

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15273

研究課題名（和文）リン脂質sn-1位脂肪酸規定分子の解析と標的分子探索技術の確立

研究課題名（英文）Analysis of phospholipid sn-1 fatty acid-determining factor and establishment of target molecule identification technique

研究代表者

川名 裕己（Kawana, Hiroki）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：40846672

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000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位脂肪酸の変化が臓器の正常機能に与える影響は不明であった。本研究よりsn-1位脂肪酸決定に関わる分子であるLPLAT7/LPGAT1は視覚機能や脂肪組織の維持に必須であり、遺伝子欠損動物の解析から障害が生じるメカニズムの一部が明らかとなった。また、リン脂質の脂肪酸部の決定に関わる制御因子群を新規に同定し、リン脂質の脂肪酸部形成メカニズムとその意義を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでほとんどその実体が不明であったリン脂質脂肪酸部の切断に関わり、脂肪酸部決定に寄与する新規因子群の同定はリン脂質の脂肪酸部形成機構の全容を解明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。さらに特定のリン脂質が持つ視覚機能への影響を明らかにできたことにより、それらをヒトの網膜色素変性症の治療や予防に応用できる可能性が示された点は医療への応用という観点でも意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：It has been unclear the effect of changes in sn-1 position fatty acids of phospholipids on the normal function of organs. In this study, we found that LPLAT7/LPGAT1 involving in the determination of sn-1 position fatty acids, is essential for visual function and maintenance of adipose tissue, and revealed a part of the mechanism of dysfunction using gene-deficient animals. In addition, new regulatory factors involved in the determination of the fatty acid composition of phospholipids were identified. We revealed the mechanism of fatty acid composition of phospholipids and its biological significance.

研究分野：脂質生物学

キーワード：リン脂質 リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ 網膜変性 脂肪酸誘導体 ホスホリパーゼA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜を構成するリン脂質分子の脂肪酸部が特定の臓器・組織・細胞において多様で特徴的であることは古くから知られており、そのような特定の構造を有するリン脂質分子が生物学的機能を持つことが想定されてきた。しかしながら個々のリン脂質分子自体は遺伝子にコードされないことからタンパク質と同様の解析手法がとれず、リン脂質分子の機能を個体レベルで証明することは難しかった。近年になり、リン脂質の脂肪酸部形成に関わる酵素群としてリゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ (LPLAT) が複数、同定されたことで逆遺伝学的アプローチによるリン脂質分子の存在量を変動させ、生物学的機能と関連させた解析が可能となった。リン脂質には2箇所の脂肪酸部が存在しているがグリセロール骨格の *sn*-1 位には飽和型脂肪酸、*sn*-2 位には不飽和型脂肪酸が主に分布するような特徴が知られている。リン脂質の *sn*-2 位にアラキドン酸(20:4)や DHA(22:6)などの不飽和脂肪酸が導入される意義が解明され、同じ不飽和脂肪酸でもアラキドン酸と DHA では全く異なる生物学的機能に関わることが示された。一方で、*sn*-1 位に飽和脂肪酸や一価不飽和脂肪酸を導入する LPLAT の実体はほぼ不明であった。申請者はリン脂質の *sn*-1 位へ脂肪酸導入する LPLAT の活性を評価する手法を開発し、この手法によりリン脂質の *sn*-1 位に脂肪酸を導入する複数の LPLAT 分子を同定した。個々の LPLAT 分子に関して解析を進めると LPLAT7/LPGAT1 は特にステアリン酸(18:0)を選択的にリン脂質分子に導入することを見出した。LPLAT7/LPGAT1 を欠損したマウスは成長異常を示し、半数が性成熟前に死亡した。さらに欠損マウスは進行性の網膜変性をきたすことを見出した。このように *sn*-1 位に特定の脂肪酸をもつリン脂質にも生物学的機能の存在が示唆された。しかしながら表現型の詳細やそのメカニズムは全く不明であり、多くの疑問が残されていた。特定の構造を有するリン脂質分子がどのように機能しているのか分子レベルでのメカニズムはほぼ未解明であった。仮説としてリン脂質は生体膜を構成していることから膜の厚み・曲率・柔軟性を規定することや直接相互作用することで膜タンパク質の機能に影響していることが想定された。このような解析には特定のリン脂質分子近傍に存在し、機能調節させている膜タンパク質を同定する手法の確立が必要であった。さらに、脂質生物学の観点で残された学術的な問いとして LPLAT 分子にリゾリン脂質を供給しているホスホリパーゼ A (PLA) 分子の多くが未同定である点があげられた。これまで多くの可溶性 PLA 分子が同定されているが LPLAT との協調作用が示されたものや遺伝子欠損の表現型が一致するものはごくわずかであった。そこで未同定の PLA 群が存在し、LPLAT と協調した作用を担っていると考え、新規の膜型 PLA 分子の探索が必要と考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、*sn*-1 位に特定の脂肪酸を持つリン脂質と関連した特定の生命現象を見出し、分子レベルでのリン脂質の機能発現機構の解明を目指すとともに、新規のリン脂質代謝酵素の同定によるリン脂質脂肪酸決定のメカニズムの詳細な解明であった。具体的にはリン脂質 *sn*-1 位に特定の脂肪酸を有するユニークなリン脂質分子の減少がもたらす個体レベルでの異常を明らかにすること、メカニズム解明に向けた特定のリン脂質と相互作用するタンパク質因子の同定手法を確立し、同定した膜タンパク質の機能評価を行うこと、新たなリン脂質代謝酵素の探索を行い、リン脂質の脂肪酸決定のメカニズムの全容解明に向けた萌芽的なさらなる解析を実施することを目的とした。

### 3. 研究の方法

*sn*-1 位ステアリン酸含有リン脂質形成酵素である LPLAT7/LPGAT1 の機能解析を中心に実施した。全身性 LPGAT1 欠損マウスは進行性の網膜変性を示すことを見出していたため、網膜へのリン脂質供給の異常が網膜の細胞でのリン脂質合成異常によるものか明らかにするために網膜特異的 LPLAT7/LPGAT1 欠損マウスを解析した。さらに異常を生じる細胞種を発現解析、リン脂質解析から同定した。異常が生じている細胞種においてその詳細を解析した。また、LPLAT7/LPGAT1 欠損マウスは低温への適応性やインスリン分泌異常等への関与も示唆されることから他の表現型についても解析を実施した。

特定のリン脂質分子と相互作用する因子の同定手法を確立し、同定した膜タンパク質の機能評価を行う実験系の確立を目指した。LPLAT7/LPGAT1 依存的にリン脂質に取り込まれる脂肪酸誘導体を探索した。脂肪酸誘導体に存在する機能性残基に対して Click 反応を利用して可視化または標識化可能か検証し、標的タンパク質同定の手法構築を検討した。

リン脂質脂肪酸部の新たな代謝酵素の探索を行った。アディポネクチン受容体として知られる AdipoR がリン脂質の飽和化に関わる因子として報告されていたことから、リコンビナント AdipoR が *in vitro* においてリン脂質に対し、直接の代謝活性を有するか検討を行った。また、AdipoR が属する PAQR 遺伝子ファミリーの分子に関して、同様にリン脂質脂肪酸部に与える影響を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) リン脂質 *sn*-1 位脂肪酸導入酵素 LPLAT7/LPGAT1 の機能解析

###### 網膜組織における解析

LPLAT7/LPGAT1 欠損マウスの網膜組織において表現型の詳細な解析を実施した。これまで全身性に LPLAT7/LPGAT1 欠損したマウスを用いて進行性の網膜変性をきたすことを見出していたが、LPLAT7/LPGAT1 は全身の組織に発現することから網膜変性の要因が網膜自体に発現する LPLAT7/LPGAT1 が重要なのか、もしくは肝臓などの別の組織で形成されたステアリン酸(C18:0)含有リン脂質が網膜組織に届けられ、機能しているのか不明であった。そこで網膜特異的に LPLAT7/LPGAT1 を欠損するマウスを作出し、網膜組織の観察を行ったところ、網膜特異的欠損マウスにおいても全身性と同様の網膜変性が観察されたことから網膜変性の原因は他の組織からのステアリン酸(C18:0)含有リン脂質の供給不全ではなく、網膜組織自体での LPLAT7/LPGAT1 によるステアリン酸(C18:0)含有リン脂質の形成が重要であることがわかった。

また、組織変性が観察されはじめる生後 3 週齢前後において TUNEL 染色を行うと視細胞においてアポトーシスが亢進していることから、ステアリン酸(C18:0)含有リン脂質の減少は視細胞においてアポトーシスによる細胞死を誘起していることが明らかとなった。さらに網膜組織において様々な細胞種のマーカー分子の免疫染色を行なったところ、概ねほとんどのマーカー分子の発現や局在には異常は認められなかったが、視細胞が特異的に発現しているロドプシンの局在を観察したところ、組織変性が観察されはじめる生後 3 週齢より前の段階においてロドプシンが先端の disc 構造だけでなく、細胞体側にも局在する様子が観察され、ロドプシンの局在や細胞内輸送に異常が生じていることが判明した。このことから LPLAT7/LPGAT1 欠損によるステアリン酸(C18:0)含有リン脂質の減少は視細胞、特に桿体細胞においてロドプシンの局在化に異常をきたすこと、以前の解析で見出したゴルジ体の変性なども加味すると細胞内輸送系全般に異常が生じている可能性も示唆された。またその結果、桿体細胞ではアポトーシスが亢進して、最終的には全ての桿体細胞が脱落して網膜変性を生じていることが明らかとなった。

###### 寒冷刺激時における脂肪組織の解析

LPLAT7/LPGAT1 は脂肪組織に発現し、寒冷刺激によりその発現が変動することが示唆されていたため、寒冷刺激時における脂肪組織での解析を行った。脂肪組織の中でも褐色脂肪組織において、マウスを寒冷ストレスに暴露することで LPLAT7/LPGAT1 が発現上昇することが確認された。また LPLAT7/LPGAT1 がその産生に関わるステアリン酸含有リン脂質の増加が観察された。脂肪組織特異的 LPLAT7/LPGAT1 欠損マウスを用いて解析を進めると欠損マウスでは褐色脂肪組織において脂肪蓄積が抑制される傾向が観察された。また白色脂肪組織においても寒冷刺激時のベージュ化が抑制される傾向にあることを見出した。これらから LPLAT7/LPGAT1 は寒冷刺激時にステアリン酸含有リン脂質を産生することで脂肪組織において熱産生や組織の機能維持に関わる可能性が示唆された。

##### (2) 脂肪酸誘導体を用いた LPLAT 解析ツールの検討

特異的脂質近傍分子同定に向けた解析ツールの検討を行った。様々な構造を有する脂肪酸誘導体(アルキン脂肪酸やアジド脂肪酸)を培養細胞に添加し、リン脂質への取り込みを質量分析計により解析した。その結果、LPLAT7/LPGAT1 により選択的に認識され、リン脂質への取り込みの増大が見られる脂肪酸誘導体として C17-アジドを見出した。また他の LPLAT に関しても選択的にリン脂質に取り込まれる脂肪酸誘導体を見出した。さらに脂肪酸誘導体を取り込ませた培養細胞に対してクリック反応により蛍光団を付与することで細胞レベルでのリン脂質への脂肪酸誘導体取り込みの可視化を試みた。複数の LPLAT 発現細胞においてはその発現部位である小胞体(ER)にシグナルが観察され、LPLAT による脂肪酸の導入の可視化に成功した。特に LPLAT7/LPGAT1 発現細胞では小胞体の中でも three-way-junction と呼ばれる小胞体の網目構造が交差する部位で強いシグナルが観察されたことから LPLAT7/LPGAT1 の小胞体における機能的部位として ER three-way-junction が想定された。さらに近傍への標識化が可能であるか検討を進めることで標的タンパク質の濃縮・同定への応用が期待される。

##### (3) リン脂質脂肪酸部の新規代謝酵素の解析

アディポネクチン受容体(AdipoR)はアディポネクチンをリガンドとする受容体として知られるが、線虫においては飽和脂肪酸毒性を軽減する因子として報告されており、リン脂質代謝との関連が示唆されていた。AdipoR を哺乳類培養細胞に発現させると飽和脂肪酸を含有するリン脂質レベルが低下することを見出した。さらに AdipoR の精製タンパク質とリン脂質を試験管内で混同すると、リン脂質の *sn*-2 位の脂肪酸が切断され、1-アシル型リゾリン脂質を生じるホスホリパーゼ A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>) 活性を示すことを明らかにした。また切断させる脂肪酸鎖には特異性があり、飽和脂肪酸が *sn*-2 位に存在する場合にその活性が非常に強いことが判明した。培養細胞において飽和脂肪酸を大量に付加すると飽和脂肪酸ストレスが生じることが知られているが、このような飽和脂肪酸ストレスに対して AdipoR は防御的機能を持っており、その機能は AdipoR の PLA 活性に依存していることが明らかとなった。さらに AdipoR は PAQR と呼ばれる family に属し、複数種類の相同分子が存在しているため、それらの分子にも PLA 活性を持つ分子が存在しているのではないかと考え、ファミリー分子についても同様の検討を行った。その結果、PAQR ファ

ミリー分子の多くは過剰発現細胞において顕著なリゾリン脂質の増加を誘導し、PLA 活性を持つ可能性が示唆された。また過剰発現細胞や発現抑制細胞ではリン脂質の脂肪酸分子種の変化も観察された。その変化は PAQR ファミリー分子ごとに異なっており、特定のファミリー分子が特定の極性頭部や脂肪部を持つリン脂質量を変動させることが判明した。これらの解析から PAQR ファミリー分子はリン脂質の脂肪酸部を規定する重要な因子であることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yaginuma Shun, Kawana Hiroki, Aoki Junken	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 2487 ~ 2487
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 Shibata Takeaki, Kawakami Kouki, Kawana Hiroki, Aoki Junken, Inoue Asuka	4. 巻 602
2. 論文標題 Phenotypic evaluation of constitutive GPCR/G-protein signaling in zebrafish embryos and larvae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 70 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.02.098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shibata Takeaki, Kawana Hiroki, Nishino Yuri, Ito Yoshiko, Sato Hiroyasu, Onishi Hirofumi, Kano Kuniyuki, Inoue Asuka, Taketomi Yoshitaka, Murakami Makoto, Kofuji Satoshi, Nishina Hiroshi, Miyazawa Atsuo, Kono Nozomu, Aoki Junken	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 7312
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 Kawana Hiroki, Ozawa Masaya, Shibata Takeaki, Onishi Hirofumi, Sato Yukitaka, Kano Kuniyuki, Shindou Hideo, Shimizu Takao, Kono Nozomu, Aoki Junken	4. 巻 63
2. 論文標題 Identification and characterization of LPLAT7 as an sn-1-specific lysophospholipid acyltransferase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 100271 ~ 100271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jlr.2022.100271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Petkevicius K, Palmgren H, Glover MS, Ahnmark A, Andreasson AC, Madeyski-Bengtson K, Kawana H, ... Kono N, Aoki J, Hess S, Sienski G, Pilon M, Bohlooly-Y M, Maresca M, Peng XR	4. 巻 13
2. 論文標題 TLCD1 and TLCD2 regulate cellular phosphatidylethanolamine composition and promote the progression of non-alcoholic steatohepatitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-33735-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato Tomoki, Umebayashi Shuhei, Senoo Nanami, Akahori Takumi, Ichida Hiyori, Miyoshi Noriyuki, Yoshida Takuya, Sugiura Yuki, Goto-Inoue Naoko, Kawana Hiroki, Shindou Hideo, Baba Takashi, Maemoto Yuki, Kamei Yasutomi, Shimizu Takao, Aoki Junken, Miura Shinji	4. 巻 299
2. 論文標題 LPGAT1/LPLAT7 regulates acyl chain profiles at the sn-1 position of phospholipids in murine skeletal muscles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 104848 ~ 104848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.104848	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川名裕己、小澤雅也、河野望、青木淳賢
2. 発表標題 LPLAT7/LPGAT1によるER形態制御機構の解析
3. 学会等名 第64日本脂質生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川名裕己、大西浩文、八木優太郎、可野邦行、河野望、田辺弘明、岩部-岡田美紀、岩部真人、山内敏正、門脇孝、横山茂之、青木淳賢
2. 発表標題 PAQRファミリー分子は新規リン脂質代謝酵素群である
3. 学会等名 第95回日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩間大河, 可野邦行, 川名裕己, 河野望, 長田克之, 橋立智美, 進藤英雄, 青木淳賢
2. 発表標題 MSイメージングを用いた組織切片上での脂肪酸リモデリング活性の可視化
3. 学会等名 第64日本脂質生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩間大河, 可野邦行, 川名裕己, 河野望, 長田克之, 橋立智美, 進藤英雄, 青木淳賢
2. 発表標題 組織切片上でのde novoリン脂質生合成活性の可視化
3. 学会等名 第95回日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大西浩文, 川名裕己, 可野邦行, 河野望, 田辺弘明, 岩部(岡田)美紀, 岩部真人, 山内敏正, 横山茂之, 門脇孝, 青木淳賢
2. 発表標題 魚類PAQR分子のリン脂質代謝酵素としての性状解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八木優太郎, 川名裕己, 可野邦行, 河野望, 田辺弘明, 岩部(岡田)美紀, 岩部真人, 山内敏正, 横山茂之, 門脇孝, 青木淳賢
2. 発表標題 アディポネクチン受容体はホスホリパーゼA2活性によりリン脂質の不飽和化に寄与する
3. 学会等名 第95回日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野利佳子, 佐藤友紀, 村上紗希, 三好規之, 川名裕己, 青木淳賢, 三浦進司
2. 発表標題 腸管上皮におけるアシル基転移酵素LPGAT1/LPLAT7を介したリン脂質クオリティの制御と栄養素吸収機能への影響
3. 学会等名 第65日本脂質生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 曾我茜, 市田日和, 三好規之, 三好規之, 川名裕己, 青木淳賢, 佐藤友紀, 三浦進司
2. 発表標題 アシル基転移酵素LPGAT1/LPLAT7の過剰発現が筋性状・筋機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第96回日本生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩田紘歩, 坂本新悟, 川名裕己, 河野望, 青木淳賢
2. 発表標題 THP-1細胞分化に伴うリン脂質脂肪酸鎖リモデリングを担う分子の探索
3. 学会等名 第96回日本生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小野利佳子, 佐藤友紀, 村上紗希, 三好規之, 川名裕己, 青木淳賢
2. 発表標題 アシル基転移酵素LPLAT7による腸管上皮細胞のPCアシル基リモデリングと糖質の消化・吸収への影響
3. 学会等名 第96回日本生化学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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			
スウェーデン	AstraZeneca			