

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15984

研究課題名（和文）新規リン脂質sn-1位導入リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ群の機能解析

研究課題名（英文）Analysis of novel phospholipid sn-1 position lysophospholipid acyltransferases

研究代表者

川名 裕己（Kawana, Hiroki）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・特任助教

研究者番号：40846672

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：これまで生体膜を構成するリン脂質分子のsn-1位脂肪酸決定機構に関する知見は乏しく、その生物学的意義も不明であった。本研究によりリン脂質分子のsn-1位脂肪酸決定に関わる分子としてLPGAT1とLPEAT2が見出された。また、遺伝子欠損動物の解析からリン脂質sn-1位脂肪酸のクオリティが動物個体の複数臓器の正常機能に必須であることが示され、リン脂質sn-1位脂肪酸種に支配される高等生物の生命現象の存在が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リン脂質のsn-1位脂肪酸種は多くの生物において普遍的であり、進化的にもよく保存されている。その形成に関わる分子が同定されたことは多くの生物に共通するリン脂質形成機構を理解する上で重要であり、学術的な意義は大きいと考えられる。生体膜の主要な構成成分であるリン脂質分子の質は様々な生命現象や疾患との関わりも示唆されていることからリン脂質形成機構の理解はヒト疾患の診断や治療への応用も将来的に期待される。

研究成果の概要（英文）：There has been little knowledge about the mechanism for determining fatty acid species of the sn-1 position of phospholipids that compose biological membranes, and its biological significance has been unclear. In this study, LPGAT1 and LPEAT2 were found as molecules involved in the determination of fatty acid species of the sn-1 position of phospholipids. In addition, analysis of gene-deficient animals showed that the quality of fatty acid species of the sn-1 position of phospholipids is essential for the normal function of multiple organs, and revealed the existence of biological phenomena controlled by phospholipids sn-1 fatty acid species in higher organisms.

研究分野：脂質生物学

キーワード：リゾリン脂質アシル基転移酵素 脂肪酸リモデリング リン脂質sn-1位 ステアリン酸 オレイン酸 網膜変性

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体膜の主要な構成成分であるリン脂質分子は2つの脂肪酸部を持ち、生体内には様々な種類の脂肪酸が存在することからその組み合わせで多種多様なリン脂質分子種が存在する。高等動物のリン脂質分子種を分析するとリン脂質分子種の種類は一定ではなく、特定の組織・細胞に特定の脂肪酸種の組み合わせを持つリン脂質分子種が存在していることから特定のリン脂質分子種は特定の組織・細胞の機能発現に寄与していることが予想される。こういったことからリン脂質の脂肪酸分子種の形成機構の解析はリン脂質を通じた組織・細胞の正常機能の発揮を理解する上で重要である。さらに詳細に脂肪酸部に着目するとリン脂質の2つの脂肪酸部は極性頭部からグリセロール骨格上の位置により *sn*-1 位と *sn*-2 位が存在する。一般に *sn*-1 位にはステアリン酸(C18:0)、パルミチン酸(C16:0)などの飽和脂肪酸またはオレイン酸(C18:1)などの一価不飽和脂肪酸が、*sn*-2 位にはアラキドン酸(C20:4)やドコサヘキサエン酸/DHA(C22:6)などの不飽和脂肪酸が主に分布するような脂肪酸種の非対称性が存在している。このリン脂質の脂肪酸部の非対称性の分子機構や意義は不明であったが、近年、リン脂質の *sn*-2 位に不飽和脂肪酸を導入するリゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ(LPLAT)と呼ばれるリン脂質代謝酵素が複数、発見され、その機能解析から *sn*-2 位への不飽和脂肪酸導入の意義は解明されつつある。一方で、*sn*-1 位が飽和脂肪酸や一価不飽和脂肪酸が存在することの意義に関しては、それらの脂肪酸の導入機構が不明であり、その意義も未解明であった。研究代表者のグループはリン脂質の *sn*-1 位へ脂肪酸導入する LPLAT の活性を *in vitro* で評価する新規手法を開発し (BBA MOL CELL BIOL L 2019)、この手法を用い *sn*-1 位へステアリン酸やオレイン酸をそれぞれ導入する複数の新規 LPLAT 分子を生化学的に複数同定した。

2. 研究の目的

本研究では、同定した新規 LPLAT 分子が実際に培養細胞や動物個体レベルでリン脂質の脂肪酸分子種の形成にどのように寄与しているのか明らかにすること、遺伝子欠損細胞や動物を用いて特定のリン脂質分子種を低下させた際にどのような異常が生じるのか解析することでリン脂質の *sn*-1 位脂肪酸決定機構が持つ生物学的意義を見いだすこと、生体機能を発揮する上でリン脂質分子種がどのように働いているのかその分子メカニズムを解明することを目指した。

3. 研究の方法

ヒト培養細胞、マウス、ゼブラフィッシュをモデルとして各種 *sn*-1 位脂肪酸導入 LPLAT の欠損体を作製、LC-MS または質量分析イメージング技術を用いてリン脂質の脂肪酸分子種を個体・組織・オルガネラレベルで測定し、リン脂質分子種形成における新規 *sn*-1 位脂肪酸導入 LPLAT の寄与を確認し、変動するリン脂質分子種を同定した。作製した新規 *sn*-1 位脂肪酸導入 LPLAT 欠損体(ヒト培養細胞、マウス、ゼブラフィッシュ)で認められる表現型を探索し、その表現型の詳細を解析するとともに特定のリン脂質分子種を介した機能であることを証明するためにリン脂質の添加による表現型の回復を試みた。また、リン脂質分子種的作用基盤の解明を目指し、網羅的なプロテオミクスや RNA-seq による発現解析を実施し、遺伝子欠損によるリン脂質分子種の変動がどのような分子(タンパク質など)の変動をもたらしているのか解析した。

4. 研究成果

(1) 新規 *sn*-1 位脂肪酸導入 LPLAT が内在性リン脂質組成に与える影響の解析

LPGAT1 の解析

sn-1 位脂肪酸導入 LPLAT の一つである LPGAT1 を欠損したヒト培養細胞、マウス、ゼブラフィッシュを作製した。LC-MS を用いたリン脂質分子種の解析から欠損細胞において主要なリン脂質である PC (ホスファチジルコリン)、PE (ホスファチジルエタノールアミン)、PS (ホスファチジルセリン)、PG (ホスファチジルグリセロール) のうち、ステアリン酸を含有する分子種が顕著に低下することが判明した。一方で PI (ホスファチジルイノシトール) や PA (ホスファチジン酸) では顕著な変動は認められなかった。また、欠損マウスやゼブラフィッシュの様々な臓器に関して LC-MS によるリン脂質分子種解析を行なった結果、培養細胞と同様に PC、PE、PS、PG のうち、ステアリン酸を含有する分子種が顕著に低下していた。このことから LPGAT1 は動物個体レベル・ヒト培養細胞レベルでステアリン酸を含有したリン脂質形成に必須の因子であることが明らかとなった。さらに欠損マウス肝臓から膜画分を調製して主要なリゾリン脂質の *sn*-1 位に対するアシル基導入活性を測定すると欠損マウスにおいてステアリン酸を導入する活性がほとんど消失することから LPGAT1 は *sn*-1 位へのステアリン酸導入活性の大部分を説明する LPLAT 分子であることがわかった。

LPEAT2 の解析

別の *sn*-1 位脂肪酸導入 LPLAT である LPEAT2 についても欠損体を作製してそのリン脂質分子種組成を LC-MS を用いて解析した。脳などの中枢神経系の組織において *sn*-1 位にオレイン酸を

含有する PC 分子種が LPEAT2 欠損マウスで減少していた。脳において質量分析イメージングにより部位ごとの変動を解析したが脳のほぼ全域でオレイン酸を含有する PC 分子種の低下が観察された。LPEAT2 の発現レベルが低い他の組織ではこういった PC 分子種の変化は観察されなかったことから LPEAT2 は脳をはじめとした神経系組織において sn-1 位にオレイン酸を含有する PC 分子種の形成に選択的に寄与することが明らかとなった。

興味深いことに LPGAT1 や LPEAT2 は *in vitro* の酵素活性評価ではステアリン酸、パルミチン酸、オレイン酸を sn-1 位に導入する活性のいずれも有していたが、欠損体の解析から *in vivo* では LPGAT1 はステアリン酸、LPEAT2 はオレイン酸を選択的にリン脂質に導入していることが判明し、*in vitro* の酵素活性からは予測できない脂肪酸種の選択性をもたらず機構の存在が示唆された。

(2) 新規 sn-1 位脂肪酸導入 LPLAT 欠損体の表現型探索と解析

LPGAT1 欠損体の解析

LPGAT1 欠損マウスは出生可能であったが体重減少などの発育不全を示し、性成熟までにおよそ半数の欠損個体が死亡することが判明した。また、成熟した欠損個体の解析から網膜変性が認められることが明らかとなった。この網膜変性過程の詳細を解析すると、網膜細胞層の発生過程は正常に進行するが生後 3 週前後から網膜の辺縁部より網膜外層の視細胞に細胞死の増加が観察された。その後この細胞死は網膜外層全域に進行してほとんどの細胞が脱落し、網膜外層が大きく萎縮していた。網膜層に存在する細胞種のマーカー分子の免疫染色から視細胞の中でも桿体細胞特異的に細胞死が起きていることが判明した。顕著な網膜外層の変性が認められる生後 3 週前において細胞層をレーザーマイクロダイセクション (LMD) で切り出し、LC-MS 解析により変動しているリン脂質分子種を解析するとステアリン酸含有リン脂質の顕著な低下が網膜層の全域に渡り観察された。特に顕著な異常が認められる網膜外層では C40:6 (ステアリン酸とドコサヘキサエン酸 DHA を含有) の脂肪酸鎖を持つリン脂質が大きく低下していた。このようなリン脂質分子種の変動は網膜組織切片を用いた質量分析イメージングで確認された。また、電子顕微鏡解析により桿体細胞を観察するとゴルジ体をはじめとした複数のオルガネラの形態異常が観察された。以上からステアリン酸含有リン脂質は桿体細胞のオルガネラの恒常性に関わることでその生存に必須であり、視覚機能に不可欠なリン脂質分子種であることが明らかとなった。

CRISPR-Cas9 システムを用いてゼブラフィッシュにおいても LPGAT1 欠損個体を作製し、解析を行った。LPGAT1 欠損個体は出生可能であったが出生数は少なく、生後徐々に個体数が減少し、性成熟した欠損個体を得ることはできなかった。また、欠損個体はマウス同様に視覚機能の異常が観察されたことから種を超えて LPGAT1 が視覚機能に関与することが明らかとなった。欠損個体を得る過程においてヘテロ欠損個体同士の交配を行うと受精が進行しない未受精卵が多く出現することを見出した。この表現型はメスの遺伝子型にはよらず、ヘテロ欠損オス個体を交配に用いた場合に見出されたことからヘテロ欠損オス個体の精子に何らかの異常があることが想定された。ヘテロ欠損オス個体の精子を解析するとその運動能の低下や電子顕微鏡解析から形態の異常が観察された。また、未受精卵の増加には精子自体の LPGAT1 の欠損の有無は関係しなかったことからヘテロ欠損オス個体の精巣での精子の成熟が一定の割合で機能不全の精子を生み出し、未受精卵の増加をもたらしているものと想定された。さらに発生期の解析を行う目的でゼブラフィッシュ受精卵にアンチセンスモルホリノを導入し、LPGAT1 の発現を抑制すると様々な発生ステージにおいて一定の割合で発生異常が生じることがわかった。したがって受精段階に加えて発生段階においても LPGAT1 を通じたステアリン酸含有リン脂質が機能を持つことが示唆された。

細胞レベルでの LPGAT1 の機能を解析する目的でヒト培養細胞株である HEK293A 細胞や HeLa 細胞において siRNA による発現抑制や CRISPR-Cas9 システムによる遺伝子欠損株の樹立を行った。LPGAT1 の発現抑制や遺伝子欠損株においてはミトコンドリア形態が断片化する傾向が観察された。この表現型はステアリン酸を含有リン脂質の添加により、部分的に回復したことからステアリン酸含有リン脂質を介したオルガネラ制御機構の存在が示唆された。

LPEAT2 欠損体の解析

LPEAT2 欠損マウスは出生可能であり、メンデル則に従った比率で出生・成長した。LPEAT2 の発現は脳などの神経系に偏っており、リン脂質分子種の変動も神経系で観察されたことから脳を中心とした解析を行った。LPEAT2 の脳における発現を *In situ* Hybridization 法で調べるとほとんどすべての領域での発現が観察されたが特に小脳のプルキンエ細胞に加え、海馬や大脳皮質の神経細胞での発現がよく観察された。オレイン酸含有リン脂質が神経細胞のシナプスや形態に影響する先行知見からゴルジ染色による神経細胞の形態の可視化を行った。これにより LPEAT2 欠損マウスは特に大脳皮質の神経細胞の軸索の走行が異常であることが判明した。sn-1 位にオレイン酸を含有したリン脂質は神経細胞の正常な軸索の走行への寄与が想定され、さらなる解析から神経細胞におけるこのリン脂質分子種の機能が明らかにされることが期待される。

(3) 特定のリン脂質脂肪酸分子種が機能するその分子基盤の解析

解析が先行した LPGAT1 の欠損細胞やマウス組織のプロテオミクス解析から欠損体ではミトコンドリア呼吸鎖因子の発現が増大していることがわかった。その他にも欠損に依存した複数の

因子の発現上昇や発現低下が観察された。これまでの解析から LPGAT1 はステアリン酸含有リン脂質形成への寄与が想定されるが、通常リン脂質の *sn*-1 位に豊富に存在するパルミチン酸に比べてステアリン酸は炭素鎖がやや長い(炭素鎖 2 つ分)ことで生体膜の厚みが変化し、それに伴った膜タンパク質の安定性や機能の変化が想定される。今後、直接的な生体膜厚みと膜タンパク質の安定性や機能との関連が明らかになればリン脂質分子種が分子レベルで機能するメカニズム迫ることができると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shibata, T., Kawana, H., Nishino, Y., Ito, Y., Sato, H., Onishi, H., Kano, K., Inoue, A., Taketomi, Y., Murakami, M., Kofuji, S., Nishina, H., Miyazawa, A., Kono, N., & Aoki, J	4. 巻 12
2. 論文標題 Abnormal male reproduction and embryonic development induced by downregulation of a phospholipid fatty acid-introducing enzyme Lpgat1 in zebrafish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-11002-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yaginuma, S., Kawana, H., & Aoki, J	4. 巻 27
2. 論文標題 Current Knowledge on Mammalian Phospholipase A1, Brief History, Structures, Biochemical and Pathophysiological Roles.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules27082487	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Valentine, W. J., Yanagida, K., Kawana, H., Kono, N., Noda, N. N., Aoki, J., & Shindou, H	4. 巻 289
2. 論文標題 Update and nomenclature proposal for mammalian lysophospholipid acyltransferases, which create membrane phospholipid diversity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of biological chemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.101470	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川名裕己、小澤雅也、柴田剛明、佐藤悠喜飛、可野邦行、青木淳賢
2. 発表標題 リン脂質sn -1位代謝機構による細胞機能の制御
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小澤雅也、川名裕己、可野邦行、石原孝也、石原直忠、青木淳賢
2. 発表標題 リン脂質sn-1位脂肪酸リモデリング機構の培養細胞レベルでの機能解析
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤悠喜飛、川名裕己、可野邦行、青木淳賢
2. 発表標題 リン脂質sn-1位脂肪酸導入酵素としてのLPEAT2の生化学的性状解析
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田剛明、川名裕己、青木淳賢
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いたリン脂質sn-1位ステアリン酸導入酵素LPGAT1の生理機能の解明
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田剛明、川名裕己、青木淳賢
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いたリン脂質sn-1位ステアリン酸導入酵素LPGAT1の雄性生殖における生理機能解明
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第86回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川名 裕己、柴田 剛明、岩間 大河、相良 洋、佐藤 悠喜飛、可野 邦行、河野 望、青木 淳賢
2. 発表標題 LPLAT7/LPGAT1欠損体における網膜変性機構の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田 剛明、川名 裕己、大西浩文、河野 望、青木 淳賢
2. 発表標題 ゼブラフィッシュはリン脂質分子種の多様性の意義解明に有用なモデル生物である
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小澤 雅也、川名 裕己、可野 邦行、河野 望、青木 淳賢
2. 発表標題 ステアリン酸含有リン脂質の培養細胞レベルでの機能解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大西浩文、柴田 剛明、川名 裕己、河野 望、青木 淳賢
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いたLPLAT10/LPEAT2の生理的意義の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 青木淳賢、川名裕己	4. 発行年 2020年
2. 出版社 建帛社	5. 総ページ数 27
3. 書名 生体におけるリン脂質の性状と機能性-リン脂質の脂肪酸組成を決定するリゾリン脂質アシル基転移酵素-	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------