

平成 21 年 4 月 3 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 -2008

課題番号：19790047

研究課題名（和文）高度不飽和脂肪酸要求性分子の探索と機能解析

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of PUFA-related genes

研究代表者

井上 貴雄（INOUE TAKAO）

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号 50361605

研究成果の概要：

PUFA が欠乏すると、知能発達障害、皮膚障害など様々な病態、疾患を引き起こす。これらの中にはプロスタグランジンなど脂質性メディエーターの欠乏で説明できるものもあるが、脳神経系の発達等については、アラキドン酸代謝物だけでは説明できず、PUFA が他にも重要な機能を果たしていると考えられる。PUFA はリン脂質に多く含まれており、柔軟な膜を形成することから、特に膜タンパク質の機能発現に重要な役割を果たしていることが予想されている。しかしながら、実際にどのような分子が PUFA を豊富に含む膜環境を要求するか、これまでほとんど明らかになっていない。

本研究では線虫 *C. elegans* を用いた網羅的 RNAi スクリーニングにより、機能発現に PUFA を要求すると考えられる遺伝子を複数同定した。また、これらの細胞内局在を解析したところ、膜タンパク質と考えられる機能未知分子 X の細胞内局在が PUFA 欠乏変異体において変化することを見出した。この局在変化は PUFA の添加によりレスキューされたことから、本分子の適切な局在維持に PUFA を含む膜環境が必要であると考えられる。これまで PUFA 欠乏状態によって引き起こされる膜環境の変化が、どのような分子に影響を与えるか不明であった。本研究により同定した分子は進化的に高度に保存された膜タンパク質であり、哺乳動物においても機能発現に PUFA を豊富に含む膜環境を要求すると考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：PUFA、線虫

1. 研究開始当初の背景

近年、EPA (エイコサペンタエン酸) や DHA (ドコサヘキサエン酸) などの高度不飽和脂肪酸が機能性食品として注目を集めており、メディア、雑誌等で数多く取り上げられている。高度不飽和脂肪酸 (PUFA: polyunsaturated fatty acid) とは、狭義において二重結合が 4 つ以上、炭素数 20 以上の不飽和脂肪酸のことを指し、EPA (20:5) 、DHA (22:6) に加え、アラキドン酸 (20:4) がその代表例である (20:4 の表記は炭素数が 20、二重結合 4 の脂肪酸であることを示す)。

PUFA が欠乏すると、知能発達障害、皮膚障害、視覚障害、生殖異常、さらには免疫機能障害、心血管機能障害まで様々な病態、疾患が引き起こされる。これらの中にはプロスタグランジンなど脂質性メディエーターの欠乏、あるいはメディエーター産生系の阻害で説明できるものもあるが、脳神経系の発達、記憶・学習等については、アラキドン酸代謝物だけでは説明できず、メディエーター前駆体としての機能の他にも PUFA が重要な機能を果たしていることが予想されている。しかしながら、これまでその分子的基盤はほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

研究代表者は線虫 *C. elegans* における不飽和脂肪酸合成酵素の変異体を用いた解析から興味深い現象を見いだした。線虫は PUFA を合成するためのすべての酵素を備えているため、不飽和脂肪酸を含まない大腸菌をエサとして自前で PUFA を合成することができ、合成酵素を欠損させることで様々な脂肪酸欠乏状態を作出することが可能である。このような PUFA 欠乏変異体に対して様々な分子の RNAi を行っていたところ、野生株に RNAi しても異常を示さないが、PUFA 欠乏変異体に同様の発現抑制を行うと著しい表現型を示す分子があることに気がついた。これらの分子は PUFA が欠乏すると機能に障害が現れる

と考えられ、いわば「PUFA 要求性分子」と捉えることができる。

本研究では、線虫 *C. elegans* を用いた RNAi スクリーニングにより、PUFA と機能的に連関する分子を網羅的に探索する。スクリーニングの結果得られた分子の中には、機能発現に PUFA を豊富に含む膜環境を要求する「PUFA 要求性分子」が存在すると考えられ、特に、PUFA 含有リン脂質を必要とする膜タンパク質の同定を目指す。

3. 研究の方法

1) 線虫の全ゲノムに対して網羅的 RNAi を行い、「野生株に RNAi しても表現型を示さないが、PUFA 欠損株に同様の RNAi を行うと著しい表現型を示す遺伝子」を同定する。具体的には、線虫のエサとなる大腸菌の中に dsRNA を発現させ、これを線虫に取り込ませる feeding RNAi 法を用いる。線虫全 19,000 遺伝子のうち、87% をカバーする RNAi ライブラリーおよび 55% をカバーするライブラリーを取得しており、これら二つのライブラリーで全遺伝子の 95% の発現抑制が可能である。

2) スクリーニングで同定した分子に関し、PUFA 欠乏条件下においてどのような影響があるかを調べる。具体的には蛋白の安定性、細胞内局在、当該分子の機能を評価する。

3) 当該分子の欠損変異体を作製し、その生理機能を明らかにする。

4. 研究成果

線虫全遺伝子の RNAi スクリーニングを終了し、機能発現に PUFA を要求すると考えられる遺伝子を 23 分子同定することに成功した。これらの分子に mCerry を付加して線虫に導入し、細胞内局在を解析したところ、膜タンパク質と考えられる機能未知分子 X の細胞内局在が PUFA 欠乏変異体において大きく変化することを見出した。この局在変化は PUFA の添加によりレスキューされたことが

ら、分子 X の適切な局在維持に PUFA が必要であることが分かった。さらに、生体膜の主要リン脂質であるホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンに PUFA を導入する脂肪酸転移酵素の機能を阻害した場合にも、分子 X の細胞内局在が同様に変化したことから、生体膜中の PUFA 含有リン脂質がその局在に重要であると考えられる。

次に分子 X の生理機能を明らかにするため変異体を作製した。興味深いことに分子 X の変異体では PUFA 欠乏変異体で見られる異常と同様の表現型が観察され、本分子が PUFA 欠乏により引き起こされる異常の一部を説明する分子であることが示唆された。

本研究により同定した分子 X は進化的に高度に保存された膜タンパク質であった。本分子は哺乳動物においても PUFA 含有リン脂質と機能的に密接に関連する可能性が高いと考えられ、PUFA 欠乏により引き起こされる病態の発症メカニズムの解明にも寄与するものと期待される。

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) *C. elegans mboa-7*, a member of the MBOAT family, is required for selective incorporation of polyunsaturated fatty acids into phosphatidylinositol. Lee H.C., Inoue T., Imae R., Kono N., Shirae S., Matsuda S., Gengyo-Ando K., Mitani S. and Arai H. *Mol. Biol. Cell*, 19, 1174-1184, 2008 査読あり

(2) -Catenin asymmetry is regulated by PLA1 and retrograde traffic in *C. elegans* stem cell divisions. Kanamori T., Inoue T., Sakamoto T., Gengyo-Ando K., Tsujimoto M., Mitani S., Sawa H., Aoki J., and Arai H. *EMBO J.*, 27, 1647-1657, 2008 査読あり

(3) A member of the membrane-bound O-acyltransferase (MBOAT) family encodes a lysophospholipid acyltransferase with broad substrate specificity. Matsuda S., Inoue T., Lee H.C., Kono N., Tanaka F., Gengyo-Ando K., Mitani S., and

Arai H. *Genes to Cells*, 13, 879-888, 2008 査読あり

〔学会発表〕(計 10 件)

(1) *C. elegans*: a model for functional and molecular analysis of polyunsaturated fatty acid Takao Inoue BMB2008、2008.12.10、神戸

(2) Functional and molecular analysis of polyunsaturated fatty acids using *C. elegans*. Takao Inoue フォーラム 2008: 衛生薬学・環境トキシコロジー、2008.10.17、熊本

(3) *C. elegans mboa-7*, a Member of the MBOAT family, is Required for Selective Incorporation of Polyunsaturated Fatty Acids into Phosphatidylinositol Takao Inoue Keystone Symposia、2008.1.14、Big Sky, Montana

(4) 線虫 *C.elegans* を用いた高度不飽和脂肪酸 (PUFA) 要求性遺伝子の探索 白江伸一郎、井上貴雄、安藤恵子、三谷昌平、新井洋由 東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム 2007、2007.9.15、東京

(5) A genome-wide RNAi screen to identify genes required for incorporation of exogenous PUFAs in *C. elegans* Hyeon-Cheol Lee, Takao Inoue, Keiko Gengyo-Ando, Shohei Mitani, Hiroyuki Arai BMB2007、2007.12.12、横浜

(6) *In vivo* incorporation of radiolabeled fatty acids into *C. elegans* 松田真治、井上貴雄、安藤恵子、三谷昌平、新井洋由 BMB2007、2007.12.12、横浜

(7) 線虫 *C.elegans* を用いた高度不飽和脂肪酸 (PUFA) 要求性遺伝子の探索 白江伸一郎、井上貴雄、安藤恵子、三谷昌平、新井洋由 BMB2007、2007.12.12、横浜

(8) A large-scale RNAi screen for genes involved in incorporation of exogenous PUFAs into phospholipids in *C. elegans* 井上貴雄、BMB2007、2007.12.12、横浜

(9) 線虫 *C.elegans* を用いた高度不飽和脂肪酸感受性遺伝子の同定 新井洋由、井上貴雄 BMB2007、2007.12.14、横浜

(10) 線虫 *C.elegans* を用いた高度不飽和脂肪酸 (PUFA) 要求性遺伝子の探索 白江伸一郎、井上貴雄、安藤恵子、三谷昌平、新井洋由 フォーラム 2007 衛生薬学・環境トキシコロジー、2007.11.02、大阪

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井上 貴雄 (INOUE TAKAO)
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号：50361605

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし