

「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を行う。これらの分子の機能解析を通して、「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. 研究実施体制

### (1) 「新井」グループ

- ① 研究分担グループ長: 新井 洋由 (東京大学大学院、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同定、を行い、その機能解析を行う。

### (2) 「中台」グループ

- ① 研究分担グループ長: 中台 枝里子 (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。

### § 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

#### 研究のねらい

生体膜はリン脂質の二重層で構成されている。リン脂質はホスファチジルコリン(PC)やホスファチジルセリン(PS)といった極性頭部の違いに加えて、飽和脂肪酸から高度不飽和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acid: PUFA)まで様々な脂肪酸が結合しており、生体膜には数百種類のリン脂質分子種が存在する。このようなリン脂質脂肪酸鎖の多様性は、リン脂質がいったん生合成された後、脂肪酸鎖が置き換わる「リモデリング反応」により形成される。しかし、リモデリング反応に関わる酵素群はほとんど同定されておらず、また、生体膜リン脂質の多様性はなぜ必要なのか、それが破綻するとどのような異常や病態を招くのかという問題も解明されていない。

我々は多様に存在するリン脂質分子種の中でも、特に「PUFA を含むリン脂質」の生理機能に着目している。代表的なPUFAとしては、アラキドン酸(20:4)やエイコサペンタエン酸(EPA, 20:5)、ドコサヘキサエン酸(DHA, 22:6)が知られているが、これらのPUFAが欠乏すると、知能発達障害、皮膚障害、生殖異常、さらには免疫機能障害から心血管系障害まで様々な病態、疾患が引き起こされる。このような異常が生じる要因の一つとして、生体膜中のPUFAが減少により、ある特定の膜タンパク質の機能が減弱する可能性が考えられている。しかしながら、実際にどのような分子が影響を受けるのか、その分子実態はこれまで明らかになっていない。

以上の背景のもと、本CREST研究では、1)リン脂質分子種多様性形成に関わる脂肪酸リモデリング分子の同定、ならびに、2)PUFAを含む膜環境を要求する分子(PUFA要求性分子)の同定を行ってきた。これらの分子の機能解析を通して、「生体膜リン脂質の多様性はなぜ必要なのか」という生体膜構造および機能の本質的問題を分子レベルで解決する。

#### 研究実施方法

線虫は脂質関連分子の保存性が高く、また、PUFA を有するなど生体膜リン脂質の組成も哺乳動物と類似している。また、網羅的 RNAi やサプレッサースクリーニングなど遺伝的解析にも優れている。我々は線虫の利点を生かした独自のスクリーニング系を構築し、「リン脂質脂肪酸リモデリング酵素」ならびに「PUFA 要求性分子」の探索を行ってきた。さらに、東京女子医大・中台グループによる系統的な変異体作製プロジェクトにより、構造類似性から脂肪酸リモデリングに関わる可能性のある分子群を網羅的にノックアウトし、脂肪酸転移活性の測定、ならびに脂質メタボローム解析を行っている。

#### 1)リン脂質分子種多様性形成に関わる脂肪酸リモデリング分子の同定

リン脂質分子種多様性形成に関わる分子を同定するため、「生物学的評価に基づく網羅的 RNAi スクリーニング」および「構造類似性から予測される候補分子(アシルトランスフェラーゼファミ

リー分子群)の系統的ノックアウト」という 2 つのアプローチにより、幅広い探索を行ってきた。その結果、平成 20 年度までに、

- 1) 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*/LPIAT1 の同定ならびに LPIAT1 ノックアウトマウスの作製
- 2) 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)、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、*mboa-6*/LPLAT の同定

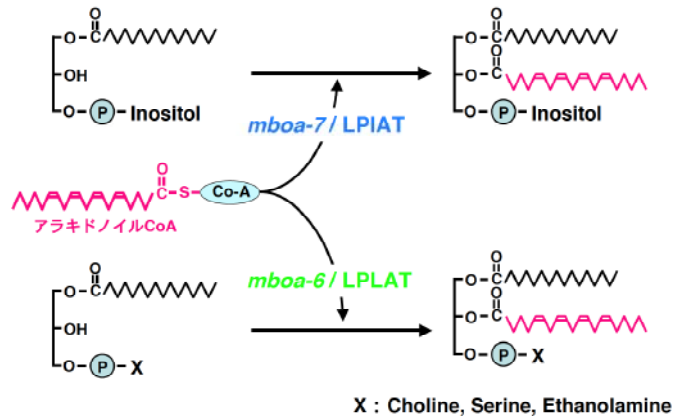
に成功している(図 1)。平成 21 年度においては、LPIAT1 ノックアウトマウスの表現型(脳の形態形成の異常)を詳細に解析したので以下に述べる。*mboa-6*/LPLAT に関しては、次項の「PUFA を含む膜環境を要求する分子(PUFA 要求性分子)の同定」と密接に関連するデータが得られており、次項においてその研究成果を述べる。

#### *mboa-7*/LPIAT1 の機能解析

PIは細胞の増殖、遊走、細胞骨格制御、小胞輸送など様々な生命現象に関与するリン脂質である。PIは極性基の特性のみならず、脂肪酸鎖についても特徴的な構造を持つことが知られており、その大部分は *sn*-1 位にステアリン酸(18:0)、*sn*-2 位にアラキドン酸を有する。我々は PI の有する特徴的な脂肪酸分子種の生物学的意義を明らかにする

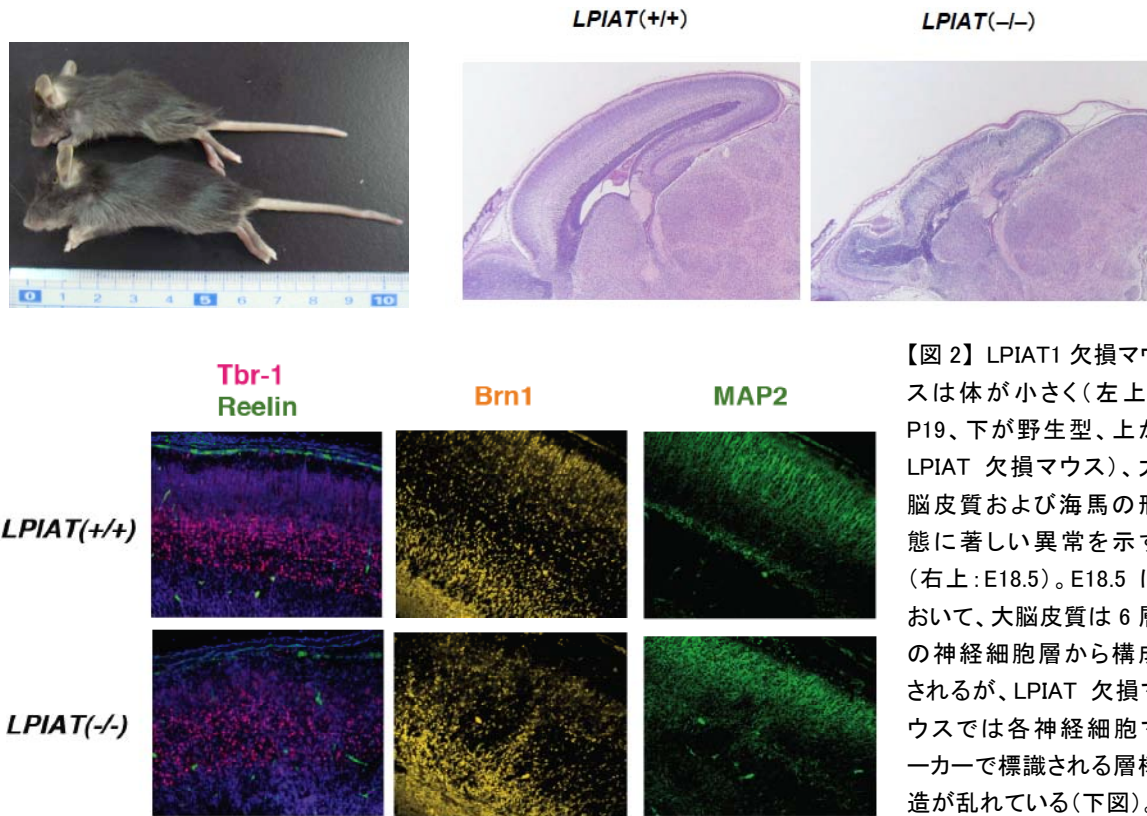
ため、*mboa-7*/LPIAT1 の欠損細胞ならびに欠損マウスを樹立した。哺乳動物 LPIAT1 は線虫と同様に PI 特異的にアラキドン酸を導入する脂肪酸転移酵素であり、LPIAT1 KO マウス由来の臓器では、アラキドン酸を PI に導入する LPIAT 活性が消失していた。LPIAT ヘテロ欠損マウス同士の交配から得られるホモマウスはメンデル則では得られず、ホモ個体の一部は胎仔期に致死となると考えられた。また、出生したホモ欠損マウスは体が小さく(図 2)、ほとんどの個体が 1 ヶ月以内に死に至った。さらに、胎仔(E18.5)における各組織の形態を調べたところ、LPIAT1 KO マウスでは大脳や海馬が萎縮しており、形態に異常が生じることが分かった(図 2)。

そこで、各神経細胞マーカー(Tbr1, Brn1, MAP2)を用いて、大脳皮質の層構造を調べたところ、形態形成初期(E12.5-14.4)における神経細胞の分化や神経細胞数には変化は見られなかったが、皮質形成が終了する E18.5 において、皮質の層構造が乱れていることが分かった(図 2)。さらに、BrdU でマウス個体の神経細胞の一過的にラベルし、発生段階における神経細胞の移動を調べたところ、KO マウスの大脳皮質では神経細胞の移動が遅延していることが分かった。また、海馬初代培養を単離し、神経細胞の突起進展を調べたところ、KO マウス由来の海馬細胞は神経突起の進展が弱く、短い突起を有する神経細胞の割合が高いことが分かった。以上の結果から、PI における脂肪酸分子種、特に *sn*-2 位に結合するアラキドン酸が、脳の形態形成における神経細胞の移動や突起進展に重要性であることが初めて明らかになった。この研究成果は国内



【図 1】 *mboa-7*/LPIAT1 および *mboa-6*/LPLAT はリン脂質に PUFA を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異性を有する。

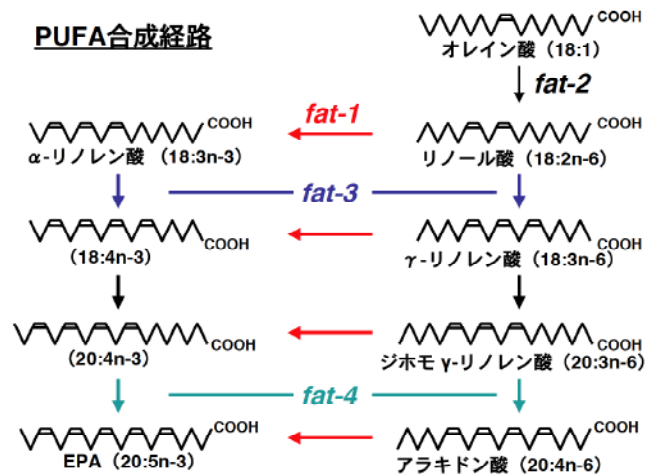
外の学会で高い評価を受け、複数の学会で最優秀発表を受賞した(17th International *C. elegans* Meeting, UCLA; 若手ファーマ・バイオフィォラム 2009, 名古屋)。



【図 2】 LPIAT1 欠損マウスは体が小さく(左上: P19、下が野生型、上が LPIAT 欠損マウス)、大脳皮質および海馬の形態に著しい異常を示す(右上: E18.5)。E18.5 において、大脳皮質は 6 層の神経細胞層から構成されるが、LPIAT 欠損マウスでは各神経細胞マーカーで標識される層構造が乱れている(下図)。

## 2) PUFA を含む膜環境を要求する分子 (PUFA 要求性分子) の同定

本稿の冒頭(研究のねらい)で述べたように、PUFA が減少した膜環境では何らかの分子(特に膜タンパク質)の機能が低下しており、その結果、知能発達障害、皮膚障害、生殖異常など、様々な病態、疾患が生じると予想される。しかしながら、実際にどのようなタンパク質が影響を受けるかは明らかになっておらず、従って、その発症機構も不明な点が多い。我々は、「PUFA 欠乏により機能および発現に影響を受ける分子」を同定するひとつのアプローチとして、線虫 PUFA 合成酵素変異体の表現型を増強させるエンハンサーのスクリーニングを行い、膜リン脂質の PUFA 欠乏に伴い細胞内局在が変化する新規膜タンパク質を同定することに成功した。以下、そ



【図 3】 線虫における PUFA 合成経路。線虫は PUFA を含まない大腸菌をエサとし、EPA やアラキドン酸などの PUFA を生合成することができる。

の研究概要を述べる。

線虫はPUFAを合成するための脂肪酸不飽和化酵素 (*fat* 遺伝子) を内在的に備えており、野生株では EPA (20:5) が豊富に含まれている。一方、各 *fat* 遺伝子の変異体では、PUFA 合成系の最終産物が不飽和度の低い脂肪酸に変わっており、*fat* 変異を組み合わせることにより、様々な脂肪酸欠失状態が作出できる (図 3、表 1)。我々はこれまで、*fat* 変異体の表現型を詳細に解析しており、胚発生、成長、神経機能、生殖機能、エンドサイトーシスなどに異常を示すこと、また、最終産物となる脂肪酸の不飽和度が低いほど表現型が強く現れることを見出している (表 1)。これらの異常の多くは、培地にアラキドン酸や EPA を添加することにより回復し、不飽和度が高い脂肪酸ほど回復の効率が高い傾向が見られる。

*fat* 変異体は PUFA 欠乏状態の膜で構成されており、このような膜環境では何らかの分子 (特に膜タンパク質) の機能が減弱している可能性が考えられる。

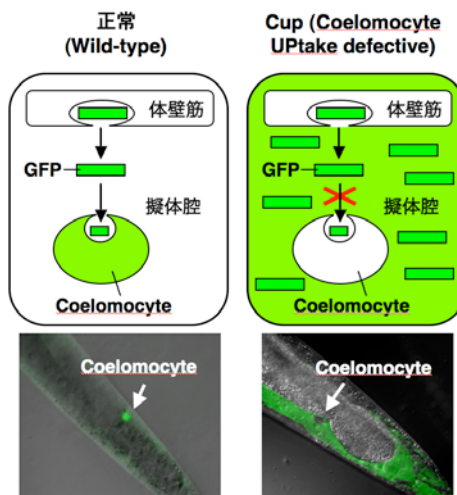
Strain	Final product	胚致死率 (%)	成長遅延	運動能の異常	CUP
<i>Wild-type</i>	20:5 n-3	0	-	-	-
<i>fat-1</i>	20:4 n-6	0	-	-	N.D.
<i>fat-4</i>	20:4 n-3	0	-	-	N.D.
<i>fat-4 fat-1</i>	20:3 n-6	2	+	+	±
<i>fat-3</i>	18:3 n-3	6	++	++	±
<i>fat-3 fat-1</i>	18:2 n-6	12	+++	+++	++

【表 1】線虫 *fat* 変異体における脂肪酸合成の最終産物とその表現型 (20°C)。上記表現型の他、上皮組織形成、生殖機能にも異常を示す。CUP: スカベンジャー細胞における Fluid phase エンドサイトーシスの異常 (テキスト参照)。

これらの分子は PUFA を添加することにより機能が回復することから、「PUFA 要求性分子」と捉えることができる。RNAi によって「PUFA 要求性分子」の発現を低下させると、PUFA を豊富に含む膜環境 (野生株) では異常が現れにくい、PUFA の欠乏した膜環境 (*fat* 変異体) では表現型が生じやすいと考えられる。以上の仮定に基づき、野生株と *fat* 変異体に対して網羅的な RNAi スクリーニングを行い、*fat* 変異体においてのみ顕著な異常を示す RNAi クローンを探索した。

#### 線虫におけるエンドサイトーシスの評価系

線虫においてエンドサイトーシスを評価する指標として、Coelomocyte Uptake と呼ばれるアッセイ系が用いられる (図 4)。線虫の体壁筋に分泌配列を付加した GFP を発現させると GFP は擬体腔に放出され、放出された GFP は擬体腔に存在するスカベンジャー細胞である Coelomocyte によって取り込まれる (図 4 左)。一方、Coelomocyte において GFP の取り込みに異常



【図 4】線虫における Fluid phase エンドサイトーシスの評価系。上段: 体壁筋に分泌型 GFP を発現するトランスジェニック体の模式図。下段: 実際の蛍光像。偽体腔に存在する Coelomocyte において GFP の取り込みに異常が生じると、偽体腔に GFP 蛍光が蓄積した像が観察される (右下)。

が生じると、GFP が偽体腔に蓄積し、蛍光実体顕微鏡下では線虫全体が GFP を発光したように観察される (Cup: Coelomocyte uptake defective, 図 4 右)。*fat-3* 変異体 (最終脂肪酸 18:3) や *fat-4 fat-1* 変異体 (最終脂肪酸 20:3) では GFP の蓄積は非常に弱い、不飽和結合が 3 つ以上の脂肪酸を合成できない *fat-3 fat-1* 二重変異体 (最終脂肪酸 18:2) ではより強い GFP の蓄積が観察された (表 1)。

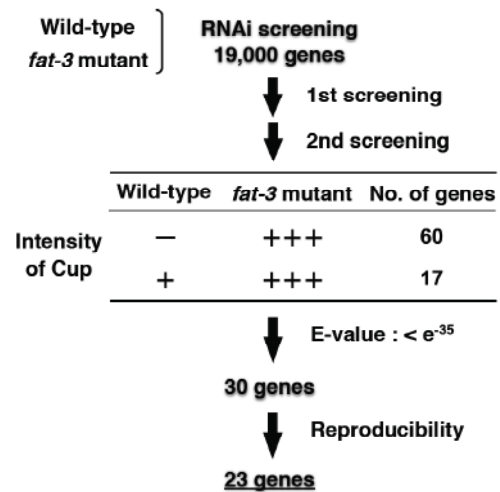
#### *fat-3* 変異体のエンハンサースクリーニング

そこで次に、Cup 異常が低レベルで見られる *fat-3* 変異体を用い、Cup 異常を増強させるエンハンサー遺伝子を探索した。Feeding RNAi により線虫全ゲノム (~19,000 遺伝子) を対象としたスクリーニングを行い、*fat-3* 変異体においてのみ著しい GFP の取り込み異常を引き起こす RNAi クローンを 23 同定した (図 5-7)。

#### PUFA 欠乏により局在が変化する分子の同定: *pure-1*

これらのエンハンサー分子は、PUFA が欠乏した膜環境において機能が減弱している可能性や PUFA 欠乏に伴って生じる異常を機能的に相補している可能性などが考えられる。我々はこれら分子が PUFA 欠乏条件下でどのような影響を受けているかを調べるため、まず膜局在性が予想される分子について、細胞内局在を解析した。

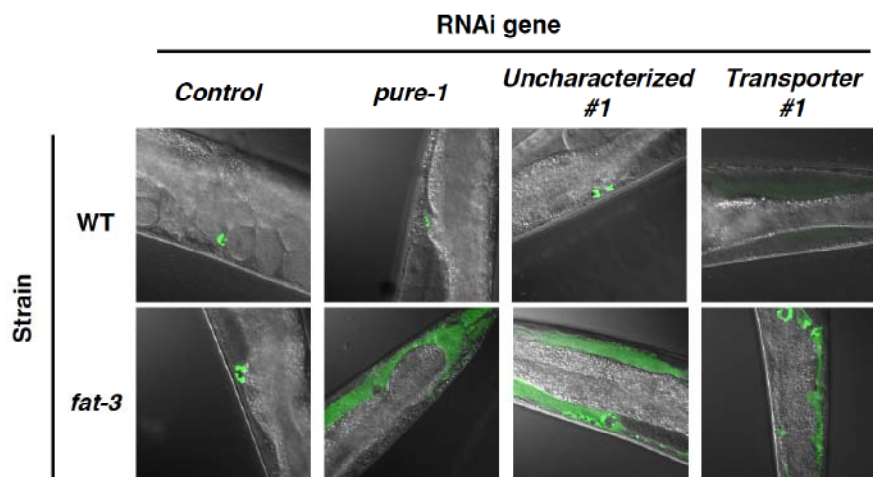
mCherry を付加した各遺伝子を Coelomocyte に発現させ、細胞内局在を調べた結果、*pure-1* (PUFA-**R**equiring gene for normal intracellular localization) と命名した機能未知の膜蛋白質が、PUFA 欠乏に伴い細胞内局在を著しく変化させることを見出した (図 8: 核近傍の小胞体と考えられる局在からリソソーム内腔へと移行)。この細胞内局在の変化は、培地にアラキドン酸や EPA といった PUFA を添加することにより回復することから、*pure-1* の適切な局在維持に PUFA を含む膜環境が必要であると考えられる。



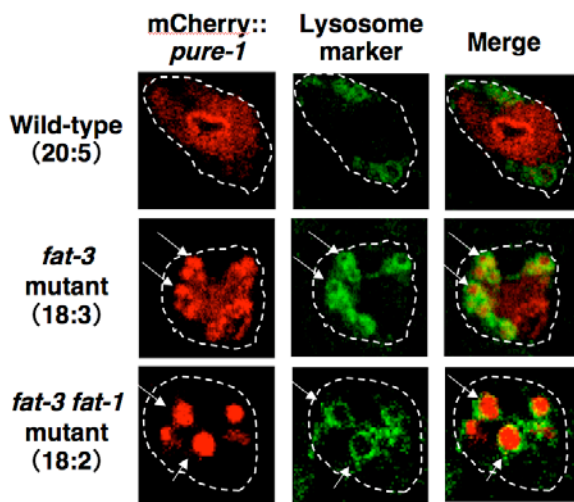
【図 5】 Cup を指標とした RNAi スクリーニングの概要。野生株と比較して、*fat-3* 変異体においてのみ強い Cup を引き起こす RNAi クローンを 77 同定した。このうち、哺乳動物まで高度に保存された遺伝子を 30 遺伝子選択し、さらに再現性よく異常が観察された 23 分子を PUFA 要求性分子とした。

分類	遺伝子数
脂質関連 (うち、PIPs関連)	4 (2)
小胞輸送・細胞骨格	5
トランスポーター	3
核酸関連 (複製・転写)	4
機能未知	2
その他	5

【図 6】 PUFA 要求性分子の分類



【図 7】野生株および *fat-3* 変異体における Fluid phase エンドサイトーシス。得られたエンハンサー遺伝子を発現抑制すると、野生株ではほとんど異常が生じないが、*fat-3* 変異体では擬体腔に蓄積した GFP が観察される。



【図 8】各変異体における *pure-1* の細胞内局在 (Coelomocyte)。括弧内の脂肪酸は各ストレインにおける脂肪酸合成の最終産物を示す。生体膜を構成する脂肪酸の不飽和度が小さくなるに伴い、リソソーム (緑) の内腔へと局在が変化する (矢印)。

1-1)の項で述べたように、我々は、PUFA をホスファチジルイノシトールに導入する脂肪酸転移酵素 *mboa-7*/LPIAT、ならびに PUFA を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)、ホスファチジルセリン (PS) に導入する *mboa-6*/LPLAT を同定している。*fat* 変異体で見られた *pure-1* の局在変化がどのリン脂質の PUFA 欠乏に起因するかを検証するため、各脂肪酸転移酵素の変異体を用いて *pure-1* の局在を調べた。その結果、*mboa-7* 変異体 (PI の PUFA が減少) では変化がみられなかったが、*mboa-6* 変異体 (特に PC の PUFA が減少) では *fat* 変異体と同様に局在変化が観察された。したがって、*pure-1* の適切な局在には PUFA を含む PC が必要であると考えられる。

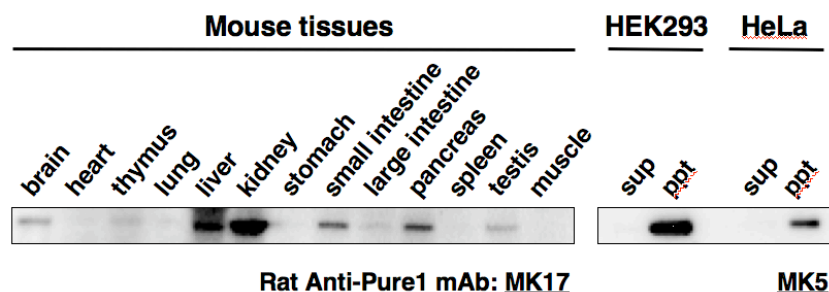
#### *pure-1* 変異体の解析

*pure-1* は線虫から哺乳動物まで進化的に高度に保存された分子であったが、その機能はこれまで解析されていない。我々は *pure-1* の生理機能を解析するため、中台グループの協力を得て *pure-1* の欠損変異体を樹立した。*pure-1* 変異体は生殖不全であり、ホモ接合体で個体を維持す

ることができなかった。また、*pure-1* 変異体は単独変異体でも Coelomocyte において GFP の取り込みに異常を示したことから、Fluid phase エンドサイトーシスに必須の分子であることがわかった。PUFA 欠乏により *pure-1* の細胞内局在が変化すること、また、*pure-1* がエンドサイトーシスに必須の分子であることから、PUFA 欠乏状態におけるエンドサイトーシス異常は、*pure-1* が局在変化により機能低下したことが原因の一つと考えられる。

PUFA 欠乏状態によって引き起こされる膜環境の変化により、膜タンパク質の機能や発現に影響を与えることは十分予想されるが、これまでどのような分子に影響を与えるかはほとんど解析されていなかった。本研究において我々は、線虫 *fat* 変異体を用いた網羅的 RNAi スクリーニングにより、PUFA と機能的に関連する分子を複数同定し、その中から、PUFA 欠乏により局在を変化させる新規膜タンパク質 (*pure-1*) を同定することに成功した。*pure-1* は HEK、HeLa などの培養細胞株に発現しており、また、組織レベルでは、腎臓、肝臓、小腸、膵臓などで発現が確認している (図 9)。今後、*pure-1*

がエンドサイトーシスのどのステップに関与するか、どのような機構で PUFA 含有リン脂質を認識するのかを解析すると共に、哺乳動物における PUFA 欠乏症と本分子の関連についても明らかにしたい。



【図 9】 *pure-1* の組織分布 (左: マウス) と HEK293 細胞、HeLa 細胞における発現 (右)。ラット抗 *pure-1* ヒトモノクローナル抗体によるウェスタンブロット (MK17 はマウスと交差性を示す)。

### 3) 不飽和度の低い脂肪酸を多く含む膜環境形成 (ラフト形成) に関わる分子の解析

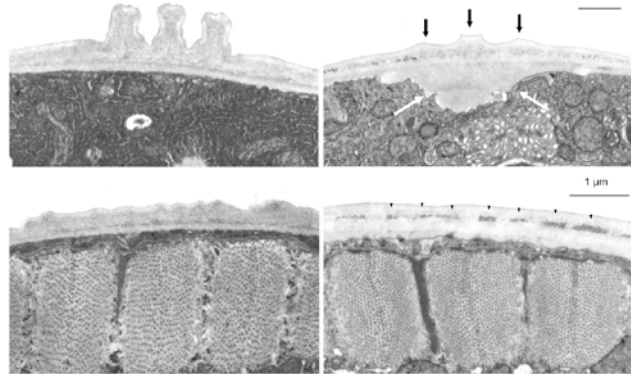
我々は脂肪酸転移酵素ファミリーの系統的解析の中で、飽和脂肪酸など不飽和度の低い脂肪酸に選択性をもつ脂肪酸転移酵素が存在することを見出している (後述)。飽和脂肪酸を豊富に含む膜環境は、スフィンゴ脂質やコレステロールと共に「ラフト」と呼ばれるマイクロドメインを形成し、膜タンパク質や裏打ちタンパク質、シグナル分子を集合させることで効率の良いシグナル伝達を行うと考えられている。我々は「生体膜リン脂質多様性の生物学的意義」を解明する上で、不飽和度の低い脂肪酸に選択性をもつ脂肪酸転移酵素、ならびにそれらと協調的に機能すると考えられるスフィンゴ脂質やコレステロールを含め、包括的に解析していく必要があると考えている。そこで、ラフト様ドメイン構造の形成に関わると考えられる脂肪酸転移酵素、あるいは、スフィンゴ脂質・コレステロール動態に関わる分子に着目し、順次解析を行っていく。21 年度において中台グループは、ラフト形成に重要な役割を果たす極長鎖飽和脂肪酸に着目して解析を行った (Kage-Nakadai E, *et al*, *PLoS ONE*, 2010, *on-line*)。また、新井グループは細胞内のコレステロール分布を規定すると考えられる脂質結合蛋白質群について解析し、ゴルジ体においてコレステロールを要求する SNARE 分子を同定した (Maekawa M, *et al*, *Genes Cells*, 2009、動物細胞を用いた機能解析については投稿中)。以下に中台グループの研究成果を述べる。



## 極長鎖脂肪酸アシルCoAシンテターゼの解析

脂肪酸はその鎖長によって異なるアシル CoA シンテターゼにより CoA を付加され活性化され、極長鎖脂肪酸に関しては FATP (fatty acid transport protein) が CoA 付加を担う。哺乳類では FATP1~6 までの FATP ファミリー分子が存在しており、FATP4 ノックアウトマウスは著しい皮膚障害を示し、出生直後に死亡する。このマウスは、表皮が肥厚してシワがなくなり、皮膚透過性が著しく上昇することが知られており、ヒトの“restrictive dermopathy”と類似した重篤な皮膚疾患を呈する。しかしながら、その分子遺伝学的基盤の全体像は未だ明らかではない。

中台グループは、線虫における2つの FATP 遺伝子 (*acs-20*, *acs-22*) の変異体を作製し、FATP 変異体が表皮のバリアー機能に異常を示すことを見出した(表皮における低分子化合物の透過性の上昇、低浸透圧に対する高感受性)。この表皮バリアー異常は線虫 FATP そのもの、あるいはヒト FATP4 を上皮細胞に導入により回復した。興味深いことに、線虫 FATP 変異体では上皮細胞そのものには異常が見られず、上皮細胞から分泌されるキューティクルの構造に異常が見られた(図 10)。



【図 10】電子顕微鏡写真(左列:野生株、右列:FATP 変異体)。上図:側面上皮部分の断面図。FATP 変異体(右上)では、上皮細胞が分泌したキューティクルによって形成される表皮構造が形成されない(黒矢印)。下図:筋細胞の表層にある上皮-表皮組織。FATP 変異体(右下)では、上皮組織内に電子密度の濃い成分が蓄積している(矢頭)。

また、FATP 変異体では、極長鎖脂肪酸(26:0)のスフィンゴミエリンへの取り込みが減少している(16:0、20:4 の取り込みは変化しない)。

以上の結果から、線虫の FATP 様遺伝子はヒト FATP4 の機能的ホモログであり、線虫においても極長鎖脂肪酸アシル CoA シンテターゼが表皮バリアーに重要であることが明らかとなった。本研究から FATP4 が上皮細胞において機能することが明確に示され、極長鎖脂肪酸を含むスフィンゴ脂質が上皮細胞において細胞外基質の分泌に関与する可能性、あるいはスフィンゴ脂質由来の代謝物(セラミド等)が分泌されてバリア機能を担う可能性が想定された。線虫 FATP 変異体は、極長鎖脂肪酸の生理的意義の解明、また表皮バリアー破綻の病態モデルとして有用なツールとなると考えられる。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. Maekawa M., Inoue T., Kobuna H., Nishimura T., Gengyo-Ando K., Mitani S., and Arai H. (2009) Functional analysis of GS28, an intra-Golgi SNARE, in *C. elegans*. ***Genes Cells*** **14**:1003-1013.  
10.1111/j.1365-2443.2009.01325.x
2. Kage-Nakadai E, Kobuna H, Kimura M, Gengyo-Ando K., Inoue T, Arai H, and Mitani S (2010) Two very long chain fatty acid acyl-CoA synthetase genes, *acs-20* and *acs-22*, have roles in the cuticle surface barrier in *Caenorhabditis elegans*. ***PLoS ONE***, **5**: e8857  
10.1371/journal.pone.0008857