

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890254

研究課題名（和文）膜結合型カルシウム非依存性ホスホリパーゼ A₂ (iPLA₂γ) の生体機能の解析研究課題名（英文）Analysis of membrane-associated calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂γ) *in vivo*.

研究代表者

依田 恵美子 (YODA EMIKO)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：60527183

研究成果の概要（和文）：本研究では、機能が明らかになっていない iPLA₂γ について、その遺伝子欠損マウスの解析を行い、iPLA₂γ の生体内の機能を明らかにすることを目指した。その結果、iPLA₂γ 欠損マウスは通常飼育下において、成長遅延、筋力低下など外見上明白な表現型を示すことが明らかとなった。さらに、欠損マウスの筋肉組織中で、ミトコンドリアの主要構成脂質であるカルジオリピンや、その他のリン脂質が変化していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed about iPLA₂γ gene knockout mice to investigate that the function of iPLA₂γ *in vivo*. We found that iPLA₂γ knockout mice showed remarkable phenotypes, growth retardation and muscle weakness. We further found that compositions of cardiolipin, a critical mitochondrial phospholipid, and other phospholipid subclasses were altered.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010 年度	970,000	291,000	1,261,000
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

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：脂質、ホスホリパーゼ A₂、ミトコンドリア、筋肉組織、血小板、脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

細胞膜の主要な構成脂質であるグリセロリン脂質を分解する酵素、ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) 群には、多数の分子種が存在している。PLA₂ は脂質の分解という作用を介して発熱、疼痛、癌細胞増殖など様々な作用を示す生理活性脂質の産生に関与している。その PLA₂ 群の分子種の 1 つである iPLA₂γ は解析がすすんでおらず、その機能は不明であった。そこで、iPLA₂γ の遺伝子を欠損したマウスを用いて解析することにより、iPLA₂γ の機能を解明することを目指した。

2. 研究の目的

iPLA₂γ の遺伝子改変マウスを用いて、

iPLA₂γ の生体内機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、野生型マウスと iPLA₂γ 遺伝子欠損マウスを用いてそれぞれを比較することにより解析を行った。

①それぞれのマウスの筋肉、心臓から遠心分離法によりミトコンドリアを単離し、呼吸活性を測定した。

②マウスの筋肉組織、心臓より総脂質を Bligh&Dyer 法によって抽出した。その後、シリカゲル板を用いた薄層クロマトグラフィーによりリン脂質分子種を分離し、それぞれに分離したスポット上にある脂質を抽出

し、モリブデン酸法によってリン脂質量を定量した。

さらに、総脂質をエレクトロスプレーイオン化質量分析計(ESI-MS)によってどのような脂肪酸組成のリン脂質が変化しているか検討した。

③筋肉組織中の酸化脂質量を ELISA により定量した。さらに、酸化ストレスにより発現が誘導されることが知られている、遺伝子をリアルタイム PCR 法により定量した。

④受精後 13.5 日目の胎児(野生型と欠損マウス)から初代培養繊維芽細胞を調製し、脂肪細胞へ分化誘導し、分化後の脂肪細胞をオイルレッド O により染色した後、染色陽性の細胞を数えた。

4. 研究成果

① ミトコンドリアの呼吸活性は、野生型に比べて欠損マウスで有意に低下したことから、欠損マウスの組織中ではミトコンドリア機能が低下していることが示唆された。

② 欠損マウスの筋肉および心臓ではカルジオリピン量が野生型のものに比べて有意に減少していた。一方、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン量などは野生型と欠損マウスで有意な差は認められなかった。このことから、iPLA_{2γ}はカルジオリピンの恒常性の維持に参与している可能性が考えられた。

さらに、ESI-MS の結果では、長鎖不飽和脂肪酸を含むホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンが欠損マウスで減少していた。これは、活性酸素を多く含むミトコンドリアの機能低下、構造異常が生じたために、ミトコンドリアから活性酸素が漏出し、この活性酸素により 2 重結合を多く含む長鎖不飽和脂肪酸が酸化された可能性が考えられた。

③活性酸素が漏出しているかを確かめるために、酸化脂質を定量したところ、欠損マウスで有意に酸化脂質が増加していた。また、酸化ストレスで発現が誘導される遺伝子の発現を検討したところ、欠損マウスで有意な増加が認められた。このことから、欠損マウスの組織中では、活性酸素が多い可能性が示唆された。

④欠損マウスは体重が野生型に比べて非常に軽いこと、脂肪組織の重量が少ないことなどが認められていた。そこで、脂肪細胞における蓄積や脂肪細胞への分化能などが欠損マウスでどのようになっているのか検討するために、マウスの胎児より繊維芽細胞を調製し、脂肪細胞への分化能を検討した。その結果、欠損マウスから調整した繊維芽細胞は、脂肪細胞への分化能、脂肪の蓄積が低下していることが明らかとなった。

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 1 件)

Yoda, E., Hachisu, K., Taketomi, Y., Yoshida, K., Nakamura, M., Ikeda, K., Taguchi, R., Nakatani, Y., Kuwata, H., Murakami, M., Kudo, I., and Hara, S. Mitochondrial dysfunction and reduced prostaglandin synthesis in skeletal muscle of group VIB Ca²⁺-independent phospholipase A₂ (iPLA_{2γ}) deficient mice.

J. Lipid Res. (2010) **51**, 3003-3015

[学会発表] (計 17 件)

国際学会

1. [4th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators (PLM2009) 2009/5/27 東京]

Analysis of group VIB Ca²⁺-independent phospholipase A₂ (iPLA_{2γ})-deficient mice

依田 恵美子, 鉢須 桂子、武富 芳隆、村上 誠、工藤 一郎、原 俊太郎

2. [50th International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL2009)] 2009/9/4 ドイツ・レーゲンスブルグ

Skeletal muscle weakness and atrophy in membrane-associated calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA_{2γ})-deficient mice

依田 恵美子, 鉢須 桂子、武富 芳隆、原 俊太郎

国内学会

1. [第 51 回日本脂質生化学会 2009/7/31 名古屋]

膜結合型カルシウム非依存性ホスホリパーゼ A₂(iPLA_{2γ})の生体機能解析

依田 恵美子, 鉢須 桂子、武富 芳隆、原 俊太郎

2. [第 82 回日本生化学会大会 2009/10/22 神戸]

脂肪組織における膜結合型 Ca²⁺非依存性ホスホリパーゼ A₂(iPLA_{2γ})の機能解析

依田 恵美子, 鉢須 桂子、武富 芳隆、原 俊太郎

3. [第 82 回日本生化学会大会 2009/10/22 神戸]

血小板機能活性化における膜結合型 Ca²⁺非依存性ホスホリパーゼ A₂(iPLA_{2γ})の関与の解析

頼 幸良、依田 恵美子、村上 誠、原 俊太郎

4. [フォーラム 2009: 衛生薬学・環境トキシ

- コロジー 2009/11/6 宜野湾市]
血小板機能活性化における膜結合型
Ca²⁺非依存性ホスホリパーゼ
A₂(iPLA₂γ)の関与の解析
頼 幸良、依田 恵美子、村上 誠、原
俊太郎
5. [第8回次世代を担う若手ファーマ・バイ
オフォーラム 2009 2009/11/14 名古屋
]
血小板機能活性化における膜結合型
Ca²⁺非依存性ホスホリパーゼ
A₂(iPLA₂γ)の関与の解析
頼 幸良、依田 恵美子、村上 誠、原
俊太郎
6. [日本薬学会第130年会 2010/3/28 岡
山]
脂肪組織における膜結合型カルシウム非
依存性ホスホリパーゼ A₂ (iPLA₂γ)
の解析
依田 恵美子、鉢須 桂子、武富 芳隆、
原 俊太郎
7. [日本薬学会第130年会 2010/3/30 岡
山]
血小板機能活性化における膜結合型
Ca²⁺非依存性ホスホリパーゼ
A₂(iPLA₂γ)の関与の解析
頼 幸良、依田 恵美子、村上 誠、原
俊太郎
8. [第52回日本脂質生化学会 2010/6/14
伊香保]
血小板における VIB 型 Ca²⁺非依存性ホ
スホリパーゼ A₂ (iPLA₂γ)の解析
依田 恵美子、頼 幸良、小川 麻衣、
鈴木 英紀、村上 誠、原 俊太郎
9. [第52回日本脂質生化学会 2010/6/14
伊香保]
細胞内ホスホリパーゼ A₂ による走化性
因子産生の制御
桑田 浩、原田 和佳、譲原 千尋、滝 雄
貴、依田 恵美子、中谷 良人、原 俊太郎
10. [フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシ
コロジー 2010/9/9 東京]
膜結合型カルシウム非依存性ホスホリパ
ーゼ A₂γ(iPLA₂γ)は血栓形成に関わる
小川 麻衣、頼 幸良、依田 恵美子、
原 俊太郎
11. [第54回日本薬学会関東支部大会
2010/10/2 東京]
膜結合型カルシウム非依存性ホスホリパ
ーゼ A₂γ(iPLA₂γ)は血栓形成に関わる
小川 麻衣、頼 幸良、依田 恵美子、
原 俊太郎
12. [第54回日本薬学会関東支部大会
2010/10/2 東京]
メチル水銀の神経毒性軽減因子としての
膜結合型カルシウム非依存性ホスホリパ
ーゼ A₂の機能解析

- 畠山 里美、佐々木 由香、依田 恵美子、
原 俊太郎
13. [第83回日本生化学会大会・第33回日本
分子生物学会年会合同大会(BMB2010)
2010/12/7 神戸]
Increased bleeding tendency and
decreased susceptibility to
thromboembolism in mice lacking
membrane-associated
Ca²⁺-independent phospholipase A₂
(iPLA₂γ)
Emiko Yoda, Kohmi Rai, Mai Ogawa,
Makiko Kawai, Akiko Kudo, Hidenori
Suzuki, Makoto Murakami, Shuntaro
Hara
14. [第83回日本生化学会大会・第33回日本
分子生物学会年会合同大会(BMB2010)
2010/12/7 神戸]
細胞内ホスホリパーゼ A₂ 依存的なケモ
カイン発現誘導機構
原田 和佳、木下 夏海、桑田 浩、依
田 恵美子、原 俊太郎
15. [日本薬学会第131年会 2011/3/30 静
岡]
細胞内ホスホリパーゼ A₂ 依存的なケモ
カイン発現誘導機構
原田 和佳、木下 夏海、桑田 浩、依
田 恵美子、原 俊太郎

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

依田 恵美子 (YODA EMIKO)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：60527183

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：