

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07389

研究課題名(和文)新規トランスポーターによるミトコンドリアへの脂肪酸輸送機構の解明

研究課題名(英文)A novel mechanism for fatty acid transport in mitochondria

研究代表者

長尾 耕治郎(Nagao, Kohjiro)

京都大学・工学研究科・助教

研究者番号：40587325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアへの脂肪酸の輸送に必須であると考えられてきたCPT1を欠損したショウジョウバエ個体が脂質代謝に異常を示さないことを我々は見出した。このため、“ショウジョウバエにはCPT1に依存せずに脂肪酸をミトコンドリアへと輸送する機構が存在するのではないか”と考え、分子遺伝学手法を駆使したスクリーニングを行った。その結果、機能未知の輸送体がCPT1に依存しない脂肪酸輸送機構に関与することを見出した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the mechanism of fatty acid metabolism in *Drosophila melanogaster* and identified a novel transporter for the fatty acid transport into mitochondria.

研究分野：生化学

キーワード：脂肪酸 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

昆虫は地球上で最も繁栄した動物種であり、特有の優れた代謝システムを進化の過程で獲得してきた。飛翔時にヒトの運動時の20倍という高い代謝率を示すショウジョウバエは、ヒト疾患に関わる遺伝子の70%以上を持つことから、エネルギー代謝機構の解析や脂質異常症に対する治療、創薬に向けた研究に適したモデル生物であると考えられる。我々はショウジョウバエ変異体を用いてエネルギー代謝機構を解析する中で、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1 (CPT1) を欠損したショウジョウバエ個体が脂質代謝に異常を示さないことを見出した。図1のように、CPT1は貯蔵脂質であるトリアシルグリセロールに由来するアシルCoAをアシルカルニチンへと変換する酵素である。アシルCoAがミトコンドリア内膜を通過できないため、CPT1によるアシルCoAのアシルカルニチンへの変換はβ酸化の場であるミトコンドリアへの脂肪酸の輸送のために必須である。このようにCPT1が脂肪酸のβ酸化に必須であり、哺乳動物におけるCPT1の欠損が致死性であることから、ショウジョウバエにおいてCPT1の欠損が脂質代謝に影響しなかったことは驚きであった。このため、我々は「ショウジョウバエにはCPT1に依存せずに脂肪酸をミトコンドリアへと輸送する機構が存在するのではないか」と考えた。

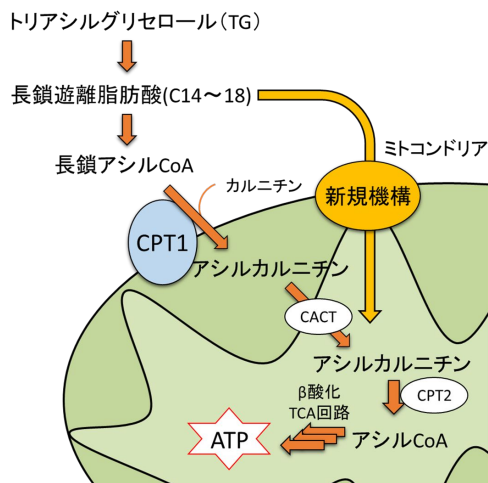


図1. ミトコンドリアへの脂肪酸の輸送機構

2. 研究の目的

CPT1を介した脂肪酸輸送機構が保存されているにもかかわらず、ショウジョウバエはCPT1を欠損しても哺乳動物のような重篤な表現型を示さない。また、ショウジョウバエは非常に高いエネルギー代謝率を示し、特に飛翔時には極めて多くのエネルギーを産生する。このため、本研究ではショウジョウバエにおけるCPT1のエネルギー代謝における役割並びにCPT1に依存せずにエネルギーを産生する機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエの飼育

ショウジョウバエの飼育には4% コーンミール、8% エピオス(乾燥酵母)、10% グルコース、0.67% 含有培地を用いた。この培地を加熱した後、ボーキニン(0.04%)およびプロピオン酸(0.44%)を加えたものをプラスチックバイアルに分注し、スポンジを用いて栓をした。25℃のインキュベーター内で12時間毎に点灯・消灯を繰り返す環境下で飼育した。

(2) 筋肉特異的発現抑制

野生型個体としてw¹¹¹⁸を用いた。遺伝子発現抑制個体の作製にはGAL4-UASシステムを用いた。GAL4システムとしては、Mhc-GAL4を用いた。UAS-RNAiシステムは、国立遺伝学研究所、Bloomington Drosophila Stock Center、Vienna Drosophila RNAi Centerより取り寄せた。交配にはGAL4システムの未交配メス20匹とUAS RNAiシステムのオス10匹を用いた。

(3) 脂質定量

ショウジョウバエ個体に含まれる総脂質をBligh & Dyer法に従い抽出した。トリアシルグリセロール含量の測定には、トリグリセライドEテストワコー(Wako)を用いた。リン脂質の定量はリン-モリブデン法により行った。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエの脂質代謝におけるCPT1の役割

ショウジョウバエにおけるCPT1のエネルギー代謝における役割を調べるために、成虫個体のATP量およびCO₂産生量を測定した。野生型個体とCPT1欠損個体のATP量とCO₂産生量には有意な差は認められなかった。また、成虫の体重にもCPT1の欠損は影響を与えなかった。

次に脂質代謝におけるCPT1の役割を解析するために、脂肪酸の貯蔵形態であるトリアシルグリセロールの含量を測定した。通常飼育時においては、野生型個体とCPT1欠損個体のトリアシルグリセロール含量に有意な差は認められなかった。一方、CPT1欠損個体の飢餓後のトリアシルグリセロール含量は野生型個体よりも有意に高かった。しかし、飢餓時にはCPT1欠損個体においてもトリアシルグリセロールが消費されたことから、ショウジョウバエにはCPT1を介せずに脂肪酸をミトコンドリア内に輸送する機構が存在することが示唆された。

(2) 新規脂質輸送因子の探索

CPT1に依存しない新たな脂肪酸輸送機構を明らかにするため、ショウジョウバエの分子遺伝学的手法を駆使したスクリーニングを行った。脂質恒常性は食餌からの吸収、体

内での生合成・分解・貯蔵、体外への排泄によって全身で統合的に制御されている。このため、我々は脂肪酸の代謝（分解）経路を特異的に評価するために、全身ではなく、筋肉組織での脂肪酸の代謝量をスクリーニングの指標とした。先ず、ショウジョウバエ個体において、Mhc-GAL4 ドライバーを用いて CPT1 と評価対象となる遺伝子に対する dsRNA の発現を筋肉特異的に誘導し、筋肉組織において CPT1 と評価対象の遺伝子を同時に発現抑制したショウジョウバエ個体を作出した（図 2）。そして、これらの個体の筋肉組織における飢餓時のトリアシルグリセロールの消費量を測定することで、脂肪酸の代謝量を評価した（図 2）。つまり、CPT1 経路が機能しない状況下において、脂肪酸の消費に関わる遺伝子を探索することで、CPT1 に依存しない脂肪酸の代謝経路を同定することができると考えた。ミトコンドリアに局在すると考えられる約 80 の遺伝子の評価を行った結果、脂質代謝における役割が未知の Solute carrier (SLC) トランスポーターである SLC25-FAT の発現抑制により有意にトリアシルグリセロールの消費が減少した。一方で、ペルオキシソームでの極長鎖脂肪酸の酸化に関わる遺伝子の発現抑制はトリアシルグリセロールの消費に影響しなかった。以上のスクリーニングから、ミトコンドリアに局在する SLC25-FAT が CPT1 に依存しない脂肪酸輸送経路に関与している可能性が示された。

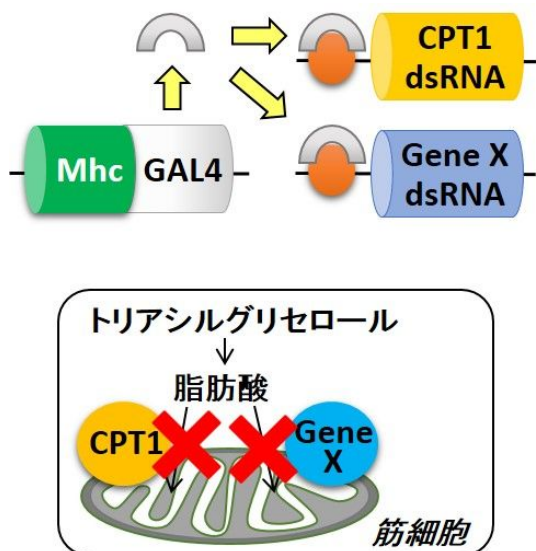


図 2 . 新規脂肪酸輸送機能の探索戦略
CPT1 と評価対象遺伝子の発現を Mhc-GAL4 により筋肉特異的に抑制した個体を作出した。それらの個体から筋肉に富む胸部を飢餓前後に単離し、トリアシルグリセロール含量を測定した。

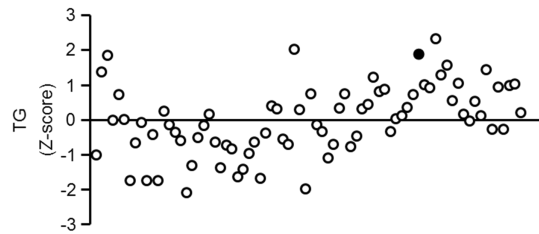


図 3 . 新規脂肪酸輸送機能の探索結果
CPT1 と評価対象遺伝子を筋肉特異的に発現抑制したショウジョウバエ個体の胸部における飢餓前後のトリアシルグリセロール (TG) 含量の変化。各サンプルの平均値が母集団の平均値からどれだけ離れているかを示す z score により、飢餓後のトリアシルグリセロール含量を示した。 SLC25-FAT の測定値を表す。

(2) SLC25-FAT の機能解析

続いて、新規脂肪酸輸送機構を解明するために、スクリーニングにより見出した SLC25-FAT の機能解析を行った。SLC25-FAT の筋肉特異的な発現抑制は成虫の体重には影響を与えなかったが、飢餓耐性は SLC25-FAT の発現抑制により向上した。飢餓耐性はエネルギー代謝の強い影響を受けるため、SLC25-FAT 発現抑制個体では脂質代謝に異常をきたしていることが考えられた。

そこで、脂質代謝機能について詳細に調べるために、貯蔵脂質であるトリアシルグリセロールを測定した。SLC25-FAT を発現抑制した個体の胸部におけるトリアシルグリセロール含量は野生型個体の胸部と比較して有意に増加していた。さらに、筋肉特異的な SLC25-FAT の発現抑制により筋肉に富む胸部だけでなく、全身のトリアシルグリセロール含量も有意に増加していた。

また、摂食量についても測定したところ、野生型個体と SLC25-FAT 発現抑制個体の摂食量には有意な差がないことが示され、トリアシルグリセロール含量の増加が摂食量の増加に起因しないことが明らかとなった。

以上の結果から、SLC25-FAT がショウジョウバエのエネルギー代謝において重要な役割を果たすことが示された。

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 2 件)

Akira Murakami, Kohjiro Nagao, Yuji Hara, Naoto Juni, Masato Umeda, An N-terminal di-proline motif is essential for fatty acid-dependent degradation of 9-desaturase in *Drosophila*, *The Journal of Biological Chemistry*, 査読有、292、2017、

19976-19986

<http://www.jbc.org/content/292/49/19976.long>

doi: 10.1074/jbc.M117.801936

Takuto Suito, Kohjiro Nagao, Masataka Hatano, Kenichi Kohashi, Aiko Tanabe, Hiromichi Ozaki, Jun Kawamoto, Tatsuo Kurihara, Tetsuo Mioka, Kazuma Tanaka, Yuji Hara, Masato Umeda, Synthesis of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid-rich triacylglycerols in an endemic goby, *Gymnogobius isaza*, from Lake Biwa, Japan, *The Journal of Biochemistry*, 査読有、in press

<https://academic.oup.com/jb/advance-article/doi/10.1093/jb/mvy035/493850>

doi: 10.1093/jb/mvy035.

研究者番号：60362456

(4)研究協力者
該当なし

〔学会発表〕(計2件)

長尾耕治郎、塩見晃史、原雄二、村手源英、小林俊秀、梅田真郷、ショウジョウバエ細胞の特徴的なリン脂質膜構築機構の解析、第57回日本脂質生化学会、2015年5月28日、東京、口頭発表

長尾耕治郎、塩見晃史、梅田真郷、ショウジョウバエ細胞の形質膜におけるリン脂質輸送機構の解析、日本膜学会第38年会、2015年5月10日、東京、口頭発表

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

所属研究室ホームページ

<http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/umeda-lab/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

長尾 耕治郎 (NAGAO, Kohjiro)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：40587325

(2)連携研究者

梅田 真郷 (UMEDA, Masato)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：10185069

(3)連携研究者

原 雄二 (HARA, Yuji)

京都大学・大学院工学研究科・准教授