

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：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15094

研究課題名（和文）新規内因性コリン産生経路の分子機構とその生物学的意義

研究課題名（英文）Molecular mechanism and biological significance of a novel intrinsic choline production pathway

研究代表者

平林 哲也（HIRABAYASHI, Tetsuya）

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・主席研究員

研究者番号：90345025

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：肝臓において膜リン脂質からコリンを取り出す内因性コリン代謝経路の分子実体として iPLA2 γ 、iPLA2 θ 、GDE という酵素群を見出し、この代謝経路がコリン産生のみならず、肝臓におけるメチオニン再生や肝機能にも関わることを明らかとした。また iPLA2 θ の欠損により広範囲の脳の萎縮を伴う神経変性や白色脂肪組織の褐色化が起きることから、神経細胞の生存やエネルギー代謝においても我々が同定した内因性コリン産生経路が極めて重要な役割を持つことが分かった。

研究成果の概要（英文）：We have found that the iPLA2 γ /iPLA2 θ /GED axis functions as an intrinsic choline production pathway that mobilizes free choline from the membrane phospholipids in the liver and shown that this pathway is involved in the methionine regeneration and liver function. Moreover, iPLA2 θ deficiency causes profound neuronal degeneration in the brain and browning of white adipose tissues, indicating that the novel choline production pathway that we have identified has also a crucial role in neuronal survival and energy metabolism.

研究分野：脂質生化学

キーワード：リン脂質代謝 変性 ホスファチジルコリン コリン メチオニン メチル化 メタボロミクス 肝臓 神経

1. 研究開始当初の背景

コリンは、i)細胞膜リン脂質ホスファチジルコリン(PC)の構成要素、ii)神経伝達物質アセチルコリンの前駆体、iii)メチル基供給源、として重要な栄養素である。コリンは食餌から摂取されるが、細胞内のコリンの大半は膜リン脂質の PC に貯蔵されている。このことから、PC を分解してコリンを動員する代謝経路の存在が想定されるが、その分子実体や生理的意義はほとんど解明されていなかった。申請者はリン脂質代謝酵素である Ca^{2+} 非依存性ホスホリパーゼ A_2 (iPLA₂) に分類される iPLA₂ が、PC の代謝産物であるリゾ PC を特異的に加水分解してグリセロホスホコリン(GPC)を産生するリゾホスホリパーゼ活性を持つことに着目し、この分子の全身性欠損マウスを作製した。iPLA₂ 欠損マウスは、肝臓における GPC 産生がほぼ消失し、代謝の下流に位置するコリン、ベタインおよび S-アデノシルメチオニン(SAM)の濃度も顕著に低下した。したがって、iPLA₂ は肝臓の PC を分解してコリンを動員する代謝経路を制御するリゾホスホリパーゼとして機能し、この内因性コリン産生経路が遮断されると、メチオニン回路も正常に機能しないと考えられた。そこで、この内因性コリン産生経路の分子機構の全容を明らかにし、取り出されたコリンが生命活動にどのように利用されているかについて、特に疾患の観点から評価することを着想した。

2. 研究の目的

コリンは生命活動に不可欠な栄養素であり、大部分が生体膜リン脂質の PC の親水基として貯蔵されているが、必要に応じてどのようにコリンが取り出されて、どのような目的で利用されるかについては十分に解明されていなかった。本研究では、PC を分解してコリンを取り出す内因性コリン産生経路を制御すると予想される新規リゾホスホリパーゼ iPLA₂ に着目し、欠損マウスの表現型や活性の調節機構に加えて、代謝経路の上流と下流に位置する酵素の同定や代謝疾患との関連などについて解析を行うことで、これまで不明であった内因性コリン産生経路の分子機構の全容と生理的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

内因性コリン産生経路の分子機構の概要と生理的意義を明らかにするための実験として、以下の方法に基づいて研究を進めた。

(1) 全身性欠損マウスや組織特異的欠損マウスの表現型の詳細な検討

(2) 欠損マウス由来の臓器や初代培養を用いた遺伝子およびタンパク質の発現解析、メタボロミクス解析

(3) iPLA₂ の発現や活性を制御する因子の探索

(4) 上流と下流に位置する酵素の同定と、それらの遺伝子欠損マウスの作製ならびに表現型解析

(5) 肝臓およびその他の器官の代謝疾患との関連を検討することによる、内因性コリン産生経路の生理的・病理的意義の検討

4. 研究成果

(1) 肝臓において膜リン脂質からコリンを取り出す内因性コリン代謝経路の分子実体として iPLA₂ を見出し、この酵素がコリン産生のみならず、肝臓におけるメチオニン再生や肝機能(リポタンパク質 VLDL の分泌や糖新生など)にも関わることを明らかとした。コリン補充食やメチル強化食を与えたが、欠損マウスが示す痩せ型や短寿命などの劇的な表現型の回復には至らなかった。このことから、PC 分解による内因性コリンの産生そのものが肝臓に必要であるか、あるいはこの代謝経路で生じるグリセロール 3-リン酸や脂肪酸などの他の代謝物も重要な役割を持つ可能性が考えられた。

(2) iPLA₂ にリゾ PC を供給する上流酵素として iPLA₂ (PNPLA8)を見出した。この酵素の欠損マウスも iPLA₂ 欠損マウスと同様に痩せ型となった。CE-MS を用いて、肝臓のメタボロミクス解析を行うと、iPLA₂ 欠損マウスと同様に、コリン-メチオニン代謝関連の一連の化合物(GPC, choline, betaine, SAM など)が減少していた。したがって、両酵素は機能的にカップルしていると考えられた。一方、メチオニン回路を構成する主要代謝酵素群(*Bhmt*, *Mat1a* など)の発現が、両欠損マウスの肝臓において上昇していたことから、メチル基供給不足に対抗するための代償機構が存在すると考えられた。さらに、肝臓において iPLA₂ 下流に位置して、グリセロホスホコリンからコリンを生成するグリセロリン酸ジエステルホスホジエステラーゼ(GDE)を同定し、CRISPR/Cas9 システムを利用して欠損マウスを作製した。

(3) iPLA₂ の肝臓では Fibroblast growth factor 21(FGF21)の発現と分泌の増加が生じ、これが白色脂肪組織の褐色化の一因を担うと考えられたが、iPLA₂ 欠損マウス由来の初代培養肝細胞においても FGF21 の発現と分泌の増加が再現され、培養液中にメチオニンとコリンを過剰量添加することで FGF21 の発現が正常レベルに戻ることを見出した。このことから、肝臓の内因性コリン産生経路の異常は、脂肪組織をはじめとした全身のエネルギー代謝にも関与すると考えられた。

(4) iPLA₂ の脳は萎縮し、海馬、大脳皮質、

視床、線条体等において神経変性が生じていた。脳切片を用いた質量分析イメージングにより、iPLA₂ の脳の特定の領域でも PC 分解経路の異常や GPC の減少が見られた。生きたマウスを用いた磁気共鳴スペクトルでもコリン代謝の異常が確認された。したがって、我々が同定した内因性コリン産生経路は、肝臓のメチル基代謝のみならず、神経細胞の生存においても極めて重要な役割を持つことが分かった。

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1件)

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 AR, Ikeda K, Arita M, Akiyama M, Murakami M. PNPLA1 has a crucial role in skin barrier function by directing acylceramide biosynthesis. Nat Commun. 査読有、8、2017、14609
DOI: 10.1038/ncomms14609

[学会発表](計8件)

平林哲也、毛利美紗、徳岡涼美、北芳博、池田和貴、中田理恵子、村上誠、肝臓における新規ホスファチジルコリン分解経路の代謝恒常性における役割、第89回日本生化学会大会、2016.9.26、仙台国際センター(宮城県仙台市)

Tetsuya Hirabayashi, Misa Mouri, Toru Shimamura, Kohei Yokoyama, and Makoto Murakami. PNPLA7 lysophospholipase is required for normal hepatic choline metabolism and systemic energy homeostasis. 14th IGAKUKEN International Symposium "IGAKUKEN Summit for Japan and Korea Science Leaders 2016", 2016.6.30, 東京都医学総合研究所(東京都世田谷区)

Tetsuya Hirabayashi, Misa Mouri, Suzumi M. Tokuoka, Yoshihiro Kita, Rieko Nakata, Kazutaka Ikeda and Makoto Murakami. PNPLA7-mediated catabolic pathway for phosphatidylcholine has a crucial role in hepatic choline metabolism and systemic energy homeostasis. 7th International Conference on Phospholipase A₂: From Bench To Translational Medicine, 2016.5.19-20, La Jolla, CA, USA

平林哲也、毛利美紗、徳岡涼美、池田和貴、中田理恵子、北芳博、村上誠、肝臓における新規グリセロホスホコリン産生経路、BMB2015、2015.12.1、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

金子 亜里紗、安城樹、平林哲也、妹尾勇弥、柴田章貴、直江綾乃、石川准子、池田和貴、有田誠、谷佳津子、秋山真志、村上誠、皮膚バリア機能に重要なセラミド代謝におけるPNPLA1の役割、BMB2015、2015.12.1、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

平林哲也、安城樹、妹尾勇弥、柴田章貴、直江綾乃、石川准子、池田和貴、有田誠、秋山真志、村上誠「アシルセラミド生合成と皮膚バリア機能におけるPNPLA1の役割」第8回セラミド研究会、2015.10.30、北海道大学学術交流会館(北海道札幌市)

Tetsuya Hirabayashi, Misa Mouri, Toru Shimamura, Kazutaka Ikeda, Rieko Nakata, Makoto Murakami. PNPLA7-mediated production of glycerophosphocholine from lysophosphatidylcholine has a pivotal role in hepatic choline metabolism and systemic energy homeostasis. FASEB SRC Lysophospholipid and Related Mediators-from Bench to Clinic, 2015.8.24-25, Banff, Canada

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)

平林哲也、村上誠、エル・アイ・シー、モデル動物利用マニュアル<疾患モデルの作製と利用-脂質代謝異常と関連疾患 下巻>、2015、p.147-159

平林哲也、村上誠、羊土社、実験医学「脂質疾患学」、2015、p. 2456-2461

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.igakuken.or.jp/lipid/>

6．研究組織

(1)研究代表者

平林 哲也 (HIRABAYASHI, Tetsuya)
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・主席研究員
研究者番号：90345025