

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870879

研究課題名(和文)生命維持に必要なリン脂質代謝の解明

研究課題名(英文)Elucidation of phospholipid metabolism necessary for life

研究代表者

吉田 智美 (Yoshida, Tomomi)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：30610216

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)：リン脂質代謝酵素であるLPCAT3が、生体内においてアラキドン酸含有のリン脂質の生合成に寄与している事を明らかにした。またLPCAT3欠損マウスは、生後1週間以内に死亡する事がわかった。LPCAT3欠損マウスの小腸では生後1日目に大量の脂質(中性脂肪：トリグリセリド)蓄積が見られ、これが局所的なアラキドン酸含有リン脂質の減少による可能性をin vitroの実験より示唆した。この脂質蓄積によって、LPCAT3欠損マウスでは小腸の機能不全が起こっていると推察され、それによる低血糖や血中の中性脂肪の濃度低下が観察された。これらの事が、LPCAT3欠損マウスにおける新生児致死の要因である事を示した。

研究成果の概要(英文)：This study demonstrated that LPCAT3, which is one of lysophospholipid acyltransferase, played a key role in biosynthesis of arachidonic acid containing phospholipids in vivo. LPCAT3-deficient mice showed a lethal phenotype within one week after birth. We also found that a triacylglycerol (TG) accumulation occurred by LPCAT3 deletion in small intestine at postnatal day 1. The study showed that an arachidonic acid containing phospholipid was important for an efficient TG transfer by an enzymatic assay in vitro. A glucose level and a TG level in blood were decreased in LPCAT3-deficient mice because enterocyte was disrupted by the accumulation. These results suggested that the dysfunction of enterocyte was one of the reasons for the neonatal lethal phenotype.

研究分野：脂質生化学

キーワード：発生医学 生体膜リン脂質

### 1. 研究開始当初の背景

リン脂質は生体膜の構成成分であり、生体内においてシグナル伝達に關与するなど多様な機能を持つ。リン脂質を合成する酵素としてリゾリン脂質アシル転移酵素が知られている。このうちリゾホスファチジルコリンアシル転移酵素-3(LPCAT3)は、*in vitro*の酵素学的解析よりアラキドン酸(C20:4)やリノール酸(C18:2)をリゾリン脂質(リゾホスファチジルコリン: LPC, リゾホスファチジルエタノールアミン: LPE, リゾホスファチジルセリン: LPS)に導入し、リン脂質(ホスファチジルコリン: PC, ホスファチジルエタノールアミン: PE, ホスファチジルセリン: PS)を生合成する事が専攻研究より明らかにされていたが、生体内における機能は全く分かっていなかった。

### 2. 研究の目的

LPCAT3 の生体内における役割を明らかにするため、遺伝子欠損マウスを使った解析を行なう事にした。すると LPCAT3 遺伝子欠損マウスは生後 1 週間以内に死亡する事が分かった。そこで、この原因を追求して LPCAT3 の機能を解明し、生命維持や成長に必要なリン脂質代謝の意義やそのシステムを明らかにする事を目的とした。

### 3. 研究の方法

LPCAT3 遺伝子欠損によるリン脂質への影響を調べるため、LC-MS を使ったリン脂質測定や活性測定をはじめ、GC-FID を用いた脂肪酸分析などを行なった。また、LPCAT3 遺伝子欠損マウスの死亡原因を探るため、全身の組織形態観察や体重測定、血液学検査、生化学検査などを行なった。組織における中性脂質の蓄積を確認するため、組織染色や血清中の中性脂質の定量解析などを行なった。さらに LPCAT3 欠損による中性脂質蓄積のメカニズムを明らかにするため、リポソームを使った MTP(microsomal triglyceride transfer protein)の活性測定を行なった。

### 4. 研究成果

LPCAT3 遺伝子欠損マウスでは、調べた全組織(脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、脾臓、胃、小腸、腎臓)において、アラキドン酸含有リン脂質が減少していた(図1)。

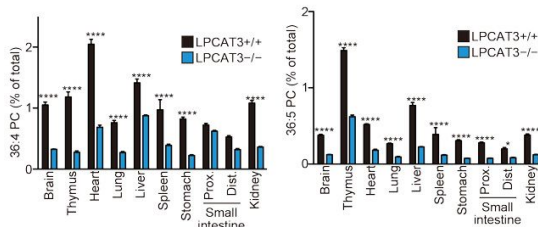


図1 アラキドン酸含有リン脂質組成 GC-FID を用いた脂肪酸解析の結果から、LPCAT3 遺伝子欠損マウスでは組織中のアラキドン酸量が低下している事も明らかとなった。

また、各組織から回収したタンパク質を使った酵素活性測定を行なった所、LPCAT3 遺伝子欠損マウスでは調べた全ての組織において活性低下が確認された(図2)。

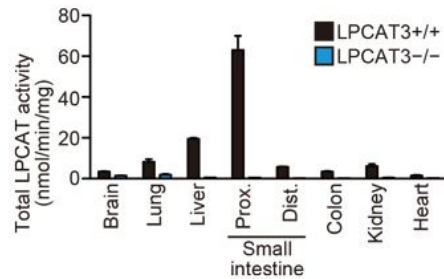


図2 酵素活性測定

上記の結果は、*in vitro*での酵素活性解析を中心とした以前の研究報告と一致しており、生体内においても LPCAT3 がアラキドン酸含有リン脂質を生合成している事が明らかとなった。

さらに解析を進めていた所、LPCAT3 遺伝子欠損マウスが生後 1 週間以内に全て死亡する事が分かった(図3)。

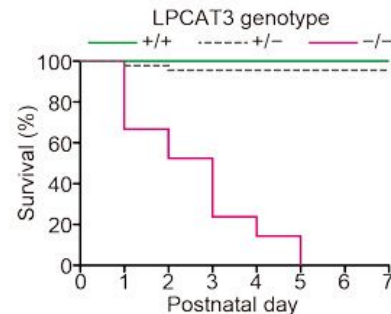


図3 生存曲線

この原因を探るため、胎児期及び新生児期(生後0-2日目)の体重や見た目の観察を行なった所、胎児期や生後0日目では野生型との違いは見られないが、生後1日目から徐々に体重減少が見られ、生後2日目では明らかにやせ細ってくる事が分かった(図4)。

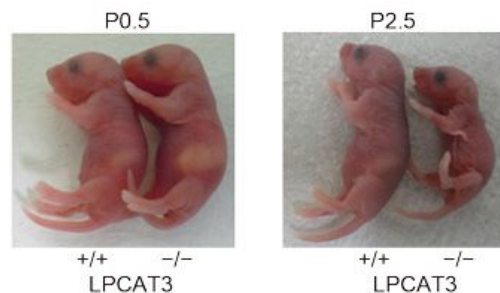


図4 新生児期の様子

全身の組織切片(HE染色)の観察を行なった所、生後1日目では小腸に異常が見つかった。腸上皮細胞の空胞化がみられ、この異常は生後0日目では観察されなかった。この空胞化の正体を探るため、Oil Red O 染色を行なった所、この空胞部分が真っ赤に染まった事から LPCAT3 遺伝子欠損マウスでは小腸では脂質(TG:トリグリセリド)が蓄積している事が分かった(図5)。

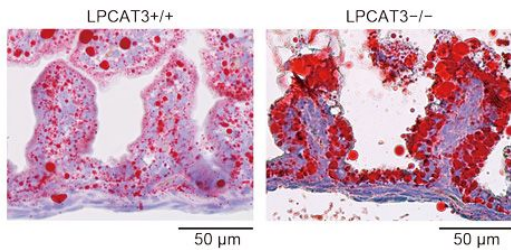


図5 小腸におけるTG蓄積

生後1日目では血糖値低下も観察されており、この脂質蓄積によって小腸機能不全が起こっており、それにより栄養吸収障害を引き起こされ死亡に至るのではないかと推察される。

次にLPCAT3を欠失した事によるTG蓄積のメカニズムを探るため、リン脂質組成が異なる数種類のリポソームを使い、TG輸送に関わる酵素(MTP)の酵素活性測定を行なった。アラキドン酸やドコサヘキサエン酸が入ったリン脂質を多く含むTG含有リポソームでは、オレイン酸やリノール酸のリポソームと比べMTPの活性上昇が見られた(図6)。

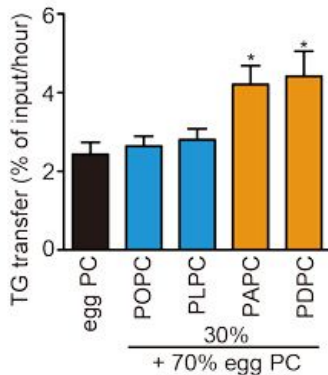


図6 MTP活性測定

この結果から、遺伝子欠損マウスではアラキドン酸含有のリン脂質が低下しているため、MTPによる効率的なTG輸送が阻害され小腸でのTG蓄積が起こっていると考えられる。

上記結果をまとめて論文発表した(雑誌論文)。

<引用文献>

- Shindou et. al., J. Biol. Chem., 2009, 284, 1-5  
 Hishikawa et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008, 105, 2830-2835

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)

Hashidate-Yoshida T, Harayama T, Hishikawa D, Morimoto R, Hamano F, Tokuoka SM, Eto M, Tamura-Nakano M, Yanobu-Takanashi R, Mukumoto Y, Kiyonari

H, Okamura T, Kita Y, Shindou H, Shimizu T., Fatty acid remodeling by LPCAT3 enriches arachidonate in phospholipid membranes and regulates triglyceride transport., *Elife*, 査読有, 2015, DOI: 10.7554/eLife.06328

Taniguchi K, Hikiji H, Okinaga T, Hashidate-Yoshida T, Shindou H, Ariyoshi W, Shimizu T, Tominaga K, Nishihara T., Essential Role of Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 3 in the Induction of Macrophage Polarization in PMA-Treated U937 Cells., *J. Cell Biochem.*, 査読有, 116, 2015, 2840-8, DOI: 10.1002/jcb.25230

[学会発表](計 2 件)

橋立(吉田)智美, 原山武士, 菱川大介, 森本亮, 浜野文三江, 徳岡涼美, 衛藤樹, 北芳博, 進藤英雄, 清水孝雄, リゾホスファチジルコリンアシル転移酵素3(LPCAT3)によるトリアシルグリセロール輸送の調節機構, 第57回日本脂質生化学会, 2015年5月29日, 東京

Tomomi Hashidate-Yoshida, Takeshi Harayama, Daisuke Hishikawa, Ryo Morimoto, Fumie Hamano, Suzumi M. Tokuoka, Miki Eto, Yoshihiro Kita, Hideo Shindou, and Takao Shimizu, The role of lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 (LPCAT3) modulating triacylglycerol transport, *BMB*2015, 2015年12月3日, 神戸

[図書](計 件)

[産業財産権] 出願状況(計 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

吉田 智美 (YOSHIDA, Tomomi)  
国立国際医療研究センター  
脂質シグナリングプロジェクト  
上級研究員  
研究者番号：30610216