

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21379

研究課題名（和文）多種多様な脂肪酸種で構成されるリン脂質分子種の意義解明

研究課題名（英文）Elucidating the biological significance of phospholipid species

研究代表者

青木 淳賢（Aoki, Junken）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・教授

研究者番号：20250219

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：生体膜のグリセリン脂質の脂肪酸組成の形成にはリゾリン脂質アシル基転移酵素（LPLAT）と呼ばれる酵素群が重要な働きを持つ。これまでに同定されたほとんどのLPLAT分子はグリセロール骨格のsn-2位への導入を担う分子である。一方でsn-1位への脂肪酸導入を担うLPLATは不明であった。今回我々は新規LPLAT活性評価法を用いてsn-1位への脂肪酸導入に関わるLPLATの探索を行い、リン脂質sn-1位にオレイン酸（18:1）を導入する酵素としてLPEAT2を同定した。また、KOマウスを解析し、LPEAT2が神経軸索伸張に関与する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食事に含まれる脂肪酸が多様であるように、我々の細胞を構成する脂肪酸は多様である。この多様性の意義解明は、有効な脂肪酸栄養学に寄与するだけでなく、将来的な疾病予防、創薬につながる可能性がある。本研究で、脂肪酸多様性の意義として、特定の脂肪酸がリン脂質に取り込まれる機構が明らかになった。本研究結果をきっかけに、リン脂質の脂肪酸組成の多様性に意義に大きく近づける可能性がある。

研究成果の概要（英文）：A group of enzymes called lysophospholipid acyltransferases (LPLATs) play an important role in the formation of the fatty acid composition of glycerophospholipids in the biological membranes. Most of the LPLAT molecules identified so far are responsible for the introduction into the sn-2 position of the glycerol backbone. On the other hand, the LPLAT responsible for the introduction of fatty acids into the sn-1 position is unknown. In this study, we used a novel LPLAT activity assay to search for LPLATs involved in the introduction of fatty acids into the sn-1 position and identified LPEAT2 as the enzyme responsible for introducing oleic acid (18:1) into the phospholipid sn-1 position. KO mice were analyzed and LPEAT2 was found to be potentially involved in neuronal axon elongation.

研究分野：脂質生物学

キーワード：脂肪酸 多様性 生物学的意義 リン脂質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜脂質の主成分であるリン脂質は 1,500 種以上の分子種からなる。これら多種のリン脂質分子種それぞれの機能を解明することは脂質生物学の難題かつ挑戦的な課題である。様々な研究手法が発達した現在でも、脂質は機能解析が困難な研究対象である。タンパク質や核酸とは異なり脂質は、(1) 組織・細胞レベルの可視化ツールが無い、(2) 1 遺伝子でコードされず、その生成過程には複数の遺伝子が関与するため脂質分子の発現変動を容易に実現できないこと、が主な理由である。(1) に関して、新規手法の開発、また、(2) に関して、リン脂質合成酵素(リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ、LPLAT) の同定がリン脂質分子機能解明の突破口になりうる。本研究では、研究代表者が同定した、3 つの脂肪酸(パルミチン酸(16:0)、ステアリン酸(18:0)、オレイン酸(18:1)) に対する LPLAT 分子(LPGAT1/LPLAT7, LPLCAT1/LPLAT8, LPEAT2/LPLAT10) を標的にし、*sn*-1 位にこれら 3 つの脂肪酸をそれぞれ持たないリン脂質組成を持つ細胞膜を作り出すことで、それぞれの脂肪酸を有するリン脂質の機能解明を目指した。

### 2. 研究の目的

LPLAT 分子(LPGAT1/LPLAT7, LPLCAT1/LPLAT8, LPEAT2/LPLAT10) を通じ作りだされる、それぞれ、18:0, 16:0, 18:1 含有リン脂質の細胞内局在、機能を解明する。

### 3. 研究の方法および研究成果

#### 3-1. 炭素数 17 の脂肪酸アジドはステアリン酸アナログとして機能する

ステアリン酸(C18:0)に近い挙動を示すアジド化合物として、炭素数 17 の飽和脂肪酸アジド(C17:0-azide; AzC17) が報告されていた(*Nature*, 525, 124-128, 2017)。このことを確認するため、AzC17 を有機合成し、ステアリン酸を導入する活性を有する LPLAT7 を強制発現させた細胞への AzC17 の取り込みを LC-MS により評価した。その結果、LPLAT7 の過剰発現により、リン脂質画分への AzC17 の取り込みが劇的に増加した(図 1)。

3-2. AzC17 は LPLAT7 陽性 ER three way junction のドット状構造に取り込まれる

LPLAT7 を過剰発現させた HeLa 細胞に AzC17 を添加し、取り込まれた AzC17 を click 反応で蛍光基質と結合させ、その細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察した。LPLAT7 強制発現条件では、核周辺の構造と細胞辺縁部のドット状構造体に AzC17 シグナルが検出された(図 2、黄色矢印)。また、興味深いことにこのシグナルは、LPLAT7 の分布とよく一致した。以上から、LPLAT7 の酵素活性依存的に取り込まれた AzC17 を可視化することに成功した。

3-3. ドット状構造は LPLAT7 の酵素活性依存的に形成される

このドット状構造を詳細に観察すると、3 本の ER tube が繋がる場所、いわゆる、ER three-way-junction に存在することがわかった。また、活性中心変異体 LPLAT7 を強制発現させた場合は、このドット状の構造は小さく、また、数も少なく、AzC17 の取り込みも見られなかった。一方、コントロール細胞やパルミチン酸(C16:0)とオレイン酸(C18:1)を導入する酵素である LPLA8、LPLAT10 を過剰発現させた場合ではこのドット状構造は観察されなかった。

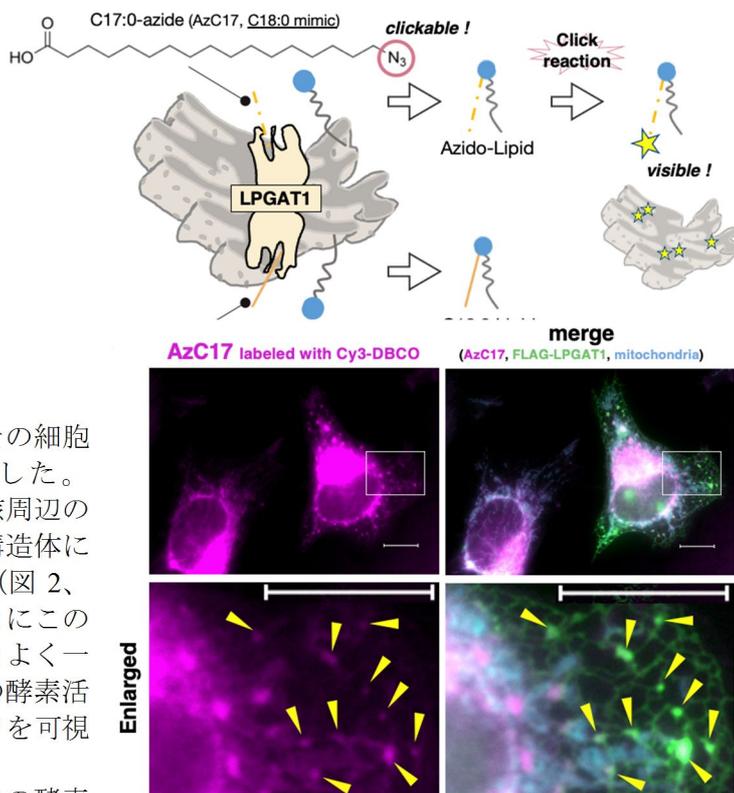


図2: LPLAT7 高発現細胞における AzC17 signal [scale bar : 10 μm]

#### 4. 考察

細胞内のオルガネラを含むさまざまな膜構造にはそれぞれ構造の異なるリン脂質分子種が存在し、膜構造の維持やそこに局在する膜タンパク質の安定化・活性発現に寄与すると考えられている。しかし、多様なリン脂質分子種のそれぞれの役割解明はほとんど進んでいない。本研究で私は、ステアリン酸 (C18:0) 導入酵素である LPLAT7 が酵素活性依存的に機能未知の構造体を作り出すこと、この構造体には、LPLAT7 が濃縮されており、また、ステアリン酸アナログ (AzC17) が取り込まれることを示した、LPLAT7 により取り込まれた脂質分子の可視化に初めて成功した。この構造体は LPLAT7 により産生されたステアリン酸含有リン脂質が作り出す構造体であることが強く示唆される。今後この構造に実際、ステアリン酸含有リン脂質が含まれているか、内因性 LPLAT7 により作り出されるステアリン酸含有脂質のドット状構造形成への寄与などを明らかにする必要がある。LPLAT7 KO マウス、KO ゼブラフィッシュは筋肉・心筋・網膜・精子等に重篤な異常を示すため、これら組織・細胞中の ER 構造を詳細に調べることで、本研究で見出された新規構造体の同定や意義解明につながるものと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Valentine William J., Yanagida Keisuke, Kawana Hiroki, Kono Nozomu, Noda Nobuo N., Aoki Junken, Shindou Hideo	4. 巻 298
2. 論文標題 Update and nomenclature proposal for mammalian lysophospholipid acyltransferases, which create membrane phospholipid diversity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101470 ~ 101470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101470	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 Shibata Takeaki, Kawana Hiroki, Nishino Yuri, Ito Yoshiko, Sato Hiroyasu, Onishi Hirofumi, Kano Kuniyuki, Inoue Asuka, Taketomi Yoshitaka, Murakami Makoto, Kofuji Satoshi, Nishina Hiroshi, Miyazawa Atsuo, Kono Nozomu, Aoki Junken	4. 巻 12
2. 論文標題 Abnormal male reproduction and embryonic development induced by downregulation of a phospholipid fatty acid-introducing enzyme Lpgat1 in zebrafish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7312-7320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-11002-4	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 Taiga Iwama, Kuniyuki Kano, Daisuke Saigusa, Kim Ekroos, Gerhild van Echten-Deckert, Johannes Vogt, Junken Aoki	4. 巻 93
2. 論文標題 Development of an On-Tissue Derivatization Method for MALDI Mass Spectrometry Imaging of Bioactive Lipids Containing Phosphate Monoester Using Phos-tag	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 3867-3875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c04479.	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川名 裕己, 柴田 剛明, 岩間 大河, 相良 洋, 佐藤 悠喜飛, 可野 邦行, 河野 望, 青木 淳賢
2. 発表標題 LPLAT7/LPGAT1欠損体における網膜変性機構の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小澤 雅也, 川名 裕己, 可野 邦行, 河野 望, 青木 淳賢
2. 発表標題 ステアリン酸含有リン脂質の培養細胞レベルでの機能解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 可野邦行, 岩間大河, 青木淳賢
2. 発表標題 リン脂質研究における新たな質量分析イメージング法の開発とその応用
3. 学会等名 第46回日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田剛明, 川名裕己, 青木淳賢
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いたリン脂質sn-1位ステアリン酸導入酵素LPGAT1の生理機能の解明
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第86回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩間大河, 可野邦行, 三枝大輔, 青木淳賢
2. 発表標題 On-tissue derivatization を用いたリン酸基含有脂質のイメージング解析
3. 学会等名 第93回生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田剛明、川名裕己、青木淳賢
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いたリン脂質sn-1位ステアリン酸導入酵素LPGAT1の生理機能の解明
3. 学会等名 第93回生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤悠喜飛、川名裕己、可野邦行、青木淳賢
2. 発表標題 リン脂質sn-1位脂肪酸導入酵素としてのLPEAT2の生化学的性状解析
3. 学会等名 第93回生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川名裕己、小澤雅也、柴田剛明、佐藤悠喜飛、可野邦行、青木淳賢
2. 発表標題 リン脂質sn-1位代謝機構による細胞機能の制御
3. 学会等名 第93回生化学会大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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