

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」

平成 18 年度採択研究代表者

新井 洋由

(東京大学大学院薬学系研究科 教授)

「生体膜リン脂質多様性の構築機構の解明と
高度不飽和脂肪酸要求性蛋白質の同定」

1. 研究実施の概要

本研究では、線虫および動物細胞を材料として用い、遺伝学、生化学的手法、およびマススペクトロメトリーによる脂質メタボローム解析を駆使しながら、1. リン脂質分子種多様性形成に関わる分子群の同定、2. 高度不飽和脂肪酸 (PUFA) 要求性遺伝子の同定、3. PUFA をもつ新規生理活性脂質の同定、の 3 点に焦点を絞り、「生体膜を構成するリン脂質分子種多様性の構築機構とその生理的意義」という生体膜構造および機能の基本的かつ本質的問題を解決する。

2. 研究実施内容

1. リン脂質分子種多様性形成に関わる分子群の同定

1-1. リン脂質リモデリングに関与する遺伝子の網羅的スクリーニング

de novo 経路で合成されたリン脂質に、「リモデリング反応」によって PUFA 鎖が導入される過程には、脂肪酸の輸送、脂肪酸の活性化 (主として CoA 付加)、*de novo* リン脂質からの脂肪酸鎖の切り出しと PUFA の導入、など様々なステップが存在すると考えられる。各ステップの反応を担う候補酵素等の報告はこれまでにもあるが、細胞内でそれらの分子がリモデリング反応に関与しているとの証拠は乏しい。

研究代表者らはこれまでに、PUFA 合成に関わる酵素群の各欠損変異体ならびに多重変異体を樹立し、運動異常、形態異常、生殖異常などの表現型を示すことを明らかにしている。また、これらの異常が低温環境下において著しく増強され、最も重篤な PUFA 欠乏状態となる *fat-1 fat-3* 二重変異体の場合、低温環境下ではほとんど成長できないことを見出している。この変異体に外からアラキドン酸 (20:4) や EPA (20:5) を添加すると、リン脂質脂肪酸鎖のリモデリングが起こり、これと同時に表現型も著しく回復する。これらの結果から、PUFA 鎖を含むリン脂質が線虫の様々な生命現象において重要な役割を果たすことを示すとともに、外来性脂肪酸による表現型回復を利用してリン脂質へのアシル鎖導入に関与する遺伝子を網羅的に同定するスクリーニング系を確立した。本研究では、*fat* 変異体を

PUFA 存在下において低温環境下で培養し、同時に線虫の全遺伝子について網羅的な RNAi を行う。もし PUFA 導入に関与する遺伝子が RNAi によりノックダウンされれば、その線虫はこの条件下で生育できないはずである。このスクリーニングによりリン脂質のリモデリングに関与する遺伝子を同定する。このアッセイ系で、一週間に約 400 遺伝子を実験できる。線虫には約 2 万遺伝子があるので、約 50 週で全遺伝子のスクリーニングができる予定である。平成 18 年度の成果として、半数近くの遺伝子について、一次スクリーニングを終了した。平成 19 年度には全遺伝子の一次スクリーニングを終了し、さらに得られてきた候補遺伝子について再現性、特異性等の二次スクリーニングを平成 20 年度終了までに完了する。その後、リン脂質リモデリングの反応機構ならびにその生物学的意義を明らかにする。

1-2. アシルトランスフェラーゼファミリー分子の網羅的解析

リン脂質に脂肪酸鎖を導入する酵素（アシルトランスフェラーゼ）として、リン脂質の *de novo* 合成に関わるグリセロ 3 リン酸アシルトランスフェラーゼ、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼが既に同定されているが、これらのアシルトランスフェラーゼに保存されたモチーフ構造を持つ遺伝子がヒトには 15 種類存在し、機能未知遺伝子も多い。これらの分子が脂肪酸の導入に関わる酵素である可能性が高いと考えられること、さらに線虫にもほとんどが保存されている (*ac1-1-14* と命名) ことに着目し、機能未知のすべてのアシルトランスフェラーゼ様分子について欠損変異体を既に確立している。本研究では、まず、得られた *ac1* 欠損変異体の表現型解析、発現部位の解析を通して、アシルトランスフェラーゼファミリー分子の生理機能を解明する。次に、野生型および変異体の脂質組成のマスマスペクトロメトリーを中心とした網羅的解析により、どのような脂質分子の合成に関与しているか明らかにする。さらに、得られた *ac1* 欠損変異体を変異剤で処理し、表現型を抑圧するサプレッサー遺伝子あるいは増強させるエンハンサー遺伝子を実験スクリーニングする。これにより、*ac1* 遺伝子と遺伝学的に関連する遺伝子を同定する。平成 18 年度の成果として、すべての *ac1* 欠損変異体についてバッククロスを終了し、さらに、相同性の高い分子に関してはリダンダンシーの可能性を考慮して多重変異体を樹立した。平成 20 年度をめどに、これら変異体を用いてその分子機能を明らかにする。また、平成 22 年度までに、これらの酵素が触媒する基質および産物、ならびに産物の機能等を解明する。

2. PUFA 要求性遺伝子の同定

PUFA が欠乏すると、知能発達障害、皮膚障害、視覚障害、さらには免疫機能障害から心血管機能障害まで様々な病態、疾患を引き起こす。これらの中にはプロスタグランジンなど脂質性メディエーターの欠乏で説明できるものもあるが、脳神経系の発達等については、アラキドン酸代謝物だけでは説明できず、PUFA が他にも重要な機能を果たしていることが

予想できる。しかし、その分子的基盤はほとんど解明されていない。

我々は、野生株に RNAi しても表現型を示さないが、PUFA 欠損株に同様の RNAi を行うと著しい表現型を示す分子があることを見いだしてきた。これらの分子は PUFA が欠乏すると機能に障害が現れるものと考えられ、いわば「PUFA 要求性遺伝子」と捉えることができる。本研究では、生理機能を発揮する上で PUFA を必要とする分子を網羅的に同定し、PUFA の生理機能を分子レベルで解明することを目的として次の実験を行う。1) 野生株および PUFA 欠損株に対してゲノムワイドな RNAi を行い、PUFA 欠損株だけに異常（運動異常、形態異常等）が表れる遺伝子群を網羅的に同定する。2) 異常が現れた遺伝子については、PUFA 欠乏下における安定性・局在性、他の蛋白質との相互作用等に対する影響を調べる。機能既知蛋白質については活性に対する影響も調べる。4) 膜蛋白質を中心に、人工膜（リポソーム）を用いてリン脂質脂肪酸鎖の蛋白質機能に対する影響を *in vitro* で調べるとともに、膜貫通ドメインなどに点変異を導入しリン脂質脂肪酸鎖感受性部位を同定する。点変異体は線虫欠損株に導入し、同時に *in vivo* でも評価する。

網羅的スクリーニングの指標に用いる表現型として、神経および筋の異常をモニターする運動性の異常にまず着目し、神経および筋機能に関与する PUFA 要求性遺伝子を同定する。平成 18 年度の成果として、これまでのスクリーニング系を最適化し、最適化したスクリーニング系で約 3000 遺伝子の一次スクリーニングを終了した。確立されたアッセイ系を用いた全ゲノムにおよぶスクリーニングを平成 20 年度までに終了する。さらに、平成 22 年度までに、スクリーニングで得られた候補分子の生化学的解析、生理機能の解析、分子メカニズムの解析を行う。

3. PUFA をもつ新規生理活性脂質の同定

リン脂質は一般的にグリセロール骨格の一位に飽和脂肪酸（あるいはモノ不飽和脂肪酸）、二位に PUFA を有している。グリセロール骨格一位の脂肪酸鎖を加水分解するホスホリパーゼ A1 が作用すると、PUFA の結合したリゾリン脂質を産生され、また、脂質に PUFA を導入するアシルトランスフェラーゼは PUFA を含む脂質を合成する。従って、このような反応を担う酵素は PUFA を有する脂質を産生し、産生酵素の候補となる遺伝子の変異体を作製することにより、PUFA をもつ新規生理活性脂質を同定する手がかりになるものと期待される。我々は、線虫におけるホスホリパーゼ A1 の変異体、ならびにアシルトランスフェラーゼ様分子の変異体を単離しており、これらの変異体の表現型解析、脂質解析、関連分子の探索を行うことにより、PUFA をもつ新規生理活性脂質の存在、ならびにその作用点を明らかにし、最終的にその構造決定を目指す。平成 18 年度の成果として、細胞内型ホスホリパーゼ A1 変異体の機能解析を進め、細胞内型ホスホリパーゼ A1 が上皮細胞の非対称分裂に関与することを明らかにした。さらに、ホスホリパーゼ A1 変異体のサブレッサー遺伝子を 2 つ同定することに成功した。平成 19 年度までに、この分子メカニズムの解明を目指す。PUFA 要求性遺伝子の中に、PUFA 含有生理活性脂質の産生酵素も含まれると予想されるので、そ

これらの分子の機能について平成 22 年度までに生理機能を解明する。

3. 研究実施体制

(1) 東大・新井グループ

研究項目

- ・リン脂質分子種多様性形成に関わる分子群の同定、
- ・生体膜リン脂質多様性により調節される分子群の網羅的解析、
- ・PUFAをもつ新規生理活性脂質の同定、

(2) 東京女子医大・安藤グループ

研究項目

- ・脂質関連遺伝子ならびにRNAiスクリーニングによって得られた候補分子の系統的なノックアウト線虫の作製。

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Morikawa R, Tsujimoto M, Arai H, Aoki J. Phospholipase A1 assays using a radio-labeled substrate and mass spectrometry. *Methods in Enzymology* in press.
- Umemura K, Kato I, Hirashima Y, Ishii Y, Inoue T, Aoki J, Kono N, Oya T, Hayashi N, Hamada H, Endo S, Oda M, Arai H, Kinouchi H, Hiraga K. Neuroprotective role of transgenic PAF-acetylhydrolase II in mouse models of focal cerebral ischemia. *Stroke* 2007; 38: 1063-1068.