

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17950

研究課題名（和文）加齢に伴う脳内セリン合成能低下による脂質代謝変動と病態発症機序の解明

研究課題名（英文）Age-related changes in lipid metabolism and pathogenic mechanisms due to reduced L-serine synthesis

研究代表者

佐矢野 智子（Sayano, Tomoko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：20733934

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）：本研究では、セリン欠乏が誘発する脂質代謝異常が、正常細胞に及ぼす影響を明らかにするため、主にコレステロール合成経路に着目して解析を行ってきた。その結果、セリン欠乏はコレステロールや脂肪酸合成および代謝経路関連の代謝物を大きく変動させており、セリンが細胞の恒常性維持に果たす役割を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セリン欠乏に関連した脂質代謝基盤が明らかになれば、アミノ酸欠乏が惹起する脂質代謝軸恒常性破綻が、従来病因の分子基盤が明らかになっていない神経変性疾患の新たな病因性として結びつけられると考えている。実際にアミノ酸代謝・スフィンゴ脂質代謝・コレステロール代謝の異常が原因となって発症することが示唆されている神経疾患は多く、これらの代謝軸の理解を目指す本研究は、代謝性神経疾患の病態解明とその治療戦略の構築に貢献できると期待している。

研究成果の概要（英文）：To identify molecules affected by L-Serine (Ser) depletion and the molecular mechanism underlying the L-Ser deficiency-induced metabolic abnormalities, qPCR, Western blotting and LC-TOFMS was performed in this study. The results showed that L-Ser deficiency significantly alters metabolites related to Cholesterol, Fatty acid synthesis, and metabolic pathways. This indicates the role of L-Ser in maintaining cellular homeostasis.

研究分野：分子栄養学

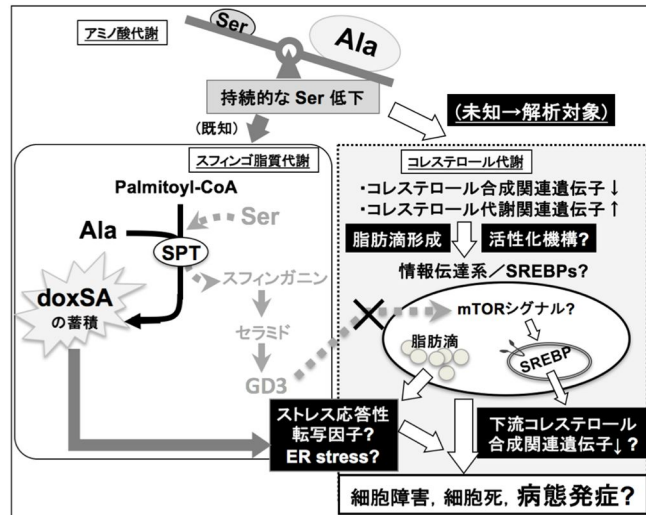
キーワード：セリン欠乏 脂質代謝 コレステロール 加齢

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

L-セリン (以下セリン) は、他のアミノ酸や細胞膜脂質であるスフィンゴ脂質など、様々な生体分子の生合成に不可欠な代謝成分であり、生体内で合成可能な可欠アミノ酸である。しかし、セリン生合成の初発酵素である *Phgdh* のノックアウト (KO) マウスやヒトのセリン合成不全患者は、共通に、小頭症を含む重篤な神経及び全身性の発達障害、或いは胎生致死に至ることから、セリンが重要な代謝機能をもつことが実証されている。申請者は、細胞レベルでセリン欠乏が細胞増殖能低下・細胞死といった表現型を呈すことを見いだしてきた。しかし、一体どのような機構でセリンが個体の発達と生存の代謝基盤を支えているのか、その詳細な分子機序は未だ十分に解明されていない。

セリンは脳内ではグルコースから生合成され、脂質合成に直接取り込まれる唯一のアミノ酸であり、膜脂質の前駆体として利用されることから、セリン欠乏による体内セリン濃度の減少は *Phgdh* KO 胚における脂質代謝に影響を及ぼすことが推察されていた。実際に、*Phgdh* KO マウスや同マウス由来胚性線維芽細胞 (KO-MEF) では、セリン欠乏により正常なスフィンゴ脂質類が減少し、正常組織では稀な、セリンではなくアラニン含有する doxSA が産生されることを見出している。またさらに、doxSA は細胞増殖抑制、ストレス応答、細胞死などを誘発する細胞障害性脂質であり、細胞内の遊離アラニン/セリン濃度比が 3 以上に増大すると合成が促進されることが明らかとなっている。脳内のセリン合成酵素 *Phgdh* の発現量は加齢に伴い減少することから、老化に伴う脳内セリン合成能低下は、脂質代謝恒常性の破綻を介したアルツハイマー病等の加齢性脳神経系疾患への脆弱性増加や病態進行促進に繋がる可能性があると考えられた (図 1)。申請者はセリン欠乏が誘発する脂質代謝異常の分子メカニズムを明らかにすることで、アミノ酸-脂質代謝軸の恒常性維持から加齢性神経疾患の予防及び将来的な治療への貢献へ結びつけたいと考えた。



(図1) セリン-脂質代謝関連の仮説

2. 研究の目的

本研究は、セリン欠乏が誘発する脂質代謝異常が正常細胞に及ぼす影響及び病態へ関与する可能性とその分子基盤について包括的に明らかにすることを目的とした

3. 研究の方法

(1) セリン欠乏によるコレステロール代謝経路の変動解析: セリン欠乏が Sterol Regulatory Element-binding Proteins (SREBPs) 及びその標的因子やコレステロール代謝へ及ぼす影響を検討するため、セリン合成不全線維芽細胞 (KO-MEF) を用い、qRT-PCR 及び western blotting による解析を行った。

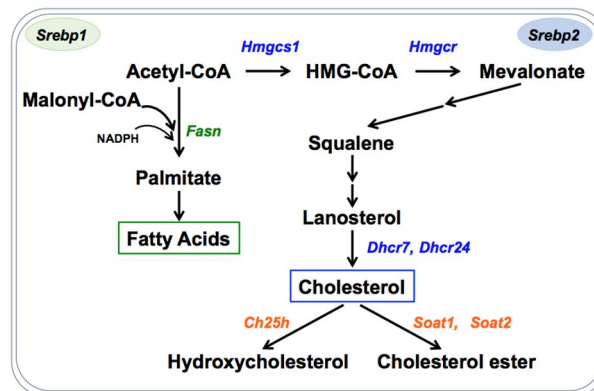
(2) GD3 の Srebps 発現に対する影響の解析: セリン欠乏により顕著に発現低下しているスフィンゴ糖脂質のガングリオシド GD3 が、細胞内全体のコレステロール量を決定づける転写因子 SREBP の制御をしているのか、細胞外 GD3 添加実験による検討を行った。

(3) 脂質分析による網羅的な脂質代謝解析: LC-TOFMS によりセリン欠乏が脂質代謝に及ぼす影響について検討した。

4. 研究成果

(1) セリン欠乏によるコレステロール代謝経路の変動解析: セリン欠乏がコレステロール代謝に及ぼす影響を検討するため、KO-MEF をセリン添加条件培地とセリン制限条件培地で 6h もしくは 24h 培養し、qRT-PCR 及び western blotting による解析を行った。その結果、セリン制限 6h でコレステロール合成の最終段階を触媒する酵素である Dhcr24 が著しく減少し、セリン制限 24h 後においてはさらに一段と発現が抑制されることを確認した。その他、脂肪酸合成を制御する *Srebp1* がセリン制限 6h, 24h で経時的に有意な発現増強を示しており、脂肪酸合成酵素遺伝子である *Fasn* がセリン制限 6h ではセリン添加条件の 1/3 にまで発現減少し、セリン制限 24h ではセリン添加条件の 2/3 にまで回復していることを認めた。また、コレステロール合成を制御する *Srebp2* においてはセリン制限 6h で有意に発現が減少していることを確認した。

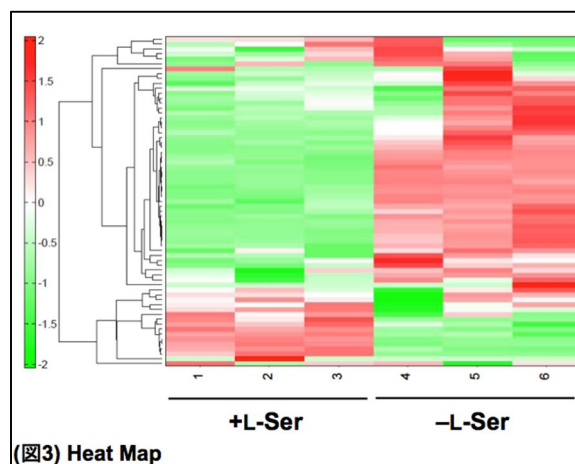
その他に、セリン欠乏下でコレステロール合成関連遺伝子/タンパク質 (*Hmgcs1*, *Hmgcr*, *Dhcr7*)の発現減少と、コレステロール代謝関連遺伝子 (*Ch25h*, *Soat1*, *Soat2*)の発現増加を確認した(図2)。コレステロール合成の最終段階を触媒する酵素である *Dhcr24* と *Dhcr7* はセリン欠乏により著しく発現が減少していたが、発現量だけでなく、酵素活性についても今後調べる必要がある。



(図2) コレステロール合成経路図

(2) GD3 の Srebps 発現に対する影響の解析: 細胞内コレステロール量を調節する機構の一つとして、セリン欠乏では GD3 の顕著な減少が原因で、Srebp によるコレステロール合成経路が負に制御されている可能性を考えたことから、GD3 が脂質関連遺伝子/タンパク質に及ぼす影響について検討を行った。GD3 は apoptosis を誘導することが知られており、また、セリン欠乏自体が 48h 以降で有意に細胞死を惹起することを鑑み、GD3 の添加濃度は GD3 添加により細胞死が起きない濃度に設定し、検討を行った。その結果、*Srebp1*, *Srebp2*, *Fasn*, *Soat2* が GD3 の添加に鋭敏に反応することが分かった。

(3) 脂質分析による網羅的な脂質代謝解析: 実際にセリン欠乏によりコレステロール量の減少が認められるか、セリン添加条件培養、セリン制限条件培養、セリン制限+GD3 添加条件培養のサンプルを用いて LC-MS による脂質分析を行った。その結果、予想に反してセリン制限条件培養サンプルにおいて、コレステロールの減少を認めることができなかった。そこで、セリン欠乏が脂質代謝に及ぼす影響を包括的に捉えるため、LC-TOFMS によるメタボローム解析を行った。使用培地はセリン欠乏以外の要因を含まないように(栄養素枯渇にならないよう)に、条件培養培地へ交換後 12h で一度半量培地交換を行った。



(図3) Heat Map

メタボローム解析の結果は、やはりセリン欠乏によってコレステロールは減少していないという結果であった。また、図3のように67のピークが絞り込まれ、そのうち32の化合物についてセリン制限下で有意な変動が認められることが分かった。また今回の脂質分析で、これまでセリン欠乏で発現変動していた遺伝子が、一部の脂質の蓄積に関与している可能性が推察され、セリン-脂質代謝関連の一端が伺える結果となった。引き続き解析を行っていく。

Srebp1 が制御する *Fasn* は、Acetyl-CoA と Malonyl-CoA から生成されるパルミチン酸の合成を触媒する脂肪酸合成酵素であり、パルミチン酸は他の脂肪酸や複合脂質に利用されてシグナル伝達等の重要な役割を果たす。*Fasn* は PI3K-Akt-mTOR を介したシグナル伝達を増加させることが知られているが、Akt の下流には申請者がこれまで注目してきたセリン欠乏により産生される doxSA でも活性化される p38 MAPK 経路がある。このことから、今後も引き続きアミノ酸-脂質代謝軸の連携動態を詳細に調べていき、セリン欠乏が惹起する脂質恒常性の破綻が、従来分子基盤が明らかになっていない神経変性疾患の新たな病因性として結びつくかについて明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hamano Momoko, Haraguchi Yurina, Sayano Tomoko, Zyao Chong, Arimoto Yashiho, Kawano Yui, Moriyasu Kazuki, Uono Miyako, Katakura Yoshinori, Ogawa Takuya, Kato Hisanori, Furuya Shigeki	4. 巻 8
2. 論文標題 Enhanced vulnerability to oxidative stress and induction of inflammatory gene expression in 3-phosphoglycerate dehydrogenase-deficient fibroblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 914 ~ 922
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.12429	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

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------