

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06978

研究課題名(和文) リン脂質分解を介した内因性コリン産生経路の全容解明

研究課題名(英文) Endogenous choline production through phospholipid catabolism

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・基礎医科学研究分野・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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：コリンは生命活動に不可欠な分子であり、生体膜リン脂質成分に貯蔵されているが、どのように膜成分から取り出され、どのような目的で利用され、その代謝異常によってどのような疾患が生じるかは十分に解明されていなかった。本研究では、肝臓、中枢神経系、骨格筋などにおいて「内因性コリン産生経路」に関わる脂質分解酵素群を同定し、それらの欠損マウスを作出して表現型解析やメタボロミクス解析を行うことで、内因性コリン産生経路の生理的・病理的意義を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかとした肝臓と神経系における内因性コリン産生系の役割は、脂肪肝、神経変性、筋萎縮などの疾患群とリン脂質代謝経路の関連性を示唆し、従来想定されていたリゾホスホリパーゼの概念を大きく転換するものである。将来的にリン脂質分解酵素の機能介入を通じて肝機能、神経機能、骨格筋機能を人為的に調節できるようになれば、新しい分子機序に基づく健康食品・医薬品の開発に結びつくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have shown that the iPLA2gamma/iPLA2theta/glycerophosphoesterase axis functions as an intrinsic choline production pathway that mobilizes free choline from the membrane phospholipids to supply methyl groups in the liver. This pathway is necessary for the methionine regeneration and normal liver function. Moreover, CNS-specific iPLA2delta and iPLA2theta deficiency causes profound neuronal degeneration and muscle atrophy, indicating that these lysophospholipases have crucial roles in the survival of neurons including motor neurons.

研究分野：脂質生化学

キーワード：コリン グリセロホスホコリン リゾホスホリパーゼ メチル基 肝臓 神経変性 ホスホリパーゼA2
リン脂質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

コリンは、i)細胞膜リン脂質ホスファチジルコリン(PC)の構成要素、ii)神経伝達物質アセチルコリンの前駆体、iii)メチル基供給源、として必須であり、この栄養素は食餌由来の外因性コリンとして摂取される他にも、肝臓においてホスファチジルエタノールアミンをメチル化してPCに変換するPEMT経路により *de novo* 合成される。生体内に存在するコリンの約95%はPCとして生体膜に貯蔵されるため、PCを分解してコリンを動員する内因性コリン産生経路が想定される。すなわち、細胞膜PCの2つの脂肪酸鎖がホスホリパーゼA₂(PLA₂)とリゾホスホリパーゼの作用によって連続的に加水分解を受けるとグリセロホスファチジルコリン(GPC)を生じ、これにさらにグリセロホスホジエステラーゼ(GDE)が作用すると遊離コリンを生じ得る。従来のリン脂質代謝の研究は、Kennedy経路とPEMT経路によるPCの生合成、リゾリン脂質の再アシル化によるリン脂質リモデリング(Lands回路)、PLA₂の作用による脂質メディエーター(脂肪酸の代謝物およびリゾリン脂質)の産生などが中心であり、リゾホスホリパーゼは細胞膜溶解性のリゾPCを消去するための解毒機構として長年認識されてきた程度であった。一方、栄養学の分野では、コリンやメチル基供与体(ベタイン、メチオニン、S-アデノシルメチオニンなど)の重要性は、これらの欠乏症やサプリメント摂取の有効性から広く知られているが、遊離コリンやメチル基の供給源としての膜リン脂質PCの重要性は認識されていなかった。そのため、PCを分解してコリンを供給する代謝酵素群の同定や機能解析はこれまで行われず、双方の研究分野にとって空白領域のままであった。我々は、PLA₂分子群を網羅的に解析する中で、iPLA₂ がリゾPCを特異的に加水分解してGPCを産生するリゾホスホリパーゼ活性を持ち、肝臓において「内因性コリン産生経路」を担うことを見出した。本酵素の全身性欠損マウスは肝臓中のGPCとコリンが激減し、代謝の下流に位置するベタインとS-アデノシルメチオニンも減少し、コリン・メチオニン欠乏に特徴的な表現型や神経変性、老化などを示した。しかしながら、この全身性欠損マウスではGPCやコリンが減少しない組織も存在し、内因性コリン産生経路の分子多様性が想定された。これを踏まえて、「各組織や細胞において、リン脂質に貯蔵されているコリンは具体的にどのように取り出され、生命活動にどのように利用されるのか」という問いが生じた。

2. 研究の目的

コリンやGPCなどのコリン含有代謝物は生命活動に不可欠な分子であり、大部分が生体膜リン脂質成分のPCの親水基として貯蔵されているが、必要に応じてどのように膜成分から取り出され、どのような目的で利用されるか、あるいはその代謝異常によってどのような疾患が生じるかについては十分に解明されていない。本研究では、我々が独自に肝臓において見出した、リン脂質分解を介した「内因性コリン産生経路」を、他の組織や細胞にも拡張し、代謝酵素欠損マウスの表現型と遺伝子発現・代謝物の網羅的プロファイリング、酵素発現量と活性の調節機構、各組織での代謝経路の上流と下流に位置する酵素群の同定、安定同位体と質量分析を用いた代謝フラックスの追跡、代謝疾患、神経変性、老化、エピジェネティクスなどとの関連、について重点的に解析を行うことで、リン脂質分解を介した内因性コリン産生経路の分子機構とその生理的・病理的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

内因性コリン産生経路の分子機構と生理的意義を明らかにするために、主に以下のような方針で解析を進めた。

- (1) 各リン脂質分解酵素の全身性欠損マウスや組織特異的欠損マウスの表現型の検討
- (2) 欠損マウス由来の臓器や初代培養を用いた遺伝子およびタンパク質の発現解析、メタボロミクス解析
- (3) 定量的PCR、DNAマイクロアレイ解析、Western blot、組織免疫染色、放射性標識基質を用いた活性測定など、酵素発現や活性を制御する因子の探索
- (4) 上流と下流に位置する酵素の同定と、それらの遺伝子欠損マウスの作製ならびに表現型解析
- (5) 肝臓、脳、その他の器官の代謝疾患との関連を検討することによる、内因性コリン産生経路の生理的・病理的意義の検討

4. 研究成果

(1) 肝臓でのメチル基供給における役割

肝臓においてリン脂質のPCを分解し、リゾPCやGPCを産生するホスホリパーゼA₂とリゾホスホリパーゼとして、それぞれiPLA₂とiPLA₂を同定し、両遺伝子の欠損マウスの表現型を比較した。発現遺伝子変化をマイクロアレイおよび定量的PCRにより解析すると、両欠損マウスとも肝臓においてメチオニン回路を構成する酵素群の発現が誘導されたのに対し、lipogenesisに関わる遺伝子群は発現が低下していた。iPLA₂欠損マウスの肝臓においてはS-アデノシルメチオニン感受性のヒストンメチル化の低下が生じており、血液の生化学検査においても、低血糖、VLDLを介したトリグリセリド分泌の低下など、メチル基不足を示唆する表現

型が両欠損マウスで観察されたことから、肝臓におけるリン脂質分解を $iPLA_2$ と $iPLA_2$ が促進することで生じた内因性コリンがベタインを経由してメチオニン回路にメチル基を供給するという仮説を支持する結果が得られた。一方、肝臓中のトリグリセリド量は、メチオニン・コリン欠乏食を野生型マウスに与えた場合では増加するのに対し、 $iPLA_2$ 欠損マウスでは減少していたことから、リン脂質分解の過程で生じるグリセロール 3-リン酸や遊離脂肪酸がトリグリセリド生成に利用されている可能性も想定された。*in vitro* 実験系を用いて内因性コリン産生経路の役割を検討するために、 $iPLA_2$ を欠損する初代培養肝細胞を用いると、GPC やコリンの減少に伴って FGF21 の発現が誘導され、さらに培養液にメチオニン・コリンを過剰添加することでこの発現誘導は抑制された。重水素標識した PC を用いて、内因性コリン産生経路の代謝フラックスを分析すると共に、acute に上記酵素を欠損させた場合、あるいは逆に強制発現させた場合の GPC やコリンの変化を定量することで、上記の仮説の妥当性を検証した。

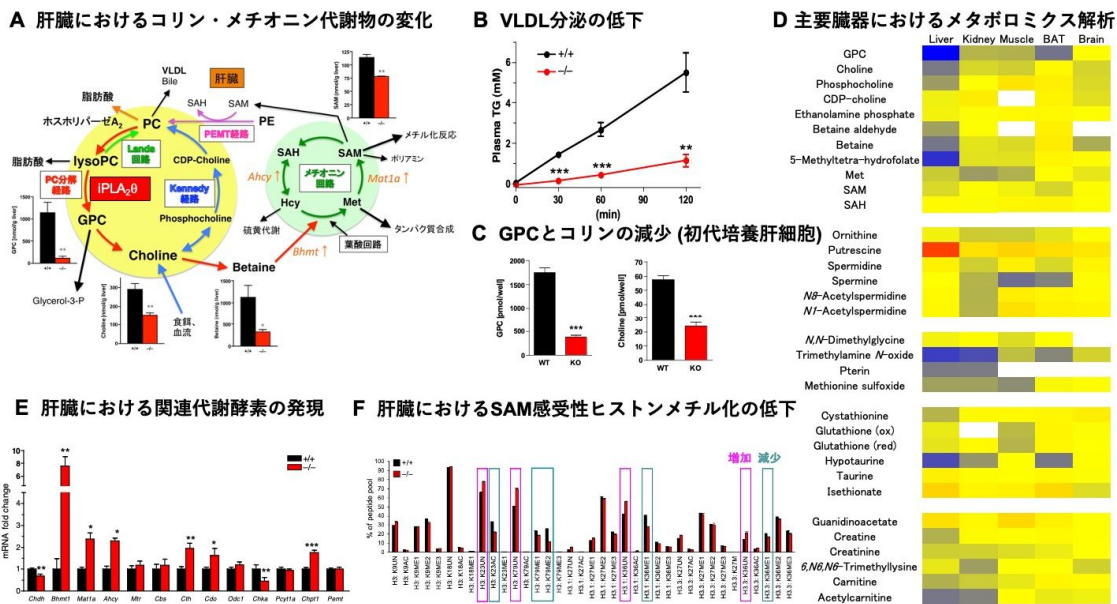


図 1 $iPLA_2$ 欠損マウスの主要な表現型

(2) 神経変性におけるリン脂質分解経路の役割

$iPLA_2$ ならびにそのホモログである $iPLA_2$ は、リゾリン脂質を分解するリゾホスホリパーゼとして機能するので、これら酵素を神経系特異的に欠損させたマウス ($iPLA_2\delta^{fl/fl}$; $iPLA_2\theta^{fl/fl}$; Nes-Cre、以下 double conditional KO = dcKO と呼ぶ) を用いて中枢神経系でリン脂質分解を阻害した際の表現型解析を行った。dcKO は顕著な成長不良を示し、hindlimb clasping と呼ばれる下肢反射異常を示し、体重減少に伴って歩行異常、安静時振戦、寡動等を呈し、次第に下肢を引きずって移動困難となり、100 日齢程度で早期死亡した。5 週齢以前から握力が低下するとともに、ロータロッドを用いた協調運動テストでは、対照群に比べてパフォーマンスが低下していた。一方、 $iPLA_2$ もしくは $iPLA_2$ 単独の神経系特異的欠損マウスでは、運動機能の低下は少なくとも 9 週齢以前には見られなかった。dcKO では大腿筋の筋線維の横径が減少しており、大規模な群衆萎縮が生じ、周辺核の増加や筋萎縮マーカー発現の亢進が生じていた。12 週齢ではさらに全身の骨格筋が重度に萎縮し、筋力低下によって生じると考えられる背骨の彎曲も見られた。dcKO マウスの神経筋接合部では神経終末の投射が顕著に減少し、除神経と神経原性筋萎縮が生じていた。免疫組織学的に評価したところ、オートファジー不全などにより蓄積する p62 陽性凝集体が脳および脊髄の白質を中心に広く観察され、GFAP 陽性のアストログリオシスも同様の経時変化で進行し、脊髄前角の神経細胞数が有意に減少していた。さらに dcKO マウスではミエリン鞘を構成する一連のスフィンゴ脂質群が半分程度に減少しており、オリゴデンドロサイトの生存や鞘形成に異常が生じていることが示唆された。以上の結果から、中枢神経系でリゾホスホリパーゼ $iPLA_2$ と $iPLA_2$ を同時欠損させると、アストロサイトの活性化、p62 陽性凝集体の蓄積、ミエリン鞘のスフィンゴ脂質群減少などを伴う脳や脊髄の広範な神経変性が生じるとともに、脊髄前角の運動ニューロンが脱落し、重度の神経原性筋萎縮が起こることが明らかとなった。一方、 $iPLA_2$ 全身欠損マウスは若年期より神経変性を生じ、脳内代謝物濃度を非侵襲的にプロトン磁気共鳴法 (1H -MRS) により検証したところ、コリン含有代謝物の減少が示唆され、質量分析イメージングにより脳切片でのコリン含有代謝物の脳内分布を可視化すると GPC およびアセチルコリンの減少が認められたことから、リン脂質分解経路を介した内因

性コリン代謝物の産生異常が神経変性に影響を与えることが示唆された。

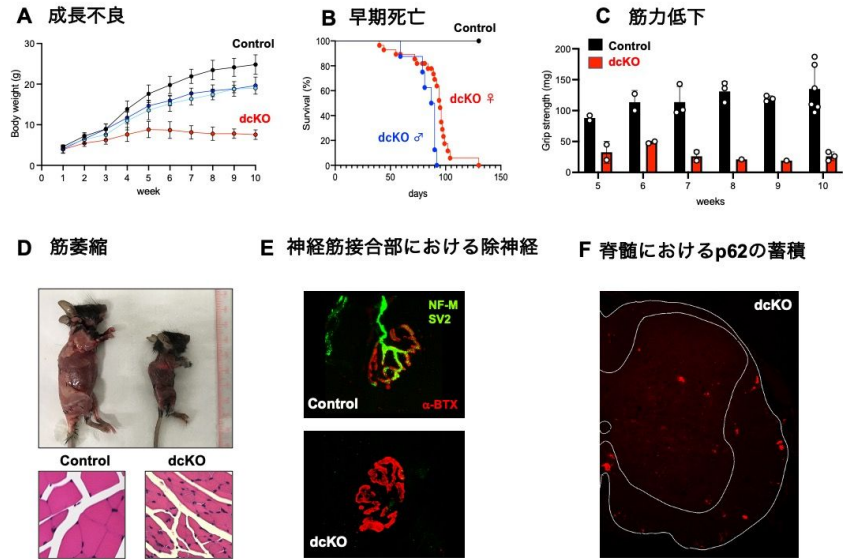


図2 中枢神経系特異的 iPLA₂δおよび iPLA₂θ欠損マウス(dcKO)の主要な表現型

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mori A, Hatano T, Inoshita T, Shiba-Fukushima K, Koinuma T, Meng H, Kubo SI, Spratt S, Cui C, Yamashita C, Miki Y, Yamamoto K, Hirabayashi T, Murakami M, Takahashi Y, Shindou H, Nonaka T, Hasegawa M, Okuzumi A, Imai Y, Hattori N	4. 巻 116
2. 論文標題 Parkinson's disease-associated iPLA2-VIA/PLA2G6 regulates neuronal functions and α -synuclein stability through membrane remodeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA	6. 最初と最後の頁 20689-99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1902958116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeichi T, Hirabayashi T, Miyasaka Y, Kawamoto A, Okuno Y, Taguchi S, Tanahashi K, Murase C, Takama H, Tanaka K, Boeglin WE, Calcutt MW, Watanabe D, Kono M, Muro Y, Ishikawa J, Ohno T, Brash AR, Akiyama M	4. 巻 130
2. 論文標題 SDR9C7 catalyzes critical dehydrogenation of acylceramides for skin barrier formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Invest	6. 最初と最後の頁 890-903
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI130675	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirabayashi T, Murakami M, Kihara A	4. 巻 1864
2. 論文標題 The role of PNPLA1 in α -acylceramide synthesis and skin barrier function	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 869-879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2018.09.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 平林哲也	4. 巻 264
2. 論文標題 iPLA2/PNPLAファミリーがかかわる脂質代謝異常と疾患	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 149-154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 村上誠、佐藤弘泰、武富芳隆、平林哲也	4. 巻 36
2. 論文標題 ホスホリパーゼA2ファミリーによるリポクオリティ制御	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1623-1630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Liang L, Takamiya R, Miki Y, Heike K, Sugimoto N, Yamaguchi M, Shitara H, Nishito Y, Kobayashi T, Hirabayashi T, Murakami M	4. 巻 36
2. 論文標題 Group IVE cytosolic phospholipase A2 limits psoriatic inflammation by mobilizing the antiinflammatory lipid N-acylethanolamine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 e22301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202101958R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 平林哲也	4. 巻 42
2. 論文標題 アシルセラミド代謝と皮膚バリア形成	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 61-65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Mai Kawaguchi, Tetsuya Hirabayashi, Makoto Murakami
2. 発表標題 Phosphatidylcholine breakdown by PNPLA8 and PNPLA7 supplies methyl groups in the liver
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sayaka Harada, Yoshitaka Taketomi, Mai Kawaguchi, Tetsuya Hirabayashi, Makoto Murakami
2. 発表標題 The lysophospholipase PNPLA7 is induced by methionine depletion and is linked to epigenetic regulation
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Luyiyun Liang, Kanako Heike, Tetsuyuki Kobayashi, Tetsuya Hirabayashi, Yoshimi Miki, Kei Yamamoto, Yoshitaka Taketomi, Makoto Murakami
2. 発表標題 Group IVE phospholipase A2 (cPLA ₂) mobilizes the non-canonical lipid mediator N-acyl ethanolamine in mouse skin
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口舞、平林哲也、笠原浩二、村上誠
2. 発表標題 PNPLA8, PNPLA7を介した内因性コリン産生経路は肝臓のメチル基供給に寄与する
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梁 陸伊韻, 三木 寿美, 平林 哲也, 平家 圭奈子, 小林 哲幸, 山本 圭, 武富 芳隆, 高宮 里奈, 村上 誠
2. 発表標題 皮膚における新規細胞質型ホスホリパーゼA2(cPLA ₂ , cPLA ₂)の機能解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Alan R Brash, Takuya Takeichi, William E Boeglin, James A Weiny, M Wade Calcutt, Tetsuya Hirabayashi, Masashi Akiyama
2. 発表標題 A new enzyme in the 12R-lipoxygenase pathway, vital for the role of EFA in skin barrier function
3. 学会等名 16th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平林哲也, 武市拓也, 笠原浩二, Alan R. Brash, 村上 誠, 秋山真志
2. 発表標題 アシルセラミド代謝を介した皮膚バリア形成機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Hirabayashi, Makoto Murakami
2. 発表標題 Phosphatidylcholine catabolism by PNPLA7 provides a source of hepatic methyl groups and controls energy homeostasis
3. 学会等名 59th ICBL (International Conference on the Bioscience of Lipids) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsuya Hirabayashi, Makoto Murakami
2. 発表標題 Phosphatidylcholine catabolism mediated by PNPLAs plays an important role in liver function and energy homeostasis
3. 学会等名 2nd Japan-Korea Lipid Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口舞、平林哲也、村上誠
2. 発表標題 PNPLA8とPNPLA7によるホスファチジルコリンの分解は肝臓のメチル基供給に重要である
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T Takeichi, T Hirabayashi, Y Miyasaka, A Kawamoto, Y Okuno, S Taguchi, K Tanahashi, C Murase, H Takama, K Tanaka, W Boeglin, M Calcutt, D Watanabe, M Kono, Y Muro, J Ishikawa, T Ohno, AR Brash and M Akiyama
2. 発表標題 SDR9C7 catalyzes the critical dehydrogenation of acylceramides for skin barrier formation
3. 学会等名 Society for Investigative Dermatology 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平林 哲也、川口 舞、笠原 浩二、村上 誠
2. 発表標題 肝臓のリン脂質分解を介したメチル基供給とトリグリセリド産生
3. 学会等名 第28回肝細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川口 舞、笠原 浩二、村上 誠、平林 哲也
2. 発表標題 中枢神経系における PNPLA6および PNPLA7欠損は筋萎縮を伴う神経変性を生じる
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 神経変性及び筋委縮モデル動物	発明者 平林哲也、村上誠	権利者 公益財団法人東京 京都医学総合研 究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-173338	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

(公財)東京都医学総合研究所 基礎医科学研究分野 細胞膜研究室 https://www.igakuken.or.jp/biomembrane/Study.html 東京都医学総合研究所 TOPICS 2019 http://www.igakuken.or.jp/topics/2019/1106.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	村上 誠 (MURAKAMI Makoto)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------