

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617004

研究課題名(和文) 必須脂肪酸欠乏で増加するミード酸およびその代謝物の機能解析

研究課題名(英文) Function analysis of Mead acid and its metabolism in essential fatty acid deficiency state

研究代表者

市 育代 (ICHI, Ikuyo)

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・講師

研究者番号：50403316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物において、必須脂肪酸が欠乏するとミード酸という特殊な脂肪酸が産生されることが知られている。しかし、その産生遺伝子や経路を詳細に検討した報告はない。そこで、必須脂肪酸欠乏状態にある培養細胞を用いて、siRNAによる脂肪酸合成酵素の遺伝子発現抑制を行い、産生遺伝子と経路の同定を行った。ミード酸はオレイン酸からFads1, Fads2, Elovl5という遺伝子によって、2通りの経路で産生されることが明らかとなった。また、ミード酸はホスファチジルイノシトール(PI)というリン脂質において増加が顕著であったことから、必須脂肪酸欠乏時のPIにおけるミード酸の重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In mammals, 5,8,11-eicosatrienoic acid (Mead acid, 20:3n-9) is synthesized from oleic acid during a state of essential fatty acid deficiency (EFAD). Mead acid is thought to be produced by the same enzymes that synthesize arachidonic acid and eicosapentaenoic acid, but the genes and the pathway involved in the conversion of oleic acid to Mead acid have not been fully elucidated. In this study, we found that the cultured cell, such as NIH3T3 cells, had significant levels of Mead acid, indicating that cells in culture are in an EFAD state under normal culture conditions. We then examined the effect of siRNA-mediated knockdown of fatty acid desaturases and elongases on the level of Mead acid, and found that knockdown of Elovl5, Fads1, or Fads2 decreased the level of Mead acid. This and the measured levels of possible intermediate products for the synthesis of Mead acid such as 18:2n-9, 20:1n-9 and 20:2n-9 in the knocked down cells indicate two pathways for the synthesis of Mead acid.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：食生活学

キーワード：必須脂肪酸 多価不飽和脂肪酸 脂肪酸合成酵素

1. 研究開始当初の背景

必須脂肪酸は生体膜の構成成分であるだけでなく、生体の恒常性維持にも重要な物質であることから、必須脂肪酸欠乏が欠乏すると、成長遅延や皮膚障害、不妊などの症状がみられる。哺乳動物では、必須脂肪酸である n-6 系多価不飽和脂肪酸のリノール酸 (18:2n-6) からアラキドン酸 (20:4n-6)、n-3 系多価不飽和脂肪酸の α -リノレン酸 (18:3n-3) からエイコサペンタエン酸 (EPA; 20:5n-3) が産生される。これには、不飽和化酵素 Fads1, 2 の 2 回の不飽和化反応と、鎖長伸長酵素 Elovl5 の 1 回の鎖長伸長反応が必要である。これらの不飽和脂肪酸から産生される生理活性脂質は、多くの生理機能を持ち、生体の恒常性維持だけでなく、様々な疾患に関わっていることが明らかになってきている。

哺乳動物では必須脂肪酸が欠乏すると、皮膚障害や生殖機能の異常などがみられるが、同時にミード酸 (20:3n-9) という通常は殆ど存在しない脂肪酸が産生されることが知られている。ミード酸は炭素数が 20 で、3 つの二重結合をもつ脂肪酸で、必須脂肪酸が欠乏すると、オレイン酸 (18:1n-9) に対して 2 回の不飽和化反応と、1 回の鎖長伸長反応が行われることで産生されると考えられていることから、必須脂肪酸欠乏時のミード酸は、アラキドン酸や EPA が産生されるのと同様の遺伝子で産生されると考えられている。しかし、産生遺伝子やその経路を詳細に検討した報告はない。また、必須脂肪酸欠乏時に産生されるミード酸が、生体においてどのような役割をもっているかについても、ほとんど知られていない。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子学的手法を用いて、必須脂肪酸欠乏時に産生されるミード酸の産生遺伝子とその経路を明らかにする。また、必須脂肪酸欠乏時にオレイン酸からミード酸が産生される意義についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 必須脂肪酸欠乏マウスの作成

8 週齢の C57BL/6J マウスに、10%大豆油食 (普通食マウス)、または無脂肪食 (必須脂肪酸欠乏マウス) を 4 週間与えた。マウスは自由接餌、自由飲水にて飼育を行った。

(2) siRNA による遺伝子発現抑制

マウス繊維芽 NIH3T3 細胞は、6-well dish に 1×10^5 cells 播種した。70%コンフルエントの後、Lipofectamine RNAiMAX にて、siRNA を導入し、72 時間後に細胞を回収した。脂肪酸合成酵素について、不飽和化酵素 Fads1, 2, 鎖長伸長酵素 Elovl1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 について、遺伝子発現抑制を行った。

(3) GC-MS による脂質解析

細胞はメタノールで回収し、脂質抽出を行った。その後、メチルエステル化を行い、GC-MS (GC/MS QP2010, Shimadzu) にて脂肪酸の解析を行った。

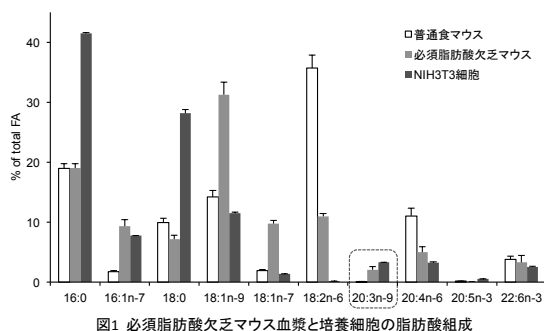
(4) 鎖長伸長活性の測定

NIH3T3 細胞から膜タンパク質を抽出し、18:1n-9-CoA または 18:2n-6-CoA と、 $[^{14}C]$ malonyl-CoA を加え、37°C で反応させた。その後、ケン化を行い、脂質を抽出後、液体シンチレーションカウンターで反応生成物を測定した。

4. 研究成果

(1) 必須脂肪酸欠乏状態にある培養細胞を用いたミード酸の産生遺伝子の同定

4 週間の無脂肪食を与えた必須脂肪酸欠乏マウスの血漿には 3% 程度のミード酸が存在していた。また、細胞播種 72 時間後の NIH3T3 細胞でも、必須脂肪酸欠乏マウスと同程度のミード酸が存在していた (図 1)。この結果より、NIH3T3 細胞は必須脂肪酸欠乏状態にあることが分かった。



次に、必須脂肪酸欠乏状態にある NIH3T3 細胞を用いて、脂肪酸不飽和化酵素および鎖長伸長酵素の発現抑制を行うことで、ミード酸の産生遺伝子の同定を行った。マウスの脂肪酸合成酵素について、脂肪酸不飽和化酵素は Fads1, 2, 3、鎖長伸長酵素は Elovl1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 がある。そこで、これらの全ての遺伝子において siRNA による遺伝子発現抑制を行った。その結果、不飽和化酵素では Fads1, 2、鎖長伸張酵素では Elovl5 の発現抑制により、ミード酸の産生が有意に減少した。

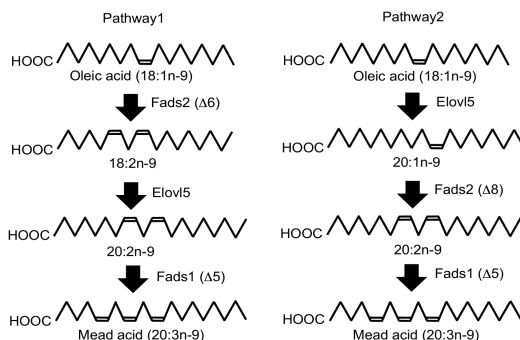


図2 オレイン酸からミード酸の産生経路

これらの結果より、オレイン酸 (18:1n-9) からミード酸の産生遺伝子は Fads1, 2, Elovl5 であることが明らかとなり、図 2 のような 2 通りの経路によって産生されることが予想された。

(2) ミード酸の産生経路の解明

図 2 の 2 通りの経路によって、ミード酸が産生されているかを明らかにするため、NIH3T3 細胞に Fads1, 2 および Elovl5 の siRNA による発現抑制を行い、オレイン酸からミード酸の中間代謝物 (18:2n-9, 20:1n-9, 20:2n-9) の変化を調べることで産生経路の同定を行った (図 3)。

まず経路 1 について、Fads2 発現抑制時には 18:2n-9 が減少し、Elovl5 の発現抑制では 18:2n-9 は増加した。また、Elovl5 の発現抑制下で 20:2n-9 は減少し、Fads1 の発現抑制下で 20:2n-9 は増加したことから、経路 1 によってミード酸は産生されていることが証明できた。次に経路 2 について、Elovl5 の発現抑制で 20:1n-9 は減少し、Fads2 の発現抑制で 20:1n-9 が増加していたことから、経路 2 でもミード酸は産生されていることがわかった。これらの結果より、ミード酸は図 2 の経路で産生されていることが遺伝学的に証明できた。

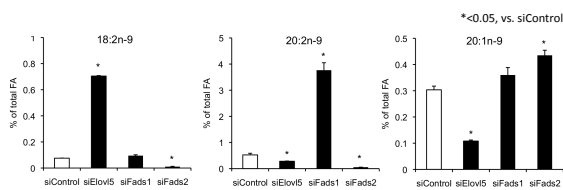


図3 ミード酸の産生遺伝子の発現抑制による中間物質の変化

(3) Elovl5 の 18:1n-9 に対する基質特異性

ミード酸の産生遺伝子である Elovl5 の鎖長伸長活性について、多価不飽和脂肪酸に対する活性は知られているが、一価不飽和脂肪酸である 18:1n-9 に対する活性は知られていない。そこで、必須脂肪酸欠乏状態にある NIH3T3 細胞を用いて、Elovl5 の 18:1n-9 に対する伸長活性について調べた。まず、NIH3T3 細胞において、¹⁴C malonyl-CoA と反応させ、18:2n-6 に対する伸長活性を検討したところ、Elovl5 の 18:2n-6 に対する伸長活性は確認でき、その活性は Elovl5 の siRNA によって減少した (図 4)。そこで、18:1n-9 に対する伸長活性を調べたところ、Elovl5 は 18:1n-9 に対しても伸長活性を有しており、その活性は Elovl5 の発現抑制で減少した (図 4)。これらの結果より、Elovl5 は 18:1n-9 に対しても伸長活性を持つことが酵素学的にも証明でき、ミード酸はオレイン酸から、2 とおりの経路で産生されていることが明らかとなった。

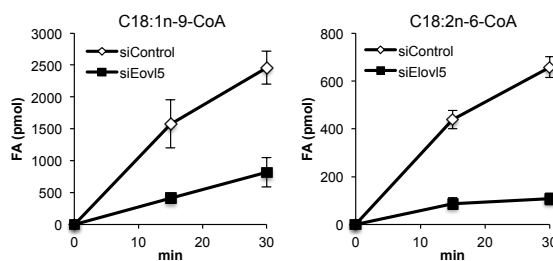


図4 Elovl5の基質特異性

(4) マウスにおけるミード酸産生経路の確認

培養細胞だけでなく、マウスでもミード酸の産生経路が存在するかを明らかにするため、必須脂肪酸欠乏マウスの肝臓においてオレイン酸からミード酸の中間物質が存在するか調べた。その結果、普通食マウスおよび必須脂肪酸欠乏マウスにおいて、18:2n-9 や 20:1n-9, 20:2n-9 は存在しており、これらの中間物質は必須脂肪酸欠乏マウスで有意に増加していることが確認できた。このことから、マウスにおいてもこれらの経路が存在していることがわかった (図 5)。

また、必須脂肪酸欠乏時には産生遺伝子の Fads1, 2, Elovl5 などの遺伝子発現も増加していたことから、必須脂肪酸欠乏マウスでは遺伝子レベルでミード酸の産生が亢進していることが確認できた (図 5)。

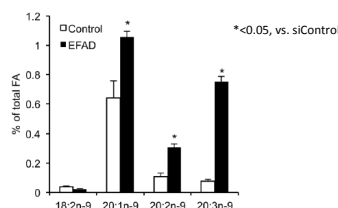


図5 必須脂肪酸欠乏マウスの肝臓における中間物質と産生遺伝子の変化

(5) 必須脂肪酸欠乏時にミード酸が産生される意義

多価不飽和脂肪酸の多くはリン脂質の sn-2 位に存在することが知られている。そこで、必須脂肪酸状態にある培養細胞および必須脂肪酸欠乏マウスの肝臓における各リン脂質のミード酸の分布の違いを調べた。その結果、培養細胞とマウスの血漿や肝臓ともに、ミード酸はリン脂質の中で、ホスファチジルイノシトール (PI) に圧倒的に多く分布していた (図 6)。

PI の脂肪酸組成は、他のリン脂質の中でも特徴的で、sn-2 位に結合している多価不飽和脂肪酸のほとんどがアラキドン酸 (20:4n-6) である。アラキドン酸とミード酸はともに、Δ5 位に二重結合をもつ多価不飽和脂肪酸で

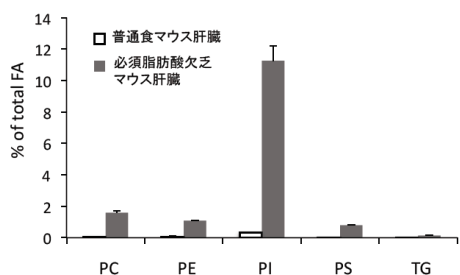


図6 各リン脂質におけるミード酸の分布

ある。最近、PIのsn-2位には $\Delta 5$ 位に二重結合をもつ脂肪酸が結合しやすいということが示唆されている。したがって、PIにおいてミード酸の分子種が多い理由として、必須脂肪酸欠乏によって減少したアラキドン酸の代わりに、ミード酸がPIに結合した可能性が考えられる。これらの結果より、必須脂肪酸欠乏時のミードの役割として、PIにおいてアラキドン酸の代用をしている可能性が考えられた。PIは細胞膜の構成成分であるだけでなく、シグナル伝達のセカンドメッセンジャー産生に関わっている。また様々なたんぱく質と結合して、細胞膜に局在させる働きを持っている。したがって、必須脂肪酸欠乏時におけるPIの脂肪酸鎖の顕著な変化は、必須脂肪酸欠乏でみられる症状の発症に関わっている可能性もある。したがって、今後、PIにおけるミード酸の増加が生体に及ぼす影響についても明らかにしたい。

本研究より、必須脂肪酸欠乏時に産生されるミード酸の産生遺伝子とその経路を明確にすることができた。また、必須脂肪酸欠乏時のミード酸については、PIにおける増加が顕著であったことから、その意義についても今後明らかにしていきたい。

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 11 件)

- ① I. Ichi, N. Kono, Y. Arita, S. Haga, K. Arisawa, M. Yamano, M. Nagase, Y. Fujiwara, H. Arai, Identification of genes and pathways involved in the synthesis of Mead acid (20:3n-9), an indicator of essential fatty acid deficiency, *Biochim. Biophys. Acta. - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1841**, 204-13, 2014, DOI: 10.1016/j.bbalip.2013.10.013. 査読有
- ② Y. Sone, R. Hirasawa, I. Ichi, T. Ishikawa, S. Kodama, H. Sone, S. Egawa, K. Kawahara, Y. Otsuka, Y. Fujiwara, Efficacy of Habitual Exercise for Improving Lipid Profiles Depends on the PPAR γ Genotype in Japanese Males. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **60**, 66-70, 2014, 査読有
- ③ O. Udagawa, C. Ito, N. Ogonuki,; H. Sato, S.

- Lee, T. Pearlta, I. Ichi, Y. Uchida, T. Nishimura, M. Murakami, A. Ogura, T. Inoue, K. Toshimori, H. Arai, Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking ORP4, a sterol-binding protein in the OSBP-related protein family. *Gene to cells*, **19**, 13-27, 2014, 10.1111/gtc.12105, 査読有
- ④ Y. Sone, R. Hirasawa, I. Ichi, T. Ishikawa, S. Kodama, H. Sone, S. Egawa, K. Kawahara, Y. Otsuka, Y. Fujiwara, Efficacy of habitual exercise for improving lipid profiles depends on the PPAR γ genotype in Japanese males. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **60**, 66-70, 2014, 査読有
- ⑤ K. Arisawa, I. Ichi*, Y. Yasukawa, Y. Sone, Y. Fujiwara, Changes in the phospholipid fatty acid composition of the lipid droplet during the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J. Biochem.*, **154**, 281-289, 2013, DOI: 10.1093/jb/mvt051, *Corresponding author, 査読有
- ⑥ Y. Takahashi, A. Shinoda, N. Furuya, E. Harada, N. Arimura, I. Ichi, Y. Fujiwara, J. Inoue, R. Sato, Perilipin-mediated lipid droplet formation in adipocytes promotes sterol regulatory element-binding protein-1 processing and triacylglyceride accumulation. *PLoS One*, **29**, e64605, 2013, DOI: 10.1371/journal.pone.0064605, 査読有
- ⑦ Y. Sone Y, T. Kido, T. Ainuki, M. Sonoda, I. Ichi, S. Kodama, H. Sone, K. Kondo, Y. Morita, S. Egawa, K. Kawahara, Y. Otsuka, Y. Fujiwara, Genetic variants of the fatty acid desaturase gene cluster are associated with plasma LDL cholesterol levels in Japanese males. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **59**, 325-335, 2013, 査読有
- ⑧ K. Tambo, T. Yamaguchi, K. Kobayashi, E. Terauchi, I. Ichi, S. Kojo, Racemization of the aspartic acid residue of amyloid- β peptide by a radical reaction. *Biosci Biotechnol Biochem*. **77**, 416-418, 2013, 査読有
- ⑨ T. Uyama, I. Ichi, N. Kono, A. Inoue, K. Tsuboi, XH. Jin, N. Araki, J. Aoki, H. Arai, N. Ueda, Regulation of peroxisomal lipid metabolism by the catalytic activity of the tumor suppressor H-rev107. *J. Biol. Chem.* **287**, 2706-2718, 2012, DOI: 10.1074/jbc.M111.267575, 査読有
- ⑩ K. Kiso, S. Ueno, M. Fukuda, I. Ichi, K. Kobayashi, T. Sakai, K. Fukui, and S. Kojo, The role of Kupffer cells in carbon tetrachloride intoxication in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 980-983, 2012, 査読有
- ⑪ K. Kobayashi, I. Ichi*, T. Nakagawa, C. Kamikawa, Y. Kitamura, E. Koga, Y. Washino, Y. Hoshinaga, S. Kojo*, Increase in plasma ceramide levels via secretory sphingomyelinase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Med.*

Chem. Comm., 2, 536-541, 2011, 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 有澤琴子、市 育代、吉田好美、藤原葉子、
日本農芸化学会 2014 大会「脂肪滴サイズ
による脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸鎖の違
い」(東京) 2014 年 3 月
- ② ○Ikuyo Ichi, Shizuka Haga, Kotoko Arisawa,
Misato Yamano, and Yoko Fujiwara, IUNS
20th International Congress of Nutrition,
“Identification of pathways involved in the
synthesis of increased fatty acid in essential
fatty acid deficiency”(スペイン) 2013 年 9 月
- ③ ○市 育代, 他 5 名、第 67 回日本栄養・食
糧学会大会「必須脂肪酸欠乏時における脂
肪酸代謝とリン脂質脂肪酸の変化」(名古屋)
2013 年 5 月
- ④ ○有澤琴子, 市 育代, 他 3 名、日本ビタミ
ン学会第 65 回大会「3T3-L1 脂肪細胞にお
ける脂肪滴膜リン脂質構成脂肪酸の特徴」
(東京) 2013 年 5 月
- ⑤ ○市 育代、脂溶性ビタミン研究会「必須
脂肪酸欠乏時にみられるミード酸の産生
遺伝子とその合成経路」(東京) 2012 年 3
月
- ⑥ ○市 育代, 他 2 名、第 66 回日本栄養・
食糧学会大会「必須脂肪酸欠乏で増加する
ミード酸 (20:3 n-9) 合成に関わる遺伝子」
(仙台) 2012 年 5 月
- ⑦ ○Ikuyo ichi, Shizuka Haga, Nozomu Kono,
Hiroyuki Arai, and Yoko Fujiwara, FASEB
2012 - Science Research Conferences:
Phospholipid Metabolism: Disease, Signal
Transduction, & Membrane Dynamics,
Saxtons River, Vermont (USA). “Identification
of genes and pathway involved in the synthesis
of Mead acid (20:3 n-9) in essential fatty acid
deficiency”(アメリカ) 2012 年 7 月
- ⑧ ○市 育代, 他 4 名、第 85 回日本生化学
会大会「必須脂肪酸欠乏時におけるミード

酸 (20:3n-9) の産生経路」(福岡) 2012
年 12 月

[図書] (計 4 件)

- ① 市 育代 (分担執筆), 他、医歯薬出版、ス
マート栄養管理-栄養とスポーツの管理が
重要であるこれだけの理由、2014、4
- ② 市 育代 (分担執筆), 他、アイ・ケイコー
ポレーション基礎生化学-健康・疾病との
つながり、2013、54
- ③ 市 育代 (分担執筆), 他、講談社、ビタミ
ンの新栄養学、2012
- ④ 市 育代 (分担執筆), 他、学文社、食物と
栄養学基礎シリーズ 7 基礎栄養学、2012、
78

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市 育代 (ICHI, Ikuyo)
お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科
科学研究科・講師
研究者番号: 50403316

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし