

令和元年6月18日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20996

研究課題名(和文)ホスファチジルイノシトールの特徴的脂肪酸組成の生物学的意義の解明

研究課題名(英文)The biological significance of characteristic fatty acid composition of phosphatidylinositol

研究代表者

今江 理恵子 (Imae, Rieko)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：60584000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ホスファチジルイノシトール(PI)はそのほとんどがsn-2位にアラキドン酸を結合している。sn-2位にアラキドン酸を導入する脂肪酸転移酵素LPIAT1の機能不全は、マウス成体において肝臓における中性脂肪の蓄積を引き起こす。このメカニズムを解析するため、より単純な培養細胞による評価系の構築を試みた。ヒト肝臓由来培養細胞Huh-7を用いてLPIAT1を発現抑制したところ、PIの脂肪酸組成変化と共にトリグリセリドの蓄積が見られ、LPIAT1の発現により回復した。主要なリン脂質の量についても解析したところ、PIのみ減少しており、リン脂質代謝系にも異常が生じていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、脂肪肝を発症する人が増加しているが、脂肪肝は肝硬変や肝癌の発症リスクを高めることが知られている。一方最近、ホスファチジルイノシトールにアラキドン酸を導入する脂肪酸転移酵素LPIAT1の一塩基多型が脂肪肝や肝障害の発症に関わることが相次いで報告され、LPIAT1の機能と脂肪肝発症との関連を明らかにすることは、脂肪肝の新たな発症メカニズムの発見に繋がると考えられる。本研究では、そのメカニズム解析の基盤として肝臓由来培養細胞を用いた評価系を構築し、分子機構を解析した。

研究成果の概要(英文)：Arachidonic acid is the predominant fatty acid in the sn-2 position of PI in mammals. Loss of LPIAT1, an acyltransferase introducing arachidonic acid into the sn-2 position of PI, causes accumulation of neutral lipid in the adult mouse. To investigate the underlying molecular mechanisms, we developed the in vitro analysis system using cultured cells. We used the human hepatoma cell line Huh-7 and expression of LPIAT1 was reduced by siRNA transfection. The molecular species of PI containing arachidonic acid was reduced and triglyceride was accumulated, and these phenotypes were rescued by expression of siRNA-resistant LPIAT1. We also analyzed the major phospholipids and found that only the amount of PI was reduced by the repression of LPIAT1 expression.

研究分野：脂質生物学

キーワード：ホスファチジルイノシトール アラキドン酸 脂肪肝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜リン脂質の一つであるホスファチジルイノシトール (PI) は、イノシトール環のリン酸化により様々な生命現象に関与する。PI は脂肪酸部分についても特徴的な構造を有しており、そのほとんどが *sn*-1 位にステアリン酸、*sn*-2 位にアラキドン酸を結合している。しかし、この特徴的な脂肪酸組成の生物学的意義はほとんど明らかになっていない。PI がなぜ特徴的な脂肪酸組成を必要とするのかを明らかにするため、我々はこの脂肪酸組成を形成するのに必要な脂肪酸転移酵素を探索した。その結果、*sn*-1 位にステアリン酸を導入する脂肪酸転移酵素として LYCAT (線虫では *acl-8, 9, 10*)、*sn*-2 位にアラキドン酸を導入する脂肪酸転移酵素として LPIAT1 (線虫では *mboa-7*) を同定した。これまでに LPIAT1 の KO マウスの解析から、LPIAT1 が脳の発生など、個体の発生段階で重要な機能を果たすことを明らかにしている。一方、LPIAT1 の KO マウスは生後すぐに致死となってしまったため、LPIAT1 の発生期以降における重要性は明らかになっていなかった。そこで LPIAT1 のコンディショナル KO マウスを構築し、成体マウスにおいて全身性に LPIAT1 を欠損させたところ、脳の形態には異常が見られなかったことから、LPIAT1 は発生期の脳の形態形成には重要な役割を果たすが、成体での脳の形態維持には大きく寄与していないと考えられた。一方、肝臓においては脂肪が蓄積しており、脂肪肝を発症していることが分かった。この表現型は、肝臓特異的 LPIAT1 欠損マウスにおいても、同様に見られたことから、臓器自律的な表現型であることが示唆された。この結果から、アラキドン酸を含む PI は、成体において肝臓での中性脂質代謝に重要な役割を持つことが明らかになっていった。

### 2. 研究の目的

LPIAT1 の機能不全により肝臓で脂肪蓄積が引き起こされる現象の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。肝臓は肝実質細胞の他、肝類洞内皮細胞、クッパー細胞など、多種の細胞種から構成されている。また、個体においては肝臓と他の臓器との間で脂質の受け渡しが行われるなど、臓器間での相互作用が存在する。このように、多種の細胞や臓器が相互作用しており、個体レベルで分子メカニズムを追跡するのは難しい場合がある。また、遺伝子発現制御や薬剤処理、パルスチェイス実験など、個体より細胞レベルの方が簡便に行える場合が多い。そこで、培養細胞レベルで LPIAT1 の機能不全と脂肪の蓄積が再現できる系が構築できれば、その系を用いて分子メカニズムを解析することが望ましい。本研究では、まずマウス個体レベルで見られた現象 (脂肪肝) を培養細胞レベルに落とし込むことができるか検討する。構築した系で分子機構が解明されたら、最終的にはマウスで検証し、実際に個体レベルでも起きるか確認する。

### 3. 研究の方法

#### (1) Huh-7 での LPIAT1 発現抑制系の構築

LPIAT1 の肝臓特異的 KO マウスでも脂肪肝の表現型が見られるが、この KO マウスは肝実質細胞で LPIAT1 が KO されていることから、肝実質細胞での LPIAT1 の機能が重要であると考えられる。そこで、肝実質細胞のモデル細胞として、高分化型ヒト肝癌由来細胞株である Huh-7 を選択し、LPIAT1 の発現抑制を行った。LPIAT1 に対する siRNA を複数設計し、それぞれトランスフェクションして一定時間後に細胞を回収し、LPIAT1 のタンパク質レベルでの発現量を確認した。LPIAT1 が良く発現抑制された複数の siRNA について、トランスフェクションにより PI の脂肪酸組成が変化するかについても確認した。PI の脂肪酸組成変化については、Bligh and Dyer 法により脂質抽出後、LC-MS にて解析した。トランスフェクション後、PI の脂肪酸組成変化が現れるまでのタイムコースについても検討した。

#### (2) LPIAT1 発現抑制による脂肪蓄積の評価

細胞回収後、Bligh and Dyer 法により脂質抽出し、トリグリセリドの量を測定した。測定には、トリグリセリド E-テストワコーを用いた。また、Oil Red O 染色により細胞染色し、脂肪滴の確認も行った。

#### (3) LPIAT1 レスキュー実験

トリグリセリドの増加が見られる siRNA について、RNAi 耐性の LPIAT1 発現コンストラクトを作成し、これを安定的に発現する株を作成した。この株に対して siRNA をトランスフェクションし、トリグリセリドの増加がレスキューされるか検討した。

#### (4) トリグリセリド代謝系の検討

肝臓は脂肪組織とともにトリグリセリドを合成する主要な臓器である。肝臓は血中へ超低密度リポタンパク質 VLDL としてトリグリセリドを分泌している。肝臓にトリグリセリドが蓄積する原因として、このトリグリセリド分泌の低下が考えられる。また、その他に、トリグリセリドの合成促進あるいは分解の低下が考えられる。これらの可能性を検証するために、放射標識による脂質のラベル化を行い、トリグリセリドの代謝系を解析した。肝細胞内において、グリセロール及び脂肪酸を原料としてトリグリセリド及びリン脂質が合成される。そこで、トリグリセリドの合成活性を調べるために、放射標識されたグリセロールを培地に添加し、2hr のイ

ンキュベーション後に細胞におけるトリグリセリドの放射活性を調べた。2hr という短時間のインキュベーションでは、グリセロールからのトリグリセリドの de novo 合成活性を見ることができると考えられる。トリグリセリドの分解に関しては、放射標識グリセロールを培地に添加して 24hr インキュベーションしてトリグリセリドのラベル化が平衡状態に達した後に放射標識グリセロールを含まない培地に交換し、その後のトリグリセリド画分の放射活性の減少度を調べた(パルスチェイス実験)。トリグリセリドの分泌に関しても、チェイス時の培地中へのトリグリセリド分泌量を調べることで解析した。トリグリセリドの放射活性については、脂質抽出後 TLC で展開し、トリグリセリド画分の放射活性を調べる方法で行った。

#### (5)各種リン脂質量の定量

LPIAT1 を発現抑制した細胞から脂質抽出し、TLC で展開して各主要リン脂質に分けた後、各画分を書き取って再度抽出し、リンの定量を行うことでリン脂質量を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) Huh-7 での LPIAT1 発現抑制系の構築

LPIAT1 に対する複数の siRNA について検討し、トランスフェクションしてから 72hr 後に LPIAT1 がタンパク質レベルで 90%以上発現抑制される siRNA を用いて、以降の解析を行った。PI の脂肪酸組成についても変化しているか確認したところ、トランスフェクション後 72hr の細胞では変化が小さく、LPIAT1 が発現減少してから脂質組成に変化が現れるまでに時間を要することが考えられた。そこで、siRNA をトランスフェクションして 72hr 後に再度 siRNA をトランスフェクションし、そこから 72hr 後(計 144hr 後)に細胞を回収して PI の脂肪酸組成を調べたところ、アラキドン酸を含む PI 分子種は著しく減少し、パルミチン酸やオレイン酸といった不飽和度の低い脂肪酸を持つ PI 分子種が増加することが確認された。以降、RNAi はこのタイムコースで行うこととした。

#### (2) LPIAT1 発現抑制による脂肪蓄積の評価

LPIAT1 を RNAi した Huh-7 でも、マウス肝臓と同様に脂肪の蓄積が見られるか検討した。回収した細胞について、トリグリセリドの量を測定したところ、約 2 倍程度に増加していることが確認された。また、細胞を Oil Red O 染色し、脂肪滴を染色したところ、LPIAT1 を RNAi した細胞では脂肪滴が大きくなっていることも確認できた。この結果から、細胞レベルでも脂肪肝を再現できる系を構築できたと考えられる。

#### (3)LPIAT1 レスキュー実験

(2)で明らかになった、トリグリセリドの蓄積が見られる siRNA について、LPIAT1 の発現抑制がその原因であるのか、オフターゲット効果によるものかを確認するため、レスキュー実験を行った。RNAi 耐性の LPIAT1 コンストラクトを安定発現する株に対して siRNA をトランスフェクションし、トリグリセリドの測定をしたところ、蓄積は見られず、レスキューが確認できるものが存在した。以降の実験では、レスキューが確認できた siRNA を用いて行った。

#### (4)トリグリセリド代謝系の検討

放射標識グリセロールを用いた実験により、トリグリセリド代謝を調べた。まず、放射標識グリセロールの 2hr のインキュベーションにおいて、LPIAT1 発現抑制細胞ではコントロール細胞に対してトリグリセリド画分の放射活性に有意な差はなく、トリグリセリドの de novo 合成活性は亢進していないと考えられた。インキュベーション時間を 24hr に伸ばすと、LPIAT1 発現抑制によりトリグリセリド画分の放射活性が有意に増加しており、LPIAT1 発現抑制した細胞でトリグリセリドが蓄積することと一致する。次に、パルスチェイス実験によりトリグリセリドの分解活性を調べた。チェイス開始時のトリグリセリド画分における放射活性を 1 とした時の継時的な推移を調べると、LPIAT1 発現抑制によりトリグリセリド画分の放射活性の低下がわずかに阻害されることが分かった。この時、培地中へのトリグリセリドの分泌は低下していなかった。以上の結果から、LPIAT1 発現抑制細胞でのトリグリセリドの蓄積は、分解活性の低下が原因である可能性が示唆される。一方、低下の度合はわずかであり、これ以外にもトリグリセリドの蓄積の原因がある可能性も考えられ、さらに詳細な解析が必要である。

#### (5)各種リン脂質量の定量

LPIAT1 発現抑制により、リン脂質画分にも影響があるか調べるため、主要なリン脂質(PC, PE, PI, PS, SM, CL, PG)について定量を行った。その結果、LPIAT1 発現抑制細胞では PI のみ約 8 割に減少していることが分かった。このことから、LPIAT1 発現抑制により、トリグリセリド代謝のみならずリン脂質代謝にも異常が生じていることが明らかになった。

近年、LPIAT1 のゲノムに存在する一塩基多型とアルコール性肝硬変や脂肪肝、肝障害との関連について、相次いで報告されており、ヒト疾患においても LPIAT1 の機能障害が関わっていることが明らかになってきた。本研究から、LPIAT1 の機能低下による脂肪肝のメカニズム解明が進んだ。今後のさらなる研究により、病態形成メカニズムが明らかになることで、治療標

的の創出につながる事が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- ① Imae R, Many H, Tsumoto H, Osumi K, Tanaka T, Mizuno M, Kanagawa M, Kobayashi K, Toda T, Endo T. CDP-glycerol inhibits the synthesis of the functional O-mannosyl glycan of  $\alpha$ -dystroglycan. *J Biol Chem.* 293, 12186-12198, 2018. 査読有  
DOI: 10.1074/jbc.RA118.003197
- ② Nishihara R, Kobayashi K, Imae R, Tsumoto H, Many H, Mizuno M, Kanagawa M, Endo T, Toda T. Cell endogenous activities of fukutin and FKRFP coexist with the ribitol xylosyltransferase, TMEM5. *Biochem Biophys Res Commun*, 497, 1025-1030, 2018. 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.02.162

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① 今江 理恵子, 萬谷 博, 津元 裕樹, 田中 智博, 水野 真盛, 金川 基, 小林 千浩, 戸田 達史, 遠藤 玉夫 「CDP-glycerol は  $\alpha$ -ジストログリカンの糖鎖伸長を阻害する」第 91 回日本生化学会大会、京都、9/24-26, 2018
- ② 今江 理恵子, 萬谷 博, 津元 裕樹, 田中 智博, 水野 真盛, 金川 基, 小林 千浩, 戸田 達史, 遠藤 玉夫 「新規糖鎖修飾体グリセロールリン酸による  $\alpha$ -ジストログリカンの機能糖鎖合成阻害」第 37 回日本糖質学会年会、仙台、8/28-30, 2018
- ③ 今江 理恵子、三谷 昌平、新井 洋由 「ホスファチジルイノシトールの sn-1 位の脂肪酸組成は上皮細胞のアピカルジャンクション形成に重要である」ConBio2017、神戸、12/6-9, 2017
- ④ 今江 理恵子、三谷 昌平、新井 洋由 「非対称分裂におけるホスファチジルイノシトールの sn-1 位の脂肪酸組成の役割」第 69 回日本細胞生物学会大会、仙台、6/13-15, 2017
- ⑤ 徳丸 陽介、今江 理恵子、久保 卓也、Mao Yanli、河野 望、新井 洋由 「ホスファチジルイノシトール特異的脂肪酸転移酵素 LPIAT1 の成体マウスにおける生理機能解析」第 89 回日本生化学会大会、仙台、9/25-27, 2016

〔図書〕(計 1 件)

- ① 今江 理恵子、河野 望、新井 洋由、医学書院、生体の科学「線虫を用いた脂質研究」67 巻 3 号、252-257、2016.

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/eiseikagaku/home>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。