

ホスファチジルイノシトールの特徴的脂肪酸組成の 皮膚恒常性における役割の解析

東京都健康長寿医療センター研究所

今江 理恵子

Phosphatidylinositol (PI) is a versatile lipid that not only serves as a structural component of cellular membranes, but also plays important roles in signal transduction through distinct phosphorylated derivatives of the inositol head group. PI contains stearic acid (18:0) as the predominant fatty acid at the *sn*-1 position. This fatty acid composition is formed through fatty acid remodeling by sequential deacylation and reacylation. We previously identified acyltransferases responsible for the incorporation of stearic acid into the *sn*-1 position of PI in *C. elegans* (*acl-8*, *acl-9* and *acl-10*) and mice (*lycat*). However, the biological significance of the enrichment of stearic acid at the *sn*-1 position of PI is largely unknown. In this study, we analyzed the phenotypes of *acl-8 acl-9 acl-10* triple mutants in *C. elegans* and found that the epithelial morphology was disrupted. The mutants showed defects in the amount and localization of actin filaments at the apical junction of epithelial cells. In addition, PI(4,5)P₂ was significantly accumulated at the apical junction of epithelial cells. Furthermore, our genetic screen identified the ether lipid biosynthetic pathway genes *acl-7/DHAPAT* and *ads-1/AGPS* as suppressor genes of *acl-10* mutants. We found that *acl-7* mutation rescued both the reduced amount of stearic acid at the *sn*-1 position of PI and the defects at the apical junction of epithelial cells in *acl-8 acl-9 acl-10* triple mutants. Taken together, these results indicate the important role of stearic acid in the *sn*-1 position of PI in the epithelial cell integrity through proper actin filament organization.

1. 緒言

皮膚の恒常性は、表皮幹細胞から表皮角化細胞が分裂、分化して剥がれ落ちる“ターンオーバー”の繰り返しや、バリア構造の形成等によって維持される。一方、加齢によって表皮幹細胞数が減少することや、表皮のターンオーバーが遅くなることが知られている。また、バリア構造の破綻はアトピー性皮膚炎等の皮膚疾患を引き起こす。角質バリアにおいては、セラミドに代表される細胞外脂質が重要な働きを担っていることが知られている。脂質は生体膜の重要な構成成分でもあり、膜タンパク質機能の調節因子として、あるいはシグナル分子として、細胞機能に必須の役割を果たす。しかし、皮膚の恒常性において生体膜脂質がどのような役割を果たすのかについては、あまり明らかになっていない。

私は、生体膜リン脂質の一つであるホスファチジルイノシトール (PI) の特徴的な脂肪酸組成を規定する酵素群の同定及び機能解析を行ってきた¹⁻³⁾。PIは、グリセロール骨格の *sn*-1 位にステアリン酸 (18:0)、*sn*-2 位にアラキドン酸 (20:4) を持つ分子種が圧倒的に多い。これまでに、モデル生物である線虫を用いて、PIの *sn*-1 位へのステア

リン酸導入に関わる酵素として、ホスホリパーゼ A₁ (*ipla-1*)、脂肪酸転移酵素 (*acl-8, 9, 10*) を世界に先駆けて同定し、線虫表皮幹細胞の非対称分裂において PI の *sn*-1 位の脂肪酸組成が重要な役割を果たすことを明らかにしている²⁾。さらに、*acl-8, 9, 10* の哺乳動物相同分子である LYCAT についても、マウスにおいて PI の *sn*-1 位の脂肪酸組成を規定していることを明らかにした³⁾。しかし、PI の *sn*-1 位の脂肪酸組成がどのようにして上皮細胞の恒常性に寄与しているか、その分子メカニズムについては未だほとんど明らかになっていない。本研究では、PI の特徴的な脂肪酸組成が上皮細胞の恒常性において果たす役割を分子レベルで解明することを目的とした。

2. 方法

2.1. アクチンフィラメントの観察

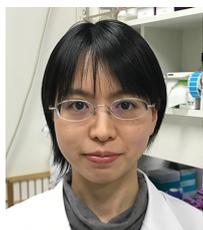
young adult 期の線虫を回収後、ホルムアルデヒド、アセトンにて固定後、Alexa Fluor 546-phalloidin で染色した。観察は共焦点顕微鏡ライカ TCS SP8 を使用した。

2.2. *xhls3503[dpy-7p::PLCδ1-PH::GFP]* の作成

MoSCI 法にて、線虫ゲノム (IV 番染色体の特定の部位) にシングルコピーで外来遺伝子 (上皮細胞特異的 *dpy-7* promoter の下流に PLCδ1-PH::GFP をつないだ DNA 配列) を挿入した株を作成した。

2.3. サプレッサー遺伝子の同定

線虫 (Bristol N2 株) の近縁種である Hawaiian 株を用いた Snip-SNPs 法を用いて、原因遺伝子の染色体、ゲノム



The roles of the characteristic fatty acid composition of phosphatidylinositol in the homeostasis of skin

Rieko Imae

Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital and Institute of Gerontology

領域を絞り込んだ。該当するゲノム領域に存在する遺伝子について、feeding RNAi法にて発現抑制し、原因遺伝子と考えられる遺伝子についてサンガー法にてシーケンス解析し、原因変異の同定を行った。

2.4. 脂質解析

線虫を回収後、超音波処理により破碎、Brigh and Dyer法にて脂質を抽出した。個々のリン脂質脂肪酸量の定量については、TLCにて各リン脂質を分離後、メチルエステル化してGC-MSにて解析した。また、リン脂質脂肪酸分子種の測定にはLC-MSを用いた。

3. 結果

3.1. *acl-8, 9, 10* 三重変異体は上皮細胞のapical junction部位のアクチンフィラメントの量や局在に異常を示す

線虫を用いて、上皮細胞におけるPIのsn-1位の脂肪酸組成の役割を明らかにするため、*acl-8, 9, 10* 三重変異体を用いて上皮細胞の形態を観察した。野生株では、幼虫期から成虫期になる段階で、上皮細胞の一種であるseam cellが互いに融合し、細長い多核の細胞になる。seam cellは、隣接する大きな上皮細胞であるhypodermal cellとadherence junctionを形成しており、アピカルジャンクション複合体の構成分子であるAJM-1::GFPを発現する株(*syIs78*)を用いて観察すると、AJM-1::GFPは2本の平行なラインとして観察される(図1A)。一方、*acl-8, 9, 10* 三重変異体では、seam cellが途切れてギャップが生じる様子や、小さく分断されている様子が観察された(図1A)。*acl-8, 9, 10* 三重変異体ではseam cell同士の融合の過程には異常が見られなかったことから、seam cellが融合した後、何らかの原因で細胞の形態が維持できなくなり、分断が生じたものと考えられる。

細胞の形態維持には、アクチンフィラメントの裏打ち構造が重要である。上皮細胞においては、細胞接着に関わ

るadherence junctionにアクチンフィラメントが局在していることが知られている。そこで、細胞間接着部位のアクチンフィラメントを観察した。野生株では細胞間接着部位にアクチンフィラメントが一樣に存在しており、詳細に観察すると細かいドットが連なったように配置している(図1B)。一方、*acl-8, 9, 10* 三重変異体では、細胞間接着部位におけるアクチンフィラメントが大きな不定形のドット状に局在し、細胞間接着部位に一樣には存在しないことが分かった(図1B)。また、細胞間接着部位におけるアクチンフィラメントの量を解析したところ、*acl-8, 9, 10* 三重変異体では顕著に増加していることが分かった(図1C)。アクチンフィラメントの大きなドットは、seam cellの分断が生じている部分と完全ではないが一致したことから、アクチンフィラメントの制御が異常になったことにより、細胞間接着部位に異常な張力が生じ、上皮細胞の形態に異常が生じた可能性が考えられる。

3.2. *acl-8, 9, 10* 三重変異体は上皮細胞のapical junction部位のPI(4, 5) P2の量が顕著に増加する

PIは、極性頭部のイノシトール環がリン酸化されることで様々なphosphoinositideに変換され、シグナル伝達や小胞輸送等、細胞内の様々な現象に関与する。PIのsn-1位の脂肪酸組成が変動すると、phosphoinositideの産生や分解、あるいはphosphoinositideの局在等に影響が生じる可能性が考えられる。一方、アクチン調節タンパク質には、phosphoinositideの一つであるPI(4, 5) P2によって活性制御を受けるものが多い。そこで、*acl-8, 9, 10* 三重変異体の上皮細胞で、PI(4, 5) P2の量や局在に異常がないか解析した。PI(4, 5) P2に結合するPLCδ1のPHドメインにGFPを結合したプローブ(PLCδ1-PH::GFP)を上皮細胞で発現させた株(*xhIs3503*)を作成し、*acl-8, 9, 10* 三重変異体バックグラウンドと比較して観察した。同時にアクチンフィラメントの染色も行い、PLCδ1-PH::GFP

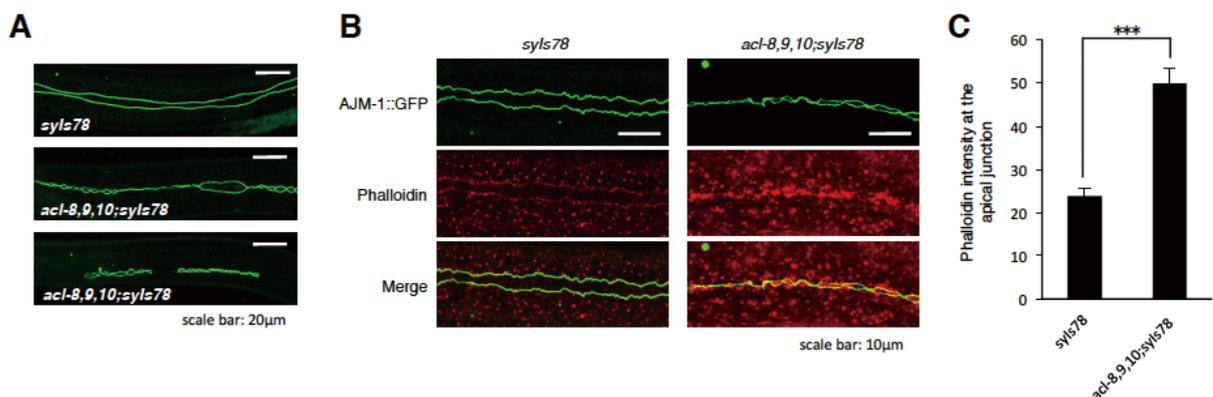


図1 *acl-8, 9, 10* 三重変異体は上皮細胞のapical junctionにおけるアクチンフィラメントの量や局在に異常を示す

の局在との関連を調べた。*xhIs3503*では、アクチンフィラメントが存在する apical junction 部位に弱く PLC $\delta 1$ -PH::GFP が局在する様子が観察された (図 2A)。一方、*acl-8, 9, 10; xhIs3503*では apical junction 部位に PLC $\delta 1$ -PH::GFP がドット状に集積する様子が観察された (図 2B, C)。興味深いことに、この PLC $\delta 1$ -PH::GFP のドットとアクチンフィラメントのドットの位置は、完全ではないが一致していた。以上の結果から、*acl-8, 9, 10* 三重変異体では、apical junction 部位において PI (4, 5) P2 が過剰に集積しており、それによってアクチン調節タンパク質が活性化され、アクチンフィラメントが過剰に動員された可能性が考えられる。

3. 3. *acl-10* 変異体のサプレッサー遺伝子として、 エーテル型リン脂質合成酵素 *acl-7* と *ads-1* を同定

PI の sn-1 位の脂肪酸組成の上皮細胞における役割の分子メカニズムをさらに探る目的で、*acl-8, 9, 10* と遺伝学的に相互作用する分子のスクリーニングを行うことにした。*acl-8, 9, 10* のうち、*acl-10* は上皮細胞にメインに発現しており、*acl-10* 変異体は単独でも AJM-1::GFP のパターンに異常を示す (図 1A)。そこで、遺伝学的操作を簡便にするため、*acl-10* 変異体を用いてサプレッサー遺伝子のスクリーニングを行った。*acl-10* 変異体に突然変異剤 (EMS) を処理し、表現型が回復する個体を単離して原因遺伝子をマッピングする、という方法で行った。*acl-10* 変異体は、低張液に浸すと体が破裂しやすいという特徴があり、スクリーニングにはこの表現型を利用した。変異剤処理した *acl-10* 変異体の F2 世代から、1st スクリーニングとして水に浸しても生存している個体を単離し、2nd スクリーニングとして AJM-1::GFP のパターン

を観察し、成虫期において途切れない系統を選別した。44000 haploid genome をスクリーニングし、サプレッサー変異体として 2 系統を単離した。うち 2 系統 (原因遺伝子変異: *xh25* 及び *xh26*) (図 3A, B) について、バッククロスを 2 回行った後、近縁種との SNPs を利用した原因遺伝子のマッピングを行った。その結果、*xh25* については *acl-8, 9, 10* と同じ AGPAT acyltransferase family に属する *acl-7* における exon/intron 境界での G \rightarrow A の置換であり、exon/intron 構造が乱れ、フレームシフトが起こり、premature stop となる変異であった (図 3C)。*xh26* については、*ads-1* の exon 中での C \rightarrow T の置換であり、進化的に保存された P が L に置換する P281L の変異であった (図 3D)。*acl-7, ads-1* の RNAi でも *acl-10* 変異体の表現型の抑圧が観察されたことから、*acl-7* (*xh25*), *ads-1* (*xh26*) は loss /reduction of function となる変異であると考えられる。*acl-7* と *ads-1* は、エーテル型リン脂質を合成する初発段階の酵素である (エーテル型リン脂質とは、sn-1 位の脂肪酸の結合様式が通常のリン脂質のようにエステル結合ではなくエーテル結合であるものを指す)。このことから、*acl-10* 変異体の表現型はエーテル型リン脂質合成と何らかの関わりがあることが示唆された。

3. 4. *acl-7, 8, 9, 10* 四重変異体では PI の脂肪酸組成、apical junction 部位の異常が共に回復する

サプレッサー遺伝子を用いてさらに解析を進めるため、*acl-7* の deletion mutant を作成した (*tm3252*) (図 4A)。*tm3252* は acyltransferase motif の下流に欠失部位があるが、フレームシフトを起こして premature stop となることが予想されるため、ACL-7 の局在部位であるペルオキシソームに局在できず、null になると考えられる。実際、

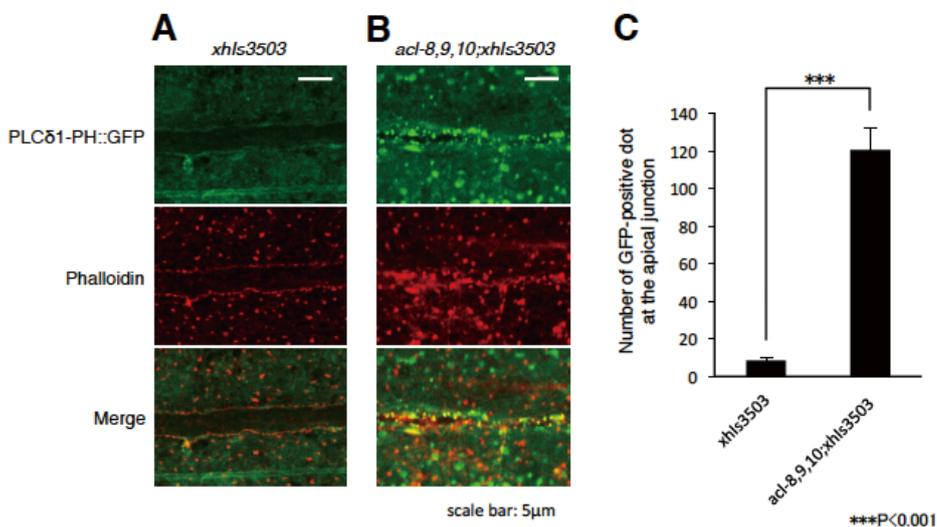


図 2 *acl-8, 9, 10* 三重変異体では上皮細胞の apical junction における PI (4, 5) P2 の量が著しく増加する

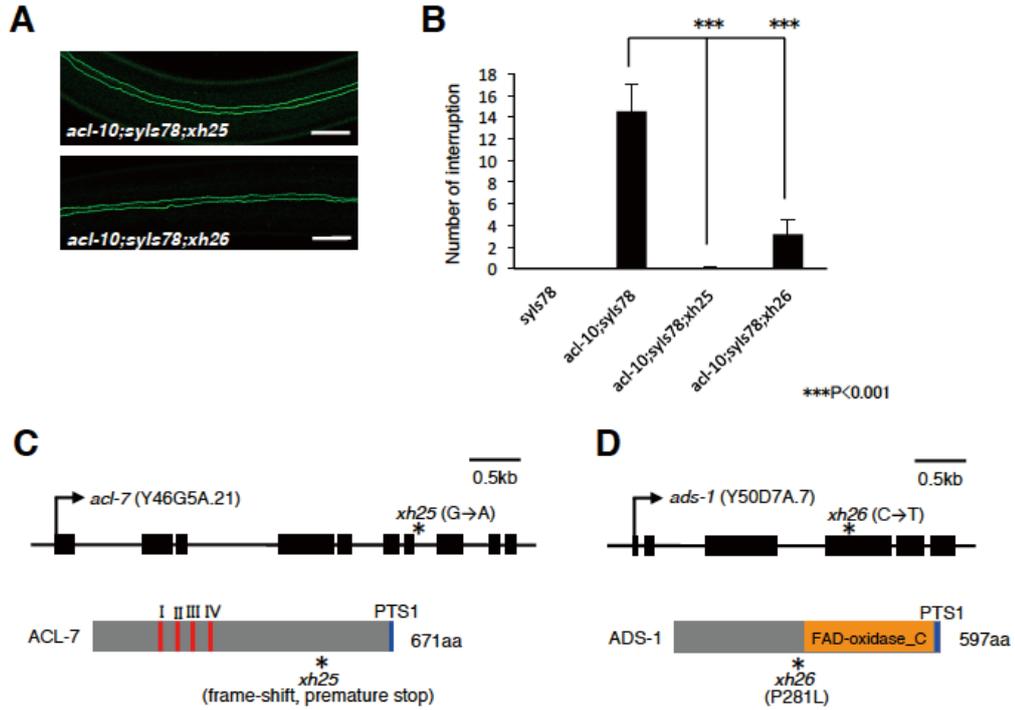


図3 *accl-8, 9, 10* 三重変異体のサプレッサー遺伝子として、エーテル型リン脂質合成酵素 *accl-7* と *ads-1* を単離

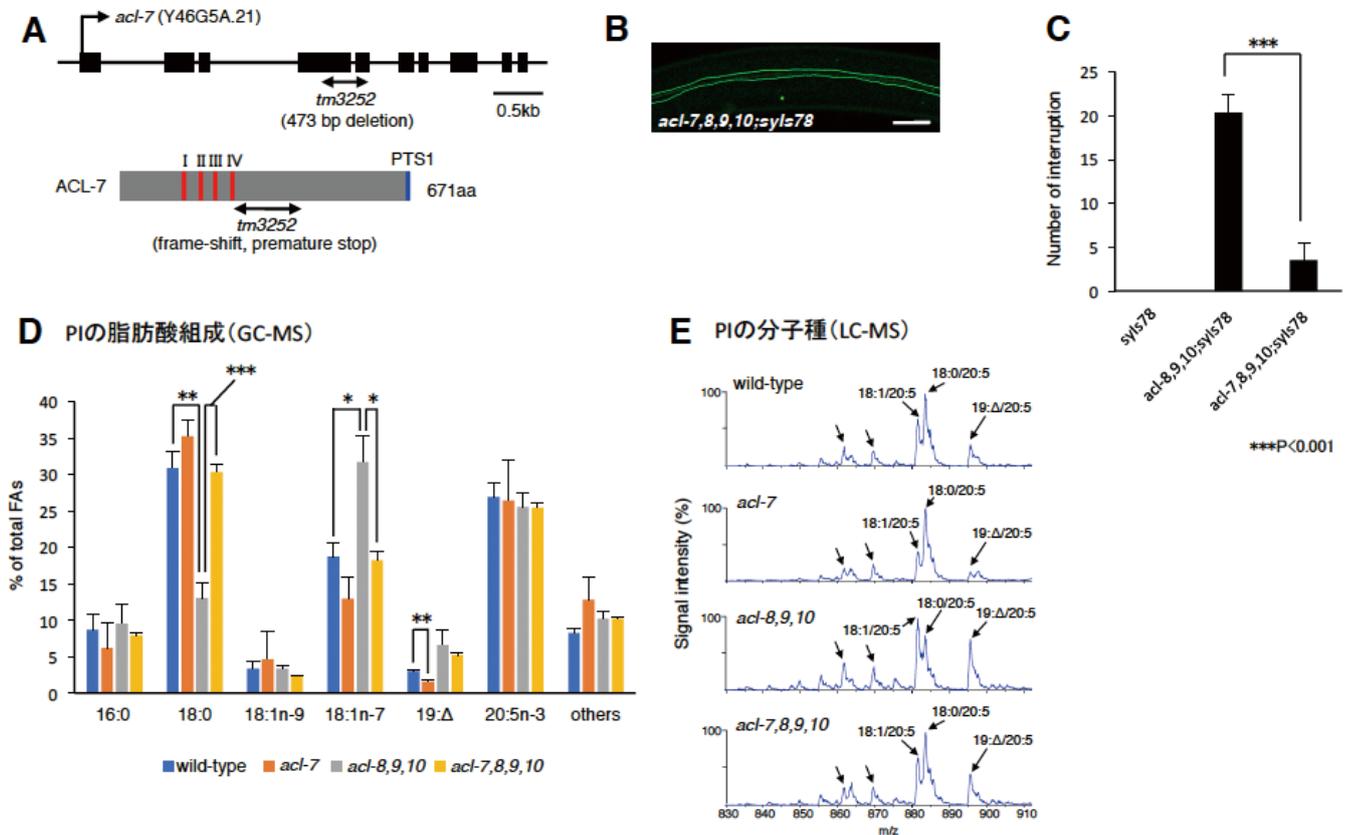


図4 *accl-7, 8, 9, 10* 四重変異体では *ajm-1::GFP* のパターン及びPIの脂肪酸組成が回復している

acl-7 (*tm 3252*) ではエーテル型リン脂質の一つであるアルケニル型PEの量が検出限界以下であったことから、機能喪失型変異体であることが確認された。*acl-7(tm 3252)* と *acl-8, 9, 10; syls 78* を交配して作成した *acl-7, 8, 9, 10; syls 78* についても、AJM-1::gfpのパターンの異常は顕著に回復していることが確認できた (図4B, C)。*acl-7* (*tm 3252*) による表現型の抑圧が、脂質組成が戻ったことによるのかどうかを判別するため、*acl-7, 8, 9, 10* 四重変異体の脂質解析を行った。まず、GC-MSを用いてリン脂質の脂肪酸組成を解析した。その結果、PIの脂肪酸組成において、*acl-8, 9, 10* 三重変異体では18:0の量が減少し、18:1n-7の量が増えているが、*acl-7, 8, 9, 10* 四重変異体では、18:0の量が野生株と同程度まで増加し、18:1n-7の量も野生株と同程度まで減少していることが分かった (図4D)。さらに、LC-MSを用いてPIの脂肪酸分子種を解析した。野生株では18:0/20:5がmajorで18:1/20:5がminorピークとして存在するのに対し、*acl-8, 9, 10* 三重変異体では18:1/20:5がmajorピークとなり、18:0/20:5はマイナーピークとして存在する。一方、*acl-7, 8, 9, 10* 四重変異体ではこの二つの分子種

の比率が野生株と同程度まで戻っていることが分かった (図4E)。以上の結果から、サブレッサー変異体ではPIの脂肪酸組成が野生株と同様に戻ったことにより、表現型が回復したと考えられた。近年、線虫のエーテル型リン脂質合成の変異体を単離し、解析した報告⁴⁾において、脂肪酸合成の促進、SCD (Stearoyl-CoA desaturase) (*fat-5, 6, 7*) の発現低下により、脂質全体で18:0/18:1 ratioが増加していることが報告されている。実際、PEについてもGC-MSで脂肪酸の量を定量したところ、*acl-7* (*tm 3252*) では18:0の量が劇的に増え、18:1n-7の量が減少していた。PIにおいても*acl-7* (*tm 3252*) における18:0/18:1n-7 ratioの増加傾向が見られており (図4D)、これによって*acl-7, 8, 9, 10* 四重変異体におけるPIの脂肪酸組成がレスキューしたものと考えられた。さらに、*acl-7, 8, 9, 10* 四重変異体では、上皮細胞接着部位におけるアクチンフィラメントの集積や、PI (4, 5) P2の集積についてもレスキューしているかを検証した。その結果、これらの表現型についてもレスキューする傾向が見られた (図5)。この結果から、上皮細胞接着部位におけるアクチンフィラメント及びPI (4, 5) P2の量の制御は、PIのsn-1位の脂

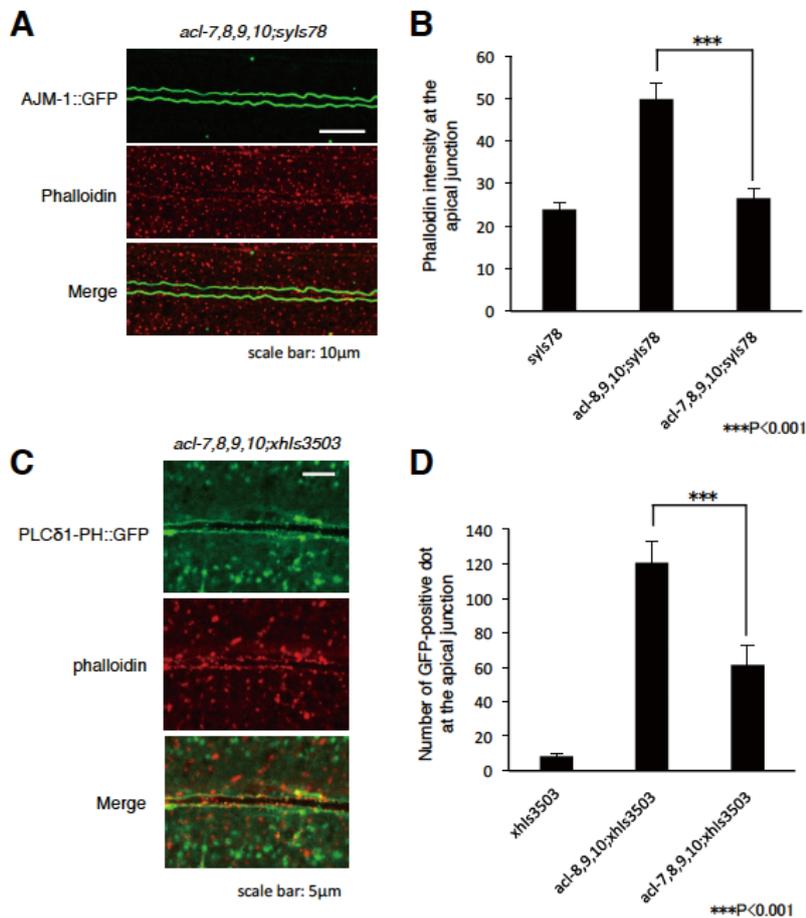


図5 *acl-8, 9, 10* 四重変異体では上皮細胞の apical junction におけるアクチンフィラメントの量、PIP2 の蓄積が回復する

脂肪酸組成が重要な役割を果たしていることが強く支持された。

4. 考 察

本研究から、*acl-8, 9, 10* 三重変異体では上皮細胞間接着部位においてPI (4, 5) P2が過剰に蓄積していること、また、その蓄積部位に高頻度でアクチンフィラメントが集積していることが明らかになった。このアクチンフィラメントの過剰な集積が引き起こす収縮力によって、上皮細胞形態に異常を来した可能性が考えられる。PI (4, 5) P2は、アクチンフィラメントの重要な制御因子であるRhoファミリー低分子量Gタンパク質 (RHO-1, RAC-1, CDC-42等) を正に制御することから、過剰に蓄積したPI (4, 5) P2はこれらの分子の活性化を介してアクチンフィラメントの集積を引き起こした可能性が考えられる。その他にも、PI (4, 5) P2のeffectorで、アクチンフィラメントの重合を制御する分子は多数存在するので、そうした分子の活性化を介している可能性も考えられる。

生細胞において観察されるPI (4, 5) P2シグナリングは非常に早い応答であり、高度にコンパートメント化されている。PIの*sn-1*位の18:0が18:1に置換されると、上皮細胞間接着部位においてPI (4, 5) P2のドット状の集積が観察されたことから、PIの脂肪酸組成は局所における適切なPI (4, 5) P2の制御に重要であると考えられる。すなわち、PIの*sn-1*位の脂肪酸組成が異常であると、PI(4, 5) P2の産生酵素あるいは分解酵素の基質認識に異常が生じ、異所性にPI (4, 5) P2の産生が起きる、あるいはPI (4, 5) P2の分解が妨げられる可能性がある。また、脂肪酸組成が異常なPI (4, 5) P2は、生体膜における局在化 (コンパートメント化) に異常を来し、mis-localizationが起きてしまうことも考えられる。一方、AJM-1::GFPや他のアピカルジャンクション構成分子 (E-Cadherin/HMR-1や α -catenin/HMP-1) はアピカル側に正常に局在していたことから、上皮細胞の極性そのものには大きな異常はないと思われる。

近年、ヒトやマウスにおいて、*acl-8, 9, 10*の相同分子であるLYCATが肺線維症や喘息に関わることが報告されている^{5,6)}。*acl-8, 9, 10* 三重変異体で上皮細胞の細胞間接着部位の異常が見られたこと、細胞間接着は上皮バリア機能の形成に重要な役割を担うことから、マウス肺においても、PIの*sn-1*位の脂肪酸組成が異常になると、細胞間接着に異常を来し、肺胞上皮や気道上皮バリア機能が破綻した結果、肺線維症や喘息が引き起こされる可能性が考えられる。ヒト皮膚バリア機能においても同様に、PIの*sn-1*位の脂肪酸組成は重要な役割を担っている可能性が高い。また、加齢によるPIの脂肪酸組成変化の報告もある⁷⁾。このように、皮膚の疾患や美容において、PIの脂肪

酸組成変化が原因となっている場合も存在すると考えられるが、本研究により異常発症の分子メカニズムの一端が明らかになった。この結果は、皮膚恒常性破綻の予防法や治療法の開発に貢献できるものと考えられる。

(引用文献)

- 1) Lee HC, Inoue T, Imae R, Kono N, Shirae S, Matsuda S, Gengyo-Ando K, Mitani S, Arai H. *Caenorhabditis elegans mboa-7*, a member of the MBOAT family, is required for selective incorporation of polyunsaturated fatty acids into phosphatidylinositol. *Mol Biol Cell.* 19 (3) : 1174-84, 2008.
- 2) Imae R, Inoue T, Kimura M, Kanamori T, Tomioka NH, Kage-Nakadai E, Mitani S, Arai H. Intracellular phospholipase A1 and acyltransferase, which are involved in *Caenorhabditis elegans* stem cell divisions, determine the *sn-1* fatty acyl chain of phosphatidylinositol. *Mol Biol Cell.* 21 (18) : 3114-24, 2010.
- 3) Imae R, Inoue T, Nakasaki Y, Uchida Y, Ohba Y, Kono N, Nakanishi H, Sasaki T, Mitani S, Arai H. LYCAT, a homologue of *C. elegans acl-8, acl-9, and acl-10*, determines the fatty acid composition of phosphatidylinositol in mice. *J Lipid Res.* 53 (3) : 335-47, 2012.
- 4) Shi X, Tarazona P, Brock TJ, Browse J, Feussner I, Watts JL. A *Caenorhabditis elegans* model for ether lipid biosynthesis and function. *J Lipid Res.* 57 (2) : 265-75, 2016.
- 5) Huang LS, Mathew B, Li H, Zhao Y, Ma SF, Noth I, Reddy SP, Harijith A, Usatyuk PV, Berdyshev EV, Kaminski N, Zhou T, Zhang W, Zhang Y, Rehman J, Kotha SR, Gurney TO, Parinandi NL, Lussier YA, Garcia JG, Natarajan V. The mitochondrial cardiolipin remodeling enzyme lysocardiolipin acyltransferase is a novel target in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 189 (11) : 1402-15, 2014.
- 6) Huang YT, Liang L, Moffatt MF, Cookson WO, Lin X. iGWAS: Integrative Genome-Wide Association Studies of Genetic and Genomic Data for Disease Susceptibility Using Mediation Analysis. *Genet Epidemiol.* 39 (5) : 347-56, 2015.
- 7) Ulmann L, Mimouni V, Roux S, Porsolt R, Poisson JP. Brain and hippocampus fatty acid composition in phospholipid classes of aged-relativecognitive deficit rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 64 (3) : 189-95, 2001.