

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14476

研究課題名(和文)ミトコンドリアへの新たな脂肪酸輸送経路の解明

研究課題名(英文)Elucidation of a novel fatty acid transport system into mitochondria

研究代表者

梅田 眞郷 (Umeda, Masato)

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：10185069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、哺乳動物においてミトコンドリア内への脂肪酸輸送に必須と考えられていたカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ(CPT1)を完全欠損したショウジョウバエが、脂質・エネルギー代謝に全く異常を示さないことを見出した。この観察を契機に、CPT1経路を代替するミトコンドリアへの新たな脂肪酸輸送経路を探索するスクリーニング系を確立した。さらに、ミトコンドリアに局在するタンパク質をコードする約80の遺伝子より、5つの候補遺伝子を同定することに成功し、当該分子の機能解析を行うことによりミトコンドリアへの新たな脂肪酸輸送経路を担う分子を同定した。

研究成果の概要(英文)：Insects are the most abundant and diversified animal species on earth. Although the great diversity of form and function displayed by the insect is responsible for their superior adaptability to the changes in environmental conditions, the underlying molecular mechanisms remain elusive. Actively flying insects achieve the highest rates of energy metabolism known in the Animal Kingdom. However, the metabolic pathway that meets such a high-energy demand is not well understood. Here we demonstrate that fruit fly *Drosophila melanogaster* efficiently oxidizes fatty acids in the absence of carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) that is indispensable for transporting long-chain fatty acids into mitochondria in mammalian cells. Genetic screen using *cpt1*-depleted *Drosophila* identified the five candidate genes that surrogated the CPT1-mediated fatty acid transport into mitochondria.

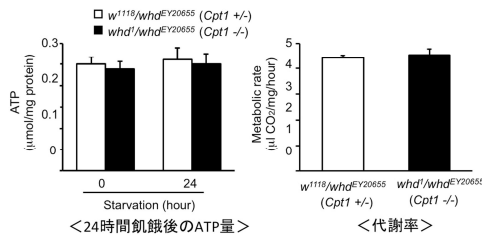
研究分野：生化学

キーワード：脂質 脂肪酸 ミトコンドリア エネルギー代謝 筋肉

1. 研究開始当初の背景

カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ(CPT1)は、細胞質中のアシル CoA をアシルカルニチンへと変換することにより長鎖脂肪酸のミトコンドリア内への輸送を行う酵素である。CPT1 はミトコンドリア内への長鎖脂肪酸の輸送および引き続くβ酸化の律速酵素として働き、エネルギー代謝制御の中心的な役割を担うことから同酵素の哺乳動物における欠損は胎生致死をもたらす。一方、申請者らは、エネルギー代謝活性が亢進し低温選好性を示す *atsugari* 変異体 (*Science* 323:1740, 2009)を解析する過程で、CPT1 を欠損したショウジョウバエが脂質・エネルギー代謝に全く異常を示さないことを見出した(図1)。これらの知見は、従来の脂肪酸代謝経路の大幅な見直しを迫るものである。

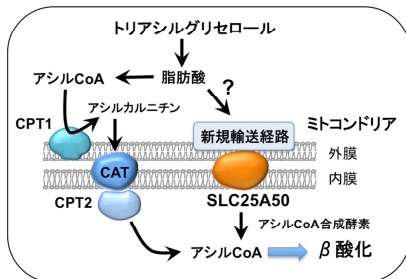
図1. CPT1の完全欠損個体にエネルギー代謝異常が認められない



2. 研究の目的

本研究では、1) CPT1 欠損ショウジョウバエにおける脂質・エネルギー代謝の解析、2) ショウジョウバエの分子遺伝学的手法を駆使して、CPT1 経路を代替するミトコンドリアへの新たな脂肪酸輸送経路を探索するスクリーニング系を確立する。3) CPT1 経路を代替する輸送経路に関わる分子の同定と解析を行い、ミトコンドリア内への脂肪酸輸送において、CPT1 を介する経路を代替する未知の輸送経路の実体を明らかにする(図2)。

図2. ミトコンドリアへの脂肪酸輸送経路



3. 研究の方法

- 1) CPT1 を欠損した変異体における脂質・エネルギー代謝解析
- 2) CPT1 経路を代替する脂肪酸輸送経路の探索：筋組織特異的に遺伝子発現を制御する GAL4-UAS システムを利用し、CPT1 と評価

対象遺伝を同時に筋組織特異的に発現抑制した際の脂質代謝不全とそれに伴う脂質代謝を測定することにより遺伝子の探索を行う。

4. 研究成果

1) CPT1 欠損ショウジョウバエにおけるエネルギー・脂質代謝

a) エネルギー代謝：初期の実験により、CPT1 欠損変異体 *whd1* は致死性を示さず、また酸素消費量および ATP 産生量にも野生型との間に差は認められなかった。一方、野生型の *w¹¹¹⁸* と CPT1 欠損体の *whd¹* では遺伝子のバックグラウンドが異なることから、もう1つの CPT1 の変異体である *whd^{EY20655}* とそれぞれを掛け合わせることによって、遺伝子のバックグラウンドの影響を排除して解析を行い、これまでに得られた知見を確認した。

b) 脂質代謝：

CPT1 欠損変異体における脂肪酸代謝について、主な貯蔵脂質であるトリアシルグリセロールに着目し解析を行った。ショウジョウバエのトリアシルグリセロールの分子種は哺乳動物とは大きく異なり、哺乳類には見られない鎖長の脂肪酸であるミリスチン酸(C14:0)が主要な構成脂肪酸であった。また、CPT1 欠損による脂肪酸組成の変化は認められなかった。さらに、飢餓時における脂肪酸代謝を詳細に解析した結果、CPT1 欠損変異体では、主にミリスチン酸などの中鎖脂肪酸が効率良く消費された。これらの知見は、ショウジョウバエには CPT1 非依存的に、より短鎖長の中鎖脂肪酸を消費する経路が存在することを示唆している。さらに、脂肪酸の鎖長による代謝量の違いを明確にするため、放射性同位体を用いたミトコンドリアにおける脂肪酸代謝の解析を行った。その結果、マウス、ショウジョウバエともにミリスチン酸はパルミチン酸より多く代謝され、少なくとも半分以上は CPT1 を介さない経路により代謝されていた。また、膜の透過性が高いデカン酸の代謝量はマウスとショウジョウバエで異なることから、マウスとショウジョウバエのミトコンドリア膜は物理的に異なることが示唆された。したがって、ミリスチン酸のみがマウスとショウジョウバエで共通して膜の透過性が高いとは考えにくく、ショウジョウバエにはミリスチン酸を積極的に輸送する新たな経路が存在すると考えられた。

2) 分子遺伝学的手法を駆使したスクリーニング系の確立

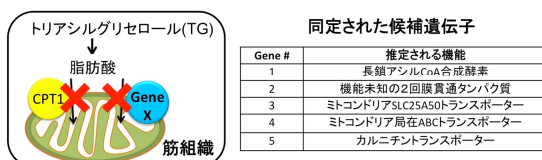
申請者らはまず、CPT1 を欠損した変異体の生育と脂質代謝を指標に CPT1 と遺伝学的相互作用を示す遺伝子の探索を試みた。しかし、このスクリーニングによっては有意な遺伝子を同定するには至らなかった。その理由として、全身における CPT1 の欠損は、個体内での脂質の生合成・輸送・貯蔵・分解・排

泄など多岐にわたる代謝要因に影響を及ぼすことが考えられた。そこで、脂肪酸のミトコンドリアへの輸送と引き続く代謝(β 酸化)経路を特異的に評価するために、GAL4-UASシステムを利用することにより筋組織特異的なスクリーニング系を確立した。本系は、CPT1 と評価対象遺伝子を同時に筋組織特異的に発現抑制した際の脂肪酸代謝不全とそれに伴う脂質蓄積を測定することにより、脂肪酸の代謝量を評価するものである。まず、長鎖脂肪酸の β 酸化における4段階の反応のうち、3段階を担う酵素であるMtp α をCPT1と同時にノックダウンし、飢餓前後でのトリアシルグリセロールの減少量を解析した。その結果、筋肉特異的にCPT1のみをノックダウンした場合に比べ、CPT1とMtp α をともにノックダウンした場合は、顕著にトリアシルグリセロールの減少が抑制された。したがって、新規脂肪酸輸送機構の抑制による β 酸化量の減少が、トリアシルグリセロールの減少抑制につながることを示され、本手法によりスクリーニングを行うことが可能との結論に至った。

3) CPT1 経路を代替する輸送経路に関わる分子の同定と機能解析

a) 候補遺伝子の同定:ミトコンドリアに発現する種々の輸送体を中心に約80の候補遺伝子についてCPT1とともに筋組織特異的にノックダウンし、飢餓前後での胸部トリアシルグリセロール量の変化を指標にスクリーニングを行った。その結果、5つの遺伝子で有意にトリアシルグリセロールの減少が抑制され、CPT1を介さない新たな脂肪酸輸送に関わることが示唆された(図3)。

図3. ミトコンドリアへの新規脂肪酸輸送経路の探索戦略



b) 候補遺伝子の機能解析:同定された候補遺伝子のうち、輸送基質が未知のミトコンドリア Solute Carrier (SLC)である SLC25A50 に着目し、解析を進めた。まず、CPT1とは異なり、SLC25A50のショウジョウバエ個体全体での発現抑制は致死となることが示された。そこで、筋組織特異的に SLC25A50 の発現を抑制した個体を作製し、詳細な解析を行った。その結果、胸部における TG 量を測定したところ、通常時において CPT1 を発現抑制した個体ではコントロールと比べて差がないのに対し、SLC25A50 を発現抑制した個体では TG 量が 20%増加しているという結果が得られた。また、筋肉特異的な発現抑制によって筋肉だけでなく、全身での TG 量も増加しており、肥満状態になっていることが明らかと

なった。一方、SLC25A50 のヒト相同分子である MTCH2 の一塩基多型は、肥満と強い関連を示すことが報告されている。これらの知見は、SLC25A50 が哺乳動物の脂肪酸代謝においても重要な役割を果たすことを示唆しており、CPT1 経路とは基質特異性の異なる新たな脂肪酸輸送経路を担い、脂質・エネルギー代謝の制御に深く関与する可能性を強く支持することとなった。

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 4 件)

土谷正樹・原雄二・梅田眞郷: 生体膜におけるリン脂質ダイナミクスとその生物機能、*生体化学* 41、196-201 (2016). 査読無

長尾耕治郎・塩見晃史・梅田眞郷: ショウジョウバエのリン脂質輸送タンパク質 - ユニークな形質膜のリン脂質の組成と分布、*生体の化学* 67、247-251 (2016). 査読無

Bhat, H. B., Ishitsuka, R., Inaba, T., Murate, M., Abe, M., Makino, A., Kohyama-Koganeya, A., Nagao, K., Kurahashi, A., Kishimoto, T., Tahara, M., Yamano, A., Nagamune, K., Hirabayashi, Y., Juni, N., Umeda, M., Fujimori, F., Nishibori, K., Yamaji-Hasegawa, A., Greimel, P., Kobayashi, T. Evaluation of aegerolysins as novel tools to detect and visualize ceramide phosphoethanolamine, a major sphingolipid in invertebrates. *FASEB.J.* 29, 3920-3934 (2015). 査読有
doi: 10.1096/fj.15-272112

Ogawa R, Nagao K, Taniuchi K, Tsuchiya M, Kato U, Hara Y, Inaba T, Kobayashi T, Sasaki Y, Akiyoshi K, Watanabe-Takahashi M, Nishikawa K, Umeda M. Development of a novel tetravalent synthetic peptide that binds to phosphatidic acid. *PLOS ONE* 10, e0131668 (2015). 査読有
10.1371/journal.pone.0131668

[学会発表](計 11 件)

Masato Umeda, Takuto Suito, Naoto Juni, Kojiro Nagao: Dietary response governing thermoregulatory behavior、第 39 回日本分子生物学会年会、2016.11.30、横浜(パシフィコ横浜)

梅田眞郷、水藤拓人、従二直人、長尾耕治郎：腸内細菌を介する行動性体温調節の分子機構、第 89 回日本生化学会大会、2016.9.25、仙台（仙台国際センター）招待講演 オーガナイザー

梅田眞郷：体温はいかにして決まるのか？ HiHA 第 7 回 Workshop、2016.9.23、広島（広島大学）

梅田眞郷：温度センシングとエネルギー代謝、第 68 回日本細胞生化学会大会、2016.6.15、京都（京都テルサ）

梅田眞郷：膜脂質ダイナミクスを介する細胞機能の制御機構、日本膜学会「第 38 年会」、2016.5.10、東京（早稲田大学西早稲田キャンパス）

梅田眞郷、村上光、従二直人、長尾耕治郎、原雄二：脂質を介するエネルギー代謝と温度調節行動の制御機構、第 93 回日本生理学会大会、2016.3.24、札幌（札幌コンベンションセンター）

梅田眞郷：生体膜脂質と温度感受性システム、第 36 回白金シンポジウム、2016.2.27、東京（北里大学薬学部）

梅田眞郷：生体膜におけるリン脂質分子の運動と機能、第 53 回日本生物物理学会年会、2015.9.13、金沢（金沢大学）

梅田眞郷：呼吸とエネルギー代謝：昆虫の秘密から学ぶ、第 19 回酵素ダイナミクス研究会、2015.9.12、東京（東京女子医科大学）

梅田眞郷：生物の温度応答と生体膜システムの関係、第 59 回生物医工学サロン、2015.6.22、京都（京都大学再生医科学研究所）

梅田眞郷：生物のロバスト制御と脂質生物学、第 57 回日本脂質生化学会、2015.5.29、東京（一橋大学一橋講堂）

〔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〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅田 眞郷 (UMEDA, Masato)
京都大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：10185069

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
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

従二 直人 (JUNI, Naoto)
京都大学・大学院工学研究科・研究員
研究者番号：90572199

(4) 研究協力者
該当なし