

機関番号：12601
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21770133
 研究課題名 (和文) ホスファチジルイノシトールの特異的脂肪酸組成の生物学的意義の解明
 研究課題名 (英文) Physiological significance of the fatty acid composition in phosphatidylinositol
 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 (和文)：生体膜を構成するホスファチジルイノシトール (PI) は特徴的な構造を持ち、その大部分は *sn*-1 位にステアリン酸、*sn*-2 位にアラキドン酸を有する。しかしながらその生物学的意義は不明である。本研究において我々は、線虫遺伝学とリポドミクスを組み合わせることにより、PI の *sn*-1 位の脂肪酸組成を規定する脂肪酸転移酵素として LYCAT/ACL-8, 9, 10 を同定することに成功した。欠損個体を用いた解析から、PI の特徴的な脂肪酸分子種が幹細胞の非対称分裂に重要であることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：Phosphatidylinositol (PI), an important constituent of membranes, contains stearic acid as the major fatty acid at the *sn*-1 position. This fatty acid is thought to be incorporated into PI through fatty acid remodeling by sequential deacylation and reacylation. However, the genes responsible for the reaction are unknown, and consequently, the physiological significance of the *sn*-1 fatty acid remains to be elucidated. Here, we identified *acl-8*, *acl-9*, *acl-10*, which are closely related to each other, and *ipla-1* as strong candidates for genes involved in fatty acid remodeling at the *sn*-1 position of PI. In both *ipla-1* mutants and *acl-8 acl-9 acl-10* triple mutants of *C. elegans*, the stearic acid content of PI is reduced and asymmetric division of stem cell-like epithelial cells is defective. The defects in asymmetric division of these mutants are suppressed by a mutation of the same genes involved in intracellular retrograde transport, suggesting that *ipla-1* and *acl* genes act in the same pathway. IPLA-1 and ACL-10 have phospholipase A₁ and acyltransferase activity, respectively, both of which recognize the *sn*-1 position of PI as their substrate. We propose that the *sn*-1 fatty acid of PI is determined by *ipla-1* and *acl-8*, *-9*, *-10* and crucial for asymmetric divisions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構

1. 研究開始当初の背景

ホスファチジルイノシトール (PI) は細胞の生存、増殖、遊走、細胞骨格制御、小胞輸

送など様々な生命現象に関与するリン脂質である。PI はグリセロール骨格の3位にイノシトール環を有しており、イノシトール環の

リン酸化により、PI 結合タンパク質の活性を時空間的に制御している。このような極性基の特性に加え、PI は脂肪酸鎖部分についても特徴的な構造を持つことが古くから知られている。生体膜を構成する他のリン脂質はグリセロール骨格の1位と2位に様々な脂肪酸が結合しており、その組み合わせにより多様な分子種が存在するが、PI に関しては1位にステアリン酸 (18:0)、2位にアラキドン酸 (20:4) を持つ分子種がほとんどであり、この脂肪酸組成の特異性は種を超えて保存されている。この特徴的な脂肪酸組成は、リン脂質がいったん生合成された後、脂肪酸鎖のみが置き換わる「リモデリング反応」により形成されると考えられている。しかしながら、本活性は膜結合性でかつ微量にしか存在しないことから、その分子実体は不明であり、また、PI にはなぜ特異的な脂肪酸分子種が必要なのか、その破綻がどのような異常や病態を招くのかという問題も解明されていなかった。

2. 研究の目的

PI の特徴的な脂肪酸組成を規定する分子群を同定し、その欠損個体の表現型を解析することで、特徴的な脂肪酸組成の生物学的意義を明らかにする。

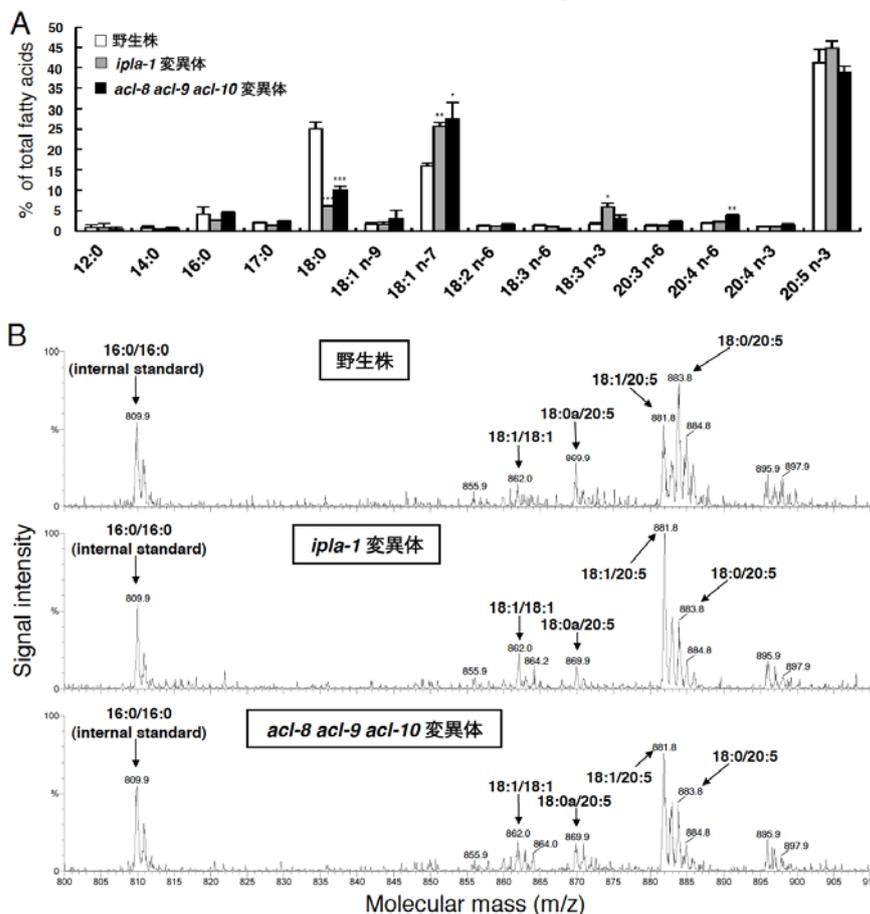
3. 研究の方法

我々は脂質代謝に関連すると予想される分子について、線虫 *C. elegans* の変異体ライブラリーを樹立している。この変異体ライブラリーの脂質メタボローム解析を行うことで、当該分子の担う脂質代謝における位置づけを推測する。さらに、変異体の表現型を詳細に比較することで遺伝学的に同じパスウェイで機能する分子を特定する。以上の手法を用いて、PI の脂肪酸リモデリングに関わる酵素群を同定する。

4. 研究成果

(1) *ipla-1* 変異体および *acl-8 acl-9 acl-10* 三重変異体はPIにおけるステアリン酸 (18:0) の割合が減少する

我々はこれまで、細胞内型ホスホリパーゼ A₁ (*ipla-1*) の機能解析を行っており、本酵素が線虫において上皮系幹細胞 (seam 細胞) の非対称分裂を制御していることを見出している (Kanamori *et al*, *EMBO J*, 2008)。この現象にどのようなリン脂質代謝が関与するかを調べるため、*ipla-1* 変異体の脂質メタボローム解析を行ったところ、*ipla-1* 変異体では PI の脂肪酸分子種が顕著に変化していることが分かった。線虫における PI の主要な分子種は、sn-1 位は哺乳動物と同様に 18:0 であるが、sn-2 位にはアラキドン酸



【図1】

ipla-1 変異体と *acl-8 acl-9 acl-10* 変異体は同様の PI の脂肪酸組成を持つ。

(A) ガスクロマトグラフィーによる PI に結合する脂肪酸量の定量。

(B) マスペクトロメトリーによる PI の脂肪酸分子種の解析。

(20:4)ではなくEPA(20:5)が結合している。*ipla-1*変異体では18:0/20:5のPI分子種が減少し、代わりに18:1/20:5PIが増加していた(図1B)。さらに、PIに結合した脂肪酸量を定量したところ、*ipla-1*変異体では18:0の割合が減少しており、代わりに18:1が増加していた(図1A)。PIの*sn-2*位の主要な脂肪酸である20:5に関しては変化が見られていない。このことから、*ipla-1*変異体ではPIの*sn-1*位の脂肪酸が18:0から18:1へ入れ替わっていることが明らかになった。

一方、脂質関連分子群の線虫欠損変異体を網羅的に解析したところ、互いに高い相同性を有する*acl-8*, *acl-9*, *acl-10*の三重変異体が*ipla-1*変異体と非常に類似した表現型を示すことを見出した(後述)。そこで、*acl-8 acl-9 acl-10*三重変異体のメタボローム解析を行ったところ、*acl-8 acl-9 acl-10*変異体は*ipla-1*変異体と同様に、PIの*sn-1*位の脂肪酸鎖が18:0から18:1に入れ替わっていることが分かった(図1)。*ipla-1*変異体、*acl-8 acl-9 acl-10*変異体ではいずれも、PI以外のリン脂質であるPCやPE、PSの脂肪酸組成には大きな変化は見られていない。以上の結果から、*ipla-1*ならびに*acl-8*, *-9*, *-10*はPIの*sn-1*位の脂肪酸組成を規定する分子であることが明らかになった。*ipla-1*および*acl-10*の遺伝子産物はそれぞれ*in vitro*において、PIに対するホスホリパーゼA₁活性、LysoPIに対する脂肪酸転移活性を有していたことから、*ipla-1*および*acl-8*, *-9*, *-10*がPIの*sn-1*位の脂肪酸リモデリングを担っており、PIの*sn-1*位に18:0を導入していると考えられる。

(2) *acl-8 acl-9 acl-10*変異体は*ipla-1*変異体と類似した表現型を示す

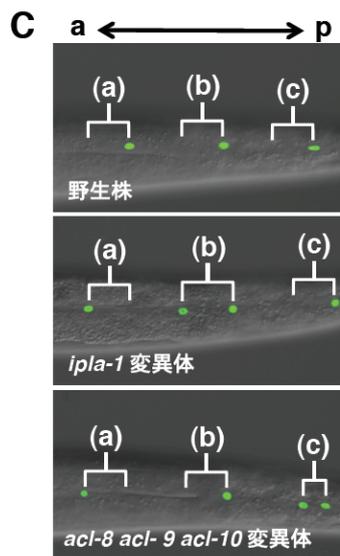
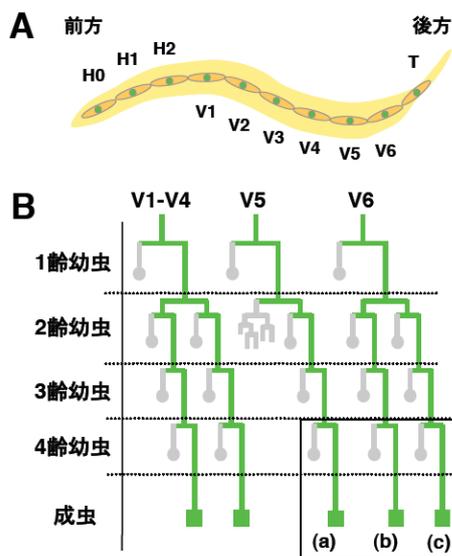
我々はこれまで、*ipla-1*変異体が上皮系

幹細胞であるseam細胞の非対称分裂に異常を示すことを明らかにしている。Seam細胞は線虫の側面に並ぶ上皮細胞で、胚発生後も分裂を続け、幹細胞様の分裂パターンを示す

(図2A, B)。野生株においてseam細胞は線虫の前後軸と平行に分裂し、前側の娘細胞は分化してseam細胞の性質を失うが、後ろ側の娘細胞はseam細胞の運命を維持する(図2C)。一方、*ipla-1*変異体ではseam細胞が分裂した後、前側の娘細胞がseam細胞としての運命をたどるものや、両方の娘細胞がseam細胞になるものが観察された(図2C)。*acl-8 acl-9 acl-10*変異体を同様に解析したところ、*acl-8 acl-9 acl-10*変異体でも同様に、seam細胞の非対称分裂に異常が観察された(図2C)。我々はさらに*ipla-1*変異体、*acl-8 acl-9 acl-10*変異体の非対称分裂の異常が共に、逆行性小胞輸送を制御する分子(*tbc-3*/RabGAP、*mon-2*/ArfGEF-like)の変異によって回復することを見出している。以上の結果から、*ipla-1*変異体および*acl-8 acl-9 acl-10*変異体における異常は、逆行性小胞輸送を介する同様の分子機構で生じていると考えられる。

(3) まとめと展望

本研究において我々は、PIの*sn-1*位の脂肪酸組成を規定する分子として、*ipla-1*(ホスホリパーゼA₁)と*acl-8*, *-9*, *-10*(脂肪酸転移酵素)を同定することに成功した。1) *ipla-1*変異体と*acl-8 acl-9 acl-10*変異体はPIの*sn-1*位の脂肪酸組成において同様の変動が見られること、2) *ipla-1*変異体と*acl-8 acl-9 acl-10*変異体は共にseam細胞の非対称分裂に異常が生じること、3) これらのseam細胞の異常は共に同じ遺伝子(*tbc-3*あるいは*mon-2*)の変異によって抑圧されることから、*ipla-1*と*acl-8*, *-9*, *-10*は協調的にPIの*sn-1*位の脂肪酸リモデリン



【図2】

(A)seam細胞の模式図。(B)seam細胞の細胞系譜。seam細胞は前後軸に沿って分裂した後、前側の娘細胞は分化してseam細胞の性質を失うが(灰色)、後ろ側の娘細胞はseam細胞の運命を維持する(緑)。(C)seam細胞の核にGFPを発現するトランスジェニック体。Bの四角で囲った(a), (b), (c)の分裂パターンを示す。*ipla-1*変異体や*acl-8 acl-9 acl-10*変異体では分裂後の細胞運命決定に異常が見られる。a: anterior, p: posterior

グに関与し (図3)、この脂肪酸リモデリングにより生じるPIの脂肪酸組成が非対称分裂の獲得に重要な役割を果たすことが予想される。

最近、線虫受精卵の分裂過程において PIPs 産生酵素 (PI (4)P5-kinase) が母細胞内で非対称に局在することが報告されており、非対称分裂における PIPs の重要性が示唆されている。一方で、PIP_s は各オルガネラ膜で特徴的な分布を示し、PIP_s の偏在性が小胞輸送の重要な制御基盤であることが明らかにされている。「*ipla-1*、*acl-8*、*-9*、*-10* 欠損によるPIの脂肪酸組成の変動」、「seam細胞の非対称分裂異常」、「逆行性小胞輸送」の関連は現時点では不明であるが、PIの脂肪酸組成の変動が何らかのPIP_sの代謝に影響を及ぼし、小胞輸送系に異常が生じた結果、非対称分裂の異常が引き起こされるのではないかと考えられる。本研究は、生体膜リン脂質の *sn-1* 位の脂肪酸リモデリングの分子実体を初めて提唱するものであり、また、PIの脂肪酸構造と小胞輸送、非対称分裂の関連を初めて示すものである。今後、異常発症のメカニズムを分子レベルで解析することにより、なぜPIの *sn-1* 位に 18:0 を含む分子種が多いのか、その生物学的意義が明らかになるものと期待される。

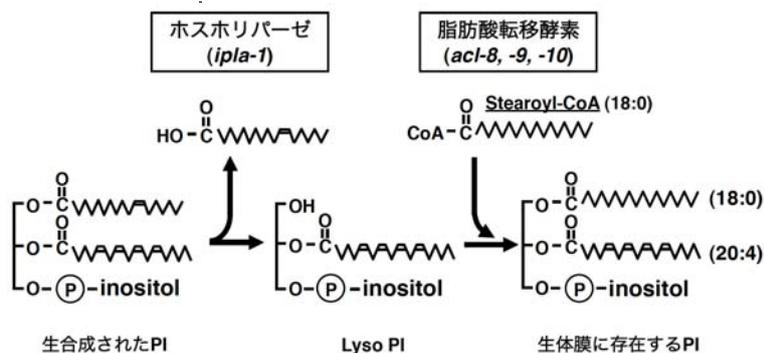
5. 主な発表論文等

(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7件)

1. Intracellular PLA1 and Acyltransferase, Which Are Involved in *Caenorhabditis elegans* Stem Cell Divisions, Determine the *sn-1* fatty acyl Chain of Phosphatidylinositol
Imae R., Inoue T., Kimura M., Kanamori T., H. Tomioka N., Kage-Nakadai E., Mitani S. and Arai H.
Mol. Biol. Cell, 21, 3114-3124 (2010)

2. Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response
Ariyama H., Kono N., Matsuda S., Inoue T. and Arai H.
J. Biol. Chem., 221, 87-95 (2010)



【図3】PIの *sn-1* 位の脂肪酸リモデリング

[学会発表] (計42件)

- Inoue T., Arai H.
「Identification of enzymes which determine the fatty acid composition of phosphatidylinositol」
BMB2010 (2010, 12/7-10, Hyogo)
- Inoue T., Arai H.
「Functional analysis of membrane lipids using *C. elegans*」
The 32th symposium on the Drugs-Membranes Interaction (2010, 11/29-30, Toyama)
- Inoue T., Imae R., Arai H.
「Intracellular PLA1 and acyltransferase, which are involved in *C. elegans* stem cell divisions, determine the *sn-1* fatty acyl chain of phosphatidylinositol」
FASEB Summer Research Conference Phospholipid Metabolism: Disease, Signal Transduction, and Membrane Dynamics (2010, 6/27-7/2, Colorado)
- Inoue T., Arai H.
「Comprehensive analysis of enzymes involved in phospholipid fatty acid remodeling」
The 52th Japanese Conference on the Biochemistry of Lipids (2010, 6/14-15, Gunma)
- Inoue T., Arai H.
「 β -catenin asymmetry is regulated by PLA₁ and retrograde traffic in *C. elegans* stem cell divisions」
11th International Conference Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases (2009, 10/25-28, Cancun Mexico)

6. Inoue T., Arai H.
「Comprehensive analysis of phospholipid
acyltransferases」
The 82th Annual Meeting of the Japanese
Biochemical Society (2009, 10/21-24,
Hyogo)

〔図書〕(計3件)

「ホスファチシルイノシトールの脂肪酸組
成を規定する酵素群の同定」

井上 貴雄, 新井 洋由

実験医学, Vol. 28, No. 20, 3306-3313
(2010)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~eisei/jp/Members.html>

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