

「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、動物細胞およびマウスを材料として用い、遺伝学、生化学的手法、およびマスマ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 点に焦点をしばり、「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(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

平成 20 年度は、「1. リン脂質分子種多様性形成に関わる分子群の同定」に関し、生体膜における主要リン脂質であるホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、およびホスファチジルセリン(PS)に PUFA を導入する脂肪酸転移酵素を同定した(*Matsuda et al, Genes Cells, 2008*: 文献 4)。また、線虫を用いたスクリーニングにより同定したホスファチジルイノシトール(PI)に PUFA を導入する脂肪酸転移酵素、*mboa-7/LPIAT* (LysoPI acyltransferase, *Lee et al, MBC, 2008*: 文献 1)については、ノックアウトマウスを作製し、解析を行った。

PUFA 含有リゾリン脂質 (*sn-2*-PUFA Lysophospholipid) を産生すると考えられるホスホリパーゼ A1 に関しては、線虫を用いた遺伝学的解析から、ホスホリパーゼ A1 が細胞内小胞輸送系を制御し、幹細胞の非対称分裂に関与することを明らかにした (*Kanamori et al, EMBO J, 2008*: 文献 3)。

1. PC、PS および PE に PUFA を導入する脂肪酸転移酵素 *mboa-6/LPLAT* の同定

一般に生体膜リン脂質の *sn-1* 位には飽和脂肪酸、*sn-2* 位には PUFA が結合している。研究代表者はこれまで線虫を用いた RNAi スクリーニングにより、PI の *sn-2* 位に PUFA を導入する脂肪酸転移酵素 *mboa-7/LPIAT* を同定したが、PC、PE など、その他のリン脂質に PUFA を導入する酵素については不明なままであった。*mboa-7/LPIAT* は MBOAT (Membrane bound

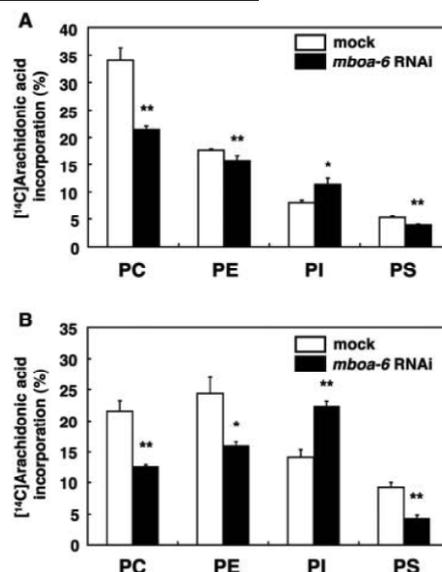
O-acyltransferase) と呼ばれるモチーフ構造を有しており、線虫にはこのモチーフを有する遺伝子が *mboa-7* を含め 10 遺伝子存在していた (Table 1、*mboa-6* はこの時点で機能未知遺伝子)。これらの中には機能未知分子も含まれていたことから、我々はこの中に PUFA をリン脂質に導入する酵素が他にも存在すると予想し、線虫における発現抑制系を用いてその可能性を検証した。

Table 1 *Caenorhabditis elegans* MBOAT family

Gene	Human homologue	Acyltransferase to
<i>mboa-1</i>	ACAT-1, ACAT-2	Cholesterol
<i>mboa-2</i>	DGAT1	Diacylglycerol
<i>mboa-3</i>	MBOAT1, MBOAT2	
<i>mboa-4</i>	MBOAT1, MBOAT2	
<i>mboa-5</i>	MBOAT1, MBOAT2	
<i>mboa-6</i>	MBOAT5	LysoPC, LysoPS, LysoPE (This study)
<i>mboa-7</i>	<i>h-mboa-7</i> (LPIAT)	LysoPI
<i>mom-1</i>	Porcupine	Wnt
<i>hhah-1</i>	HHAT	Hedgehog
<i>hhah-2</i>	HHAT	Hedgehog

mboa-6 の発現抑制により、PC, PS, PE に対するアラキドン酸の導入が減少する

線虫 MBOAT ファミリーに属する遺伝子のうち、他の生物種を含め機能が明らかになっていない *mboa-3*、*mboa-4*、*mboa-5*、*mboa-6* について発現抑制を試みた。各遺伝子を発現抑制し、リン脂質への [¹⁴C]アラキドン酸の取り込みを調べたところ、*mboa-3*、*mboa-4*、*mboa-5* の発現抑制では取り込みに変化が見られなかったが、*mboa-6* の発現抑制により、PC へのアラキドン酸の取り込みが約 40% 減少し、PS、PE への取り込みも有意に減少することが分かった (図 1A)。また、内在的に PUFA を欠乏した脂肪酸不飽和化酵素の変異体を用いて同様の解析を行った結果、PS および PE へのアラキドン酸の取り込み抑制がより顕著となり、PS において約 60%、PE において約 35% の減少が観察された (図 1B)。*mboa-6* の発現抑制下では、線虫の成長速度が



【図 1】*mboa-6* の発現抑制により PC, PE, PS へのアラキドン酸導入が減少する [A: 野生株、B: PUFA 欠乏変異体 (*fat-3* 変異体)]。

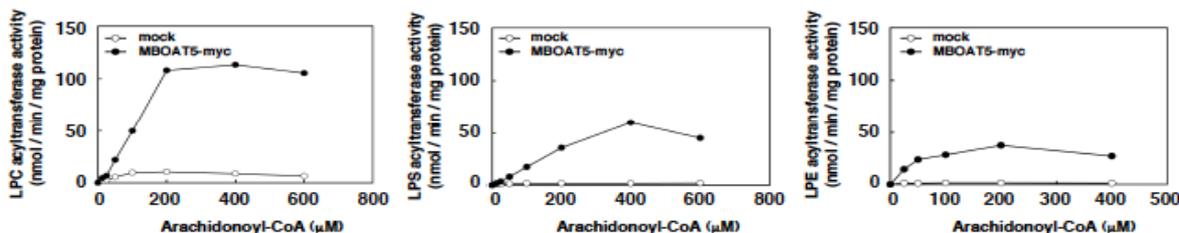
遅延し、一部の個体において幼虫期における成長停止が観察された。また、形態にも異常が生じており、上皮組織あるいは筋肉組織において何らかの異常が生じていると考えられた。

以上の結果から、*mboa-6* は PC、PS および PE への PUFA 導入に寄与しており、線虫の成長や形態形成に重要な機能を持つことが明らかになった。

ヒト *mboa-6* 相同分子は LPCAT、LPSAT、LPEAT 活性を有する

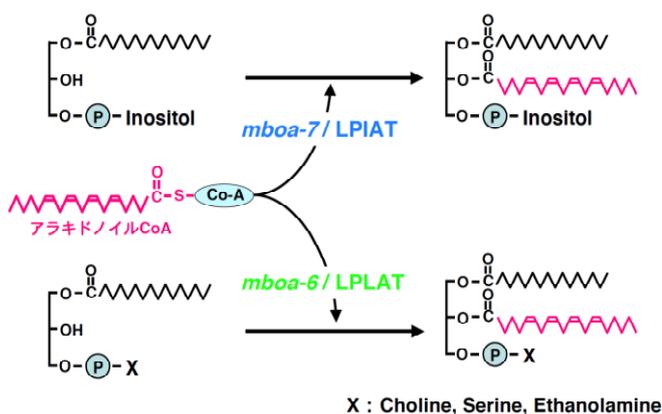
mboa-6 は進化的に広く保存されており、ヒト、マウスにおいても *mboa-6* に対応する相同遺伝子が 1 つずつ存在した。これらの遺伝子産物が PC、PS、および PE に PUFA を導入する脂肪酸転移酵素である可能性を検証するために、*mboa-6* のヒト相同遺伝子 (MBOAT5) を HEK293 細胞に発現させ、その膜画分を用いて脂肪酸転移活性を調べた。アラキドニル CoA を基質として解析した結果、ヒト *mboa-6* を発現した膜画分では LPCAT (LysoPC acyltransferase)、LPSAT (LysoPS

acyltransferase)、LPEAT (LysoPE acyltransferase) 活性が顕著に上昇し、ヒト *mboa-6* が PC、PS、PE にアラキドン酸を導入する脂肪酸転移酵素であることが分かった (図 2)。一方、LPAAT (LysoPA acyltransferase) 活性、LPIAT 活性の上昇は見られなかった。また、HeLa 細胞において、ヒト *mboa-6* の発現抑制を行い、同様の解析を行ったところ、LPCAT、LPSAT、LPEAT 活性の顕著な抑制が観察され、さらに、ヒト *mboa-6* を発現抑制した HeLa 細胞に放射標識したアラキドン酸を添加したところ PC、PS、PE に対するアラキドン酸の取り込みが減弱した (data not shown)。



【図 2】*mboa-6* ヒト相同分子 MBOAT5 は、LPCAT 活性、LPSAT 活性、LPEAT 活性を有する。

以上の結果から、*mboa-6*/MBOAT5 が PC、PS、PE にアラキドン酸を導入する脂肪酸転移酵素 (Lysophospholipid acyltransferase: LPLAT) であることが明らかになった。本酵素は PC や PE といった生体膜における主要リン脂質に PUFA を導入することから、膜流動性など膜の物性を規定することが予想される。*mboa-6*/LPLAT は PI 特異的に PUFA を導入する *mboa-7*/LPIAT と共に、リン脂質の脂肪酸組成を規定する Key enzyme と考えられ (図 3)、今後、これらの機能解析により生体膜リン脂質における脂肪酸分子種多様性の生物学的意義が明らかになるものと期待される。我々はアシルトランスフェラーゼ反応 (リモデリング反応) の基質となるリゾリン脂質を供給するホスホリパーゼについても個体レベルで機能解析を行っている (Kono *et al*, *J.Biol.Chem*, 2008: 文献 2)。



【図 3】*mboa-7*/LPIAT および *mboa-6*/LPLAT は PUFA をリン脂質に導入する脂肪酸転移酵素である。*mboa-7*/LPIAT は PI 特異的であるのに対し、*mboa-6*/LPLAT は比較的広い基質特性を有する。

解析により生体膜リン脂質における脂肪酸分子種多様性の生物学的意義が明らかになるものと期待される。我々はアシルトランスフェラーゼ反応 (リモデリング反応) の基質となるリゾリン脂質を供給するホスホリパーゼについても個体レベルで機能解析を行っている (Kono *et al*, *J.Biol.Chem*, 2008: 文献 2)。

2. 哺乳動物における LPIAT (LysoPI-specific acyltransferase) の解析

マウス LPIAT を欠失した ES 細胞、ならびに LPIAT ノックアウト (KO) マウスを樹立した。LPIAT KO マウス由来の主要臓器 (脳、肝臓等) では、アラキドン酸を PI に導入する LPIAT 活性をほぼ完全に消失していたことから、本酵素はマウスにおいても LPIAT 反応を担う主要な酵素であることがわかった。興味深いことに、LPIAT ヘテロ欠損マウス同士の交配から得られるホモ欠損マウスはメ

ンデル則では得られず、ホモ個体の一部は胎仔期や出生直後にかけて致死となると考えられた。また、出生したホモ欠損マウスは体が小さく、ほとんどの個体が1ヶ月以内に死に至った。

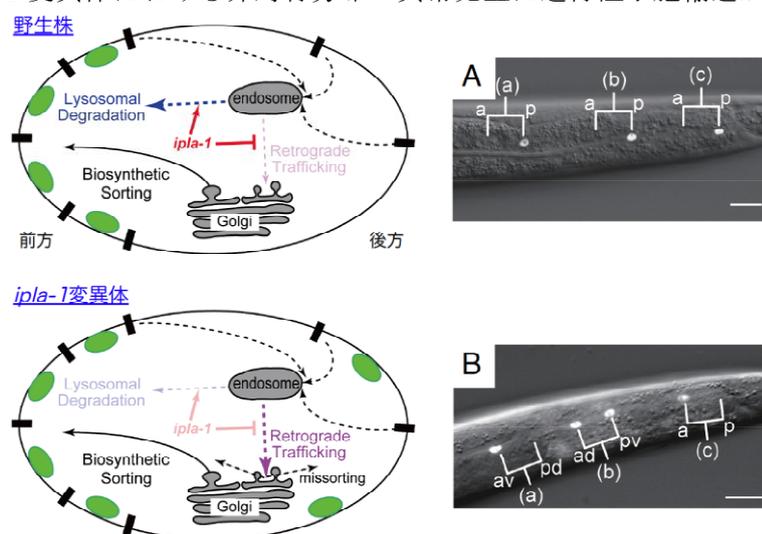
これまでPIの極性頭部に着目した「シグナル伝達の起点としての機能」あるいは「オルガネラ膜表面のランドマークとしての機能」については、多くの研究がなされ、その重要性も広く認められている。一方、PIの脂肪酸分子種に関しては、これまでPIの脂肪酸鎖を規定する分子が同定されていなかったことから、その生物学的意義については不明のままであった。LPIAT KOマウスの示す表現型は、PIにおける脂肪酸分子種の重要性を明確に示すものであり、今後、LPIAT KOマウスや線虫LPIAT (*mbo-7*) 変異体を用いた解析により、異常発症の分子機構を明らかにしていく。

3. 細胞内型ホスホリパーゼ A1 の機能解析

リン脂質は一般的にグリセロール骨格の1位に飽和脂肪酸(あるいはモノ不飽和脂肪酸)、2位にPUFAを有している。リン脂質における *sn*-1 位に結合した脂肪酸鎖を加水分解するホスホリパーゼ A1 は、*sn*-2 位に PUFA が結合したリゾリン脂質 (*sn*-2-PUFA Lysophospholipid) を産生すると考えられるが、これまで細胞内型ホスホリパーゼ A1 の個体レベルでの解析はほとんど明らかになっていなかった。

研究代表者は線虫における細胞内型ホスホリパーゼ A1 (*ipla-1*) の欠損変異体を作製し、*ipla-1* 変異体が線虫における幹細胞様上皮細胞の非対称分裂に異常を示すことを見出した(図4:写真)。非対称分裂では分裂に先立ち、母細胞におけるタンパク質(β カテニン、転写因子等)の非対称分布が形成されるが、変異体ではこの非対称分布が形成されなかった。さらに、順遺伝学的手法により *ipla-1* 変異体の非対称分裂異常を回復させるサプレッサーを探索した結果、*ipla-1* 変異体における非対称分布の異常発生に逆行性小胞輸送が関与することが明らかになった(図4:模式図)。

今後、*ipla-1* がどのようなリン脂質を基質とするのか、また、*ipla-1* により代謝される脂質分子がどのような機構で非対称分裂や小胞輸送系を制御するのが重要な課題であるが、サプレッサーの中には PS などのアミノリン脂質を脂質二重膜の細胞外側(あるいは内膜 lumen 側)から細胞質



【図4】非対称分裂前の幹細胞ではタンパク質の非対称分布が形成され(野生株)、その結果、正常な非対称分裂が起こる[A:前方の細胞は分化し(a:幹細胞マーカーが消失する)、後方の細胞は幹細胞能を維持する(p:幹細胞マーカーが維持される)]。細胞内型ホスホリパーゼ A₁ の変異体ではこの分布に異常が生じ(*ipla-1* 変異体)、非対称分裂も異常となる[B:前方の細胞や両方の細胞が幹細胞マーカーを発現している]。

側に反転させるフリッパーゼ (*tat-5*) が含まれており、膜リン脂質と逆行性輸送の関連を
探る上で興味深い。共同研究者の安藤は同じアミノリン脂質フリッパーゼファミリー分子
(*tat-1*) の機能を線虫個体で明確に示しており (*Science*, 2008: 文献 5)、その解析手法は
本研究の遂行に大きく貢献している。

幹細胞の非対称分裂は多細胞生物が様々な細胞種を生み出すために獲得した根源的な
生命現象である。本研究は、細胞内型ホスホリパーゼ A1 の機能を明らかにしただけでなく、
非対称分裂におけるタンパク質の非対称分布形成に逆行性小胞輸送が関与することを示し
た研究としても注目を集め、*Nature Cell Biology* (10, 890, 2008) や *Current Opinion in
Genetics & Development* (18, 1-6, 2008) 等の Review においても、大きく取り上げられ
ている。

3. 研究実施体制

(1) 東大・新井グループ

① 研究分担グループ長: 新井 洋由 (東京大学、教授)

② 研究項目

新井が本研究の代表者であり、すべての研究テーマ推進についての責務を負う。本研究
においては、「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」を解
明するために、1. リン脂質分子種多様性形成に関わる分子群の同定、2. 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、3. PUFAをもつ新規生理活性脂質の同定、
の3点に焦点をしばり研究を推進する。

(2) 東京女子医大・安藤グループ

① 研究分担グループ長: 安藤 恵子 (東京女子医科大学、助教)

② 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)

1. Lee HC, Inoue T, Imae R, Kono N, Shirae S, Matsuda S, Gengyo-Ando K, Mitani S, Arai H
(2008) *Caenorhabditis elegans mboa-7*, a Member of the MBOAT Family, Is Required for
Selective Incorporation of Polyunsaturated Fatty Acids into Phosphatidylinositol. *Mol Biol Cell*
19:1174-1184.
2. Kono N, Inoue T, Yoshida Y, Sato H, Matsusue T, Itabe H, Niki E, Aoki J, Arai H (2008)
Protection against oxidative stress-induced hepatic injury by intracellular type II

platelet-activating factor acetylhydrolase by metabolism of oxidized phospholipids in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **283**:1628-1636.

3. Kanamori T, Inoue T, Sakamoto T, Gengyo-Ando K, Tsujimoto M, Mitani S, Sawa H, Aoki J, Arai H (2008) \square -catenin asymmetry is regulated by PLA(1) and retrograde traffic in *C. elegans* stem cell divisions. *EMBO Journal* **27**: 1647-1657
4. Matsuda S, Inoue T, Lee HC, Kono N, Tanaka F, Gengyo-Ando K, Mitani S, Arai H (2008) Member of the membrane-bound *O*-acyltransferase (MBOAT) family encodes a lysophospholipid acyltransferase with broad substrate specificity. *Genes to Cells* **13**: 879-888
5. Darland-Ransom M, Wang X, Sun, CL, Mapes, J, Gengyo-Ando K, Mitani S, Xue D (2008) Role of *C. elegans* TAT-1 protein in maintaining plasma membrane phosphatidylserine asymmetry. *Science* **320**: 528-531

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)