

- ・ 脂肪酸メチルエステル精製キット (Nacalai Tesque, catalog number: 16961-14)

前処理液

洗浄液

溶出液

固相カートリッジカラム

- ・ クロロホルム:2-プロパノール (2:1, v:v) (2-3.試薬調整参照)

- ・ 2% 酢酸／ジエチルエーテル (2-3.試薬調整参照)

- ・ 2.8% アンモニア／メタノール (2-3.試薬調整参照)

2-3. 試薬調整

1. クロロホルム:2-プロパノール (2:1, v:v) (用事調製)

クロロホルム 40 mL と 2-プロパノール 20 mL をガラス製メスシリンダーで別々に測り取り、ガラス瓶に入れて混合する。

2. 2% 酢酸／ジエチルエーテル (用事調製)

メスシリンダーでジエチルエーテルを 60 mL 測り取り、ガラス瓶に移し、そこに酢酸 1.2 mL をピペットマンで加える。

3. 2.8% アンモニア／メタノール (用事調製)

メスシリンダーでメタノールを 54 mL 測り取り、ガラス瓶に移し、そこに 28% アンモニア水 6 mL をピペットマンで加える。

4. C23:0 脂肪酸 (5 mg/mL ストック溶液 および 1 mg/mL 溶液)
 - a. ガラスメスシリンダーを使ってクロロホルム:メタノール(1:1, v:v)を作成する。
 - b. 5 mg/mL ストック溶液作製には、C23:0 脂肪酸 20 mg を天秤で秤量し、ガラス試験管に入れ、クロロホルム:メタノール (1:1, v:v) 4 mL を加え溶解する。
 - c. 1 mg/mL 溶液は、5 mg/mL ストック溶液 1 mL をガラス管 (16×125 mm) に入れ、4 mL のメタノールで希釈する。 -30 °C で保存することができる。
5. 検量線用 Supelco 37-component FAME mix の段階希釈 (用事調製)
 - a. 空の 0.5 mL マイクロチューブ 4 本に「std1」、「std2」、「std3」、「std4」のラベルを貼る。
 - b. Supelco 37-component FAME mix 原液 Place 30 μ L を std1 チューブに入れる。30 μ L のジクロロメタンを std2 から std4 チューブに分注する。チップを十分にウエットしてから分注すること。
 - c. 10 μ L の std1 を std2 チューブに移す。std3、std4 にも順に 10 μ L ずつ加え、1/4 希釈を繰り返す。std4 は原液の 1/64 希釈となる。
 - d. std1～std4 をガラス製の GC バイアルインサートに移す。std1～std4 の FAME 標準物質の濃度を Table2-2 に示す。
6. DTA/DPA FAME ミックス
7. 約 1 mg/mL の C22:4n-6、 C22:5n-6、 C22:5n-6 FAME 溶液を等量ずつ混合し、DTA/DPA FAME ミックスとする。(保持時間決定のために使用するので、濃度は正確である必要はない)。

2-4. ソフトウェア

1. GC Solution Software, version 2.44 (Shimadzu)
2. Microsoft Excel

2-5. 統計

すべての統計計算は R 統計パッケージ バージョン 4.0.3 を用いて行った。統計学的検定は Welch's t-test を行い、Benjamini-Hochberg 法を用いて、False discovery rate (FDR) を q 値（補正した p 値）として求めた。有意水準は $[***FDR\ q < 0.03]$ とした。

2-6. 実験方法

生体組織からの GC-FID を用いた脂肪酸解析の全体のワークフローは Fig. 2-3 に示す。青い矢印は脂質を分画せずに総脂肪酸の組成を求めるときの方法になり、緑の矢印は脂質を中性脂質とリン脂質に分画し、それぞれの脂肪酸組成を求める方法である。

A. 組織粉砕

- 1) 凍結した生体組織（～50 mg 以下）とステンレスクラッシャーをステンレス内蓋付き 2 mL チューブに入れ、液体窒素中で冷却する。
- 2) 自動粉砕機を用いて、チューブを激しく振動させ（900-1,500 rpm, 20 sec）、組織を粉砕する。完全に組織が粉状になるまで、数回繰り返す。
- 3) 脂質を分画せずに総脂肪酸の組成を求める場合は方法 D へ。リン脂質画分および中性脂質画分の脂肪酸組成を求める場合は方法 B へ進む。

B. 脂質抽出（Bligh & Dyer 法）⁷¹

- 1) 方法 A で粉砕した組織に 800 μ L のメタノールを加える。
- 2) 4°C で 1 時間、ローテーター（3-6 rpm）を用いて転倒混和を行う。
- 3) ステンレスクラッシャーをピンセットで除いたのち、PBS 1 mL が入ったガラス試験管へチューブ内内容物すべてをデカンテーションで移す。
- 4) チューブ内の組織を全回収するために、さらに 1.0 ml のメタノールをチューブに加え

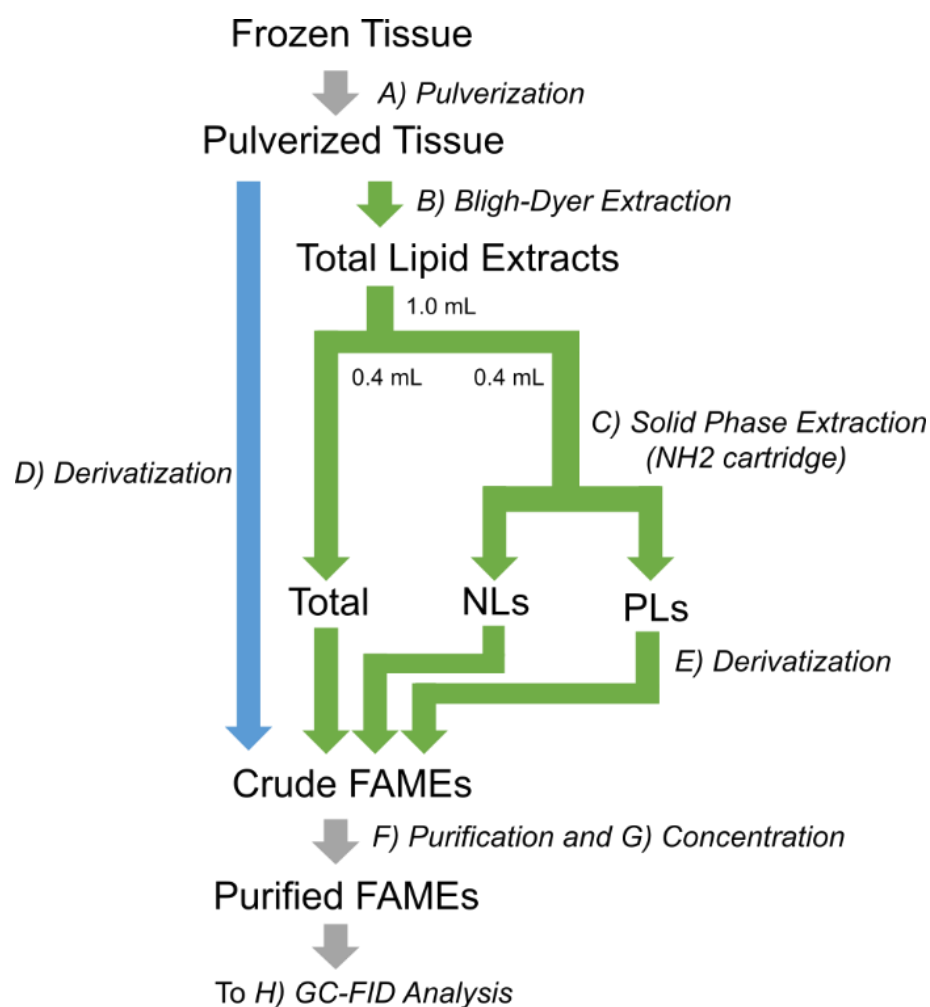


Fig. 2-3 GC-FID による組織試料からの脂肪酸定量化のためのワークフロー

A) 凍結した組織を低温で粉砕する。B) 中性脂肪 (NL)、リン脂質 (PL) 画分の脂肪酸を定量する場合は、Bligh-Dyer 法で粉砕した組織から総脂質を抽出する。C) 固相抽出で中性脂質とリン脂質を分画した後、E) 誘導体化する (緑色の経路)。D) 全脂肪酸定量の場合は、粉砕した組織を直接誘導体化する (青の経路)。

Hamano, F. et al., *Bio protoc.* 2020 May 5; 10(9): e3613 より転載⁷²。

て、全量を 3) のガラス試験管に移す。

5) 4) のガラス試験管にさらにクロロホルム 1.25 mL とメタノール 0.7 mL を加える。

6) ボルテックスを 2 分間行う。

7) 室温で 10 分間静置する。

8) クロロホルム 1.25 mL を加えて、ボルテックスを 2 分間行う。

9) PBS 1.25 mL をさらに加え、ボルテックスを 2 分間行う。

10) 室温で 10 分間、1,000 x g で遠心する。

11) 下層の有機層を新しいガラス試験管に移す。

12) 脂質を十分に回収するために、残った水層にさらにクロロホルム 1.0 mL を加え、2 分間ボルテックスし、10 分間 1,000 x g で遠心し、下層の有機層を 11) のガラス試験管に加える。

13) 11) の脂質抽出液を、ロータリーエバポレーターを用いて乾燥し、乾燥された脂質にクロロホルム 1 mL を加えて、再溶解する（脂質抽出液）。

方法 C へ続く。

C. 固相抽出による中性脂質及びリン脂質の分画

1) 脂質抽出液 1 mL のうち正確に 0.4 mL を固相抽出前の総脂肪酸サンプルとして、新しいガラス試験管（[総脂肪酸] とラベルする）に分注する。

2) アミノプロピルカートリッジ（InertSep NH₂, 200 mg/3 mL）をヘキサン 9 mL（3x3 mL）で平衡化する。

3) 新しいガラス試験管（[中性脂質画分] とラベルする）をカートリッジの下に設置する。

4) 方法 B で調製した脂質抽出液から 0.4 mL を正確に測り取り、カートリッジにアプライする。フロースルー画分を中性脂質画分として回収する。

5) クロロホルム:2-プロパノール（2:1） 9 mL（3x3 mL）をさらにカートリッジに加え、そ

の溶出液を 4) のガラス試験管〔中性脂質画分〕に引き続き回収する。

6) カートリッジを 2% 酢酸/ジエチルエーテル 9 mL (3x3 mL) で洗浄し、遊離脂肪酸画分を除去する。この遊離脂肪酸画分にはパルミチン酸 (C16:0) やステアリン酸 (C18:0) のプラスチック製チューブやチップ由来の脂肪酸が混入することが多いため、遊離脂肪酸分画として GC 解析は行わない。

7) 新しいガラス試験管〔リン脂質画分〕とラベルする) をカートリッジの下に設置する。

8) 2.8% アンモニア/メタノール 9 mL (3x3 mL) をさらにカートリッジに加え、その溶出液をリン脂質画分として回収する。

9) 3 本の試験管 (〔総脂肪酸〕、〔中性脂質画分〕、〔リン脂質画分〕) の誘導体化 (方法 E) へ続く。

D. 粉碎した組織からの総脂肪酸抽出と誘導体化 (脂質分画しない場合)

脂肪酸メチル化キット (ナカライ) を用いてメチル化を行う。

1) 方法 A-3) の粉碎した組織の入ったクラッシャー入りチューブにメチル化試薬 A (メタノール/トルエン) 500 μ L と内部標準として 1 mg/mL C23:0 脂肪酸を 10 μ L 加える。

2) 4 °C で 1 時間、ローテーター (3-6 rpm) を用いて混合する。

3) クラッシャーを除いたのち、ガラス試験管へデカントで移す。

4) メチル化試薬 B (ナトリウムメトキシド/メタノール) 500 μ L を加え、ボルテックス 5 秒間行う。

5) 37 °C 水浴で 1 時間インキュベートする。

6) メチル化試薬 C (塩酸/メタノール) 500 μ L を加え、ボルテックス 5 秒間行う。

7) 37 °C 水浴で 20 分間インキュベートする。

8) 抽出溶液 (ノルマルヘキサン) 1 mL を加え、ボルテックス 20 秒間行う。

9) 2 層に分離するまで静置した後、上層 (有機層) を新しい試験管へ移す。

- 10) 有機層にミリ Q 水 1 mL 加え、ボルテックス 20 秒間行う。
- 11) 2 層に分離するまで静置した後、上層（有機層）を新しい試験管へ移す。
- 12) 脂肪酸メチルエステル精製（方法 F）へ。

E. 脂質抽出液からの誘導体化

脂肪酸メチル化キット（ナカライ）を用いてメチル化を行う。

- 1) 有機溶媒に溶けている脂質（方法 C-9）で得られた総脂肪酸、中性脂質画分、リン脂質画分など）を、ロータリーエバポレーターを用いて乾燥する。
- 2) メチル化試薬 A（メタノール/トルエン）500 μ L と内部標準として 1 mg/mL C23:0 脂肪酸を 10 μ L（10 μ g 分）加える。
- 3) ボルテックス 20 秒間行う。
- 4) メチル化試薬 B（ナトリウムメトキシド/メタノール）500 μ L を加え、ボルテックス 5 秒間行う。
- 5) 37°C 水浴で 1 時間インキュベートする。
- 6) メチル化試薬 C（塩酸/メタノール）500 μ L を加え、ボルテックス 5 秒間行う。
- 7) 37°C 水浴で 20 分間インキュベートする。
- 8) 抽出溶液（ノルマルヘキサン）1 mL を加え、ボルテックス 20 秒間行う。
- 9) 2 層に分離するまで静置した後、上層（有機層）を新しい試験管へ移す。
- 10) 有機層にミリ Q 水 1 mL 加え、ボルテックス 20 秒間行う。
- 11) 2 層に分離するまで静置した後、上層（有機層）を新しい試験管へ移す。
- 12) 脂肪酸メチルエステル精製（方法 F）へ。

F. 脂肪酸メチルエステルの精製

脂肪酸メチルエステル精製キット（ナカライ）を用いて、精製を行う。

- 1) 固相カートリッジに前処理液 3 mL を注入し、洗浄する。
- 2) カートリッジにメチル化反応を行った溶液を注入し、吸着させる。
- 3) 洗浄液 3 mL を注入し、洗浄する。
- 4) カートリッジの下に新しいガラス試験管を設置したのち、溶出液 3 mL を加えて、脂肪酸メチルエステルを回収する。
- 5) 脂肪酸メチルエステル溶液濃度が薄い場合は濃縮（方法 G）を行う。十分な濃さがある場合は GC-FID 解析（方法 H）へ。

G. 脂肪酸メチルエステル溶液の濃縮

- 1) 方法 F で調製した脂肪酸メチルエステル溶液を、ロータリーエバポレーターを用いて乾固する。このステップは 10-15 分かかる。乾燥後にさらに長時間蒸発させると、炭素鎖が短い脂肪酸メチルエステルほど失われてしまうため、乾燥後は速やかにサンプルを回収すること。
- 2) 乾固した脂肪酸メチルエステルに少量（20-500 μ L）のジクロロメタンを加えて再溶解し、GC 測定用バイアルに移す。

H. GC-FID 解析

GC-FID 装置に GC-2010Plus（島津製作所）、キャピラリーカラムに FAMEWAX カラム（RESTEK）を使用した。

- 1) カラムオープン、インジェクター、検出器温度をそれぞれ、140°C、240°C、250°Cにする。
- 2) キャリアガスにヘリウムを使用し、線速度 45 cm/秒に設定する。
- 3) オープン温度プログラムは Table 2-1 の通りに設定する。
- 4) 標準試料（std1~std4、および DTA/DPA FAME ミックス）（2-3.試薬調整参照）を、スプ

リット比 1:25 に設定し、2 μ L ずつ FAMEWAX カラムに注入して分析する。Table2-1 の GC カラムオープン温度プログラムを用いることで、良好な分離が得られる (Fig. 2-4)。

Note : C18:1n-9 と C18:2n-6 の *cis* と *trans* の FAME 異性体は、このプロトコルでは分離されないため、データ処理には *cis* と *trans* の FAME 異性体の分離は行わない。実際、哺乳類組織サンプルには *trans*-異性体がほとんど存在しないため、*cis* と *trans* 分離をせずに短時間で測定することが、哺乳類組織サンプルにとって実用的である。

5) 目的のサンプルを標準試料と同じ GC メソッドを用いて分析する (Fig.2-5)。試料の濃度に応じて、split 比や注入量を微調整することができる。

2-7. データ解析

1) GC Solution ソフトウェア (島津製作所) を用いて解析を行う。27 種類のターゲット FAME (Supelco 37 成分 FAME ミックスのうちの 24 種類の FAME と、C22:4n-6、C22:5n-6、C22:5n-3) の保持時間と検量線用濃度を入力し、線形検量線 (Curve Fit Type: 'Linear') を使用して定量用の化合物テーブルを作成する (Fig. 2-6A、赤枠)。保持時間は、分析で得られたピーク結果に応じて記入することができる。検量線用濃度は、Table 2-2 のように設定できる。

注 : C22:4n-6、C22:5n-6、C22:5n-3 の 3 つの FAME には、C23:0 の検量線が設定されることになる。

2) std1 から std4 までのデータファイルを処理し、「force origin」オプションを用いて線形検量線を作成する (Y 切片を強制的にゼロにする)。24 種類の FAME について線形反応が観測されたことを確認する (Fig. 2-6A、青枠)。

3) GC Solution ソフトウェアで「Curve Fit Type」を「Linear」から「Manual RF (Linear)」に変更する (Fig.2-6B)。これにより、傾き (response factor、RF) の値が手動で修正可能となる。C23:0 FAME の RF 値を、C22:4n-6、C22:5n-6、C22:5n-3 FAME の RF 値にコピーして、

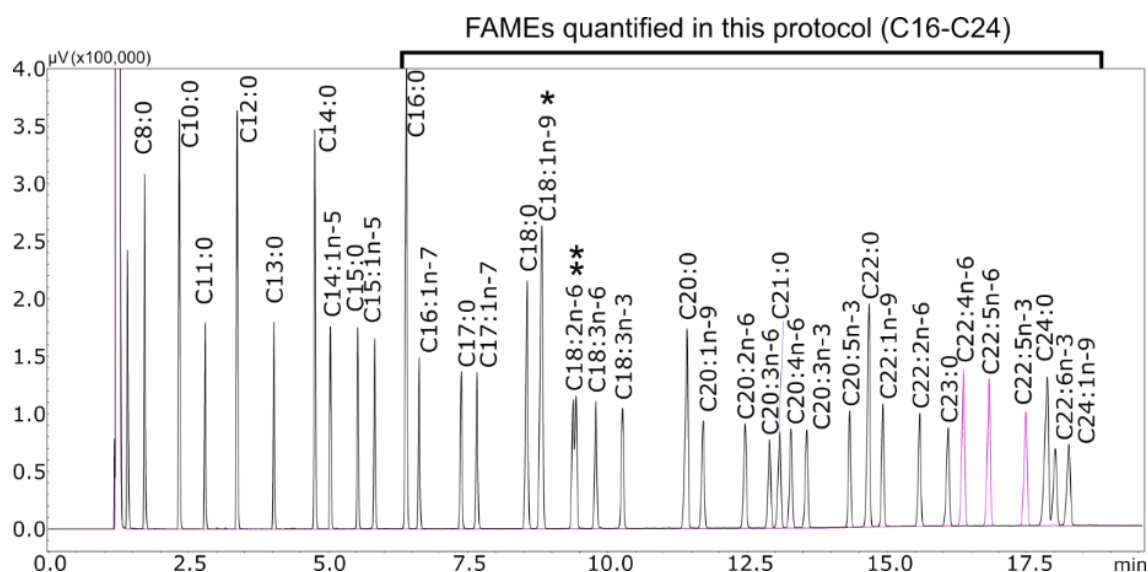


Fig. 2-4 脂肪酸メチルエステル (FAME) 標準品のクロマトグラム

Supelco 37 成分の FAME ミックス (黒) と DTA/DPA FAME ミックス (ピンク) のクロマトグラムを重ねて示した。手順 G の濃縮のためのロータリーエバポレーターを用いた乾燥では短鎖の FAME の定量性が損なわれるため、本プロトコルでは C16 より長い FAME を定量する。*C18:1n-9 および**C18:2n-6 FAME の異性体は完全には分離されないため、シスとトランスの異性体の合計として定量を行う。

Hamano, F. et al., *Bio protoc.* 2020 May 5; 10(9) : e3613 より転載⁷²。

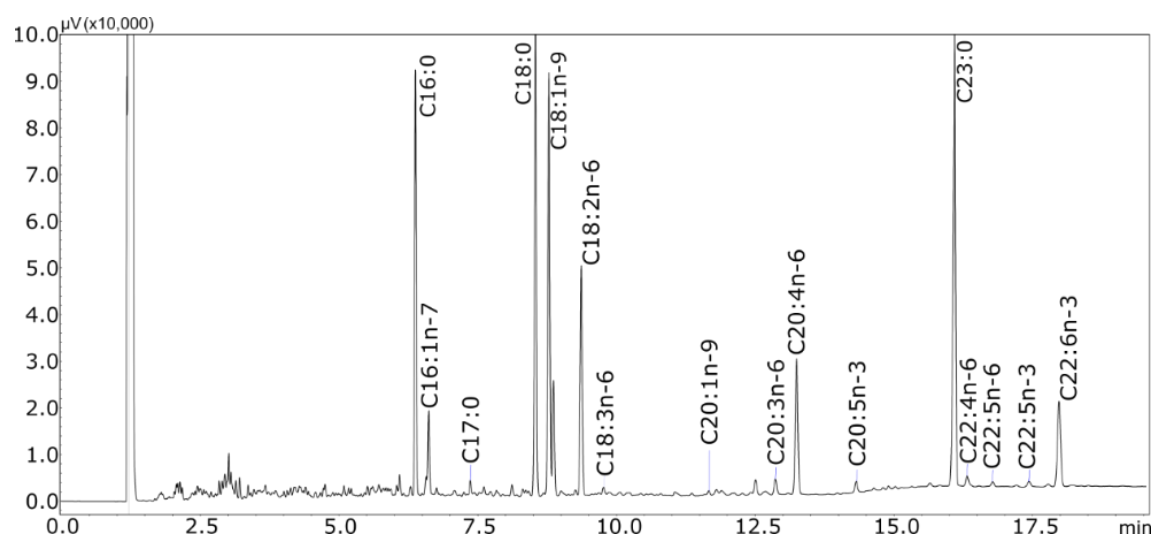


Fig. 2-5 典型的なマウス組織サンプルのクロマトグラム

E18.5 マウスの小腸約 5 mg から Bligh-Dyer 法により全脂質を抽出し、そのうちの 40%を誘導体化して FAME を得た。20 μ L のジクロロメタンで再構成した後、2 μ L を GC カラムに 1:25 のスプリット比で注入した。

Hamano, F. et al., *Bio protoc.* 2020 May 5; 10(9) : e3613 より転載⁷²。

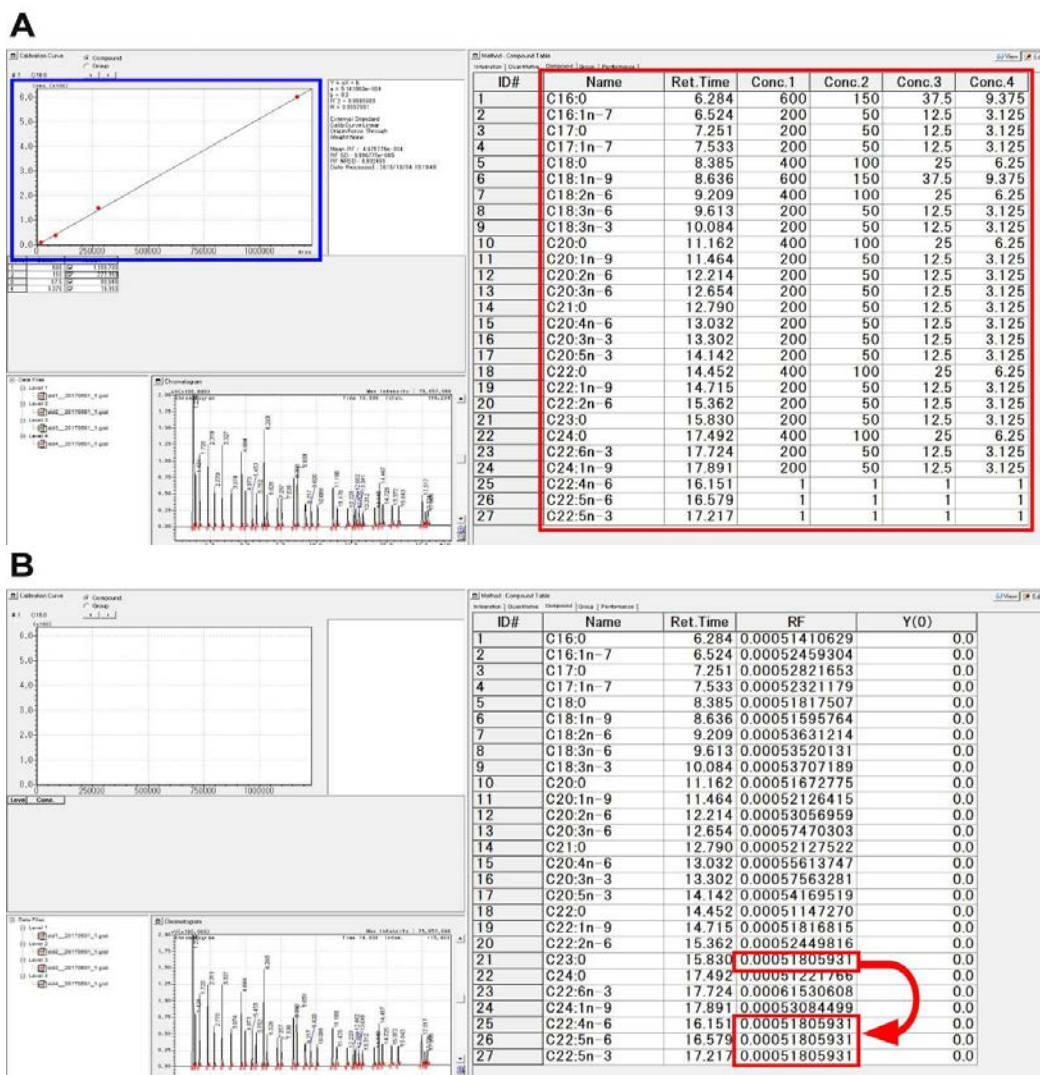


Fig.2-6 GC Solution ソフトウェアによるデータ処理。A. 化合物テーブル(赤枠)と検量線(青枠)。検量線は、標準試料の処理後に直線性を確認することができる。B. C23:0 FAME を使用して C22:4n-6、C22:5n-6、C22:5n-3 FAME 検量線を作成する。「Curve Fit Type」を「Manual RF (Linear)」に変更した後、C23:0 FAME の response factor (RF) を C22:4n-6、C22:5n-6、C22:5n-3 FAME のものにコピーする。

Hamano, F. et al., *Bio protoc.* 2020 May 5; 10(9) : e3613 より転載⁷²。

C23:0 FAME と同等の FID 反応効率をもつ化合物として定量する (Fig.2-6B、矢印)。すべての FAME の RF 値は類似しているため、他の FAME の RF 値も有効な近似値として使用できる。

- 4) 作成した検量線設定を用いて、未知のサンプルのデータファイルを処理する。
- 5) すべてのピークが正しく検出されていることを確認し、正しく検出されていない場合は、手動またはピーク検出パラメータを変更して修正する。
- 6) GC Solution から得られた生の定量データを MS Excel のワークシートにコピー＆ペーストし、元のサンプルに含まれる脂肪酸 (FA) の絶対量を算出する (Table 2-3)。生の定量データは GC バイアル内の FAME 濃度であるため、サンプルにスパイクされた既知量 (すなわち 10 µg) の C23:0 FA を使用して、以下の比例計算によりサンプル中の FAME の絶対量を求める。

$$\begin{aligned}
 & \text{Amount of FAME X (}\mu\text{g)} \\
 &= \frac{\text{Amount of C23:0 FA (}\mu\text{g)}}{\text{Conc. of C23:0 FAME (}\mu\text{g/mL)}} \times \frac{\text{Molecular weight of C23:0 FAME}}{\text{Molecular weight of C23:0 FA}} \\
 & \times \text{Conc. of FAME X (}\mu\text{g/mL)} \\
 & \text{Amount of FAME X (}\mu\text{g)} \\
 &= \frac{10}{\text{Conc. of C23:0 FAME (}\mu\text{g/mL)}} \times \frac{368.637}{354.610} \times \text{Conc. of FAME X (}\mu\text{g/mL)}
 \end{aligned}$$

FAME の量は、FAME に対応する FA の分子量を用いて FA の量に変換することができる (Table2-3)。

$$\text{Amount of FA X (}\mu\text{g)} = \text{Amount of FAME X (}\mu\text{g)} \times \frac{\text{Molecular weight of FA X}}{\text{Molecular weight of FAME X}}$$

7) 上記のように比例計算を行い、最初のサンプルに含まれる FA の量を求める。手順 C (総量 1.0 mL から 0.4 mL を分析) で調製した試料の場合は、その量に 2.5 ($=1.0/0.4$) を乗じること。

2-8. 注意事項

プラスチック器具から成分が溶出して、いくつかの FAME の定量ができなくなるため、有機溶媒用のプラスチック器具 (チューブや容器) は、ピペットチップを除いて使用しない。同様に、脂肪酸メチル化キットの試薬をプラスチック容器に移し替えて使用することも避ける。

有機溶剤を正確に定量するためには、吸引前にピペットを溶剤であらかじめ 10 回以上ピペッティングしておく必要がある。

安全のため、有機溶剤はヒュームフードやドラフトチャンバー内で使用する必要がある。白衣を着用し、保護メガネと手袋を使用している。

2-9. 応用例に用いるマウスおよびマウス組織

マウスを用いる動物実験は、国立国際医療研究センター動物実験委員会のガイドラインに基づいて承認され、実施した。遺伝子組み換えを含むすべての実験は、国立国際医療研究センターのバイオセーフティー委員会のガイドラインの承認を得、それに従って実施した。リゾホスファチジルコリンアシル基転移酵素 3 (LPCAT3) 欠損マウス

(C57BL/6N)、リゾホスファチジルコリンアシル基転移酵素 (LPCAT2) 欠損マウス

(C57BL/6N)、およびリゾホスファチジン酸アシル基転移酵素 (LPAAT3) 欠損マウス

(C57BL/6J) およびそれぞれに対応する野生型マウスは清水孝雄研究室において作製されたものを用いた^{7,49,54}。野生型マウスはヘテロ欠損マウス同士の交配によって得られたものを用いた。

組織サンプルは、マウスを安楽死させたのち、直ちに液体窒素で凍結させ、脂質抽出前に重量を測定した。脂肪酸測定のために、LPCAT3 欠損マウス（新生児致死）とそのコントロールマウスからは生後 0 日の肝臓を採取した（n=4）。LPCAT2 欠損マウスとそのコントロールマウスは LPCAT2 の発現の高い臓器として脾臓を回収した（9 週齢、n=4）。LPAAT3 欠損マウスとそのコントロールマウスは LPAAT3 の発現量が多い精巣を回収した（12 週齢、n=4）。

2-10. 結果

Fig.2-3 において緑色の線で示した手順を用いて、リゾリン脂質アシル基転移酵素欠損マウスとコントロールマウス組織のリン脂質画分における脂肪酸の定量を行った。LPCAT2 欠損マウス、LPCAT3 欠損マウス、LPAAT3 欠損マウス、および対照群となる各々の野生型マウスを測定に用いた。各酵素が高発現している臓器を解析対象とし、LPCAT2 は脾臓、LPCAT3 は肝臓、LPAAT3 は精巣をサンプルとして採取した。これらの遺伝子の欠損マウスの表現型と、それぞれの酵素を強制発現させた CHO 細胞のマイクロゾーム画分を用いた酵素活性解析から明らかとされている主な脂肪酸基質については Fig. 2-7 に示した。

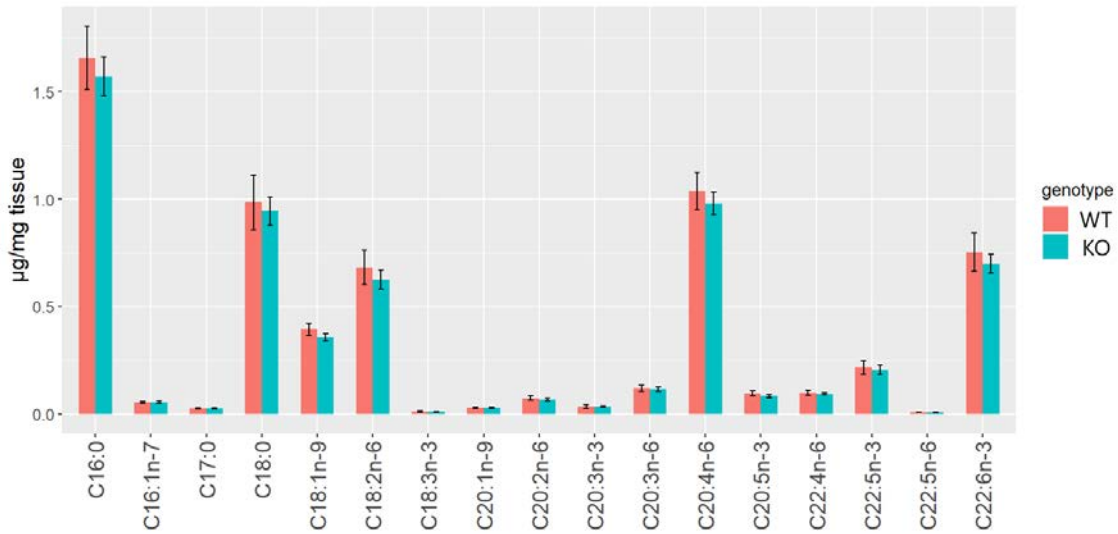
LPCAT2 は基質として 2 : 0-CoA および 20 : 4-CoA を利用できる。LPCAT2 欠損マウスと野生型マウスの脾臓のリン脂質構成脂肪酸の一斉定量を行った結果、脂肪酸組成に明らかな違いは見られなかった（Fig. 2-8A）。なお、以前の報告よりこの LPCAT2 欠損マウスのマクロファージおよび組織において PAF が検出されないことがわかり、LPCAT2 が生体における PAF 合成の責任酵素であることが示された。（Fig. 2-8B）⁴⁹。次に、LPCAT3 欠損マウスの肝臓のリン脂質構成脂肪酸を定量した。LPCAT3 を高発現する肝臓では、遺伝子欠損によりリン脂質中の C18:2n-6（リノール酸）、C20:3n-6、C20:4n-6（アラキドン酸）、C20:5n-3（EPA）の有意な減少と C22:4n-6、C22:5n-6 の有意な増加が認められた（Fig. 2-9）。次に LPAAT3 欠損マウスの精巣のリン脂質構成脂肪酸を一斉定量した。LPAAT3 の主要な発現臓

リゾリン脂質アシル基 転移酵素	主な脂肪酸基質	KOマウス表現型	論文
LPCAT2	2:0, 20:4 (アラキドン酸)	神経因性疼痛の軽減	Shindou et al. (2017) JBC
LPCAT3	20:4 (アラキドン酸)	新生児致死 中性脂質分泌異常	Yoshida-Hashidate et al. (2015) eLife、 Rong X et al. (2015) Life など
LPAAT3	22:6 (DHA)	精子形成不全	Iizuka-Hishikawa et al. (2017) JBC
		網膜変性	Shindou et al. (2017) JBC

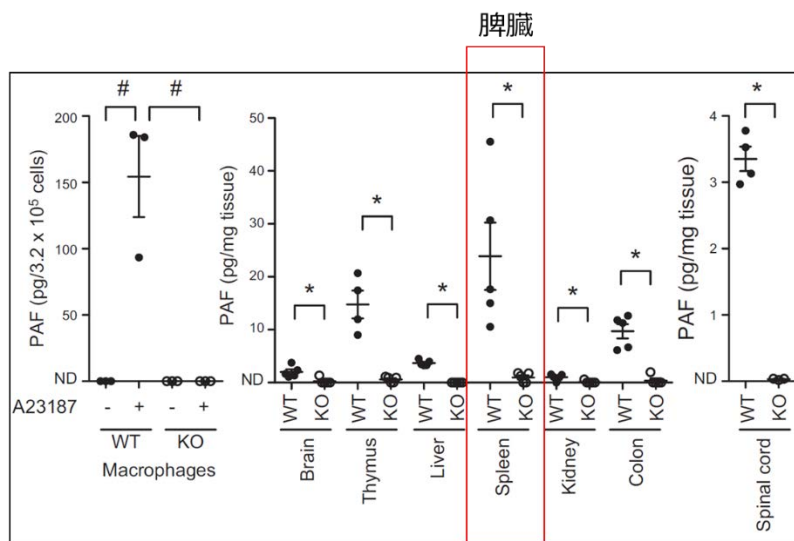
Fig.2-7 GC-FID 測定に用いたリゾリン脂質アシル基転移酵素欠損マウス

3 種類のリゾリン脂質アシル基転移酵素欠損マウスのリン脂質画分における脂肪酸測定を行った。各酵素の主な脂肪酸基質と欠損 (KO) マウスの表現型を示した。

A)



B)



Shindou, H et al. *FASEB J.* (2017) 31(7):2973-2980より引用

Fig.2-8 LPCAT2 欠損によるマウス肝臓リン脂質構成脂肪酸組成への影響

A. GC-FID による野生型マウスおよび LPCAT2 欠損マウス脾臓リン脂質構成脂肪酸測定結果を示した(平均値±SD、n=4)。統計学的検定は Welch's t-test を行い、Benjamini-Hochberg 法を用いて、False discovery rate (FDR) を q 値 (補正した p 値) として求めた。有意水準は [***FDR q<0.03] とした。B. LPCAT2 欠損マウスの PAF 合成量 (Shindou, H et al. *FASEB J.* (2017) 31(7):2973-2980 より引用) ⁴⁹。脾臓における PAF 合成を赤枠で囲んだ。

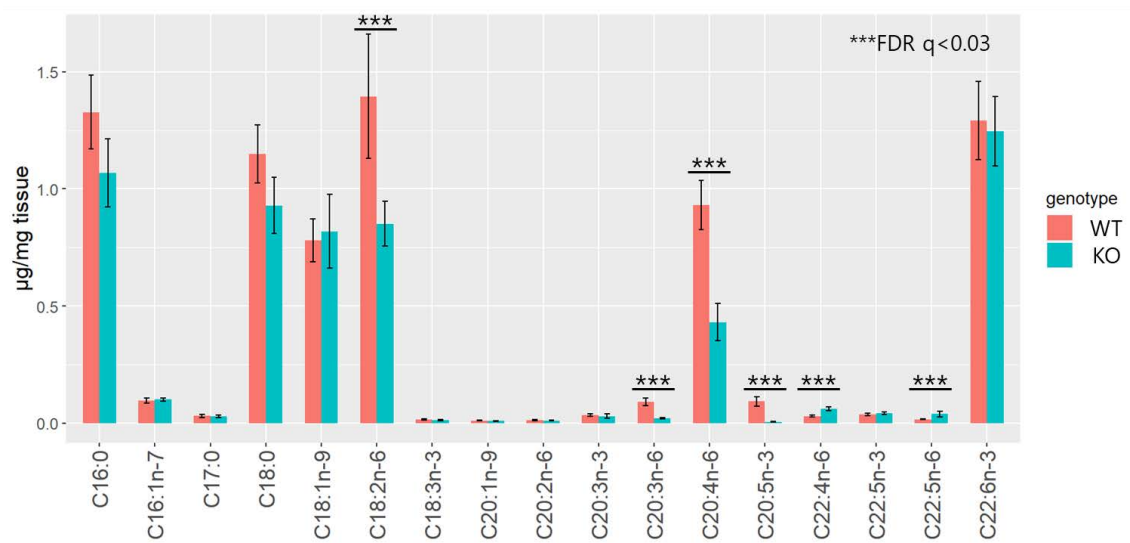


Fig.2-9 LPCAT3 欠損によるマウス肝臓リン脂質構成脂肪酸組成への影響

GC-FID による野生型マウスおよび LPCAT3 欠損マウス肝臓リン脂質構成脂肪酸測定結果を示した(平均値±SD、n=4)。統計学的検定は Welch's t-test を行い、Benjamini-Hochberg 法を用いて、False discovery rate (FDR) を q 値 (補正した p 値) として求めた。有意水準は [***FDR $q < 0.03$] とした。

器の1つである精巣では、遺伝子欠損によりリン脂質中の C18:3n-3 (リノレン酸)、C20:5n-3、C22:5n-3、C22:6n-3 量が有意に減少し、C22:4n-6、C22:5n-6 (DHA) 量が有意に増加していた (Fig. 2-10)。以上より、GC-FID を用いた脂肪酸一斉定量分析により、組織リン脂質組成に対するリゾリン脂質アシル基転移酵素の寄与を評価することができた。

2-11. 考察

マウス組織の脂肪酸定量を行うために、GC-FID を用いた脂肪酸分析プロトコルの作成を行った。このプロトコルにより、組織に含まれるエステル型脂肪酸と非エステル型脂肪酸の合計である総脂肪酸の定量、および、アミノプロピルカートリッジ固相抽出によりリン脂質または中性脂質画分中のエステル型脂肪酸の定量が可能となった。この方法を用いて、各種 LPLAT 欠損マウス臓器のリン脂質構成脂肪酸定量を行った。LPCAT2 遺伝子欠損による脂肪酸組成の寄与が LPCAT2 高発現組織である脾臓では見られなかった。LPCAT2 は生体においては PAF 合成が主な役割で、リン脂質合成には関与していない可能性が考えられる。しかし LPCAT2 は脂肪滴上にも局在していることが知られており、局所においてアシル基転移活性を有しているかもしれない^{50,51}。今後、細胞内小器官ごとの脂肪酸解析を行うことで、生体における LPCAT2 のリン脂質合成への関与を見つけられる可能性がある。LPCAT3 と LPAAT3 欠損マウスで減少していた脂肪酸は、各組織において酵素の基質となっていると考えられた。LPCAT3 で増加した C22:4n-6、C22:5n-6 はリン脂質に取り込まれなかった 20:4-CoA が伸長酵素の基質となり伸長し、なんらかの LPLAT によってリン脂質に取り込まれたものと考えられる^{54,73}。また LPAAT3 欠損マウスではオメガ3系の多価不飽和脂肪酸の減少に対してオメガ6系の多価不飽和脂肪酸の増加が観察された。オメガ6系脂肪酸の増加については、アシル CoA の代謝変動に加え、LPAAT3 遺伝子欠損により引き起こされたオメガ3系脂肪酸、特に DHA の欠乏を肝臓が感知し、多価不飽和合成酵素を誘導して、それらを各組織に供給するフィードバック機構が存在している可能性が推測される⁷⁴。

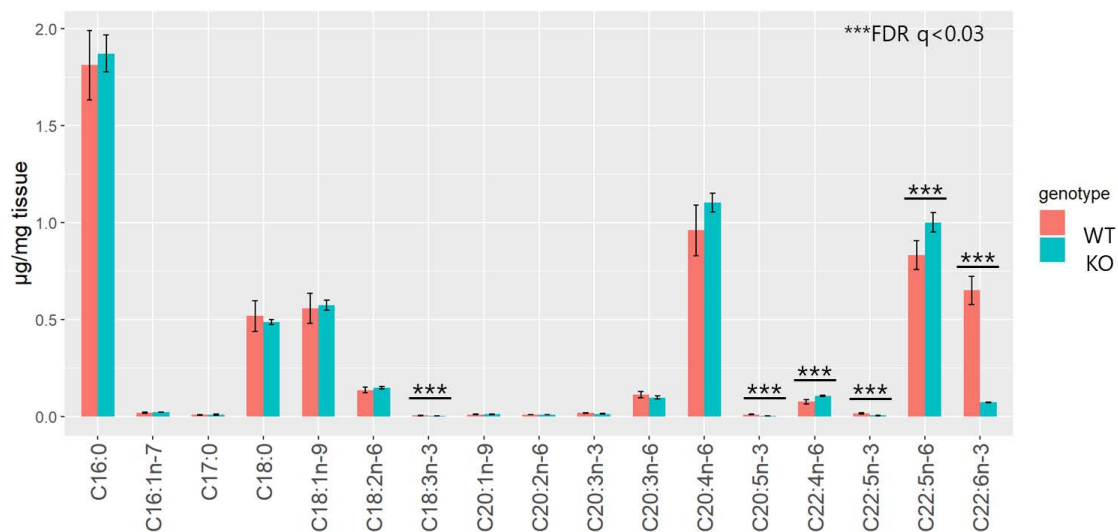


Fig.2-10 LPAAT3 欠損によるマウス精巣リン脂質構成脂肪酸組成への影響

GC-FID による野生型マウスおよび LPAAT3 欠損マウス精巣リン脂質構成脂肪酸測定結果を示した(平均値 $\pm$ SD、n=4)。統計学的検定は Welch's t-test を行い、Benjamini-Hochberg 法を用いて、False discovery rate (FDR) を q 値 (補正した p 値) として求めた。有意水準は [***FDR $q < 0.03$] とした。

2-12. まとめ

脂質は水に溶けず、有機溶媒に溶解させる必要があり、中でもリン脂質はその両親媒性の物性から実験対象として扱いにくい。第二章では脂質の抽出から、脂質の分画、および GC-FID 解析までの全工程をプロトコル化した。このプロトコルにより、マウス組織の総脂質、リン脂質画分、および中性脂質画分の脂肪酸一斉定量が可能となった。

本法により、リゾリン脂質アシル基転移酵素の組織リン脂質組成に対する寄与を評価することができた。

Table2-1. GC カラムオーブンの温度プログラム

	Rate (°C/min)	Temperature (°C)	Hold (min)	Time
0		140.0	0.0	
1	11.0	200.0	0.0	
2	3.0	225.0	0.0	
3	20.0	240.0	5.0	
Total program time: 19.54 min				

Table 2-2. 検量線用 FAME mix の濃度

連続的に希釈した標準 FAME の濃度。*C18:1n-9 および**C18:2n-6 FAMEs の濃度は, *cis*-および *trans*-異性体の合計として表されている (Fig. 2-4 参照)。

FAME	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)			
	std1	std2	std3	std4
C16:0	600	150	37.5	9.375
C16:1n-7	200	50	12.5	3.125
C17:0	200	50	12.5	3.125
C17:1n-7	200	50	12.5	3.125
C18:0	400	100	25	6.25
C18:1n-9 <i>cis</i> + C18:1n-9 <i>trans</i> *	600	150	37.5	9.375
C18:2n-6 <i>cis</i> + C18:2n-6 <i>trans</i> **	400	100	25	6.25
C18:3n-6	200	50	12.5	3.125
C18:3n-3	200	50	12.5	3.125
C20:0	400	100	25	6.25
C20:1n-9	200	50	12.5	3.125
C20:2n-6	200	50	12.5	3.125
C20:3n-6	200	50	12.5	3.125
C21:0	200	50	12.5	3.125
C20:4n-6	200	50	12.5	3.125
C20:3n-3	200	50	12.5	3.125
C20:5n-3	200	50	12.5	3.125
C22:0	400	100	25	6.25
C22:1n-9	200	50	12.5	3.125
C22:2n-6	200	50	12.5	3.125
C23:0	200	50	12.5	3.125
C24:0	400	100	25	6.25
C22:6n-3	200	50	12.5	3.125
C24:1n-9	200	50	12.5	3.125

Table 2-3. 生の定量データから FA 量を算出する方法を示した例。

この Table では、E18.5 マウス小腸の定量結果を例に挙げる。GC Solution ソフトウェアから得られる生の定量データは、GC バイアル内の FAME 濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を示しており、サンプル中の C23:0 FAME 量 $10.396 \mu\text{g}$ (C23:0 FA $10 \mu\text{g}$ に相当) を用いた比例計算によって各 FAME 量 (μg) に変換することができる。FAME 量は、分子量比を用いてさらに FA 量に変換することができる。赤色で示された値は、分子量から決まる定数である。

Fatty acid	Raw quantification data ($\mu\text{g/mL}$)	Amount of FAME in the sample (μg)	M.W.(FA) /M.W.(FAME)	Amount of FA in the sample (μg)
C16:0	111.116	4.868	0.948	4.615
C16:1n-7	28.239	1.237	0.948	1.172
C17:0	5.767	0.253	0.951	0.240
C17:1n-7	0.000	0.000	0.950	0.000
C18:0	172.423	7.554	0.953	7.199
C18:1n-9	147.546	6.464	0.953	6.158
C18:2n-6	82.938	3.633	0.952	3.460
C18:3n-6	2.524	0.111	0.952	0.105
C18:3n-3	0.000	0.000	0.952	0.000
C20:0	0.000	0.000	0.957	0.000
C20:1n-9	1.442	0.063	0.957	0.060
C20:2n-6	0.000	0.000	0.957	0.000
C20:3n-6	8.543	0.374	0.956	0.358
C21:0	0.000	0.000	0.959	0.000
C20:4n-6	67.035	2.937	0.956	2.807
C20:3n-3	0.000	0.000	0.956	0.000
C20:5n-3	5.405	0.237	0.956	0.226
C22:0	0.000	0.000	0.960	0.000
C22:1n-9	0.000	0.000	0.960	0.000
C22:2n-6	0.000	0.000	0.960	0.000
C23:0	237.292	10.396	0.962	10.000
C24:0	0.000	0.000	0.963	0.000
C22:6n-3	51.497	2.256	0.959	2.164
C24:1n-9	0.000	0.000	0.963	0.000
C22:4n-6	5.316	0.233	0.960	0.223
C22:5n-6	2.079	0.091	0.959	0.087
C22:5n-3	2.888	0.127	0.959	0.121

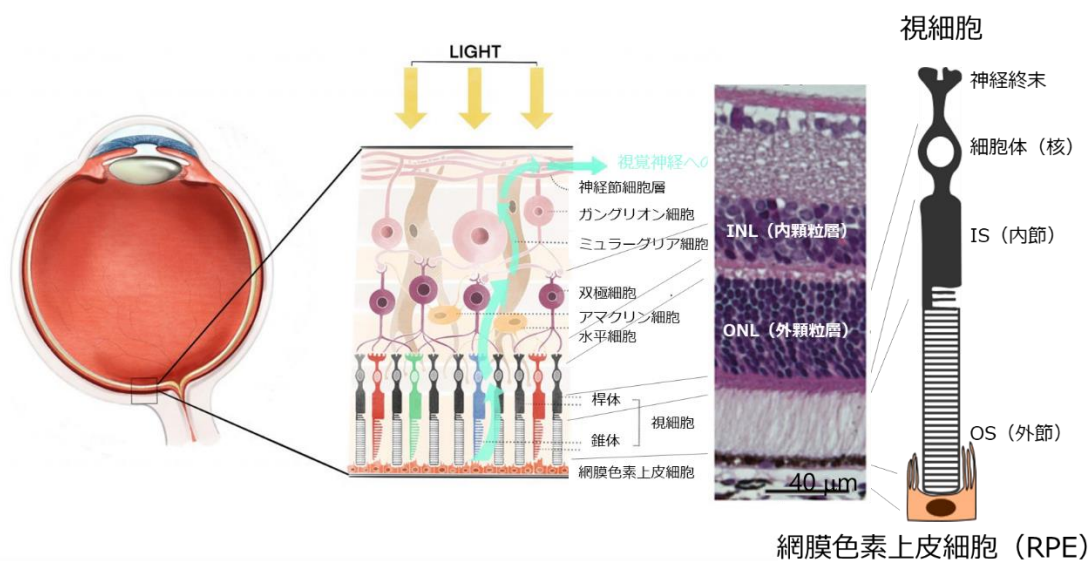
第3章 液体クロマトグラフィー質量分析法によるマウス網膜リン脂質分子種

網羅的解析

3-1. 序文

脊椎動物の網膜は 6 種類の神経細胞、色素上皮細胞とミュラーグリア細胞から構成されている (Fig. 3-1) ⁷⁵。マウスではこれらの主要な網膜細胞は共通の網膜前駆細胞に由来し、胎生 11 日 (E11) から生後 10 日 (P10) の間に順次発生する。網膜のガングリオン細胞、アマクリン細胞、水平細胞、および錐体視細胞の大部分は出生前に分化するが、双極細胞、桿体視細胞、およびミュラーグリア細胞の大部分は出生後に発生する (Fig. 3-2)。これまでの研究により、秩序立った網膜細胞の分化は転写因子とエピゲノム機構が協調して作用することで制御されていることが明らかとなっている ^{76,77}。

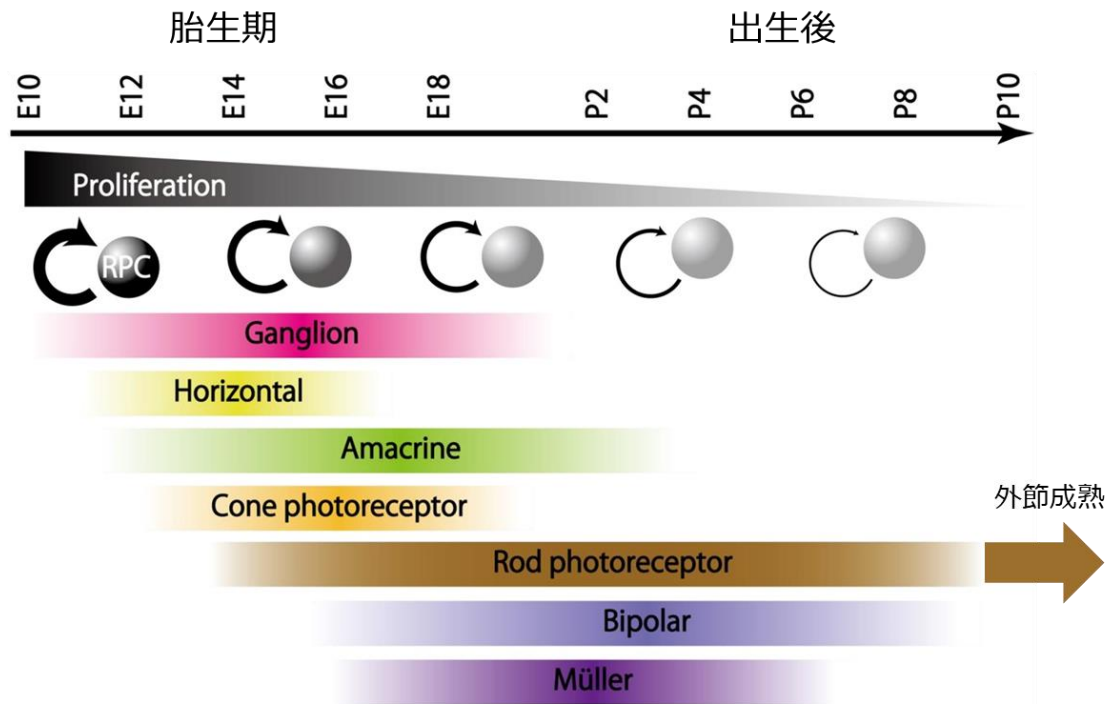
網膜視細胞の変性は失明の原因のひとつであるが、現在のところ網膜視細胞変性症に有効な治療法は見つかっていない。脂質代謝をはじめとする様々な生物学的プロセスが、視細胞の維持に関わっていると考えられる。特に、脂質ホメオスタシスの異常が網膜変性を引き起こすことを示唆するデータが多く存在する。突然変異遺伝子である *rd* (retinal degeneration) を有する *rd1* から *rd16* マウスは、遺伝性網膜変性症のモデルマウスとして、広く用いられている。その中の *rd11* マウスは、*Lpcat1* 遺伝子のエクソン 3 に一塩基挿入 (c.420-421 insG) があり、その結果ストップコドンが入り、未成熟の酵素ができる ⁷⁸。LPCAT1 は、パルミトイル-リゾホスファチジルコリン (LPC16:0) にパルミチン酸 (C16:0) を導入し、ジパルミトイルホスファチジルコリン (PC16:0/16:0) の生合成を触媒するリゾホスファチジルコリンアシル基転移酵素である ^{38,39,79}。*rd11* マウスの網膜では PC16:0/16:0 量の減少が確認されているが ⁷⁸、PC16:0/16:0 量の減少と視細胞変性との関連性については明らかにされていない。



<https://gene.vision/knowledge-base/leber-hereditary-optic-neuropathy-for-patients/>より引用
Shindou H. et al. *J. Biol. Chem.* 292. (2017) 12054-12064より一部改変

Fig. 3-1 網膜を構成する細胞と桿体視細胞の構造

網膜は眼球内の後ろを覆う薄い膜で、ミュラーグリア細胞と6種類の神経細胞（ガングリオン細胞、双極細胞、アマクリン細胞、水平細胞、桿体視細胞、錐体視細胞）が層状に重なった構造をしている。また視細胞の外側には網膜色素上皮細胞（RPE）が存在する。桿体視細胞は細長い細胞で、外節、内節、核を含む細胞体と神経終末の4つの部分から成り立っている。外節は繊毛が発達した構造で、光を効率的に取り込むために大量の光受容体であるロドプシンが埋め込まれた膜がぎっしりと積み重なっている。RPE細胞は、視細胞を保護する役目を持ち、視細胞に栄養を与え、古くなった外節を貪食し、リサイクルして、視細胞を正常に保つ働きがある。



Iwagawa T, Watanabe S. Neurosci Res. (2019) 138:43-48より一部改変

Fig. 3-2 マウスの発生過程における網膜細胞形成の時間軸

網膜細胞は共通の網膜前駆細胞に由来し、胎生 11 日 (E11) から生後 10 日 (P10) の間に順次発生する。網膜のガングリオン (Ganglion) 細胞、アマクリン (Amacrine) 細胞、水平 (Horizontal) 細胞、および錐体視細胞 (Cone photoreceptor) の大部分は出生前に分化するが、双極 (Bipolar) 細胞、桿体視細胞 (Rod photoreceptor)、およびミュラーグリア (Müller) 細胞の大部分は出生後に発生する⁷⁷。桿体視細胞の外節は網膜発達の後期に成熟していく。

オメガ3系長鎖多価不飽和脂肪酸 (LC-PUFA) は、網膜において抗血管新生作用や神経保護作用を示すと報告されている⁸⁰。LC-PUFA であるドコサヘキサエン酸 (DHA, C22:6) は視細胞の発生とその維持に重要な役割を果たしていると考えられている^{81,82}。エイコサペンタエン酸 (EPA, C20:5) と DHA の大量摂取は、中期加齢黄斑変性症 (AMD) を予防または遅延させることが示されている⁸³。しかし、進行した AMD における EPA および DHA の役割は未だ不明である。DHA 含有リン脂質合成酵素であるリゾホスファチジン酸アシル基転移酵素 3 (LPAAT3) を欠損したマウスは、視細胞外節 (OS) の不完全な伸長やディスク形態の乱れ、外顆粒層 (ONL) の厚さが減少し、さらに視覚機能の低下を示した⁶¹。Stargardt 病では、網膜色素上皮 (RPE) にリポフスチンが蓄積し、視細胞の変性が起きることが特徴である⁸⁴。LC-PUFA の合成に不可欠な炭素鎖伸長酵素をコードする *Elovl4* 遺伝子の変異は、若年発症性の網膜変性疾患である 3 型 Stargardt 病の発症に関与することが報告されている^{85,86}。これらの知見から、網膜変性の予防に多価不飽和脂肪酸が重要であることが示唆される。

近年、脳の神経細胞の変性に加齢や酸化ストレスが関係していることが示唆されている。加齢や酸化ストレスによる脂質組成の変化が神経細胞の変性の機序の一つとして仮定される。酸化ストレスによる脂質ホメオスタシスの異常は、視細胞の変性を促進する可能性がある。

網膜変性と脂質ホメオスタシスの関連性を明らかにするためには、生理的条件および病態における網膜脂質組成の詳細な解析が重要である。これまでの研究で、網膜の発生段階におけるリン脂質の動態がある程度明らかにされている⁸⁷。哺乳類の細胞膜に最も多く含まれているリン脂質はホスファチジルコリン (PC) とホスファチジルエタノールアミン (PE) であることが知られている⁸⁸。そこで、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) を用いて、発生過程の網膜における PC と PE 組成の時間的变化を分子種ごとに調べた。また、セルソーターによる網膜細胞の分画技術を用いて、桿体視細胞とその他の網膜細胞に分け、

それぞれにおける PC と PE の組成を比較分析した。

3-2. 実験材料・実験方法

動物

マウスを用いる全ての実験はヘルシンキ宣言に遵守し、東京大学医科学研究所の動物実験委員会の承認を得て、ARVO（Association for Research in Vision and Ophthalmology）の眼科・視覚研究における動物使用に関する声明（<https://www.arvo.org/About/policies/statement-for-the-use-of-animals-in-ophthalmic-and-vision-research/>）に基づいて行われた。ICR マウスおよび rd1 マウスは日本エスエルシー株式会社から購入した。プラグ（交尾栓）が観察された日を胚性 0 日（E0）とし、生まれた日を生後 0 日（P0）とした。成体マウスとしては、8 週齢の雌の ICR マウスを用いた。

マウスへの NaIO₃ 投与

視細胞の変性モデルとして、NaIO₃ の投与を採用した⁸⁹。NaIO₃（Sigma-Aldrich）を 120 mg/kg で尾静脈内に投与し、1、3、5 日後に眼球を採取した。コントロールのマウスには、PBS を投与した。

蛍光活性化セルソーティング（FACS）

摘出した眼球から網膜を分離し、0.25% トリプシンを加え 15 分間インキュベートし、一細胞ずつに分離した。その後、網膜を 20% FBS と DNaseI で処理した後、フィコエリスリン結合抗 CD73 抗体（TY/23, BD）を用いて、氷上で 30 分間染色した。網膜細胞を 2% BSA/PBS で洗浄したのち、さらにヨウ化プロピジウムで染色して死細胞を区別した。CD73 陰性および陽性の生存細胞をセルソーターFACSAria II（BD）を用いて回収した。

網膜および網膜細胞からのリン脂質の測定

凍結した網膜に 70 μ L または 100 μ L のメタノールを加え、超音波破碎を行った。その懸濁液を 10,000 $\times$ g で 5 分間遠心分離し、回収した上清をメタノールで希釈してリン脂質の分析に用いた。網膜細胞は 50 μ L のメタノールに懸濁し、この細胞懸濁液を 10,000 $\times$ g で 5 分間遠心分離し、回収した上清をリン脂質の分析に用いた。LC-SRM (selected reaction monitoring) -MS 分析は、液体クロマトグラフ Nexera UHPLC とトリプル四重極型質量分析計 LCMS-8050 (島津製作所) を用いて行った。クロマトグラフィー分離には Acquity UPLC BEH C8 カラム (1.7 μ m, 2.1 mm $\times$ 100 mm, Waters) を使用し、移動相には、5 mM NH_4HCO_3 /水 (A 液)、アセトニトリル (B 液)、イソプロパノール (C 液) の 3 液を使用した。送液グラジエントのプログラム (時間 (%A 液/%B 液/%C 液)) は以下の 2 種類を使用した。0 min (50/45/5) -10 min (20/75/5) -20 min (20/50/30) -27.5 min (5/5/90) -28.5 min (5/5/90) -28.6 min (50/45/5)、または 0 min (75/20/5) -20 min (20/75/5) -40 min (20/5/75) -45 min (5/5/90) -50 min (5/5/90) -55 min (75/20/5)。流速は 0.35 mL/min、カラム温度は 47 $^{\circ}\text{C}$ に設定した。サンプルは 5 μ L 注入した。質量分析によるリン脂質検出では選択反応モニタリング (SRM) モードによる計測を行った。使用したトリプル四重極型質量分析計には、2 つの質量分離部 Q1 と Q3 があり、その間に Q2 と呼ばれるコリジョンセル (衝突室) がある。SRM 分析では、Q1 で選択した m/z のプリカーサーイオンを分離し、その後 Q2 でアルゴンガスと衝突誘導解離させてフラグメントイオンを生成させる。このフラグメントイオンを Q3 において m/z を指定し選択することにより、目的の化合物由来のイオンを高い選択性をもって検出することができる。リン脂質の分析は、正イオンモードを用いた SRM トランジション (PC は $[\text{M}+\text{H}]^+ \rightarrow 184$ 、PE は $[\text{M}+\text{H}]^+ \rightarrow [\text{M}+\text{H}-141]^+$) で行った。検出されたすべての PC または PE の分子種のピーク面積値を合計して、それぞれの総ピーク面積値とした。個々の分子種のピーク面積は、総ピーク面積値で除して正規

化し、総ピーク面積値に対する割合として、またはサンプル中の単位タンパク当たりの値に正規化して評価した。

分子種は、PC C:D または PE C:D のように表記し、ここで、C は 2 本のアシル鎖の合計の炭素数、D は 2 本のアシル鎖の二重結合数の合計を示す。

DHA 含有 PC 種のアシル鎖の確認

DHA 含有と想定される PC 分子種のアシル鎖組成を明らかにするため、PC38:6、PC 40:6、PC 44:12、PC 46:12、PC 56:12 を対象に、負イオンモードを用いた LC-SRM-MS 解析を実施した。可能性のある脂肪アシル鎖のフラグメントイオンシグナルは、以下の SRM トランジション ($[M + HCO_3]^- \rightarrow [FA-H]^-$) によって得られた。[FA]は各脂肪酸のモノアイソトピック質量である。対象とした脂肪酸は C16:0 (m/z 255.25)、C16:1 (m/z 253.25)、C18:0 (m/z 283.25)、C18:1 (m/z 281.25)、C18:2 (m/z 279.25)、C20:2 (m/z 307.25)、C20:3 (m/z 305.25)、C20:4 (m/z 303.25)、C20:5 (m/z 301.25)、C22:5 (m/z 329.25)、C22:6 (m/z 327.25)、C24:5 (m/z 357.25)、C24:6 (m/z 355.25)、C34:6 (m/z 495.25) である (カッコ内は装置に設定した脱プロトンイオンのモノアイソトピック質量)。

タンパク質濃度の測定

脂質抽出後の網膜と細胞ペレットを、遠心エバポレーターを用いて乾燥させ、8 M 尿素、2 M チオ尿素、2%CHAPS と 0.8%Triton X-100 を含む可溶化剤で再懸濁した。タンパク質濃度を測定する前に、ソニケーターを用いてサンプルを可溶化した。タンパク質濃度は、BSA を検量線とし、Pierce 660nm Protein Assay (Thermo Fischer 社) を用いて測定した。

免疫組織化学

凍結切片を用いた網膜の免疫組織化学は、文献に記載されている方法で行った⁹⁰。核は4',6-ジアミノ-2-フェニルインドール (DAPI) (1 µg/µl) 染色で可視化した。一次抗体は、マウス IgG 抗 GFAP 抗体 (1:500, Sigma-Aldrich)、ウサギ抗 Iba1 抗体 (1:2000, FUJIFILM Wako Pure Chemical) とし、Alexa Flour 488 または Alexa Flour 594 (Molecular probes, Eugene, OR) に結合させた二次抗体を用いて可視化した。

透過電子顕微鏡検査

眼球を除核した後、2%パラホルムアルデヒドと 2.5%グルタルアルデヒドを含む溶液で直ちに半球状に切断し、同じ固定液で2時間インキュベートした。その後、2%酸化オスミウムを含む溶液で固定し、段階的にエタノールで脱水し、Epon 812 樹脂混合物 (TAAB Laboratories Equipment Ltd., Berks, UK) で包埋した。ウルトラミクロトームで超薄切片を作成し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色した後、電子顕微鏡 (JEOL JEM-1400Flash, Tokyo, Japan) で観察した。

統計情報

測定値は平均±標準偏差 (Standard deviation, SD) で示し、有意差は* $P < 0.05$ で示した。二群間比較は Student t test または Tukey HSD (honorable significant difference) 検定を用いた。

3-3. 結果

3-3-1 発生段階におけるマウス網膜におけるリン脂質組成の変化

網膜の発生段階におけるリン脂質組成の変化を調べるために、E14 から生後 8 週齢（成体）までの異なる発生段階にあるマウスの網膜をサンプルとして用いた。網膜サンプルより抽出した脂質画分を LC-MS 分析し、PC と PE の組成を決定した。また、網膜サンプルよりタンパク質量を測定し、PC および PE のタンパク質 1 μg 当たりの総ピーク面積値を算出した。網膜の単位タンパク当たりの総 PC 量は、E14 から出生まで急激に増加した後、P12 で緩やかに増加し、その後減少した (Fig. 3-3A)。アシル鎖の炭素数 28 以上の超長鎖多価不飽和脂肪酸 (VLC-PUFA) は、神経細胞の生存に重要な役割を果たしていることが報告されている⁸⁶。網膜では、VLC-PUFA は、網膜外層の視細胞に豊富に含まれている^{81,86,91}。本論文では、分子組成が 44 : 12 以上の PC および PE を VLC-PC と VLC-PE と定義した。VLC-PC の量は、胎児期にはごく微量であったが、出生後に劇的に増加した (Fig. 3-3B)。単位タンパク当たりの総 PE 量も出生時までは増加し、その後 P5 までは一定を保ったのち、P12 まで急激に増加し、そして成体になるまで一定に保たれた (Fig. 3-3C)。VLC-PE の総量の変化 (Fig. 3-3D) は、VLC-PC の総量の変化 (Fig. 3-3B) と同様のパターンであった。

次に、網膜の発生段階における PC 分子種の個々の変動を調べた。PC 32:0、PC 32:1 と PC 34:1 は豊富な PC の分子種で、その量は胎児期に増加し、出生後に減少した (Fig. 3-3E)。調べたすべての PC 分子種は、網膜の発生段階において変動を示し、ほとんどの PC 分子種は胎児期に増加していた (Fig. 3-3E)。VLC-PC の多くの分子種は、出生後、特に P12 以降、継続的かつ急激な増加を示した (Fig. 3-3F、Fig. 3-4)。この観察結果は、網膜発達の後期に OS が発達することと一致する。しかし、PC 52:6、PC 56:10、PC 58:11、PC 58:12 などの特定の VLC-PC 分子種は、P15 でピークに達し、成体の網膜では劇的に減少した (Fig. 3-3F、Fig. 3-4)。

PE 38:4、PE 38:6、PE 40:6 といった網膜の主要な PE 分子種は、網膜の発生段階において P12

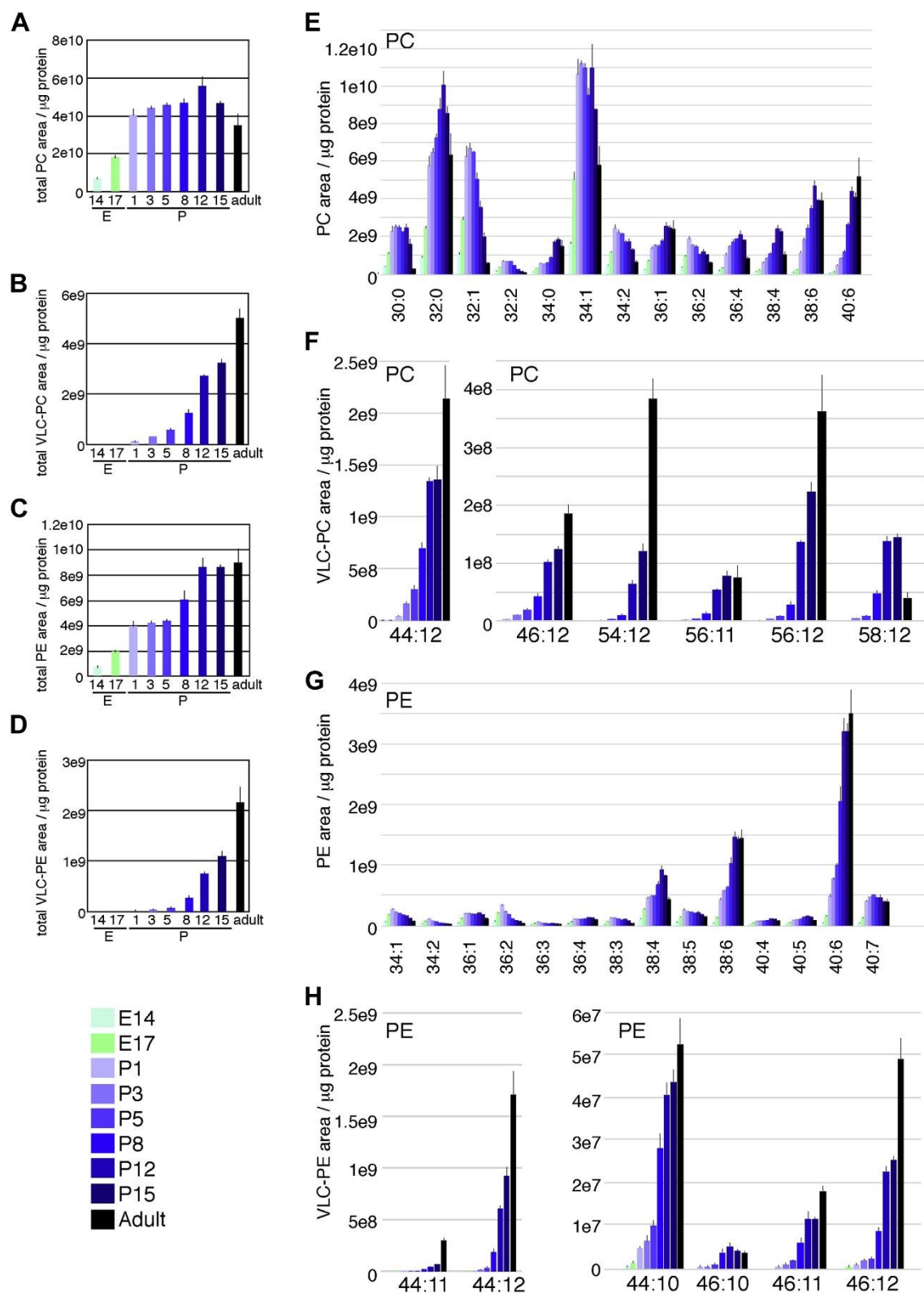


Fig. 3-3 網膜の発達過程におけるホスファチジルコリン (PC) およびホスファチジルエタノールアミン (PE) 組成の変化

異なる発達段階にあるマウス網膜を分離し、PC と PE の組成を LC-MS で分析した。A-D では、タンパク質 1 μg 当たりの PC (A)、VLC-PC (B)、PE (C)、VLC-PE (D) の総ピーク面積値を示す。VLC-PC および VLC-PE は、分子量が 44 : 12 以上の PC と PE と定義した。PC と PE の総面積値はそれぞれ 238 種の合計である。E-H はタンパク質 1 μg 当たりの PC、PE の各分子種の面積値を示す。数値は 3-4 ロットの独立したサンプルの平均値で、標準偏差 (SD) と共に示した。1 サンプルに 1 枚の網膜を使用した成体期の網膜を除き、すべての発達段階で 1 サンプルに 2 枚の網膜を使用した。

Hamano F. et al. *J Biol Chem.* 2021 Jan 16; 296: 100303 より転載⁹²。

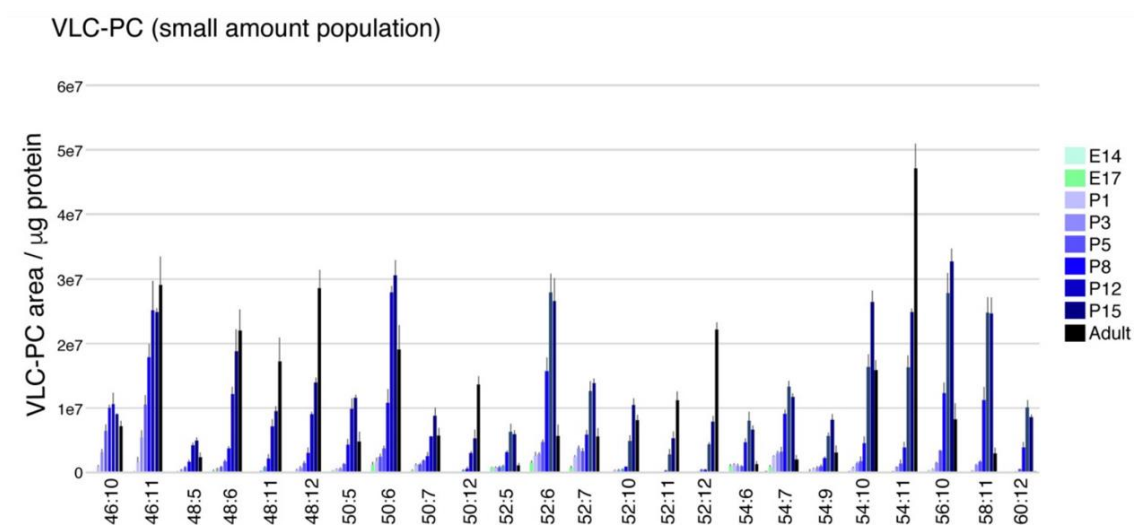


Fig. 3-4 網膜の発達過程における極長鎖ホスファチジルコリン (VLC-PC) 組成の変化 (微量成分)

異なる発達段階にあるマウスの網膜を分離し、LC-MS で VLC-PC 分析した。平均値が $4\text{e}7$ 個以下の VLC-PC を示す。数値はタンパク質 $1\text{ }\mu\text{g}$ 当たりの各分子種の面積値を示す。独立した 3 サンプルの平均値を SD とともに示した。

Hamano F. et al. *J Biol Chem.* 2021 Jan 16; 296: 100303 より転載⁹²。

まで継続的に増加した (Fig. 3-3G)。Fig. 3-3C で示した総 PE 量の増加はこれらの主要 PE 分子種の増加に対応するものと考えられる。その他の PE 分子種量は、出生前後にピークを迎え、その後徐々に減少した (Fig. 3-3G)。VLC-PE の主要な分子種である PE 44:12 と PE 44:11 の量は、出生後に急激に増加していた (Fig. 3-3H)。

3-3-2 rd1 マウスの変性網膜におけるリン脂質組成分析

次に、rd1 マウスの変性した網膜におけるリン脂質組成を調べた。これまでの研究で、薄層クロマトグラフィー (TLC) /ガスクロマトグラフィー法により野生型と rd1 のマウス網膜の脂肪酸組成が調べられており、野生型では発生に伴ってリン脂質に含まれる DHA の増加が見られたが、rd1 マウスでは DHA 量が減少していた^{87,93}。そこで、LC-MS を用いて、分子種ごとに PC と PE を測定した。rd1 マウスモデルでは、視細胞の変性は P10 前後から始まることが知られている^{94,95}。P10、P13、P16 の rd1 およびコントロールマウスの網膜凍結切片の DAPI 染色を行い、観察をおこなったところ、P16 の rd1 網膜において薄い ONL が観察された (Fig. 3-5A、B)。ONL は視細胞の核の位置にあたることから、P16 の rd1 網膜の視細胞数の減少が示唆された。一方、内顆粒層 (INL) の厚さは、P10、P13、P16 の 3 つの発生段階において、コントロールの野生型と rd1 の網膜の間で大きな差は見られなかった (Fig. 3-5A、B)。P10、P13、P16 で rd1 マウスとコントロールマウスの網膜における PC と PE 組成を分析した。rd1 マウスの網膜では、発生に伴って網膜当たりの PC および PE の総ピーク面積値が減少していたが、コントロールマウスの発達期の網膜では、PC と PE の総ピーク面積値が増加していた (Fig. 3-5C、D)。rd1 マウス網膜での PC および PE 総ピーク面積値の減少は、rd1 マウスの網膜自体の大きさが徐々に小さくなっていったことと一致する。rd1 の網膜において、PC 32:0、PC 38:6、PC 44:12、および PE 44:12 量が発生段階に伴い減少したが、コントロールマウスの網膜ではこれらのリン脂質分子種が発生に伴い増加した (Fig. 3-5E、F)。また、rd1 マウスの発達中の網膜では、PC 34:1 と PE 38:4 の量が増加したが、コ

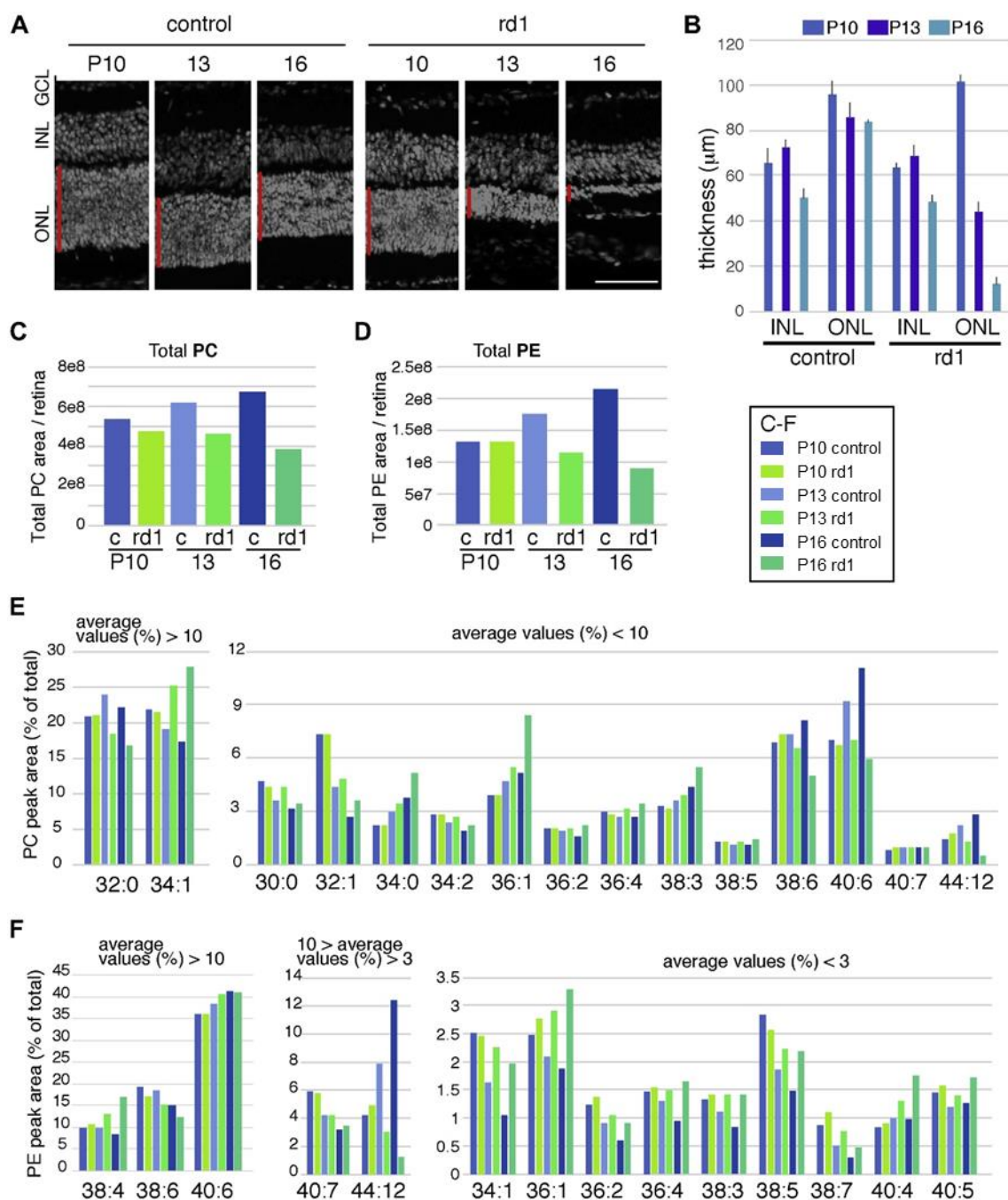


Fig. 3-5 rd1 網膜変性モデルマウスの PC および PE 組成の解析

A および B では、コントロールおよび rd1 マウスの P10、P13、P16 の網膜を凍結切片にし、DAPI 染色で核を可視化した。スケールバーは 50 μm。内顆粒層(INL)および外顆粒層(ONL)の厚さを測定し、3 サンプルの平均値と標準偏差を示した (B)。C-F では、P10、P13、P16 のコントロールまたは rd1 マウスの網膜を採取し、PC と PE の含有量を分析した。C と D は、コントロールおよび rd1 マウス由来の網膜の PC (C) および PE (D) の総ピーク面積値を示す。PC と PE の総ピーク面積値は、それぞれ 266 種と 273 種の合計である。PC (E) と

PE (F) の総面積値に対する各分子種の面積値の割合 (%) を示す。左のパネルは平均値が 10 以上の分子種を、E の右のパネルは平均値が 10 未満の分子種を示す。F の中央パネルは平均値が 3 以上かつ 10 未満、右パネルは平均値が 3 未満の分子種を示す。

Hamano F. et al. *J Biol Chem.* 2021 Jan 16; 296: 100303 より転載⁹²。

ントロールの網膜では減少した (Fig. 3-5E、F)。

3-3-3 セルソーターにより分画された網膜細胞を用いたリン脂質組成分析の条件検討

発生に伴う rd1 網膜における特定の PC および PE 分子種の減少は、視細胞が徐々に失われていることに起因すると考えられた。そこで次に、セルソーターを用いて網膜細胞を分画し、視細胞に特異的な PC および PE 組成測定を試みた。まず、セルソーターによる細胞分画処理がリン脂質組成分析に影響を及ぼさないか、すなわちセルソーターによって分画された網膜細胞を測定することで分画前網膜の PC および PE 組成を正しく評価できるかを検討した。また、LC-MS によるリン脂質組成分析に必要な細胞数の条件検討を行った。E17 または成体のマウス網膜を分離した後、トリプシン処理とセルソーターによる分画処理を行った。分画処理を行った細胞を回収し、異なる数の細胞をプールした後、膜脂質をメタノール抽出した (Fig. 3-6A)。抽出した脂質のリン脂質組成分析を行った。PC および PE の総ピーク面積値は、細胞数の増加とともに増加した (Fig. 3-6B、D)。この時、 1×10^4 細胞あたりの総ピーク面積値を比較すると、PC、PE とともに、細胞数が少ないサンプルで標準偏差の値が大きくなっていた (Fig. 3-6C、E)。

主な PC 分子種の総ピーク面積値に対する割合は、一部の例外を除き、分画された細胞と E17 および成体の網膜で同等であった (Fig. 3-6F、G、左パネル)。これは割合の低い PC 分子種についても同様であった (Fig. 3-6F、G、右パネル)。成体網膜では、PC 46:12 や PC 54:12 などの VLC-PC については、 5×10^3 細胞から 1×10^5 細胞まで同等の値を示したことから、VLC-PC 分析には少数の細胞で十分であることが示唆された (Fig. 3-6G、右パネル)。また PE についても、ほとんどの分子種は 5×10^3 個の細胞を用いて解析した場合にも、分画された細胞と E17 および成体網膜で同等の値を示した (Fig. 3-6H、I)。

以上の結果より、セルソーターを用いた分画処理を行った細胞を 5×10^4 個以上使用するこ

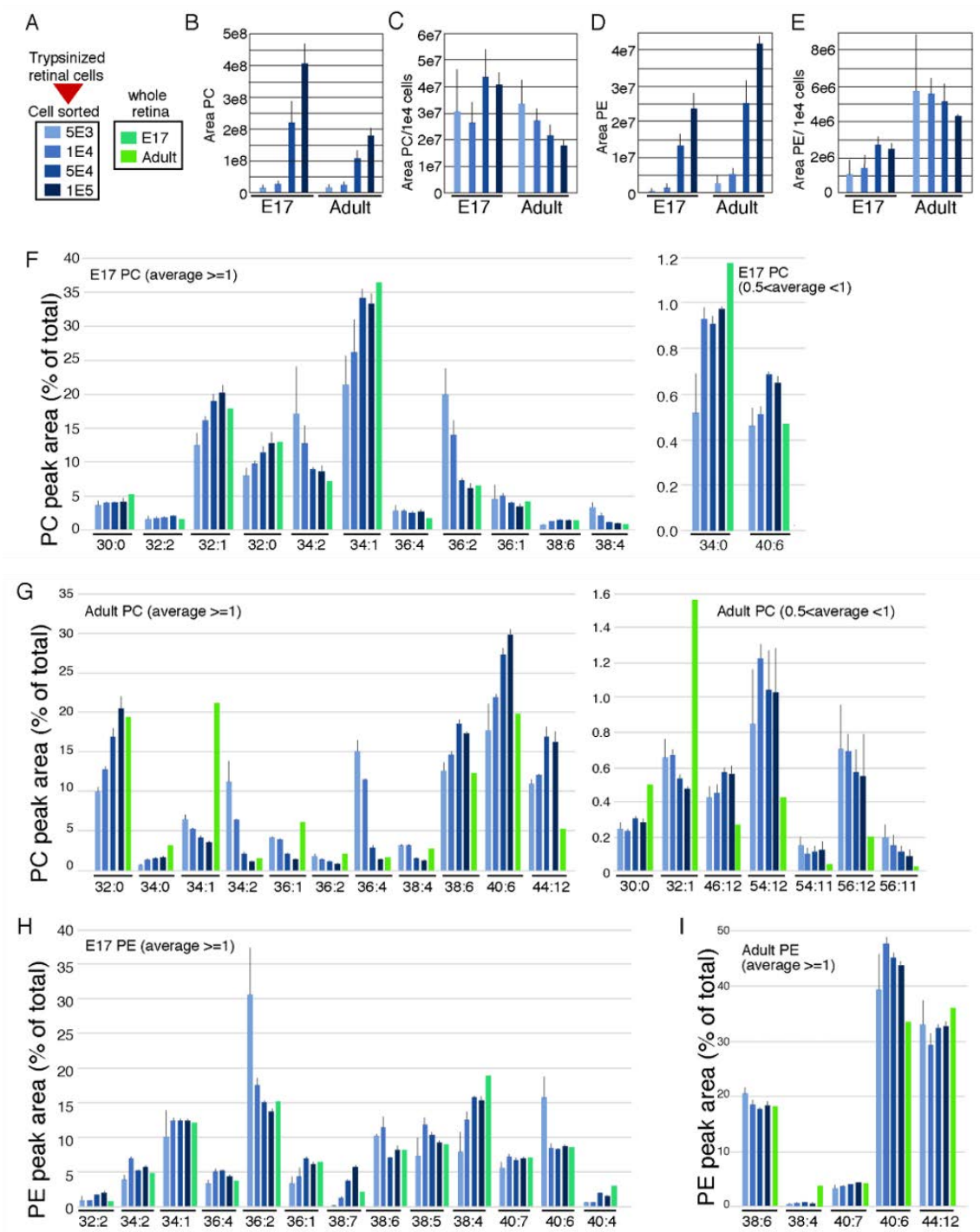


Fig. 3-6 セルソーターにより分画された網膜細胞を用いた PC と PE 組成分析の条件検討
セルソーターされた網膜細胞の PC および PE 成分を示す。E17 胚または成体から分離したマウス網膜細胞をトリプシンで処理した後に、セルソーターにかけ、 5×10^3 (5E3) 個から 1×10^5 (1E5) 個の異なる数の細胞を回収した (A)。その後、細胞のペレットにメタノール 50 μL を加え、10,000 rpm で 5 分間遠心したのち、その上清を LC-MS を用いて、PC (B、C、

F、G) と PE (D、E、H、I) を分析した。同時に、E17 マウス (F、H) および成体マウス (G、I) のトリプシン処理をしていない全網膜から抽出した脂質画分を対照として、PC および PE を分析した (A)。B および D は、PC (B) および PE (D) の総ピーク面積値を示す。C および E は、PC (C) および PE (E) の各サンプルの 1E4 細胞に相当する総ピーク面積値を示す。F-I は、E17 (F, H) および成体 (G, I) の総ピーク面積値に対する PE の各 PC 分子種の面積値の割合 (%) を示す。数値は独立した 3 サンプルの平均値である。E17 および成体の網膜全体のコントロールサンプルについては 1 サンプルの代表値を用いた。

Hamano F. et al. *J Biol Chem.* 2021 Jan 16; 296: 100303 より転載⁹²。

とで、ばらつきが少なく、網膜細胞のリン脂質組成評価を行えると考えた。そこで、分画された網膜細胞の解析には、 5×10^4 個の細胞を使用することとした。

3-3-4 CD73 陽性桿体視細胞および CD73 陰性網膜細胞におけるリン脂質組成分析

桿体視細胞が網膜細胞の 70-80%を占めているため、網膜全体のサンプルを LC-MS で分析しても、存在量の少ない網膜細胞の脂質組成については十分な情報が得られない。発達期および成体の網膜における桿体視細胞のマーカーとして CD73 が同定されている⁹⁶。成体の CD73 陽性および CD73 陰性の網膜細胞の RNA シーケンス解析データ (GSE71462、GSE71464)⁹⁷ を用いて、網膜細胞サブタイプ特異的発現遺伝子を調べた。その結果、P12 の CD73 陽性画分の細胞には桿体視細胞特異的遺伝子が発現し、その他の網膜細胞特異的遺伝子の発現はほぼ見られないことが確認された (Fig. 3-7)。

CD73 の発現に基づいて成体の網膜細胞を分画した後、LC-MS を用いたリン脂質組成分析を行った。その結果、CD73 陽性桿体視細胞と CD73 陰性網膜細胞では、PC 組成のパターンに顕著な違いが見られた。特に、PC 34:1 と PC 36:1 は、CD73 陰性網膜細胞の方が CD73 陽性桿体視細胞よりもかなり多かったが、PC 44:12、PC 38:6、PC 40:6 では逆に CD73 陽性桿体視細胞の方が多かった (Fig. 3-8A)。存在割合の低い分子種の中では、VLC-PC54:12、VLC-PC 56:12 が CD73 陽性桿体視細胞に偏って存在していた (Fig. 3-8A、右パネル)。また PE 44:12 の割合は CD73 陽性桿体視細胞で有意に高かった (Fig. 3-8B)。

3-3-5 脂質生合成関連酵素の発現量の変化

次に、網膜の発達過程において、超長鎖脂質に関わる遺伝子の発現パターンがどのように変化するかを調べた。ELOVL2 と ELOVL4 は、極長鎖多価不飽和脂肪酸の生合成に関与する伸長酵素である (Fig. 3-9D)^{81,98}。ELOVL4 の mRNA レベルは、網膜の発生段階で増

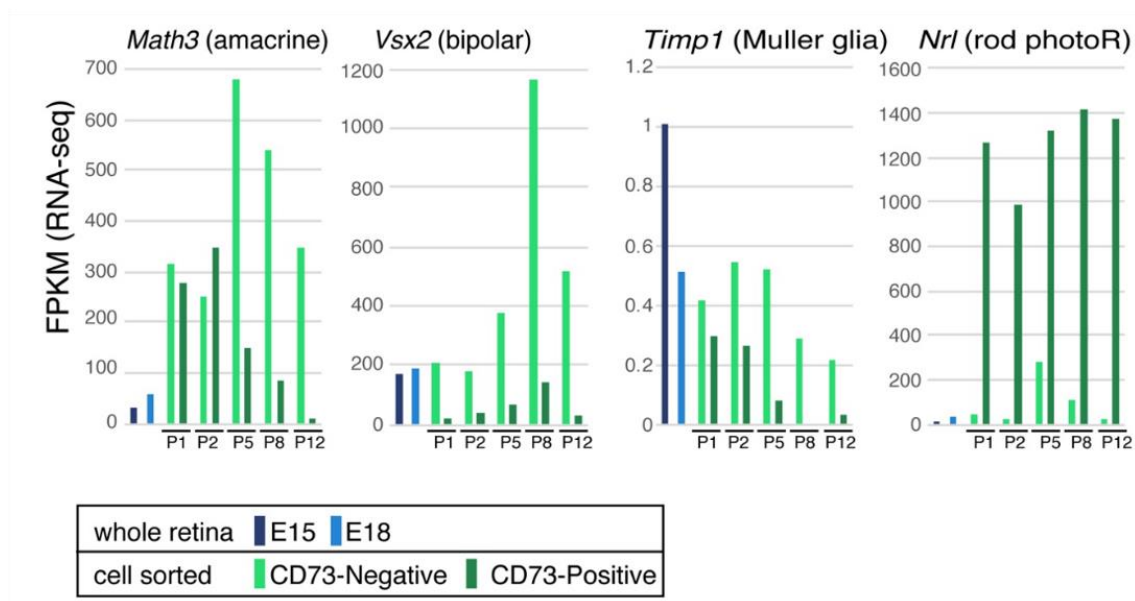


Fig. 3-7 CD73 陽性および CD73 陰性の成体網膜細胞の RNA シーケンス解析
胎生期網膜と、CD73 陽性および CD73 陰性の網膜細胞の RNA シーケンス解析データ (GSE71462、GSE71464) を用いて、網膜細胞サブタイプ特異的発現遺伝子を調べた。
Hamano F. et al. *J Biol Chem.* 2021 Jan 16; 296: 100303 より転載⁹²。

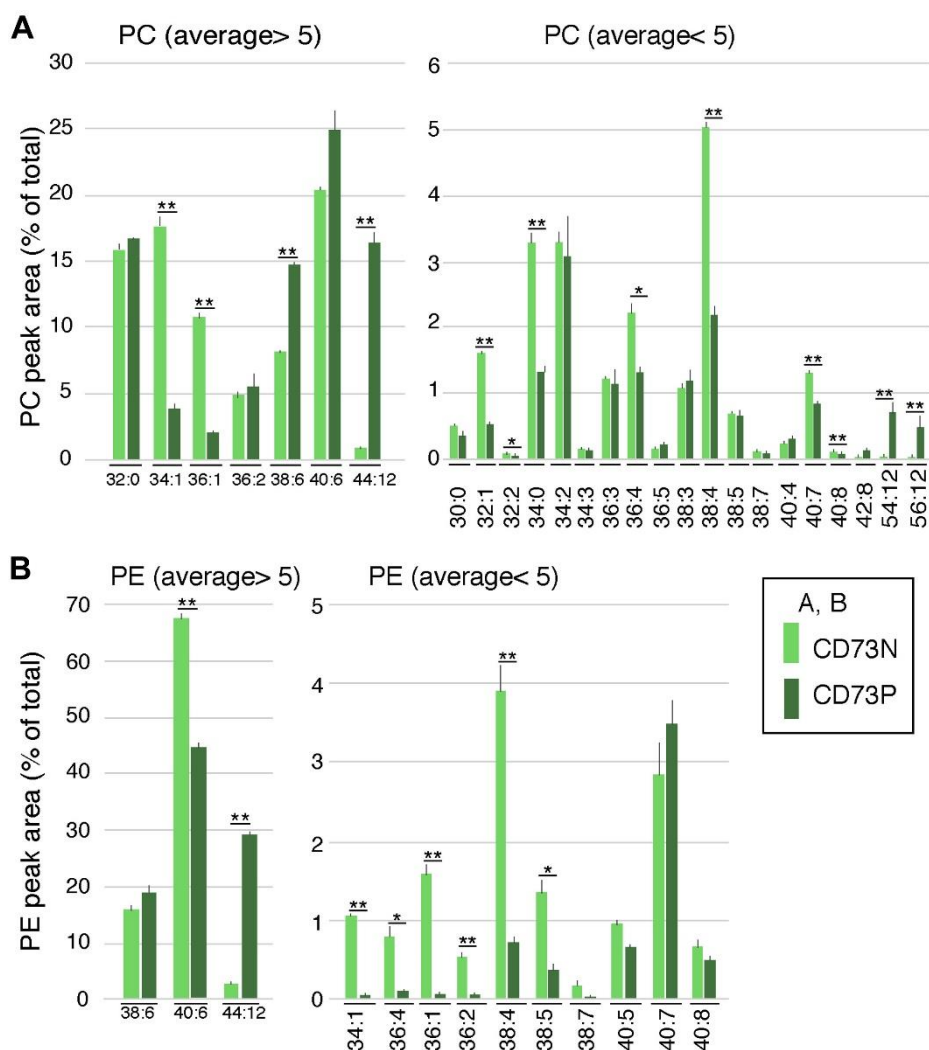


Fig. 3-8 CD73 陽性桿体視細胞と CD73 陰性その他の網膜細胞の PC および PE 組成
成体網膜細胞をセルソーターで CD73 陽性細胞と陰性細胞に分画した。その後、両画分の PC および PE 成分を LC-MS で分析した。PC には 25 種、PE には 14 種の成分が検出された。それぞれ 25 種と 14 種の合計を面積の合計値とした。PC (A) と PE (B) の総ピーク面積値に対する各分子種の面積値の割合(%)を示す。左側のパネルは平均値 (%) が 5 以上の分子種、右側のパネルは 5 未満の分子種を示す。数値は独立した 3 サンプルの平均値で、標準偏差を付けて示した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, by unpaired t-test.

Hamano F. et al. *J Biol Chem.* 2021 Jan 16; 296: 100303 より転載⁹²。

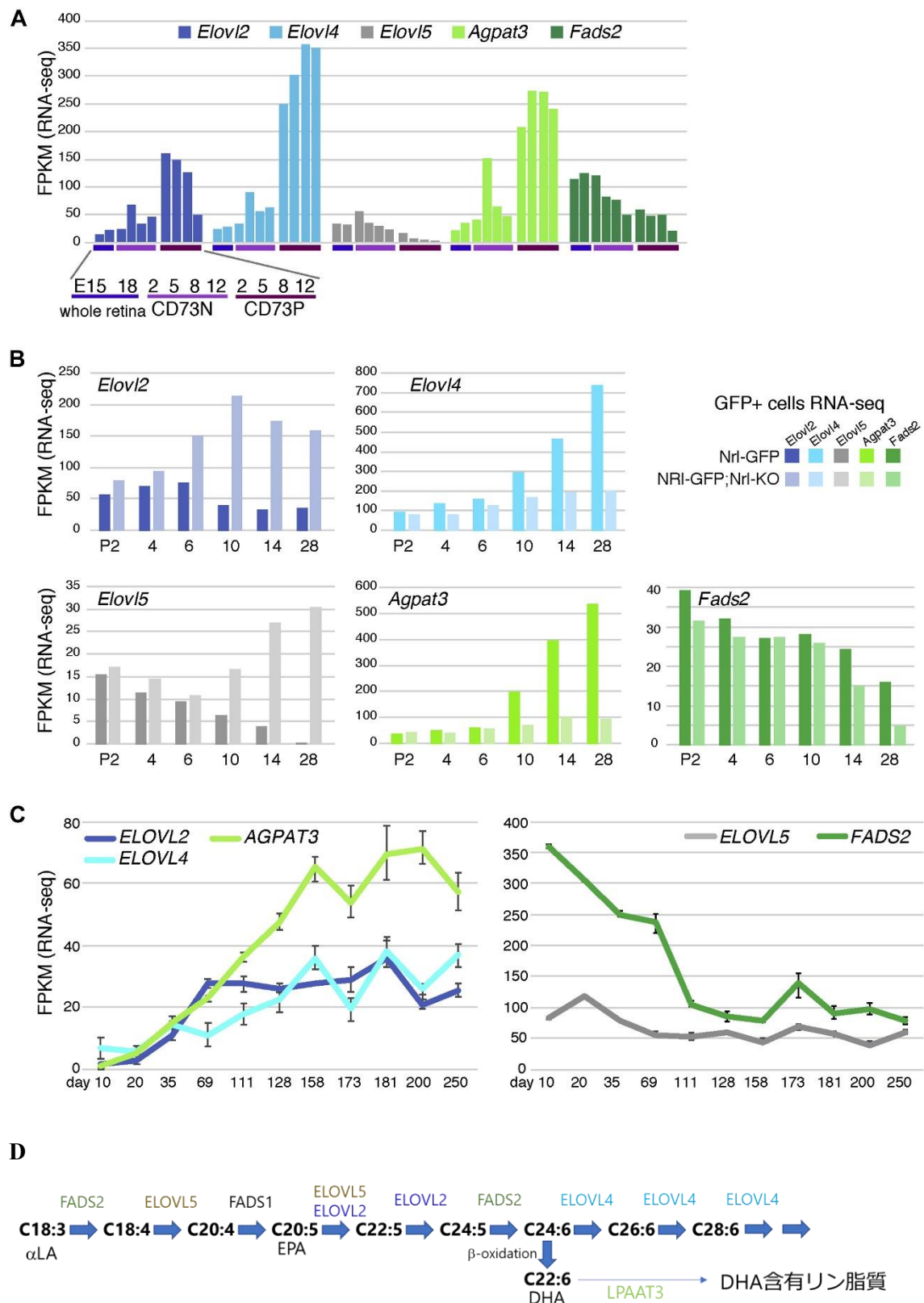


Fig. 3-9 脂質合成関連酵素の発現量変化

A は、E15, E18 全網膜、P2, P5, P8, P12 における CD73 陽性桿体視細胞と陰性網膜細胞の RNA-seq データ (GSE71462, GSE71464)。B は、Nrlp-GFP マウスの網膜からフローソートした桿体視細胞と Nrlp-GFP;Nrl-KO マウスの GFP 陽性の S-cone-like 細胞の発現プロファイリング (GSE74660, GSE74657)。C, 公開されているヒト iPS 由来の網膜オルガノイド (GSE119320) の RNA-Seq データ。D はオメガ3系多価不飽和脂肪酸合成と DHA 含有リン脂質合成経路。AGPAT3 と LPAAT3 は同酵素。

Hamano F. et al. *J Biol Chem.* 2021 Jan 16; 296: 100303 より転載のうえ、一部改変⁹²。

加することが示されており⁹⁹、特に視細胞の内節で増加することが示されている⁸⁵。以前に公開された RNA シーケンスデータ (GSE71462, GSE71464)⁹⁷を用いて CD73 陽性細胞及び陰性細胞の遺伝子発現を比較したところ、桿体視細胞の誕生時期に相当する P2 の時点で、CD73 陽性細胞において Elov12 と Elov14 が高く発現していることを見出した (Fig. 3-9A)。桿体視細胞の成熟期に相当する網膜発達後期には、CD73 陽性細胞では Elov14 の発現量は高いままであったが、Elov12 の発現量は徐々に減少し、CD73 陰性細胞と同程度のレベルになった (Fig. 3-9A)。ELOVL5 も長鎖脂肪酸の伸長を触媒することが示されていたが、Elov15 の発現は CD73 陽性桿体視細胞よりも CD73 陰性細胞画分で高かった (Fig. 3-9A、D)。Nrl は桿体視細胞への分化に必須である Maf ファミリーのロイシンジッパー転写因子であり、Nrl 欠損 (Nrl-KO) の網膜では、視細胞前駆体は短波長感受性錐体視細胞の特徴を持つ細胞に運命づけられる¹⁰⁰。Nrl 遺伝子プロモーター-GFP 発現カセットを導入したマウス (Nrlp-GFP マウス) の網膜からソーティングした桿体視細胞¹⁰¹と Nrlp-GFP;Nrl-KO マウスから得た GFP 陽性の短波長感受性錐体様細胞¹⁰²の発現プロファイリングデータベースを用いて、桿体視細胞と短波長感受性錐体視細胞の遺伝子発現パターンの比較を行った (GSE74660, GSE74657)。桿体視細胞は P14 以降も高い Elov14 の発現パターンを維持していたが、Elov12 の発現レベルは低くなっていた (Fig. 3-9B)。また Nrl-KO マウス由来の短波長感受性錐体視細胞では、Elov12 と Elov15 の発現レベルが高かったが、Elov14 は Nrl-GFP 由来の桿体視細胞に比べて低かった (Fig. 3-9B)。この結果より、これらの遺伝子の発現パターンが桿体視細胞と錐体視細胞で異なることが示唆された。

また、DHA の代謝に関与する 2 つの酵素を調べたところ、CD73 陽性細胞では Agpat3 (Lpaat3) が CD73 陰性細胞よりも高い発現を示したが、CD73 陽性細胞の Fads2 は CD73 陰性細胞よりもむしろ低かった (Fig. 3-9A、D)。Nrl-KO 由来の短波長感受性錐体視細胞では桿体視細胞よりも Agpat3 (Lpaat3) と Fads2 の発現レベルが低いことがわかった (Fig. 3-9B)。これらの極長鎖脂肪酸代謝に関わる遺伝子の発現に伴う発現変動について、公表されてい

るヒト iPS 由来網膜オルガノイドの RNA-seq データ (GSE119320) ¹⁰³ を用いて調べたところ、ヒト iPS 由来網膜の発生過程における Elovl メンバーと Agpat3 (Lpaat3)、Fads2 の発現の推移がマウス桿体視細胞における発現パターンと似た傾向を示していた (Fig. 3-9A、C)。

3-3-6 NaIO₃ 処理による変性した網膜のリン脂質組成分析

rd1 マウスとコントロールの野生型マウスの網膜における PC と PE 組成の違いは、網膜を構成する細胞の集団の違いによって一部説明されると考えている。次に視細胞が変性していく過程において PC と PE の量がどのように推移いくのかを直接解析することを試みた。この目的のために、遺伝的に脂質代謝遺伝子に変異のある rd1 モデルよりも薬剤によって網膜変性が均一に起こるヨウ素酸ナトリウム (NaIO₃) モデルを用いた。NaIO₃ は、視細胞の変性を引き起こすが、主に網膜色素上皮細胞 (RPE) を標的とする ⁸⁹。NaIO₃ 処理後の CD73 陽性桿体視細胞および陰性細胞画分の PC および PE 組成の経時的変化を調べることにした。まず、NaIO₃ 投与 1 日目、3 日目、5 日目にマウスの網膜を採取し、DAPI (40,6-ジアミディノ-2-フェニリンドール) による核染色を行ったところ、投与 5 日目に、NaIO₃ 投与マウスの ONL はコントロールの ONL よりも薄くなっていた (Fig. 3-10A)。

次に、NaIO₃ を投与したマウス (投与 1、3、5 日目) の CD73 陽性および CD73 陰性の網膜細胞における PC および PE 組成を調べた。CD73 陽性画分の PC 組成を見ると、NaIO₃ 投与により PC 44:12 が徐々に有意に減少し、PC 32:0 と PC 34:2 が増加した (Fig. 3-10B)。存在割合の低い PC 分子種の半数以上が増加したように見えるが (Fig. 3-10C)、これは総 PC ピーク面積値に対する割合として結果を出しているため、PC 44:12 が大幅に減少したことが原因と考えられる。PE の分析では、PE 44:12 が大幅に減少し、PE 38:6 と PE 40:8 の増加が見られた (Fig. 3-10D)。存在割合の低い分子種については PE についても PC と同様に増加したように見えるが (Fig. 3-10E)、PE 44:12 が大幅に減少したことが原因と考えられる。

に示す。数値は独立した 3 サンプルの平均値であり、標準偏差を付けて示した。統計はスチューデントの t 検定を用いた。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

Hamano F. et al. *J Biol Chem*. 2021 Jan 16; 296: 100303 より転載⁹²。

PC 34:1 と PE 38:4 は、rd1 の網膜で最も顕著に存在量が増加し (Fig. 3-5E、F)、NaIO₃ モデルにおいても、PC 34:1 と PE 38:4 の両方が CD73 陽性の画分で増加していた (Fig. 3-10B、E)。

NaIO₃ による網膜変性のより詳細な病理学的状況を調べるために、電子顕微鏡分析を行った。NaIO₃ 投与 1 日後の凍結切片では、明らかな症状は見られなかったが (Fig. 3-10A)、電子顕微鏡による解析 (Fig. 3-11) では、OS と RPE の境界部分に断片化した OS が集積していることが示された。しかし、OS 自体の形態はコントロールの網膜と変わらなかった。2 日目には、断片化した OS の蓄積量が増加し、RPE の内部構造 (微絨毛、細胞質内の小胞体など) に異常形態が見られた。3 日後、RPE 細胞は消失し始め、境界部には OS の断片が大量に集積し、形態的に乱れていた。5 日目には蓄積していた OS のほとんどが消失していた。リン脂質組成と形態観察から、1 日目の視細胞は比較的正常な形態を保っているが、脂質組成はすでに変化し始めていることがわかった。以上のことから、NaIO₃ 処理は、視細胞変性の初期段階から CD73 陽性細胞の PC および PE 組成を変化させることがわかった。

3-4. 考察

脂質のホメオスタシスは、網膜におけるさまざまな生物学的プロセスと関連しているが、網膜細胞の系統ごとの脂質組成や発生段階における脂質組成については十分に解明されていない。そこで、セルソーティングと LC-MS を用いて、発生段階の網膜細胞における PC と PE 組成を生理的および病理的な条件下で解析した。その結果、発生過程におけるリン脂質組成の動的な変化が明らかになり、これらの変化は細胞の種類に特異的であることがわかった。

また LC-MS を用いた PC および PE 分析では、分子内の 2 本の脂肪酸 (アシル鎖) の同定をせずに、構造異性体の合計の値として解析を行った。PC38:6、PC40:6、PC44:12、PC46:12、

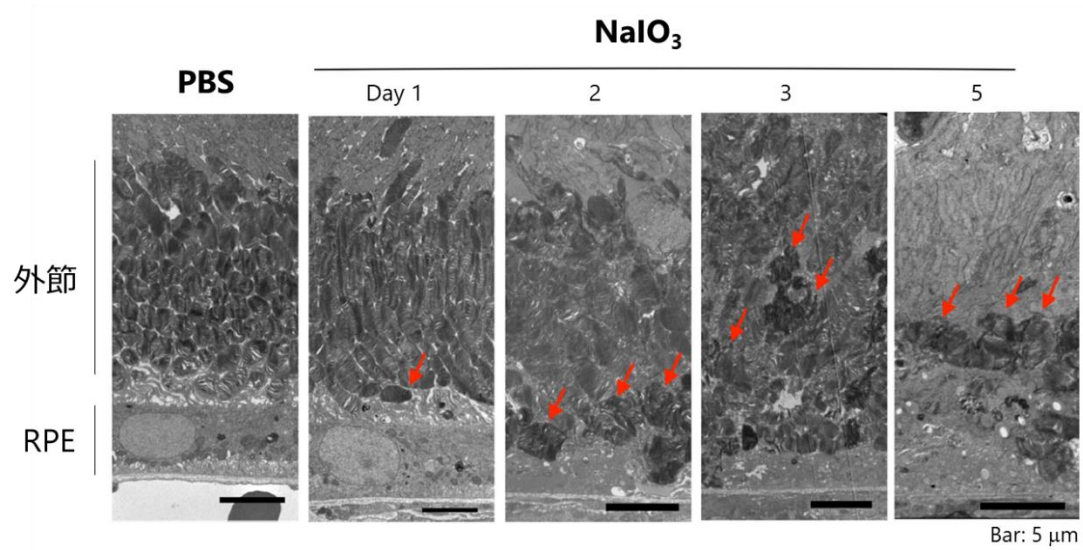


Fig. 3-11 NaIO₃ 処理による桿体視細胞と RPE の経時的変化観察

RPE と桿体視細胞外節領域を、電子顕微鏡を用いて観察を行った結果を示した。電子密度の高い断片化した外節（赤矢印）が外節と RPE の間に蓄積していることが観察された。スケールバーは 5 μm。

Hamano F. et al. *J Biol Chem.* 2021 Jan 16; 296: 100303 より転載⁹²。

PC54:12、PC56:12 は桿体視細胞に多く存在しており、DHA (22:6) を含む分子種である可能性がある。これらの 6 種類の PC について、LC-MS の負イオンモードを用いて再解析を行い、PC 分子種のアシル鎖を同定したところ、成体網膜、CD73 陽性細胞においてこれらの PC は DHA を含んだ分子種が主成分であった。具体的には、Fig. 3-12A に示すように PC38:6 は E14 網膜では Peak1 の PC (16:0/22:6) と Peak2 の PC (18:2/20:4) の 2 種類の構造異性体を含んでいたが、成体網膜では Peak2 の PC (18:2/20:4) が著しく減少し、PC (16:0/22:6) が主成分となっていた。PC40:6 は E14 網膜では Peak1 の PC (18:0/22:6) と Peak2 の PC (20:2/20:4) の 2 種類の構造異性体を含んでいたが、成体網膜では Peak2 の PC (20:2/20:4) が減少し、PC (18:0/22:6) が主成分となっていた (Fig. 3-12B)。LC-MS の負イオンモードを用いたリン脂質のアシル鎖解析は、現在は感度が不十分で、微量な成分の解析は行えていないが、今後の課題として、アシル鎖の同定も行ったリン脂質組成を決定していきたいと考えている。

PC と PE の膜含有量は、網膜の発生過程で劇的に増加する。この観察結果は、桿体視細胞の誕生のピークは P0 から P2 付近であり⁷⁵、網膜発生の後期に桿体視細胞が成熟することと説明できるかもしれない。しかし、桿体視細胞の数の増加は、網膜発生の初期段階（胎生期）における PC および PE 量の増加を説明できない。錐体視細胞は網膜発達の非常に早い段階で発生するが、網膜構成細胞のうちで錐体は最も細胞数が少ないため、胎生期の PC および PE 量の増加は、錐体視細胞の数の増加に完全に起因するものではないと考えられる。脳の発生過程では、脂肪酸の組成が大きく変化し、成長円錐体とシナプトソームの脂質プロファイルが大きく異なるという研究結果がある¹⁰⁴。PC の生合成が神経突起の伸長を促進することを考えると¹⁰⁵、網膜発生過程での神経細胞の成熟が、観察された PC と PE 量に影響を与えているのかもしれない。また網膜の発生過程で、さまざまな PC および PE 量が、細胞の種類に応じて大きく変化することがわかった。網膜細胞の大部分は P15 以前に完全に形成しているが、PC 46:12、PC 54:12、PC 56:12、PE 44:12 などの特定の分子種は、P15 か

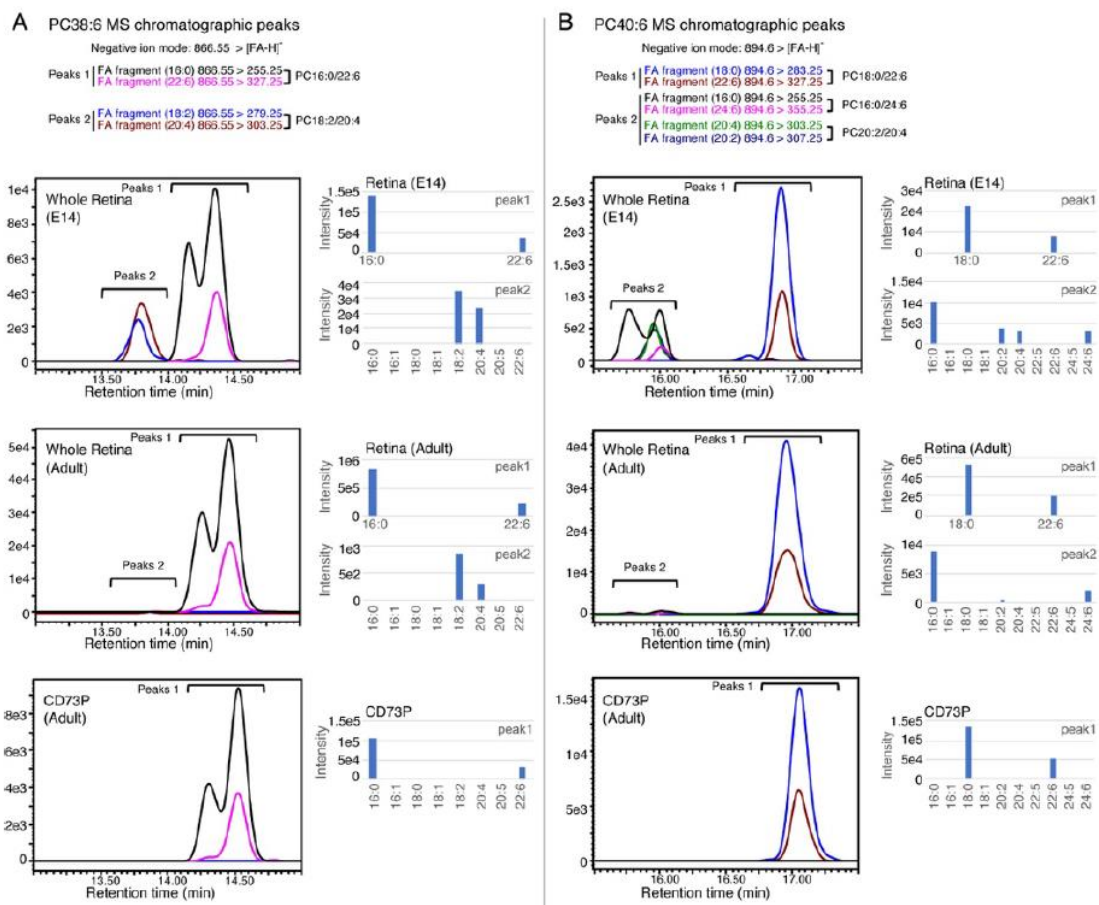


Fig. 3-12 DHA 含有 PC のアシル鎖同定

PC38:6, PC40:6, PC44:12, PC46:12, PC54:12, PC56:12 のアシル鎖の同定を、負イオンモードを用いたターゲット LC-SRM-MS/MS で行った。代表的なデータとして、PC38:6(A)と PC40:6(B)を示す。左側の図は、アシル鎖 16:0, 18:2, 20:4, 22:6 (A)と、16:0, 18:0, 20:2, 20:4, 22:6, 24:6 (B)の MRM クロマトグラムである。右の棒グラフは、アシル鎖のフラグメントシグナルの強さを示す。DHA フラグメントはマゼンタ色 (A) と茶色 (B) で示されている。PC38:6 (A) には、E14 網膜では Peak1 の PC(16:0/22:6)と Peak2 の PC(18:2/20:4)の 2 種類の構造異性体を含んでいたが、成体網膜では Peak2 の PC(18:2/20:4)が著しく減少し、CD73P 網膜桿体細胞では PC(18:2/20:4)は検出されなかった。成体網膜、CD73P 細胞ともに PC(16:0/22:6)が PC38:6 の主成分であった。

PC40:6(B)も同様に、E14 網膜では PC(20:2/20:4)が検出されたが、成体網膜および CD73P 網膜桿体細胞では DHA を含む PC(18:0/22:6)が主要な分子種となっていた。

Hamano F. et al. *J Biol Chem.* 2021 Jan 16; 296: 100303 より転載⁹²。

ら成体になるまでの間に顕著に増加した。これらの分子種の増加が、VLC-PC および VLC-PE の総量の急上昇を説明していると考えられる。

PC34:1 と PE38:4 は、rd1 マウスの網膜全体で顕著に割合が増加しており (Fig. 3-5E、F)、これらの2つの分子種は CD73 陽性よりも CD73 陰性でより多く発現していることから (Fig. 3-8A)、これらの変化は rd1 の網膜で桿体視細胞が相対的に減少していることに起因すると考えられる。

ELOVL4 は、視細胞における VLC-PC および VLC-PE の合成に必須である (Fig. 3-9D)⁸⁶。RNA-seq データより Elovl2 と Elovl4 が CD73 陽性網膜細胞に特異的に発現していることを示した。さらに、Nrl-KO 網膜の RNA-seq データから、桿体視細胞と錐体視細胞では ELOVL ファミリーの異なる酵素が利用されていることが示唆された。桿体視細胞では、Elovl2 と Elovl5 は低レベルで発現しているが、錐体視細胞ではこれら2つの遺伝子が強く発現していた。また錐体視細胞では Elovl4 の発現が低かった。Agpat3 (Lpaat3) と Fads2 も錐体視細胞では桿体視細胞よりも低かったことから、DHA の代謝も錐体と桿体では異なることが示唆された。実際、桿体優位の網膜では錐体優位の網膜よりも LC-PUFA と VLC-PUFA が高いことが報告されている⁸¹。意外なことに、EPA や DHA の合成に関与する不飽和化酵素⁸⁶である Fads2 は、胎生期の網膜で主に発現しており、成熟した桿体視細胞では発現が低かった (Fig. 4A、D)。これらの知見から、成熟した桿体視細胞における DHA および EPA は α -リノレン酸 (18:3) から生合成されたものではない可能性も考えられる。DHA 欠乏食を与えることで DHA 欠損にしたネズミを使った研究では、生理的な DHA 量と網膜機能を維持するためには、食事による DHA が必要であることが示されている¹⁰⁶。

さらに、様々な PC および PE の分子種が桿体視細胞と他の網膜細胞との間で有意に異なることも明らかにした。特に、PC34:1、PC36:1、PC32:1、PC36:4 などの割合は、桿体視細胞では他の網膜細胞よりも有意に低く、Lpaat3 (Agpat3) ノックアウトマウスの網膜における以前の報告⁶¹と一致していた。CD73 陽性細胞では、Lpaat3 (Agpat3) の mRNA レベルが

CD73 陰性細胞に比べてかなり高かったことから (Fig. 3-9A)、CD73 陽性細胞と CD73 陰性細胞の間の PC および PE 組成の違いは、主に脂質代謝経路に関与する酵素の発現の違いに起因すると考えられる。また、桿体視細胞の分化初期段階である P2 から Lpaat3 (Agpat3) の転写が多く見られたことから、Lpaat3 (Agpat3) は桿体視細胞の分化と維持の両方に重要な役割を果たしていることが示唆された。

セルソーターにより分画処理を行った細胞と全網膜の膜脂質組成を比較したところ、E17 網膜では高い類似性が見られた。成体の網膜では、量の少ない分子種では、分画したサンプルでは全網膜サンプルよりも高い割合を示したが、豊富に存在する PC と PE 分子種のそれぞれの割合は、分画した細胞サンプルと全網膜サンプルにおいて同程度であった。成体の網膜から単一細胞サンプルを調製することは困難である。しかし、セルソーティングによって網膜細胞を分取することで、その後の LC-MS 分析に必要な質の高いサンプルを得ることができた。このことは、セルソーティングと LC-MS の組み合わせが、網膜細胞の系統固有の脂質組成を調べるための有望なアプローチであることを示している。

また NaIO₃ 処理により、個々の分子種のレベルが大きく変化した。NaIO₃ 処理は、形態異常があまり見られない視細胞変性の初期段階から CD73 陽性細胞の PC および PE 組成を変化させることがわかった。RPE の異常と視細胞の脂質代謝との関係については、今後のさらなる解析が必要である。

3-5. まとめ

LC-MS を用いて、胎生 14 日から生後 8 週齢までのマウス網膜の PC および PE の網羅的解析を行った。網膜の発達過程に伴い PC と PE の総量は増加した。また個々の分子種は異なる増減パターンを示し、極長鎖脂肪酸を持つリン脂質は、網膜の発達後期に急激な増加を示した。この増加は視細胞成熟期と重なる。

セルソーターを用いて CD73 発現に基づき細胞分画を行い、CD73 陽性桿体視細胞と CD73 陰性網膜細胞のリン脂質解析を行った。CD73 陽性細胞と陰性細胞では異なったリン脂質組成であることが分かった。CD73 陽性桿体視細胞に多く存在していた PC38:6、PC44:12、PC46:12、PC54:12、PC56:12 は、それぞれ DHA を含む構造異性体が主成分であった。

次に、ヨウ素酸ナトリウム誘発網膜変性モデルを用いて網膜変性過程における経時的なリン脂質組成変化を解析した。その結果、視細胞外節部の形態障害が観察される前からリン脂質組成の変動が確認された。

以上より、網膜におけるリン脂質組成が発達段階および病態において変化すること、また網膜細胞の系統によってもリン脂質組成が異なることを示した。

第4章 リゾリン脂質アシル基転移酵素 LPCAT2 の基質認識機構予測

4-1. 序文

血小板活性化因子 (PAF) は G タンパク質共役型受容体である PAF 受容体を活性化する強力な炎症誘発性脂質メディエーターである。PAF は血小板の活性化、気道収縮、血管透過性亢進、血圧低下、全身性アナフィラキシー、神経障害性疼痛などを引き起こすことが知られている^{48,49,107}。細胞外の刺激に応答して、1-*O*-アルキル-2-アシル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリンはホスホリパーゼ A₂ によって加水分解され、多価不飽和脂肪酸と 1-アルキル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン (リゾ PAF) が生成される。生成されたリゾ PAF はリゾ PAF アセチル基転移酵素 [EC: 2.3.1.67] により PAF へと変換される^{32,108,109}。

これまでに 2 種類のリゾ PAF アセチル基転移活性を持つ、リゾホスファチジルコリンアシル基転移酵素 1 (LPCAT1)¹³ と LPCAT2³² が同定されている。リゾリン脂質アシル基転移酵素の系統樹において、両者は近い存在であり、アミノ酸配列の相同性が約 48% と高いことが知られている (Fig. 4-1)。LPCAT1 は恒常的に発現するリゾ PAF アセチル基転移酵素であり、またリゾホスファチジルコリンアシル基転移活性 [EC: 2.3.1.23] を有し、ジパルミトイル-ホスファチジルコリン (PC) も生成する^{13,38,39}。ジパルミトイル-PC は肺胞のガス交換に不可欠な肺サーファクタント脂質の主成分である^{41,42}。一方、マクロファージでは LPCAT2 は 3 種類の活性調節を受けることが分かっている。まずマクロファージが ATP または PAF で 1 分間刺激を受けると、LPCAT2 はプロテインキナーゼ C α によって速やかにセリン残基 (Ser34) がリン酸化され活性化を受ける⁴⁷。またリポ多糖 (LPS) で刺激をすると、Toll-like 受容体 4 を介して、約 30 分で MAP キナーゼ活性化プロテインキナーゼにより、同じくセリン残基 (Ser34) がリン酸化され活性化を受ける⁴⁶。更に約 16 時間で LPCAT2 の

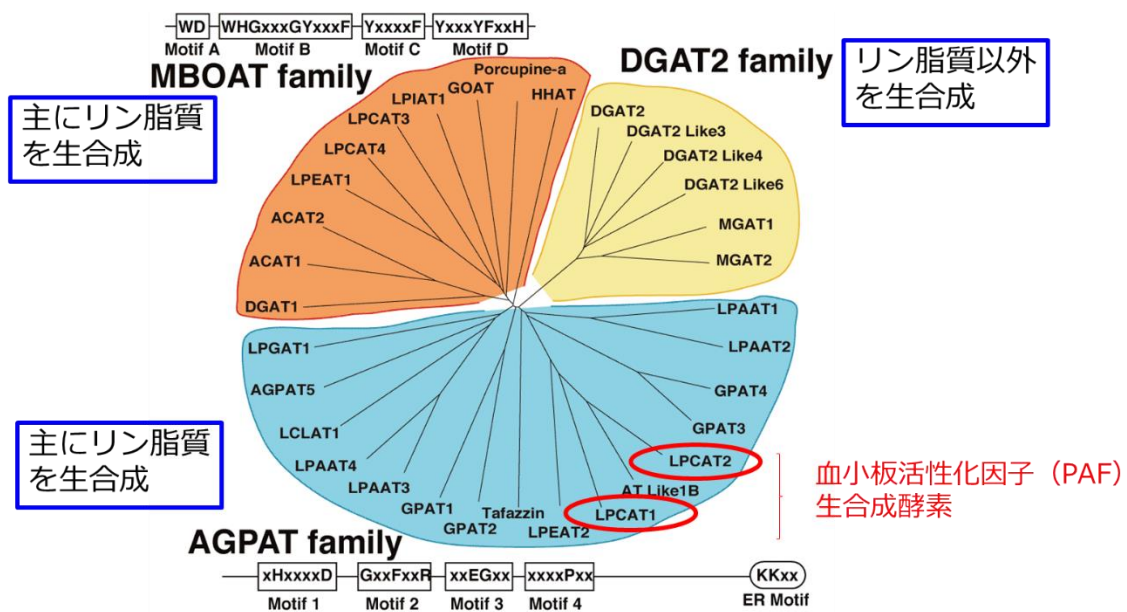


Fig. 4-1 リゾリン脂質アシル基転移酵素の系統樹

アシル基転移酵素は MBOAT、DGAT2、AGPAT の 3 つのスーパーファミリーに分類されている。主にリン脂質生成にかかわる酵素が MBOAT と AGPAT ファミリーに属している。AGPAT ファミリー、MBOAT ファミリー共に、高く保存された 4 つのモチーフが知られている。AGPAT ファミリーに属す LPCAT1 と LPCAT2 は共に血小板活性化因子 (PAF) 合成能を有し、系統樹の近い位置に存在している。

Shimizu T *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2009; 49:123-50. より改変³¹。

mRNA、タンパク質の発現が誘導される^{32,46}。LPCAT2 の活性化を導く Ser34 のリン酸化は刺激の種類により、タイムコースもリン酸化酵素も異なる。このように LPCAT2 は炎症時に誘導され活性化を受け、リゾ PAF アセチル基転移酵素として働く。また LPCAT2 は生体膜の PC への脂肪酸（アシル基）の取り込みを触媒する LPCAT 活性も有している（Fig. 4-2）。しかし、LPCAT2 欠損マウスを用いた脂質解析を行ったところ、欠損マウスでは PAF の減少が見られたものの、他のリン脂質には顕著な変化が見られなかったことから、LPCAT2 のリゾホスファチジルコリンアシル基転移活性の生物学的役割は不明のままである⁴⁹。近年 LPCAT2 が脂肪滴の膜上に局在し、PC を産生しているとの報告もあり、さらなる研究が必要である^{50,51}。

LPCAT1 と LPCAT2 は共に、1-アシルグリセロール-3-リン酸-*O*-アシル基転移酵素 (AGPAT) ファミリーに属している。いくつかのグループが、AGPAT モチーフがアシル基転移活性に必須であることを報告している¹³⁻¹⁶。PAF 関連疾患の治療薬を開発するために、PAF 産生の生化学的メカニズムと LPCAT2 の構造を明らかにすることは重要である。しかし一般的に膜タンパク質の構造解析は難しい。LPCAT2 を含む AGPAT ファミリー酵素群も膜タンパク質であり、組織や細胞の膜面分からの可溶化、精製は非常に困難であり、LPCAT2 の構造も不明のままである。近年、Robertson らは、AGPAT ファミリーの 1 つであり、リゾホスファチジン酸アシル基転移活性を有する好熱菌 *Thermotoga maritima* PlsC の結晶構造を報告した（Fig. 4-3a, b）¹⁷。PlsC は結晶構造を用いた MD シミュレーションから生体脂質二重膜の片側に埋まるように存在し、酵素活性ドメインは細胞質側に向いていると推測された（Fig. 4-3c）。この報告は、同じ AGPAT ファミリーに属し、PlsC と同様にリゾリン脂質とアシル CoA の 2 つを基質とする LPCAT2 の構造解析には非常に有用であると考えられた。

そこで、PlsC 結晶解析より得られた情報をもとに、LPCAT2 のホモロジーモデリングを行った。次に LPCAT2 の点変異体解析により、マウス LPCAT2 (mLPCAT2) の AGPAT モチーフと、そのアシル CoA 選択性に重要な残基を明らかにした。得られた結果から、mLPCAT2

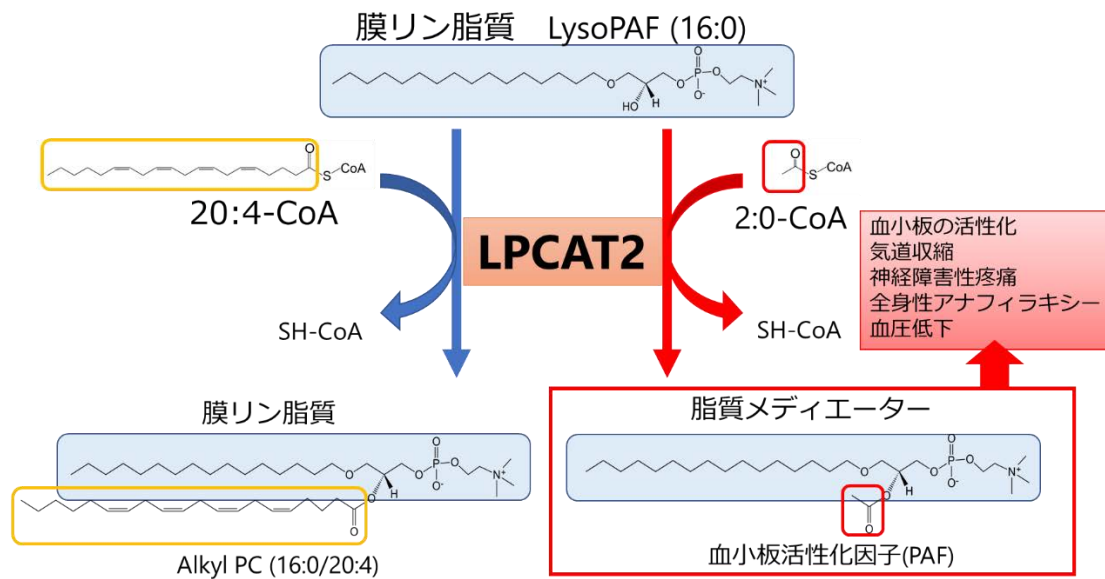


Fig. 4-2 LPCAT2 の 2 つの酵素活性

LPCAT2 はリゾリン脂質にアシル CoA を転移する活性とアセチル CoA を転移させる 2 つの活性を持つ。炎症時に誘導される LPCAT2 はアセチル CoA をリゾリン脂質の 1 つである リゾ PAF に転移し、血小板活性化因子 (PAF) を生成する。PAF は生理活性分子として機能する。LPCAT2 のリゾホスファチジルコリンアシル基転移活性の生物学的役割は不明のままである。

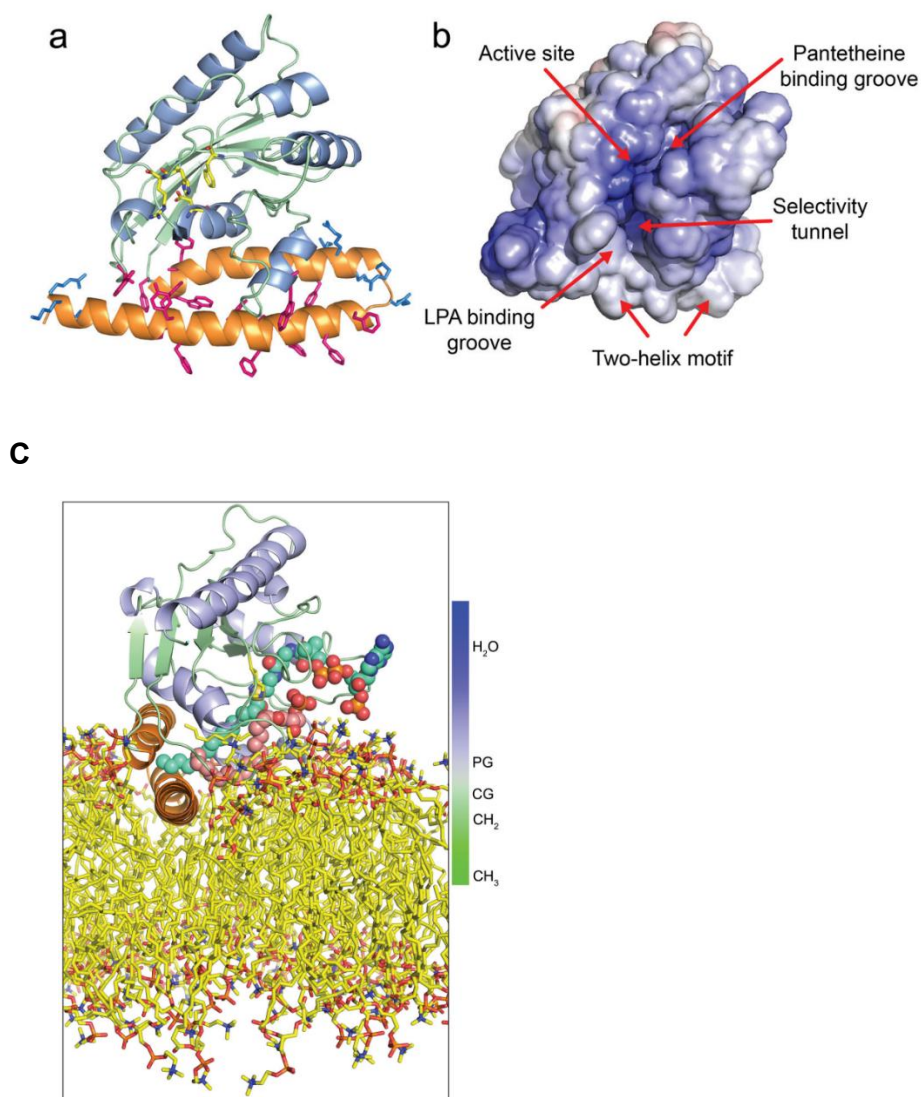


Fig. 4-3 好熱菌 (*Thermotoga maritima*) PlsC の三次構造と脂質二重層に結合した TmPlsC の分子動力学法によるモデル

Robertson, Rosanna M. *Nat Struct Mol Biol.* 24(8), 666-671 (2017) より引用¹⁷。

a) TmPlsC の全体構造。N 末端の 2 つのヘリックスモチーフ (オレンジ)、活性部位の残基 (黄)、芳香族残基 (マゼンタ)、塩基性残基(青)。(b) TmPlsC の表面電荷。静電面は APBS プログラムを用いて計算した。赤 (負) と青 (正) の極端な範囲は、 $-7 \sim +7 \text{ kT}$ (k はボルツマン定数、 T は温度) の静電ポテンシャルを表している。c) TmPlsC の分子動力学法によるモデル。N 末端の 2 ヘリックスモチーフ (オレンジ)、 $\alpha\beta$ コアの触媒ドメイン (青/緑)、活性部位のヒスチジン (黄)、LPA 基質 (サーモン色：炭素)、アシルドナー (青緑色：炭素)、膜リン脂質 (黄色：アシル鎖、赤/オレンジ：リン酸基、青：極性基部分) である。

の基質認識様式を予測した。得られた知見は、mLPCAT2 の生化学特性の解明や、PAF 関連疾患の新薬開発に役立つものと考えている。

4-2. 実験材料・実験方法

点変異体作成

mLPCAT2 変異導入は KOD-Plus- (TOYOBO) を用いて PCR オーバーラップ伸長法¹¹⁰により作成した。PCR オーバーラップ伸長に用いたプライマー配列は Table 4-1 に示した。増幅した PCR 生成物は pCXN2.1 ベクターに導入し、遺伝子配列を確認した。

CHO 細胞ミクロソーム画分の調製

10 cm ディッシュで培養した Chinese Hamster Ovary (CHO) -K1 細胞に、Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、FLAG タグ付き野生型 mLPCAT2 および変異体のいずれかをコードする遺伝子を導入した。導入後 48 時間に細胞をバッファー (20 mM Tris-Cl (pH7.4)、300 mM スクロース、1 x cOmplete protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich)) を用いて回収し、氷上で超音波破碎した。9,000 x g 10 分間遠心後、上清を 100,000 x g 1 時間遠心を行った。ペレットは TE バッファー (20 mM Tris-Cl (pH7.4)、1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) に懸濁し、タンパク質濃度を Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) を用いて、ブラッドフォード法により定量した。検量線は濃度既知の BSA (essentially fatty acid-free lyophilized powder; Sigma) 溶液を用いて作成した。

リゾ PAF アセチル基転移活性 (Lyso-PAF-2:0-CoA アッセイ) 及びリゾ PAF アシル基転移活性 (Lyso-PAF-20:4-CoA アッセイ) 反応条件

ミクロソームタンパク質 0.05 µg を反応液 (100 mM Tris-Cl (pH7.4)、1 mM EDTA、1 mM CaCl₂、0.015% Tween-20、5 µM リゾ PAF C16-d₄、1 mM 2:0-CoA (Lyso-PAF-2:0-CoA アッ

セイの場合) または 25 μ M 20:4-CoA (Lyso-PAF-20:4-CoA アッセイの場合)) に加えた合計 100 μ L を 37°C 10 分間反応させた。酵素反応は 300 μ L メタノールで停止させた。その後、内部標準として Lyso-PAF-2:0-CoA アッセイおよび Lyso-PAF-20:4-CoA アッセイにそれぞれ 1 μ M 17:0 LPC または 5 μ M DMPC を 10 μ L 加えた。酵素反応液を 10,000 x g 5 分間遠心し、上清を LC-MS で分析した。

アシル CoA ミックスを用いたリゾ PAF アシル基転移活性 (Lyso-PAF-acyl-CoA ミックス アッセイ) 測定

ミクロソームタンパク質 0.05 μ g を反応液 (100 mM Tris-Cl (pH7.4)、1 mM EDTA、1 mM CaCl₂、0.015% Tween-20、5 μ M リゾ PAF C16-d4、基質 (ドナー) として各 5 μ M 16:0-CoA、18:1-CoA、18:2-CoA、20:4-CoA のアシル CoA ミックス) に加えた合計 100 μ L を 37°C 10 分間反応させた。酵素反応停止液としてクロロホルム/メタノール (1:2, v/v) を 300 μ L 加えたのち、内部標準として 0.02 μ M DMPC を 50 μ L 添加した。その後 Bligh and Dyer 法⁷¹を用いて脂質抽出を行った。脂質抽出液は遠心エバポレーターを用いて乾燥させたのち、メタノール 0.1 mL に再溶解させ、遠心後に液体クロマトグラフ Nexera UHPLC と四重極型質量分析計 LCMS8050、島津製作所で分析し、d4-アルキル PC のピーク面積を測定した。

LC-MS/MS を用いたリン脂質測定法

Lyso-PAF-2:0-CoA assay 及び Lyso-PAF-20:4-CoA assay 測定の生成物は Acquity UPLC システム (Waters) とトリプル四重極 TSQ Vantage 質量分析装置 (Thermo Scientific) で構成される LC-MS を用いて分析した¹¹¹。分析カラムには BEH C8 カラム (2.1 x 30 mm、Waters) を使用した。水相 (A 液) は 20 mM 炭酸アンモニウム (Wako)、有機相 (B 液) はアセトニトリル (Wako) を用いた。送液グラジエントのプログラム (時間 (%A/%B)) は以下の通りである。

PAF 測定：0 min (80/20) -4.5 min (5/95) -6.1 min (5/95) -6.01 min (80/20)

PC 測定：0 min (80/20) -3.0 min (30/70) -3.01 min (5/95) -4.25 min (5/95) -4.26 min (80/20)

流速は 800 μ L/min に設定し、サンプルは 5 μ L 注入した。

Lyso-PAF-acyl-CoA mix assay 測定の生成物は Nexera Ultra High-Performance Liquid Chromatograph system (島津製作所) とトリプル四重極質量分析装置 (LCMS8050、島津製作所) で構成される LC-MS/MS を用いて分析した。分析カラムには BEH C8 カラム (2.1 x 100 mm、Waters) を使用した。水相 (A 液) は 20 mM 炭酸アンモニウム (Wako)、有機相 (B 液) はアセトニトリル (Wako)、有機相 (C 液) はイソプロパノール (Wako) を用いた。送液グラジエントのプログラム (時間 (%A/%B/%C)) は以下の通りである。

PC 測定：0 min (70/15/15) -1.5 min (20/40/40) -8 min (20/40/40) -8.1 min (6/47/47) -15.1 min (70/15/15) -18:0 min (70/15/15)

流速は 300 mL/min に設定し、サンプルは 5 μ L 注入した。選択反応モニタリング (SRM) を用いて分析した。SRM トランジションは Table 4-2 に示す。

ウエスタンブロッティング解析

ミクロソームタンパク質 2 μ g を 10%SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、ニトロセルロース膜 (GE ヘルスケア) に転写した。5%スキムミルク/0.1%Tween-20-TBS を用いてブロッキングしたのち、1 次抗体 (M2 (sigma) ; 抗 FLAG 抗体: 1000 倍希釈) と反応させた。洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識された 2 次抗体 (抗マウス IgG (GE ヘルスケア) : 1000 倍希釈) と反応させた。洗浄後、抗体と反応したタンパク質を ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE ヘルスケア) を用いて発光させ、Image Quant LAS500 (GE ヘルスケア) で検出した。

ホモロジーモデリング

ホモロジーモデリングは微生物化学研究所の野田展生博士、的場一晃博士との共同研究として行った。tmPlsC の結晶構造 (PDB コード:5KYM) を利用し、Discovery Studio 2018 の MODELLER プログラム¹¹² を用いて、LPCAT1 と LPCAT2 のホモロジーモデリングを行った。PSIPRED アルゴリズム¹¹³ を用いて生成した二次構造予測は、tmPlsC、mLPCAT1 および mLPCAT2 間に類似した構造が存在することを示した。アミノ酸配列の類似性は、ClustalW ソフトウェア¹¹⁴ を用いて確認した。構築されたモデルは、確率密度関数のトータルエネルギースコアと Discrete Optimized Potential Energy 分析¹¹⁵ に基づいて決定した。さらに、Discovery Studio の CHARMM¹¹⁶ と NAMD¹¹⁷ を用いて、デフォルト設定で最適化した。

ソフトウェア

アミノ酸配列のアライメントは GENETYX-MAC ソフトウェアバージョン 17.0.2 (GENETYX Corporation) を用いて作成した。アミノ酸配列 (mLPCAT1: NP_663351; mLPCAT2: NP_766602; tmPlsC: WP_004082209.1) は National Center for Biotechnology Information database から得た。すべての統計計算は R 統計パッケージ バージョン 4.0.0 を用いて行った。

4-3. 結果

4-3-1 好熱菌 PlsC を用いたマウス LPCAT1 及び LPCAT2 のホモロジーモデリング

好熱菌 *Thermotoga Maritima* (tm) PlsC は AGPAT ファミリーの 1 つであり、リゾホスファチジン酸アシル基転移活性を有する¹⁷。EMBOSS Water のウェブサイト (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/) によると、tmPlsC は mLPCAT1、mLPCAT2 のそれぞれと 26% の相同性を持つ。tmPlsC の構造情報は Protein Data Bank (PDB) で公開されており (PDB code 5KYM)、mLPCAT1 と mLPCAT 2 のホモロジーモデリングに利用できると考えた。

まず mLPCAT2 のアミノ酸一次構造を mLPCAT1 および tmPlsC の一次構造と比較した (Fig. 4-4A)。AGPAT モチーフ 1~4 は、3 つの酵素間で高く保存されていた。活性中心であるモチーフ 1 の HXXXXD 配列も保存されていた。また mLPCAT1 と mLPCAT2 の予測される二次構造について、tmPlsC の二次構造と比較を行った。tmPlsC に存在する N 末の 2 本の α ヘリックス部分のアミノ酸配列と mLPCAT1 および mLPCAT2 の N 末部分のアミノ酸配列は相同性があまり高くないが (Fig. 4-4A)、2 次構造予測を行ったところ mLPCAT1、LPCAT2 とともに tmPlsC と同様に N 末に 2 本の α ヘリックスが存在すると予測された (Fig. 4-5A, B)。2 次構造予測から mLPCAT1、LPCAT2 は N 末の α ヘリックス以外の部分についても tmPlsC と類似した構造をと考えられ、tmPlsC は mLPCAT1 と mLPCAT2 のホモロジーモデリングの鋳型に適していると考えられた。ホモロジーモデリングは構造既知のタンパク質を鋳型にターゲットタンパク質の構造を予測することから、鋳型となるタンパク質がない部分は予測できない。tmPlsC は mLPCAT1 および mLPCAT2 のいずれよりも配列が短いため、mLPCAT1 についてはアミノ酸残基 44-301、mLPCAT2 についてはアミノ酸残基 52-320 のショートフォームに対して予測を行った (Fig. 4-4B)。すなわち tmPlsC は小胞体局在モチーフであるダイリジンモチーフや EF ハンドモチーフを持っていないため、それらのモチーフ

[illegible]

tmPlsC 1 247 AGPAT motif 1 2 3 4

mLPCAT1 1 44 301 534 EF-hand like dilysine motif 1 2 3 4

mLPCAT2 1 52 320 544 EF-hand dilysine motif Ser34 1 2 3 4

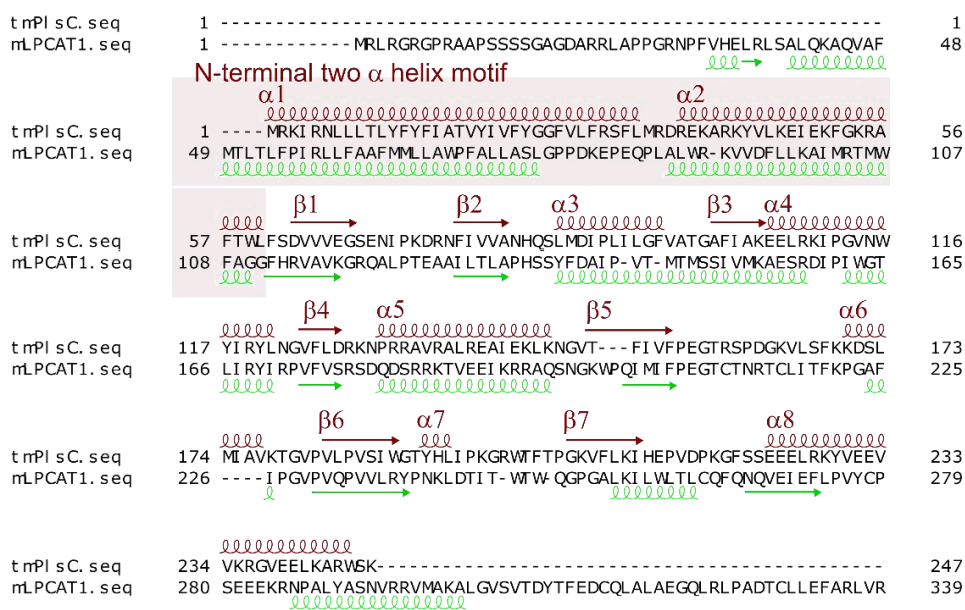
Fig. 4-4 tmPlsC、mLPCAT1、mLPCAT2 のアライメントとホモロジーモデリング

A) tmPlsC、mLPCAT、mLPCAT2 のアミノ酸アライメント。AGPAT モチーフ 1 (緑)、2 (マゼンタ)、3 (青)、4 (オレンジ)。本研究で変異導入により解析されたアミノ酸残基を赤い四角で囲った。アスタリスクは保存された残基、ドットは弱く類似した残基を表す。B) tmPlsC、mLPCAT1、および mLPCAT2 の構造を模式的に示したもの。モチーフ 1～4 は、それぞれ緑、マゼンタ、青、オレンジに着色した。C) mLPCAT1 (薄緑) と mLPCAT2 (水色) のホモロジーモデリング。tmPlsC (テンプレートとして使用、ベージュ)、mLPCAT1、および mLPCAT2 をリボンモデルで示した。モチーフ 1 は緑、モチーフ 2 はマゼンタ、モチーフ 3 は青、モチーフ 4 はオレンジ。

アミノ酸配列 (mLPCAT1: NP_663351; mLPCAT2: NP_766602; tmPlsC: WP_004082209.1) は National Center for Biotechnology Information database から得た。

Hamano F. et al. *FASEB J.* 2021 May 6; 35(6): e21501 より転載¹¹⁸。

A)



B)



Fig. 4-5 mLPCAT1 と mLPCAT2 の配列アラインメントと二次構造予測

mLPCAT1 (黄緑) (A) と mLPCAT2 (青) (B) の各二次構造と tmPlsC (茶) の二次構造を示した。tmPlsC の N 末端にある 2 つのヘリックスモチーフをページの枠で示した。α、α-ヘリックス;β, β-シート。Hamano F. et al. *FASEB J.* 2021 May 6; 35(6) : e21501 より転載

118。

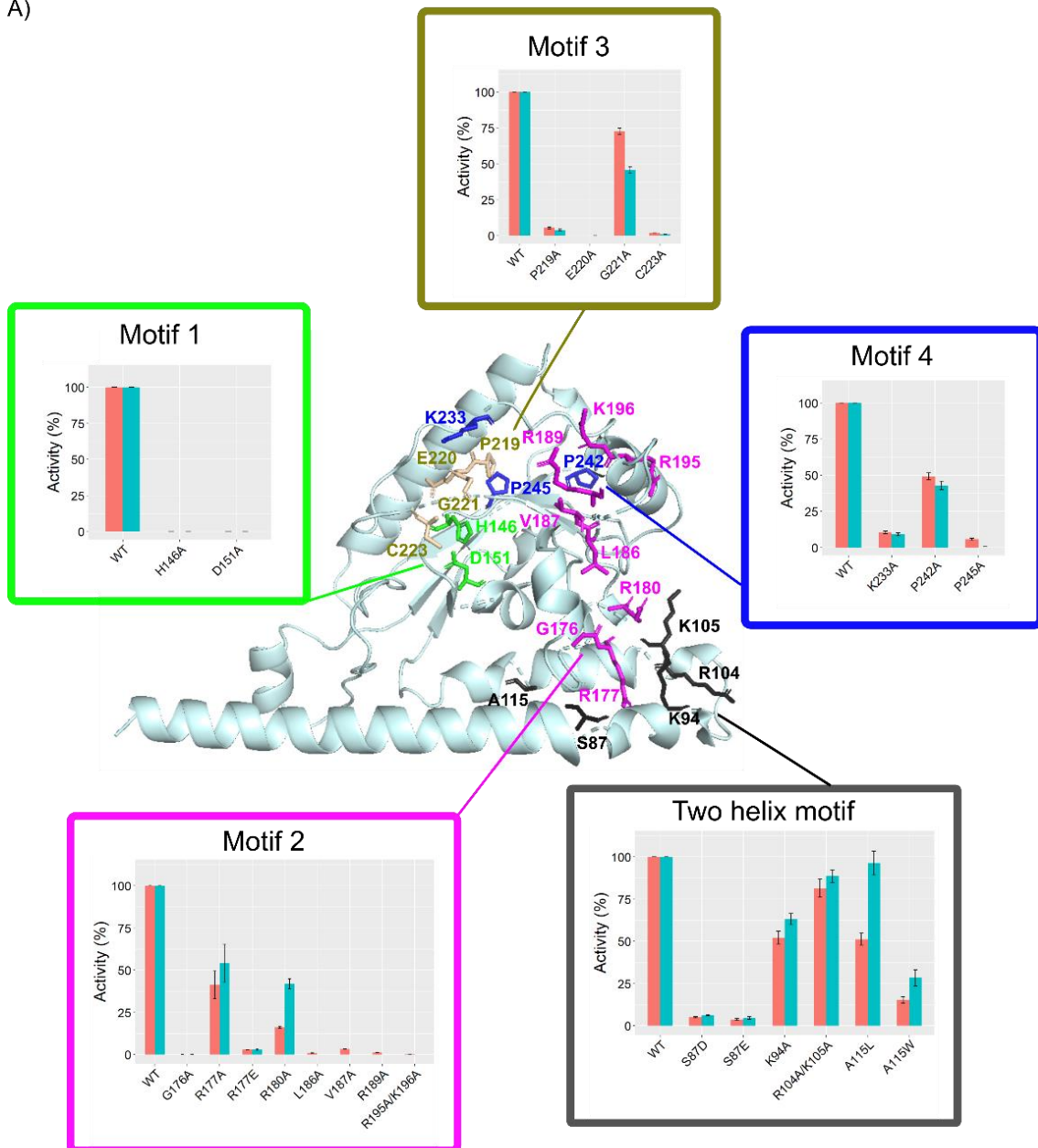
はホモロジーモデリングを行う範囲に含めなかった。また mLPCAT2 の活性化に関与するリン酸化部位である N 末のセリン 34 残基の解析についても解析は行わなかった。AGPAT モチーフ 1~4 は独立したグ 3 つのループによって同定されており¹³⁻¹⁶、それぞれ、緑、マゼンタ、青、オレンジの四角で示した (Fig. 4-4A)。mLPCAT1 と mLPCAT2 は AGPAT モチーフの他、モチーフ 4 に続くループ構造をとると予測される部分についても高い相同性を示していた (赤い四角) (Fig. 4-4A)。

ホモロジーモデリングを行った結果を Fig. 4-4C に示す。これらの構造予測から、tmPlsC を膜の片側のリーフレットに固定する 2 本の α ヘリックスが、mLPCAT1 と mLPCAT2 にも存在すると考えられた。この N 末の 2 本の α ヘリックスは N 末ヘリックスモチーフとして、その役割について評価を行うことにした (後述 4-3-2)。

4-3-2 mLPCAT2 の AGPAT モチーフと N 末ヘリックスモチーフの役割評価

次に、AGPAT モチーフと N 末ヘリックスモチーフの役割を評価するために、アミノ酸をアラニンに置換した点変異体を作成した。点変異体の変異箇所はモチーフ内に加え、その近傍についても作製した (Fig. 4-4A (赤い四角)、4-6A (中央図))。作製した変異体は以下の通りである。モチーフ 1 の点変異体は H146A、D151A の 2 つを作成した。モチーフ 2 についてはモチーフ内と近傍を含めて合計 8 種の変異体を作製した。作製したモチーフ 2 の点変異体は G176A、R177A、R177E、R180A、L186A、V187A、R189A と RK195/196AA である。モチーフ 3 についてはモチーフ内に P219A、E220A、G221A と C223A の 4 つの変異体を作製した。モチーフ 4 についてはモチーフ内及び近傍に点変異体を作成し、K233A、P242A と P245A の 3 つを作製した。N 末ヘリックスモチーフの点変異体は基質選択性への関与についても検討するためにアラニン置換の K94A、RK104//105AA に加え、S87D、S87E、A115L と A115W の 4 つの変異体を作製し評価を行った。この評価に用いた全ての酵素の発現量には大きな違いがないことを、抗FLAG抗体を用いたウェスタンブローディングで確認した (Fig.

A)



B)

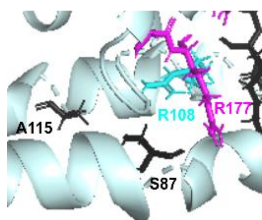


Fig. 4-6 AGPAT モチーフと N 末端の 2 本の α ヘリックスモチーフの解析

A) 中央に、酵素活性測定を行った変異体の変異の位置を mLPCAT2 のリボンモデルで示した。モチーフ 1 の変異個所は緑、モチーフ 2 の変異個所はマゼンタ、モチーフ 3 の変異個所は肌色、モチーフ 4 の変異個所は青、N 末ヘリックスモチーフの変異個所は黒で示した。野生型および mLPCAT2 変異体について、基質に 2:0-CoA (オレンジ色のバー) または 20:4-CoA (緑色のバー) を用いて酵素活性を測定した。グラフは、WT 酵素と比較した相対的な活性として示されている。バックグラウンド活性は、ベクターを導入した細胞を用いて測定し、実験値から差し引いた。エラーバーは、それぞれ 3 ロット分の独立した実験の標準誤差 (S.E.M) を表す。B) Ser87 と Arg108 付近の拡大図。

Hamano F. et al. *FASEB J.* 2021 May 6; 35(6) : e21501 より転載¹¹⁸。

4-7)。抗 FLAG 抗体を用いた検出では、FLAG タグ部分が分解されているが活性を有しているような酵素の検出ができないことを考慮し、抗 FLAG 抗体に加えて LPCAT2 の C 末から 19 アミノ酸を認識する抗体を用いてウエスタンブロッティングも行った (Fig. 4-8)。抗 mLPCAT2 抗体で認識される複数のバンドが確認されたが、LPCAT2 の発現に大きな違いはないことを確認した。

mLPCAT2 はリゾ PAF アセチル基転移活性とリゾ PAF アシル基転移活性の 2 種類の活性を有していることから (Fig. 4-2)、変異体の酵素活性の評価にはアクセプター基質としてリゾ PAF を、またドナー基質としてアセチル CoA (2:0-CoA) とアラキドノイル CoA (20:4-CoA) の 2 種類を使用し、両方の活性を評価した (Fig. 4-6、Table 4-3)。AGPAT モチーフに関するこれまでの研究と同様に、モチーフ内の変異のほとんどはリゾ PAF アセチル基転移活性とリゾ PAF アシル基転移活性の両方の活性を低下させており、AGPAT モチーフが酵素活性に重要であることが確認された^{13-16,23}。具体的には、モチーフ 1 内の活性中心に位置するヒスチジン 146 とアスパラギン酸 151 のアラニン変異体は、mLPCAT2 の活性を完全に失っていた。またホモロジーモデリングの構造予測からヒスチジン 146 とアスパラギン酸 151 の活性中心に近い変異体とされる変異体ほど活性を失いやすい傾向がみられた。すなわち、活性中心の周りに位置する L186A、V187A、P219A、E220A、C223A、P245A はリゾ PAF アセチル基転移活性とリゾ PAF アシル基転移活性の両方の活性をほぼ失い、活性中心からやや離れた位置のアミノ酸をアラニン置換した R180A、R177A、P242A は野生型 LPCAT2 の約半分の活性を維持していた。ホモロジーモデリングの結果からこのアルギニン 177 とアルギニン 180 は N 末ヘリックスモチーフ近くに位置していると考えられた。膜近傍のアミノ酸正電荷は、膜リン脂質の極性基との相互作用に関与する可能性やドナー基質であるアシル CoA のリン酸基部位と相互作用する可能性が考えられた。そこで、次にアルギニン 177 を酸性アミノ酸であるグルタミン酸で置換し、この位置の正電荷が mLPCAT2 の活性に重要かどうかを検証した。その結果、アルギニン 177 をアラニン置換した場合に保た

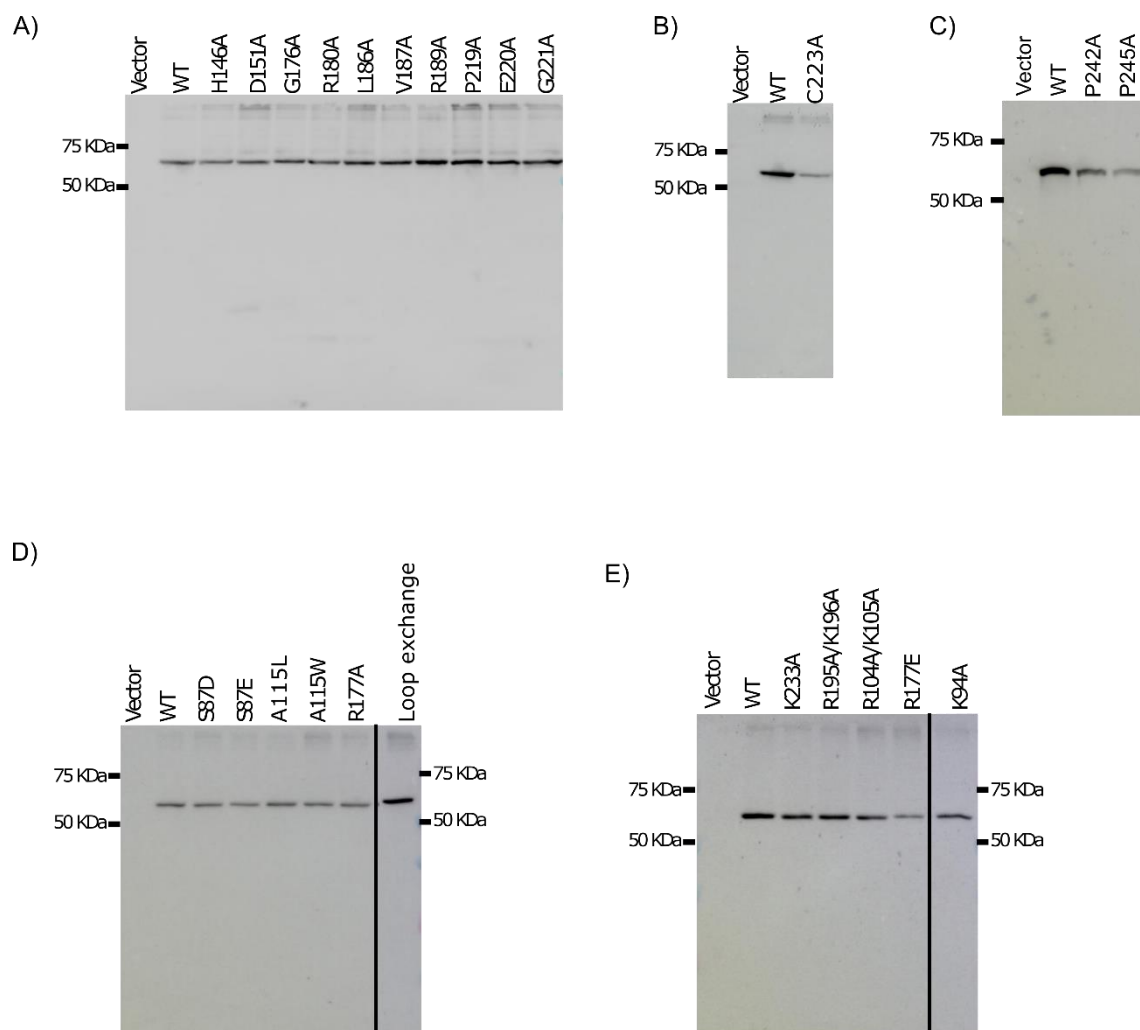


Fig. 4-7 抗 FLAG 抗体を用いたウェスタングロットによる mLPCAT2 変異体発現の確認
ウェスタングロットは、実験方法の項に記載した方法で行った。Vector、空ベクター発
現；WT、野生型 mLPCAT2。Vector を導入した細胞ではシグナルが検出されなかったが、
WT の mLPCAT2 または mLPCAT2 の変異体を発現させた細胞では、期待したサイズのバン
ドが観察された。3 ロット分の実験を行い、同様の結果を得た。これらの写真は、未使用
のタンパク質を除去するためにカットされ、黒線で示されている。

Hamano F. et al. *FASEB J.* 2021 May 6; 35(6) : e21501 より転載¹¹⁸。

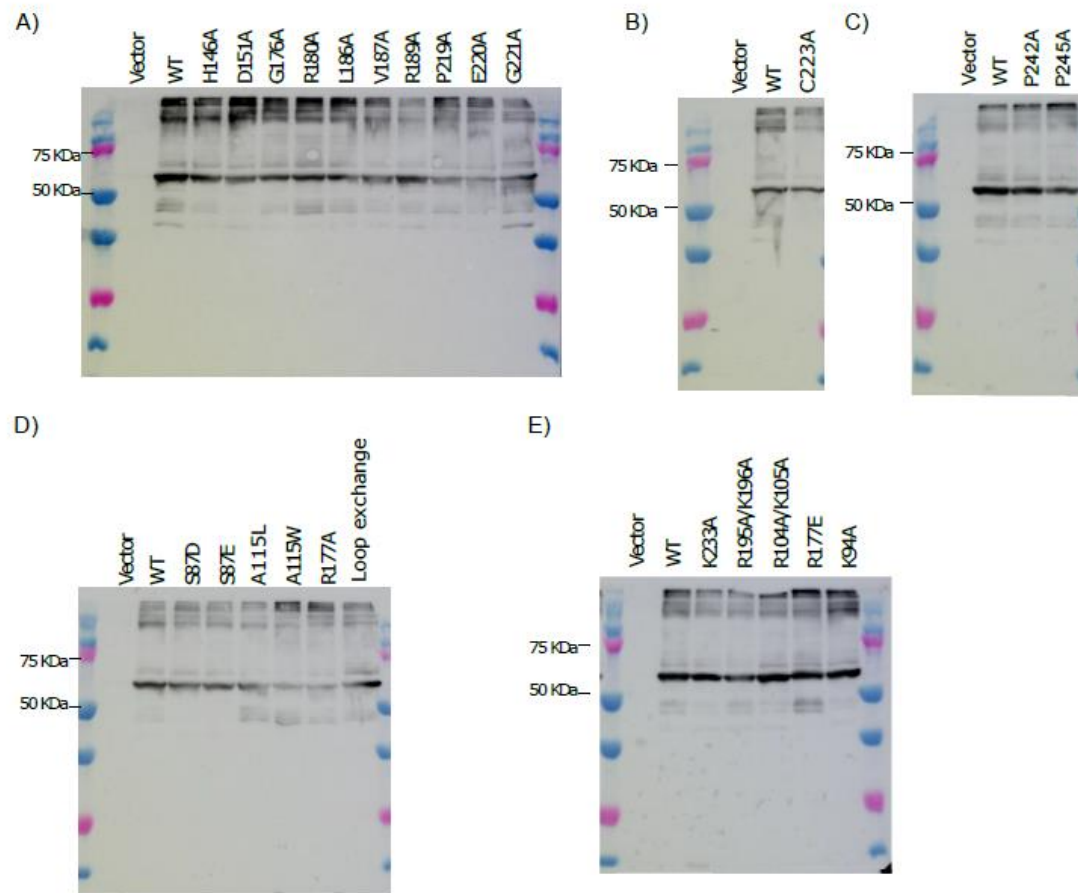


Fig. 4-8 抗 mLPCAT2 抗体を用いたウェスタンブロットによる mLPCAT2 変異体発現の確認

抗体は mLPCAT2 の C 末の 19 アミノ酸ペプチドを認識するものを使用した。

Vector、空ベクター発現；WT、野生型 mLPCAT2。Vector を導入した細胞ではシグナルが検出されなかったが、WT の mLPCAT2 または mLPCAT2 の変異体を発現させた細胞では、期待したサイズのバンドおよび小さいサイズのバンドも観察された。2 ロット分の実験を行い、同様の結果を得た。

れていた野生型の約半分の活性がグルタミン酸置換することで、ほぼ失われる結果となった。これによりこの位置の正電荷が活性に寄与していることが示唆された。またグリシン 176 はホモロジーモデリングから活性中心から離れた位置に存在すると考えられたが、G176A 変異体は完全に 2 つの活性を失っていた。プロリン 173-X174-X176-グリシン 176 の配列は様々なリゾリン脂質アシル基転移酵素において高度に保存されており、モチーフ 1 とモチーフ 2 の間にねじれ構造をもたらししていると考えられていることから¹¹⁹、このねじれ構造が mLPCAT2 の活性においても必要であると考えられた (Fig. 4-9)。Fig. 4-10A にホモロジーモデリングにより得られたモデルの表面電荷を示した。赤は負電荷部位、青が正電荷部位を示し、白の部分は疎水性を表している。tmPlsC の中心に存在する疎水性ポケットは、mLPCAT1 と mLPCAT2 のホモロジーモデルにおいても予測された。また tmPlsC と同様に mLPCAT1、mLPCAT2 の上部にはその疎水性ポケットへアクセス可能な入口が存在していた (Fig. 4-10A 下段)。この酵素表面の上部、疎水ポケットの入口付近に、アルギニン 189、アルギニン 195、リジン 196 とリジン 233 は位置しており (Fig. 4-10B)、これらのアラニン変異体が mLPCAT2 活性を大きく失っていることから、酵素表面の正電荷が酵素活性に重要であると考えられた。一方、N 末ヘリックスモチーフに存在するリジン 94、アルギニン 104 とリジン 105 のアラニン変異体は大きな活性の低下は観察されず、この位置の正電荷は酵素上部の正電荷に比べ重要度は高くないと考えられた。またモチーフ 3 のグリシン 221 は活性中心の非常に近くに位置すると予測されたが、このアラニン変異体は活性を完全には失わず、活性を約半分維持していた。これはグリシンからアラニンへの変化があまり大きくなかったためと考えられた。

tmPlsC の結晶解析論文では、tmPlsC の疎水性ポケットの長さがドナー基質のアシル基選択性を決定すると報告していた¹⁷。そこで mLPCAT2 の疎水性ポケットの大きさがアシル基選択性に影響するかどうかの検証を行った。ホモロジーモデリングの結果から N 末ヘリックスモチーフ中のセリン 87 とアルギニン 108 は 2 本の α ヘリックスのそれぞれに存在

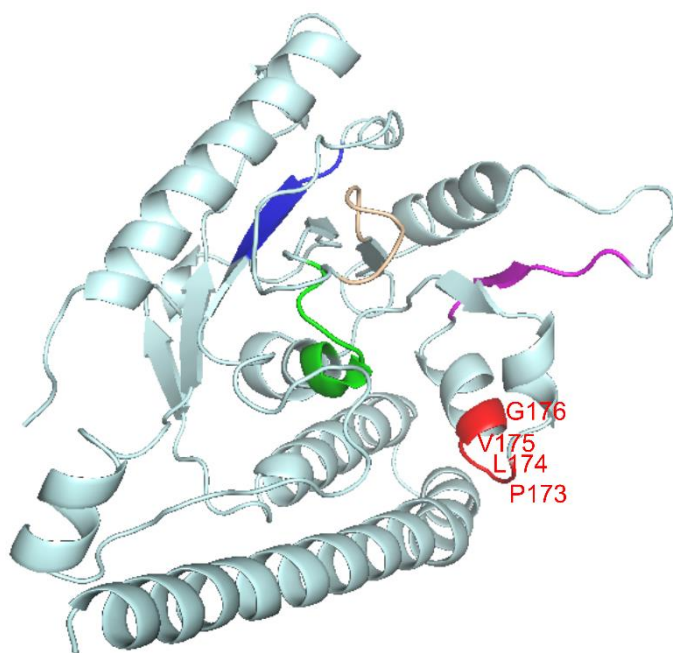
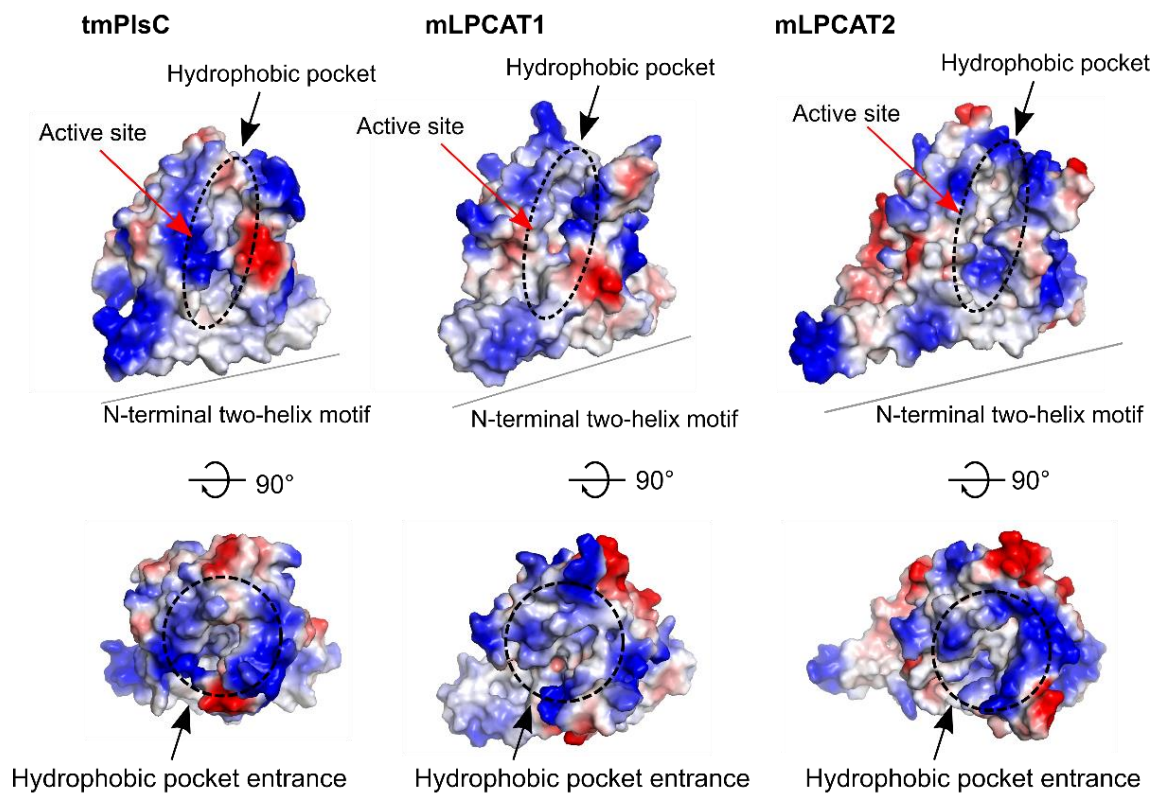


Fig. 4-9 mLPCAT2 モデルにおける P-X-X-G 配列の位置。

Pro173-x174-x175-Gly176 は様々なリゾリン脂質アシル基転移酵素の間で高度に保存されており、モチーフ 1 とモチーフ 2 の間に捻じれ構造を導入できる可能性がある。P-X-X-G 配列は赤で示した。モチーフ 1~4 は次のように色付けした。：モチーフ 1 は緑、モチーフ 2 はマゼンタ、モチーフ 3 は肌色、モチーフ 4 は青。

Hamano F. et al. *FASEB J.* 2021 May 6; 35(6) : e21501 より転載¹¹⁸。

A)



B)

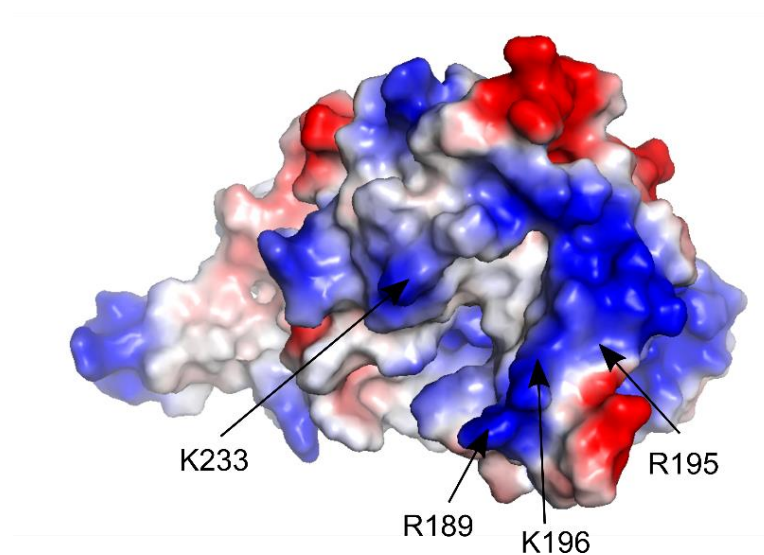


Fig. 4-10 tmPlsC、mLPCAT1、および mLPCAT2 の表面の静電荷。

A) tmPlsC、mLPCAT1、および mLPCAT2 の表面電荷を表したものの。モチーフ 1 の H-X-X-X-D を含む活性部位、疎水性ポケット、疎水性ポケットの入り口、および N 末端の 2 ヘリックスモチーフを示している。B)細胞質側の mLPCAT2 の上面。疎水性ポケットの入り口付近に存在するアミノ酸で変異体を作成した位置を示した。図は、PyMol ソフトウェア (バージョン 2.3.2) を用いて作成した。表面電荷モデルは、PyMol のデフォルトの vacuum electrostatic package を用いて作成した。赤は負電荷領域を、青は正電荷領域を、白は中性/疎水性領域を表している。

Hamano F. et al. *FASEB J.* 2021 May 6; 35(6) : e21501 より転載¹¹⁸。

し、対面するように位置していると推測された (Fig. 4-6B)。そこでセリン 87 を酸性アミノ酸であるアスパラギン酸もしくはグルタミン酸に置換し、対面のアルギニンとの相互作用によりヘリックス間の空間を埋め、結果として疎水性ポケットの空間に影響を与えることで、ドナー基質のアシル基選択性に影響を与えるかを調べた。その結果、S87D および S87E 変異体はいずれも 2:0-CoA および 20:4-CoA に対する活性を失っていた (Fig. 4-6A)。セリン 87 と置換した酸性アミノ酸はアルギニン 108 と塩橋を形成し、それによって活性を失わせるほどの大きな影響を mLPCAT2 の構造に与えた可能性が考えられた。疎水性ポケットの空間に影響を与える別の方法として、N 末ヘリックスモチーフに存在するアラニン 115 を側鎖の大きなロイシンとトリプトファンで置換した変異体 A115L と A115W を作製した。A115L は 20:4-CoA に対する活性は野生型と変わらず維持していたが、2:0-CoA に対する活性は半減した。また A115W についても 2:0-CoA に対する活性がより低下し、20:4-CoA に対する活性も野生型の約 25% 程度に低下した。アラニン 115 の変異は活性を完全に失わずに維持することができ、基質ごとに活性への影響が異なっていた。この 2 つの変異体を用いて、アシル基選択性を調べることにした (後述 4-3-3)。

モチーフ 4 に続くループと予測される領域 (Fig. 4-4A 赤い長四角) は、mLPCAT1 と mLPCAT2 で非常によく保存されていた。しかし、mLPCAT2 のループ配列を mLPCAT1 のループ配列と交換したところ、mLPCAT2 の活性を完全に失われることが分かった (Fig. 4-11)。

4-3-3 ドナー基質アシル基選択性

ドナー基質であるアシル CoA の選択性を評価するために、2:0-CoA と 20:4-CoA に対して異なる活性への影響を示した A115L と A115W 変異体を用い、16:0-、18:1-、18:2-と 20:4-CoA の 4 種類のアシル-CoA ミックスを基質としてリゾ PAF アシル基転移活性を測定した (Fig. 4-12A, B)。アラニン 115 の位置は疎水性ポケット内と予測され、アラニンの代わりに側鎖のサイズの大きいアミノ酸を導入することで、疎水性ポケットのサイズや環境に直接影響

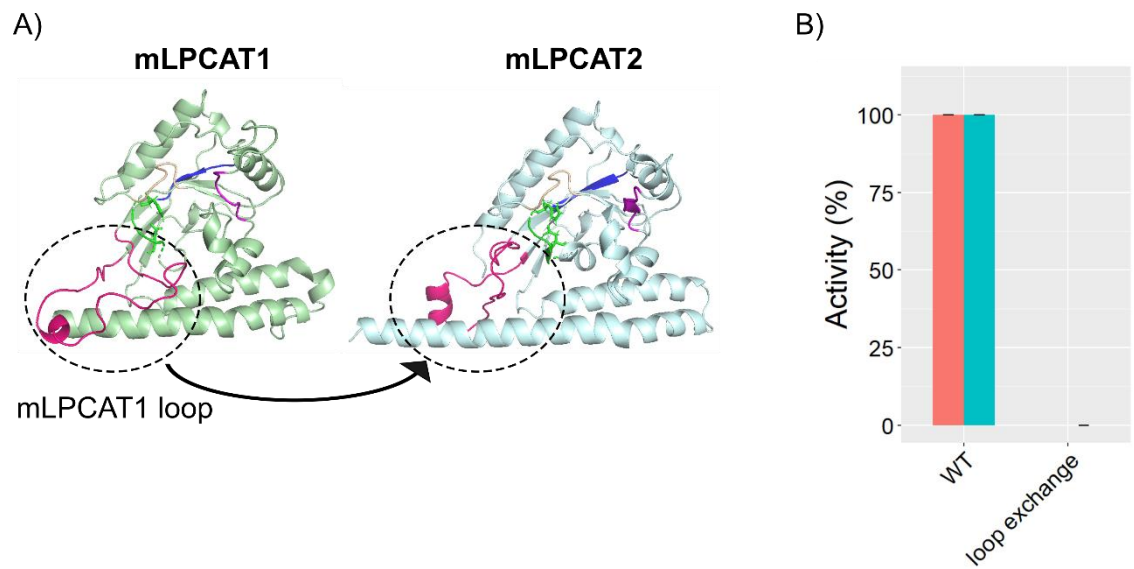
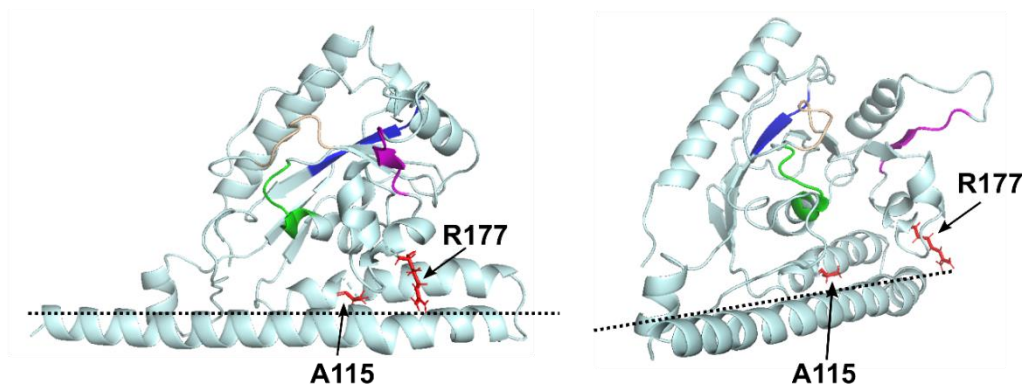


Fig. 4-11 予測されるループ領域の解析

A) mLPCAT2 のループ配列を mLPCAT1 のループ配列と交換したループ交換変異体を作成した。ループは点線で囲んだマゼンタで着色した。リボンモデルは左が mLPCAT1 (薄緑色)、右のモデルは mLPCAT2 (水色)。モチーフ 1 は緑、モチーフ 2 はマゼンタ、モチーフ 3 は肌色、モチーフ 4 は青。B) mLPCAT2 のループ交換変異体について、2:0-CoA (オレンジ) または 20:4-CoA (緑) を用いて酵素活性を測定した。

Hamano F. et al. *FASEB J.* 2021 May 6; 35(6): e21501 より転載¹¹⁸。

A)



B)

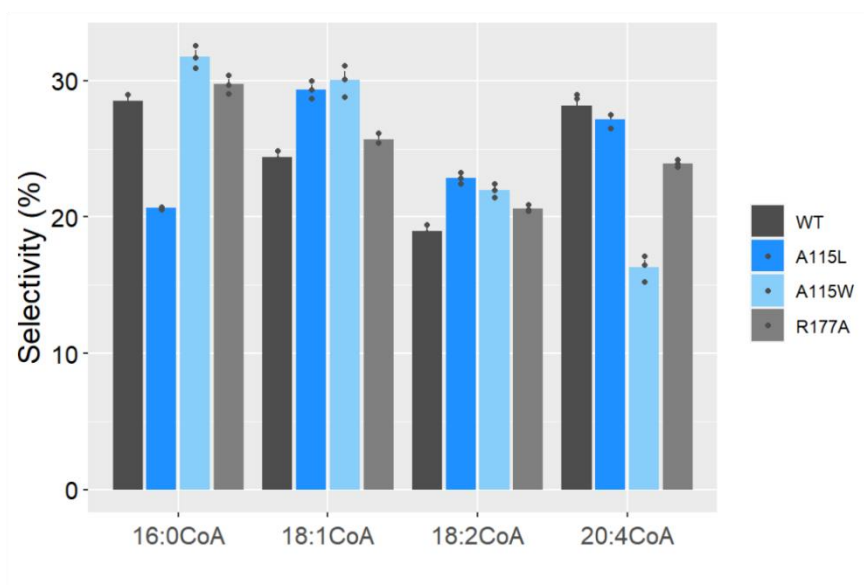


Fig. 4-12 N 末ヘリックスモチーフの変異がアシル基選択性に及ぼす影響

A) mLPCAT2 におけるアラニン 115 とアルギニン 177 の位置。A115 と R177 は赤で示した。黒の破線は、予測される膜の位置を示す。モチーフ 1 は緑、モチーフ 2 はマゼンタ、モチーフ 3 は肌色、モチーフ 4 は青。B) アシル-CoA 混合物 (16:0-CoA、18:1-CoA、18:2-CoA、20:4-CoA) を用いて、野生型 mLPCAT2 (WT)、A115L、A115W、R177A mLPCAT2 変異体のリゾ-PAF アシルトランスフェラーゼ活性を測定した。基質選択性は、生成されたアルキル-PC の総量に対する各生成物の比率として求めた。エラーバーは、3 回の独立した実験の S.E.M を表す (それぞれ 3 ロット実施)。

Hamano F. et al. *FASEB J.* 2021 May 6; 35(6): e21501 より転載¹¹⁸。

を与えることが期待される。疎水ポケットに直接影響しないと考えられるコントロールとして R177A 変異体の基質選択性を調べた。アルギニン 177 は N 末ヘリックスモチーフの近くに存在し、膜と相互作用している可能性がある (Fig. 4-12A)。これらのタンパク質発現量には大きな違いはない (Fig. 4-7, 4-8)。アクセプター基質にリゾ PAF (C16)、ドナー基質に 16:0-、18:1-、18:2-と 20:4-CoA の 4 種類のアシル-CoA ミックスを用いると、生成物はアルキル PC (16:0/16:0、16:0/18:1、16:0/18:2、16:0/20:4) の 4 種類である。LC-MS を用いて各酵素が生成する 4 種類のアシル PC のピーク面積値を求め、それぞれベクターを導入した細胞のマイクロゾーム画分タンパク質のバックグラウンドシグナルを差し引いたのち、面積値の総和を 100%とした。各変異体の基質選択性はアルキル PC の総面積値に対する各生成物の比率として求めた (Fig. 4-12B、Table 4-4)。野生型と比較し、A115L 変異体は 16:0-CoA の選択性が低下し、A115W 変異体は 20:4-CoA の選択性が低下していた。一方 R177A 変異体の基質選択性は野生型 (WT) と比べてほとんど変化が見られなかった。これらの結果からアラニン 115 の位置のアミノ酸がアシル CoA の選択性に影響を与えている可能性が示唆された。

4-3-4 mLPCAT2-アシル CoA 結合モデル

ホモロジーモデリングの結果、tmPlsC と同様に活性中心 (H-X-X-X-X-D) を含む疎水性ポケットを酵素の中心に配置しうることが明らかとなり、同時に N 末に 2 本の α ヘリックス構造も存在することが予測された (Fig. 4-4C)。また点変異解析によって明らかとなった LPCAT2 活性に大きく関与している AGPAT モチーフが、疎水性ポケットの周囲に位置すると予測された。さらに、ドナー基質のアシル鎖の選択性に影響を与えるアラニン 115 は疎水性ポケットの底部に存在すると考えられた。これらの結果より、tmPlsC と同様に、mLPCAT2 は膜の片側のリーフレットに埋まるように局在し、酵素中心の疎水性ポケットにドナー基質であるアシル-CoA が収まると考えられ、Fig. 4-13 の結合モデルを作成した。Fig. 4-13 に

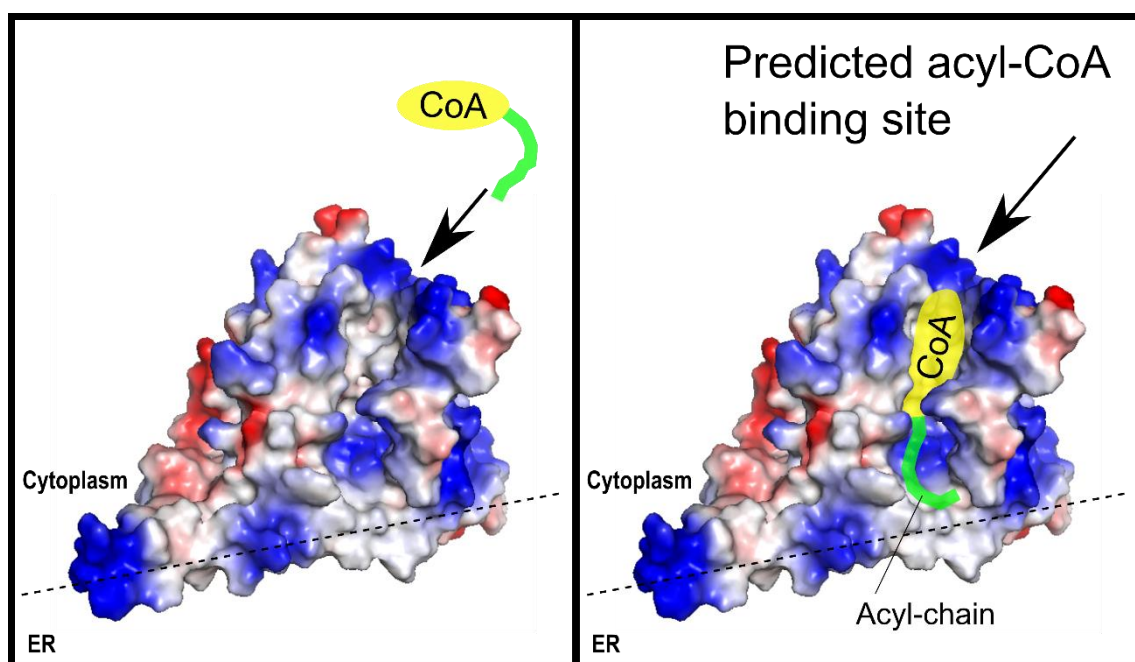


Fig. 4-13 mLPCAT2 のアシル-CoA 結合モデル

アシル-CoA のアシル鎖を緑色、CoA 部分を黄色で示した。黒の破線は、予測される膜の位置を示す。表面電荷モデルでは、赤が負電荷、青が正電荷、白が中性・疎水性の領域を表す。アシル-CoA は、細胞質からリクルートされると考えられている。アシル-CoA のアシル基は疎水性ポケットに収まり、負電荷のリン酸基を含む CoA 部分は疎水性ポケットの細胞質側入り口の正電荷近くに位置すると予測した。

Hamano F. et al. *FASEB J.* 2021 May 6; 35(6): e21501 より転載¹¹⁸。

において、アシル-CoA のアシル鎖は緑色に、CoA は黄色で示している。黒の破線は予測される膜の位置を示している。mLPCAT2 の構造は表面電荷を色で表し、赤が負電荷、青が正電荷、白が中性・疎水性を表している。アシル-CoA のアシル鎖は疎水性ポケットに収まり、負電荷のリン酸基を含む CoA 部分は疎水性ポケットの細胞質側入り口の正電荷近くに位置することになる。またその場合、アシル鎖と CoA を繋ぐチオエステル結合部分が mLPCAT2 の活性中心 (H-X-X-X-X-D) の近傍に存在することができるため、酵素反応を触媒する際に都合が良いと考えられる。

4-4. 考察

tmPlsC を鋳型としたホモロジーモデリングに基づいて、mLPCAT2 と mLPCAT1 の構造を予測することが出来た。その結果、mLPCAT1 と mLPCAT2 は、細胞膜の片側のリーフレットに埋まることが知られている 2 つの N 末 α ヘリックスを持つことが予測された。また点変異導入により、mLPCAT2 の 4 つの AGPAT モチーフが mLPCAT2 の活性に重要であること、また基質選択性に影響を及ぼすアミノ酸残基の存在も明らかとなり、アシル-CoA 結合ポケットの存在が示唆された。mLPCAT2 の 4 つの AGPAT モチーフがアシル-CoA 結合ポケットの周辺に位置していることも予測された。ホモロジーモデリングおよび点変異体解析より得た知見は、現在進行中の LPCAT2 阻害剤開発に貢献できるものと思われる。

PDB に登録されているタンパク質のアミノ酸配列から、シトクロム C 酸化酵素サブユニット II¹²⁰ やカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 2¹²¹ など、いくつかの酵素がモノトピックな膜タンパク質であると予測されている。これらの酵素は、リン脂質二重膜内または細胞質中に存在する両親媒性の基質と反応すると考えられている¹²²。mLPCAT1 と mLPCAT2 のホモロジーモデリングの結果から、これらの酵素もモノトピックな膜タンパク質であることを示唆しており、過去の報告と一致していた⁵⁰。mLPCAT2 のドナー基質は、両親媒性分子であるアシル CoA や親水性分子であるアセチル CoA (2:0-CoA) である。一方アクセプター基質であるリゾ PAF (LPC) は膜中に存在する。mLPCAT2 のモノトピックな構造は、親水性、両親媒性、疎水性という異なる物性を持つ複数の物質を基質とする際に有益であると考えられる。

tmPlsC と同様に、mLPCAT2 および mLPCAT1 の表面電荷をみると (Fig. 4-10A)、細胞質側の疎水性ポケットの入り口周辺が青く、正電荷を持つアミノ酸が局在していることが示唆された。点変異導入によりこれらの正電荷アミノ酸であるアルギニン 189、アルギニン 195

トリジン 196、トリジン 233 をアラニンに置換すると、それぞれ mLPCAT2 のリゾ PAF アセチル基転移活性、リゾ PAF アシル基転移活性ともに低下することから、この部分の正電荷が活性に重要であることが示唆された。基質となるアセチル CoA とアシル CoA の CoA に含まれる負電荷のリン酸基部分との相互作用に重要であると考えている。またアルギニン 180 とアルギニン 177 は、モチーフ 2 に属するアミノ酸であるが、ホモロジーモデリングにより膜近傍の酵素表面に存在していることが予測された。この 2 つのアルギニンをアラニンに置換した R180A と R177A の活性を見ると、リゾ PAF アセチル基転移活性は野生型の半分以下に、リゾ PAF アシル基転移活性も野生型の半分程度に落ちていた。この二つのアルギニンは活性中心 (H-X-X-X-X-D) からやや遠いため、活性中心を含む疎水性ポケットの環境に影響を与えたというよりは酵素表面の電荷を失わせたことで酵素活性に影響を与えたとも考えられる。アルギニン 177 を負電荷のグルタミン酸置換した R177E が 2 つの活性を失ったことからこの部位における正電荷が酵素活性に重要であることを示唆している。アルギニン 180 とアルギニン 177 の正電荷は膜の近傍であることから、酵素と膜の相互作用に関与している可能性と基質であるアシル CoA が膜の近くからアクセスしてきた際にガイド役として機能している可能性も考えられる。Fig. 4-13 のモデルではアシル CoA が細胞質から LPCAT2 にアクセスしているように表現したが、実際にアシル CoA がどうやって LPCAT2 に入ってくるのかは未解明のままである。アシル CoA の臨界ミセル濃度 (Critical Micelle Concentration: CMC) は 10 μ M 以上であり¹²³、Bligh & Dyer 脂質抽出法では条件にもよるが有機層ではなく水層に分画されることから¹²⁴、アシル CoA が単独で細胞質に存在することは可能だと考えられる。その場合、疎水性ポケット入り口周辺の正電荷と CoA に含まれるリン酸基の負電荷が酵素と基質の相互作用に重要になると考えられる。またアシル CoA は疎水性のアシル鎖と親水性の CoA 部位を持つ両親媒性の物質であるため、細胞内では ER 膜などにアシル鎖を挿し、CoA 部分を細胞質側に出した状態にいることも可能である。既に同定されているアシル CoA 結合タンパク質¹²⁵などに結合した状態にいることもあ

り得る。膜近くから近づくアシル CoA はアルギニン 177 や 180 の膜近くの正電荷アミノ酸と CoA のリン酸基の相互作用をガイドに LPCAT2 の疎水性ポケットに侵入することも考えられる。アシル CoA は脂肪酸がアシル CoA 合成酵素により代謝のために活性化された物質である¹²⁶。このアシル CoA 合成酵素により活性されたアシル CoA が直接 LPCAT2 に引き渡される仕組みが存在する可能性もあり得る。今後、蛍光色素標識されたアシル CoA を用いるなどして、細胞内において産生されたアシル CoA がどのように LPCAT2 にアクセスしうるかの研究が必要である。

点変異体解析により、モチーフ内のアミノ酸であっても、活性中心に近い位置の変異ほど LPCAT2 の活性を低下させやすいことが分かった。また A115L 及び A115W の変異により、ドナー基質のアシル基の基質特異性が変化することが分かった。ホモロジーモデリングにより、このアラニン 115 は酵素中心に存在する疎水性ポケットの底で、N 末ヘリックスモチーフ内に存在すると予測された。tmPlsC の結晶解析論文では、tmPlsC の疎水性ポケットの長さがドナー基質のアシル基選択性を決定すると報告していた¹⁷。アラニンを側鎖の長いロイシンや、大きな側鎖を持つトリプトファンに置換することで LPCAT2 の疎水性ポケットのサイズが小さくなり 20:4-CoA よりも炭素鎖の短いアシル鎖を好むようになると予想して行ったが、A115L では逆に 16:0-CoA を選択する割合が野生型よりも低下した。A115W では予想通りに 20:4-CoA への選択率が低下し、16:0-CoA や 18:1-CoA を選択するようになった。アラニン 115 をロイシンやトリプトファンに置換することで単純に疎水性ポケットのサイズが変化したわけではなく、2 本の α ヘリックスの間隔が広がるなど疎水性ポケット全体の環境を変化させた可能性もある。疎水性ポケットの環境によって、基質選択性が変化することが明らかになったと言える。今後、正確に基質特異性を比較するには、セルフリースシステムなどを用いて精製酵素を準備し、 K_m や V_{max} を算出する必要がある。

また LPCAT1 のループ配列を LPCAT2 のループ配列に入れた変異体ではリゾ PAF アシル

転移活性とリゾ PAF アセチル活性をともに失った。このループ配列は LPCAT1 と LPCAT2 で非常によく保存されており、活性を失うことは予想外であった。このループはモチーフ 4 に続く配列で、モデリングによると疎水性ポケットを支えるような位置にある。微妙な環境の変化によって活性を失うことから、それぞれの酵素にとって最適の構造が厳密に制御されていると考えられる。

mLPCAT1 は mLPCAT2 と同様にリゾ PAF アセチル基転移活性とリゾ PAF アシル基転移活性を持つ酵素である。mLPCAT1 も AGPAT ファミリーに属し、4 つの AGPAT モチーフを有し、点変異による活性への影響は既に報告されている¹³。mLPCAT1 についても tmPlsC を鋳型にホモロジーモデリングを行った。mLPCAT1 についても酵素の中央に疎水性ポケットが存在し、その周辺に AGPAT モチーフが存在していた (Fig. 4-4C)。AGPAT ファミリーの高度に保存されたモチーフは、アシル-CoA 結合に重要な領域である。

ドナー基質であるアシル-CoA との結合について構想予測を行ったが、アクセプター基質であるリゾ PAF と相互作用を示す部位についても今後さらなる研究が必要だと考えている。リゾ PAF は生体膜内に存在するため、N 末ヘリックスモチーフがリゾ PAF との反応に重要な役割を果たしている可能性がある。

以上、mLPCAT2 の構造予測および基質認識様式を初めて提示することが出来た。mLPCAT2 の生化学的特性を理解するうえで重要な知見である。しかし今回提示した構造予測は tmPlsC と相同性を持つ活性ドメインのみである。mLPCAT2 は細胞外からの刺激に反応してリン酸化され、活性化されるため、セリン 34 を含む mLPCAT2 の全長構造を明らかにすることは、炎症下での PAF 生合成機構を理解するうえで重要である。今後、セリン 34 に加え、C 末のカルシウム依存性を示す EF ハンド領域も含めて、mLPCAT2 の立体構造をさらに研究する必要がある。

4-5. まとめ

mLPCAT2 のアシル-CoA 結合様式をホモロジーモデリングと点変異解析により構造予測を行った。その結果、活性中心 (H-X-X-X-X-D) を含む疎水性ポケットを酵素の中心に配置しうることが明らかとなり、4つの AGPAT モチーフがこのポケット周辺に位置しすることが分かった。また同時に tmPlsC と同様に N 末に 2 本の α ヘリックス構造も存在することが予測された (Fig. 4-4C)。ドナー基質のアシル-CoA のアシル基は Fig. 4-13 のように疎水性ポケットに収まることで、アシル鎖のチオエステル結合部分が活性中心の近傍に存在することが可能と考えられた。またアシル鎖の特異性は疎水性ポケットの環境によって変化することも明らかとなった。リゾリン脂質アシル転移酵素ファミリーに存在するアシル-CoA 結合ポケット (疎水性ポケット) の環境の多様性がリン脂質の多様性が生み出す要因の 1 つであると考えられる。

リン脂質合成酵素であると同時に PAF 生合成酵素である mLPCAT2 の構造を解明することで、PAF 生合成メカニズムの解析や神経障害性疼痛、炎症、アレルギー、アナフィラキシーなど PAF に関連する疾患を克服する医薬品の開発への貢献が期待できる。

Table 4-1: mLPCAT2 変異体作成に用いたプライマー配列

Mutant	Forward primer	Reverse primer
H146 A	CGTCGCTCCTGCTTCCACGTTCTTCGA CGG	CGTGGAAGCAGGAGCGACGACAAAAA TGGGCGC
D151 A	GGTTCTTCGCCGGAATTGCC	AATTCCGGCGAAGAACGTGG
G176 A	CTGGTTGCCAGACTGTTACGG	CAGTCTGGCAACCAGAGGGG
R177 A	CTGGTTGGCGCACTGTTACGGGCTTTG CAGC	CCGTAACAGTGCGCCAACCAGAGGGG TCTG
R177 E	TCTGGTTGGCGAACTGTTACGGGCTTT GCAG	CCCGTAACAGTTCGCCAACCAGAGGG GTCTG
R180 A	GGCAGACTGTTAGCGGCTTTGCAGCC	GGCTGCAAAGCCGCTAACAGTCTGCC
L186 A	CAGCCAGTTGCGGTATCCCG	GGGATACCGCAACTGGCTGC
V187 A	GCCAGTTTTGGCATCCCGTG	CACGGGATGCCAAAAGTGGC
R189 A	TTGGTATCCGCTGTTGACCC	AACAGCGGATACCAAAAGTGG
R195 A+K 196A	CCCTGACTCCGCAGCAAACACAATCA ATGAAATCAAAAAG	GATTGTGTTTGCTGCGGAGTCAGGGTC AACACG
P219 A	CTAGTTTTTCGCAGAAGGTAC	GTACCTTCTGCGAAAAGTAG
E220 A	TTCCCAGCAGGTACTTGTAC	AGTACCTGCTGGGAAAAGTAG
G221 A	CCCAGAAGCTACTTGTACTA	TAGTACAAGTAGCTTCTGGG
C223 A	CAGAAGGTACTGCTACTAATC	GATTAGTAGCAGTACCTTCTG
K233 A	GATTACTTTTGCACCAGGAGCCTTCAT CCC	GGCTCCTGGTGCAAAAGTAATCAAAC AGGAGCG

P242 A	CCAGGAGTTGCAGTGCAGCCCGTCCTC CTC	GGCTGCACTGCAACTCCTGGGATGAAG GC
P245 A	CAGTGCAGGCAGTCCTCCTCAGATACC CAAAC	GAGGAGGACTGCCTGCACTGGAACTC CTGG
S87D	GCTGTCATTGACACAGCATGCTGTCCT G	GCATGCTGTGTCAATGACAGCAAATGG CC
S87E	GCTGTCATTGAAACAGCATGCTGTCCT G	GCATGCTGTTTCAATGACAGCAAATGG CC
K94A	CTGTCCTGAAGCGCTGACCCATCCAAT AAGC	GGGTCAGCGCTTCAGGACAGCATGCTG TTG
R104 A+K 105A	CAATTGGAGGGCGGCGATCACTCGGC CCGCTTTG	GCCGAGTGATCGCCGCCCTCCAATTGC TTATTGG
A115 W	GACATTTCTGTGGCGTGCCATGTTCTT CTCC	CATGGCACGCCACAGAAATGTCAAAG CGGG
A115 L	GACATTTCTGCTGCGTGCCATGTTCTT CTCC	CATGGCACGCAGCAGAAATGTCAAAG CGGG
loop excha nge	CCTGGAGCGTTGAAAATCCTGTGGCTC ACTCTGTGCCAGTTTCAAAACCAAGTG GAGATTGAGTTTATGCC	TTGGTTTTGAAACTGGCACAGAGTGAG CCACAGGATTTTCAACGCTCCAGGTTG CCAGGTCCAGGTCACAG

Table 4-2: LC-MS/MS を用いた LPCAT2 活性測定条件

Objective	Analyte	Q1	Q3	Polarity	Collision Energy
Measurement of LysoPAF-2:0-CoA assay	LPC 17:0	510.4	184.1	positive	30
	PAF (deuterated)Standard	528.4	184.1	positive	30
Measurement of LysoPAF-20:4- CoA assay	DMPC	738.5	227.2	negative	35
	Alkyl 36:4PC (deuterated)	832.6	303.2	negative	35
	Alkyl 36:4PC (standard)	828.6	303.2	negative	35
Measurement of LysoPAF-acyl- CoA mix assay	DMPC	678.5	184.05	positive	33
	Alkyl 32:0PC (deuterated)	724.6	184.05	positive	33
	Alkyl 34:1PC (deuterated)	750.6	184.05	positive	33
	Alkyl 34:2PC (deuterated)	748.6	184.05	positive	33
	Alkyl 36:4PC (deuterated)	772.6	184.05	positive	33

Table 4-3: LPCAT2 酵素活性データ (Fig. 4-6 参照)

2:0-CoA または 20:4-CoA を用いた LPCAT2 変異体の酵素活性を測定した。結果は 3 回の独立した実験の平均値と S.E. で表した。アッセイは、トランスフェクション実験によって分けられた 5 つのグループ (A、B、C、D、E) で行った。Table 3 のグループは、ウェスタンブロットのデータと同じである。これらのデータから、Fig. 4-6 の比活性を算出した。n.d. は、検出されなかったことを表す。

A)

Enzyme	2:0-CoA		20:4-CoA	
	Activity (nmol/min/mg)	S.E.	Activity (nmol/min/mg)	S.E.
Vector	0.06	0.01	n.d.	
WT	69.62	6.67	23.08	2.36
H146A	0.15	0.02	n.d.	
D151A	0.08	0.02	n.d.	
G176A	0.07	0.01	n.d.	
R180A	11.07	0.72	9.29	0.53
L186A	0.67	0.01	n.d.	
V187A	2.33	0.11	n.d.	
R189A	0.90	0.07	n.d.	
P219A	3.60	0.13	0.83	0.02
E220A	0.06	0.00	n.d.	
G221A	49.79	3.87	10.32	0.77

B)

Enzyme	2:0-CoA		20:4-CoA	
	Activity (nmol/min/mg)	S.E.	Activity (nmol/min/mg)	S.E.
Vector	0.20	0.01	0.18	0.05
WT	143.51	10.01	66.94	0.64
C223A	2.93	0.23	0.85	0.06

C)

	2:0-CoA		20:4-CoA	
Enzyme	Activity (nmol/min/mg)	S.E.	Activity (nmol/min/mg)	S.E.
Vector	0.06	0.00	n.d.	
WT	40.36	1.18	22.61	2.04
P242A	19.76	0.88	9.52	0.73
P245A	2.33	0.30	n.d.	

D)

	2:0-CoA		20:4-CoA	
Enzyme	Activity (nmol/min/mg)	S.E.	Activity (nmol/min/mg)	S.E.
Vector	0.10	0.01	n.d.	
WT	67.86	11.83	21.32	3.62
S87D	3.23	0.41	1.25	0.18
S87E	2.19	0.13	0.83	0.06
A115L	32.40	4.44	19.02	2.45
A115W	9.27	0.98	5.03	0.34
R177A	22.35	1.62	9.16	0.62
loop exchange	0.07	0.00	n.d.	

E)

	2:0-CoA		20:4-CoA	
Enzyme	Activity (nmol/min/mg)	S.E.	Activity (nmol/min/mg)	S.E.
Vector	0.14	0.00	n.d.	
WT	60.46	3.21	14.59	0.80
K94A	30.87	0.64	9.38	0.93
R104A/K105A	48.29	0.64	13.11	1.21
R177E	1.87	0.04	0.47	0.10
R195A/K196A	0.26	0.01	n.d.	
K233A	6.26	0.20	1.36	0.22

Table 4-4: 各生成物の内部標準に対する面積比 (Fig. 4-12B 参照)

mLPCAT2 の変異体 (Vector, WT, A115L, A115W, R177A) を用いて、16:0-CoA, 18:1-CoA, 18:2-CoA, 20:4-CoA に対する酵素活性を測定した。結果は 3 回の独立した実験の平均値と S.E. で表した。これらのデータから、Fig. 4-12B に示した比活性を算出した。

Enzyme	16:0-CoA		18:1-CoA		18:2-CoA		20:4-CoA	
	Area ratio (Product/ DMPC)	S.E.	Area ratio (Product/ DMPC)	S.E.	Area ratio (Product/ DMPC)	S.E.	Area ratio (Product/ DMPC)	S.E.
Vector	3.08	0.07	2.29	0.03	3.95	0.06	19.64	0.42
WT	98.41	24.23	83.95	20.73	67.24	15.94	115.78	26.08
A115L	78.63	13.26	109.53	18.58	88.06	15.29	118.97	17.87
A115W	54.42	5.03	51.28	5.84	39.74	4.13	45.98	2.99
R177A	55.58	3.94	47.87	4.28	40.50	3.05	62.09	4.12

第5章 総括

5-1. 総括

本研究ではリン脂質分子種多様性の意義と形成機構の解明を目指し、マウス組織における生体膜リン脂質組成解析、脂肪酸組成解析、および LPLAT による多様性形成メカニズムの理解のため、以下に示す 3 つの課題に取り組んだ。

(第 2 章) GC-FID を用いた LPLAT 欠損マウス組織の脂肪酸組成解析

(第 3 章) LC-MS を用いたマウス網膜のリン脂質分子種網羅的解析

(第 4 章) リゾリン脂質アシル基転移酵素 LPCAT2 の基質認識機構予測

生体膜リン脂質組成は、組織や細胞、細胞内オルガネラごとで異なり、様々な疾患においてリン脂質組成の破綻が報告されている。また生体膜のリン脂質は脂質メディエーターの代謝前駆体としても機能している。リン脂質組成の制御に関わるリゾリン脂質アシル基転移酵素が病態時のリン脂質組成の異常や生体機能異常を説明できる可能性がある。本研究で用いたリゾリン脂質アシル基転移酵素である LPCAT1、LPCAT2、LPCAT3、LPAAT3 における、疾患との関連および酵素欠損による生体機能異常の報告を第 1 章に示した。

第 2 章「GC-FID を用いた LPLAT 欠損マウス組織の脂肪酸組成解析」では、GC-FID 法による総脂質、リン脂質画分、および中性脂質画分の脂肪酸一斉定量法を新たに作成した (Hamano et al., *Bio-protocol* (2020))。これを用いて、各種 LPLAT 欠損マウス臓器を解析した。リゾホスファチジルコリンアシル基転移酵素 (LPCAT) 2 の発現臓器である脾臓において、遺伝子欠損によるリン脂質脂肪酸組成に違いは認められなかった。LPCAT3 を高発現する肝臓では、遺伝子欠損によりリン脂質中の C18:2n-6 (リノール酸)、C20:3n-6、C20:4n-6 (アラキドン酸)、C20:5n-3 (EPA) の有意な減少が認められた。LPAAT3 の主要な発現臓器の 1 つである精巣では、遺伝子欠損によりリン脂質中の C18:3n-3 (リノレン酸)、C20:5n-3、C22:5n-3、C22:6n-3 (DHA) が有意に減少していた。以上、GC-FID を用いた脂肪酸分析に

より、組織リン脂質組成に対する LPLAT の寄与を評価することができた。LPCAT3 と LPAAT3 欠損マウスで減少していた脂肪酸は、各組織において酵素の基質となっていると考えられた。

第3章「LC-MS を用いたマウス網膜の PC および PE の分子種網羅的解析」では、網膜の発達に伴うリン脂質組成変動を分子種ごとに調べるため、胎生 14 日から生後 8 週齢までのマウスの網膜を採取し、LC-MS を用いて PC およびホスファチジルエタノールアミン (PE) 分子種の網羅的解析を行った。網膜の発達過程に伴い PC と PE の総量は増加した。個々の分子種は異なる増減パターンを示し、極長鎖脂肪酸を持つリン脂質は、網膜の発達後期に急激な増加を示した。網膜細胞を CD73 発現に基づきセルソーターを用いて分画して解析したところ、CD73 陽性桿体視細胞と CD73 陰性網膜細胞では異なったリン脂質組成であることが分かった。CD73 陽性桿体視細胞に多く存在していた PC 38:6、PC 44:12、PC 46:12、PC 56:12 は、それぞれ DHA を含む構造異性体が主成分であった。次に、NaIO₃ 誘発網膜変性モデルを用いて網膜変性過程における経時的なリン脂質組成変化を測定した。その結果、視細胞外節部の形態障害が観察される前からリン脂質組成の変動が確認された。以上より、網膜におけるリン脂質組成が発達段階および病的状況に応じて変化すること、また網膜細胞の系統によってもリン脂質組成が異なることが分かった(Hamano et al., *J Biol Chem* (2021))。

第4章「リゾリン脂質アシル基転移酵素 LPCAT2 の基質認識機構予測」では、AGPAT ファミリーに属する LPLAT の 1 つである LPCAT2 の基質認識機構予測を行った。LPCAT2 はリゾリン脂質に対しアシル基転移活性とアセチル基転移活性を持つ。LPCAT2 のアセチル基転移活性により生成される血小板活性化因子 (PAF) は炎症・アレルギー・神経障害性疼痛を引き起こすリン脂質メディエーターである。LPCAT2 の構造理解は阻害剤開発にも有益な情報となる。しかし一般的に膜タンパク質の構造解析は難しい。近年 AGPAT ファミリーの 1 つで、好熱菌 *Thermotoga.maritima* の LPAAT である PlsC の結晶構造が報告された。LPCAT2 構造予測のため、PlsC 構造を鋳型とした LPCAT2 のホモロジーモデリングを行った。LPCAT2

には PlsC と同様に、アシル CoA が作用する疎水性ポケットと生体膜局在のための N 末の 2 本の α ヘリックスが存在すると予測された。活性に重要なアミノ酸の同定のために、LPCAT2 のアラニン点変異体を作製した。酵素活性解析から、疎水性ポケット内の活性中心とその近くに位置するアミノ酸の変異体はほぼ活性を失うことが分かった。また疎水性ポケットの底に位置するアラニンをロイシンまたはトリプトファンに置換することによりアシル CoA の基質選択性に影響が見られた。以上の結果から、LPCAT2 はアシル CoA が結合する疎水性ポケットを有し、その疎水性ポケットがアシル基選択性に寄与していることが示唆された(Hamano et al., *FASEB J.* (2021))。

以上、本研究では、GC-FID による生体内脂肪酸一斉定量法を作成し、LPLAT の生体膜脂脂肪酸組成への寄与を評価する系を確立した。網膜の発生および網膜変性におけるリン脂質組成の動的変化と、網膜細胞の系統の違いによるリン脂質組成の違いを LC-MS とセルソーターを組み合わせることにより明らかにした。また、ホモロジーモデリングと点変異解析により、LPCAT2 の基質認識様式を予測することができた。

第 2 章、第 3 章を通じて、生体膜が組織ごと細胞ごとに多様なリン脂質組成をもち、その制御にリゾリン脂質アシル基転移酵素が関与することを示した。リゾリン脂質アシル基転移酵素は広範囲に基質認識をすることが酵素活性解析より知られているが、生体内で 1 つの酵素を欠損させると、特定のリン脂質分子種を減少させ、組織におけるリン脂質組成を変化させることがわかった。これまで報告されたリゾリン脂質アシル基転移酵素欠損マウスの組織形態異常や疾患時のリン脂質組成異常から、組織、細胞、タンパク質が正常に機能するためには、それぞれの場に必須なリン脂質組成があると考えられた。生体機能に必要なリン脂質組成は発生段階や細胞の状態などによっても変化するもので、時と場によって異なり、リゾリン脂質アシル基転移酵素を含むリン脂質合成・代謝関連酵素の発現パターンや基質供給により制御されることが考えられる。本研究ではマウスの脾臓、肝臓、精巣、網膜および

網膜細胞分画におけるリン脂質解析を行った。生体内では脂質は血液やリンパ液を介して体中をめぐり、細胞間、組織間をつなぎ、他組織のリン脂質組成にも影響を及ぼすと考えられている。生体機能に必要なリン脂質組成形成機構解明に、組織間ネットワークについても考慮に入れる必要がある。組織間ネットワークを研究するには、安定同位体や蛍光などで標識した脂質の動態を調べていく方法がある。既に安定同位体標識脂肪酸のヒトの体内における動きや代謝について調べられ¹²⁷、また最近ではレポーター分子（ルシフェリン）や蛍光で標識した脂肪酸を用いて、実験動物に対し非侵襲的にリアルタイムで時空間定量ができる報告もある^{128,129}。今後、新しい技術によって、包括的に生体内での脂質の動態および代謝の情報が得られれば、リン脂質組成形成機構解明だけでなく、脂質関連疾患のメカニズム解明や治療法開発にもつながる可能性がある。また一方で、生体膜リン脂質組成と生体機能の関連性の理解には、膜物性の理解も必要である。リポソームなどのリン脂質組成を操作した膜を作製し、膜の物性解析および脂質とタンパク質との相互作用解析を行うことも重要と考えている。

5-2. 今後の課題と展望

第2章及び第3章の脂質分析について

生体膜リン脂質分子種多様性の意義を理解するにはリポミクスの網羅性を高めることが重要となる。本研究において用いた脂肪酸測定およびリン脂質組成解析では、不飽和脂肪酸が酸化されて出来る過酸化脂肪酸（脂質）やエポキシ化脂肪酸（脂質）は検出対象になっていないため、今後新たな分析系を立ち上げる必要がある。また未同定の脂質検出のためのノンターゲットリポミクス解析や極微量成分の検出を可能にする分析技術の向上も重要である。

リン脂質分子種多様性の形成機構解明に向けて、生体内での脂質の動態、組織間ネットワークの情報を得ていくことは重要なアプローチの1つである。そのために用いる安定同位

体標識や蛍光標識の脂肪酸（脂質）や非天然型の脂質ホモログを用いた観察も有益になる。

新たな脂肪酸（脂質）の測定系の確立も今後必要と考えている。

第4章 リゾリン脂質アシル基転移酵素 LPCAT2 の基質認識機構予測について

LPCAT2 にはモデリングを行えなかった C 末ドメインが存在している。この C 末ドメインは好熱菌 PlsC には存在しない部分であり、EF ハンドや ER 局在配列を含んでいる。LPCAT2 はカルシウム要求性であることから、この C 末ドメインが活性制御に関与していると考えられる。LPCAT2 の全長の構造を知ることはリゾリン脂質アシル基転移酵素の反応メカニズムを理解するうえで重要である。また、活性化に必要なリン酸化部位 Ser34 も含めた構造解析が、LPCAT2 の活性調節を理解する上でも有益な情報になる。今後、結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析を進め、LPCAT2 の立体構造理解、さらには分子動力学シミュレーションや蛍光標識分子などを用いて生体膜上での LPCAT2 の動きや反応メカニズム理解を深めたい。

生体膜が組織ごと細胞ごと、また発達段階ごとにおいて多様なリン脂質組成をもち、その組成決定にリゾリン脂質アシル基転移酵素の寄与が明らかとなった。今後、生体膜の役割である、膜タンパク質の存在する場や、内と外の区切り、および生理活性物質前駆体におけるリン脂質分子種多様性の意義が明らかにされれば、脂質関連疾患にのみならず、これまで脂質との関連性を考えられてこなかった疾患に対しても新たな治療などへの応用が期待できる。

謝辞

本研究に行うに際し、総括的なご指導とご鞭撻を賜りました清水 孝雄 東京大学名誉教授（国立国際医療研究センタープロジェクト長）に深甚なる感謝の意を表します。第 2 章 GCFID による脂肪酸解析および本研究全体について多大なるご協力と幅広く深いご指導を賜りました北 芳博 東京大学医学部准教授に深く感謝申し上げます。第 3 章マウス網膜リン脂質解析につきましては渡辺 すみ子東京大学特任教授に全面的なご協力とご指導を賜り、心より感謝申し上げます。第 4 章 LPCAT2 構造予測および本研究全体について、多大なるご協力と細部にわたるご指導、また多くの議論、励ましを頂いた進藤 英雄 東京大学連携准教授（国立国際医療研究センター副プロジェクト長）に深く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、国立国際医療研究センター脂質シグナリングプロジェクト、東京大学大学院医学系研究科リピドミクス社会連携講座およびライフサイエンス研究機器支援室の現メンバーおよび OB、OG の皆様よりご支援、ご協力とご助言を賜りました。心より御礼申し上げます。

また長年の夢であった母校である東京工業大学での博士(工学)取得に際し、快くお引き受けいただき、温かくご指導いただきました恩師である和地 正明 東京工業大学教授に心より感謝申し上げます。東京工業大学教授 小島 英理博士、柳田 保子博士、また東京工業大学准教授 八波 利恵博士、平沢 敬博士には、本論文をご精読いただき、誠に有難く、厚く御礼申し上げます。

研究の楽しさをはじめに教えていただき、そして再度、研究に戻る道を作ってくださった東京工業大学名誉教授 永井 和夫博士と万有製薬つくば研究所所長でおられた元筑波大学監事 西村 暹博士に、この場を借りて深く御礼申し上げます。

最後に、長きにわたり私を支えてくれた両親に心からの感謝を表します。また長男凌平と長女晴加には沢山の応援をもらいました。私の心の支えである子供たちに深い感謝を伝えたいと思います。

参考文献

1. 中川靖一. 新生化学実験講座 4 脂質 II リン脂質/日本生化学会編. 1992.
2. Valentine WJ, Hashidate-Yoshida T, Yamamoto S, Shindou H. *Biosynthetic Enzymes of Membrane Glycerophospholipid Diversity as Therapeutic Targets for Drug Development*. Vol 1274. Advances in experimental medicine and biology; 2020.
<http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-50621-6>.
3. Harayama T, Riezman H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(5):281-296. doi:10.1038/nrm.2017.138
4. KENNEDY EP, WEISS SB. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem*. 1956;222(1):193-214. doi:10.1016/s0021-9258(19)50785-2
5. Lands WE. Metabolism of glycerolipides; a comparison of lecithin and triglyceride synthesis. *J Biol Chem*. 1958;231:883-888.
6. Shindou H, Koso H, Sasaki J, et al. Docosahexaenoic acid preserves visual function by maintaining correct disc morphology in retinal photoreceptor cells. *J Biol Chem*. 2017;292(29):12054-12064. doi:10.1074/jbc.M117.790568
7. Iizuka-Hishikawa Y, Hishikawa D, Sasaki J, et al. Lysophosphatidic acid acyltransferase 3 tunes the membrane status of germ cells by incorporating docosahexaenoic acid during spermatogenesis. *J Biol Chem*. 2017;292(29):12065-12076. doi:10.1074/jbc.M117.791277
8. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, et al. A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res*. 2005;46(5):839-861. doi:10.1194/jlr.E400004-JLR200
9. Liebisch G, Fahy E, Aoki J, et al. Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *J Lipid Res*. 2020;61(12):1539-1555.
doi:10.1194/jlr.S120001025
10. Kita Y, Shindou H, Shimizu T. Cytosolic phospholipase A 2 and lysophospholipid

- acyltransferases. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2019;1864(6):838-845.
doi:10.1016/j.bbalip.2018.08.006
11. Murakami M, Sato H, Taketomi Y. Updating Phospholipase A2 Biology. *Biomolecules*. 2020;10(1457):1-32. doi:10.1007/978-4-431-55669-5_2
 12. Yamashita A, Hayashi Y, Nemoto-Sasaki Y, et al. Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. *Prog Lipid Res*. 2014;53(1):18-81.
doi:10.1016/j.plipres.2013.10.001
 13. Harayama T, Shindou H, Ogasawara R, Suwabe A, Shimizu T. Identification of a novel noninflammatory biosynthetic pathway of platelet-activating factor. *J Biol Chem*. 2008;283(17):11097-11106. doi:10.1074/jbc.M708909200
 14. Lewin TM, Wang P, Coleman RA. Analysis of amino acid motifs diagnostic for the sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase reaction. *Biochemistry*. 1999;38(18):5764-5771.
doi:10.1021/bi982805d
 15. Dircks LK, Ke J, Sul HS. A conserved seven amino acid stretch important for murine mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. Significance of arginine 318 in catalysis. *J Biol Chem*. 1999;274(49):34728-34734. doi:10.1074/jbc.274.49.34728
 16. Yamashita A, Nakanishi H, Suzuki H, et al. Topology of acyltransferase motifs and substrate specificity and accessibility in 1-acyl-sn-glycero-3-phosphate acyltransferase 1. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2007;1771(9):1202-1215. doi:10.1016/j.bbalip.2007.07.002
 17. Robertson RM, Yao J, Gajewski S, et al. A two-helix motif positions the lysophosphatidic acid acyltransferase active site for catalysis within the membrane bilayer. *Nat Struct Mol Biol*. 2017;24(8):666-671. doi:10.1038/nsmb.3436
 18. Shindou H, Eto M, Morimoto R, Shimizu T. Identification of membrane O-acyltransferase family

- motifs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;383(3):320-325. doi:10.1016/j.bbrc.2009.04.013
19. Hofmann K. A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for Wnt signaling. *Trends Biochem Sci*. 2000;25(3):111-112. doi:10.1016/S0968-0004(99)01539-X
 20. Qian H, Zhao X, Yan R, et al. Structural basis for catalysis and substrate specificity of human ACAT1. *Nature*. 2020;581(7808):333-338. doi:10.1038/s41586-020-2290-0
 21. Wang L, Qian H, Nian Y, et al. Structure and mechanism of human diacylglycerol O-acyltransferase-1. *Nature*. 2020;581(7808):329-332. doi:10.1038/s41586-020-2280-2. Structure
 22. Sui X, Kun Wang, Nina L. Gluchowski, et al. Structure and catalytic mechanism of a human triglyceride synthesis enzyme. *Nature*. 2020;581(7808):323-328. doi:10.1038/s41586-020-2289-6. Structure
 23. Albesa-Jové D, Svetlíková Z, Tersa M, et al. Structural basis for selective recognition of acyl chains by the membrane-associated acyltransferase PatA. *Nat Commun*. 2016;7. doi:10.1038/ncomms10906
 24. Singer SJ, Nicolson GL. The Fluid Mosaic of the Structure of Cell Membrane. *Science (80-)*. 1972;175:720-731.
 25. Rawicz W, Olbrich KC, McIntosh T, Needham D, Evans EA. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys J*. 2000;79(1):328-339. doi:10.1016/S0006-3495(00)76295-3
 26. Sharpe HJ, Stevens TJ, Munro S. A Comprehensive Comparison of Transmembrane Domains Reveals Organelle-Specific Properties. *Cell*. 2010;142(1):158-169. doi:10.1016/j.cell.2010.05.037
 27. Olbrich K, Rawicz W, Needham D, Evans E. Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Biophys J*. 2000;79(1):321-327. doi:10.1016/S0006-3495(00)76294-1
 28. Pinot M, Vanni S, Pagnotta S, et al. Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane

- deformation and fission by endocytic proteins. *Science* (80-). 2014;345(6197):693-697.
doi:10.1126/science.1255288
29. Hishikawa D, Valentine WJ, Iizuka-Hishikawa Y, Shindou H, Shimizu T. Metabolism and functions of docosahexaenoic acid-containing membrane glycerophospholipids. *FEBS Lett.* 2017;591(18):2730-2744. doi:10.1002/1873-3468.12825
 30. Antonny B, Vanni S, Shindou H, Ferreira T. From zero to six double bonds: Phospholipid unsaturation and organelle function. *Trends Cell Biol.* 2015;25(7):427-436.
doi:10.1016/j.tcb.2015.03.004
 31. Shimizu T. Lipid mediators in health and disease: Enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2009;49:123-150. doi:10.1146/annurev.pharmtox.011008.145616
 32. Shindou H, Hishikawa D, Nakanishi H, et al. A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells: Cloning and characterization of acetyl-CoA:lyso-PAF acetyltransferase. *J Biol Chem.* 2007;282(9):6532-6539.
doi:10.1074/jbc.M609641200
 33. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature.* 2014;510(7503):92-101. doi:10.1038/nature13479
 34. Dennis EA and PCN. Eicosanoid Storm in Infection and Inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015;11(8):511-523. doi:10.1038/nri3859.Eicosanoid
 35. Veldhuizen EJA, Haagsman HP. Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2000;1467(2):255-270.
doi:10.1016/S0005-2736(00)00256-X
 36. Floras J, Kala P. Surfactant proteins: Molecular genetics of neonatal pulmonary diseases. *Annu Rev Physiol.* 1998;60(1):365-384. doi:10.1146/annurev.physiol.60.1.365

37. Kallapur S, Ikegami M. The surfactants. *Am J Perinatol*. 2000;17(7):335-343. doi:10.1055/s-2000-13445
38. Nakanishi H, Shindou H, Hishikawa D, et al. Cloning and characterization of mouse lung-type acyl-CoA: lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAt1): Expression in alveolar type II cells and possible involvement in surfactant production. *J Biol Chem*. 2006;281(29):20140-20147. doi:10.1074/jbc.M600225200
39. Chen X, Hyatt BA, Mucenski ML, Mason RJ, Shannon JM. Identification and characterization of a lysophosphatidylcholine acyltransferase in alveolar II cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(31):11724-11729. doi:10.1073/pnas.0604946103
40. Harayama T, Shindou H, Shimizu T. Biosynthesis of phosphatidylcholine by human lysophosphatidylcholine acyltransferase 1. *J Lipid Res*. 2009;50(9):1824-1831. doi:10.1194/jlr.M800500-JLR200
41. Harayama T, Eto M, Shindou H, et al. Lysophospholipid acyltransferases mediate phosphatidylcholine diversification to achieve the physical properties required in vivo. *Cell Metab*. 2014;20(2):295-305. doi:10.1016/j.cmet.2014.05.019
42. Bridges JP, Ikegami M, Brilli LL, Chen X, Mason RJ, Shannon JM. LPCAT1 regulates surfactant phospholipid synthesis and is required for transitioning to air breathing in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(5):1736-1748. doi:10.1172/JCI38061
43. Morita Y, Sakaguchi T, Ikegami K, et al. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 altered phospholipid composition and regulated hepatoma progression. *J Hepatol*. 2013;59(2):292-299. doi:10.1016/j.jhep.2013.02.030
44. Uehara T, Kikuchi H, Miyazaki S, et al. Overexpression of Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 1 and Concomitant Lipid Alterations in Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2016;23:206-213. doi:10.1245/s10434-015-4459-6

45. Bi J, Ichu TA, Zanca C, et al. Oncogene Amplification in Growth Factor Signaling Pathways Renders Cancers Dependent on Membrane Lipid Remodeling. *Cell Metab.* 2019;30(3):525-538.e8. doi:10.1016/j.cmet.2019.06.014
46. Morimoto R, Shindou H, Oda Y, Shimizu T. Phosphorylation of lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 at Ser 34 enhances platelet-activating factor production in endotoxin-stimulated macrophages. *J Biol Chem.* 2010;285(39):29857-29862. doi:10.1074/jbc.M110.147025
47. Morimoto R, Shindou H, Tarui M, Shimizu T. Rapid production of platelet-activating factor is induced by protein kinase C α -mediated phosphorylation of lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 protein. *J Biol Chem.* 2014;289(22):15566-15576. doi:10.1074/jbc.M114.558874
48. Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res.* 2000;39(1):41-82. doi:10.1016/S0163-7827(99)00016-8
49. Shindou H, Shiraishi S, Tokuoka SM, et al. Relief from neuropathic pain by blocking of the platelet-activating factor–pain loop. *FASEB J.* 2017;31(7):2973-2980. doi:10.1096/fj.201601183R
50. Moessinger C, Kuerschner L, Spandl J, Shevchenko A, Thiele C. Human lysophosphatidylcholine acyltransferases 1 and 2 are located in lipid droplets where they catalyze the formation of phosphatidylcholine. *J Biol Chem.* 2011;286(24):21330-21339. doi:10.1074/jbc.M110.202424
51. Cotte AK, Aires V, Fredon M, et al. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2-mediated lipid droplet production supports colorectal cancer chemoresistance. *Nat Commun.* 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-017-02732-5
52. Hishikawa D, Shindou H, Kobayashi S, Nakanishi H, Taguchi R, Shimizu T. Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(8):2830-2835. doi:10.1073/pnas.0712245105

53. Zhao Y, Chen YQ, Bonacci TM, et al. Identification and characterization of a major liver lysophosphatidylcholine acyltransferase. *J Biol Chem*. 2008;283(13):8258-8265.
doi:10.1074/jbc.M710422200
54. Hashidate-Yoshida T, Harayama T, Hishikawa D, et al. Fatty acyl-chain remodeling by LPCAT3 enriches arachidonate in phospholipid membranes and regulates triglyceride transport. *Elife*. 2015;2015(4):1-75. doi:10.7554/eLife.06328
55. Rong X, Wang B, Dunham MM, et al. Lpcat3-dependent production of arachidonoyl phospholipids is a key determinant of triglyceride secretion. *Elife*. 2015;2015(4):1-23.
doi:10.7554/eLife.06557
56. Wang B, Rong X, Palladino END, et al. Phospholipid Remodeling and Cholesterol Availability Regulate Intestinal Stemness and Tumorigenesis. *Cell Stem Cell*. 2018;22(2):206-220.e4.
doi:10.1016/j.stem.2017.12.017
57. Tanaka H, Zaima N, Sasaki T, et al. Lysophosphatidylcholine Acyltransferase-3 Expression Is Associated with Atherosclerosis Progression. *J Vasc Res*. 2017;54(4):200-208.
doi:10.1159/000473879
58. Ferrara PJ, Rong X, Maschek JA, et al. Lysophospholipid acylation modulates plasma membrane lipid organization and insulin sensitivity in skeletal muscle. *J Clin Invest*. 2021;131(8).
doi:10.1172/JCI135963
59. Yuki K, Shindou H, Hishikawa D, Shimizu T. Characterization of mouse lysophosphatidic acid acyltransferase 3: An enzyme with dual functions in the testis. *J Lipid Res*. 2009;50(5):860-869.
doi:10.1194/jlr.M800468-JLR200
60. Koeberle A, Shindou H, Harayama T, Yuki K, Shimizu T. Polyunsaturated fatty acids are incorporated into maturing male mouse germ cells by lysophosphatidic acid acyltransferase 3. *FASEB J*. 2011;26(1):169-180. doi:10.1096/fj.11-184879

61. Shindou H, Koso H, Sasaki J, et al. Docosahexaenoic acid preserves visual function by maintaining correct disc morphology in retinal photoreceptor cells. *J Biol Chem.* 2017;292(29):12054-12064. doi:10.1074/jbc.M117.790568
62. Hishikawa D, Hashidate T, Shimizu T, Shindou H. Diversity and function of membrane glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells. *J Lipid Res.* 2014;55(5):799-807. doi:10.1194/jlr.R046094
63. Nielsen TS, Jessen N, Jørgensen JOL, Møller N, Lund S. Dissecting adipose tissue lipolysis: Molecular regulation and implications for metabolic disease. *J Mol Endocrinol.* 2014;52(3). doi:10.1530/JME-13-0277
64. Hui DY, Howles PN. Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. *Semin Cell Dev Biol.* 2005;16(2):183-192. doi:10.1016/j.semcdb.2005.01.003
65. Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(2):112-124. doi:10.1038/nrm2330
66. Vorbeck ML, Mattick LR, Lee FA, Pederson CS. Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids for Gas-Liquid Chromatography: Quantitative Comparison of Methylation Techniques. *Anal Chem.* 1961;33(11):1512-1514. doi:10.1021/ac60179a019
67. Liu KS. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials. *J Am Oil Chem Soc.* 1994;71(11):1179-1187. doi:10.1007/BF02540534
68. Ichihara KN ich., Shibahara A, Yamamoto K, Nakayama T. An improved method for rapid analysis of the fatty acids of glycerolipids. *Lipids.* 1996;31(5):535-539. doi:10.1007/BF02522648
69. Ichihara K, Fukubayashi Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J Lipid Res.* 2010;51(3):635-640. doi:10.1194/jlr.D001065
70. Egberts J, Buiskool R. Isolation of the Acidic Phospholipid Phosphatidylglycerol from Pulmonary Surfactant by Sorbent Extraction Chromatography. 1988;34(1):163-164.

71. Bligh, E.G. and Dyer WJ. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. *Can J Biochem Physiol.* 1959;37(8).
72. Hamano F, Tokuoka S, Hashidate-Yoshida T, Shindou H, Shimizu T, Kita Y. Quantification of Fatty Acids in Mammalian Tissues by Gas Chromatography–Hydrogen Flame Ionization Detection. *Bio-Protocol.* 2020;10(9):1-17. doi:10.21769/bioprotoc.3613
73. Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res.* 2008;47(2):147-155. doi:10.1016/j.plipres.2007.12.004
74. Hishikawa D, Yanagida K, Nagata K, et al. Hepatic Levels of DHA-Containing Phospholipids Instruct SREBP1-Mediated Synthesis and Systemic Delivery of Polyunsaturated Fatty Acids. *iScience.* 2020;23(9):101495. doi:10.1016/j.isci.2020.101495
75. Marquardt T, Gruss P. Generating neuronal diversity in the retina: One for nearly all. *Trends Neurosci.* 2002;25(1):32-38. doi:10.1016/S0166-2236(00)02028-2
76. Swaroop A, Kim D, Forrest D. Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci.* 2010;11(8):563-576. doi:10.1038/nrn2880
77. Iwagawa T, Watanabe S. Molecular mechanisms of H3K27me3 and H3K4me3 in retinal development. *Neurosci Res.* 2019;138:43-48. doi:10.1016/j.neures.2018.09.010
78. Friedman JS, Chang B, Krauth DS, et al. Loss of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 leads to photoreceptor degeneration in rd11 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(35):15523-15528. doi:10.1073/pnas.1002897107
79. Shindou H, Shimizu T. Acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases. *J Biol Chem.* 2009;284(1):1-5. doi:10.1074/jbc.R800046200
80. SanGiovanni JP, Chew EY. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog Retin Eye Res.* 2005;24(1):87-138.

doi:10.1016/j.preteyeres.2004.06.002

81. Agbaga MP, Mandal NA, Anderson RE. Retinal very long-chain PUFAs: New insights from studies on ELOVL4 protein. *J Lipid Res.* 2010;51(7):1624-1642. doi:10.1194/jlr.R005025
82. Harayama T, Shimizu T. Roles of polyunsaturated fatty acids, from mediators to membranes. *J Lipid Res.* 2020;61(8):1150-1160. doi:10.1194/JLR.R120000800
83. Wu J, Cho E, Giovannucci EL, et al. Dietary Intakes of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid and Risk of Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology.* 2017;124(5):634-643. doi:10.1016/j.optha.2016.12.033
84. Tanna P, Strauss RW, Fujinami K, Michaelides M. Stargardt disease: Clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. *Br J Ophthalmol.* 2017;101(1):25-30. doi:10.1136/bjophthalmol-2016-308823
85. Zhang K, Kniazeva M, Han M, et al. A 5-bp deletion in ELOVL4 is associated with two related forms of autosomal dominant macular dystrophy. *Nat Genet.* 2001;27(1):89-93. doi:10.1038/83817
86. Deák F, Anderson RE, Fessler JL, Sherry DM. Novel Cellular Functions of Very Long Chain-Fatty Acids: Insight From ELOVL4 Mutations. *Front Cell Neurosci.* 2019;13(September). doi:10.3389/fncel.2019.00428
87. Scott BL, Racz E, Lolley RN, Bazan NG. Developing rod photoreceptors from normal and mutant Rd mouse retinas: Altered fatty acid composition early in development of the mutant. *J Neurosci Res.* 1988;20(2):202-211. doi:10.1002/jnr.490200209
88. van der Veen JN, Kennelly JP, Wan S, Vance JE, Vance DE, Jacobs RL. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2017;1859(9):1558-1572. doi:10.1016/j.bbamem.2017.04.006
89. Enzmann V, Row BW, Yamauchi Y, et al. Behavioral and anatomical abnormalities in a sodium

- iodate-induced model of retinal pigment epithelium degeneration. *Exp Eye Res.* 2006;82(3):441-448. doi:10.1016/j.exer.2005.08.002
90. Iida A, Shinoe T, Baba Y, Mano H, Watanabe S. Dicer plays essential roles for retinal development by regulation of survival and differentiation. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(6):3008-3017. doi:10.1167/iops.10-6428
 91. Phosphatidylcholines D, Aveldaiio MI. A Novel Group of Very Long Chain Polyenoic Fatty Acids in. 1987;262(3):1172-1179. doi:10.1016/S0021-9258(19)75767-6
 92. Hamano F, Kuribayashi H, Iwagawa T, et al. Mapping membrane lipids in the developing and adult mouse retina under physiological and pathological conditions using mass spectrometry. *J Biol Chem.* 2021;296:100303. doi:10.1016/j.jbc.2021.100303
 93. Scott BURTONL. Docosahexaenoate etabolis a n d F a t t y - a c i d C o p o s i t i o n i n Developing Retinas of Nor al and rd utant ice. 2020;(1987).
 94. Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Heckenlively JR. Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res.* 2002;42(4):517-525. doi:10.1016/S0042-6989(01)00146-8
 95. Iwagawa T, Aihara Y, Umutoni D, et al. CD9 protects photoreceptors from injury and potentiates EDN2 expression. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2020;61(3). doi:10.1167/iops.61.3.7
 96. Koso H, Minami C, Tabata Y, et al. CD73, a novel cell surface antigen that characterizes retinal photoreceptor precursor cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(11):5411-5418. doi:10.1167/iops.08-3246
 97. Ueno K, Iwagawa T, Kuribayashi H, et al. Transition of differential histone H3 methylation in photoreceptors and other retinal cells during retinal differentiation. *Sci Rep.* 2016;6(August 2015):1-12. doi:10.1038/srep29264
 98. Pauter AM, Olsson P, Asadi A, et al. Elovl2 ablation demonstrates that systemic DHA is

- endogenously produced and is essential for lipid homeostasis in mice. *J Lipid Res.* 2014;55(4):718-728. doi:10.1194/jlr.M046151
99. Mandal MNA, Ambasudhan R, Wong PW, Gage PJ, Sieving PA, Ayyagari R. Characterization of mouse orthologue of ELOVL4: Genomic organization and spatial and temporal expression. *Genomics.* 2004;83(4):626-635. doi:10.1016/j.ygeno.2003.09.020
 100. Mears AJ, Kondo M, Swain PK, et al. Nrl is required for rod photoreceptor development. *Nat Genet.* 2001;29(4):447-452. doi:10.1038/ng774
 101. Akimoto M, Cheng H, Zhu D, et al. Targeting of GFP to newborn rods by Nrl promoter and temporal expression profiling of flow-sorted photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(10):3890-3895. doi:10.1073/pnas.0508214103
 102. Kim JW, Yang HJ, Brooks MJ, et al. NRL-Regulated Transcriptome Dynamics of Developing Rod Photoreceptors. *Cell Rep.* 2016;17(9):2460-2473. doi:10.1016/j.celrep.2016.10.074
 103. Brooks MJ, Chen HY, Kelley RA, et al. Improved Retinal Organoid Differentiation by Modulating Signaling Pathways Revealed by Comparative Transcriptome Analyses with Development In Vivo. *Stem Cell Reports.* 2019;13(5):891-905. doi:10.1016/j.stemcr.2019.09.009
 104. Martin RE, Bazan NG. Changing Fatty Acid Content of Growth Cone Lipids Prior to Synaptogenesis. *J Neurochem.* 1992;59(1):318-325. doi:10.1111/j.1471-4159.1992.tb08906.x
 105. Carter JM, Demizieux L, Campenot RB, Vance DE, Vance JE. Phosphatidylcholine biosynthesis via CTP:phosphocholine cytidyltransferase β 2 facilitates neurite outgrowth and branching. *J Biol Chem.* 2008;283(1):202-212. doi:10.1074/jbc.M706531200
 106. Neuringer M, Anderson GJ, Connor WE. Quick links to online content THE ESSENTIALITY OF N-3 FATTY ACIDS FOR THE DEVELOPMENT AND FUNCTION. *Development.* 1988:517-541.
 107. Finkelman FD, Rothenberg ME, Brandt EB, Morris SC, Strait RT. Molecular mechanisms of

- anaphylaxis: Lessons from studies with murine models. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(3):449-457. doi:10.1016/j.jaci.2004.12.1125
108. Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating Factor. *J Biol Chem*. 1990;265(29):17381-17384.
 109. Wykle RL, Malone B, Snyder F. Enzymatic synthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a hypotensive and platelet-aggregating lipid. *J Biol Chem*. 1980;255(21):10256-10260.
 110. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*. 1989;77(1):51-59. doi:10.1016/0378-1119(89)90358-2
 111. Tarui M, Shindou H, Kumagai K, et al. Selective inhibitors of a PAF biosynthetic enzyme lysophosphatidylcholine acyltransferase 2. *J Lipid Res*. 2014;55(7):1386-1396. doi:10.1194/jlr.M049205
 112. Webb B, Sali A. *Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER*. Vol 2016.; 2016. doi:10.1002/cpbi.3
 113. Jones DT. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol*. 1999;292(2):195-202. doi:10.1006/jmbi.1999.3091
 114. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23(21):2947-2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404
 115. Shen M, Sali A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Science*, 2507–2524. <https://doi.org/10.1110/ps.062416606>. Instead assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci*. 2006;15:2507-2524. doi:10.1110/ps.062416606. Instead
 116. Brooks BR, Brooks C., Mackerell AD, et al. CHARMM: The Biomolecular simulation Program.

- J Comput Chem.* 2009;30(10):1545-1614. doi:10.1002/jcc.21287.CHARMM
117. Phillips JC, Braun R, Wang WEI, et al. Scalable Molecular Dynamics with NAMD. 2005;26:1781-1802. doi:10.1002/jcc.20289
 118. Hamano F, Matoba K, Hashidate-Yoshida T, et al. Mutagenesis and homology modeling reveal a predicted pocket of lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 to catch Acyl-CoA. *FASEB J.* 2021;35(6):e21501. doi:10.1096/fj.202002591R
 119. Zhukovsky MA, Filograna A, Luini A, et al. The Structure and Function of Acylglycerophosphate Acyltransferase 4/ Lysophosphatidic Acid Acyltransferase Delta (AGPAT4/LPAATδ). *Front Cell Dev Biol.* 2019;7(August):1-14. doi:10.3389/fcell.2019.00147
 120. Picot D, Loll PJ, Garavito RM. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H 2 synthase-1. *Nature.* 1994;367(6460):243-249. doi:10.1038/367243a0
 121. Hsiao YS, Jogl G, Esser V, Tong L. Crystal structure of rat carnitine palmitoyltransferase II (CPT-II). *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;346(3):974-980. doi:10.1016/j.bbrc.2006.06.006
 122. Allen KN, Entova S, Ray LC, Imperiali B. Monotopic Membrane Proteins Join the Fold. *Trends Biochem Sci.* 2018;44(1):7-20. doi:10.1016/j.tibs.2018.09.013
 123. M. Asun Requero FMG and AA. The Critical Micellar Concentrations of Fatty Acyl Coenzyme A and Fatty Acyl Carnitines. 1993:343-346.
 124. Mangino MJ, Zografakis J, Murphy MK, Anderson CB. Improved and simplified tissue extraction method for quantitating long-chain acyl-coenzyme A thioesters with picomolar detection using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1992;577(1):157-162. doi:10.1016/0378-4347(92)80612-T
 125. Shrago E, Woldegiorgis G. Symposium: The role of long chain fatty acyl-CoAs as signaling molecules in cellular metabolism: Introduction. *J Nutr.* 2000;130(2 SUPPL.):294-298.
 126. Kuwata H, Hara S. Role of acyl-CoA synthetase ACSL4 in arachidonic acid metabolism.

Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2019;144(March):106363.

doi:10.1016/j.prostaglandins.2019.106363

127. Emken E. Human studies using isotope labeled fatty acids: Answered and unanswered questions. *J Oleo Sci.* 2013;62(5):245-255. doi:10.5650/jos.62.245
128. Henkin AH, Cohen AS, Dubikovskaya EA, et al. Real-time noninvasive imaging of fatty acid uptake in vivo. *ACS Chem Biol.* 2012;7(11):1884-1891. doi:10.1021/cb300194b
129. Panagia M, Yang J, Gale E, et al. A novel tracer for in vivo optical imaging of fatty acid metabolism in the heart and brown adipose tissue. *Sci Rep.* 2020;10(1):1-9. doi:10.1038/s41598-020-68065-4