

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 25 日現在

機関番号：32653

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890032

研究課題名（和文） 幹細胞非対称分裂におけるホスファチジルイノシトールの特異的脂肪酸組成の意義の解明

研究課題名（英文） Biological significance of the unique fatty acid composition of phosphatidylinositol in the asymmetric division of stem cells.

研究代表者

今江 理恵子（IMAE RIEKO）

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：60584000

研究成果の概要（和文）：細胞内型ホスホリパーゼ A<sub>1</sub> (*ipla-1*) と脂肪酸転移酵素 (*acl-8*, *acl-9*, *acl-10*) は、線虫においてホスファチジルイノシトール (PI) の *sn-1* 位の脂肪酸組成を規定する酵素であり、その破綻は、上皮幹細胞の非対称分裂の異常を引き起こす。本研究では、PI の脂肪酸組成変化が、どのような分子を介して非対称分裂の異常を引き起こすのかを明らかにした。また、*acl-8*, *-9*, *-10* の哺乳動物における機能の保存性を確認した。

研究成果の概要（英文）：Intracellular phospholipase A<sub>1</sub> (*ipla-1*) and acyltransferases (*acl-8*, *acl-9* and *acl-10*) determine the *sn-1* fatty acyl chain of phosphatidylinositol (PI) in *C. elegans*. In both *ipla-1* mutants and *acl-8 acl-9 acl-10* triple mutants, the *sn-1* fatty acid composition of PI is significantly altered, and asymmetric division of stem cell-like epithelial cells is defective. This study identified the molecules that are associated with the asymmetric division defects caused by the altered fatty acid composition of PI. In addition, functional conservation of *acl-8*, *-9*, *-10* in mammals was examined.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学、生物系薬学

キーワード：非対称分裂・ホスホイノシチド

## 1. 研究開始当初の背景

幹細胞は非対称に分裂し、新たな幹細胞と分化細胞を生み出すことによって、組織の形

態形成／恒常性維持に寄与している。幹細胞分裂のモデルとしては、線虫やショウジョウバエ等の幹細胞が有用な解析ツールとなっており、非対称分裂に関わる分子が徐々に明

らかにされている。しかし、幹細胞非対称分裂に関わる分子の全貌は明らかになっておらず、その制御機構についても不明な点が多く残されている。

一方、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、特徴的な脂肪酸組成を有することが知られており、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) を持つ。しかし、その生物学的意義はこれまでほとんど明らかになっていなかった。我々は最近、PI の *sn*-1 位の脂肪酸組成を規定する酵素として、細胞内型ホスホリパーゼ A<sub>1</sub> (*ipla-1*) と脂肪酸転移酵素 (*acl-8*, *acl-9*, *acl-10*) を同定した (Imae *et al*, *Mol Biol Cell*, 2010)。これらの酵素の変異体は共に、seam 細胞と呼ばれる上皮幹細胞の非対称分裂に異常を示すことから (Kanamori *et al*, *EMBO J*, 2008; Imae *et al*, *Mol Biol Cell*, 2010)、PI の *sn*-1 位の特徴的な脂肪酸組成は、*ipla-1* による脂肪酸の切り出しと *acl-8*, *-9*, *-10* によるステアリン酸の再導入により形成されること、この PI の脂肪酸組成が幹細胞の非対称分裂に重要な役割を持つことが明らかになった。

## 2. 研究の目的

PI の *sn*-1 位の脂肪酸組成がどのような分子機構で非対称分裂に関与するかを、線虫を用いた遺伝学的解析により明らかにする。また、ほ乳動物における機能の保存性についても検証する。

## 3. 研究の方法

(1) Seam 細胞の非対称分裂に関与するポリホスホイノシチド (PIPs) の同定

最近、線虫初期胚の非対称分裂において、PI (4, 5)P<sub>2</sub> が母細胞において非対称分布することが報告され、PIPs が蛋白分子の非対称分布に寄与する可能性が示唆された。従って、PI の脂肪酸組成の変化と非対称分裂異常の接点として、母細胞における PIPs の局在や膜内分布の異常が一つの候補と考えられる。*ipla-1* 変異体および *acl-8* *acl-9* *acl-10* 変異体が示す seam 細胞の非対称分裂異常がどの PIPs を介して生じているのかを明らかにするために、PIPs 代謝酵素群を網羅的に発現抑制し、同様の異常を示すものをスクリーニングした。

### (2) サプレッサースクリーニング

PI の脂肪酸組成の変化がどのような分子を介して非対称分裂の異常を引き起こすかを解明するために、*ipla-1* や *acl-8*, *-9*, *-10* と機能的に関連する遺伝子を遺伝学的に探索

した。具体的には、*acl-8*, *-9*, *-10* のうち、非対称分裂において主要な役割を果たす *acl-10* の変異体を用いて、非対称分裂異常の表現型を抑圧するサプレッサースクリーニングを行い、原因遺伝子をマッピングした。

### (3) *acl-8*, *-9*, *-10* のほ乳動物ホモログ LYCAT の解析

ほ乳動物においては、*acl-8*, *-9*, *-10* のホモログとして LYCAT が存在する。LYCAT が線虫 *acl-8*, *-9*, *-10* と同様の機能を有しているかを検討した。まず *in vitro* の脂肪酸転移活性測定による酵素活性の確認を行い、独自に樹立した LYCAT ノックアウトマウスにおけるリン脂質の脂肪酸組成を解析した。また、LYCAT ノックアウトマウスの表現型を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) PIPs 代謝酵素群の RNAi スクリーニング

野生株に対して PIPs 合成酵素 35 遺伝子の RNAi を行い、*ipla-1* 変異体および *acl-8* *acl-9* *acl-10* 変異体と同様の seam 細胞の非対称分裂の異常を示す遺伝子を探索した。Seam 細胞の核に GFP が局在するレポーターを用いて、蛍光顕微鏡下で観察した結果、PI (4, 5)P<sub>2</sub> の産生酵素である PI (4)P 5-kinase、PI (3)P の産生酵素である PI 3-kinase の発現抑制によって、seam 細胞の非対称分裂に異常が生じることが明らかになった。このことから、*ipla-1* 変異体および *acl-8* *acl-9* *acl-10* 変異体が示す seam 細胞の非対称分裂異常は、PI (4, 5)P<sub>2</sub> や PI (3)P を介して生じている可能性が考えられる。

### (2) サプレッサースクリーニング

*acl-10* 変異体に対して変異剤 (EMS) 処理し、seam 細胞の非対称分裂異常を抑圧するサプレッサー変異体を 5 ライン単離した。このうち 2 ラインについて、近縁種との遺伝子多型を利用した snip-SNPs 法により原因遺伝子のマッピングを行った。その結果、これらのサプレッサー遺伝子は、それぞれ特定のリン脂質合成酵素をコードしていることが明らかになった。このリン脂質は、脂質ラフト等に多く存在することが知られていることから、*acl-10* 変異体における異常発症にはラフトが関わっている可能性が考えられる。また、これまでにエンドソームからゴルジ体への「逆行性小胞輸送」に関与する分子もサプレッサー遺伝子であることが分かっている。これらのことから、PI の脂肪酸組成は、特定のリン脂質や逆行性小胞輸送を介して非対称分裂を制御していることが示唆された。

(3) ほ乳動物における *acl-8*, *-9*, *-10*/LYCAT の機能解析

①マウス LYCAT の酵素活性の測定

マウス LYCAT を過剰発現した HEK293 細胞の膜画分を用いて、*in vitro* の脂肪酸転移活性を測定したところ、線虫 *acl-10* において見られたのと同様、PI の *sn-1* 位にステアリン酸を導入する活性が確認された。また、樹立した LYCAT ノックアウトマウスの様々な臓器（脳、心臓、肝臓、骨格筋）において、この活性が顕著に減弱していることを見出した。このことから、LYCAT はマウス臓器における PI の *sn-1* 位へのステアリン酸の導入活性に大きく寄与していることが明らかになった。

②LYCAT ノックアウトマウスにおけるリン脂質脂肪酸組成の解析

LYCAT のリン脂質脂肪酸代謝における機能を明らかにするために、LYCAT ノックアウトマウスの各臓器（脳、心臓、肝臓、骨格筋）における主要なリン脂質の脂肪酸組成を解析した。その結果、いずれの臓器においても PI の脂肪酸組成のみが顕著に変動しており、その他のリン脂質においては大きな変動は見られなかった。このことから、LYCAT は PI の脂肪酸組成の規定に選択的に関わるということが明らかになった。また、いずれの臓器においても PI のステアリン酸の量が減少していたことから、特に PI の *sn-1* 位の脂肪酸組成が変動していると考えられる。さらに、PIPs (PIP1, PIP2) の脂肪酸組成についても解析したところ、PI と同様に変動していることが明らかになった。PIPs はラフトに多く存在することが知られており、LYCAT ノックアウトマウスでは PIPs の脂肪酸組成が変動していたことから、ラフト等の膜ドメインにおける PIPs の局在に異常が生じている可能性が考えられる。

③LYCAT ノックアウトマウスの表現型解析

LYCAT ノックアウトマウスはメンデルの法則に従って生まれ、見た目上顕著な表現型は示さなかった。また、光学顕微鏡レベルでの組織学的異常も見出されなかった。血球細胞数を解析したところ、一部の個体においては血球の比率に異常が認められた。今後、発現レベルの高い組織に注目して表現型を解析すると共に、非対称分裂と関連の深い造血幹細胞の分化や発癌への影響についてより詳細に解析していく。

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 2 件)

1. Rieko Imae, Takao Inoue, Yasuko Nakasaki, Yasunori Uchida, Yohsuke Ohba, Nozomu Kono, Hiroki Nakanishi, Takehiko Sasaki, Shohei Mitani and Hiroyuki Arai, LYCAT, a homologue of *C. elegans acl-8*, *acl-9*, and *acl-10*, determines the fatty acid composition of phosphatidylinositol in mice, *Journal of Lipid Research* (2012) 53, 335-347, DOI:10.1194/jlr.M018655, 査読有り

2. Rieko Imae, Takao Inoue, Masako Kimura, Takahiro Kanamori, Naoko H. Tomioka, Eriko Kage-Nakadai, Shohei Mitani and Hiroyuki Arai, Intracellular phospholipase A<sub>1</sub> and acyltransferase, which are involved in *Caenorhabditis elegans* stem cell divisions, determine the *sn-1* fatty acyl chain of phosphatidylinositol, *Molecular Biology of the Cell* (2010) 21, 3114-3124, DOI:10.1091/mbc.E10-03-0195, 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

1. Rieko Imae, Takao Inoue, Masako Kimura, Eriko Kage-Nakadai, Shohei Mitani, Hiroyuki Arai, Intracellular PLA1 and acyltransferase, which are involved in *C. elegans* stem cell divisions, determine the *sn-1* fatty acyl chain of phosphatidylinositol, 18<sup>th</sup> International *C. elegans* Meeting, 2011.6.23, Los Angeles, USA

2. Rieko Imae, Takao Inoue, Masako Kimura, Eriko Kage-Nakadai, Shohei Mitani, Hiroyuki Arai, Intracellular PLA1 and acyltransferase, which are involved in *C. elegans* stem cell divisions, determine the *sn-1* fatty acyl chain of phosphatidylinositol, ASCB (the American Society for Cell Biology) 50th Annual Meeting, 2010.12.13, Philadelphia, USA

3. Rieko Imae, Takao Inoue, Masako Kimura, Eriko Kage-Nakadai, Shohei Mitani, Hiroyuki Arai, Intracellular PLA1 and acyltransferase, which are involved in *C. elegans* stem cell divisions, determine the *sn-1* fatty acyl chain of phosphatidylinositol, 4<sup>th</sup> East Asia *C. elegans* Meeting, 2010.7.13, Tokyo

[その他]

NBRP ホームページアドレス

<http://www.shigen.nig.ac.jp/c.elegans/index.jsp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今江 理恵子 (IMAE RIEKO)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号：60584000

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし