

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670021

研究課題名(和文)2-アシル型リゾリン脂質の細胞内機能の解明

研究課題名(英文) Intracellular roles of 2-acyl-lysophospholipids

研究代表者

青木 淳賢 (Aoki, Junken)

東北大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20250219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： リゾリン脂質はsn-1位あるいはsn-2位に脂肪酸を1本のみ有するリン脂質である。脂質メダイエーターとしてのリゾリン脂質とは対照的に、細胞内リゾリン脂質の意義は全く未解明である。本研究では、2-アシル型リゾリン脂質と細胞内型PLA1の細胞内機能の明らかにすることにより新たなリゾリン脂質機能の解明を目指した。本研究では、細胞内のリゾリン脂質アシル化反応を止めることで、リゾリン脂質が蓄積することを見出した。また、この際、細胞内PLA1を過剰発現させることで、高濃度のリゾリン脂質を細胞内に蓄積させることに初めて成功し、同時に、ミトコンドリア、核膜の異常が起きることを見出した。

研究成果の概要(英文)： Lysophospholipid is a kind of phospholipids with only one fatty acid either at the sn-1 or sn-2 position of glycerol. In contrast to the extracellular lysophospholipids, roles of intracellular lysophospholipids remain to be determined. In this study we tried to elucidate the role of intracellular lysophospholipids as well as its producing enzymes, intracellular phospholipase A1 (iPLA1). We found that, by inhibiting lysophospholipid acylation reaction, lysophospholipid level increased in cells. In addition, by over expressing iPLA1a, we increased the lysophospholipid level dramatically in the cells. Interestingly, we observed abnormal mitochondria and nuclear envelope in such cells, indicating possible role of intracellular lysophospholipids in regulating maintenance of these organelles.

研究分野：脂質生物学

キーワード：リゾリン脂質 脂肪酸 2-アシルリゾリン脂質

### 1. 研究開始当初の背景

ジアシルリン脂質はグリセロール骨格に 2 本脂肪酸とリン酸を含む極性基が結合した構造を有する主要な細胞膜構成成分である。グリセロール骨格の sn-1 位には主に飽和脂肪酸と単価不飽和脂肪酸、sn-2 位には多価不飽和脂肪酸がエステル結合している。このようなジアシルリン脂質の脂肪酸の非対称性は主にリモデリング反応によって形成される。リモデリング反応とは、ホスホリパーゼ A1/2 (PLA1/2) によってジアシルリン脂質の sn-1 位、sn-2 位の脂肪酸が切れ、2-アシル、1-アシルリゾリン脂質が産生される。産生されたリゾリン脂質はリゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ(LPLAT)によって脂肪酸が導入されて再びジアシルリン脂質に変換される。このリモデリング反応は古くから知られていたが、その詳細な分子メカニズムや関与する酵素群の実態は長らく不明なままであった。しかし、近年、sn-2 位のリモデリングを担う候補分子が数多く報告され、sn-2 位のリモデリングメカニズムと生体内機能が徐々に明らかになりつつある。一方、sn-1 位のリモデリングはホスファチジルイノシトール (PI) に関して線虫で一部分かっただけである。線虫では iPLA1 が PI の sn-1 位の脂肪酸を切り出し、acl-8,9,10 が脂肪酸を導入する。哺乳類には 3 種類の iPLA1 が存在する (iPLA1 $\alpha$ , iPLA1 $\beta$ , iPLA1 $\gamma$ )。このうち、iPLA1 $\alpha$  と iPLA1 $\beta$  は invitro の酵素反応において様々な種類の脂質に作用することが分かっている。一方、iPLA1 $\gamma$  はこれまで酵素活性は検出されていない。興味深いことに、ごく最近、遺伝性痙性対麻痺の原因遺伝子として iPLA1 $\alpha$  と iPLA1 $\beta$  が同定された。遺伝性形成対麻痺とは下肢の痙攣と筋力低下を主症状とする神経変性疾患である。

### 2. 研究の目的

このように iPLA1 は個体レベルで重要な機能を担っていると考えられるが、生体内で iPLA1 はどのような脂質を切っているのか、脂質を切ることでどのような細胞内機能を発揮しているのかはほとんど分かっていない。また sn-1 位のリモデリングとの関与も不明なままです。そこで本研究では iPLA1 $\alpha$  と iPLA1 $\beta$  に着目して、その脂質代謝機構と細胞内機能解析を行った。

### 3. 研究の方法

リゾリン脂質の分析は LC-MS/MS で行った。本系では、PLA $_1$  の産物である 2-アシル型リゾリン脂質と PLA $_2$  の産物である 1-アシル型リゾリン脂質を分けて測定した。細胞の遺伝子導入はリポフェクトアミン 2000 を用いた。

### 4. 研究成果

まず iPLA1 $\alpha$  と iPLA1 $\beta$  は細胞内でどのような脂質を切っているのか調べる目的で、過剰発現した時の細胞内リゾリン脂質量を測定した。

リゾリン脂質の測定は液体クロマトグラフィー/マススペクトロメトリーを用いて行った。その結果、iPLA1 を過剰発現させても全く細胞内のリゾリン脂質量に変化は見られなかった。過剰発現しても PLA1 の産生物である 2-アシルリゾリン脂質が増加しないことから、産生された 2-アシルリゾリン脂質が速やかに再アシル化反応を受けて除去されていると考えた。そこで、我々は細胞内の再アシル化反応を阻害することを考えた。CI-976 は単離したゴルジ膜上の LPLAT 活性を阻害することが報告されている。我々は CI-976 を細胞に投与した時のリゾリン脂質を測定したところ、様々な 1-アシルと 2-アシルリゾリン脂質 (LPC, LPE, LPI, LPG, LPS) が劇的に増加した。この結果は、CI-976 が 1-アシルと 2-アシルリゾリン脂質に対する LPLAT の活性を幅広く阻害したことを示唆している。ところで、CI-976 はもともとコレステロールアシルトランスフェラーゼの阻害剤として合成された。そのため、CI-976 の特異性は高くない。そこで、別の手法で再アシル化反応を止めることを試みた。LPLAT は主に acyl-CoA の脂肪酸を利用して再アシル化反応を行うため、acyl-CoA の合成を止めることでも LPLAT 活性を抑制できるのではないかと考えた。TriacsinC は 5 つの acyl-CoA 合成酵素のうち 4 つを阻害することができる。私は TriacsinC を処理した時の細胞内 acyl-CoA 濃度を測定したところ、acyl-CoA の濃度が大きく低下することが分かった。このことから、acyl-CoA 依存的な LPLAT 反応はほぼ完全に抑制されていると予想される。次に、細胞に TriacsinC で処理した時のリゾリン脂質を調べた。その結果、PLA1 の代謝産物である 2-アシル型リゾリン脂質の蓄積が顕著に観察された。この結果は CI-976 の時と非常に類似している。CI-976 あるいは TriacsinC によって増加した 2-アシルリゾリン脂質に iPLA1 $\alpha$  と iPLA1 $\beta$  が関与するのかが調べた。iPLA1 $\alpha$  ノックダウン細胞に CI-976 あるいは TriacsinC を処理すると、2-アシル型リゾリン脂質の蓄積が減少した。1-アシルリゾリン脂質は変化しないか、あるいは増加傾向にあった。iPLA1 $\alpha$  過剰発現細胞に CI-976 あるいは TriacsinC を処理すると、ノックダウンの時とは反対に 2-アシルリゾリン脂質の蓄積が増強された。このとき 1-アシルリゾリン脂質は変化しなかった。iPLA1 $\beta$  に対しても同様の実験を行ったところ、ノックダウンにより 2-アシルリゾリン脂質の蓄積が減少した。過剰発現した時には 2-アシル LPE のみ増加が見られた。2-アシルリゾリン脂質に対する影響は iPLA1 $\alpha$  に比べて iPLA1 $\beta$  で顕著に見られたため、細胞内の主要な sn-1 位の脱アシル化酵素は iPLA1 $\alpha$  であると考えられる。

次に、sn-1 位のリモデリングの細胞内機能について解析を行った。細胞内では、ミトコンドリアは常に融合と分裂を繰り返し、網目

状のネットワーク構造が観察される。これまで、CI-976 を細胞に投与するとミトコンドリアがフラグメント化することが報告されている。興味深いことに、TriacsinC 処理した場合にもミトコンドリアのフラグメント化が認められた。このことからリゾリン脂質の再アシル化反応がミトコンドリアの形態形成に重要であることが予想される。そこで次にミトコンドリアの形態形成における脱アシル化反応の関与を調べた。iPLA1 のノックダウン細胞では control と比べて変化は認められなかったが、iPLA1 をノックダウンした場合、CI-976 や TriacsinC と類似したミトコンドリアのフラグメント化が観察された。PLA2 阻害剤 (MAFP) を細胞に加えた時には、ミトコンドリアの形態に異常は見られなかった。以上の結果より、iPLA1 による sn-1 位の脂肪酸の切り出しとそれに引き続くアシル化反応 (sn-1 位の脂肪酸リモデリング反応) がミトコンドリアの形態を制御することが示唆された。iPLA1 の細胞内局在を調べたところ、通常の培養条件下では iPLA1 は主に細胞質、ゴルジ体に局在が認められた。一方、CI-976 を投与した時には iPLA1 はドット状の局在を示し、その多くがミトコンドリアと共局在した。このことから、iPLA1 はフラグメント化したミトコンドリアに集まって、そこでリモデリングを行っていることが考えられる。iPLA1 はミトコンドリアが融合した後、速やかにミトコンドリアから離れるため、通常の培養条件下ではミトコンドリアへの局在がほとんど見られなかったのかもしれない。一方、iPLA1 は細胞質にのみ局在し、ミトコンドリアへの局在は観察されなかった。このように iPLA1 $\gamma$  と iPLA1 $\alpha$  では細胞内局在が大きく異なるため、iPLA1 $\alpha$  のノックダウンではミトコンドリアに影響が見られなかったと考えられる。CI-976 はミトコンドリアのフラグメント化に加えて、ゴルジ体の tubulation 化、トランスフェリン (Tf) の細胞内輸送阻害を引き起こすことが知られている。PLA2 阻害剤は CI-976 によるゴルジの tubulation 化を抑制し、また、Tf の細胞内輸送を阻害する。このことから、sn-2 位の脂肪酸代謝がこの 2 つの細胞内現象に重要であると考えられる。しかし、一部の PLA2 阻害剤は PLA1 活性も阻害することが報告されており、PLA2 阻害剤の結果の一部は、PLA1 阻害によるものである可能性が考えられる。そこで、iPLA1 のゴルジの tubulation 化と Tf の細胞内輸送における関与を調べた。その結果、iPLA1 をノックダウンした細胞において、ゴルジの tubulation 化、Tf の細胞内輸送には全く影響を与えなかった。この結果は、ゴルジの tubulation 化、Tf の細胞内輸送には sn-1 の脂肪酸代謝は関与しないことと同時に、sn-2 位の脂肪酸代謝が重要であることを強く示唆している。

本研究により細胞内では、iPLA1 と iPLA1

によって産生された 2-アシルリゾリン脂質は、速やかに CI-976-sensitive な LPLAT によって acyl-CoA 依存的に再アシル化される sn-1 位のリモデリング経路の存在が明らかとなった。また、iPLA1 を介した sn-1 位のリモデリングはミトコンドリアの形態形成を担うこと示唆された。これまで 30 種類以上の遺伝性痙性対麻痺の原因遺伝子が同定されている。原因遺伝子の中にはミトコンドリアの機能に重要な分子が含まれており、ミトコンドリアの機能不全が病態発症の原因のひとつであると考えられている。iPLA1 欠損患者では sn-1 位のリモデリング不全がミトコンドリアの形態異常、さらにはそれに付随して起こると予想される機能異常を引き起こし、その結果、痙性対麻痺という病態を発症するメカニズムが想定された。ミトコンドリアの融合促進剤や脂肪酸を加える事で acyl-CoA の濃度を高め、sn-1 位のリモデリングを促進する方法が病態の治療に有効である可能性がある。

#### 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 4 件)

(1) Integrative genomic and proteomic analyses identifies glycerol-3-phosphate acyltransferase as a target of low-dose ionizing radiation in EBV infected-B cells. Tabe Y, Hatanaka Y, Nakashiro M, Sekihara K, Yamamoto S, Matsushita H, Kazuno S, Fujimura T, Ikegami T, Nakanaga K, Matsumoto H, Ueno T, Aoki J, Yokomizo T, Konopleva M, Andreeff M, Miida T, Iwabuchi K, Sasai K. *Int J Radiat Biol.* 92, 24-34 (2016), 査読有, doi: 10.3109/09553002.2015.1106021.

(2) Mitsugumin 56 (hedgehog acyltransferase-like) is a sarcoplasmic reticulum-resident protein essential for postnatal muscle maturation. Van B, Nishi M, Komazaki S, Ichimura A, Kakizawa S, Nakanaga K, Aoki J, Park KH, Ma J, Ueyama T, Ogata T, Maruyama N, Takeshima H. *FEBS Lett.* 589, 1095-1104 (2015), 査読有, doi: 10.1016/j.febslet.2015.03.028.

(3) Possible Involvement of Minor Lysophospholipids in the Increase in Plasma Lysophosphatidic Acid in Acute Coronary Syndrome. Kurano M, Suzuki A, Inoue A, Tokuhara Y, Kano K, Matsumoto H, Igarashi K, Ohkawa R, Nakamura K, Dohi T, Miyauchi K, Daida H, Tsukamoto K, Ikeda H, Aoki J, Yatomi Y. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35, 463-470 (2015), 査読有, doi: 10.1016/j.bbaci.2015.08.003.

(4) Separation and quantification of 2-acyl-1-lysophospholipids and 1-acyl-2-lysophospholipids in biological samples by LC-MS/MS. Okudaira M, Inoue A, Shuto A, Nakanaga K, Kano K, Makide K, Saigusa D, Tomioka Y, Aoki J. J Lipid Res 55, 2178-2192 (2014), 査読有, doi: 10.1194/jlr.D048439.

〔学会発表〕(計 3件)

- (1) ホスホリパーゼ A の細胞内基質の同定 川名裕己、青木淳賢、BMB2015(神戸)平成 27 年 12 月 1-4 日
- (2) ホスホリパーゼ A の細胞内基質の解析、川名裕己、青木淳賢、第 37 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(熊本)平成 27 年 11 月 19-20 日
- (3) ホスホリパーゼ A の細胞内基質の解析、川名裕己、青木淳賢、第 14 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム(千葉) 27 年 9 月 12-13 日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seika/H28/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

青木 淳賢 (AOKI, Junken)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：20250219