

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14957

研究課題名(和文)リン脂質のリサイクル

研究課題名(英文)Phospholipid recycling

研究代表者

村上 誠 (MURAKAMI, Makoto)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・参事研究員

研究者番号：60276607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：コリンは栄養素として外因性に供給される以外に、細胞膜ホスファチジルコリン(PC)の分解からも生じるが、本代謝経路を担う酵素の実体と意義は不明であった。我々は脂質代謝酵素PNPLA8(ホスホリパーゼA)とPNPLA7(リゾホスホリパーゼ)の欠損マウスの解析を通じて、PNPLA8-PNPLA7経路が肝臓においてPCから内因性コリンを動員する主経路であることを明らかにした。本経路が遮断されるとコリン及びその下流代謝物が激減し、成長遅延、早老、白色脂肪褐色化、低血糖、VLDL低下、ケトン体増加、脂肪肝、神経変性を発症する。本研究は、PCのリサイクル利用の生物学的重要性を初めて明らかにしたものである。

研究成果の概要(英文)：Choline, an essential nutrient, is supplied from the diet as well as via the liberation from its largest endogenous pool, phosphatidylcholine (PC), by the sequential action of phospholipase A (PLA), lysophospholipase, and glycerophosphodiesterase. Here we show that PNPLA7, a member of the PLA family, functions as a lysophospholipase responsible for the hepatic PC degradation machinery that provides glycerophosphocholine (GPC) and thereby choline in the liver. Pnpla7^{-/-} mice showed a drastic reduction in hepatic choline metabolites, displaying growth retardation, short life span, hypoglycemia with mild ketosis, profound reduction in fat mass with “browning” of white adipocytes, and neurodegeneration. Moreover, we identified PNPLA8 as an upstream PLA subtype that supplies the substrate lysophosphocholine to PNPLA7. Our study reveals the PNPLA8-PNPLA7 axis as a critical component of the PC-catabolic pathway required for hepatic choline metabolism and systemic energy homeostasis.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：酵素 細胞・組織 脂質 生体分子 肝臓 代謝 遺伝子改変マウス メタボローム

1. 研究開始当初の背景

GPC は母乳中に豊富に存在し、栄養学的には成長ホルモン分泌促進、認知症改善、肝機能障害改善、浸透圧調節などの作用がある。GPC はコリン骨格を持ち、コリン補給剤としても利用される。コリンは、①メチル基の供給源、②アセチルコリンの前駆体、③細胞膜リン脂質 PC の構成要素、として生命維持に重要である。食餌から摂取されたコリンは、Kennedy 経路または PEMT 経路を通じてホスファチジルコリン (PC) に生合成され、生体に存在するコリンの実に約 95% は PC の形で生体膜に蓄えられている。栄養素として摂取される外因性コリンに加えて、生体には内因的に生体膜 PC からコリンを動員する代謝経路が存在すると考えられてきた。すなわち、細胞膜 PC の二本の脂肪酸鎖がホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) とリゾホスホリパーゼの作用により連続的に加水分解を受けると GPC を生じ、これにホスホジエステラーゼ (GDE) が作用するとコリンを生じる (図 1)。しかしながら、PC からコリンを取り出す一連の反応 (内因性コリン動員経路) に関わる酵素の実体やその生理的意義は不明であった。

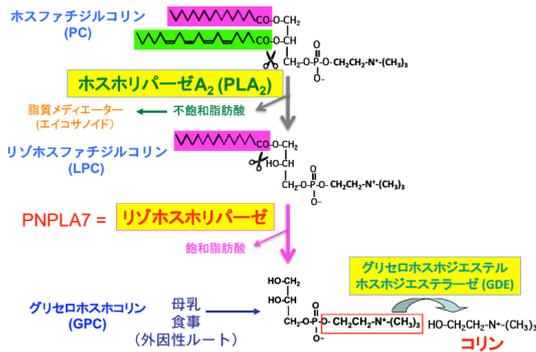


図 1 リン脂質からの内因性コリン動員経路

2. 研究の目的

代表者は、PLA₂ 分子群の網羅的解析の過程で、機能未知のサブタイプ (PNPLA7) がリゾホスファチジルコリン (LPC) → GPC の代謝を担うリゾホスホリパーゼとして働くこと、さらにその欠損マウスがコリン欠乏に起因すると思われる重篤な表現型を示すことを見出した。本研究ではこれを契機として、リゾホスホリパーゼを基軸とした内因性コリン動員経路の全体像を解明するとともに、膜リン脂質からのコリンの動員とその再利用 (リン脂質リサイクル) に関する新規概念を創成することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、各種 PLA₂ 欠損マウスに様々な病態モデルを施し、その表現型を解析した。影響を受けている組織について、質量分析により脂質プロファイリングや低分子化合物プロファイリングを行った。遺伝子発現は定

量的 PCR (qPCR) やマイクロアレイにより調べた。初代培養系を用いた細胞レベルでの解析やリコンビナント酵素を用いた基質特異性の検討を行った。各論に対応する研究方法の詳細は以下の研究成果の中で言及する。

4. 研究成果

(1) PNPLA7 欠損マウスの代謝異常

代表者は、iPLA₂/PNPLA ファミリーに属する機能未知分子 PNPLA7 がリゾホスファチジルコリン (LPC) を基質として GPC と脂肪酸に加水分解するリゾホスホリパーゼ活性を持つこと、また絶食により肝臓、脂肪組織、骨格筋などのエネルギー代謝組織で発現誘導されることを見出した。そこで、全身で PNPLA7 を欠損させた *Pnpla7*^{-/-}マウスを作成した。*Pnpla7*^{-/-}マウスでは肝臓の GPC が激減し、脂肪肝様空胞形成が認められたほか、脂肪組織退縮、背骨湾曲、成長不良、低血糖、体温低下、高ケトン血症などの重篤な表現型を示し、生後 2~3 ヶ月で死亡した (図 2)。肝臓においてコリン、ベタイン、メチオニンなどのメチル基供与体が不足すると、リポタンパク質の構成成分である PC を十分に合成できず、VLDL として分泌されるべき中性脂質が肝臓に滞留して脂肪肝になることが知られている。実際に、*Pnpla7*^{-/-}マウスの肝臓ではコリン、ベタイン、PC が顕著に減少しており、このため VLDL を分泌できず脂肪肝様形態を示し、更に脂肪が全身組織に分配されないことで脂肪退縮が生じるものと考えられた。また、欠損マウスの白色脂肪組織では細胞自律的に褐色化 (beige 化) が進行し、脂肪消費型の脂肪細胞に形質転換していることがわかった (図 3)。これらの所見と合致して、欠損マウスでは栄養失調応答性ホルモン FGF21 の発現が増加していた。さらに、*Pnpla7*^{-/-}マウスより調整した初代培養肝細胞を高濃度コリン・メチオニン含有培地中で培養すると、FGF21 の発現は正常レベルに回復した。以上より、PNPLA7 は膜リン脂質から内因性コリンを動員する代謝経路を担う酵素であり、この経路が生体の代謝恒常性維持に極めて重要であることが初めて明らかとなった。

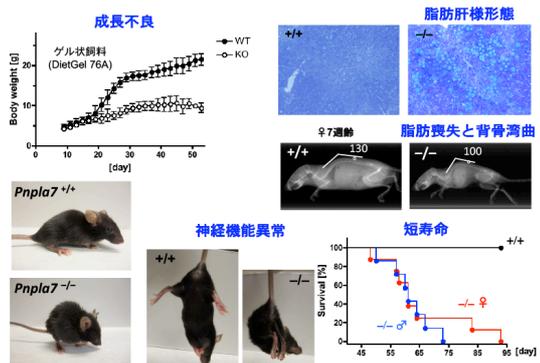


図 2 *Pnpla7*^{-/-}マウスの主な表現型

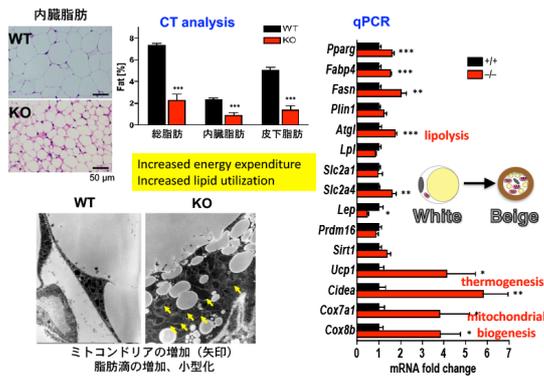


図3 *Pnpla7*^{-/-}マウスの脂肪退縮・ベージュ化の表現型

(2) PNPLA7 欠損マウスの神経異常

上述の代謝異常に加えて、*Pnpla7*^{-/-}マウスは反射・行動異常を示した(図2)。そこで脳を組織学的に調べたところ、*Pnpla7*^{-/-}マウスでは大脳皮質の菲薄化や海馬(特にCA3領域)の神経脱落が認められた。脳内代謝物を質量分析イメージングにより可視化すると、脳内のGPCの減少とGPCの前駆体であるLPCの増加が確認された。また、*Pnpla7*^{-/-}マウスの脳ではコリン由来の神経伝達物質アセチルコリンが低下しており、さらにこれに加えてATPの減少とAMPの増加が顕著であった。以上の結果から、PNPLA7の欠損により脳内の内因性コリンの動員が低下し、アセチルコリン合成やエネルギー代謝が著しく損なわれることが明らかとなった。

(3) PNPLA7 上流で働く PLA₂ の同定

PNPLA7の上流でPCからLPCを産生するPLA₂の探索を行った。代表者が所有するPLA₂分子群の欠損マウスのうち、PNPLA8(*iPLA2γ*)を欠損するマウス(*Pnpla8*^{-/-})が*Pnpla7*^{-/-}マウスと極めて類似の表現型(脂肪組織退縮、背骨湾曲、成長不良、低血糖、体温低下、神経変性など)を示すことが判明した。さらに*Pnpla8*^{-/-}マウスにおいても肝臓のコリン・メチオニン代謝経路の代謝物が著減し、*Pnpla7*^{-/-}マウスと類似の遺伝子発現変動が生じていることが明らかとなった(図4)。したがって、PNPLA8→PNPLA7経路が肝臓において膜リン脂質(PC)から内因性コリンを動員する主経路であると結論した(図5)。

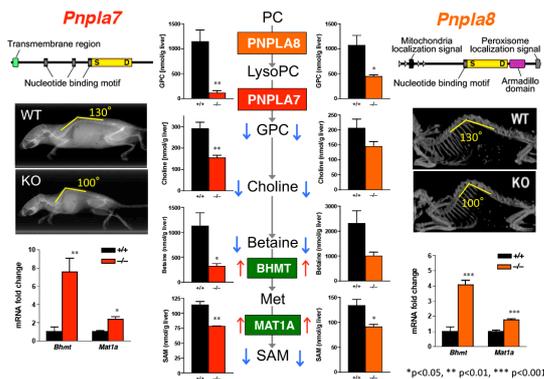


図4 *Pnpla7* 欠損と *Pnpla8* 欠損の類似性

(4) コリン動員経路の全貌解明に向けて

PNPLA7の欠損により肝臓のGPCは90%近く減少するが、他の臓器におけるGPCの減少は軽微であった。このことは、PNPLA7以外にもGPCの産生に関わるリゾホスホリパーゼが存在することを示唆している。そこで、PNPLA7と構造上最も類縁であるPNPLA6に着目し、そのコンディショナル欠損マウス(*Pnpla6*^{fllox/fllox})を作出した。PNPLA6とPNPLA7は臓器特異的にGPCを産生しているものと予想している。また、PNPLA7の下流でGPCからコリンを取り出す酵素GDEにも着目した。GDEには7種のアイソザイムが存在するが、このうちGDE5の発現が*Pnpla7*^{-/-}マウスの肝臓で顕著に増加していたことを糸口として、CRISPR/Cas9系によりGDE5欠損マウス(*Gde5*^{-/-})を作出した。

(5) 結論と展望

本研究は、内因性コリン動員経路の重要性の証明、リゾホスホリパーゼの生理的役割の発見、脂質メディエーターに依存しないPLA₂の新しい機能の解明、リン脂質リサイクルの新規概念の創成などの複数の観点から、基礎学術的に大きな意義を持つものである。今後は上述の*Pnpla8*^{-/-}、*Pnpla7*^{-/-}マウスに加えて、新規に樹立した*Pnpla6*^{fllox/fllox}、*Gde5*^{-/-}マウス、更にはPNPLA8の類縁酵素PNPLA9(*iPLA2β*)の欠損マウス(*Pnpla9*^{-/-})を駆使して、本代謝経路の全体像を解明したい(図5)。

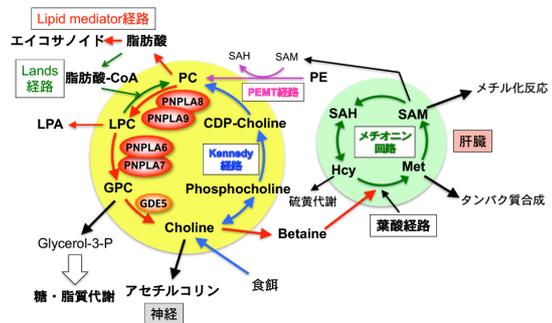


図5 リン脂質のリサイクル

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6件)

- 1) 村上誠. 細胞膜のリン脂質二重膜から局所ホルモンが産み出される仕組み. 生物の科学・遺伝. 71, 163-169, 2017. 査読無 http://www.nts-book.co.jp/item/detail/summary/bio/20051225_42bk.html
- 2) Hirabayashi, T., Anjo, T., Kaneko, A., Senoo, Y., Shibata, A., Takama, H., Yokoyama, K., Nishito, Y., Ono, T., Taya, C., Muramatsu, K., Fukami, K., Muñoz-Garcia, A., Brash, A.R., Ikeda, K., Arita, M., Akiyama, A.,

- *Murakami, M. PNPLA1 has a crucial role in skin barrier function by directing acylceramide biosynthesis. *Nat. Commun.* 8, 14609, 2017, 査読有
doi: 10.1038/ncomms14609.
- 3) Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, H., Murase, R., Taketomi, Y., *Murakami, M. *Methods Enzymol.* 583, 101-117, 2017, 査読有
doi: 10.1016/bs.mie.2016.09.007.
 - 4) Murase, R., Sato, H., Yamamoto, K., Ushida, A., Nishito, Y., Ikeda, K., Kobayashi, T., Yamamoto, T., Taketomi, Y., *Murakami, M. Group X secreted phospholipase A₂ releases ω-3 polyunsaturated fatty acids, suppresses colitis and promotes sperm fertility. *J. Biol. Chem.* 291, 6895-6911, 2016, 査読有
doi: 10.1074/jbc.M116.715672.
 - 5) 佐藤弘泰, *村上誠. ホスホリパーゼ A₂ と肥満. 糖尿病・代謝・内分泌 Annual Review 2016. 中外医学社, 94-103, 2016. 査読無
<http://www.chugaiigaku.jp/item/detail.php?id=1819>
 - 6) 平林哲也, *村上誠. ホスホリパーゼ A₂ と神経疾患. 実験医学増刊—脂質疾患学. 33, 134-139, 2015. 査読無
<https://www.yodosha.co.jp/yodobook/book/9784758103497/>

[学会発表] (計 14 件)

- 1) 平林哲也, 毛利美紗, 平家圭奈子, 徳岡涼美, 池田和貴, 中田理恵子, 北芳博, 村上誠. 肝臓における新規ホスファチジンコリン分解経路の代謝恒常性における役割. 第 89 回日本生化学会. 2016. 9. 27. 仙台国際センター (宮城県仙台市)
- 2) Irie, A., Yamamoto, K., Murakami, M. Phosphatidylethanolamine dynamics in osteoclast fusion. The 14th IGAKUKEN International Symposium: Igakuken Summit for Japan and Korea Science Leaders 2016. 2016. 7. 1. 東京都医学総合研究所 (東京都世田谷区)
- 3) Murakami, M. Lipid metabolism in health and disease. 14th IGAKUKEN International Symposium: Igakuken Summit for Japan and Korea Science Leaders 2016. 2016. 7. 1. 東京都医学総合研究所 (東京都世田谷区)
- 4) Hirabayashi, T., Mouri, M., Shimamura, T., Yokoyama, K., Murakami, M. PNPLA7 lysophospholipase is required for normal hepatic choline metabolism and systemic energy homeostasis. The 14th IGAKUKEN International Symposium: Igakuken Summit for Japan and Korea Science Leaders 2016. 2016. 7. 1. 東京都医学総合研究所 (東京都世田谷区)
- 5) Hirabayashi, T., Mouri, M., Tokuoaka, S.M., Kita, Y., Nakata, R., Ikeda, K., Murakami, M. PNPLA7-mediated catabolic pathway for phosphatidylcholine has a crucial role in hepatic choline metabolism and systemic energy homeostasis. The 7th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators. 2016. 5. 19-20. La Jolla (米国)
- 6) Murakami, M. Novel roles of the phospholipase A₂ family in metabolic regulation. The 7th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators. 2016. 5. 20. La Jolla (米国)
- 7) 村上誠. 脂質代謝の新しいパラダイム. 脂質代謝の基礎と臨床研究会. 2016. 3. 7. ホテル日航新潟 (新潟県新潟市)
- 8) 村上誠. Lipoquality regulation by the phospholipase A₂ family. BMB2015. 2015. 12. 4. 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- 9) 平林哲也, 毛利美紗, 平家圭奈子, 三田村涼美, 池田和貴, 中田理恵子, 北芳博, 村上誠. PNPLA7 を介した肝臓におけるコリン代謝経路の役割. BMB2015. 2015. 12. 1. 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- 10) 村上誠. ホスホリパーゼ A₂ 分子ファミリーを起点とした脂質代謝の新しいパラダイム. 第 27 回高遠シンポジウム. 2015. 8. 27. 比叡山延暦寺会館 (滋賀県大津市)
- 11) Hirabayashi, T., Mouri, M., Shimamura, T., Ikeda, K., Nakata, R., Murakami, M. PNPLA7-mediated production of glycerophosphocholine from lysophosphatidylcholine has a pivotal role in hepatic choline metabolism and systemic energy homeostasis. FASEB Summer Research Conference on Lysophospholipids and Related Mediators. 2015. 8. 23-28. Banff (Canada)
- 12) 村上誠. ホスホリパーゼ A₂ 分子ファミリーが制御する代謝・循環器疾患の新しいパラダイム. 第 16 回 AB カンファレンス. 2015. 8. 2. ホテル日航東京 (東京都港区)
- 13) Murakami, M., Sato, H., and Taketomi, Y. Phospholipase A₂-driven lipid networks in atherosclerosis and metabolic disease. 第 47 回日本動脈硬化学会総会. 2015. 7. 9. 仙台国際センター (宮城県仙台市)
- 14) 平林哲也, 毛利美紗, 三田村涼美, 池田和貴, 中田理恵子, 北芳博, 村上誠. 肝臓コリン代謝における新規リン脂質代謝酵素 PNPLA7 の役割. 第 22 回肝細胞研究会. 2015. 6. 4. 米子コンベンションセンター (鳥取県米子市)

[図書] (計 2 件)

- 1) Yokomizo, T., Murakami, M. Bioactive Lipid Mediators: Current Reviews and Protocols. Springer, 2015, 426 ページ
- 2) 村上誠, 横溝岳彦. 実験医学増刊: 脂質疾患学. 羊土社, 2015, 222 ページ

[産業財産権]

なし

[その他]
○研究室ホームページ
<http://www.igakuken.or.jp/lipid/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 誠 (MURAKAMI, Makoto)
公益財団法人東京都医学総合研究所・生
体分子先端研究分野・参事研究員
研究者番号：60276607

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし