

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16246

研究課題名(和文)後期エンドソーム特異的リン脂質BMPの脂肪酸分子種の生理的意義の解明

研究課題名(英文)Elucidation of physiological roles of fatty acyl species of late endosome-specific phospholipid BMP

研究代表者

李 賢哲 (LEE-OKADA, Hyeon-Cheol)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：30758321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は後期エンドソームに存在するリン脂質であるBMPが、高度不飽和脂肪酸を豊富に含む生理的意義を明らかにすることを目的とした研究である。BMPへの高度不飽和脂肪酸の導入を担う酵素の欠損マウスを調べたところ、欠損マウス由来の臓器で酸化ストレスマーカーが増加していることがわかった。そこで、酸化ストレスを引き起こす試薬を投与し、それに対する感受性を調べたところ、このマウスでは酸化ストレスに対して脆弱である傾向があることがわかった。このことから、BMPは酸化されやすい性質を持つ高度不飽和脂肪酸を効率よく取り込み酸化ストレスから守る防御機構の一つである可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な疾患や病態に対し、予防・治療効果を示すオメガ3脂肪酸は、サプリメントとしても人気のある重要な栄養素の一つである。オメガ3脂肪酸は分子内に不飽和結合を多数有するため、非常に酸化されやすい性質を有しているが、生体がどのようにオメガ3脂肪酸の酸化を防いでいるか不明であった。本研究は細胞内へ取り込まれたオメガ3脂肪酸がどのように酸化から守られているか説明する分子機構の一端を明らかにする研究であり、本研究を継続しオメガ3脂肪酸の細胞内動態をより詳細に解析することにより、オメガ3脂肪酸をより効率よく摂取する方法論の開発へと繋がりたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：BMP is an enigmatic phospholipid that is specifically localized in intraluminal vesicles of late endosomes, and is thought to be essential for proper functions of late endosomes. BMP has a propensity to incorporate polyunsaturated fatty acids (PUFAs). However, the physiological meaning of PUFA-containing BMP fatty acyl species is unknown. We created a knockout mouse line that showed reduced levels of PUFA-containing BMP, and found that they had increase levels of oxidative stress markers. We also found that these mice were susceptible to reagents that cause oxidative stress. These data taken together suggest that BMP efficiently incorporates labile PUFAs to avoid oxidative environment within the cells.

研究分野：脂質生化学

キーワード：BMP DHA DPA PUFA

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ドコサヘキサエン酸 (DocosaHexaenoic Acid; 以下 DHA) は、様々な疾患や病態に対し、予防・治療効果を示すオメガ3 脂肪酸であり、サプリメントとしても人気のある重要な栄養素の一つである。特に炎症を基盤病態とする疾患に対する作用については、近年になって同定された Resolvin や Maresin、Protectin などの抗炎症性作用を有する DHA 由来の脂質メディエーターが寄与していると考えられている。DHA はまた、脳神経系の発達や精子形成などに必須であることが知られているが、このように脂質メディエーターでは説明できないその他多くの生理作用については、生体膜やリン脂質の「質」を構成因子として制御することで発揮されると考えられる。しかし、DHA がリン脂質の質や機能にどのように寄与するかについては、ほとんど分かっていないのが現状である。

(2) BMP (Bis(monoacylglycero)phosphate; 別名 LBPA) は、後期エンドソームの内膜に特異的に存在するリン脂質であり、脂質やタンパク質の輸送・分解等の後期エンドソームの機能や内膜構造の形成に必要不可欠であると考えられている。BMP には脂肪酸として多くの DHA 分子が結合していることが知られており、また、細胞内に取り込まれた DHA は BMP へ迅速に取り込まれる。そのため、DHA の生理作用に深く関係していると考えられるが、その生理的意義はこれまで分かっていない。その主な原因として、DHA が BMP へ取り込まれる過程を含め、BMP の生合成経路を担う分子の実体が全くと言ってよいほど分かっておらず、それらの機能を阻害した細胞や動物モデルを用いた研究が、これまで出来ていなかったことが挙げられる。興味深いことに、精巣などの一部の臓器においては、DHA と構造が良く似たオメガ6 系列の高度不飽和脂肪酸 (PolyUnsaturated Fatty Acid; 以下 PUFA) であるドコサペンタエン酸 (DocosaPentaenoic Acid; 以下 DPA) が DHA の代わりに非常に多く含まれることが知られているが、その生理的意義についても全く不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、DHA や DPA などの PUFA が BMP へ取り込まれる過程を担う遺伝子群を同定し、さらにそれらの遺伝子欠損動物を作製・解析することで、DHA や DPA が BMP に豊富に含まれる生理的意義を解明することである。

## 3. 研究の方法

### (1) BMP に DHA を導入する酵素の欠損マウスの解析

研究代表者はこれまで、BMP に DHA を選択的に導入する酵素を同定し、その欠損マウスについて解析してきた。本研究ではこの酵素の発現が高い臓器である精巣に着目し、様々な生化学的解析や機能的解析を行った。

### (2) PUFA 欠乏モデルの解析

研究代表者は最近、上述の欠損マウスの BMP 中の残存 PUFA を減少させる目的で PUFA の生合成を担う酵素である 6 不飽和化酵素 FADS2 の欠損マウスを作製した。FADS2 欠損マウスに PUFA 欠乏食を食べさせた後、脂質組成を調べると、オメガ6 系列の PUFA、例えばアラキドン酸は調べた全ての臓器において大幅に減少する。DHA については脳や網膜、精巣といった元々 DHA リッチな組織においては DHA の減少速度は遅いが、長期間の PUFA 欠乏食の投与によって大幅に減少させることが可能である。興味深いことに、FADS2 欠損マウスの精巣の BMP では、通常結合する脂肪酸の 70%以上を占める DPA が、全く保持されずにほぼ消失してしまう。PUFA が結合した BMP が何らかの生理機能を有しているとするれば、FADS2 欠損マウスや二重欠損マウスの特に精巣においては、従来 BMP のほとんどを占める DPA や DHA が枯渇してしまうことから、その機能が著しく損なわれていると考えられる。本研究では FADS2 欠損マウスや二重欠損マウスについても、生化学的解析や表現型解析を行った。

### (3) 脂質解析

上記のマウス臓器や細胞の脂質解析に関しては、所属している研究室が保有している Waters 社製のタンデム四重極型質量分析計 (Xevo TQ-S micro) および、BMP と BMP の構造異性体である PG (ホスファチジルグリセロール) を区別して測定することが可能な脂質測定系を利用した。また、脂質過酸化マーカーである 4-HNE (4-hydroxy-2-nonenal) などの脂肪酸由来アルデヒド類に関しては、L-カルノシンを利用した誘導体化法 (*Anal Chem.* **84**, 4580-6.) を応用し、測定系

を立ち上げた。

#### 4. 研究成果

##### (1) PUFA 欠乏モデルの解析結果

長期間 PUFA 欠乏状態が続いたマウスは雄性不妊となり、精子数の減少や精子形成の異常、巨大頭部精子症様の表現型を示すことが知られている。研究代表者が作製した FADS2 欠損マウスにおいても、PUFA 欠乏食を2ヶ月以上食べさせると、過去の報告と同様に精子数の大幅な減少や精子形成の異常が観察された。二重欠損マウスについても同様に PUFA 欠乏食を食べさせた後に表現型を観察したところ、精子数や精子形成の表現型については FADS2 単独の欠損マウスと比較して増悪は見られなかった。

##### (2) BMP に DHA を導入する酵素の欠損マウスの解析結果

BMP に DHA を導入する酵素の欠損マウスの表現型解析を行ったところ、通常条件下においては精子の数や形態に顕著な異常は見られなかった。そこで、生化学的な解析およびリピドミクス解析を行ったところ、脂質過酸化マーカーが欠損マウスの精巣において顕著に増加していることが分かった。このことから、欠損マウスでは脂質過酸化を引き起こすような酸化刺激に対して脆弱である可能性が考えられた。そこで、酸化ストレスを誘導する目的で、抗癌剤であるドキシソルピシンをマウスに投与した。ドキシソルピシンはアントラサイクリン系の抗腫瘍性抗生物質であり、トポイソメラーゼなどの反応を阻害することによって抗腫瘍効果を示すが、活性酸素種を産生する作用があることも知られている。ドキシソルピシンを投与したマウス由来の精巣においては、精子の数や精巣の形態に著しい異常をきたし、脂質組成を調べたところオメガ6系列の PUFA (DPA や精巣に特異的に存在するオメガ6系列の極長鎖 PUFA) が著しく減少した。精巣の重量はドキシソルピシン投与群では半分以下に減少した。興味深いことに、ドキシソルピシンを投与した欠損マウスではこれらの表現型がより顕著になっていた。このことから、BMP に DHA を導入する酵素を欠損すると、酸化ストレスに脆弱になることが分かった。

##### (3) 二重欠損マウスの表現型解析

BMP 中の DHA に関しては、近傍に存在する他の脂質の過酸化を積極的に防ぐ役割があるとする過去の報告がある。そこで、BMP 中の DHA 量が減少した二重欠損マウス由来の精巣における過酸化脂質マーカー量を測定したところ、マーカーの存在量に顕著な違いは見られなかった。さらに、上述したドキシソルピシン投与モデルを二重欠損マウスにおいても検討したところ、表現型に顕著な差は見いだせなかった。

DHA は分子内に脂肪酸の中で最多の6つも不飽和結合を有する脂肪酸であるため、極めて酸化されやすく脆弱であることが知られている。そのため、生体には DHA を生体内の酸化的環境から守り有効利用する何らかの仕組みが備わっていると考えられるが、詳細はほとんど分かっていない。FADS2 欠損マウスとの二重欠損マウスにおいて表現型の増悪が見られなかったことは、このマウスモデルが酸化ストレスに脆弱な DHA などの PUFA を欠乏させてしまうモデルであるため、酸化ストレスが起こりにくくなってしまった可能性が考えられる。DHA の細胞内への取り込みに関しては近年、DHA に高い選択性を有するトランスポーターが存在することが明らかになってきており、これは食事から取り込まれた DHA を適切な臓器へ迅速に配分する仕組みの一つであると考えられる。一方、細胞内に取り込まれた DHA がどのような経路でリン脂質等の脂質の合成の場(小胞体などの細胞小器官)へ運ばれるのかについてはほとんど分かっていない。BMP が DHA を脂質過酸化から守り適切な細胞小器官へ分配するための中継地点としての役割がある可能性が考えられる。そこで、今後は酸化ストレスに脆弱な DHA などの PUFA を過剰に投与した個体モデルを作製し、酸化ストレスや脂質過酸化が起こりやすくなった条件において、BMP の生理的意義について詳細な解析を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zhang Shun, Kohira Yoshinori, Orita Hajime, Ishimine Momoko, Kobayashi Toshiyuki, Buendia Chua Sharlyn Mae, Nakaoka Hirofumi, Inoue Ituro, Hino Okio, Yokomizo Takehiko, Fukunaga Tetsu, Lee-Okada Hyeon-Cheol	4. 巻 2
2. 論文標題 Sensitization of Gastric Cancer Cells to Irinotecan by p53 Activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 130 ~ 133
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 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 Lee Hyeon-Cheol, Tominaga Mitsutoshi, Yasukawa Ken, Ohba Mai, Takahashi Nobuaki, Honda Kotaro, Okuno Toshiaki, Takamori Kenji, Yokomizo Takehiko	4. 巻 95
2. 論文標題 Dietary supplementation of omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid does not ameliorate pruritus in murine models of atopic dermatitis and psoriasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 130 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2019.07.010	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 Hirakata Toshiaki, Lee Hyeon-Cheol, Ohba Mai, Saeki Kazuko, Okuno Toshiaki, Murakami Akira, Matsuda Akira, Yokomizo Takehiko	4. 巻 33
2. 論文標題 Dietary -3 fatty acids alter the lipid mediator profile and alleviate allergic conjunctivitis without modulating Th2 immune responses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 3392 ~ 3403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201801805R	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 Shin Myungsun, Ware Timothy B., Lee Hyeon-Cheol, Hsu Ku-Lung	4. 巻 1864
2. 論文標題 Lipid-metabolizing serine hydrolases in the mammalian central nervous system: endocannabinoids and beyond	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 907 ~ 921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2018.08.007	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 該当する

1. 著者名 平形 寿彬、李 賢哲、横溝 岳彦	4. 巻 69
2. 論文標題 【生理活性脂質とアレルギー炎症】 脂肪酸由来の脂質メディエーターによるアレルギー炎症の制御	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 569 ~ 575
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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 張 順、伊志嶺 百々子、小平 佳典、折田 創、小林 敏之、樋野 興夫、横溝 岳彦、福永 哲、李 賢哲
2. 発表標題 カルボキシルエステラーゼ2の消化器癌における発現調節機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李 賢哲、伊志嶺 百々子、横溝 岳彦
2. 発表標題 C型肝炎治療薬ソホスブピルのカルボキシルエステラーゼ阻害活性の検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李 賢哲、李 慶賢、平形 寿彬、横溝 岳彦
2. 発表標題 脂肪酸不飽和化酵素FADS2欠損マウスにおける脂質プロファイル異常
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 李 慶賢、李 賢哲、横溝 岳彦
2. 発表標題 高度不飽和脂肪酸欠乏時における脂質関連遺伝子発現の変動
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 李 慶賢、李 賢哲、横溝 岳彦
2. 発表標題 Regulatory mechanism of expression of polyunsaturated fatty acids-related genes
3. 学会等名 第60回 国際脂質生物科学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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