

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16203

研究課題名(和文) 栄養状態で変化する生体膜脂肪酸の生理学的意義

研究課題名(英文) The physiological significance of the change in biomembrane fatty acids according to nutritional state

研究代表者

市 育代 (Ikuyo, Ichi)

お茶の水女子大学・基幹研究院・講師

研究者番号：50403316

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)：本研究では、脂肪酸の過剰および欠乏によって変化する生体膜脂肪酸の生物学的意義について検討を行った。まず、栄養過剰のモデルとして脂肪細胞における脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸に着目した。本研究より、脂肪滴膜リン脂質の飽和脂肪酸が大型脂肪滴の形成や安定化をもたらす物理的性質を有することが示唆された。また、栄養欠乏のモデルとして必須脂肪酸欠乏における脂肪酸代謝の変化を調べた。脂肪酸伸長酵素のElovl5は必須脂肪酸欠乏時にリン酸化を介して基質特異性が変化し、必須脂肪酸欠乏時のミード酸(C20:3n-9)産生を誘導していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined that the biological significance of biomembrane fatty acids via the excess or deficiency of fatty acids. First, we focused the phospholipid fatty acids in lipid droplets of adipocytes as a model of over nutrition. We clarified that the biophysical properties of lipids themselves constituting lipid droplets contributed to the formation of large lipid droplets. Furthermore, Our results suggest that saturated fatty acid chains in phospholipid monolayers might establish the form and/or stability of large LDs. In addition, as a model of nutritional deficiency, we examined the change of fatty acid metabolism during essential fatty acid deficiency. We revealed that Elovl5 of fatty acid elongation enzyme changed the substrate specificity via phosphorylation modification and induced the synthesis of Mead acid (C20:3n-9) in essential fatty acid deficiency.

研究分野：脂質栄養学

キーワード：脂肪酸 必須脂肪酸 脂肪滴 リン脂質

1. 研究開始当初の背景

栄養状態の不良は様々な疾患の憎悪因子であり、栄養状態の改善は高齢化が進むわが国において重要な課題である。食の欧米化に伴い、栄養の摂取状況は変化してきているが、その中で脂質の摂取は量だけでなく、質的にも大きく変化してきた。我々が摂取している脂質の主要な成分である脂肪酸は、体内の重要なエネルギー源であるだけでなく、生体の機能調節にも重要であることが知られている。また、生体膜を構成するリン脂質の脂肪酸は、飽和脂肪酸から多価不飽和脂肪酸まで多種類の脂肪酸が結合しており、この多様性は膜の流動性など生体膜の性質を規定している。生体膜に存在する膜タンパク質は外界からの物質の取り込みや、排出、情報伝達、エネルギー合成などに関わっており、生体膜の性質の変化は膜タンパク質の局在だけでなく、細胞機能にも影響を与える可能性が指摘されている。

したがって、栄養状態による脂肪酸の変化とその変化が細胞機能にもたらす影響を明らかにすることは、栄養状態の改善による疾患予防や治療の新たなメカニズムの解明に繋がる可能性がある。そこで本研究では、栄養状態に伴う脂肪酸の変化と、その生理学的意義を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、栄養状態に伴う脂肪酸の変化に関して、以下の研究を行う。

研究 1 脂肪滴膜における脂肪酸鎖の生物学的意義

肥満は生活習慣病の大きな要因であり、肥満者の増加は重大な社会問題となっている。肥満では白色脂肪細胞に過剰な中性脂肪が蓄積され、著しく肥大化した脂肪滴が形成される。近年、脂肪滴は単なる脂肪の貯蔵庫ではなく、脂肪滴自身が脂質の合成・分解を調節するオルガネラであることが明らかになってきた。脂肪滴は中性脂肪が一重膜のリン脂質で覆われた構造をしており、その膜上には種々の膜タンパク質が局在している。脂肪滴におけるリン脂質の意義については近年研究が進んでおり、脂肪滴の形態・機能維持のために脂肪滴膜リン脂質が重要であることが示唆されてきた。しかし、リン脂質の脂肪酸鎖と脂肪滴の形態に関する知見は乏しい。

そこで、本研究では脂肪滴膜の脂肪酸鎖と脂肪滴の形態、さらに脂肪滴の肥大化に関わる膜タンパク質の局在との関係について検討を行った。

研究 2 必須脂肪酸欠乏時の脂肪酸代謝の変化と産生される脂肪酸に関する研究

哺乳動物は多価不飽和脂肪酸 (PUFA) を生体内で合成することができないことから、

これらの脂肪酸は食事から摂取する必要があり、必須脂肪酸と呼ばれている。食事由来の PUFA は脂肪酸伸長酵素(Elovl)や脂肪酸不飽和化酵素(Fads)によって代謝され、種々の PUFA が産生される。Elovl には 1~7、Fads には 1~3 のアイソフォームが存在し、それぞれ基質なる脂肪酸が異なる。

我々の研究室では、必須脂肪酸欠乏時に体内で合成できるオレイン酸 (C18:1n-9) から Elovl5、Fads1、Fads2 の脂肪酸代謝酵素によって、通常は存在しない PUFA であるミード酸 (C20:3n-9) が産生されることを明らかにしている【図 1】(Ichi *et al.*, BBA, 2014)。

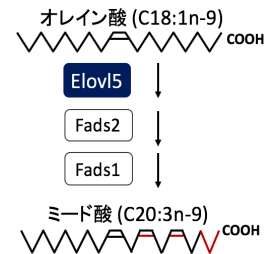


図1 ミード酸産生経路図

必須脂肪酸欠乏時に産生されるミード酸は PUFA 欠乏を補う生理活性を有する可能性が考えられるが、ミード酸の生理作用やミード酸が産生される制御機構も不明である。ミード酸の産生酵素である Elovl5 は PUFA に対して伸長活性を有する酵素として知られているが、図 1 のような一価不飽和脂肪酸の C18:1n-9 に対する伸長活性は明確ではない。したがって Elovl5 の 18:1n-9 に対する伸長活性は必須脂肪酸欠乏に特異的な現象で、それが必須脂肪酸欠乏時のミード酸産生に関与している可能性がある。

そこで本研究では、Elovl5 の活性変化が必須脂肪酸欠乏時に特異的であるか、さらにその活性の制御機構について検討を行った。また、必須脂肪酸欠乏時に産生されるミード酸の生理作用に関しても検討を行った。

3. 研究の方法

1. 脂肪滴の分画法の確立と脂肪滴膜の脂質解析

シヨ糖濃度勾配を用いた超遠心法にて、培養細胞から脂肪滴の単離方法を確立し、質量分析装置を用いて脂肪滴膜の脂質の解析を行った。

2. 脂肪滴様エマルションの作成

培養細胞の脂肪滴から得た脂質抽出物を用いて、試験管内で脂肪滴様のエマルションの再構築系を確立し、その形態を評価した。

3. 脂肪滴膜へのタンパク質局在の評価

異なる不飽和度の脂肪酸をもつリン脂質を用いて脂肪滴様エマルションを作製し、脂肪滴膜タンパク質とインキュベーション後、エマルションに結合したタンパク質を Western blotting で評価した。

4. 脂肪酸伸長活性の評価法

Elovl は 7 回膜貫通型タンパク質であることから、膜画分を用いた *in vitro* での脂肪酸伸長活性の評価を行った。培養細胞から膜画分

を抽出し、基質である脂肪酸 CoA と炭素供与体であるマロニル CoA、補酵素 NADPH を混合し、*in vitro* での酵素反応を行った。反応後、伸長産物を GC-MS にて測定し、酵素反応後の増加量を算出した。

4. 研究成果

研究 1 脂肪滴膜脂肪酸鎖の生物学的意義

結果 1-1 大小の脂肪滴における脂肪酸組成の解析

大型脂肪滴のモデル細胞を作成するために、脂肪滴の融合に係る膜タンパク質である Fat Specific Protein27 (FSP27) をマウス繊維芽細胞 NIH3T3 細胞に導入し、安定細胞発現細胞を作製した。その結果、FSP27 細胞は FSP27 を導入していない mock 細胞に比べて、大型の脂肪滴が数多く確認できた。大型脂肪滴をスクロース濃度勾配超遠心により分画し、GC-MS で脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸組成を測定すると、FSP27 細胞の大型脂肪滴の膜リン脂質には飽和脂肪酸が多く含まれることがわかった (図 2)。

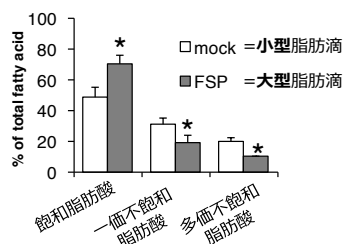


図2 脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸組成

結果 1-2 脂肪滴膜の物理的性質の評価

-*in vitro* エマルション再構成-

大型脂肪滴に特徴的な脂質組成が、大型脂肪滴の形成に有利な物理的性質をもたらすという仮説を検証した。Mock 細胞の小型脂肪滴および FSP27 細胞の大型脂肪滴から脂質を単離抽出し、脂質抽出物を用いて試験管内でエマルションを再構成させる方法を試みた。すると、FSP27 を発現させた大型の脂肪滴の脂質抽出物からは大型のエマルションが再構成され【図 3】、脂肪滴を構成する脂質そのものの生物物理的性質が、大型脂肪滴形成に寄与していることが示唆された。

そこで、リン脂質の脂肪酸がエマルション形成に与える影響を調べるために合成脂質を材料にした検討を行った。

1. 飽和脂肪酸モデル DSPC (ステアリン酸 C18:0 結合ホスファチジルコリン)
2. 不飽和脂肪酸モデル DOPC (オレイン酸 C18:1 結合ホスファチジルコリン)

その結果、上記の脂肪滴エマルションのサイズおよび膜の表面張力を評価すること

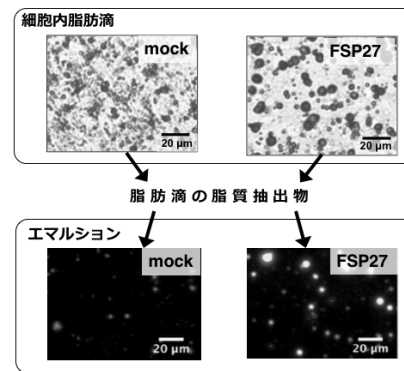


図3 細胞から得た脂肪滴(上段)の脂質抽出物よりエマルションを再構成した(下段)。FSP27を発現させた大型の脂肪滴の脂質抽出物からは、大型のエマルションが形成された。

で、脂肪滴膜リン脂質の飽和脂肪酸が脂肪滴を融合させ大型化させる生物物理的性質を有する可能性を明らかにした [業績 2]。

結果 1-3 脂肪滴膜へのタンパク質局在の評価

Perilipin1 タンパク質は脂肪滴の形成初期には脂肪滴に局在しないが、脂肪滴成熟に伴い脂肪滴に局在し、脂肪分解から保護する役割を持つことが知られている。そこで、Perilipin1 の局在が脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸組成により調節され得るかを調べた。結果 2-1 と同様に DSPC と DOPC を用いてエマルションを作製し、エマルションへの Perilipin1 の結合を Western blotting で評価したところ、不飽和脂肪酸モデルの DOPC を用いたエマルションに多く結合する傾向があった。白色脂肪細胞モデル細胞の 3T3-L1 脂肪細胞において脂肪滴の成熟後期に脂肪滴膜リン脂質の不飽和脂肪酸が増加することから、脂肪蓄積に関わる脂肪滴膜タンパク質の Perilipin1 は不飽和脂肪酸の多い膜リン脂質に局在することで、脂肪滴脂肪蓄積に関わっている可能性が示唆された。

研究 2 必須脂肪酸欠乏時の脂肪酸代謝の変化と産生される脂肪酸に関する研究

結果 2-1 PUFA による脂肪酸伸長酵素 Elovl5 の基質特異性の変化

必須脂肪酸欠乏細胞と PUFA を添加した細胞の膜タンパク質を用いて、Elovl5 の C18:1n-9 に対する伸長活性を *in vitro* の Elongation assay で評価した。必須脂肪酸欠乏状態にある PUFA(-) 群でみられた C18:1n-9 に対する伸長活性が、Elovl5 ノックダウン細胞では著しく減少したことから、PUFA 欠乏において Elovl5 が C18:1n-9 に対する伸長活性を有することが確認できた。そして、PUFA(+) 群ではその活性が消失した【図 4】。したがって Elovl5 の C18:1n-9 への伸長活性は PUFA 欠乏時に特異的である可能性が示唆された。一方、Elovl5 の

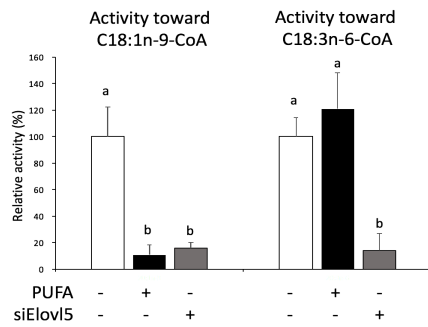


図4 PUFA添加による基質特異性の変化

C18:3n-6に対する活性はPUFA添加により変化しなかった【図4】。以上の結果より、Elov15がPUFAによる活性制御を受けて基質特異性が変化することを明らかにした。また、Elov15の基質特異性の変化は、一方の活性は維持しながら、一方の活性のみ消失するという大変興味深い現象であることが明らかとなった。

結果2-2 PUFAによるElov15活性の制御機構

結果2-1に示したElov15の基質特異性の変化はこれまで全く知られておらず、この制御機構は不明であった。しかし、Elov1ファミリーのうちElov15のみリン酸化部位の報告があったことから、Elov15のリン酸化修飾の可能性に着目した。Elov15のリン酸化をphos-tag PAGEで調べたところ、PUFA(+)群においてリン酸化タンパク質が検出された。さらに、酵母の脂肪酸伸長酵素Elo2のリン酸化がGSK3 (Glycogen synthase kinase 3) 欠損株で消失することから (Zimmermann et al., Cell Reports, 2013)、Elov15のリン酸化がGSK3依存性である可能性を考えた。GSK3特異的阻害剤 (BIO) 処理によって、Elov15のリン酸化が消失し、C18:1n-9に対する伸長活性は回復した【図5】。また、それはC20PUFA特異的であることがわかった。以上の結果より、C20PUFA欠乏下ではリン酸化タンパクが消失し、C18:1n-9の活性が生じることで、ミード酸が産生される可能性が示唆された。

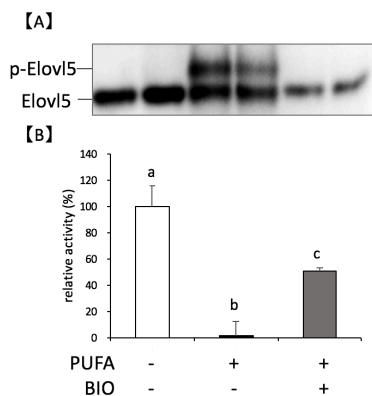


図5 GSK3阻害によるElov15のリン酸化の変化(A)、Elov15の活性の変化(B)

また、C20PUFA存在下ではElov15がリン

酸化修飾を受けてC18:1n-9に対する伸長活性を失い、ミード酸が産生されない可能性を明らかにした。

結果2-3 必須脂肪酸欠乏時に産生されるミード酸の抗炎症作用

炎症のモデル細胞であるマウスマクロファージ由来Raw264.7細胞において、ミード酸が抗炎症作用を有するか検討した。Raw264.7細胞を用いて、100 ng/mLのLPSで12時間刺激し炎症を誘導し、ミード酸を添加したところ、IL-6やCOX2などの炎症マーカーが有意に減少した。以上の結果より、必須脂肪酸欠乏時に産生されるミード酸はLPSによる炎症反応を抑制している可能性が示唆された。

また、必須脂肪酸欠乏時の皮膚におけるミード酸の作用を調べるため、ミード酸の産生抑制が皮膚のバリア機能へ及ぼす影響を調べた。まず、ミード酸が存在する必須脂肪酸欠乏状態のHaCaT細胞において、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素の阻害剤(sc26196)を添加し、ミード酸産生阻害の影響を調べた。その結果、ミード酸のみ22%まで減少した。そこで、ミード酸産生抑制時の皮膚機能への影響について検討したところ、フィラグリン、インボルクリンの遺伝子発現が有意に減少した。そこで、バリア機能異常の原因を明らかにするため、炎症反応や小胞体ストレスへの影響を調べた。その結果、炎症性サイトカインIL-1 β 、IL-6の遺伝子発現の増加はみられなかったが、小胞体ストレスマーカーであるCHOP、GRP78の遺伝子発現が増加していた。以上の結果より、必須脂肪酸欠乏時のミード酸産生の抑制により小胞体ストレスが上昇し、皮膚のバリア機能の異常が誘導されている可能性が示唆された。

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3件)

1. Ezetimibe in Combination With Statins Ameliorates Endothelial Dysfunction in Coronary Arteries After Stenting: The CuVIC Trial (Effect of Cholesterol Absorption Inhibitor Usage on Target Vessel Dysfunction After Coronary Stenting), a Multicenter Randomized Controlled Trial. S. Takase, T. Matoba, S. Nakashiro, Y. Mukai, S. Inoue, K. Oi, T. Higo, S. Katsuki, M. Takemoto, N. Suematsu, K. Eshima, K. Miyata, M. Yamamoto, M. Usui, K. Sadamatsu, S. Satoh, T. Kadokami, K. Hironaga, I. Ichi, K. Todaka, J. Kishimoto, K. Egashira, K. Sunagawa, Arterioscler Thromb Vasc Biol., 37, 350-358 (2017), DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.308388

2. Saturated fatty acid in the phospholipid monolayer contributes to the formation of large lipid droplets. K. Arisawa, H. Mitsudome, K. Yoshida, S. Sugimoto, T. Ishikawa, Y. Fujiwara, **L. Ichi***, Biochem. Biophys. Res. Commun., 480, 641-7 (2016), DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.109, * Corresponding author
3. TTC39B Deficiency Stabilizes LXR Leading to Decreased Atherosclerosis and Hepatic Steatosis. M. Koseki, J. Hsieh, M. M. Molusky, E. Yakushiji, **L. Ichi**, M. Westerterp, S. Abramowicz, L. Tascu, C. B. Welch, J. Iqbal, S. Takiguchi, S. Yamashita, M. M. Hussain, D. J. Rader, and A. R. Tall, 535, 303-7, Nature, (2016), DOI: 10.1038/nature18628

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸不飽和度が脂肪滴膜タンパク質の局在移行に与える影響、有澤琴子、**市 育代**、藤原葉子、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年
2. 必須脂肪酸欠乏における Elovl5 のリン酸化を介した活性制御機構の解明、林優里、**市 育代**、山野美怜、藤原葉子、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年
3. 必須脂肪酸欠乏の脂肪酸代謝と調節機構、**市 育代**、第 19 回日本病態栄養学会、1 月、招待講演、2017 年
4. 必須脂肪酸欠乏における脂肪酸伸長酵素 Elovl5 の活性制御機構、林 優里、**市 育代**、山野美怜、藤原葉子、第 70 回日本栄養・食糧学会、2016 年
5. 脂肪滴における膜リン脂質の脂肪酸組成と Perilipin1 の局在との関連性、有澤琴子、**市 育代**、満留 悠、藤原葉子、第 70 回日本栄養・食糧学会、2016 年
6. LPS 誘発性炎症モデルにおける desmosterol の蓄積と炎症に対する作用、小林恭子、**市 育代**、永瀬摩奈、藤原葉子、第 70 回日本栄養・食糧学会、2016 年
7. 脂肪滴の肥大化と膜リン脂質および中性脂肪の脂肪酸との関連性、**市 育代**、有澤琴子、満留 悠、藤原葉子、日本ビタミン学会第 68 回大会、2016 年
8. 多価不飽和脂肪酸による Elovl5 の活性制御機構の解明、林優里、**市 育代**、山野美怜、藤原葉子第 39 回日本分子生物学会年会
9. 脂肪滴における中性脂肪およびリン脂質の脂肪酸組成と脂肪滴サイズの関連性、有澤琴子、**市 育代**、満留悠、藤原葉子、BMB2015、2015 年
10. 酸化ステロールの骨格筋細胞における糖代謝への影響、柳本彩、**市 育代**、藤原葉子、BMB2015、2015 年
11. 必須脂肪酸欠乏における皮膚炎症とミトコンドリア産生遺伝子との関連性、多田萌、**市 育代**、藤原葉子、BMB2015、2015 年
12. スtent留置後の冠動脈疾患患者におけるエゼチミブの血清酸化コレステロールの減少作用、**市 育代**、藤原葉子、第 37 回日

- 本臨床栄養学会総会、2015 年
13. 脂肪酸鎖長伸長酵素 Elovl5 の多価不飽和脂肪酸による伸長活性の変化、**市 育代**、山野美怜、藤原葉子、日本ビタミン学会代 67 回大会、2015 年
 14. 食品に含まれるステロールと動脈硬化について、第 15 回日本抗加齢医学会総会(招待講演・ランチョンセミナー)、2015 年
 15. 多価不飽和脂肪酸による Elovl5 の伸長活性の変化に関する研究、**市 育代**、山野美怜、林優里、藤原葉子、第 57 回日本脂質生化学会、2015 年
 16. 培養細胞由来の脂肪滴の脂質抽出物を用いた脂肪滴様エマルジョンのサイズと脂肪滴サイズの関連性、有澤琴子、**市 育代**、杉本 静、藤原葉子、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年

〔図書〕(計 3 件)

1. 栄養科学シリーズ NEXT 臨床栄養学実習第 2 版、講談社、(2017) 分担執筆
2. 新スタンダード栄養・食物シリーズ 9 基礎栄養学、東京化学同人 (2015) 分担執筆
3. 栄養、実教出版株式会社 (2015) 分担執筆

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
市 育代 (ICHI, Ikuyo)
お茶の水女子大学・基幹研究院・講師
研究者番号：50403316

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()