

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670032

研究課題名(和文)内因性GPC産生経路の解明とその代謝改善への応用

研究課題名(英文)Biological role of the endogenous GPC-producing pathway and its application to metabolic improvement

研究代表者

村上 誠 (MURAKAMI, Makoto)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・参事研究員

研究者番号：60276607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、機能未知のPLA2サブタイプであるPNPLA7がリゾホスファチジルコリン(LPC)グリセロホスホコリン(GPC)の代謝を担うリゾホスホリパーゼとして働くことを見出した。リゾホスホリパーゼは従来、細胞膜溶解性のLPCを消去する解毒酵素として認識されており、その実体やGPC産生酵素としての意義は着目されていなかった。本研究は、申請者が独自に樹立したPNPLA7欠損マウスを解析した。その結果、PNPLA7は膜リン脂質からのGPCの産生を通じて肝臓のコリン・メチオニン代謝を制御する重要な分子であることを明らかにした。本研究は、リゾホスホリパーゼの生理的意義を解明した初めてのものである。

研究成果の概要(英文)：Phospholipase A2s (PLA2s) hydrolyze the sn-2 position of phospholipids to generate fatty acids and lysophospholipids. PNPLA7, a member of the iPLA2 family, acts as a lysophospholipase, which catalyzes the conversion of lysophosphatidylcholine (LPC) to glycerophosphocholine (GPC). In this study, we analyzed PNPLA7-deficient mice to decipher the biological role of this particular lysophospholipase. We found that the hepatic choline-methionine metabolic pathway was markedly perturbed in PNPLA7-deficient mice, which displayed growth retardation, fatty liver-like vacuolation, reduction and browning of white adipose tissue, impairment of VLDL secretion, starvation-like responses such as increased serum FGF1 and ketone body levels, and early death. Our results highlight the biological importance of the lysophospholipase as a GPC-producing enzyme and that this pathway is crucial for proper maintenance of the hepatic choline-methionine cycle and thereby systemic metabolism.

研究分野：代謝学

キーワード：酵素 脂質 生体分子 遺伝子 組織・細胞 遺伝子改変マウス メタボローム 病態

1. 研究開始当初の背景

グリセロホスホコリン (GPC) は母乳中に豊富に存在し、栄養学的には成長ホルモン分泌促進、認知症改善、肝機能障害改善、腎臓や精巣での浸透圧調節などの作用があるとされる。GPC はコリン骨格を持ち、健康食品市場ではコリン補給剤として利用されている。コリンは、①メチル基の供給源、②アセチルコリンの前駆体、③細胞膜リン脂質 PC の構成要素、として生命維持に重要である。栄養素として摂取される外因性 GPC に加えて、生体には内因的に GPC を生合成する代謝経路が存在すると考えられてきた。しかしながら、内因性 GPC の生合成に関わる酵素は分子的に同定されておらず、それ故に本代謝経路の生理的重要性は十分に認識されていなかった。理論的には、細胞膜 PC の二本の脂肪酸鎖が PLA₂ とリゾホスホリパーゼの作用により連続的に加水分解を受けると GPC を生じる。これまでに *in vitro* でリゾホスホリパーゼ活性を示す酵素はいくつか同定されているが、いずれも主機能は別の酵素反応であり、GPC 供給酵素として専門的に機能するリゾホスホリパーゼは不明であった。申請者は、PLA₂ ファミリー分子群の網羅的解析のプロジェクトを推進する過程で、機能未知のサブタイプである PNPLA7 が PLA₂ としてではなくリゾホスファチジルコリン (LPC) →GPC の代謝を担うリゾホスホリパーゼとして働くことを見出した (図 1)。リゾホスホリパーゼは従来、細胞膜溶解性の LPC を消去する解毒酵素として認識されており、その実体や GPC 産生酵素としての意義は着目されていなかった。本研究は、申請者が独自に樹立した PNPLA7 欠損マウスを用いて、GPC 産生酵素としてのリゾホスホリパーゼの機能を解明することを目指した。

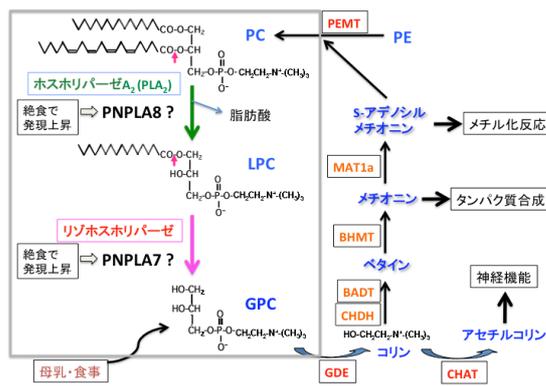


図1. GPC産生経路とコリン代謝。本研究では枠内のGPC合成経路に着目する。

2. 研究の目的

GPC から代謝されるコリンは、代謝調節や細胞機能維持に欠かせない必須栄養素であり、コリンが欠乏すると脂質を肝臓外に輸送することができず、脂肪肝を発症する。また、GPC 摂取によりアルツハイマー型・脳血管型認知症の改善効果が提唱されている。更に、GPC は成長ホルモンの分泌を増強し、成長促進・老化防止効果を示すという報告もある。

このことから、GPC は成長促進、脳機能改善、代謝改善、アンチエイジング素材としての機能が期待されてきた。しかしながら、GPC の機能に関するこれらの知見は栄養学からの議論がメインであり、分子生物学的な理解は不十分であった。本研究では、リゾホスホリパーゼ欠損マウスの表現型を切り口に、内因性 GPC 合成からコリン・メチオニン代謝経路 (図 1) の全体像を解明し、本代謝経路の意義に関する分子論を提示することで、新しい学術概念を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、リゾホスホリパーゼ PNPLA7 の欠損マウスに様々な病態モデルを施し、その表現型を解析した。特に影響を受けている組織として肝臓に注目し、質量分析により代謝物のプロファイリングを行った。遺伝子発現は定量的 PCR (qPCR) またはマイクロアレイにより調べた。初代培養系を用いた細胞レベルでの解析やリコンビナント酵素を用いた基質特異性の検討を行った。各表現型に対応する研究方法の詳細は以下の研究成果の中で言及する。

4. 研究成果

(1) PNPLA7 は代謝関連組織に発現しているリゾホスホリパーゼである

バキュロウイルス発現系を用いて Sf9 細胞に発現させたヒト PNPLA7 の酵素活性を測定すると、PC に対する活性 (PLA₂ 活性) は検出されなかったが、LPC を GPC に変換するリゾホスホリパーゼ活性を示した。PNPLA7 を HEK293T 細胞に過剰発現させると、本酵素は主に小胞体に分布していた。本酵素の mRNA は代謝関連組織 (肝臓、筋肉、脂肪組織等) と精巣での発現が高く、中枢神経系や免疫組織にも有意に発現していた。また、本酵素の代謝関連組織での発現は、24 時間の絶食により増加した。このことから、PNPLA7 は栄養状態の制御に関わる分子であることが想定された。

(2) PNPLA7 欠損マウスは著しい代謝異常を発症する

PNPLA7 遺伝子の活性中心を含むエクソンを欠落させた全身性 PNPLA7 欠損マウスを作成した。PNPLA7 欠損マウスは、体重当たりの摂餌量は野生型マウスと比べて増加したにも関わらず、離乳後に著しい発育不全を示し、生後 6~7 週齢の個体は肝臓の脂肪肝様空胞変性ならびに背骨の湾曲、内臓脂肪の著減が顕著であった。また、欠損マウスではエネルギー代謝の亢進、呼吸商の低下 (=糖質消費の減少と脂質消費の増加) が認められた。欠損マウスは生後 10 週までに死亡した。

欠損マウスは 5 週齢以降に体温低下を示し、これと合致して体温調節に関わる甲状腺ホルモンの血中濃度が低下していた。血糖値も 5 週齢以降に低下し、おそらくこれに適応す

るために血中インスリン濃度が減少していたが、全身性のインスリン感受性には変化が見られなかった。また、血中ケトン体濃度が増加しており、低血糖による栄養失調状態が示唆された。栄養失調の所見と合致して、飢餓応答性ホルモン FGF21 の血中濃度が離乳後早い時期に増加した。FGF21 は成長ホルモンによる IGF1 シグナルの活性化を抑制することが知られており⁶⁾、実際に欠損マウスでは IGF1 の血中濃度ならびに IGF シグナルに関わる分子の発現が低下していたことから、飢餓症状→FGF21 の増加→IGF シグナルの抑制、が成長遅延の要因のひとつと考えられた。また、欠損マウスでは内臓脂肪の著減と合致して血中レプチン濃度が低下していた。以上より、PNPLA7 欠損マウスは著しい代謝異常を発症することが明らかとなった。

(3) PNPLA7 欠損マウスでは肝臓の GPC-コリン代謝が乱れる

主要組織における GPC 含量を CE-MS メタボローム解析により測定した結果、欠損マウスでは肝臓の GPC 濃度が野生型マウスと比べて約 90%減少していた。これに加え、欠損マウスの肝臓では GPC の代謝産物であるコリンとその下流に位置するホスホコリンも有意に低下していた。加えて、コリンの代謝物のひとつであるベタインも著減し、更にその下流の S-アデノシルメチオニンも低下していた。この代償機構として、ベタインから S-アデノシルメチオニンへの変換に関わる一連の酵素群の発現が欠損マウスで上昇していた。更に、欠損マウス由来の初代培養肝細胞では野生型細胞と比べて GPC、コリンともに大きく減少していた。したがって、PNPLA7 欠損マウスの表現型は主に肝臓での GPC→コリン代謝経路の欠乏に起因するものと考えられた。一方、血中の GPC やコリンの濃度は組織内濃度に比べて 2~3 オーダー低く、PNPLA7 欠損の影響を受けなかった。コリン経路の乱れは、膜リン脂質 (PC) の生合成に影響を及ぼす。PNPLA7 欠損マウスと野生型マウスの肝臓におけるリン脂質メタボローム解析の結果、欠損マウスでは野生型マウスと比べて PC 分子種が一括的に減少していた。

複数臓器のマイクロアレイ解析の結果、欠損マウスでは肝臓や脂肪組織等の代謝関連組織での遺伝子変動が大きく、特に肝臓では野生型マウスと比べて発現が減少している遺伝子が多数検出された。この中で最も影響を受けていたものはコリン・メチオニン代謝に関わる遺伝子であり、糖や脂質の代謝に関わる遺伝子も含まれていた。これらの遺伝子変動を定量的 PCR により確認した結果、欠損マウスの肝臓では解糖系に関わる遺伝子の発現が減少し、逆に糖新生・糖排出に関わる遺伝子が増加していた。また、脂肪合成に関わる遺伝子群が逆に増加していた。これらの所見は、血糖値の低下や肝臓の脂肪肝様空胞

変性に対する代償応答を反映しているものと考えられた。

(4) PNPLA7 欠損マウスでは VLDL 分泌が低下する

コリン・メチオニンの欠乏や極度の栄養失調では、肝臓の PC 生合成が低下するため、VLDL を介した脂質の分泌輸送が低下し、その結果肝臓に中性脂質が滞留して脂肪肝を発症する。PNPLA7 欠損マウスでは、肝臓の PC が減少していたことと合致して (先述)、血中 VLDL が著しく低下しており、また VLDL 粒子に脂肪を転送する分子 *Mtp* の発現が減少していたことから、VLDL の分泌障害が脂肪肝様空胞変性の主因と考えられた。血中 VLDL が低下すると末梢組織は脂質供給不足に陥るため、これを補うためにリポプロテインリパーゼによる VLDL の加水分解が亢進し、結果的に LDL が増加する。これと合致して、PNPLA7 欠損マウスでは野生型マウスよりもリポプロテインリパーゼ *Lpl* の発現が上昇し、LDL が増加していた。以上の結果から、PNPLA7 欠損マウスでは肝臓の GPC が著減した結果コリン・メチオニン代謝が破綻し、肝臓の脂質を VLDL に乗せて分泌することができなくなり、その結果肝臓内に脂肪が滞留して脂肪肝様空胞変性を発症するものと結論した。

(5) PNPLA7 欠損マウスでは白色脂肪組織の退縮と褐色化が進行する

先述のように、PNPLA7 欠損マウスは体脂肪率が非常に低く、白色脂肪組織 (WAT) は大きく退行して個々の脂肪細胞のサイズが縮小化していた。電子顕微鏡による超微細構造形態観察の結果、野生型マウスの WAT の脂肪細胞は単房性 (Unilocular) 脂肪滴を有するのに対し、欠損マウスの脂肪細胞は多房性 (Multilocular) 脂肪滴を形成しており、しかも細胞質には大型のミトコンドリアが多数見られたことから、褐色脂肪細胞様の特徴を呈していた。一方、肩甲骨間に存在する褐色脂肪組織は PNPLA7 欠損の影響を殆ど受けなかった。WAT の遺伝子発現を定量的 PCR で解析したところ、レプチンの発現は予想通り欠損マウスで減少していたが、脂肪細胞分化や脂肪合成に関わる遺伝子 (*Pparg*, *Fabp4*, *Fasn* 等) の発現は PNPLA7 欠損によりむしろ増加傾向を示し、PNPLA7 欠損による WAT 退縮は脂肪細胞の分化異常によるものではないものと考えられた。一方、欠損マウスでは脂肪分解に関わる遺伝子 (*Atgl*) の発現が増加傾向にあり、更に BAT のマーカーである *Ucp1* や *Cidea* の発現が大きく増加していた。BAT には、骨格筋細胞と起源を共にする肩甲骨間 BAT と、飢餓や低温刺激により WAT 中に生じるベージュ (Beige) 細胞の二つのタイプが存在する。したがって、PNPLA7 欠損マウスでは全身性飢餓状態に対応して、WAT から Beige 細胞への分化 (Browning) が

促進されているものと考えられた。

3週齢マウスの皮下脂肪組織より脂肪幹細胞を調製し、脂肪細胞分化誘導カクテル存在下で培養して、脂肪細胞を誘導した。その結果、欠損細胞からも Oil Red O 陽性の脂肪細胞が野生型細胞と同程度に誘導された。定量的 PCR の結果、上述の vivo の結果と合致して、欠損細胞では脂肪細胞分化や脂肪合成のマーカ―は一様に増加傾向を示し、また BAT やベージュ細胞のマーカ―分子の発現が顕著に増加していた。以上から、PNPLA7 の欠損は細胞自律的 (cell-autonomous) な脂肪細胞の褐色化に寄与することが判明した。しかしながら、ベージュ細胞分化のマスター転写因子である *Prdm16* の発現は PNPLA7 欠損の影響を受けず、PNPLA7 (に由来する代謝物) の作用点は *Prdm16* 以降のベージュ化プロセスにあるものと予想される。

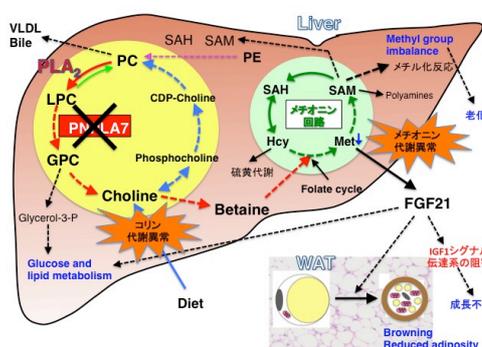


図2 PNPLA7は内因性GPC-コリン代謝経路の要であり、欠損するとコリン・メチオニン代謝が乱れ、著しい代謝異常を発症する

(6) まとめ

PNPLA7は肝臓のGPC産生に関わる主要なリゾホスホリパーゼであり、この酵素が欠損するとコリン・メチオニン代謝が遮断されるのみならず、脂質や糖質の代謝を含む全身のエネルギー代謝が大きく乱れることが明らかとなった(図2)。生理的パラメーターの推移から、PNPLA7欠損マウスは恒常的な低栄養状態にあると考えられ、脂肪異常栄養症 lipodystrophy と類似する表現型が多く見られるが、一方で糖尿病やインスリン抵抗性を発症しない等、既知の lipodystrophy モデルと異なる所見も見られる。GPCは複数の国でサプリメントや医薬品として、前述のように成長ホルモン分泌、肝機能障害改善、学習能向上、認知症改善などの効果が期待されており、このようなGPC補給効果は、PNPLA7欠損マウスの表現型から予想されるGPCの生理機能を支持するものである。

総じて本研究は、①内因性GPCの生合成に関わるリゾホスホリパーゼの初めての同定、②内因性GPC代謝経路の恒常性維持における役割の初めての解明、③脂質メディエーターに依存しないPLA₂ファミリーの新しい機能の発見、④従来のものとは異なる新しい lipodystrophy モデルマウスの創成、等の点において、基礎学術的に大きな意義を持つ。本研究はリン脂質の再利用(コリンリン脂質

リサイクル)の重要性、すなわちPCの形で蓄えられているコリンが本リサイクル経路を介して様々な代謝経路に深く関わることを初めて明らかにしたものであり、脂質研究領域ならびに代謝研究領域において革新的な研究成果といえる。

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2件)

- (1) Yoda, E., Rai K, Ogawa M, Takakura Y, Kuwata H, Suzuki H, Nakatani Y, Murakami, M., *Hara, S. Group VIB Ca²⁺-independent phospholipase A₂ (iPLA₂) regulates platelet activation, hemostasis and thrombosis in mice. *PLoS One* 9, e109409 (2014) doi: 10.1371/journal.pone.0109409 査読有
- (2) Morita, Y., Sakaguchi, T., Ikegami, K., Goto-Inoue, N., Hayasaka, T. Hang, V.T., Tanaka, H., Harada, T., Shibasaki, Y., Suzuki, A., Inaba, K., Murakami, M., Setou, M., *Konno, H. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 altered phospholipid composition and regulated hepatoma progression. *J. Hepatol.* 59, 292-299 (2013) doi: 10.1016/j.jhep.2013.02.030 査読有

[学会発表](計7件)

- (1) *Murakami, M. New insights into PLA₂s from outside and inside. The 6th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators. 2015. 2. 11. 京王プラザホテル(東京都新宿区)
- (2) Hirabayashi, T., Mouri, M., Shimamura, T., Yokoyama, K., Ikeda, K., Nakata, R., Murakami, M. PNPLA7 lysophospholipase has a pivotal role in hepatic choline metabolism and systemic energy homeostasis. The 6th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators (PLM2015), 2015. 2. 10-11. 京王プラザホテル(東京都新宿区)
- (3) *村上誠、平林哲也、山本圭. 皮膚脂質代謝の新機軸. 第7回セラミド研究会. 2014. 10. 30. 東京ユビキタス協創広場 CANVAS (東京都中央区)
- (4) *村上誠. リン脂質からオメガ3脂肪酸を動員するホスホリパーゼ A₂. 第16回 DHA・EPA 協議会. 2014. 10. 23. アイビーホール青学会館(東京都渋谷区)
- (5) 平林哲也、村上誠. 新規 PNPLA/iPLA₂ の新しい機能. 第87回日本生化学会. 2014. 10. 16. 国立京都国際会館(京都府京都市)
- (6) Hirabayashi, T., Mouri, M., Shimamura, T., Anjo, T., Yokoyama, K., Ikeda, K., and Murakami, M. Glycerophosphocholine

production by PNPLA7, a novel starvation-induced lysophospholipase, is essential for hepatic choline homeostasis. FASEB Summer Research Conference on Lysophospholipids and Other Related Mediators. 2013. 8. 8. ニセコヒルトンホテル (北海道ニセコ町)

- (7) 平林哲也、毛利美紗、安城樹、島村透、横山浩平、池田和貴、隅寿恵、村上誠. 新規リゾホスホリパーゼ PNPLA7 による GPC 産生経路の生理的役割. 第 55 回日本脂質生化学会、2013. 6. 7. ホテル松島大観荘 (宮城県松島町)

〔図書〕 (計 1 件)

- (1) 尾池雄一、佐々木雄彦、村上誠、矢作直也監修. 疾患モデルの作成と利用：脂質代謝異常と関連疾患. エルアイシー社. (2015) (監修) 上巻 480 ページ、下巻 400 ページ

〔その他〕

○研究室ホームページ
<http://www.igakuken.or.jp/lipid/>

○賞与

- (1) 東京都福祉保健局長賞. 2015. 2. 10.
(2) テルモ財団賞. 2014. 3. 16

○国際会議会頭

The 6th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators (PLM2015). 2015. 2. 10-12. Shinjuku, Tokyo, Japan (京王プラザホテル)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 誠 (MURAKAMI, Makoto)
公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・参事研究員
研究者番号：60276607