

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06600

研究課題名(和文)ドコサヘキサエン酸の後期エンドソーム特異的リン脂質BMPにおける機能の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of docosahexaenoic acids in late-endosome specific phospholipid BMP

研究代表者

李 賢哲 (LEE, Hyeon-Cheol)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：30758321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：BMPは後期エンドソームの内膜に特異的に存在するリン脂質であり、極めて多くのDHA分子が結合しているが、その生理的意義は分かっていない。研究代表者は、BMPを高感度で測定する脂質測定系を立ち上げ、BMPへのDHA導入に関わる酵素ABHD4の欠損マウスおよび、高度不飽和脂肪酸欠乏モデルマウスであるFADS2欠損マウスの脂質解析を行った。その結果、ABHD4欠損マウス精巣ではDHAを含むBMP分子種が顕著に減少し、FADS2欠損マウス精巣では、BMPに結合する脂肪酸の70%以上を占めるDPAn-6がほぼ消失していた。今後これらのマウスを用い、BMP中のDHAやDPAn-6の生理的意義を解明する。

研究成果の概要(英文)：BMP is an enigmatic phospholipid that is specifically localized in intraluminal vesicles of late endosomes, and is thought to be essential for proper functions of late endosomes. BMP has a propensity to incorporate an omega-3 fatty acid DHA, and DHA is highly enriched in BMP. However, the physiological meaning of this DHA-containing BMP fatty acyl species is unknown, mainly due to the fact that biosynthetic enzymes of BMP have not been identified so far. A non-targeted lipidomic analysis on knockout mouse organs of a lipid metabolizing enzyme recently identified a sought-after enzyme for the biosynthesis of BMP. The knockout organs exhibited reduced levels of DHA-containing BMP species. Furthermore, in testes from a recently generated PUFA-deficient mouse model, DPAn-6, which usually constitutes more than 70% of fatty acids in BMP, was nearly depleted. These mouse models seem to be very useful to reveal physiological roles of the unique fatty acyl composition of BMP.

研究分野：脂質生化学

キーワード：ドコサヘキサエン酸 リン脂質 後期エンドソーム BMP 脂質 DHA DPAn-6

1. 研究開始当初の背景

(1) ドコサヘキサエン酸 (DocosaHexaenoic Acid; 以下 DHA) は、様々な疾患・病態に対し、予防・治療効果を示す 3 脂肪酸であり、サプリメントとしても人気のある重要な栄養素の一つである。特に炎症を基盤病態とする疾患に対する作用については、近年になって同定された Resolvin や Maresin, Protectin などの抗炎症性作用を有する DHA 由来の脂質メディエーターが寄与していると考えられている。DHA はまた、脳神経系の発達や精子形成などに必須であることが知られているが、このように脂質メディエーターでは説明出来ないその他の多くの生理作用については、生体膜やリン脂質の「質」を構成因子として制御することで発揮されると考えられる。しかし、DHA がリン脂質の質や機能にどのように寄与するかについては、ほとんど分かっていないのが現状である。

(2) BMP (Bis(monoacylglycerol)phosphate; 別名 LBPA) は、後期エンドソームの内膜に特異的に存在するリン脂質であり、脂質やタンパク質の輸送・分解等の後期エンドソームの機能や内膜構造の形成に必要不可欠であると考えられている。BMP には極めて多くの DHA 分子が結合していることが知られており、DHA の生理作用に深く関係していると考えられるが、その生理的意義はこれまで分かっていない。その主な原因として、DHA が BMP へ取り込まれる過程を含め、BMP の生合成経路を担う分子の実体が全くと言ってよいほど分かっておらず、それらの機能を阻害した細胞や動物モデルを用いた研究が、これまで出来ていなかったことが挙げられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究の第一の目的は、DHA の BMP への取り込みに関わる遺伝子を同定し、その遺伝子欠損動物を作製することで、DHA が BMP に豊富に含まれる生理的意義を解明するにあたり適した新規動物モデル・実験ツールを樹立することである。それと同時に、体内の DHA 量そのものが著しく減少するような動物を作製し、特定のリン脂質中の DHA が減少した際に、それに起因する病態や表現型が顕著になるような DHA 欠乏モデルの作製についても合わせて行う。

(2) さらに、作製した動物モデルの個体レベルにおける表現型を詳細に解析することで、後期エンドソームの内膜に特異的に存在する BMP に DHA が豊富に含まれる生理的意義の解明を目指す。これを通して「DHA が何故体に良いのか」、その生理作用の一端を分子レベルで説明することを試みる。

3. 研究の方法

(1) BMP は別のリン脂質であるホスファチジルグリセロール (Phosphatidylglycerol; 以

下 PG) の構造異性体であり、同じ質量を有することから質量分析計を用いた解析においてしばしば混同される。さらに、化学的性質も酷似していることから、多くの高速液体クロマトグラフィーを用いた脂質分離の実験系において、PG と極めて近い溶出時間に溶出されるため、分離が困難である¹。そこでまず、分離能に優れた超高速高分離液体クロマトグラフィー (UPLC テクノロジー) を用いて PG と BMP を区別して測定することが可能な脂質測定系を立ち上げ、BMP に含まれる脂肪酸分子種を正確かつ網羅的に測定することが出来る体制を構築する。

(2) 申請者は以前、*N*-アシルリン脂質の代謝酵素として同定されていた酵素である ABHD4 のノンターゲットリピドミクス解析²の過程で、ABHD4 が BMP 中の DHA 量を制御する酵素であることを見出していた。そこでまず、ABHD4 欠損マウスが作製された米国スクリプス研究所より ABHD4 欠損マウスを搬入する。また、これまでの解析から ABHD4 は脳や精巣など、特定の臓器に発現が限局していることが判明している。そこで、ABHD4 の発現が比較的高い臓器に着目し、ABHD4 欠損マウスにおいて BMP の脂肪酸分子種が野生型と比較してどのように変動しているか、詳細な脂質解析を行う。

(3) これまで様々な研究グループから、生体内における DHA の生理機能を解明する目的で DHA を欠乏したモデル動物が作製されてきた³⁻⁵。これらの解析から、特に DHA が豊富に含まれる神経系や精巣といった組織においては強力な DHA の保持機構が備わっており、例えばマウスにおいては DHA 欠乏状態下においても胎児期における母親由来の DHA が生後数ヶ月を経ても高濃度で残存していることが明らかになっている³。このような背景から、*Abhd4* 遺伝子単独の欠損個体においては、組織 BMP 中に DHA が残存し、顕著な表現型が見られない可能性が考えられた。そこで、DHA 欠乏モデルとして、*Fads2* 遺伝子の欠損マウスの作製を試みる。 $\Delta 6$ 不飽和化酵素である FADS2 の欠損マウスは高度不飽和脂肪酸の生合成における二段階の $\Delta 6$ 不飽和化酵素活性を欠失するため、リノール酸およびリノレン酸以降の高度不飽和脂肪酸の生合成が出来ないのみならず、DHA やドコサペンタエン酸 (DocosaPentaenoic Acid; 以下 DPAn-6) の生合成に必要な最終反応である $\Delta 6$ 不飽和化も出来ない (Fig. 1A)。これにより、表現型がどの高度不飽和脂肪酸の欠乏に起因するかを一義的に調べる事が出来るため、非常に有用な高度不飽和脂肪酸欠乏モデルマウスである (例えばエイコサペンタエン酸 (EicosaPentaenoic Acid; EPA) を食べさせるレスキュー実験を行う際に、代謝的に下流の DHA に代謝されないため EPA のレスキュー効果のみを調べることが出来る)。この *Fads2*

遺伝子欠損マウスを用いることで、観察される病態や表現型が、DHA に起因するものであるか、判断することが出来る。

4. 研究成果

(1) まず、研究代表者が所属している研究室が保有している Waters 社製のタンデム四重極型質量分析計 (Xevo TQ-S micro) を用いて、PG と BMP を区別して測定することが可能な脂質測定系を立ち上げた。この液体クロマトグラフィーの系では、測定対象とした全ての BMP 脂肪酸分子種が PG の脂肪酸分子種よりも早い溶出時間で溶出され、PG と BMP を明確に区別して定量することが可能であった。さらに、ホスファチジルコリン等の他のリン脂質やリゾリン脂質、トリアシルグリセロール等の中性脂質、脂溶性のビタミン類にも、この測定系は適用可能であった。以下に述べる実験においては、今回立ち上げた脂質測定系 (現在も改良を重ねている) を用いて各マウス臓器におけるターゲットリポミクス解析を行っている。また、網羅的な脂質解析 (ノンターゲットリポミクス解析) やイオンモビリティ機能による BMP の高感度な分離・測定⁶ が可能な質量分析計 (Vion IMS QTof) が所属研究機関に最近導入され利用可能であることから、今後の解析に積極的に応用し、予期し得なかった新たな発見に繋がっていきたいと考えている。

(2)

マウスの臓器においては、ABHD4 は神経系 (脳や脊髄) や精巣に高発現していることがこれまでの研究から判明していた²。しかしながら、ABHD4 の高発現する培養細胞モデルはこれまで見出されておらず、そのため細胞レベルの実験で ABHD4 の機能解析をすることがこれまで出来ていなかった。そこで、保有する様々なヒト由来またはマウス由来の培養細胞を調べ、ABHD4 を高発現する培養細胞が存在するか探索した。ABHD4 の発現を調べるにあたっては、セリンヒドロラーゼ酵素ファミリーの活性を可視化することが出来るケミカルバイオロジー手法である Gel-based ABPP (Activity-based Protein Profiling) を用いた²。探索の結果、ヒト由来の細胞では、前立腺がん由来の培養細胞である LNCaP 細胞や PC-3 細胞、DU145 細胞において、ヒト ABHD4 が高発現することが明らかになった。さらに、マウス由来の細胞では、精原細胞由来の GC-1 細胞と、初代培養細胞である MEF (マウス胎児線維芽細胞) において高発現が見られた。以前に開発された ABHD4 の特異的阻害剤をこれらのうちのいくつかの培養細胞に処理し、BMP の脂肪酸分子種を解析したところ、上記のヒト由来前立腺がん細胞では、ABHD4 阻害剤処理によって BMP 中の DHA 含有脂肪酸分子種のみが顕著に減少した。このことから、ヒトにおいても ABHD4 が BMP 中の DHA 量を規定する酵素であること

が明らかになった。今後、これらの培養細胞を用いることで、BMP 中の DHA が果たす役割を培養細胞レベルで調べることが可能であると考えている。

次に、同様の手法 (Gel-based ABPP) を用いてマウスの神経系と精巣以外の臓器のうち、ABHD4 を高発現する臓器がないか探索した。その結果、ヒト培養細胞と同様に前立腺においても高発現していた。また、副腎においても高発現していることが分かった。今後、これらの臓器においても脂質解析を行い、顕著な BMP 脂肪酸分子種の変動があるか調べる。顕著な変動が観察された場合は、それぞれの臓器の形態や機能が損なわれていないか、表現型解析を行っていく。

次に、ABHD4 の発現が高い脳において、BMP の脂肪酸分子種を解析した。面白いことに、マウス脳は精巣に次いで ABHD4 の発現が高い臓器であるにも関わらず、通常条件下では BMP 中の DHA 分子種の量に変動は見られなかった。脳は体内で最も DHA 量が豊富な臓器であることが知られており、前述した DHA 量を維持しようという保持機構についても、おそらく最も強力に働いていると考えられる。このことから、脳においては DHA が過剰に存在し飽和していることにより、BMP 中の DHA 量に変化が見られない可能性が考えられた。また、脳に存在する様々な細胞のうち、どの細胞に ABHD4 が高発現しているかについても分かっていなかった。そこで、神経細胞およびアストロサイトの初代培養細胞系を用いて、ABHD4 の発現や BMP 中の脂肪酸分子種組成への寄与を調べた。その結果、ABHD4 は主にアストロサイトに高発現していることが分かった。また、この初代培養アストロサイトに ABHD4 阻害剤を添加したところ、DHA を含む BMP 分子種のみが顕著な減少を示した。これらのことから、マウス脳において ABHD4 は主にアストロサイトに高発現すること、並びに、脳 (アストロサイト) においても ABHD4 は BMP 中の DHA 量を規定する酵素であることが分かった。マウスから抽出した脳の脂質解析で BMP 中の DHA 量に顕著な変化が見られなかったことに関しては、前述したように DHA 量が脳において過剰に存在するためである可能性が考えられることから、後述する DHA 欠乏モデルと掛け合わせて今後さらなる脂質解析を行っていく予定である。

ABHD4 が最も高発現するマウス精巣における BMP の脂肪酸分子種を詳細に調べた。以前の報告から、ラット精巣においては例外的に DHA ではなく DPAn-6 が最も多く BMP 中に存在する脂肪酸であることが分かっていた⁷。実際に、マウスにおいても精巣の BMP に結合している脂肪酸は、70%以上が DPAn-6 であった (DHA は次いで多かった)。ABHD4 欠損マウス精巣の BMP の脂肪酸分子種を調べたところ、

DHAを含むBMP分子種の量が欠損マウスではおよそ半分程度に減少していた。一方、DPA n-6を含むBMP分子種は二割程度の減少に留まっていた。このことから、ABHD4はBMPへ取り込まれる高度不飽和脂肪酸のうち、DHAに特に高い選択性を有することが明らかになった。

(3) 前項で述べたように、DHAが非常に多く存在する脳においては、ABHD4を欠損しても臓器レベルでBMP中の脂肪酸分子種の量に変動が見られない。このことから、生体内でDHAが減少するような高度不飽和脂肪酸欠乏動物モデルの作製が必要であると考えられた。そこで、当大学で稼働しているCRISPR/Cas9システムを用いて $\Delta 6$ 不飽和化酵素であるFADS2の欠損マウスの作製を試みた。開始コドンターゲットとして作製を試みたところ、2ラインが樹立された。片方のラインは開始コドンが欠失し、もう片方のラインは開始コドン直後の数十塩基が欠失していたが、樹立された欠損マウスの両方由来の臓器を脂質解析したところ、FADS2の酵素産物であるアラキドン酸等の高度不飽和脂肪酸が著しく減少し、基質であるリノール酸が蓄積していたことから、両方のラインにおいてFads2遺伝子の機能が欠失していることが明らかになった。

このFADS2欠損マウスにPUFA欠乏食を1ヶ月だけ食べさせたマウスの脂質組成を調べたところ、アラキドン酸は調べた全ての臓器において大幅に減少していた (Fig. 1B)。一方、DHAは肝臓や腎臓ではアラキドン酸と同様に大幅な減少が見られたのに対し、脳や網膜、精巣といった組織ではあまり減少していなかった (Fig. 1C)。これは既報通り、脳や網膜、精巣といったDHA含量が多い組織においては、強力なDHA保持機構が存在し、DHAをこれらの臓器から枯渇させるためにはより長期間 (4~5ヶ月) のPUFA欠乏食投与が必要であるためであると考えられる (実験準備中)。面白いことに、このFADS2欠損マウスの精巣のBMPでは、野生型では通常結合する脂肪酸の70%以上を占めるDPA n-6が、ほぼ消失してしまうことが分かった (Fig. 1D)。これらのマウスモデルの特に精巣においては、従来BMPのほとんどを占めるDPA n-6 (FADS2欠損マウス) やDHA (ABHD4欠損マウス) が枯渇していることから、BMPの正常な機能が著しく損なわれている可能性が考えられる。今後、これらのマウスを掛け合わせた二重欠損マウスを作製することで、DHAやDPA n-6等の高度不飽和脂肪酸を含むBMPの役割を解明出来ると考えている。

以上述べた研究成果により、高度不飽和脂肪酸、特にDHAやDPA n-6といった機能性の脂肪酸が、後期エンドソームの内膜に特異的に存在するBMPに何故豊富に存在するか、その謎を解くにあたって鍵となる動物モデル

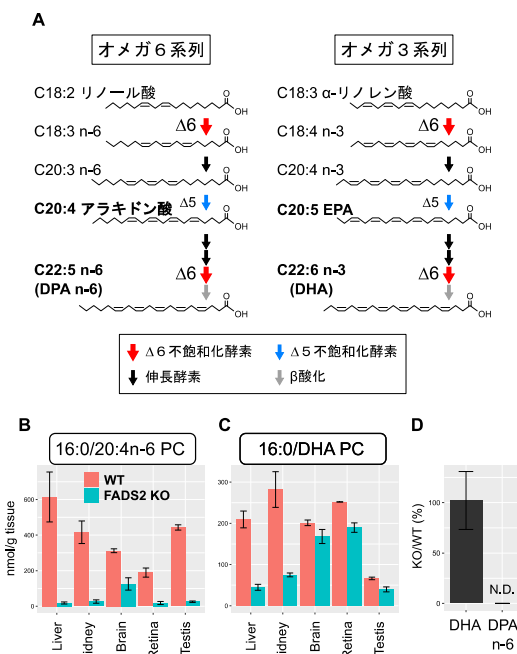


Fig. 1 (A) PUFAの生合成経路。FADS2欠損マウスでは2段階の $\Delta 6$ 不飽和化反応が起こらないため、PUFA欠乏となる。(B) 各臓器におけるPC中のアラキドン酸量 (16:0/20:4n-6)、および (C) DHA量 (16:0/DHA)を示した。(D) FADS2欠損マウス精巣ではBMP中のDPA n-6がほぼ消失した。N.D.; not detected.

が構築された。DHAに関しては栄養学的、疫学的な研究は数多くなされているものの、分子メカニズムに迫る研究はごく一部である。本研究は「DHAが何故体に良いのか」を分子レベルで説明できる研究であり、今後の研究の進展が期待される。

一方、DPA n-6に関してはこれまであまり注目されておらず、個別の生理的役割については研究が進んでいない。一般的にDPA n-6は、DHAと構造や生体内における分布が近いことから、DHAに対して補助的な役割を担うと考えられている。しかし、精巣のBMPにおいてDPA n-6はDHAをはるかに凌駕して多く存在しており、この脂肪酸分子種の偏りの生理的意義は何なのか、非常に興味深い。本研究の今後の進展によってDHAにはないDPA n-6に固有の機能についても研究が進む可能性がある。

さらに、ABHD4が高発現する培養細胞についても見出しており、培地中の脂肪酸組成を調節することにより (DHAなどの高度不飽和脂肪酸を除いた培地を使う等) 個体レベルと同様の状況を培養細胞レベルで再現することが可能であると考えられる。今後、個体レベルで見出される表現型の分子メカニズムをより詳細に解析するにあたり、これらの細胞モデルが重要であると考え、解析を進めていく所存である。

<引用文献>

- Meikle PJ, Duplock S, Blacklock D, 他. *Biochem J.* **411**, (2008), 71-78.
- Lee HC, Simon GM, Cravatt BF.

- Biochemistry* **54**, (2015), 2539-2549.
3. Stroud C, Nara T, Roqueta-Rivera M, 他.
J. Lipid Res. **50**, (2009), 1870-80.
4. Stoffel W, Holz B, Jenke B, 他. *EMBO J.*
127, (2008), 2281-92.
5. Zadavec D, Tvrdek P, Guillou H, 他. *J. Lipid Res* **52**, (2011), 245-255.
6. Hankin JA, Murphy RC, Barkley RM, Gijón MA. *Int. J. Mass Spectrom.* **378**, (2015), 255-263.
7. Luquain C, Dolmazon R, Enderlin JM, 他. *Biochem J.* **351**, (2000), 795-804.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

N-アシルリン脂質代謝酵素 ABHD4 の生化学的解析および脂質解析. 李賢哲^{1,2}, クラヴァット ベンジャミン², 横溝岳彦¹ (1.順大・医・生化学第一講座, 2.スクリプス研究所)、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25 日～27 日、仙台(口頭、ポスター)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

李 賢哲 (LEE, Hyeoncheol)

順天堂大学・医学研究科・助教

研究者番号：30758321