

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590367

研究課題名(和文)新規リゾホスホリパーゼの機能とリン脂質一重膜制御の分子基盤の解明

研究課題名(英文)Role of a novel lysophospholipase in phospholipid metabolism

研究代表者

平林 哲也 (HIRABAYASHI, Tetsuya)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号：90345025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：新規リゾホスホリパーゼである iPLA2 は、リン脂質の主要構成成分であるホスファチジルコリンを分解して遊離コリンを取り出す代謝経路に必要な酵素であることを見出した。この経路が遮断された遺伝子改変マウスでは、肝臓で内因性にコリンを取り出すことができなくなり、その結果コリンが代謝されて生じるメチル供与体であるベタインやS-アデノシルメチオニンなども不足し、脂質や糖などのエネルギー代謝が正常に保てなくなることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We have discovered that a novel lysophospholipase, iPLA2, is essential for the mobilization of free choline from the major membrane phospholipid, phosphatidylcholine. Mice deficient in this enzyme cannot utilize sufficient endogenous free choline in the liver, which leads to a shortage of hepatic methyl donors, betaine and S-adenosylmethionine. Our results also indicate that iPLA2 is required for normal lipid and glucose metabolism.

研究分野：脂質生物学

キーワード：ホスホリパーゼ コリン グリセロホスホコリン 肝臓 脂肪組織 脂質代謝 褐色化

1. 研究開始当初の背景

脂質代謝の異常は脂肪肝やインスリン耐性と密接に関連し、トリグリセリドやコレステロールエステルなどの中性脂質の貯蔵と利用に中心的な役割を果たす脂肪滴の形成や分解に関する研究が盛んに行われている。しかしながら、ホスファチジルコリン(PC)を主成分とするリン脂質膜の代謝が、どのように他の代謝経路や全身の脂質代謝・糖代謝に影響を及ぼしているかは、未だ不明な点が多い。PCの合成は全ての細胞に存在する第1経路(CDP-コリン経路)と、肝臓に特異的な第2経路(PENT経路)により調節される。近年の研究により、(i)脂肪滴の形成時に第1経路によるPC供給が不足すると脂肪滴サイズが肥大すること、(ii)第2経路を阻害すると肝臓で脂肪変性が生じること、(iii)2つの経路で合成されるPCには質的な違いがあり、第2経路で生成するPCはアラキドン酸やドコサヘキサエン酸などの多価不飽和脂肪酸含量率が高いことなどが報告され、PC合成系のエネルギー代謝における重要性が明らかとなりつつある。一方で、PCを分解代謝する経路の実体やその意義はほとんど解明されていない。我々は生体膜リン脂質の代謝酵素である細胞内ホスホリパーゼA₂(PLA₂)の研究に長年取り組んできた経緯から、哺乳動物の細胞内PLA₂ファミリーの全分子種に相当する6種のCa²⁺依存性PLA₂(cPLA₂)と9種のCa²⁺非依存性PLA₂(iPLA₂)に着目して解析を進めた結果、これまで機能が不明であった新規酵素iPLA₂(PNPLA7)が、(i)肝臓、脂肪組織、骨格筋に高発現し、絶食時にさらに発現誘導される、(ii)PCの代謝産物であるリゾPCを特異的に加水分解する、(iii)小胞体膜と脂肪滴に局在する、ことを見出した。更に我々が作出したiPLA₂の全身性欠損マウスは、(iv)生育が悪く、肝臓への脂質蓄積(脂肪肝)と白色脂肪組織の減少を伴う脂質代謝異常を示す、(v)6週齢を過ぎると背骨湾曲、歩行異常、体毛のバサツキ等の老化症状を示し、10週齢頃までに死亡する、などの特徴が見られた。以上の結果を統合し、iPLA₂は肝臓でPCを分解する経路において重要な役割を果たし、この経路が遮断された影響で全身の脂質エネルギー代謝が異常をきたし、脂肪肝と脂肪組織の萎縮を伴う生育不良や老化が生じるのではないかという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、リン脂質膜の主要成分であるホスファチジルコリンの分解経路を制御すると予想される新規リゾホスホリパーゼに着目し、欠損マウスの表現型、質量分析によるメタボローム解析、酵素の発現や活性の調節機構、脂質代謝疾患との関連などについて

重点的に解析を行うことで、本酵素の生理的役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

iPLA₂の機能を明らかにするための実験として、以下の方法に基づいて進めた。

(1)全身欠損マウスや組織特異的欠損マウスの表現型の詳細な検討

(2)血中代謝物、病態マーカー、各種ホルモンの測定

(3)肝臓、白色脂肪細胞、骨格筋をはじめとした各臓器の遺伝子発現解析(マイクロアレイ解析ならびに定量的PCR)

(4)肝臓、白色脂肪細胞、骨格筋をはじめとした各臓器の脂質および低分子量化合物の質量分析による網羅的解析

(5)遺伝子改変マウスから初代培養した肝細胞、白色脂肪細胞の発現遺伝子、代謝物の解析

4. 研究成果

全身性 iPLA₂ 欠損マウスのは成長不良、低血糖、エネルギー消費の増加、脂肪組織の退縮、肝臓における脂肪酸合成の低下など、コリン・メチオニン制限食によって生じる表現型と共通の特徴を示したが、症状はより深刻で早期に死亡した。各臓器の水溶性低分子量化合物メタボローム解析の結果、肝臓において、グリセロホスホコリンが激減し、代謝経路の下流に位置するコリン、ペタイン、S-アデノシルメチオニンが有意に減少していることを見出した。全身性 iPLA₂ 欠損マウス由来の初代培養肝細胞でも、同様の結果が再現されたことから、iPLA₂ は肝臓でリゾホスファチジルコリンを加水分解して、グリセロホスホコリンを産生するリゾホスホリパーゼとして機能すると考えられた。Tyroxapol によってリポプロテインリパーゼを阻害して血中トリグリセリド濃度の経時変化を測定することで、欠損マウスでは肝臓からの VLDL 分泌が大きく低下することが示され、これはコリン欠乏による VLDL 分泌低下に一致すると思われた。欠損マウスでは肝臓へのグリコーゲン蓄積を伴う低血糖症が見られ、それらを補償するために白色脂肪組織の lipolysis が促進され、エネルギー消費の増大と Ucp1 などの発現増加を伴う白色脂肪組織の褐色化が進行し、痩せることが示唆された。欠損マウスから分離した脂肪細胞由来幹細胞を *in vitro* で培養した場合は、野生型と同様に脂肪細胞分化(adipogenesis)が進行したことから、欠損マウスが示す脂肪組織の褐色化は脂肪細胞自身に原因があるのではなく、全身のエネルギー代謝の異常が原因と考えられた。

本研究により、iPLA₂ はリン脂質のホスファチジルコリンを分解して遊離コリンを取り出す経路に必須のリゾホスホリパーゼであることが示された。この経路が遮断されると、肝臓で内因性コリンを作り出す能力が大幅に低下し、その結果メチル供与体として重要なベタインや S-アデノシルメチオニンが不足するとともに、脂質代謝や糖代謝にも異常が生じ、生体のエネルギーホメオスタシスを正常に保てなくなることが判明した。

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 1 件)

Sato H, Taketomi Y, Ushida A, Isogai Y, Kojima T, Hirabayashi T, Miki Y, Yamamoto K, Nishito Y, Kobayashi T, Ikeda K, Taguchi R, Hara S, Ida S, Miyamoto Y, Watanabe M, Baba H, Miyata K, Oike Y, Gelb MH, Murakami M. The Adipocyte-Inducible Secreted Phospholipases PLA2G5 and PLA2G2E Play Distinct Roles in Obesity. *Cell Metab.* 20:119-32, 2014, 査読有, doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.002

[学会発表](計 16 件)

Hirabayashi T, Mouri M, Shimamura T, Yokoyama K, Ikeda K, Nakata R, Murakami M. PNPLA7 lysophospholipase has a pivotal role in hepatic choline metabolism and systemic energy homeostasis. The 6th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators (PLM2015) from bench to translational medicine, 2015.2.11, 京王プラザホテル(東京都新宿区)

Murakami M, Taketomi Y, Sato H, Miki Y, Hirabayashi T, Yamamoto K. New insight into PLA₂s: from outside and inside. The 6th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators (PLM2015) from bench to translational medicine, 2015.2.11, 京王プラザホテル(東京都新宿区)

Anjo T, Hirabayashi T, Yokoyama K, Yamamoto K, Naoe A, Tsujimura H, Ishikawa J, Muñoz-Garcia A, Brash AR, Murakami M. Impaired skin barrier function in PNPLA1-deficient mice. The 6th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators (PLM2015) from bench to translational medicine, 2015.2.10, 京王プラザホテル(東京都新宿区)

Ueno N, Taketomi Y, Yamamoto K, Hirabayashi T, Nakanishi H, and Murakami M. Analysis of two major intracellular PLA₂

in mast cells reveals crucial contribution of cPLA₂α, not iPLA₂β, to lipid mobilization in proximal mast cells and distal fibroblasts. The 6th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators (PLM2015) from bench to translational medicine, 2015.2.10, 京王プラザホテル(東京都新宿区)

村上誠、平林哲也、山本圭. 皮膚脂質代謝の新機軸. 第 7 回セラミド研究会 2014.10.30 東京コピキタス協創広場 CANVAS(東京都中央区)

平林哲也、村上誠. 新規 PNPLA/iPLA₂ の新しい機能. 第 87 回日本脂質生化学会、2014.10.16、国立京都国際会館(京都府京都市)

安城樹、平林哲也、村上誠. 皮膚バリア形成に関わる新規脂質代謝酵素 PNPLA1、第 87 回日本脂質生化学会、2014.10.17、国立京都国際会館(京都府京都市)

安城樹、平林哲也、山本圭、村上誠. 皮膚バリア機能における新規脂質代謝酵素 PNPLA1 の役割. 第 56 回日本脂質生化学会、2014. 6. 6. 近畿大学東大阪キャンパス(大阪府東大阪市)

毛利美紗、平林哲也、島村透、安城樹、小林哲幸、村上誠. 脂肪組織喪失を示すリゾホスホリパーゼ Pnpla7 欠損マウスの解析. 第 86 回日本脂質生化学会、2013.9.12、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

安城樹、平林哲也、山本圭、村上誠. 皮膚バリア機能における新規脂質代謝酵素 PNPLA1 の役割. 第 86 回日本脂質生化学会、2013.9.12、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Tetsuya Hirabayashi, Misa Mouri, Toru Shimamura, Tatsuki Anjo, Kohei Yokoyama, Kazutaka Ikeda, Makoto Murakami. PNPLA7 is a novel lysophospholipase essential for hepatic choline homeostasis and systemic energy metabolism. 2013 FASEB Science Research Conference Lysophospholipid and Other Related Mediators - From Bench to Clinic, 2013.8.5、ヒルトンニセコビレッジ(北海道虻田郡ニセコ町)

平林哲也、毛利美紗、安城樹、島村透、横山浩平、池田和貴、隅寿恵、村上誠. 新規リゾホスホリパーゼ PNPLA7 による GPC 産生経路の生理的役割. 第 55 回日本脂

質生化学会、2013.6.7、ホテル松島大観
荘(宮城県宮城郡松島町)

平林哲也、村上誠. 新規リゾホスホリパー
ゼによる GPC 産生経路の生理的意義.
第 85 回日本生化学会、2012.12.15、福岡
国際会議場(福岡県福岡市)

毛利美紗、平林哲也、島村透、安城樹、
小林哲幸、村上誠. 遺伝子欠損マウスを
用いた新規細胞内リゾホスホリパーゼの
機能解析. 第 85 回日本生化学会、
2012.12.15、福岡国際会議場(福岡県福岡
市)

武富芳隆、上野紀子、小島卓巳、田中 智
之、依田恵美子、佐藤弘泰、平林哲也、
山本圭、原俊太郎、村上誠. マスト細胞
を制御するホスホリパーゼ A2 分子群の
網羅的解析、第 85 回日本生化学会、
2012.12.15、福岡市)

上野紀子、武富芳隆、山本圭、平林哲也、
亀井大輔、北芳博、清水孝雄、新沢康英、
辻本賀英、池田和貴、田口良、村上誠.
マスト細胞の cPLA₂ により遊離される
アラキドン酸は局所環境で mPGES-1 によ
り PGE₂ へ変換され抗アレルギーに関わる、
第 54 回日本脂質生化学会、2012.6.8、九
州大学医学部百年講堂(福岡県福岡市)

〔図書〕(計 1 件)

平林哲也、村上誠. エル・アイ・シー、
疾患モデルの作製と利用 - 脂質代謝異常
と関連疾患(下巻)、第 5 章第 1 節 細胞
内ホスホリパーゼ A₂、2015 年、p. 147-159

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：皮膚バリア機能促進剤のスクリーニ
ング方法

発明者：村上誠、平林哲也

権利者：公益財団法人東京都医学総合研究所

種類：特許

番号：特願 2014-116066

出願年月日：2014 年 6 月 4 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/lipid/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平林 哲也 (HIRABAYASHI, Tetsuya)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体
分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号：90345025