

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370045

研究課題名 (和文) イノシトールリン脂質シグナリングにおけるPI分子種の意義の解明

研究課題名 (英文) Physiological significance of phosphatidylinositol (PI) molecular species in PI signaling

研究代表者

新井 洋由 (ARAI HIROYUKI)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：40167987

研究成果の概要 (和文)：生体膜を構成するホスファチジルイノシトール (PI) は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、*sn*-2 位にアラキドン酸を有する。本研究では、線虫遺伝学とリポドミクスを組み合わせることにより、PI の脂肪酸組成を規定する脂肪酸転移酵素として LYCAT/ACL-10 (*sn*-1 位にステアリン酸を導入) および LPIAT1/MBOA-7 (*sn*-2 位にアラキドン酸を導入) を同定した。さらにこれらの欠損個体を解析することで、PI の有する特徴的な脂肪酸組成の生物学的意義を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：The fatty acid composition of phosphatidylinositol (PI) is unique in that most of PI fraction in mammalian tissues and cells constitutes the 1-stearoyl-2-arachidonoyl species. In this study, we identified acyltransferases, named LYCAT/ACL-10 and LPIAT1/MBOA-7, that incorporate stearic acid and arachidonic acid into lysoPI, respectively. Furthermore, we revealed the physiological significance of unique molecular species in PI by generating knockout worms and mice of these enzymes.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 5,800,000 | 1,740,000 | 7,540,000 |
| 2009年度 | 5,300,000 | 1,590,000 | 6,890,000 |
| 2010年度 | 4,600,000 | 1,380,000 | 5,980,000 |
| 総計 | 15,700,000 | 4,710,000 | 20,410,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構

1. 研究開始当初の背景

ホスファチジルイノシトール (PI) はグリセロール骨格の3位にイノシトール環を有しており、イノシトール環のリン酸化により、細胞の生存、細胞骨格制御、小胞輸送など様々な生命現象に関与する。PI は脂肪酸鎖部分についても特徴的な構造を持つことが古くから知られており、その多くが *sn*-1 位にステアリン酸 (18:0)、*sn*-2 位にアラキドン酸 (20:4) を有する。この特徴的な脂肪酸組成は、リン脂質がいったん生合成された後、脂肪酸鎖のみが置き換わる「リモデリング反

応」により形成されると考えられており、実際、ステアリン酸やアラキドン酸を PI に導入するアシルトランスフェラーゼ活性が様々な臓器、細胞で検出されている。しかしながら、リモデリングに関わる酵素群は最近に至るまで同定されておらず、また、PI にはなぜ特異的な脂肪酸分子種が必要なのか、その破綻がどのような異常や病態を招くのかという問題も全く解明されていない。

2. 研究の目的

PI の脂肪酸組成を規定する酵素群を同定

し、その欠損個体を解析することで、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。

3. 研究の方法

(1) 我々はこれまで線虫 *C. elegans* を用いたバイオアッセイからPIの *sn-2* にアラキドン酸を導入するリモデリング酵素としてMBOA-7を同定することに成功している。本酵素は進化的に高度に保存されており、哺乳動物にも対する遺伝子が1つ保存されている。本酵素の欠損マウスを解析することで、PIに結合するアラキドン酸の生物学的意義を明らかにする。

(2) PIの *sn-1* 位についても、脂肪酸リモデリングによりステアリン酸が導入されることが示唆されていたが、この過程に関与する酵素は未だ同定されていない。我々は脂質代謝に関連すると予想される分子について、線虫の欠損変異体ライブラリーを樹立しており、この脂質メタボローム解析を行うことでPIの新規リモデリング分子を探索する。

4. 研究成果

(1) PIの *sn-2* 位の脂肪酸リモデリング酵素、LPIAT1/MBOA-7欠損マウスの解析

まず、MBOA-7の哺乳動物相同分子LPIAT1を過剰発現させた膜画分を用い、LPIAT1の脂肪酸転移活性を調べたところ、LPIAT1は線虫と同様にPI特異的にアラキドン酸を導入する酵素活性を有していた。次に、LPIAT1欠損マウスの各臓器の脂肪酸転移活性を調べたところ、解析したすべての臓器においてアラキドン酸をPIに導入する活性が消失していた。また、PIおよびホスホイノシタイド(PIPs)について脂肪酸組成を解析したところ、アラキドン酸の含量が低下していた。異以上の結果から、LPIAT1はアラキドン酸をLysoPIに導入する主要な酵素であり、実際にPIやPIPsにおけるアラキドン酸含量を規定することが分かった。

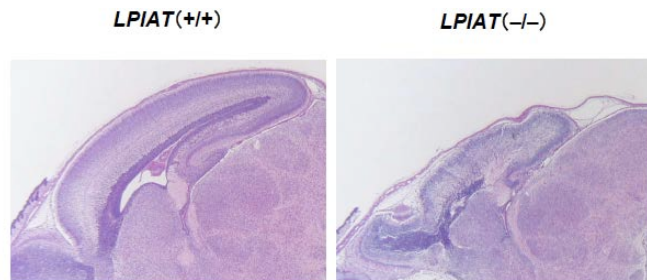
LPIAT1ヘテロ欠損マウス同士の交配から得られるホモ欠損マウスはメンデル則では得られず、ホモ個体の一部は胎仔期や出生直

後にかけて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1左)、ほとんどの個体が1ヶ月以内に死に至った。胎児期において、LPIAT1欠損マウスは脳の形態形成(大脳皮質の層構造、海馬構造)に著しい異常を示し(図1右)、神経細胞の移動が遅延していることが分かった。さらに初代培養神経細胞を単離し、神経形態を解析したところ、神経突起の進展に異常が観察された。一方、LPIAT1欠損神経細胞、胎児繊維芽細胞を用いて、リン脂質におけるアラキドン酸の動態を解析したところ、欠損細胞では放射標識したアラキドン酸のPIへの導入が顕著に減少しており、また一旦PIに取り込まれたアラキドン酸はPIから抜けにくいことが分かった。

以上の結果から、PIにおけるアラキドン酸量、あるいはPIにおけるアラキドン酸の代謝回転がマウスの発生や脳の形態形成に重要な機能を有すると考えられる。

(2) PIの *sn-1* 位の脂肪酸リモデリング酵素の同定

我々はこれまで、細胞内型ホスホリパーゼA₁(*ipla-1*)の機能解析を行っており、本酵素が線虫において上皮系幹細胞(seam細胞)の非対称分裂を制御していることを明らかにしている(Kanamori et al, *EMBO*, 2008)。この現象にどのようなリン脂質代謝が関与するかを調べるため、まずマスマスペクトロメトリーを用いて*ipla-1*変異体におけるリン脂質の脂肪酸組成を解析した。その結果、*ipla-1*変異体では、ホスファチジルコリン(PC)やホスファチジルエタノールアミン(PE)の脂質組成には大きな変化が見られなかったが、PIの分子種が顕著に変化していることが分かった。線虫におけるPIの主要な分子種は、*sn-1*位は哺乳動物と同様に18:0であるが、*sn-2*位にはアラキドン酸(20:4)ではなくEPA(20:5)が結合している。*ipla-1*変異体では18:0-20:5のPI分子種が減少し、代わりに18:1-20:5PIが増加していた。さらに、ガスクロマトグラフィーを用いてPIに結合した脂肪酸量を定量したところ、*ipla-1*変異体では18:0の割合が減少しており、代



【図1】LPIAT1欠損マウスは体が小さく(左図:P19、下が野生型、上がLPIAT1欠損)、大脳皮質および海馬の形態に著しい異常を示す(右図:E18.5)。

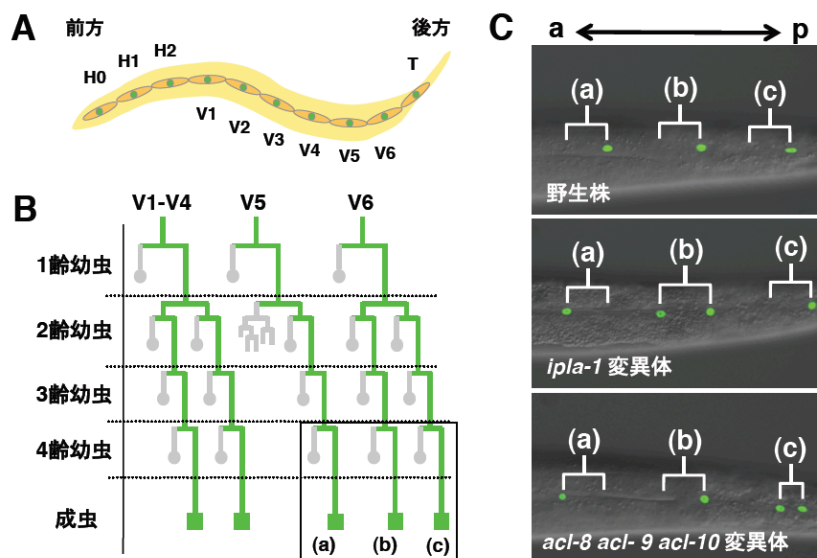
わりに 18:1 が増加していた。一方で、PIの *sn-2* 位の主要な脂肪酸である 20:5 に関しては変化が見られなかった。このことから、*ipla-1* 変異体ではPIの *sn-1* 位の脂肪酸が 18:0 から 18:1 へ入れ替わっていることが分かった。

これまでに、リン脂質の *sn-2* 位に脂肪酸鎖を導入する脂肪酸転移酵素が複数同定されている。ヒトにはこれらの分子と相同性を有する機能未知遺伝子が十数分子存在しており、我々はこれら全ての分子について、線虫相同分子の欠損変異体を樹立している。これらの線虫欠損変異体を網羅的に解析したところ、互いに高い相同性を有する *acl-8*, *acl-9*, *acl-10* の三重変異体が *ipla-1* 変異体と非常に類似した表現型を示すことを見出した(後述)。そこで、*acl-8 acl-9 acl-10* 三重変異体のメタローム解析を行ったところ、*acl-8 acl-9 acl-10* 変異体は *ipla-1* 変異体と同様に、PIの *sn-1* 位の脂肪酸鎖が 18:0 から 18:1 に入れ替わっていることが分かった(図2)。*ipla-1* 変異体、*acl-8 acl-9 acl-10* 変異体ではいずれも、PI以外のリン脂質である PC や PE、PS の脂肪酸組成には大きな変化は見られていない。以上の結果から、*ipla-1* ならびに *acl-8*, *-9*, *-10* はPIの *sn-1* 位の脂肪酸組成を規定する分子であることが明らかになった。*ipla-1* および *acl-10* の遺伝子産物はそれぞれ *in vitro* において、PIに対するホスホリパーゼ A₁ 活性、LysoPIに対する脂肪酸転移活性を有していたことから、*ipla-1* および *acl-8*, *-9*, *-10* がPIの *sn-1* 位の脂肪酸リモデリングを担っており、PIの *sn-1* 位に 18:0 を導入していると考えられる。

我々はこれまで、*ipla-1* 変異体が上皮系幹細胞である seam 細胞の非対称分裂に異常を示すことを明らかにしている。Seam 細胞は線虫の側面に並ぶ上皮細胞で、胚発生後も分裂を続け、幹細胞様の分裂パターンを示す(図 2A, B)。野生株において seam 細胞は線

虫の前後軸と平行に分裂し、前側の娘細胞は分化して seam 細胞の性質を失うが、後ろ側の娘細胞は seam 細胞の運命を維持する(図 2C)。一方、*ipla-1* 変異体では seam 細胞が分裂した後、前側の娘細胞が seam 細胞としての運命をたどるものや、両方の娘細胞が seam 細胞になるものが観察された(図 2C)。*acl-8 acl-9 acl-10* 変異体を同様に解析したところ、*acl-8 acl-9 acl-10* 変異体でも同様に、seam 細胞の非対称分裂に異常が観察された(図 2C)。これまで、*ipla-1* 変異体における seam 細胞の異常が、逆行性小胞輸送を制御すると考えられる *tbc-3*/RabGAP、あるいは *mon-2*/ArfGEF-like の変異によって回復することを明らかにしているが、*acl-8 acl-9 acl-10* 変異体における seam 細胞の異常もこれらの変異で抑制されることが分かった。以上の結果から、*ipla-1* 変異体と LPIAT2 変異体における seam 細胞の非対称分裂異常は、逆行性小胞輸送を介する同様の分子機構で生じていることが示唆された。

本研究において私は、PIの *sn-1* 位の脂肪酸組成を規定する分子として、*ipla-1* (ホスホリパーゼ A₁) と *acl-8*, *acl-9*, *acl-10* (脂肪酸転移酵素) を同定した。1) *ipla-1* 変異体と *acl-8 acl-9 acl-10* 変異体はPIの *sn-1* 位の脂肪酸組成において同様の変動が見られること、2) *ipla-1* 変異体と *acl-8 acl-9 acl-10* 変異体は共に seam 細胞の非対称分裂に異常が生じること、3) これらの seam 細胞の異常は共に *tbc-3* および *mon-2* の変異によって抑圧されることから、*ipla-1* と *acl-8*, *acl-9*, *acl-10* は協調的にPIの *sn-1* 位の脂肪酸リモデリングに関与し(図 3)、この脂肪酸リモデリングにより生じるPIの脂肪酸組成が、小胞輸送を介する非対称分裂の獲得に重要な役割を果たすことが予想される。



【図2】

(A) seam 細胞の模式図。(B) seam 細胞の細胞系譜。seam 細胞は前後軸に沿って分裂した後、前側の娘細胞は分化して seam 細胞の性質を失うが(灰色)、後ろ側の娘細胞は seam 細胞の運命を維持する(緑)。(C) seam 細胞の核に GFP を発現するトランスジェニック体。B の四角で囲った(a), (b), (c) の分裂パターンを示す。*ipla-1* 変異体や *acl-8 acl-9 acl-10* 変異体では分裂後の細胞運命決定に異常が見られる。a: anterior, p: posterior

最近、線虫受精卵の分裂過程において PIPs 産生酵素 (PI (4)P5-kinase) が母細胞内で非対称に局在することが報告されており、非対称分裂における PIPs の重要性が示唆されている。一方で、PIP_s は各オルガネラ膜で特徴的な分布を示し、PIP_s の偏在性が小胞輸送の重要な制御基盤であることが明らかにされている。「*ipla-1* 欠損、*acl-8 acl-9 acl-10* 欠損による PI の脂肪酸組成の変動」、「seam 細胞の非対称分裂異常」、「逆行性小胞輸送」の関連は現時点では不明であるが、PI の脂肪酸組成の変動が何らかの PIP_s の代謝に影響を及ぼし、小胞輸送系に異常が生じた結果、非対称分裂の異常が引き起こされるのではないかと考えている。

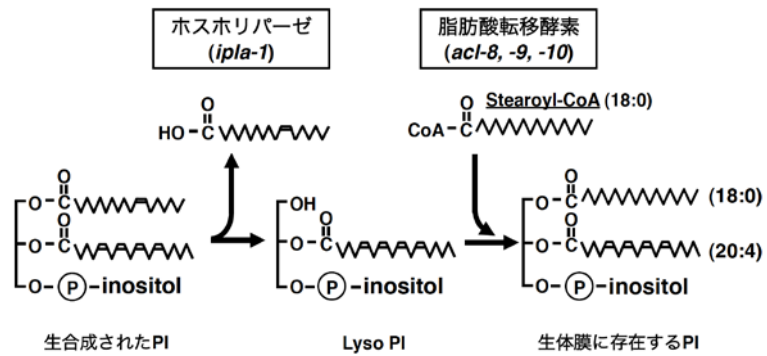
本研究は、生体膜リン脂質の *sn-1* 位の脂肪酸リモデリングの分子実体を初めて提唱するものであり、また、PI の脂肪酸構造と小胞輸送、非対称分裂の関連を初めて示すものである。今後、異常発症のメカニズムを分子レベルで解析することにより、なぜ PI の *sn-1* 位に 18:0 を含む分子種が多いのか、その生物学的意義が明らかになるものと期待される。

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 15 件)

1. Intracellular PLA1 and Acyltransferase, Which Are Involved in *Caenorhabditis elegans* Stem Cell Divisions, Determine the *sn-1* fatty acyl Chain of Phosphatidylinositol
Imae R., Inoue T., Kimura M., Kanamori T., H. Tomioka N., Kage-Nakadai E., Mitani S. and Arai H.
Mol. Biol. Cell, 21, 3114-3124 (2010)
2. Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response
Ariyama H., Kono N., Matsuda S., Inoue T. and Arai H.
J. Biol. Chem., 221, 87-95 (2010)
3. *C. elegans mboa-7*, a member of the MBOAT family, is required for selective incorporation of polyunsaturated fatty acids into phosphatidylinositol.



【図3】PI の *sn-1* 位の脂肪酸リモデリング

Lee H. C., Inoue T., Imae R., Kono N., Shirae S., Matsuda S., Gengyo-Ando K., Mitani S. and Arai H.

Mol. Biol. Cell, 19, 1174-1184 (2008)

4. β -Catenin asymmetry is regulated by PLA1 and retrograde traffic in *C. elegans* stem cell divisions.

Kanamori T., Inoue T., Sakamoto T., Gengyo-Ando K., Tsujimoto M., Mitani S., Sawa H., Aoki J., and Arai H.
EMBO J., 27, 1647-1657 (2008)

5. A member of the membrane-bound O-acyltransferase (MBOAT) family encodes a lysophospholipid acyltransferase with broad substrate specificity.

Matsuda S., Inoue T., Lee H. C., Kono N., Tanaka F., Gengyo-Ando K., Mitani S., and Arai H.
Genes to Cells, 13, 879-888 (2008)

[学会発表] (計 58 件)

1. Inoue T., Arai H.
「Identification of enzymes which determine the fatty acid composition of phosphatidylinositol」
BMB2010 (2010, 12/7-10, Hyogo)
2. Inoue T., Arai H.
「Functional analysis of membrane lipids using *C. elegans*」
The 32th symposium on the Drugs-Membranes Interaction (2010, 11/29-30, Toyama)
3. Arai H.
「Genetic analysis of phospholipid acyltransferases using *C. elegans* as a model organism」
FASEB Summer Research Conference Phospholipid Metabolism: Disease, Signal

Transduction, and Membrane Dynamics (2010, 6/27-7/2, Colorado)

4. Inoue T., Arai H.

「Comprehensive analysis of enzymes involved in phospholipid fatty acid remodeling」

The 52th Japanese Conference on the Biochemistry of Lipids (2010, 6/14-15, Gunma)

5. Arai H., Inoue T.

「Identification of acyltransferases responsible for arachidonic acid incorporation into membrane phospholipids」

11th International Conference Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases (2009, 10/25-28, Cancun Mexico)

6. Inoue T., Arai H.

「Comprehensive analysis of phospholipid acyltransferases」

The 82th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (2009, 10/21-24, Hyogo)

7. 新井洋由

「生体膜リン脂質における高度不飽和脂肪酸鎖の機能」

日本脂質栄養学会 (2009, 9/5, 東京)

8. 新井洋由

「生体膜リン脂質多様性の構築機構」

第50回新潟生化学懇話会 (2009, 6/27, 新潟市)

9. Inoue T., Arai H.

「Functional and molecular analysis of polyunsaturated fatty acids using *C. elegans*」

フォーラム2008: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2008, 10/17, 熊本)

10. Arai H., Inoue T.

「Identification of lysoPI acyltransferase as a determinant of phosphatidylinositol molecular species」

FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES Phospholipid Metabolism: Disease Signal Transduction and Membrane Dynamics (2008, 7/23, New Haven, Connecticut)

11. 新井洋由

「ホスファチジルイノシトール分子種形成の分子機構とその生物学的意義」

第4回メタボロームシンポジウム (2008,

10/31, 鶴岡)

〔図書〕 (計3件)

「ホスファチシルイノシトールの脂肪酸組成を規定する酵素群の同定」

井上 貴雄, 新井 洋由

実験医学, Vol. 28, No. 20, 3306-3313 (2010)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~eisei/jp/Members.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 洋由 (ARAI HIROYUKI)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授
研究者番号: 40167987

(2) 研究分担者

井上 貴雄 (INOUE TAKAO)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号: 50361605