

2020 年度博士学位論文

多価不飽和脂肪酸欠乏で生じる代謝変化
と生理的意義に関する研究

お茶の水女子大学大学院
人間文化創成科学研究科
ライフサイエンス専攻

林 優里

2021 年 3 月

Lipid metabolism changes in polyunsaturated fatty acid deficiency and their physiological significance

Summary

Introduction

Mammals are unable to synthesis polyunsaturated fatty acids (PUFAs) de novo, so linoleic acid (18:2n-6) and α -linolenic acid (18:3n-3) are called essential fatty acids. These carbon-18 (C18) PUFAs can be converted to \geq C20PUFAs such as arachidonic acid (20:4n-6) and docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) via fatty acid desaturases (FADS) and elongation enzymes (ELOVLs). \geq C20PUFAs play important roles in determining the structure and integrity of biological membranes and generating bioactive lipids that mediate numerous physiological functions. In essential fatty acid (EFA) deficiency state, Mead acid (20:3n-9) is endogenously synthesized from oleic acid (18:1n-9) and used as a diagnostic indicator of EFA deficiency. FADS2 is responsible enzyme for synthesis of \geq C20PUFAs such as arachidonic acid, DHA, and Mead acid. In this study, it was investigated that the effect of exogenous and endogenous \geq C20PUFAs deficiency on hepatic lipid accumulation using FADS2^{-/-} mice fed a PUFA-deficient diet.

Methods

Male FADS2^{-/-} mice (11 weeks old) were fed a PUFA-deficient diet for 4 weeks (KO-DEF). In addition, 11-week-old wild-type (WT) mice were fed a control diet (WT-CONT) or PUFA-deficient diet (WT-DEF) for 4 weeks. The control diet was AIN-93G containing 7% soybean oil as the lipid source, and the PUFA-deficient diet was AIN-93G with 7% tripalmitate (16:0-TAG).

Results and discussion

1. Hepatic lipid accumulation in PUFA-deficient FADS2^{-/-} mice.

In two groups fed a DEF diet, the level of hepatic C18 PUFAs were decreased to 30% compared to the group fed a CONT diet. The level of \geq C20 PUFAs in the KO-DEF group was decreased to under one-fifth of that in the WT-CONT mice, whereas the reduction of \geq C20 PUFAs in the WT-DEF group was about 30%. Hepatic triacylglycerol (TAG) and cholesterol levels of FADS2^{-/-} mice were significantly higher than those of two groups of WT mice. These results showed that severe deficiency of \geq C20 PUFAs caused accumulation of cholesterol as well as TAG in the liver.

The expression of *Fasn*, *Acc*, *Scd* which are genes responsible for fatty acid synthesis was

markedly increased in the KO-DEF group compared to the other two groups. Furthermore, the activation of SREBP-1, a master regulator transcription factor of lipogenesis was observed in the KO-DEF group. In addition, the TAG level in VLDL fraction and ApoB100 protein level in the plasma were declined in the KO-DEF group. Although the expression of the genes involved in cholesterologenesis such as *Hmgcr*, *Fdps* and *Lss* was also elevated in *FADS2*^{-/-} mice, the activation of SREBP-2, transcription factor of cholesterologenic genes was not observed. Moreover, there were no differences in the expression of genes involved in bile acid synthesis and bile excretion between WT and *FADS2*^{-/-} mice. From these results, it was suggested that the induction of lipid synthesis and impaired lipid secretion appears to be involved in neutral lipid accumulation in the liver of *FADS2*^{-/-} mice.

2. *The characteristic change of phospholipid composition in PUFA-deficient FADS2^{-/-} mice*

PUFAs exist as acyl chains of membrane phospholipids and provide mobility to the membrane; therefore, PUFA-containing phospholipids are essential for the maintenance of biological function. When PUFAs are deficient in vivo, changes in fatty acid metabolism may occur to compensate for the deficiency and maintain homeostasis. Therefore, we performed a comprehensive analysis of the fatty acid chains of phospholipids in the liver of *FADS2*-deficient mice fed the PUFA-deficient diet.

The presence of non-methylene interrupted fatty acid (NMIFA) called sciadonic acid (20:3^{5,11,14}) was confirmed in phospholipid of KO-DEF group. Sciadonic acid lacks the double bond at the $\Delta 8$ position in arachidonic acid and is thought to be produced from linoleic acid (18:2n-6) in *FADS2*-deficient mice by elongation of the carbon chain via ELOVL and desaturation via *FADS1*. Furthermore, 20:5n-3 and 22:5n-3 were markedly increased in phosphatidylethanolamine (PE) of *FADS2*^{-/-} mice. These results suggested that the change of fatty acid metabolism in phospholipid was induced to compensate for the decrease of $\geq C20$ PUFAs such as arachidonic acid of PUFA-deficient mice, and the amount of $\geq C20$ PUFAs in phospholipids was retained.

目次

第一章 緒言	3
第二章 必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスにおける肝臓の脂質蓄積	
第一節 緒言	15
第二節 実験方法	
第一項 実験動物および実験食	16
第二項 組織染色	17
第三項 脂質解析	17
第四項 定量 PCR	21
第五項 Western blotting	23
第六項 統計処理	24
第三節 結果および考察	
第一項 肝臓及び血漿の脂肪酸組成の変化	25
第二項 肝臓における中性脂質の蓄積	30
第三項 肝臓における脂肪酸合成の変化	33
第四項 中性脂肪の分泌に関与する因子への影響	38
第五項 肝臓におけるコレステロール合成の変化	43
第六項 コレステロールの分泌および排泄に対する影響	48

第三章 必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスの特徴的な脂質組成の変化	
第一節 緒言	54
第二節 実験方法	
第一項 実験動物及び実験食	54
第二項 TLC によるリン脂質の分画	54
第三項 GC-MS による脂肪酸の分析	55
第四項 定量 PCR	55
第三節 結果および考察	
第一項 FADS2 欠損マウスにおいて特異的に増加する非メチレン介在型不飽和脂肪酸の同定	56
第二項 FADS2 欠損マウスの肝臓におけるリン脂質組成の変化	61
第四章 総括	72
参考文献	79
謝辞	90

本論文では以下の略号を用いた。

ABCA1	ATP-binding cassette transporter 1
ABCG5/8	ATP-binding cassette sub-family G member 5/8
ACC	Acetyl-CoA carboxylase
ACSL	Acyl-CoA synthetase long chain family member
ApoA	Apolipoprotein A
ApoB	Apolipoprotein B
ChREBP	Carbohydrate-responsive element-binding protein
Cpt1a	Carnitine palmitoyltransferase 1A
COPII	Coat protein complex II
CYP	Cytochromes P450
DHA	Docosahexaenoic acid
ELOVL	Elongation of very long chain fatty acid
EPA	Eicosapentaenoic acid
FADS	Fatty acid desaturase
FASN	Fatty acid synthase
FDPS	Farnesyl diphosphate synthase
FXR	Farnesoid X receptor
GC-MS	Gas Chromatography-Mass spectrometry
HDL	High density lipoprotein
HMGCR	HMG-CoA reductase
HUFA	Highly unsaturated fatty acid
INSIG	Insulin induced gene
LDL	Low density lipoprotein
LDLR	Low density lipoprotein receptor
LPCAT	Lysophosphatidylcholine acyl transferase
LPEAT	Lysophosphatidylethanolamine acyl transferase

LSS	Lanosterol synthase
LXR	Liver X receptor
Mcad	Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase
MTP (Mttp)	Microsomal triglyceride transfer protein large subunit
NAFLD	Nonalcoholic fatty liver disease
NASH	Nonalcoholic steato-hepatitis
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidylethanolamine
PEMT	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase
PI	Phosphatidylinositol
PKLR	Red cell/liver pyruvate kinase
PNALD	Parenteral nutrition-associated liver disease
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PS	Phosphatidylserine
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
SCD	Stearoyl CoA desaturase
SNP	Single nucleotide polymorphism
SQLS	Squalene synthase
SR-BI (Scarb1)	Scavenger receptor class B type 1
SREBP	Sterol regulatory element binding protein
TAG	Triacylglycerol
TLC	Thin layer chromatography
TMS	Trimethylsilyl
VLDL	Very low density lipoprotein

第一章 緒言

1-1. 哺乳動物における多価不飽和脂肪酸の生理機能

脂肪酸は生体内の重要なエネルギー源であるだけでなく、生体膜の構成成分や生理活性物質として生体の恒常性維持に重要な物質である。特に二重結合を2つ以上有する多価不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid: PUFA) はリン脂質から切り出されてプロスタグランジンやロイコトリエンなど、様々な機能を有する脂質メディエーターへと代謝されることが知られている。哺乳動物はオレイン酸のメチル基側に二重結合を導入する不飽和化酵素を有していないことから、リノール酸 (18:2n-6) や α -リノレン酸 (18:3n-3) などの PUFA を合成することができない [1]。そのため、これらの脂肪酸は必須脂肪酸と呼ばれ、食事からの摂取が必要である。必須脂肪酸からは脂肪酸不飽和化酵素 FADS (Fatty acid desaturase) による二重結合の導入および脂肪酸伸長酵素 ELOVL (Elongase of very long chain fatty acid) による炭素鎖の伸長を介して、アラキドン酸 (20:4n-6) や EPA (20:5n-3; eicosapentaenoic acid)、DHA (22:6n-3; docosahexaenoic acid) のような炭素数 20 以上で不飽和度のさらに高い PUFA が産生される (Fig. 1-1)。特に、炭素数 20 以上、二重結合 3 つ以上の PUFA は高度不飽和脂肪酸 (Highly unsaturated fatty acid; HUFA) と称されることもあり、生体における HUFA の重要性を示唆する報告が多数ある。例えば、生体膜のリン脂質に存在する HUFA はホスホリパーゼによってリン脂質から切り出されて、プロスタグランジンやロイコトリエンなど様々な機能を持つ代謝物へと変換される。また、生体膜における脂肪酸の多様性は膜の流動性などの性質を規定し、細胞形態の維持や膜タンパク質の活性化などを含む膜機能に関与していることがわかっており [2]、HUFA が減少することで膜の流動性が減少し、生体膜の性質が変化することが報告されている [3]。しかしながら、炭素数 18 の PUFA (C18PUFA) ならびに炭素数 20 以上の PUFA (\geq C20PUFA) の欠乏時の生体応答は完全には解明されておらず、不明な点も多く残されている。

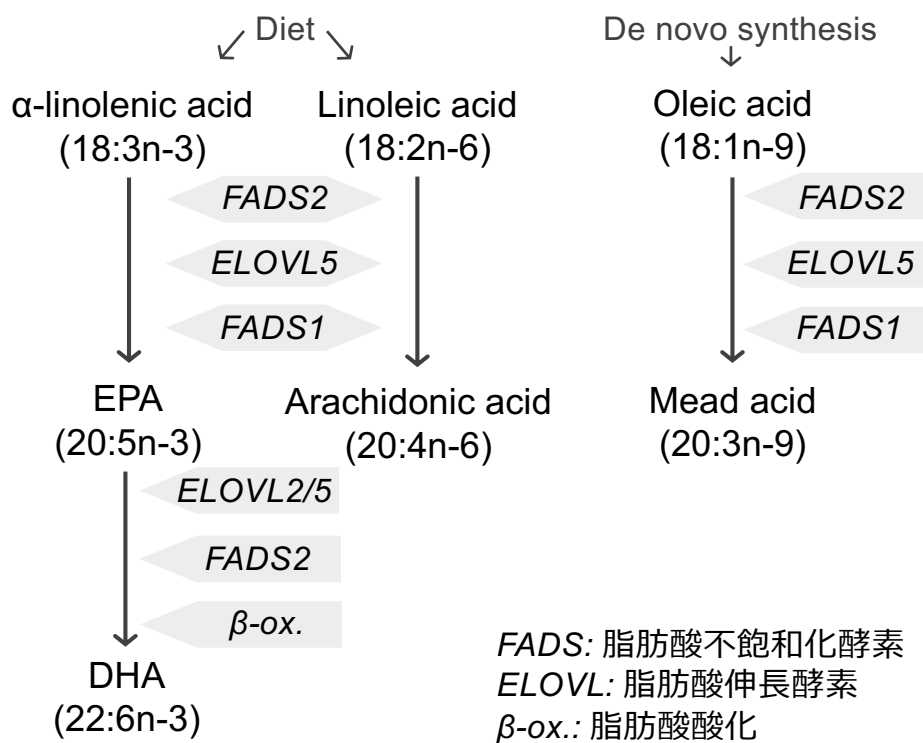


Fig. 1-1 哺乳動物における PUFA の代謝経路

1-2. 必須脂肪酸欠乏の代謝変化と病態

食事からの必須脂肪酸の供給が総カロリーの 1~2%以下になると、必須脂肪酸欠乏となる。哺乳動物では必須脂肪酸が欠乏すると、成長遅延や皮膚障害、生殖機能障害等が現れることが報告されている[4, 5]。また、必須脂肪酸が欠乏した際には、生体内ではミード酸 (20:3n-9) という通常は存在しない内因性の PUFA がオレイン酸から産生されることが知られており[6] (Fig. 1-1)、アラキドン酸とミード酸の比率は必須脂肪酸欠乏の臨床指標として用いられている[7-9]。通常の食事を摂取している健康な成人では必須脂肪酸欠乏に陥ることは殆どないが、脂肪含量の少ない人工栄養で育てられている乳児や、脂肪乳剤のない中心静脈栄養を長期間行っている者では必須脂肪酸欠乏の症状を示すことが報告されている[10]。また、食物アレルギーにおいて複数の食品制限を行っている小児では、必須脂肪酸の供給源となる動物性食品の摂取が著しく減少し、血中にミード酸が存在することが報告されている[11]。

さらに、血中のミード酸が比較的高い小児において皮膚炎や消化器障害の病態がみられる者の割合が多いことも示されている。他にも、嚢胞性線維症、腸性先端皮膚炎、肝腎症、クローン病といった疾患において PUFA の代謝異常が報告されており、病態との関連が注目されている[12, 13]。

必須脂肪酸欠乏の症状の 1 つとして脂肪肝を呈することが知られており、実験動物に必須脂肪酸欠乏食を与えると肝臓への中性脂肪の蓄積が生じる[14, 15]。中心静脈栄養患者では、静脈栄養関連肝疾患 (PNALD; Parenteral nutrition-associated liver disease) を生じることがあり、短腸症候群などの腸管不全症例において致死的な合併症となる。PNALD の発症には必須脂肪酸の不足に伴う肝障害の進行が関与している可能性があり、PUFA を豊富に含む魚油由来静脈注射用脂肪製剤の供給によって症状が緩和できることが指摘されている[16, 17]。しかし、その根底にある機構は完全には明らかにされていない。我が国で使用が認められている静脈注射用脂肪乳剤は大豆由来乳剤のみであり、魚油を用いた脂肪乳剤は現在なお臨床応用されていない。

1-3. 脂肪酸不飽和化酵素 FADS2

哺乳動物における脂肪酸不飽和化酵素は SCD (Stearoyl CoA desaturase) と FADS の 2 種類があり、SCD には 1-5 のアイソフォーム、FADS には 1-3 のアイソフォームが存在する。SCD は飽和脂肪酸を不飽和化して一価不飽和脂肪酸を産生する酵素であるのに対し、FADS は主に PUFA を基質としてさらに不飽和度の高い PUFA を産生する。このうち、FADS2 は PUFA の $\Delta 6$ 位および $\Delta 8$ 位に対する不飽和化活性を有する酵素であり、小胞体膜上に局在し、副腎、肝臓、脂肪組織、脳、生殖臓器を中心にユビキタスに発現する。FADS2 による PUFA の不飽和化は、リノール酸や α -リノレン酸のような必須脂肪酸からアラキドン酸や EPA のような $\geq C20$ PUFA への代謝の律速段階を担っている。哺乳動物において、これらの反応を行う代替酵素は存在しないことから、FADS2 欠損マウスでは C18PUFA から $\geq C20$ PUFA への代謝ができなくなる[18, 19]。FADS2 欠損マウスでは、精子の減少と形態異常、運動能力の低下に

よる生殖障害が生じ、DHA を添加した食餌を与えると正常マウスと同程度まで回復することが報告されている[20]。さらに、FADS2 欠損マウスに $\geq C20$ の PUFA をほとんど含まない大豆油を油脂源とする食餌を与えて飼育すると 4 ヶ月齢時点で潰瘍性皮膚炎、5 ヶ月齢で腸潰瘍を発症し、アラキドン酸を添加した食餌を与えるとこれらの症状は見られなくなることから[19]、 $\geq C20$ PUFA の生体機能維持における重要性が示唆されている。また、FADS2 はオレイン酸からミード酸の産生酵素でもあることから[21]、FADS2 が欠損すると必須脂肪酸欠乏状態でも $\geq C20$ PUFA のミード酸が産生されなくなる。

1-4. グリセロリン脂質における高度不飽和脂肪酸の役割

グリセロリン脂質は、グリセロール骨格の 1 位と 2 位に脂肪酸鎖が結合し、3 位にあたる水酸基にリン酸を介して極性基が結合している。極性基頭部の分子種の違いによって、ホスファチジルコリン (Phosphatidylcholine; PC)、ホスファチジルエタノールアミン (Phosphatidylethanolamine; PE)、ホスファチジルセリン (Phosphatidylserine; PS)、ホスファチジレイノシトール (Phosphatidylinositol; PI) 等に分類される。グリセロリン脂質は親水性の極性基からなる頭部と疎水性の脂肪酸からなる尾部を有する両親媒性脂質であり、多くのオルガネラ膜において親水基を外側に向けた形でリン脂質二重膜を構成している[22]。PC はグリセロリン脂質のうちの 50%程度を占める最も主要な種類のリン脂質であり、円柱型の構造をとって立ち並ぶ性質を利用して生体膜構造の基礎を構築している。PC の sn-2 位には不飽和脂肪酸が結合していることが多く、不飽和脂肪酸を有することで生体温度における流動性を維持して、オルガネラ膜上でのタンパク質の機能発現に役立っている[23]。真核生物の細胞膜において 2 番目に主要なグリセロリン脂質は PE であり、20-30%程度を占めている。PE は PC の頭部から 3 つのメチル基が外れた構造をとり、PC よりも頭部が小さいことから尾部が広がったコーン型の構造をとって膜に負の曲率をもたらすという特徴があり、オルガネラ膜の中ではミトコンドリア膜に最も多く存在し、34-38%を占めている[24]。PS や PI は、グリセロリン脂質のうち 10%以下と比較的マイナーな分子種であるが、PS は細胞膜の内膜に局所的

に存在して二重膜の非対称性をもたらしたり[25]、PI はイノシトール環の水酸基がリン酸化されてシグナル伝達に関与したりする等、それぞれのリン脂質に固有の機能があることが知られている。

リン脂質は Kennedy 経路による *de novo* 合成と Lands 回路によるアシル鎖リモデリングの 2 種類の経路を経て生合成され、極性頭部と二本の脂肪酸鎖との組み合わせにより、数千種も存在すると言われている (Fig.1-2) [26,27]。細胞膜のリン脂質に含まれる不飽和脂肪酸は、膜の流動性を保つのに重要である。リン脂質は結合している脂肪酸の鎖長が短く不飽和度が高いほど融点が低く、分子の自由運動が活発な状態となり生体膜に流動性をもたらす。実際に、*in vitro* において人工膜の物理的性質を調べた実験では、不飽和度の高い PUFA はリン脂質膜に可塑性をもたらし、エンドサイトーシスなどの膜の変形を伴う活動におけるエネルギーコストを減少させる可能性が示されている[28]。sn-2 位に PUFA を有するリン脂質は生体機能の維持に必須であり、PC の PUFA が著しく減少すると小腸での脂質吸収が低下して新生致死することや[29]、PI 中の PUFA が減少すると脳の発達が低下して新生致死すること[30]が報告されている。また最近では、PC へのアラキドン酸の導入を担う脂肪酸転移酵素 LPCAT3 (Lysophosphatidylcholine acyl transferase 3) の欠損マウスから採取した初代培養肝細胞において、流動性の低い膜が形成されて膜の秩序化を示す GP 値 (Generalized polarization) が上昇することや[29]、アラキドン酸や DHA を脂肪酸鎖に持つ PC ではオレイン酸やリノール酸を脂肪酸鎖に持つ PC と比較して中性脂肪を取り囲んで小胞を形成する能力が高いこと[31]が示されている。すなわち、FADS2 による不飽和化反応を経て産生されるアラキドン酸や DHA といった $\geq C20$ PUFA は、リノール酸などの C18PUFA とは異なる物理的性質を有し、生体膜の変形を伴う生理機能の発現において重要な役割を果たしていると考えられる。従って、PUFA は炭素数や不飽和度の違いによって物理的・生物的性質が異なっており、固有の生理学的機能を有する可能性がある。培養細胞や実験動物を用いて個々の PUFA の機能を比較検討する実験はこれまでも行われているが、炭素数 18 の PUFA を供給すると生体内でアラキドン酸や EPA、DHA といった炭素数 20 以上の PUFA に代謝されることから、脂肪酸の機

能性を評価する研究において、C18PUFA を与えた際の効果がそれ自身によるものであるのか、鎖長伸長や不飽和化を経て産生された \geq C20PUFA の効果であるのかを判断することは極めて難しい。

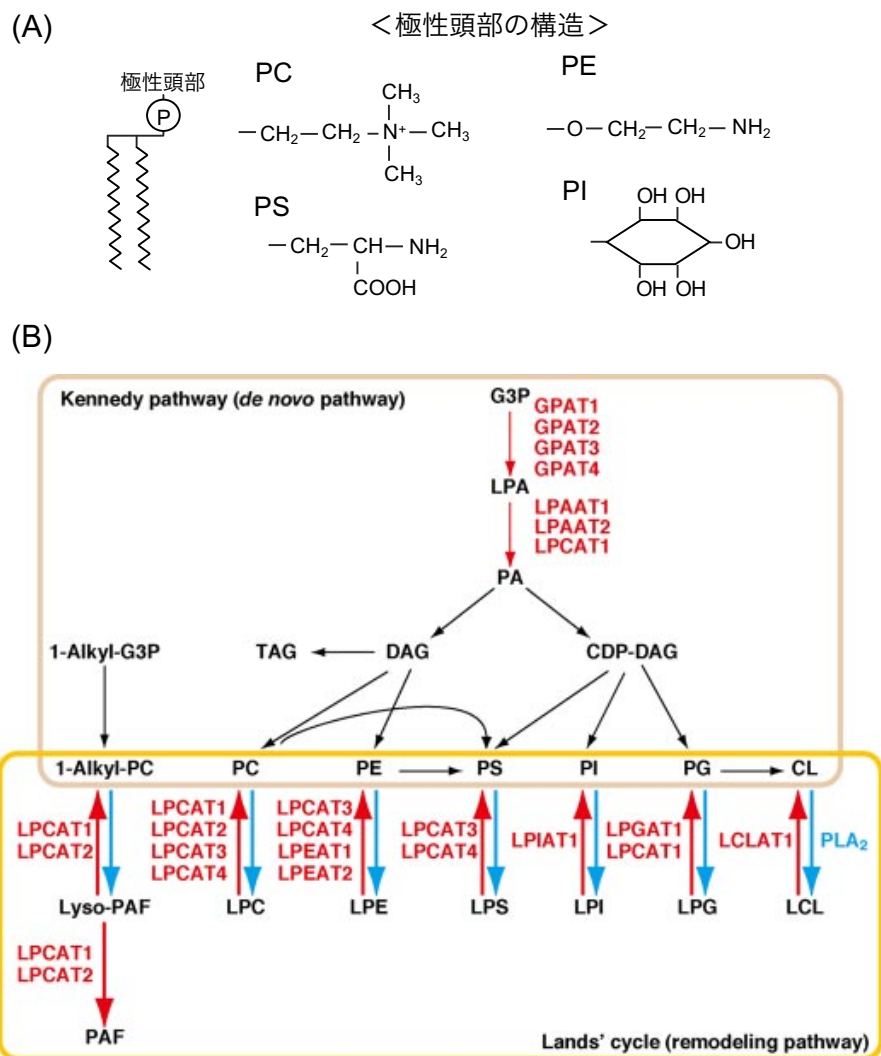


Fig. 1-2 (A)リン脂質の構造

(B)リン脂質の生合成経路 (文献 26 より引用)

1-5. 転写因子を介した脂質合成の制御

細胞内および全身において脂質のレベルを一定に保つことは、生理学的恒常性の維持において重要である。生体内の脂質レベルの調整は、内因性の合成、食事からの摂取およ

び吸収、体外への排泄や代謝変換のバランスによって保たれている。多くの動物は飢餓や冬眠の様なエネルギーが不足する時に備えて、あるいはヒトなど間隔を置いて摂食する動物では食事間のエネルギーを賄うために、余剰の炭水化物を脂肪として貯蔵する。脂質合成は過剰のグルコースやピルビン酸、乳酸、アセチル CoA などの代謝中間体を脂肪に転換するものであり、摂食サイクルの同化の時期に起こる。食事のエネルギー制限、高脂肪食、あるいは糖尿病のようなインスリンの欠乏した状況下では脂質合成の速度は低下する。このような栄養状態に応答した脂質合成の調節にはいくつかの核内受容体や転写因子が関与することが知られている。例えば、LXR (Liver X receptor) や PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor)、FXR (Farnesoid X receptor) などの核内受容体は、内因性の脂質リガンドによって活性化されて脂質代謝に関与する遺伝子の発現を制御する[32]。また、転写因子 SREBP (Sterol regulatory element binding protein) は、生体膜の主成分となる不飽和脂肪酸やコレステロールの代謝制御において中心的役割を有する[33]。

SREBPs は basic helix-loop-helix (bHLH) ファミリーの転写因子であり、SREBP-1a, 1c, 2 と呼ばれる 3 つのアイソフォームが存在する。SREBPs は非活性型の前駆体として小胞体膜に結合した形で合成され、アミノ末端はヘリックスループロイシンジッパー領域を有する一般的な転写因子で、カルボキシ末端の制御ドメインが SCAP (SREBP cleavage-activating protein) と結合し、SREBP の活性化を制御している[34-37]。また、アミノ末端とカルボキシ末端がサイトゾル側に露出し、中心部のループが小胞体内腔側に位置した形をとっている[38-40]。コレステロールなどの脂質が枯渇した細胞では、SCAP が SREBP の COPII 小胞への取り込みを促進し、ゴルジ体へと輸送させる。ゴルジ体において、SREBPs はタンパク質プロテアーゼ S1P (site-1 protease) および S2P (site-2 protease) による切断を受けて成熟型となり[41-43]、転写誘導活性を持つアミノ末端側のフラグメントがサイトゾルへと放出された後、核内に移行し、脂質代謝に関与する遺伝子のプロモーター領域に存在する SRE 配列に結合して標的遺伝子の転写を誘導する[44] (Fig.1-3)。SREBP-1c は脂肪酸合成に関与する遺伝子、SREBP-2 はコレステロール合成経路の酵素などのステロール代謝関連遺伝子の転写を制御する。SREBP-

1c は脂肪酸合成に關与する酵素をコードする遺伝子である ACC (Acetyl-CoA carboxylase)、FASN (Fatty acid synthase)、SCD (Stearoyl-CoA desaturase) などの転写を活性化する。そして、脂質合成のマスターレギュレーターである SREBP-1c の遺伝子発現は、インスリンによって LXR や mTORC1 (mammalian target of rapamycin 1) を介して誘導される[45, 46]。また、SREBP1 のもう 1 つのアイソフォームである SREBP-1a は、脾臓や骨髓由来マクロファージに高度に発現し、脂肪酸およびコレステロールの代謝に關連する遺伝子の双方の発現を制御する。以上のように、SREBP は脂質が枯渇した細胞において脂肪酸やコレステロールの合成を促進するフィードバック機構を担っていると考えられている。

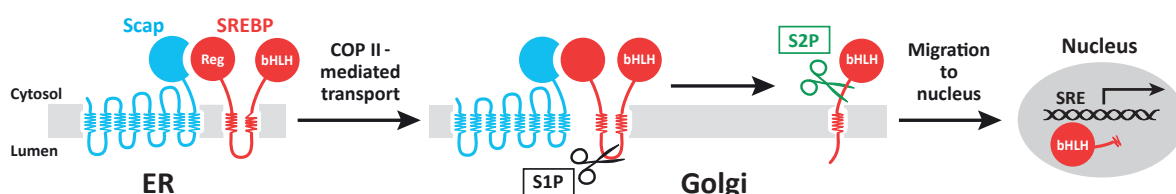


Fig. 1-3 転写因子 SREBPs の活性化機構

(文献 33 より引用)

1-6. コレステロール恒常性の制御

コレステロールは、アセチル CoA を原料として 30 段階以上に及ぶステップを経て合成される。肝臓はコレステロール合成の最も盛んな臓器であり、全身のコレステロールの 50%以上が肝臓で合成されている。コレステロール合成は ATP、NADPH、NADH を必要とするエネルギー消費の多い工程であり、厳密に制御されている。コレステロールの代謝調節には、個々の細胞単位で厳密なネガティブ・フィードバックが機能しており、細胞内のコレステロール量が多くなると、コレステロールの合成に關わる複数の遺伝子の発現が減少し、同時に LDL 受容体の発現も低下し、細胞内コレステロールを減少させる方向へと進む。一方、細胞内コレステロールが減少すると、これとは逆の減少が起きる。このような遺伝子発現制御の調節因子として主要な役割を果たすのが SREBP であり、コレステロール量の増減に伴い活性が調節さ

れ、応答遺伝子を転写レベルで制御する。このコレステロール調節に主に関与するのは、2 種類の SREBP のうち SREBP-2 であり、小胞体膜上のコレステロール濃度の変化を鋭敏に感知して、シグモイド曲線的に活性が変化する[47]。

哺乳動物はステロイド骨格を分解する酵素を持っていないことから、肝細胞内のコレステロールを減少させるためには、細胞外へ輸送、もしくは胆汁酸へと異化する必要がある。胆汁酸はコレステロールから合成され、CYP7A1 (Cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1) または CYP27A1 (Cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1) によるコレステロールの 7 α 位または 27 位の水酸化反応が律速段階である。胆管から分泌された胆汁酸はほとんど全てが回腸で回収され、門脈を経て肝臓へと戻るが、ごく小部分は吸収を免れ、体外へ排泄される。排泄されるのは 1%程度ではあるが、これがコレステロール排出の主要な経路をなしている。これらのコレステロール排出に関与する酵素は LXR の標的遺伝子であり、LXR は酸化コレステロールをリガンドとする。コレステロールの誘導体である酸化コレステロールが LXR を活性化してコレステロールの異化に関与する遺伝子の転写を促進することで、コレステロールの過剰な蓄積を抑制するフィードバック機構が機能している。また、肝臓ではコレステロール分子そのものの形でも、ABCG5/8 (ATP-binding cassette (ABC) transporters G5/8) ヘテロダイマーを介して胆管へと排出される[48-50]。

コレステロール恒常性の維持には臓器間でのコレステロール輸送も重要である。食事由来あるいは肝臓で合成されたコレステロールは、まず VLDL 粒子の一部として血中に放出される。VLDL 粒子は血中でリポタンパク質リパーゼ (LPL) の作用を受けてトリグリセリドが脂肪酸とグリセロールに分解されて LDL 粒子となり、末梢組織に脂肪酸を供給する。HDL は肝臓や小腸、膵臓で産生され、産生初期には脂質含量の少ない小粒子のリポタンパク質である。その後、LCAT (Lecithin cholesterol acyl transferase) の作用によって末梢細胞の細胞膜からコレステロールが引き抜かれ、コレステロールエステルが作られて HDL 粒子の中心部にパッキングされ、HDL 粒子は成熟型 HDL となる。そして HDL 粒子内のコレステロールエステルは、SR-BI (Scavenger receptor class B type 1) を介して肝臓に取り込まれ、肝臓においてコレス

テロール異化の経路に進む[51, 52]。HDL によるこれらの経路はコレステロール逆転送系と呼ばれる。

1-7. 脂肪肝と多価不飽和脂肪酸の関連

非アルコール性脂肪性肝疾患（Nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD）は、過度な飲酒歴がなく、肝臓に中性脂肪やコレステロールが蓄積した状態から、線維化や炎症を伴うものまでが含まれ、肝疾患の死亡率増加の要因となっている[53]。脂肪肝そのものは比較的良性であると考えられるが、炎症や線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎（Nonalcoholic steatohepatitis; NASH）へと進行するとさらなる肝障害の引き金となり、介入なしでは肝臓移植を余儀なくされる[54]。NAFLD は、糖尿病、肥満、高血圧、脂質異常症といった代謝性疾患の要素を包含する多因子疾患であり、正確な NAFLD の発症要因は不明である[55]。NAFLD の治療としては、チアゾリジンなどのインスリン増感剤、スタチンなどの脂質低下薬、 α -トコフェノールなどの抗酸化剤が提案されているが、安全で効果的な薬理学的アプローチは未だ確立されていない[56]。NAFLD 患者では、空腹時の肝臓中性脂肪の 26%が *de novo* 合成由来であり、健常者で観察される 5%よりも高い数値となっていることから[57]、脂質合成の増加は NAFLD の進展を促す要因として重要であると考えられる。また、NASH 患者から採取した肝臓のトランスクリプトーム解析の結果では、NASH において発現が上昇する遺伝子として、PUFA の不飽和化に関与する FADS1 と FADS2 が同定されており、PUFA の不飽和化が肝障害の進行に関与している可能性が示唆されている[58]。

FADS2 ゲノム領域における一塩基多型（Single nucleotide polymorphism; SNP）のマイナーアレルを有する者では不飽和化活性が低下することが示されている[59, 60]。FADS 遺伝子座における rs174556 等のマイナーアレルは、冠動脈疾患や急性冠症候群と有意に関連することが報告されており[61, 62]、FADS の不飽和化活性が低下することは代謝疾患のリスクと関連している可能性がある。また最近では、アジア人において FADS のマイナーアレルが NAFLD のリスクファクターであることも示されており[63]、FADS を介した HUFA の産生が

NAFLD のリスク軽減の役割を果たしている可能性が考えられる。さらに、NASH 患者に対して PUFA を豊富に含む魚油を与える治療を行なったヒト臨床試験では、ALT および AST レベル、血中中性脂肪、総コレステロールなどと言った NASH パラメーターの改善が示されており、PUFA の NASH の治療における有効性が期待されている[64]。また、n-3 系 PUFA が肝脂肪含量や脂肪肝スコアの改善にもたらす効果を検証したメタアナリシスにおいても、改善効果を実証されている[65]。PUFA がもたらす脂肪肝病態抑制の機序としては、SREBP-1c および ChREBP (Carbohydrate-responsive element-binding protein) の抑制を介した脂肪酸合成の低下、PPAR α の活性を介した脂肪酸分解の促進、炎症性サイトカインの産生抑制が挙げられている[66]。例えば、脂肪肝を発症するレプチン欠乏 ob/ob マウスに EPA あるいは魚油を与えると、成熟型 SREBP-1 の減少と肝臓中性脂肪の低下が認められること[67]、高炭水化物食を与えて脂肪肝を誘導したマウスに、PUFA (リノール酸、EPA、DHA の混合物) を与えると SREBP-1c および ChREBP の活性抑制を伴って解糖系と脂質合成の低下が見られること[68]が報告されている。上述の報告のように脂肪肝を発症した実験動物や患者に PUFA を供給した際の影響を調べた研究に比べると、PUFA が欠乏した際の影響と分子機構に関する研究は非常に少ない。

1-8. 本研究の目的

PUFA は生体内において多様な役割を有し、生体機能の恒常性維持に必須である。また、炭素数 20 以上の PUFA はリン脂質に導入されてオルガネラ膜を形成したり、酸化物に代謝されたりすると特有の生理機能を有する。必須脂肪酸欠乏症の脂肪肝の発症機序は完全には明かされておらず、どのような PUFA が欠乏したときに、脂肪肝の悪化が誘導されるかは不明である。

我々の研究室では、食事由来および内因性の PUFA を欠乏させたときの肝臓に対する影響を調べるために、必須脂肪酸欠乏マウスに FADS2 の酵素的阻害剤を与え、肝臓の脂肪酸組成の変化と脂肪蓄積を調べた。必須脂肪酸欠乏マウスでは、通常食を与えたマウスと比

較して肝臓の n-3 系および n-6 系の PUFA が減少し、ミード酸が検出された。FADS2 の阻害剤を与えた必須脂肪酸欠乏マウスは、通常の必須脂肪酸欠乏マウスに比べて n-3 系および n-6 系 PUFA がさらに減少するという結果は得られず、内因性の PUFA であるミード酸のみが半分程度減少した。さらに、FADS2 の阻害剤を与えた必須脂肪酸欠乏マウスでは肝臓の中性脂肪の蓄積が亢進したことから、ミード酸が必須脂肪酸欠乏時に脂肪肝の軽減に寄与している可能性を提示した[69]。また、必須脂肪酸欠乏食を与えたマウスの肝臓では、リノール酸などの C18PUFA は 10%程度となり著しく減少したのに対し、アラキドン酸や DHA などの \geq C20PUFA は半分以上維持されており減少が穏やかであった。したがって、必須脂肪酸欠乏マウスでは体内に残存している C18PUFA が積極的に \geq C20PUFA へと代謝された可能性が考えられる。

本研究では、C18PUFA から \geq C20PUFA の産生の律速酵素である FADS2 の欠損マウスを用いることで、C18PUFA から \geq C20PUFA の代謝を完全に抑制した際の肝臓の脂肪蓄積に対する影響とその機序について調べ、脂肪肝の発症や悪化の抑制における HUFA の重要性を明らかにする。また、 \geq C20PUFA が著しく減少した FADS2 欠損マウスにおけるリン脂質の脂肪酸鎖の詳細な解析を行い、FADS2 欠損マウスで特異的に産生される PUFA を同定し、リン脂質における脂肪酸組成の特徴を検討した。

第二章 必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスにおける肝臓の脂肪蓄積

アラキドン酸や DHA などの炭素数 20 以上の PUFA は、多様な生理作用を有し、生体の恒常性維持に寄与していることが広く知られている。これらの $\geq C20$ PUFA は生体内で合成することができず、食事からの摂取あるいはリノール酸や α リノレン酸などの必須脂肪酸を原料として産生する必要がある。野生型マウスに必須脂肪酸欠乏食を与えると、リノール酸などの C18PUFA は著しく減少する一方で $\geq C20$ PUFA は比較的維持される。すなわち、必須脂肪酸欠乏時には FADS や ELOVL を介した炭素数 20 以上の PUFA である HUFA の産生が頑強に行われている可能性がある。また、生体内で PUFA が欠乏すると、ミード酸と呼ばれる炭素数 20 の HUFA が産生されることが知られており、ミード酸は PUFA の欠乏を補う機能を有している可能性がある。そして、これらの HUFA の合成において律速段階となる不飽和化反応を触媒する酵素が FADS2 である。我々は以前の研究において、必須脂肪酸欠乏マウスに FADS2 阻害剤処理を行うと肝臓に中性脂質が蓄積することを報告している[69]。そして、肝臓における中性脂肪の蓄積には、肝臓から血中の脂質の移行を担う VLDL の分泌障害が要因である可能性を明らかにした。その際、FADS2 の阻害剤を与えたマウスの肝臓では内因性の HUFA であるミード酸のみが減少し、アラキドン酸や DHA の減少はみられなかった。従って、以前の研究における FADS2 阻害の方法は、アラキドン酸や DHA の産生を抑制するためには不十分であることが分かった。

そこで本研究では、FADS2 の欠損マウスに必須脂肪酸欠乏食を与えることでミード酸とともにアラキドン酸や DHA などの食事由来の HUFA も減少したマウスを作成する。必須脂肪酸欠乏下において FADS2 を介した HUFA の合成を阻害した際の肝臓における表現型の変化とその制御機構を調べ、FADS2 を介して HUFA が合成されることの生理的意義を解明することを目的とした。

第二節 実験方法

第一項 実験動物および実験食

CRISPER-Cas9 システムにより作成した C57BL/6J 系統の FADS2 欠損マウスを順天堂大学よりご供与頂き使用した。ヘテロ欠損マウスを掛け合わせて得られた野生型 (WT) もしくは欠損型 (KO) の仔マウスを 5 週齢時に離乳し、実験食開始前までは飼育繁殖用餌 CE-2 (日本クレア) を与えて飼育した。なお、食餌、水は自由摂取させた。マウスはプラスチックケージに収容し、設定温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、設定湿度 40-70%、12 時間明暗サイクル (明期: 午前 8:00~午後 8:00) の環境で飼育した。動物実験は、国立大学法人お茶の水女子大学動物実験に関する規則に基づいて実施した。実験食は AIN-93G を基準とし、大豆油を脂質源とする通常食 (CONT 食) もしくはトリパルミチン (TG-C16:0、東京化成工業株式会社) を脂質源とする必須脂肪酸欠乏食 (DEF 食) を用いた。各食餌の組成を Table 2-1-1 に示す。

Table 2-1-1 CONT 食及び DEF 食の食餌組成

(g/kg)	CONT	DEF
Corn starch	367.486	367.486
Sucrose	100	100
Casein	200	200
Soybean oil	70	--
Tripalmitate	--	70
Cellulose	50	50
Mineral mixture (AIN93G-MX)	35	35
Vitamin mixture (AIN93-VX)	10	10
L-Cystine	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5
tert-Butylhydroquinone	0.014	0.014

WT マウスには CONT 食あるいは DEF 食を (WT-CONT または WT-DEF 群)、KO マウスには DEF 食を 4 週間与えた (KO-DEF 群)。それぞれ雄性 11 週齢のマウスを用いた。特に記載のない場合には、絶食期間は設けず摂食下にて屠殺した。飼育終了後に三種混合麻酔薬 [ドミツール (日本全薬工業) 0.3 mg/kg + ミダゾラム (富士製薬) 4 mg/kg + ベトルフェール (明治製菓ファルマ) 5 mg/kg] を腹腔内に注射して麻酔後、心臓採血により屠殺した。血液はヘパリンにて抗凝固処理を施し、遠心分離 (12,000 rpm, 10 分) の後に血漿を採取した。生理食塩水にて全身灌流を行った後、各臓器を摘出し、採取した血漿および臓器は液体窒素内にて急速冷却し、-80°Cにて保管した。

第二項 組織染色

肝臓切片のヘマトキシリン&エオシン染色 (H&E 染色) は、4% PFA (パラフォルムアルデヒド) を含む PBS を用いて肝臓を灌流固定した後、4%PFA を含む PBS 内で浸漬固定し、パラフィンブロックの作成と HE 染色標本の作成をジェノスタッフ株式会社に委託した。撮影にはオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 (キーエンス) を用いた。

第三項 脂質解析

A. 脂質抽出

Bligh & Dyer 法[70]により全脂質の抽出を行った。サンプルは液体窒素から取り出した肝臓を凍結したまま砕き、約 50 mg をメタノールが 1 ml 入っているエッペンにサンプリングした。ポッター型ホモジナイザーでホモジナイズ後、メタノール 1 mL とクロロホルム 1 mL で再度ホモジナイズした。その後、800 μ L の純水を加えて 5 分間振とうし、一層になることを確認した。これに 1 mL クロロホルムと 1 mL 0.9% KCl を加え、5 分間振とうし、常温にて 2,500 rpm で 5 分間遠心分離した。下層をガラスチューブに回収し、酸性リン脂質等を抽

出するため、上層に 2 mL クロロホルムと 20 μ L 1N HCl を加えた。5 分間振とうし、常温にて 2,500 rpm で 5 分間遠心分離した後、再び下層を回収し窒素乾固した。クロロホルム-メタノール (2:1, v/v) に再溶解し、窒素封入後、-20°Cにて保存した。

B. 脂肪酸のメチルエステル化

測定サンプルに内部標準として Pentadecanoic acid (C15:0, SIGMA) を 25 μ g 加え、窒素乾固後、2 mL メタノールと濃硫酸 50 μ L を加え、80 °Cで 2 時間加温した。室温冷却後、2 mL のヘキサンと 1.5 mL の H₂O を加えて振とうし、常温にて 3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。上層を回収し、2 mL の 2% KHCO₃ を加えて再度振とうし、常温にて 3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。上層を回収して窒素乾固後、100 μ L のヘキサンに再溶解し、GC-MS 分析に供した。

C. ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS) による脂肪酸分析

脂肪酸の測定には GCMS-QP2010 Ultra 質量分析計 (島津製作所) を用いた。GC のカラムには、Select FAME (50 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m phase thickness, VARIAN) を用いた。キャリアガスは高純度ヘリウムを用い、カラム流速は 0.73 ml/min、スプリット比は 20 に設定した。インジェクター温度は 250°C、インターフェース温度は 250°Cとした。カラムの昇温条件は 120°Cで 1 分間保持し、200°Cになるまで 10°C/min で昇温後、5 分間保持した。その後、220°Cになるまで 2°C/min で昇温し、9 分間保持した。MS のイオン化法は電子衝撃イオン化 (electron impact, EI) 法を用いた。イオン源の温度は 200°Cで、選択イオン検出法 (SIM 法) による内部標準法にて、各脂肪酸の定量を行った。

D. 脂質のケン化

脂質抽出物を窒素下で乾固させた後、1M KOH を 4 mL 加え、70°C の湯浴で 60 分間反応させた。その後 H₂O を 4 mL とヘキサンを 4 mL 加えて 5 分間振とう抽出し、2,500 rpm

で 5 分間遠心分離した後、上層を回収した。上記の抽出操作を計 3 回行い、不ケン化物を回収した。

E. ステロールのトリメチルシリル (TMS) 誘導体化

回収した不ケン化物に乾燥ピリジン:ヘキサメチルジシラザン:トリメチルクロロシラン (9:3:1, v/v/v) の混合液 0.2 mL を加えて 5 分おきに軽く振り、室温で 30 分間反応させてトリメチルシリル (TMS) 誘導体化を行った。窒素下にて溶媒を除去後、乾燥酢酸エチルを 1 mL 加えて、1,200 g で 5 分間遠心分離した。内部標準には 5- α -cholestane を 20 ng 加え、同時に反応を行った。上層を分取し、200 μ L のヘキサンに溶解して GC-MS に供した。

E. ステロールの GC-MS 分析条件

ステロールの測定には GCMS-QP2010 Ultra 質量分析計 (島津製作所) を用いた。GC のカラムには SPB-1 fused silica capillary column (60 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m phase thickness, Supelco, USA) を用いた。キャリアーガスは高純度ヘリウムを用い、流速 1.5 mL/min、スプリット比は 5 に設定した。カラム温度は、初期温度 180°C で 1 分保持し、毎分 20°C で 250°C まで昇温させた。さらに毎分 5°C で 290°C に昇温し、その温度を 37.5 分維持した。インジェクター温度は 300°C、インターフェイス温度は 300°C とした。イオン源の温度は 200°C で、イオン化法は EI 法を用いた。なお、定量には SIM 法を用いた。

F. 中性脂肪の定量

中性脂肪の定量はトリグリセライド E-テストワコー (和光純薬工業) を用いて行った。脂質抽出したサンプルをガラス試験管に分取し、窒素乾固した。これをイソプロパノールに溶解し、発色試薬 1 mL を加えてよく混合し 37°C で 5 分間加温した後、96 well plate に各 200 μ L ずつ分注し、SpectraMax 340PC384 分光光度計 (Molecular Devices) を用いて 600 nm における吸光度を測定した。検量線はキット添付の基準液を用いて同様の方法で作成した。

G. 血漿および胆汁コレステロール濃度の測定

血漿および胆汁のコレステロール量の定量には、ラボアッセイ™ コレステロール (Wako) を用い、製品に付属の測定方法に従って測定した。

H. 総胆汁酸 (Total bile acid) の測定

血中総胆汁酸量の測定は、オリエンタル酵母工業株式会社に委託した。

I. 血漿のリポタンパク質画分の測定

血漿 35 μ l を各群 2 サンプルずつ、ゲルろ過 HPLC 法によるリポタンパク質画分の分析を行なった。これらの解析は(株)スカイライト・バイオテックへ委託した。

J. 薄層クロマトグラフィーによるリン脂質の分画

薄層クロマトグラフィー (Thin layer chromatography: TLC) によるリン脂質の分画サンプルには血漿 50 μ L または肝臓約 5 mg の脂質抽出物を用いた。TLC プレート (TLC Silicagel 60, Merck) は、使用前に 120°C で 30 分間活性化させた。展開溶媒は、クロロホルム : 酢酸メチル : 1-プロパノール : メタノール : 0.25% KCl = 25 : 25 : 25 : 10 : 9 とし、あらかじめ濾紙にしみ込ませて展開槽に充満させた。脂質抽出物と同時に各リン脂質の標品もスポットした。用いたリン脂質の標品は PC (ホスファチジルコリン) (L- α -PC-Dioleoyl) である。展開後、TLC プレートを約 20 分間室温放置して乾燥させた。発色には 1 mg のプリムリン (MP Biomedicals) を 100 mL のアセトン-水 (4:1, v/v) に溶解したものを噴霧した。乾燥後、紫外線を照射し、PC のスポットを確認した。

K. リン脂質の脂肪酸組成の測定

TLC によって分画したリン脂質は、2 mL のメタノール中に保存し、Bligh & Dyer 法

にて脂質抽出を行った後、メチルエステル化を行い、GC-MSにて脂肪酸組成を測定した。

第四項 定量 PCR

A. RNA 抽出

液体窒素から取り出した肝臓を凍結したまま砕き、約 50 mg を TRIzol 試薬 (Invitrogen) が 1,000 μ l 入っているエッペンにサンプリングした。ポッター型ホモジナイザーでホモジナイズした後、4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。クロロホルム 250 μ l を加えて vortex し、4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心分離してタンパク沈殿させた。上清を別のエッペンに分取し、イソプロパノール 500 μ l を加え、転倒混和後 10 分間室温に静置した後に 4°C、15,000rpm で 10 分間遠心分離して RNA 沈殿させた。沈殿を回収し、70%エタノールを 950 μ l 加えて vortex し、洗浄した。4°C、10,000 rpm で 5 分間遠心分離した後、沈殿を回収して風乾し、DEPC 水で再溶解した。

B. 逆転写 (cDNA 合成)

RNA 濃度を BioSpec-nano (SHIMADZU) を用いて測定し、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いて逆転写を行った。方法は製品に付属の使用方法に従い、反応には S11000™ Thermal Cyclers (BIO RAD) を用いた。

C. 定量 PCR

逆転写で合成した cDNA とスタンダードを鋳型として、THUNDERBIRD® SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて定量 PCR 反応を行った。定量 PCR 反応後、beta-actin をハウスキーピング遺伝子として用い、 $\Delta\Delta C_t$ 法によりサイクル数を標準化した。用いたプライマーの配列を Table 2-2-2 に示す。

Table 2-2-2 定量 RT-PCR に用いたプライマーの配列

Target	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
Beta-actin	GCCAACCGTGAAAAGATGAC	CCAGAGGCATACAGGGACAG
Srebf-1a	GAACAGACACTGGCCGAGAT	CTTGGTTGTTGATGAGCTGGA
Srebf-1c	AAGCTGTCTGGGGTAGCGTCT	CTTGGTTGTTGATGAGCTGGAG
Fasn	TTGCCCGAGTCAGAGAACC	ATAGAGCCCAGCCTTCCATC
Scd-1	TACACCTGCCTCTTCGGGATT	GCCGTGCCTTGTAAGTTCTGT
Acc	GAAAATCCACAATGCCAACC	TTGCTTCTCCAGCCACTCC
Insig-1	GTCCTGGGTGTGATGAAGATG	GTGGGGGAGCAAGGTAAGAC
Insig-2a	CCCTCAATGAATGTACTGAAGGAT T	TGTGAAGTGAAGCAGACCAATGT
Chrebp	TCATCTGGGTTTACTGTTGTGAAG	GTCTCCCCCTCAAACCTGTCC
Pklr	AGAAGGTGGAGGGGCTACTG	TCATCTGGGTTTACTGTTGTGAAG
Cpt1a	CAACAACGGCAGAGCAGAG	GGACACCACATAGAGGCAGAAG
Mcad	GCAGAGAAGAAGGGTGACGAG	CGTGCCAACAAGAAATACCAG
Srebf2	GACCAGCACCCATACTCAGG	CACCATTTACCAGCCACAGG
Hmgcr	CCAGGAGCGAACCAAGAGAG	CAGAAGCCCCAAGCACAAAC
Fdps	GACGGCTTTCTACTCTTTCTACCTG	GCATTGGCGTGTTTCCTTC
Sqls	GCAAAACCAAGCAGGTCATC	GACAGGTAAATGGGGGAGTAGTG
Lss	GATTTTCCCCTTCTCTCCTGAC	ACACTGAACGCCTCTCCATC
Ldlr	GACCCAGAGCCATCGTAGTG	CACCATTCAAACCCCTTTC
Abca1	AACAGAAAACCGCAGACATCC	AACCCGCCATACCGAAAC
Scarb1	TGGGGTCTTCACTGTCTTCAC	ATCTTGCTGAGTCCGTTCCA
Apo-a1	TGTATGTGGATGCGGTCAAAG	ACCCAGAGTGTCAGTTTTC
Cyp7a1	TGTCCACTTCATCACAACTCC	CATCACTTGGGTCTATGCTTCTG
Cyp27a1	GCTATGGGGTTCGGTCTTG	ATGCGGGACACAGTCTTTACTTC
Abcg5	GCTGAGGCGAGTAACAAGAAAC	GCGGAGAAGGTAGAAAATGAGG
Abcg8	AGGCAAAGGAACTCAACACAAG	CAGGGTGGAAAACCTGCTCTATC

第五項 Western blotting

A. 肝臓からのタンパク質抽出

凍結した肝臓を砕き、その一部をプロテアーゼインヒビターを加えた RIPA buffer (50 mmol/l Tris-HCl buffer (pH7.6), 150 mmol/l NaCl, 1% (w/v) Nonidet P40 substitute, 0.5 % (w/v) Sodium deoxycholate, 0.1% (w/v) Sodium dodecyl sulfate) を用いてポッター型ホモジナイザーにて氷冷下でホモジナイズした。12,000 g, 10 分間の遠心分離を行い細胞カスを取り除き、上清を-20℃にて保管した。抽出したタンパク質はプロテインアッセイ BCA キット (Wako) を用いて測定した。測定は添付されたプロトコルの手順に従って行った。

B. 血漿のタンパク質抽出

血漿 30 μ l にプロテアーゼインヒビターを加えた Lysis buffer (150 mM NaCl, 1% TritonX-100, 1 mM EDTA-2Na, 1 mM EGTA, 2.5 mM Sodium pyrophosphate, 100 μ M Na₃VO₄, 10% glycerol, 20 mM Tris-Hcl-pH7.4) を 270 μ l 加えてピペッティングした。Lysis buffer (+) の組成は Table 3-4-1 に示す。氷上に 15 分静置し、4℃、15,000 rpm で 10 分遠心分離を行った。そして、得られた上清をタンパク質画分として回収した。

C. Western blotting

SDS-PAGE に際しては、タンパク質抽出液を Sample buffer 4 \times stock solution (500 mM Tris-HCl (pH6.8), 20% glycerol, 8% SDS, 0.2% 2-mercaptoethanol, 0.004% Bromo phenol blue) で希釈し、37℃で 30 分加熱し SDS 化した。ゲル 1 lane あたりのタンパク質量が 30 μ g となるようにアプライし、8%アクリルアミドを含む分離ゲルにて電気泳動を行った (20 mA/gel)。SDS-PAGE 後のタンパク質は PVDF membrane (Immobilion Transfer Membranes, MILLIPORE) に転写した。ブロッキング液には 5% Skim milk (ナカライテスク) を 0.1% Tween20/TBS (TBST) に溶解したものをを用いた。一次抗体は Mouse anti-SREBP1 (Santacruz, sc-365513, 1:100)、Rabbit

anti-Apolipoprotein B (Abcam, ab20737, 1:2,000)、Mouse anti-SREBP-2 (Santacruz, sc-13552; clone 1C6, 1:100)を TBST に溶解して用いた。二次抗体は mIgGκ BP-HRP 抗体 (Santacruz, sc-5161-2, 1:1000) または Goat anti-rabbit 抗体 (Jackson Immuno Research, 1:10,000)を TBST に溶解して用いた。検出には ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Health Care) を用い、ルミノ・イメージアナライザー LAS-4000 (FUJIFILM) で検出した。

第六項 統計処理

統計処理にはエクセル統計 2012 を使用した。有意差検定は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を用い、危険率 5% ($p < 0.05$) をもって有意差ありとした。

第三章 結果および考察

第一項 肝臓及び血漿の脂肪酸組成の変化

CONT 食及び DEF 食を 4 週間摂食させた野生型 (WT) 及び FADS2 欠損 (KO) マウスの体重は、3 群間で違いはみられなかった。(Fig. 2-1-1)。しかし、食餌の摂食量は DEF 食を与えた WT マウスと KO マウスで、CONT 食を与えた WT マウスより多かった (Fig. 2-1-1)。CONT 食に用いた大豆油と DEF 食に用いたトリパルミチンでは吸収率が異なっており、摂食量と一致した体重変化が見られなかった可能性がある。

本項では、内因性に新規合成される脂肪酸と食事由来の脂肪酸とに分類し、それらの脂肪酸組成の違いを比較した (Fig. 2-1-2)。必須脂肪酸欠乏食を与えた WT 及び KO マウスにおける肝臓の脂肪酸組成の変化を Fig. 2-1-3 に示す。まず、DEF 食を与えた WT マウスでは通常食群と比較して、飽和脂肪酸の 16:0、一価不飽和脂肪酸の 16:1n-7 及び 18:1n-9 の増加がみられ、新規合成の脂肪酸が蓄積していた (Fig. 2-1-3A)。内因性の HUFA であるミード酸 (20:3n-9) は DEF 食を与えた WT マウスで増加したが、DEF 食を与えた KO マウスではミード酸は検出されなかった (Fig. 2-1-3A)。さらに、KO マウスではミード酸の前駆物質である 20:1n-9 が著しく増加していた。これは、FADS2 の活性消失によるものものである可能性が高い。次に、食事由来の脂肪酸に関して、DEF 食を与えた 2 群間で炭素数 18 の PUFA である 18:2n-6 に違いはみられなかった (Fig. 2-1-3B)。一方、FADS2 を介して合成される炭素数 20 以上の外来性 PUFA については、20:4n-6 や 22:6n-3 が WT-DEF 群と比較して KO-DEF 群ではさらに減少し、これらの HUFA の合成が著しく減少していることが確認できた。一方、20:5n-3 や 22:5n-3 は検出量は少ないものの、WT-CONT 群と比較して WT-DEF 群で低下し、KO-DEF 群では WT-CONT 群と同程度であった。これは、20:5n-3 および 22:5n-3 から 22:6n-3 を合成する過程で FADS2 を介した不飽和化が行われることから、FADS2 活性が消失したことを反映した結果であると考えられる。

PUFA に関して、FADS2 による不飽和化の前駆物質である炭素数 18 の PUFA の総量 (C18PUFAs: 18:2n-6 および 18:3n-3) および FADS2 の産物である炭素数 20 以上の PUFA の総量 (\geq C20PUFAs: 20:3n-6, 20:3n-9, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3) を算出した (Fig. 2-1-3C)。WT-DEF 群では C18PUFAs は 30%程度まで減少しているのに対し、 \geq C20PUFAs は 70%程度維持されており、 \geq C20PUFA の減少は緩やかだった。一方、KO-DEF 群では C18PUFAs の減少は WT-DEF 群と同程度であったが、 \geq C20PUFAs は WT-CONT 群の 5 分の 1 以下まで減少していた。即ち、必須脂肪酸欠乏の野生型マウスでは、HUFA の欠乏を補うために FADS2 を介した \geq C20PUFAs の産生が行われている可能性がある。

次に、必須脂肪酸欠乏食を与えた WT および KO マウスにおける血漿の脂肪酸組成の変化を比較した。血漿は肝臓と異なり、DEF 食を与えた KO マウスにおいて、WT マウスの 2 群に比べて飽和脂肪酸が有意に減少していた (Fig. 2-1-4A)。一方、16:1n-7 や 18:1n-9 などの一価不飽和脂肪酸は DEF 食を与えた WT 及び KO マウスで顕著に増加した。また、KO-DEF 群の血漿では、肝臓に比べると小さいものの 20:1n-9 の増加が見られた (Fig. 2-1-4A)。ミード酸に関しては、肝臓と同様 KO マウスでは検出されなかった。食事由来の PUFA に関しても、KO マウスではアラキドン酸や DHA などの PUFA が著しく減少した (Fig. 2-1-4B)。炭素数 18 の PUFA の総量を比較すると、DEF 食を与えた両群において 30%程度と同程度まで減少した (Fig. 2-1-4C)。一方、炭素数 20 以上の PUFA に関しては、WT-DEF 群では WT-CONT 群と比較して減少せず維持されていたが、KO-DEF 群では 10 分の 1 以下にまで減少していた。したがって、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS 欠損マウスでは、肝臓、血漿ともにミード酸が存在せず、炭素数 20 以上の PUFA が著しく減少することが確認された。

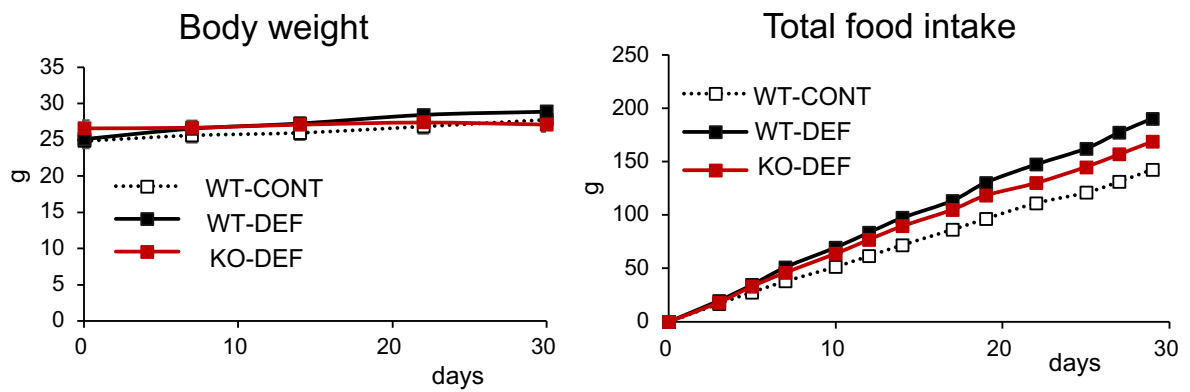


Fig. 2-1-1 摂食期間中の体重変化および累計摂食量

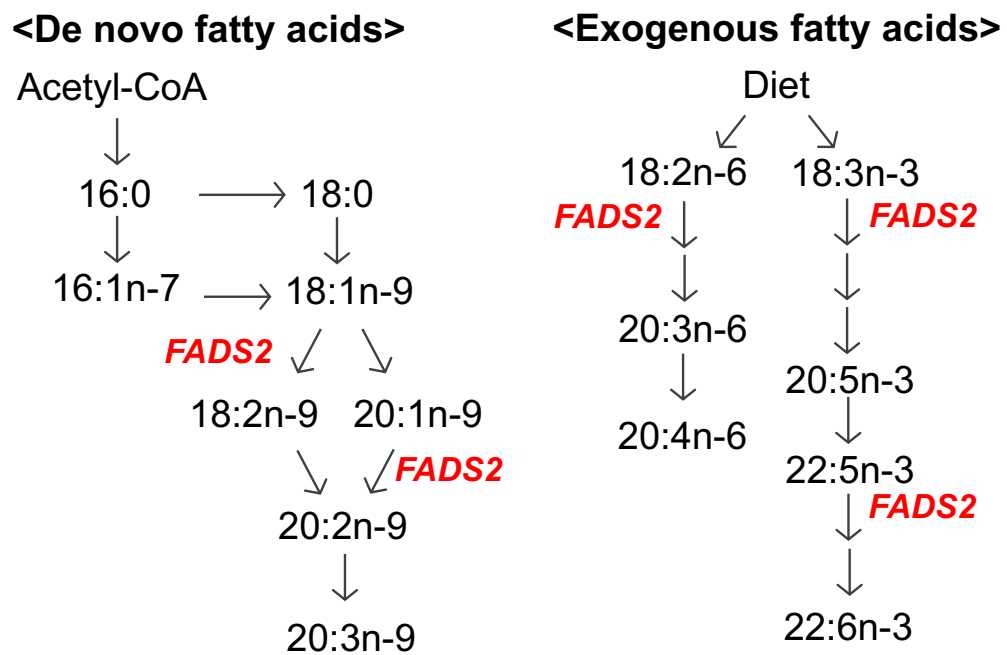
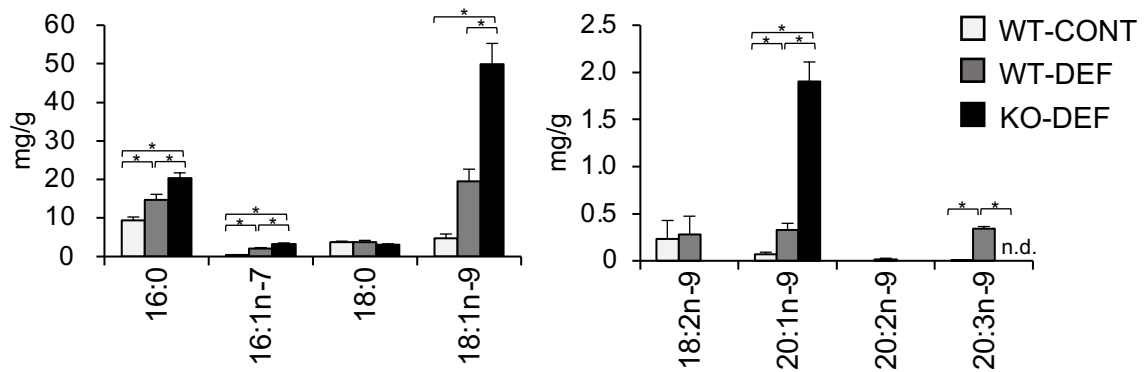
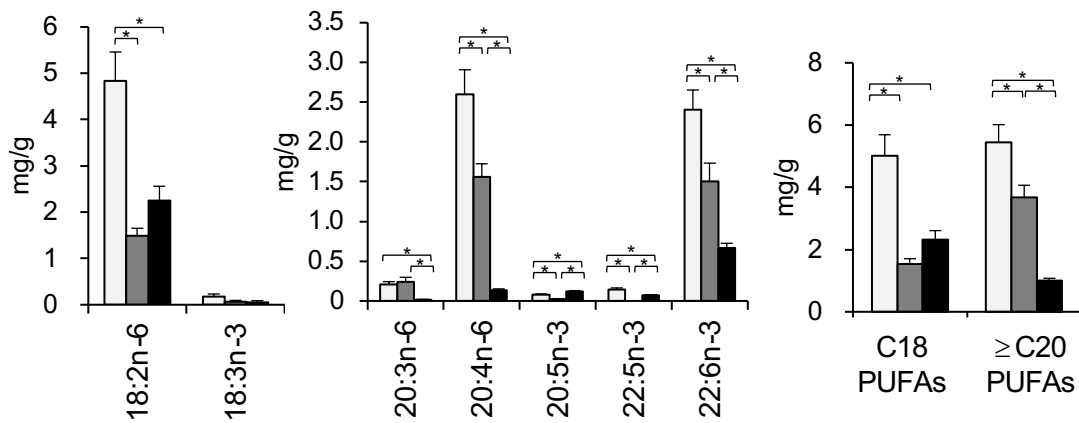


Fig. 2-1-2 内因性に合成される脂肪酸および食事由来の脂肪酸の代謝経路

(A) De novo fatty acids



(B) Exogenous fatty acids



(C)

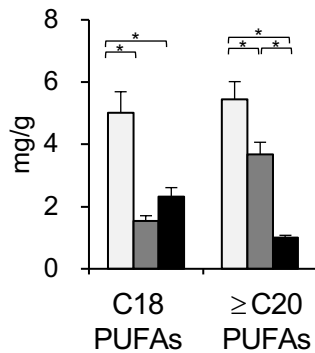


Fig. 2-1-3 必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスの肝臓における脂肪酸組成の変化

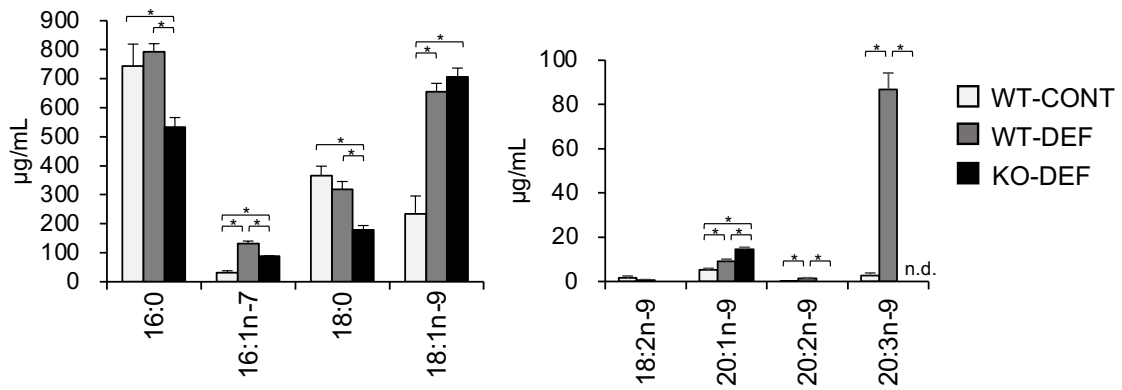
(A) 内因性に合成される脂肪酸 (B) 食事由来の脂肪酸

(C) C18PUFAs (18:2n-6, 18:3n-3) および \geq C20PUFAs (20:3n-6, 20:3n-9, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3) の合計量

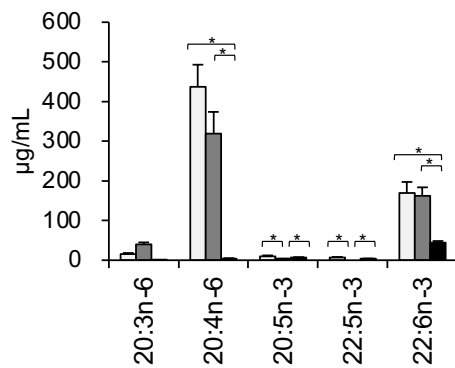
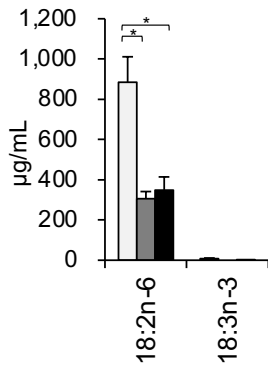
データは平均値 \pm 標準誤差で表す。統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った

(n= 5~6, *, p < 0.05)。

(A) De novo fatty acids



(B) Exogenous fatty acids



(C)

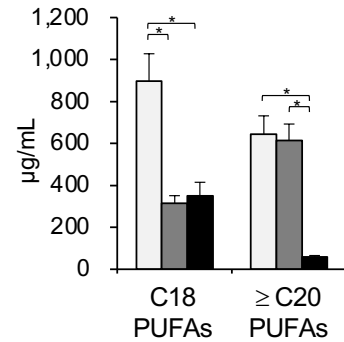


Fig. 2-1-4 必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスの血漿における脂肪酸組成の変化

(A) 内因性に合成される脂肪酸(B)食事由来の脂肪酸

(C) C18PUFAs (18:2n-6, 18:3n-3) および \geq C20PUFAs (20:3n-6, 20:3n-9, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3) の合計量

データは平均値 \pm 標準誤差で表す。統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った (n= 5~6, *, p < 0.05)。

第二項 肝臓における中性脂質の脂質蓄積

第一項の結果より、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスでは野生型マウスと比較して、炭素数 20 以上の PUFA が著しく低下することが示された。肝臓の脂肪酸組成の変化は肝障害と関連することが報告されており [71, 72]、PUFA を豊富に含む魚油を摂取することが NASH の食事療法となりうることを期待されている [64, 73]。また、必須脂肪酸欠乏時の病態の 1 つに脂肪肝が挙げられるが、特に長期静脈栄養患者における静脈栄養関連肝障害 (PNALD) の要因として、必須脂肪酸の供給が不足していることが考えられている。即ち、PUFA が著しく欠乏すると肝臓において脂肪蓄積が誘導される可能性が推察できる。そこで本項では、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスにおける肝臓の脂質蓄積を調べた。脂肪肝では主に中性脂肪とコレステロールエステルなどの中性脂質の蓄積が見られることから、これらの中性脂質の蓄積量の測定を行った。

解剖時の肝臓重量は、FADS2 欠損マウスにおいて、WT マウスの 2 群と比較して有意に高値であった (Fig. 2-2-1A)。肝臓切片の H&E 染色を行なった結果、WT-DEF 群は WT-CONT 群と比較して、白く抜けた部分が多く観察され、脂肪滴の増加が示唆された (Fig. 2-2-2)。そして、KO-DEF 群の肝臓ではさらに大滴性の脂肪滴が多く観察され、WT マウスの 2 群と比較して肝細胞に中性脂質が多く蓄積していることが示された。肝臓の中性脂肪量は必須脂肪酸欠乏食を与えた WT マウスでも 2 倍程度増加したが、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスでは CONT 食群の 4 倍以上高い値を示した (Fig. 2-2-1B)。さらに、肝臓のコレステロール量も、FADS2 欠損マウスにおいて WT マウスの 2 群と比較して 4 倍程度増加していた (Fig. 2-2-1C)。WT マウスに必須脂肪酸欠乏食を与えたマウスでは、肝臓の中性脂肪は 2 倍近く増加していたが、コレステロール量の増加は見られなかった。

これまで、通常のマウスに必須脂肪酸欠乏食を与えると肝臓において中性脂肪が蓄積するという報告はあるが [14]、我々が知る限り、肝臓のコレステロール蓄積に関する報告はない。本研究の結果より、FADS2 欠損マウスに必須脂肪酸欠乏食を与えるとさらに顕著な中

性脂肪の蓄積が誘導されるだけでなく、コレステロールが著しく蓄積することがわかった。必須脂肪酸欠乏食を与えた WT マウスと KO マウスの肝臓の脂肪酸組成を比較すると、C18PUFA の量は 2 群間での違いはみられなかったが、 \geq C20PUFA が著しく減少していたことから（第一項 Fig. 2-1-3,4）、FADS2 を介して産生される HUFA は肝臓における中性脂肪およびコレステロールの蓄積を抑制する潜在的な機能を有している可能性が示唆された。

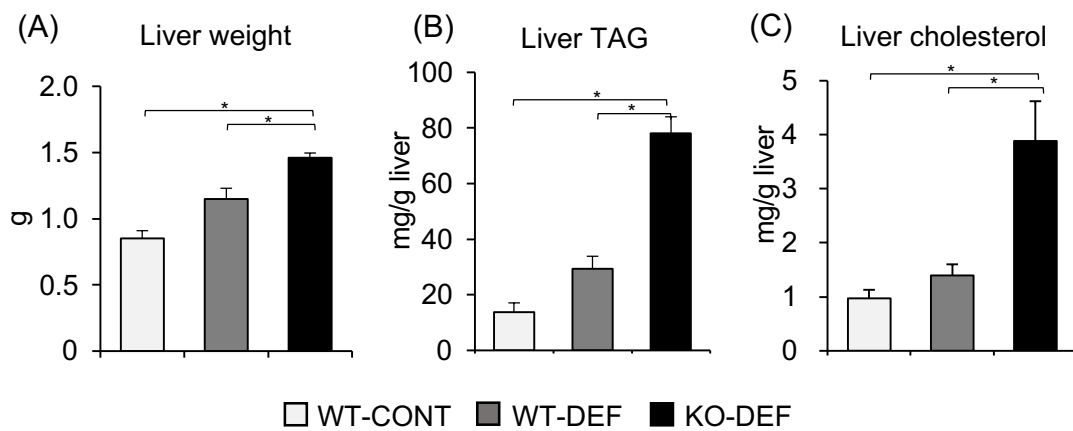


Fig. 2-2-1 必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスにおける肝臓の脂質蓄積

(A) 肝臓重量 (B) 肝臓の中性脂肪量 (C) 肝臓のコレステロール量

データは平均値±標準誤差で表す。統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った

(n= 5~6, *, p < 0.05)。

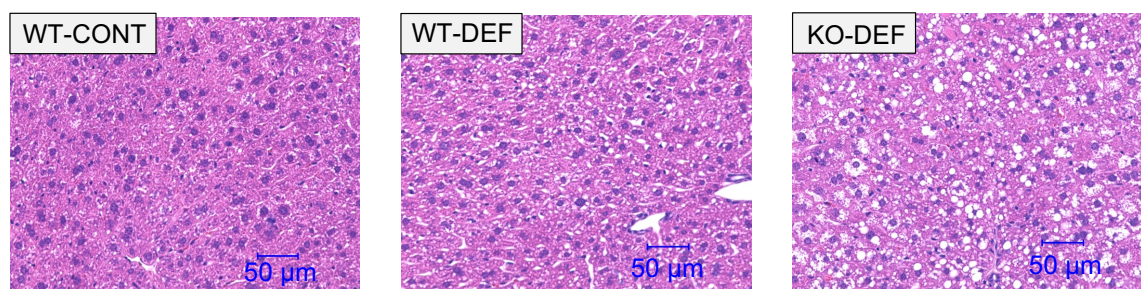


Fig. 2-2-2 肝臓切片の HE 染色

第三項 肝臓における脂肪酸合成の変化

これまでの結果より、 \geq C20 PUFAs が著しく減少した KO-DEF 群では肝臓の中性脂肪の蓄積がより顕著であることがわかった。これまでに、PUFA はいくつかの機序を介して脂質合成を低下させる作用を有することが知られている。例えば、マウスにアラキドン酸および魚油を投与すると SREBP-1c の活性抑制を介して脂肪肝が抑制されること[67]、リノール酸、アラキドン酸及び DHA は、ChREBP と SREBP-1c の活性抑制を介して解糖系と脂肪酸合成を低下させること[68]が報告されている。また、PUFA が欠乏した時の脂肪肝の発生機序について調べた研究は多くないが、ココナッツオイルを脂質源とする PUFA 欠乏食を与えたマウスでは LXR-SREBP-1c 系を介して肝臓への中性脂肪の蓄積が誘導されること[14]、必須脂肪酸欠乏食を与えたマウスでは PPAR α の DNA 結合能と脂肪酸酸化関連遺伝子の低下を介して脂肪肝が誘導されること[15]が報告されている。しかしながら、これらの報告に用いられたマウスは \geq C20 PUFA の産生が維持されているモデルであり、 \geq C20 PUFA が著しく欠乏した際の脂肪肝の機序は不明である。そこで本項では、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスにおいて、脂質合成、解糖系及び脂肪酸酸化に関与する遺伝子の変化を調べることで、 \geq C20 PUFA 欠乏時に肝臓への中性脂肪の蓄積が誘導された要因の解明を試みた。さらに、脂肪酸合成に関連する遺伝子の発現を制御する SREBP-1 のタンパク質発現と活性化についても調べた。

脂肪酸合成に関与する *Fasn*, *Acc*, *Scd* の肝臓における遺伝子発現は、WT マウスの両群と比較して FADS2 欠損マウスにおいて顕著に増加した (Fig. 2-3-1)。また、これらの脂肪酸合成遺伝子の発現を誘導する転写因子である SREBP-1c をコードする *Srebp-1c* の遺伝子発現も KO-DEF 群で有意に増加した。*Insig-1* は、SREBP 前駆体を膜にとどめて活性を抑制する INSIG のアイソフォームをコードする遺伝子である。*Insig-1* の遺伝子発現は、KO-DEF 群で増加していたが、これは *Insig-1* が SREBP-1c の標的遺伝子であること[74]を反映した結果であると考えられる。*Insig-2a* および *Srebf-1a* の遺伝子発現は FADS2 欠損マウスにおいて上昇

傾向であったが、有意な変化は認められなかった。従って、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスでは SREBP-1c とその標的遺伝子の発現が上昇していることが明らかとなった。

解糖系および脂肪酸合成遺伝子をターゲットとする転写因子 ChREBP の遺伝子発現は群間で変化していなかった (Fig. 2-3-2)。解糖系酵素である *Pklr* (Red cell/liver pyruvate kinase) の発現は KO-DEF 群において他 2 群と比較して 2.5 倍程度増加していた (Fig. 2-3-2)。解糖系は、糖質を原料として脂肪酸合成の基質となるクエン酸を供給する回路であることから、解糖系の亢進も中性脂肪の蓄積に寄与している可能性が考えられる。PUFA は ChREBP の活性抑制を介して解糖系を低下させることから [68]、PUFA が著しく欠乏した KO-DEF 群において解糖系が亢進した可能性がある。PUFA は ChREBP の mRNA 発現だけでなく脱リン酸化を介した核移行を抑制することが報告されており [68]、PUFA 欠乏時に ChREBP の活性化が起きているかどうかを結論づけるには、核移行やリン酸化状態の評価が必要である。また、PPAR α によって誘導されてミトコンドリアにおける脂肪酸 β 酸化に関与する *Cpt1a* の発現は FADS2 欠損マウスで増加し、*Mcad* の発現は 3 群間で変化していなかった (Fig. 2-3-3)。PUFA は PPAR α の活性化を介して脂肪酸分解遺伝子の転写を誘導することが報告されているが [15]、PUFA 欠乏状態の KO-DEF 群では予想外に *Cpt1a* のような脂肪酸分解遺伝子が上昇した。一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸も PPAR α の活性化作用を有することから [75, 76]、FADS2 欠損マウスにおけるオレイン酸の増加が *Cpt1a* の転写促進に影響した可能性があるが、正確な機序は明らかでない。いずれにしても、KO-DEF 群において脂肪酸酸化の低下は起きていないことが示唆された。以上の結果より、 \geq C20 PUFA 欠乏時には解糖系と脂肪酸合成の経路が亢進している可能性があり、特に脂肪酸合成に関与する遺伝子の発現上昇が顕著であることが明らかになった。ChREBP や PPAR α の厳密な活性評価には核移行やリン酸化状態の評価が必要であるが、HUFA 欠乏時には SREBP-1c 依存的に肝臓において中性脂肪の合成が亢進していることが示唆された。

次に、脂質合成遺伝子のマスターレギュレーターである転写因子 SREBP-1 のタンパク質発現を調べた。前駆体 SREBP-1 は 125 kD 程度のタンパク質として検出され、活性化後

の切断された断片が 65 kD 付近のタンパク質として検出された。SREBP-1 活性化の指標として、切断型/前駆型の比を算出したところ、KO-DEF 群において有意に増加していた (Fig. 2-3-4)。以上の結果より、HUFA が欠乏した FADS2 欠損マウスでは、SREBP-1 の活性化を介して中性脂肪の合成が増加し、肝臓において中性脂肪の蓄積が誘導された可能性が示された。

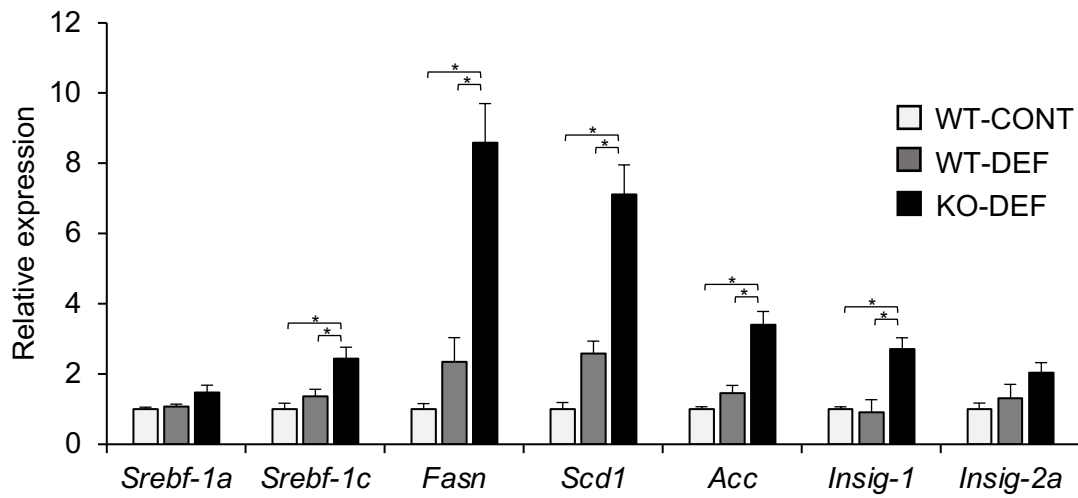


Fig. 2-3-1 脂肪酸合成に関与する遺伝子発現の変化

肝臓における遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて測定した。データは平均値±標準誤差で表す。統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った (n=5~6, *, p < 0.05)。

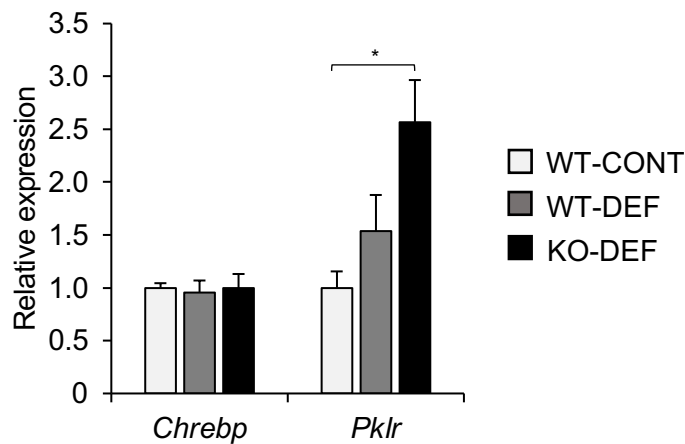


Fig. 2-3-2 解糖系に関与する遺伝子発現の変化

肝臓における遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて測定した。データは平均値±標準誤差で表す。統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った (n=5~6, *, p < 0.05)。

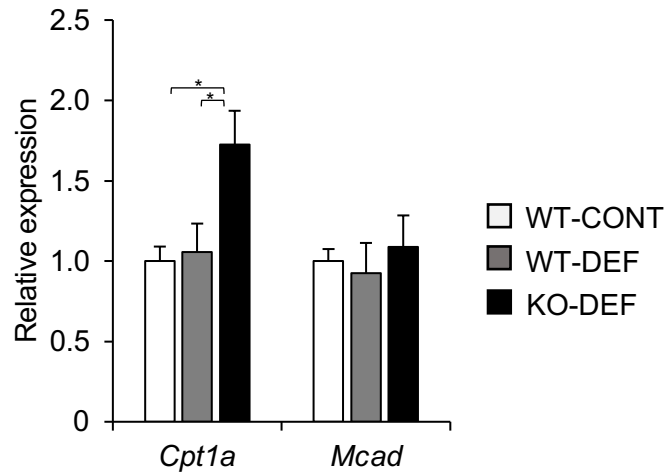


Fig. 2-3-3 脂肪酸酸化に關与する遺伝子発現の変化

肝臟における遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて測定した。データは平均値±標準誤差で表す。統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った (n=5~6, *, p < 0.05)。

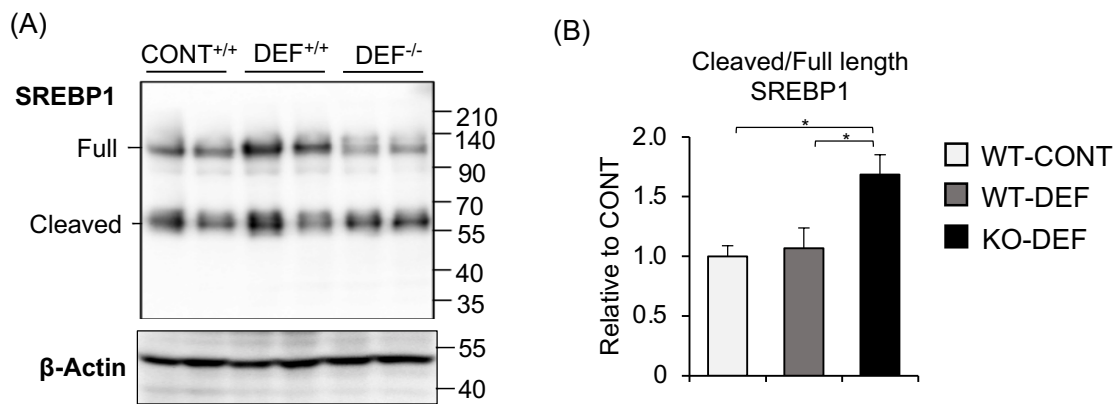


Fig. 2-3-4 SREBP-1 のタンパク質発現の変化

(A) 肝臟における SREBP-1 のタンパク質発現を western blotting 法にて測定した。Full length = 125 kDa, Cleaved form = 60 kDa. (B) western blotting にて得られたバンドを画像解析ソフト Image J を用いて定量した。データは平均値±標準誤差で表す。統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った (n=5~6, *, p < 0.05)。

第四項 中性脂肪の分泌に関与する因子への影響

肝臓に中性脂肪が蓄積する要因として、脂肪酸の合成亢進や分解低下のほかに、リポタンパク質代謝に異常が生じて肝臓からの脂質輸送が低下することが挙げられる。我々の以前の研究では、必須脂肪酸欠乏状態にあるマウスに FADS2 の阻害剤を与えて酵素活性を薬理的に阻害すると、通常の必須脂肪酸欠乏マウスと比較してミード酸が減少し、肝臓から血中への VLDL 分泌が低下して肝臓の脂質蓄積が誘導されることを示している[69]。この FADS2 阻害剤を与えたマウスでは、脂質合成遺伝子の上昇は認められず、中性脂肪の増加量も対称群の 1.6 倍程度であり、FADS2 欠損マウスと比較すると穏やかであった。必須脂肪酸欠乏状態にある FADS2 欠損マウスでは、FADS2 阻害剤を与えたマウスよりも顕著に \geq C20PUFA の低下が見られていることから、脂肪酸合成の増加だけでなく、VLDL 分泌の低下も肝臓への中性脂肪蓄積に寄与している可能性がある。

まず、肝臓での VLDL の形成に関与する因子について、ApoB のタンパク質発現に群間で変化は見られなかった (Fig. 2-4-1)。また、MTP (Microsomal triglyceride transfer protein) は小胞体の内腔で ApoB と相互作用し、VLDL 粒子の初期形成に必須の役割を果たすタンパク質である。肝臓における Mttp の遺伝子発現は 3 群間で違いはみられなかった。次に、血漿の中性脂肪濃度の測定結果を Fig. 2-4-2 に示す。FADS2 欠損マウスは WT マウスの 2 群と比較して血中の中性脂肪濃度が有意な減少を示した (Fig. 2-4-2)。従って、FADS2 欠損マウスでは、肝臓から血中への TAG の移行が低下している可能性が示唆された。続いて、血漿中の ApoB タンパク質量を Western blotting 法にて調べた。KO-DEF 群では他 2 群と比較して VLDL の構成成分である ApoB-100 及び 48 のタンパク質が減少した (Fig. 2-4-3)。以上の結果より、FADS2 欠損マウスでは、血中の中性脂肪および ApoB タンパク質が低下していることが示され、VLDL の分泌が障害されていることが示唆された。次に、血漿の各リポタンパク質画分中の中性脂肪量を調べた (Fig. 2-4-4)。Peak No. 3~7 は VLDL 画分、Peak No. 8~13 は LDL 画分、Peak No. 14~20 は HDL 画分である。KO-DEF 群は全てのリポタンパク質画分で中性脂肪

量が低値を示し、特に VLDL 画分における中性脂肪量は著しく低値であった。以上の結果より、FADS2 欠損マウスでみられた血中の中性脂肪の減少は VLDL の分泌低下によるものである可能性が示唆された。

不飽和結合を有し、低い融点を持つ PUFA は、リン脂質膜に相転移温度の低下をもたらすことから、流動性と可変性の高い膜の形成に重要である。VLDL は内部の中性脂質をリン脂質一重膜とアポ B タンパク質が取り囲んだ構造体であり、この VLDL 小胞の形成においてリン脂質膜の可変性が重要な役割を果たす。実際に、VLDL を構成する主要なリン脂質であるホスファチジルコリン (PC) に PUFA を特異的に導入する脂肪酸転移酵素 Lpcat3 (Lysophosphatidylcholine acyl transferase 3) の欠損マウスでは、アラキドン酸を脂肪酸鎖に持つ PC が減少し、VLDL 分泌の著しい低下をきたすことが報告されている[29, 31]。本研究の必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスは、FADS2 の阻害剤を与えた必須脂肪酸欠乏マウスよりも顕著な \geq C20PUFA の減少が見られており、脂肪酸合成の増加だけでなく、VLDL の分泌低下も肝臓の中性脂肪蓄積に寄与している可能性がある。従って、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスにおいて、肝臓から血中への脂質輸送に関する項目の評価を行なった。

肝臓及び血漿の PC 画分における C18PUFA と \geq C20PUFA の合計量を算出した (Fig. 2-4-5)。肝臓では、必須脂肪酸欠乏食を与えた WT マウスにおいて C18PUFA の割合が減少したが、KO マウスでは減少していなかった。血漿の C18PUFA は、WT-CONT 群と比較して必須脂肪酸欠乏食摂食の 2 群において減少し、KO マウスの方が WT マウスに比べて減少幅が小さかった。一方、 \geq C20PUFA の割合は肝臓・血漿の双方で、KO-DEF 群において WT マウスの 2 群と比較して著しく低下していた。従って、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスでは PC における \geq C20PUFA の割合が著しく減少し、VLDL 分泌障害が引き起こされた可能性が提示された。

これまでの結果より、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスでは炭素数 20 以上の PUFA が著しく減少し、SREBP-1c を介した脂質合成の亢進と、血中への脂質移行の低下の二要因が複合的に作用し、肝臓の中性脂肪の蓄積を誘導することが示唆された。

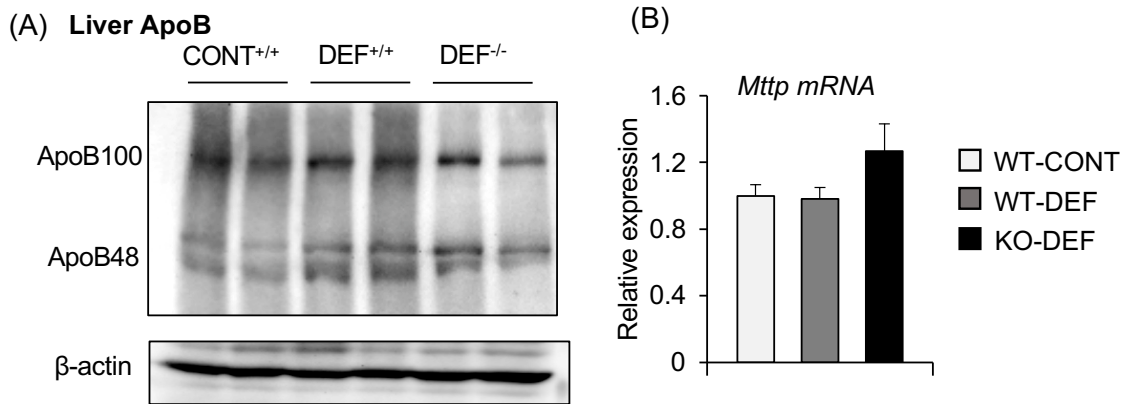


Fig. 2-4-1 肝臓の VLDL 形成に関わる因子の変化

(A) ApoB タンパク質量を western blotting 法にて定量した。

(B) 肝臓の *Mttp* 発現を RT-PCR 法にて測定した。データは平均値±標準誤差で表す。

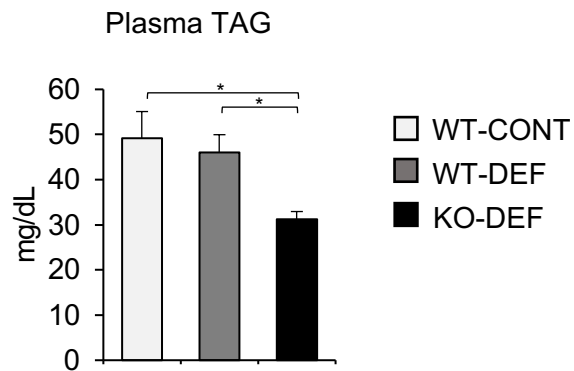


Fig. 2-4-2 血漿中性脂肪量の変化

データは平均値±標準誤差で表す。統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った

(n=5~6, *, p < 0.05)。

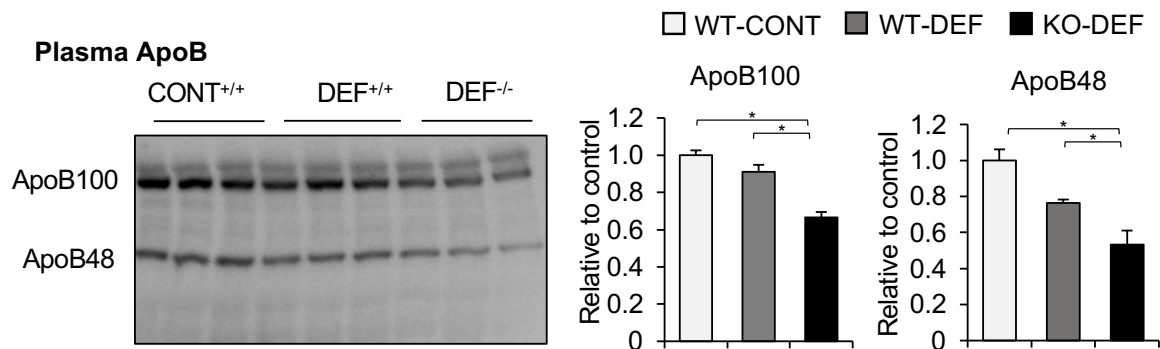


Fig. 2-4-3 血漿 ApoB タンパク質量の変化

ApoB タンパク質量を western blotting 法にて定量した。western blotting にて得られたバンドは画像解析ソフト Image J を用いて定量した。データは平均値±標準誤差で表す。統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った (n=3~5, *, p < 0.05)。

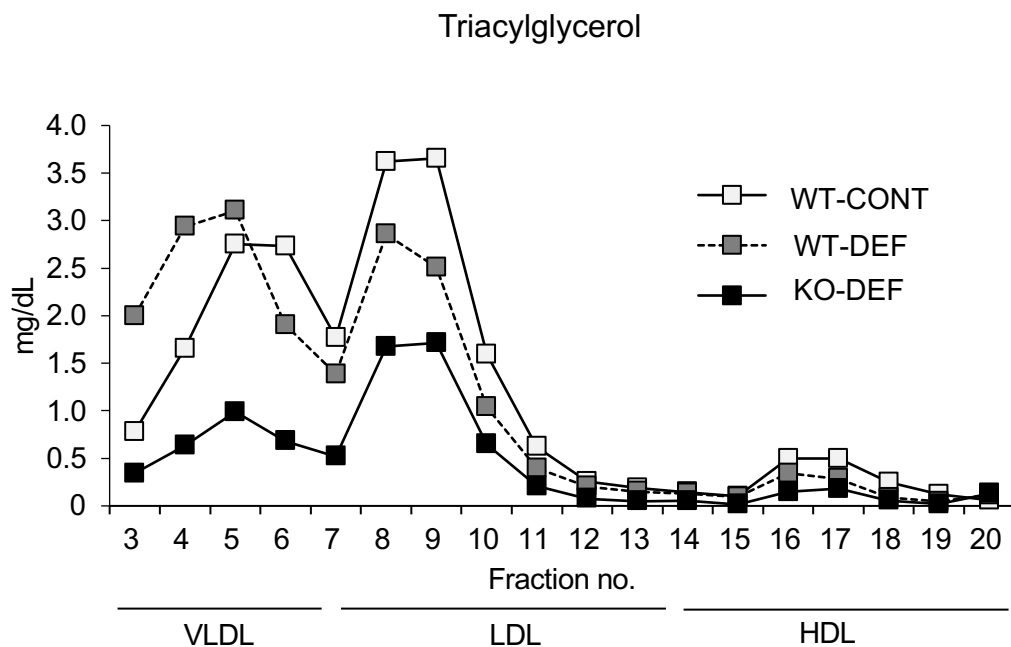


Fig. 2-4-4 血漿リポタンパク質画分ごとの中性脂肪量の変化

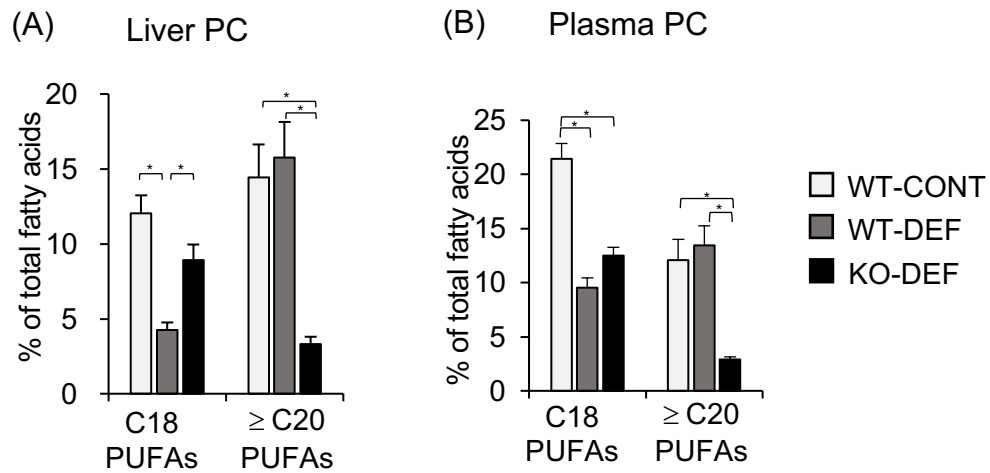


Fig. 2-4-5 PC 画分における PUFA の変化

(A) 肝臓 (B) 血漿の PC における PUFA の割合の変化を示した。

C18PUFAs: 18:2n-6, 18:3n-3, ≥C20PUFAs: 20:3n-6, 20:3n-9, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3

データは平均値±標準誤差で表す。統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った

(n=5, *, p < 0.05)。

第五項 肝臓におけるコレステロール合成の変化

脂肪肝は主に肝細胞への中性脂肪とコレステロールエステルの蓄積が引き金となる。特に肝細胞にコレステロールが蓄積すると、ミトコンドリア機能障害や小胞体ストレス、酸化物の産生を介した酸化ストレスの誘導の要因となり、NASH への進行を媒介する可能性がある[77]。第二節の結果より、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスの肝臓では中性脂肪だけでなくコレステロールも蓄積することを示している。肝臓にコレステロールが蓄積する要因には、合成の亢進、胆汁酸への異化および排泄の低下、リポタンパク質代謝・輸送の異常といった要因が挙げられる。そこで本項では、これらのコレステロール代謝に関与する因子について調べ、HUFA 欠乏時にコレステロールが蓄積する要因について検討した。SREBP-2 はコレステロール合成のマスターレギュレーターであり、アセチル CoA からコレステロールの合成の際に働く HMGCR や LSS といった酵素をコードする遺伝子のプロモーター領域に結合して転写誘導活性を発現する。SREBP-1 と SREBP-2 の活性化機構は非常に類似しており、両者とも非活性型の前駆体として小胞体膜に結合した形で合成され、ゴルジ体においてプロテアーゼによる切断を受けて活性型のフラグメントが核に移行する。また、ゴルジ体への輸送の制御を担う SCAP や INSIG-1 といった調節因子も共通している。SREBPs の活性化は内因性の脂質分子によって制御されており、SREBP-1 と SREBP-2 の活性化は両者ともステロールと不飽和脂肪酸の存在によって阻害される。しかし、SREBP-2 はステロールに対する感受性が高く、SREBP-1 の方が SREBP-2 よりも不飽和脂肪酸に対する感受性が高いと考えられている[78]。実際に、培養肝細胞にアラキドン酸を添加した際[79] や、マウスに EPA を投与した際[80]には、SREBP-1 の活性化が抑制された一方で SREBP-2 の活性化には変化が見られないことが報告されており、PUFA が肝臓のコレステロールの合成を亢進させるという報告は殆どない。以上のことから、HUFA 欠乏時にはコレステロールの合成よりも中性脂肪の合成が亢進することが予想されるが、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスでは肝臓においてコレステロールが顕著に蓄積した。本項では、肝臓においてコレステロールが蓄

積した要因を明らかにするため、コレステロール合成酵素の遺伝子発現および SREBP-2 の活性化の変化を調べた。

まず、アセチル CoA からコレステロールの合成経路に関与する酵素の遺伝子発現の変化を測定したところ (Fig. 2-5-1)、*Hmgcr*, *Fdps*, *Lss* の遺伝子発現は必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスにおいて有意に増加していた。したがって、FADS2 欠損マウスではコレステロールの合成が亢進している可能性が示唆された。これらのコレステロール合成酵素の遺伝子発現は、全て転写因子 SREBP-2 によって誘導される。SREBP-2 をコードする遺伝子 *Srebp-2* の遺伝子発現も、KO-DEF 群において有意に上昇していた。一方、SREBP-2 のターゲット遺伝子である *Sqls* の遺伝子発現には 3 群間で変化は見られなかった。

そこで、肝臓における SREBP-2 のタンパク質発現と活性化の程度を調べた (Fig. 2-5-2)。非活性型の前駆体は 125 kDa 付近に、切断された活性型のタンパク質は 60 kDa 付近に検出された。SREBP-2 の活性化指標を算出したところ、SREBP-1 の場合とは異なり、3 群間での変化は認められなかったことから、SREBP-2 の活性化は KO-DEF 群におけるコレステロール合成の増加に寄与していないことが示唆された。PUFA は SREBP-2 よりも SREBP-1 に対して強い抑制作用を持つことから [78-80]、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスにおいて、SREBP-1 の活性化が誘導される一方で SREBP-2 の活性化は誘導されないという結果が得られた可能性がある。また、活性型の SREBP-1 を過剰発現したマウスでは、HMGCR や FDPS といったコレステロール合成関連酵素の遺伝子発現が増加することが報告されている [44, 81]。従って、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスでは、SREBP-1 の活性化に伴ってコレステロール合成酵素の発現が増加し、コレステロール合成が誘導された可能性がある。しかし、SREBP-1 および SREBP-2 の活性制御に対する PUFA の役割は未解明の点も多く、PUFA 欠乏時のコレステロール合成亢進の機構を解明するためには、さらなる研究が必要である。

コレステロールの合成は、その中間物質である Lanosterol が産生されて以降、Bloch 経路と Kandutch-Russell 経路の 2 つの経路を介して合成される [82-84] (Fig. 2-5-3A)。Bloch 経

路では、Lanosterol から複数の酵素反応を経て Desmosterol が合成され、最後に Desmosterol の側鎖の二重結合が DHCR24 によって還元されてコレステロールが合成される。一方、Kandutch-Russell 経路では、最初に Lanosterol の側鎖の二重結合が DHCR24 によって還元され、その後 Lathosterol を経てコレステロールが合成される。Bloch 経路の中間産物である Desmosterol、Kandutch-Russel 経路の中間産物である Lathosterol、両経路に共通した前駆体である Lanosterol の肝臓における濃度を測定した。その結果、KO-DEF 群の肝臓では他 2 群と比較して Desmosterol および Lanosterol が増加していた (Fig. 2-5-3B,C)。一方、Lathosterol 濃度に変化は見られなかった (Fig. 2-5-3D)。従って、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスでは、Bloch 経路を介したコレステロールの合成が亢進した可能性が示唆された。

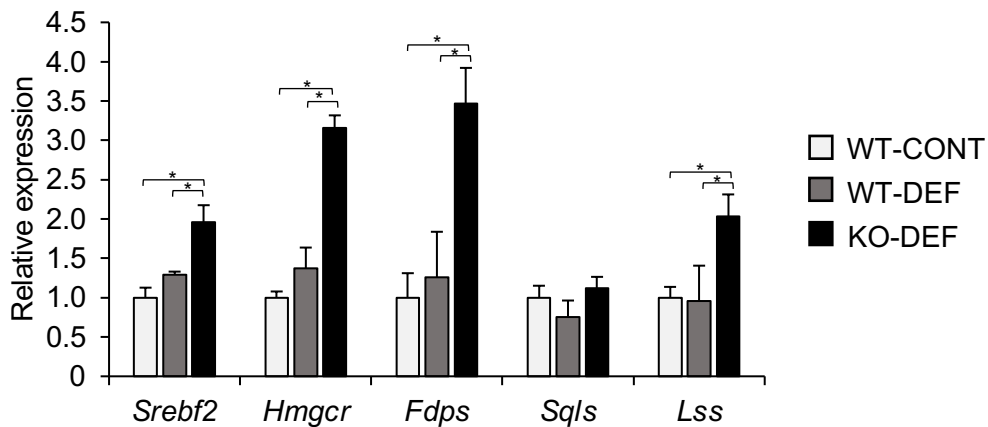


Fig. 2-5-1 肝臓におけるコレステロール合成に関与する遺伝子の発現変化

データは平均値±標準誤差で表す。統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った (n=5~6, *, p < 0.05)。

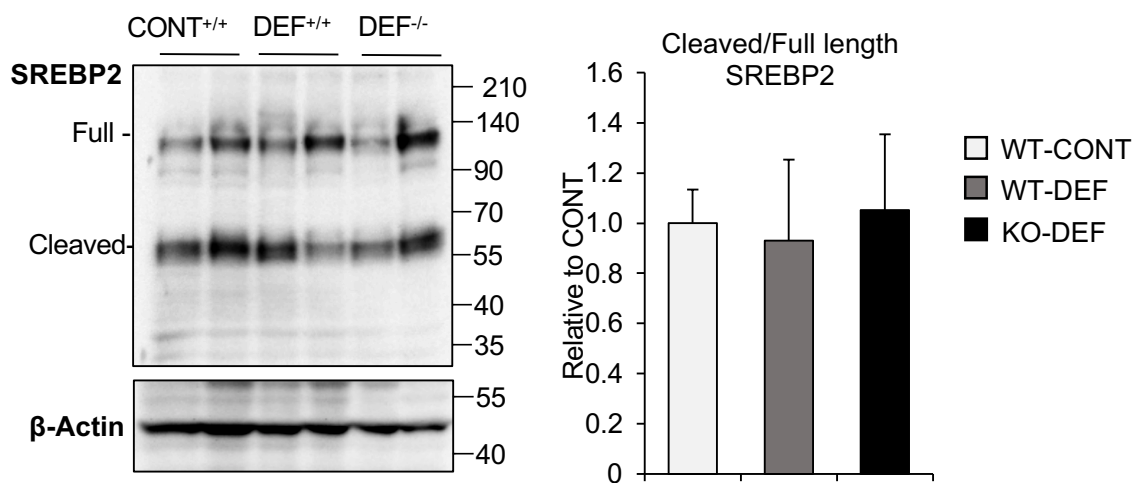


Fig. 2-5-2 SREBP-2 のタンパク質発現の変化

肝臓における SREBP-2 のタンパク質発現を western blotting 法にて測定した。Full length = 125 kDa, Cleaved form = 60 kDa. Western blotting にて得られたバンドを画像解析ソフト Image J を用いて定量した。データは平均値±標準誤差で表す。統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った (n=5~6, *, p < 0.05)。

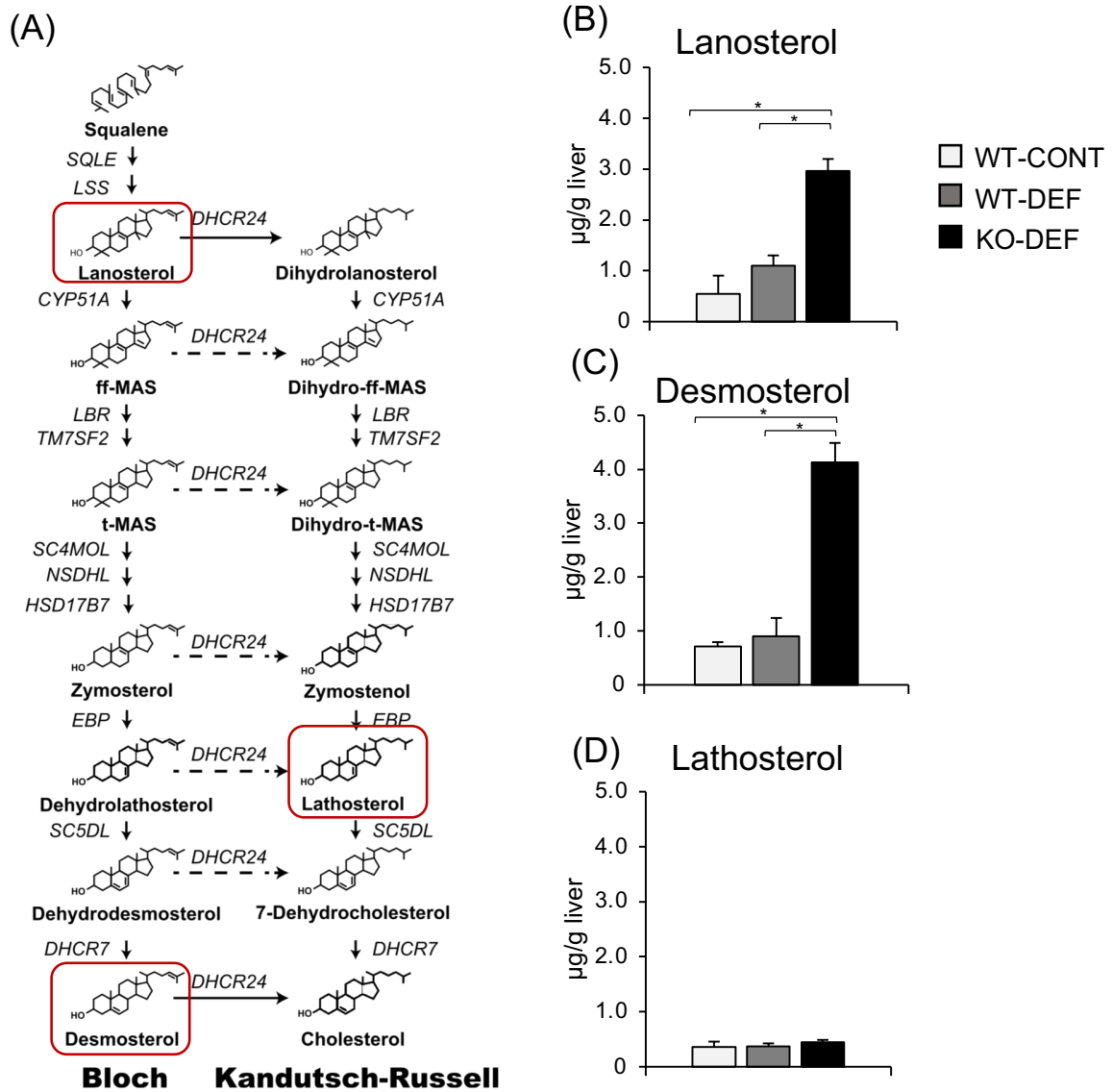


Fig. 2-5-3 コレステロール合成の中間産物の変化

(A) コレステロール合成経路 (B) Lanosterol (C) Desmosterol (D) Lathosterol の肝臓における濃度を GC-MS にて測定した。データは平均値±標準誤差で表す。統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った (n=5~6, *, p < 0.05)。

第六項 コレステロールの分泌および排泄に対する影響

前項の結果より、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスでコレステロールの合成が亢進し、肝臓にコレステロールが蓄積した可能性が示唆された。コレステロールの合成の他に、輸送や排泄も肝細胞におけるコレステロール量を規定する重要な要素である。肝細胞で合成、あるいは外部から供給されたコレステロールは、まず VLDL 粒子の一部として血中に放出される。その後血中でリポタンパク質リパーゼの作用を受けて LDL となり、LDL 受容体を介して、抹消組織あるいは肝細胞にエンドサイトーシス的に取り込まれ、コレステロールは全身に分配される。さらに、肝細胞ではコレステロールは ABCA1 を介して lipid-poor な Apo-AI に転移され、未成熟 HDL が形成される。この未成熟 HDL は ABCG1 を介した抹消組織からのコレステロール転移を受けて成熟 HDL となり、全身のコレステロールを肝臓へと転送する。このプロセスはコレステロール逆転送系と呼ばれる。HDL-コレステロールは肝臓に転移された後、肝細胞のコレステロールプールに入ることなく、胆汁に分泌されると考えられており、コレステロール逆転送系はコレステロールの排泄の鍵を握っている[85, 86]。コレステロールの体外への排泄は、遊離型コレステロールあるいは胆汁酸に変換された形で、胆汁を介して行われる。遊離型コレステロールの胆汁中への排泄はトランスポーター ABCG5/8 を介して行われ、コレステロールの胆汁酸への変換には CYP7A1 や CYP27A1 を介した水酸化が律速段階となる。本項では、コレステロールの輸送や排泄に関わる因子を調べ、HUFA 欠乏時の肝臓にコレステロールが蓄積する要因について検討した。

血漿のコレステロール濃度は、FADS2 欠損マウスにおいて WT マウスの 2 群と比較して有意に低下していた (Fig. 2-6-1)。次に、血中においてリポタンパク質画分ごとのコレステロール濃度を測定したところ、KO-DEF 群の HDL 画分におけるコレステロール濃度は他 2 群と比較して低い値を示し、HUFA 欠乏時の血中コレステロール低値は、HDL コレステロール濃度の低下を反映していることが示された (Fig. 2-6-2)。必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスにおいて HDL コレステロールが低値であったことから、HUFA の欠乏によってコ

レステロール逆転送系の制御不全が誘導された可能性が考えられる。HDL 産生酵素の過剰発現によってコレステロール逆転送系を促進すると、肝細胞へのコレステロール蓄積が軽減することが報告されており[87]、HDL 代謝の促進は脂肪肝の抑制において有効であると考えられている。HDL 代謝に関与する *Abca1*, *Scarb1*, *Apo-a1* の肝臓における遺伝子発現を測定したが、これらの遺伝子発現に群間で変化は認められなかった (Fig. 2-6-3)。一方、LDL 粒子や HDL 粒子を肝細胞に取り込む機能を持つ *Ldlr* の遺伝子発現は、KO-DEF 群において他 2 群と比較して 2 倍程度増加していた。このことから、LDL 受容体を介した肝臓におけるリポタンパク質の取り込みが増加したことによって肝臓のコレステロール蓄積が誘導された可能性が考えられる。以上の結果より、コレステロール排泄の機構であるコレステロール逆転送系の低下が *FADS2* 欠損マウスの肝臓におけるコレステロール蓄積に寄与した可能性が考えられるが、因果関係は不明確である。従って、HUFA 欠乏下での HDL 代謝の変化については遺伝子発現レベルだけでなく、不飽和脂肪酸の欠乏に伴う粒子形成障害等の要因も含めてさらなる検討が必要である。

次に、コレステロールの排泄に関連する因子について検討した。コレステロール分子の胆管への排泄を行うトランスポーターである *Abcg5*, *Abcg8* の遺伝子発現は、KO-DEF 群において他 2 群と比較して上昇していた (Fig. 2-6-4)。この結果は、肝細胞においてコレステロールが蓄積する要因とは相反する結果であり、細胞内のコレステロール濃度が上昇した結果、排泄促進のためにこれらのトランスポーターの発現が増加した可能性が考えられる。また、胆嚢から採取した胆汁中のコレステロール濃度に 3 群間で違いは見られなかった (Fig. 2-6-5A)。よって、胆汁中へのコレステロール排泄は *FADS2* 欠損マウスで変化していないことが示唆された。コレステロールを胆汁酸に変換する際の律速酵素である *Cyp7a1* および *Cyp27a1* の遺伝子発現や、血中の総胆汁酸レベルも 3 群間で変化は見られなかった (Fig. 2-6-4, 5B)。以上の結果より、HUFA が欠乏した *FADS2* 欠損マウスにおける肝臓のコレステロール蓄積に、コレステロールの胆汁中への排泄や、コレステロールの胆汁酸への変換は関与していない可能性が示唆された。

LXR はコレステロール恒常性の維持に寄与する主要な制御因子であり、PUFA によって下方制御されることが報告されている[79]。さらに、SREBP-1 のプロモーター領域には LXR 応答配列が含まれており、LXR は脂質合成の制御の主軸を担っている。必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスの肝臓における LXR 標的遺伝子の発現変化には一致した傾向は認められず、本研究では HUFA 欠乏時に LXR が活性化しているか否かについては明らかにできなかった。今後、LXR の活性評価を行うことで、HUFA 欠乏時の脂質蓄積に LXR 経路が関与しているかについて調べる必要がある。

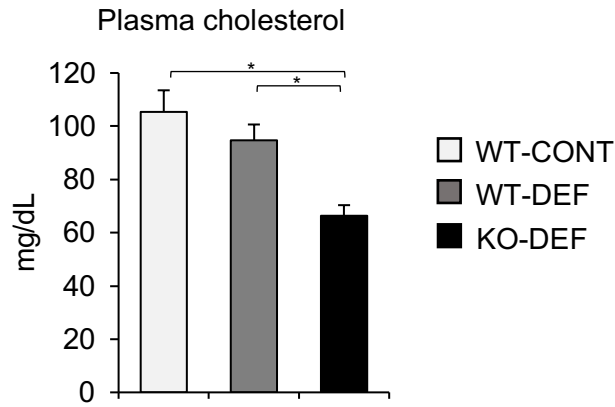


Fig. 2-6-1 血漿コレステロール濃度の変化

データは平均値±標準誤差で表す。統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った (n=5~6, *, p < 0.05)。

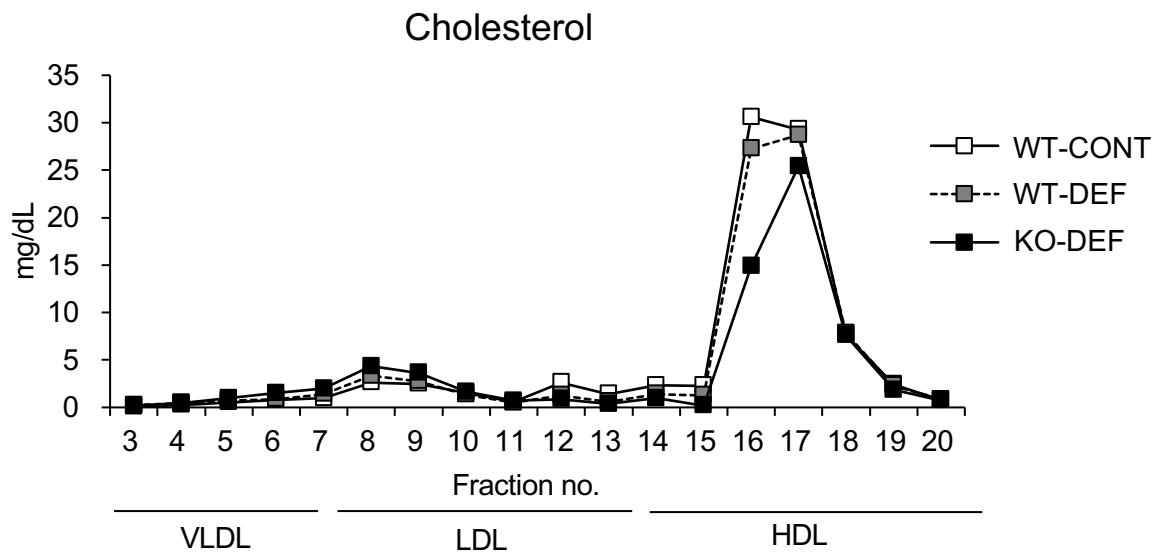


Fig. 2-6-2 血漿リポタンパク質画分ごとのコレステロール量の変化

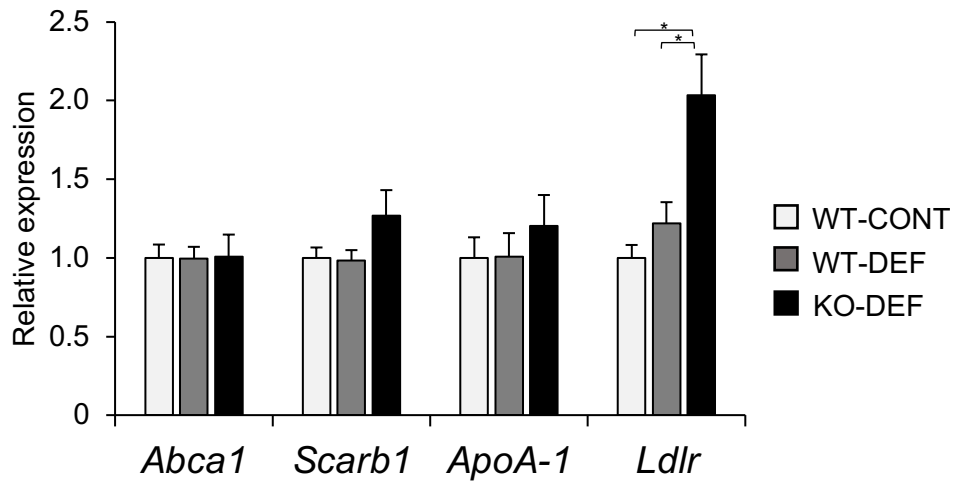


Fig. 2-6-3 コレステロールの輸送に関与する遺伝子の発現変化

肝臓における遺伝子発現を測定した。データは平均値±標準誤差で表す。統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った (n=5~6, *, p < 0.05)。

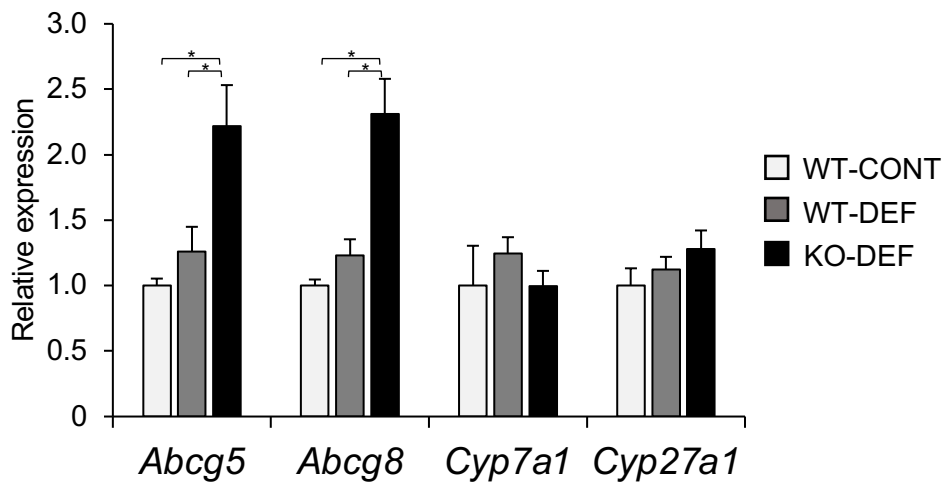


Fig. 2-6-4 コレステロールの排泄に関与する遺伝子の発現変化

肝臓における遺伝子発現を測定した。データは平均値±標準誤差で表す。統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った (n=5~6, *, p < 0.05)。

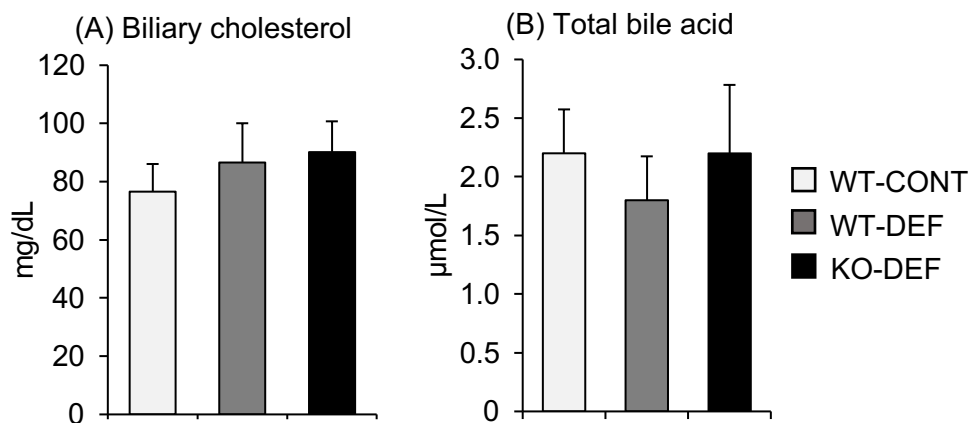


Fig. 2-6-5 胆汁コレステロール濃度および血中総胆汁酸濃度の変化

(A) 胆汁コレステロール濃度 (B) 血漿の総胆汁酸濃度を測定した。データは平均値±標準誤差で表す。統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った (n=5~6)。

第三章 必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスの特徴的な脂質組成の変化

第一節 緒言

膜リン脂質のアシル鎖として結合する脂肪酸は不飽和度が高いほど融点が低く、分子の自由運動が活発な状態になることから、リン脂質膜に局在する PUFA は膜機能を活発にして生体の恒常性を維持するために必須である。これまで、FADS2 欠損マウスにおいて通常のマウスでは合成されない PUFA が検出され、その PUFA がリン脂質に存在することが報告されている[88]。このように不飽和度の高い HUFA が欠乏すると、欠乏を代償する脂質代謝の変化が生じて恒常性が維持される可能性がある。本章では、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスにおける肝臓のリン脂質の脂肪酸鎖の詳細な解析を行い、PUFA 欠乏による各リン脂質のアシル鎖の変化を検討するとともに、これまで FADS2 欠損マウスでの存在が報告されている PUFA 以外に、必須脂肪酸欠乏食を与えることで新たな脂肪酸がリン脂質に局在しているかも明らかにする。

第二節 実験方法

第一項 実験動物及び実験食

第二章と同様に行った。

第二項 TLC によるリン脂質の分画

第二章と同様に、TLC プレート (TLC Silicagel 60) を用いて展開溶媒クロロホルム : 酢酸メチル : 1-プロパノール : メタノール : 0.25% KCl = 25 : 25 : 25 : 10 : 9 にて肝臓の脂

質抽出物からのリン脂質の分画を行なった。各リン脂質の標品は、L-3-Phosphatidylserine from Porcine Brain、L-3-Phosphatidylethanolamine from Egg Yolk、Cardiolipin Sodium Salt from Bovine Heart、Sphingomyelin from Bovine Heart (Olbracht Serdary Research Laboratories)、L- α -Phosphatidylinositol Sodium Salt from Soybean (ナカライテスク) を使用した。

第三項 GC-MS による脂肪酸の分析

TLC にてリン脂質を分画した後、脂質抽出およびメチルエステル誘導体化を行い、GCMS-QP2010 Ultra 質量分析計にて、第二章と同様の条件で脂肪酸組成を測定した。未同定ピーク成分の同定を行うため、スキャンモードでトータルイオンクロマトグラムのマススペクトル解析を行った。その後、ライブラリ検索および標準品を用いて、測定したマススペクトルとの比較を行い、脂肪酸の同定を行った。

第四項 定量 PCR

第二章と同様に行った。定量 PCR に用いたプライマーの配列を Table 3-1-1 に示す。

Table 3-1-1 定量 RT-PCR に用いたプライマーの配列

Target	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
Pemt	GGAATGTGGTAGCGAGATGG	CGGAGGATGTTCAAAGCAG
Lpcat3	ATCGTGGAAAAGCAGGTCAG	GAGGCAGAAGGCAGTCATAGAG
Lpeat2	CTATGCCTCAACCCACCTC	CAAAAAGACCCACCAAACA
Lpeat1	CCTTCCTCCTGTCTGCTCTG	TGTAGTTGTTTCCTCACCGCTCT
Acsl4	GATACTTGCACCCACCCAC	TAGCAGCACCCAACCTTGTG

第三節 結果および考察

第一項 FADS2 欠損マウスにおいて特異的に増加する非メチレン介在型不飽和脂肪酸の同定

哺乳動物が必須脂肪酸欠乏に陥ると、オレイン酸の不飽和化と鎖長伸長によってミード酸が産生される⁽⁶⁾。FADS2 はミード酸の産生酵素であることから、FADS2 欠損マウスでは必須脂肪酸欠乏食を与えてもミード酸は産生されない。一方、リノール酸 (18:2n-6) を含む食餌を与えた FADS2 欠損マウスでは、アラキドン酸 (20:4n-6) の合成が行われない代わりに、通常は存在しない all-cis-5,11,14-trienoic acid (20:3^{5,11,14}; シアドン酸) が合成される代替経路が動くことが報告されている[88]。シアドン酸は、リノール酸が ELOVL による炭素鎖の伸長と FADS1 による $\Delta 5$ 位の不飽和化を受けて合成されると考えられている (Fig. 3-1-1)。アラキドン酸と比較すると、シアドン酸は FADS2 により導入されるはずの $\Delta 8$ 位の不飽和結合を欠いており、二重結合を 3 つ持つ n-6 系の非メチレン介在型不飽和脂肪酸である。本項では、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスにおいてシアドン酸のように代償的に増加する非メチレン介在型の不飽和脂肪酸が存在するかを調べた。

シアドン酸などの非メチレン介在型不飽和脂肪酸は、アラキドン酸などの PUFA の代替としてリン脂質に導入されることが報告されている[89]。そこで、PUFA が比較的多く分布するリン脂質である PE 画分の脂質抽出物をメチルエステル化処理し、スキャンモードにて解析し、定性分析を行なった。その結果、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスでは、保持時間 17.7 分に野生型の 2 群では見られなかったピークが検出された (Fig. 3-1-2C, #1)。このピークのライブラリ検索を行った結果、シアドン酸のメチルエステル誘導体である Methyl 5,11,14-eicosatrienoate が最も類似性の高い化合物としてヒットした (Fig. 3-1-3A, B)。さらに、シアドン酸標品のメチルエステル化産物も同様に保持時間 17.7 分に検出されたことから、この溶出ピークはシアドン酸であることが確認された (Fig. 3-1-3C)。以上のことから、

必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスでもシアドン酸が合成され、リン脂質に局在していることが確認できた。シアドン酸はカヤの実の脂質中に豊富に含まれ、肝臓の中性脂肪を低下させる作用が報告されていることから[90]、HUFA 欠乏時に代償的に合成されて、FADS2 欠損マウスにおける脂肪肝を軽減させる生理作用をもたらす可能性がある。FADS1 と FADS2 の二重欠損マウスを用いてシアドン酸の合成を抑制することで、PUFA 欠乏時に生体内で合成されたシアドン酸の生理機能を明らかにできる可能性がある。

さらに、保持時間 16.4 分付近にも、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスで特異的に増加する化合物のピークの溶出が見られた (Fig. 3-1-2C, #2)。そこで、このピークのライブラリ検索を行ったところ、6,11-eicosadienoic acid methyl ester との類似性が高いことがわかった (Fig. 3-1-4A, B)。しかし、6,11-eicosadienoic acid は FADS2 欠損マウスで合成される脂肪酸である可能性は低い。そこで我々は、オレイン酸からミード酸が合成される際に、FADS2 による $\Delta 6$ 位不飽和化の段階をスキップして産生される n-9 系の非メチレン介在型不飽和脂肪酸である all-cis-5,11-eicosadienoic acid ($20:2^{5,11}$) である可能性が高いと考えた (Fig. 3-1-1B)。我々が用いた質量分析装置のライブラリには 5,11-eicosadienoic acid methyl ester が存在せず、6,11-eicosadienoic acid と 5,11-eicosadienoic acid の分子量は同じであることから、この未知のピークが 5,11-eicosadienoic acid であることを明確にするため、今後 5,11-eicosadienoic acid の標品を用いて、物質の同定を行う予定である。哺乳動物において、 $20:2^{5,11}$ が内在的に合成されることは今までに報告されていない。本研究では、FADS2 の活性が失われた状態で必須脂肪酸欠乏に陥ると、代替経路を経て二重結合を 2 つ有する n-9 系の非メチレン介在型不飽和脂肪酸が合成されることを初めて明らかにした。本研究では $20:2^{5,11}$ の機能性の解析には至らなかったが、 $20:2^{5,11}$ もシアドン酸と同様に、欠乏した PUFA の代替作用を担っていることが期待される。

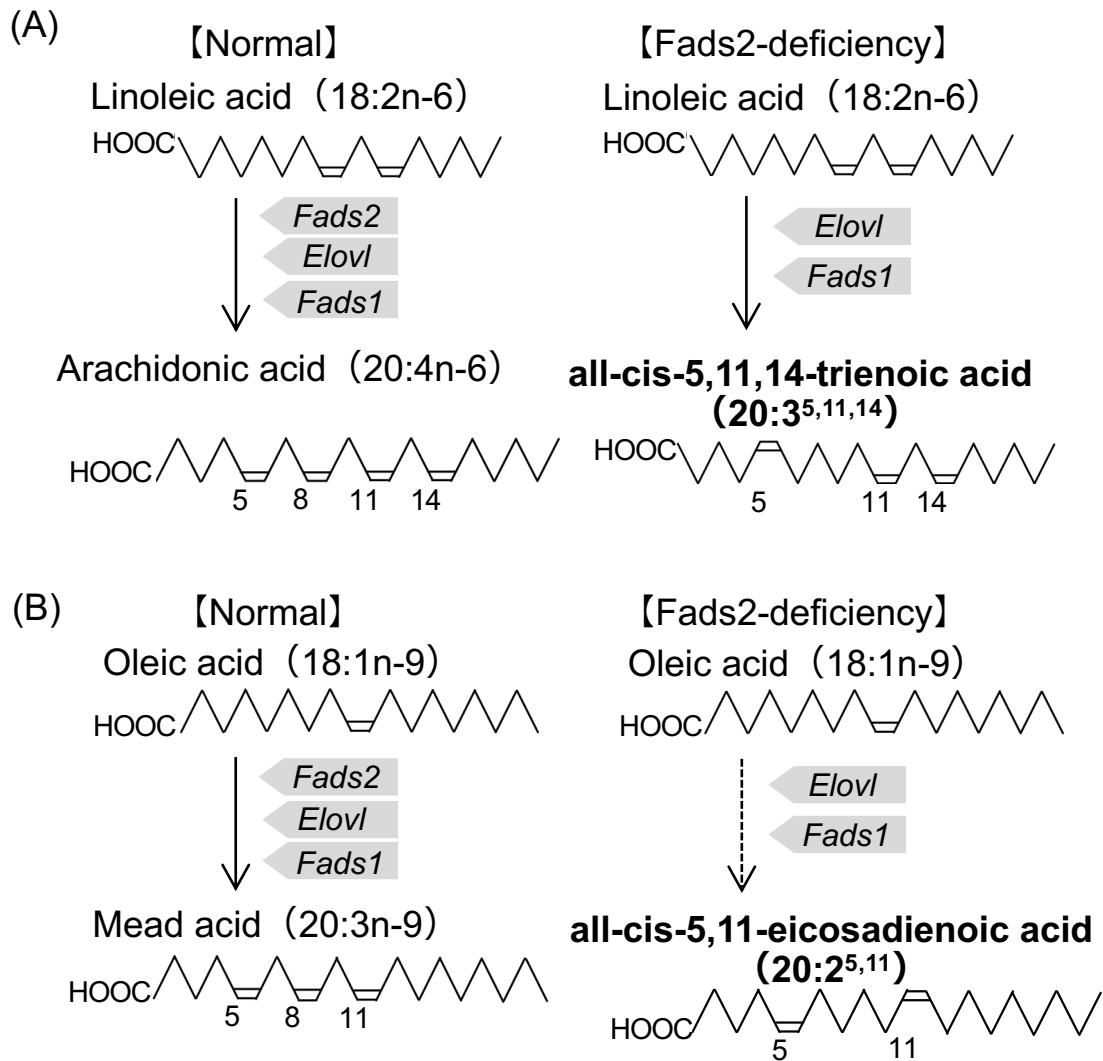
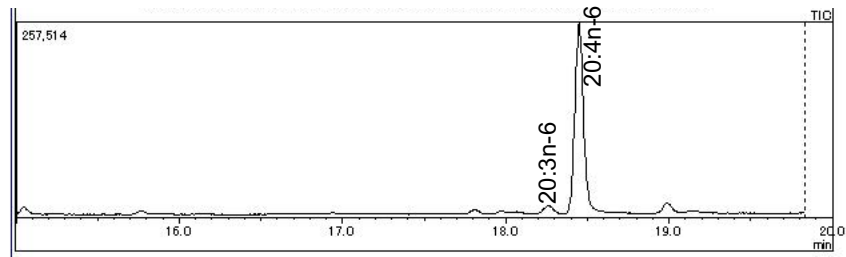


Fig. 3-1-1 非メチレン介在型不飽和脂肪酸の産生経路

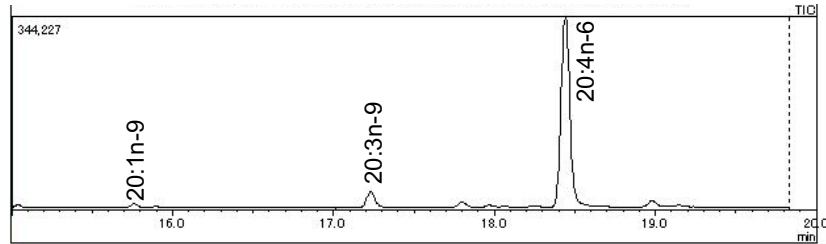
(A) リノール酸からアラキドン酸およびシアドン酸 (20:3^{5,11,14}) の産生経路

(B) オレイン酸からミード酸および 20:2^{5,11} の産生経路

(A) WT-CONT



(B) WT-DEF



(C) KO-DEF

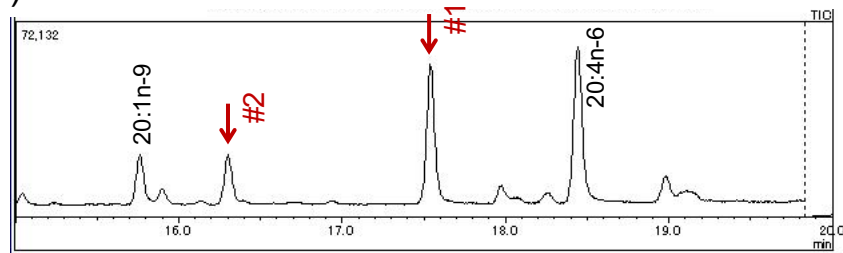


Fig. 3-1-2 必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウス肝臓のホスファチジルエタノールアミン (PE) 画分における脂肪酸測定のカロマトグラム
(A) 野生型マウス・通常食 (B) 野生型マウス・必須脂肪酸欠乏食
(C) FADS2 欠損マウス・必須脂肪酸欠乏食

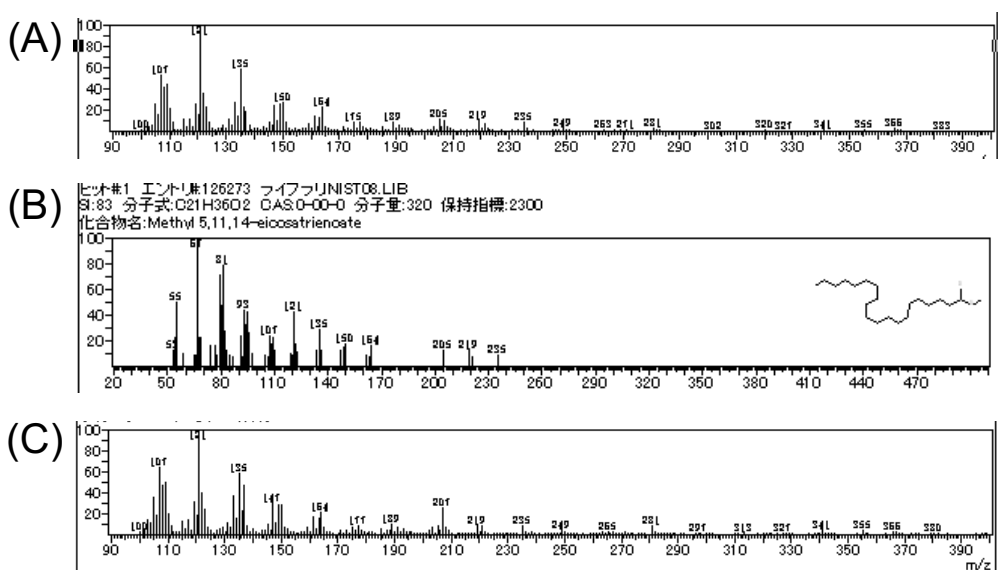


Fig. 3-1-3 保持時間 17.7 分に溶出したピーク

- (A) 保持時間 17.7 分に溶出したピークのマスペクトル
 (B) ライブラリに登録されている Methyl-5,11,14-eicosatrienoate のマスペクトル
 (C) Methyl-5,11,14-eicosatrienoate 標品のマスペクトル

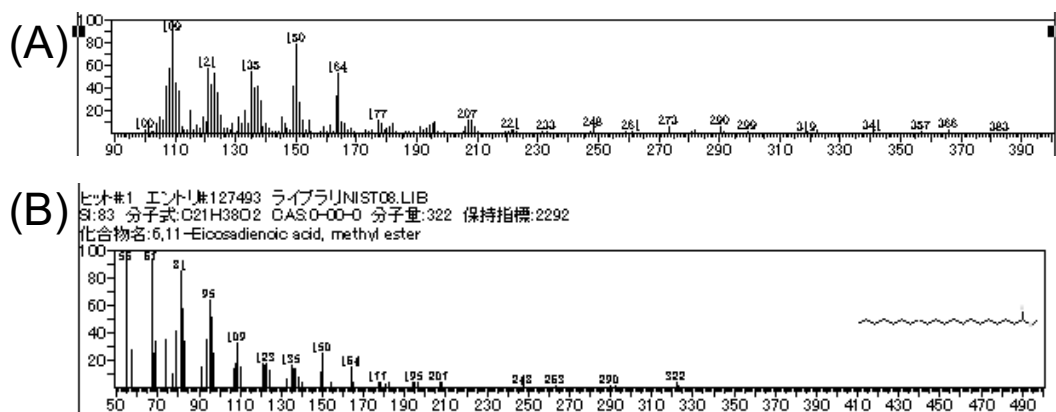


Fig. 3-1-4 保持時間 16.4 分に溶出したピーク

- (A) 保持時間 16.4 分に溶出したピークのマスペクトル
 (B) ライブラリに登録されている 6,11-eicosadienic acid methyl ester のマスペクトル

第二項 高度不飽和脂肪酸欠乏マウスの肝臓におけるリン脂質組成の変化

リン脂質はケネディ経路による *de novo* 合成と、ランズ回路によるアシル鎖リモデリングの 2 種類の経路を経て生合成され、多様な分子種が産生される[26, 27] (Fig. 1-2)。ケネディ経路では、解糖系から得られたグリセロール 3 リン酸を起点として、GPAT (Glycerol-3-phosphate acyltransferase) によって脂肪酸がエステル結合してリゾホスファチジン酸が合成され、LPAAT (Lyso phosphatidic acid acyl transferase) によってさらに脂肪酸がエステル結合してホスファチジン酸 (PA) が作られる。その後、ジアシルグリセロールを経て PC や PE、PS が、CDP-ジアシルグリセロールを経て PI や PG、PS といった他のリン脂質が合成される。ケネディ経路においてリン脂質に脂肪酸を導入するステップは、GPAT 反応と LPAAT 反応である。この段階では飽和脂肪酸や一価不飽和脂肪酸がリン脂質に組み込まれることが多いが、例外的に、LPAAT3 や LPAAT4 は DHA-CoA を基質とする[91-93]。リン脂質のアシル鎖における DHA の導入は LPAAT ステップに主に依存している。実際に、LPAAT3 の欠損マウスでは網膜の形態異常や視細胞の機能障害[94]、精子の形態異常を伴う雄性不妊症[95]が見られることから、DHA が結合したリン脂質が種々の臓器において必要であることが明らかになってきている。ランズ回路では、リン脂質の脂肪酸がホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) によって遊離してリゾリン脂質が産生された後、リゾリン脂質アシル転移酵素によってアシル化されて再度リン脂質となる。ここで、基質特異性や臓器特異性の異なる酵素が作用することで「代謝バイアス」が生じ、各リン脂質分子種や臓器、細胞小器官に特徴的なアシル鎖の組成が形成される[96]。ケネディ経路で生合成される PA の多くは飽和脂肪酸あるいは一価不飽和脂肪酸をアシル鎖に有することから、アラキドン酸などの PUFA が結合したリン脂質の産生にはランズ回路が重要となる。アラキドン酸-CoA に高い基質特異性を有してリン脂質を合成する代表的なリゾリン脂質アシル転移酵素には LPCAT3 や LPIAT1 があり、LPCAT3 は 20:4-PC、LPIAT1 は 20:4-PI の産生を担う[29-31]。LPCAT3 や LPIAT1 の欠損マウスは、PUFA 含有リン脂質の減少により新生致死となることから、リン脂質に導入された PUFA は生体機能の維持に必須であると

考えられる。本項では、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスにおけるリン脂質脂肪酸鎖の変化を明らかにする。

必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスの肝臓において主要なリン脂質分子種 (PC, PE, PI, PS) の組成に変化は見られなかった (Fig. 3-2-1)。最も主要なリン脂質である PC の脂肪酸組成について、WT マウスの 2 群を比較すると、必須脂肪酸欠乏食群では 16:1n-7 や 18:1n-9 などの一価不飽和脂肪酸が増加し、18:2n-6 や 20:4n-6 などの PUFA が減少していた (Fig. 3-2-2A)。必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスでは、18:1n-9 がさらに増加し、FADS2 の産物である 20:3n-6、20:4n-6、22:5n-3、22:6n-3 は他 2 群と比較して減少していた。FADS2 欠損マウスでは C20 以上の PUFA の変化の程度に違いがあり、PC においてアラキドン酸 (20:4n-6) は検出されず、DHA (22:6n-3) は比較的維持されていた。また、FADS2 による不飽和化の前駆体脂肪酸であるリノール酸 (18:2n-6) は、WT-DEF 群と比較して、KO-DEF 群において WT-CONT 群と同程度まで増加していた。一方、FADS2 欠損マウスの肝臓の全脂質の脂肪酸組成をみると、リノール酸は通常食を与えた野生型マウスの半分程度まで減少していた (Fig. 2-1-2)。これは、FADS2 欠損マウスにおいて PC におけるアラキドン酸や DHA の減少を補うために、リノール酸のような PUFA が積極的に導入された可能性が考えられる。PC における脂肪酸組成について、不飽和度別に WT-CONT 群を 1 として比較すると、WT-DEF 群では二重結合を 1 つ有する脂肪酸が増加し、二重結合を 2 つ有する脂肪酸が減少したが、二重結合 3 以上の脂肪酸には違いはみられなかった (Fig. 3-2-2B)。一方、KO-DEF 群では二重結合 3 以上や炭素数 20 以上の脂肪酸が他 2 群と比較して著しく低下した (Fig. 3-2-2C)。

PE は他のリン脂質と比較すると PUFA 含量が高く、KO-DEF 群の PE におけるアラキドン酸は PC に比べると高く維持されていた (Fig. 3-2-3A)。また、予想外に FADS2 欠損マウスの PE では、EPA (20:5n-3) および DPA (22:5n-3) などの n-3 系 HUFA が増加していた。肝臓の全脂質の脂肪酸組成と比較すると (第二章 Fig. 2-1-3)、KO-DEF 群において肝臓の全脂質の EPA や DPA の割合はそれぞれ 0.16%、0.08%とわずかであることから、体内に残存して

いるわずかな EPA や DPA が PE に濃縮された可能性が考えられる。また、PE も同様に不飽和度及び炭素数別の比較を行うと、KO-DEF 群の肝臓の PE では不飽和度 3 以上や炭素数 20 以上の脂肪酸がほとんど減少していないことが分かった (Fig. 3-2-3B, C)。

PI においては、野生型マウスに必須脂肪酸欠乏食を与えた際にもアラキドン酸の低下傾向が見られ、ミード酸が 7%程度と大きく増加していたことから、ミード酸がアラキドン酸の代償作用を担っている可能性がある (Fig. 3-2-4A)。KO-DEF 群の PI では PC と同様に、不飽和度 3 以上や炭素数 20 以上の脂肪酸が他 2 群と比較して大きく減少した (Fig. 3-2-4B, C)。PS の脂肪酸は、通常食を与えた野生型マウスでも 18:0 や 16:0 といった飽和脂肪酸の割合が高く、これは先行研究[97]と一致した結果であった (Fig. 3-2-5A)。また、PS では DEF 食を与えた 2 群における飽和脂肪酸や一価不飽和脂肪酸の増加はみられなかった。PS でもミード酸が WT-DEF 群において増加していたが、その増加は他のリン脂質に比べて小さかった。そして、KO-DEF 群においてアラキドン酸の減少は顕著であったが、DHA の減少は見られず、PE と同様 PS でも DHA は保持されていることがわかった。不飽和度及び炭素数別の比較を行うと、PS は他のリン脂質に比べて変化が小さいことから、必須脂肪酸欠乏及び FADS2 の機能不全の影響を受けにくいことが示唆された (Fig. 3-2-5 B, C)。

シアドン酸に関しては KO-DEF 群の全てのリン脂質画分で検出され、FADS2 欠損マウスにおいて合成されたシアドン酸がリン脂質の脂肪酸鎖に用いられていることが示された。特に、シアドン酸は PE 及び PI に多く局在していた (Fig. 3-2-6)。DHA の変化に着目すると、FADS2 欠損マウスにおいて PC 画分の DHA が減少したが、その他のリン脂質では DHA の減少は確認できなかった。アラキドン酸および DHA の合成には共に FADS2 が必要であることから FADS2 欠損マウスではこれらの脂肪酸が低下することが予想されるが、PE や PI、PS においては n-3 系 PUFA の DHA よりも n-6 系 PUFA のアラキドン酸が顕著に減少する結果となった。また、リン脂質に DHA を導入するのは主に LPAAT によって PA を合成する段階であるが、PA は各種リン脂質に共通した前駆体であることから、LPAAT ステップではリン脂質分子種間で DHA の変化に差異が生じる現象の説明ができない。したがって、PA から各種リン

脂質の合成やホスホリパーゼによる DHA の切り出し、アシル転移酵素による導入といった段階で、特定の DHA 含有リン脂質に対する基質特異性が制御されている可能性があるが、この機序についてはさらに検討する必要がある。

これらのリン脂質における \geq C20PUFA の総量を比較すると、KO-DEF 群において PC や PI の \geq C20PUFA の総量が 5%以下まで低下しているのに対し、KO-DEF 群の PE では 20:5n-3, 22:5n-3, 20:3^{5,11,14} が代償的に増加し、 \geq C20PUFA の総量は 20%以上と高く維持されていた (Fig. 3-2-6)。また、PS でも \geq C20PUFA の減少の程度は小さかった。必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスにおいて、 \geq C20PUFA は著しく減少しているにも関わらず、PE では野生型マウスの通常食群と同等レベルに維持されており、生体内で PUFA 含有 PE を保持する代償機構が働いている可能性が示唆された。そこで、肝臓における PE のアシル鎖の決定に関与する遺伝子の発現を測定した (Fig. 3-2-7A)。遊離型 PUFA に CoA を付加する *Acsl4* や、PE にメチル基を付与して PC を合成する *Pemt* の発現は変化していなかった (Fig. 3-2-7B)。PE の脂肪酸鎖のリモデリングに関与する脂肪酸転移酵素のうち、*Lpcat3* の遺伝子発現が KO-DEF 群において他 2 群と比較して有意に上昇した (Fig. 3-2-7B)。*Lpcat3* は主にアラキドン酸などの PUFA-CoA に高い基質特異性を有することから、発現増加によりリン脂質への PUFA の導入に寄与した可能性がある。しかし、*Lpcat3* は PE だけでなく PC への PUFA の導入も担っていることから、PE において特異的に PUFA が保持されるという現象にはその他の要因も関与していると考えられる。

これまでの結果より、PUFA が著しく欠乏した FADS2 欠損マウスでは、代替経路を介して通常は存在しない炭素数 20 以上の PUFA が内在的に合成されること、リン脂質の中でも特に PE では PUFA が多く保持されることがわかった。PUFA 含有 PE の合成や保持に関与する酵素を同定することで、リン脂質の PUFA における生体に必須の機能が明らかとなることが期待される。また、通常時には存在しない非メチレン介在型の PUFA も特定のリン脂質に多く局在していたことから、今後その生体における機能を明らかにする必要がある。

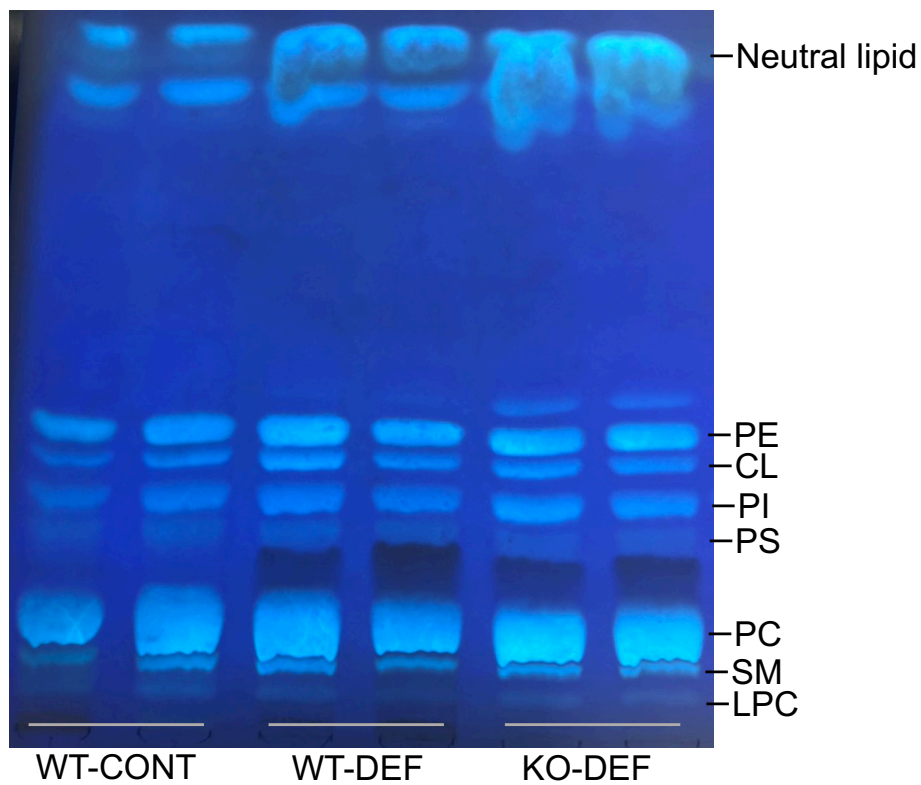


Fig. 3-2-1 TLC によるリン脂質の分画

肝臓の脂質抽出物を TLC にて展開し、発光試薬プリムリンを噴霧した後、紫外光下にて可視化した。

PE: Phosphatidylethanolamine, CL: Cardiolipin, PI: Phosphatidylinositol, PS: Phosphatidylserine, PC: Phosphatidylcholine, SM: Sphingomyelin, LPC: Lyso-phosphatidylcholine

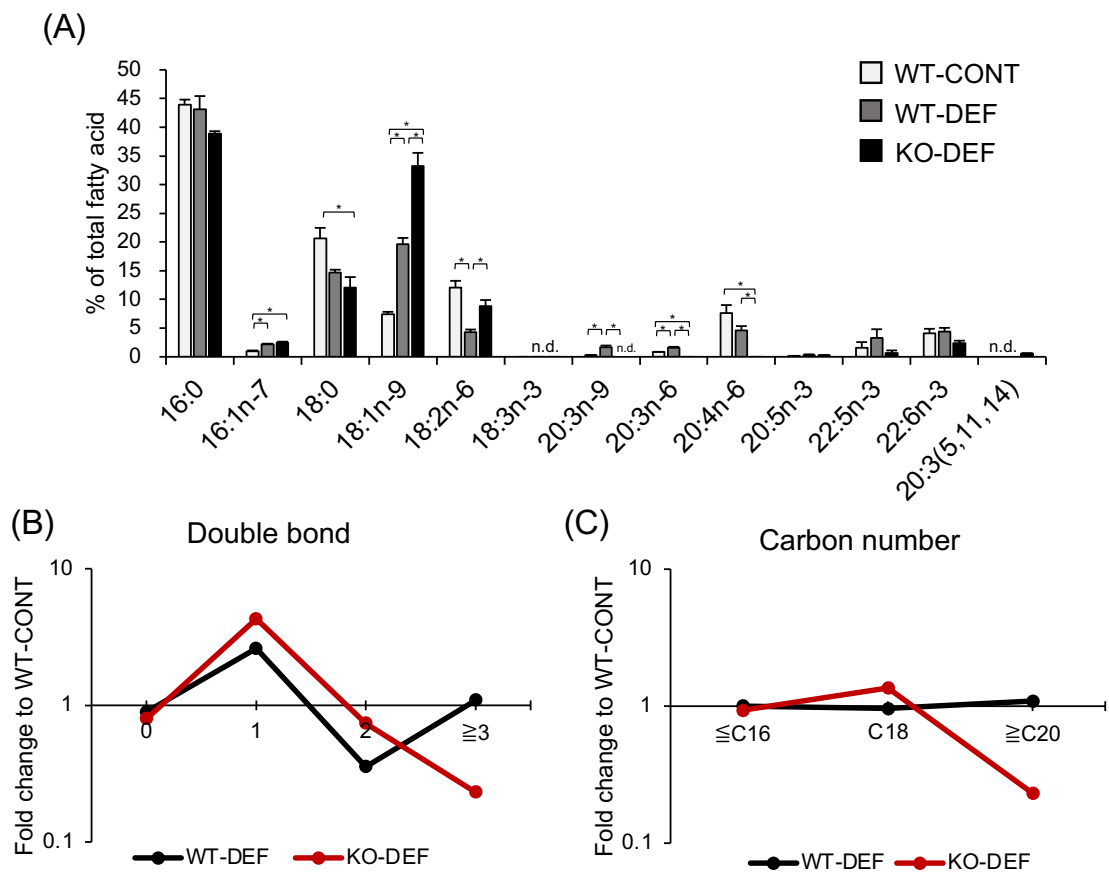


Fig. 3-2-2 肝臓の PC における脂肪酸組成の変化

(A) 脂肪酸組成を GC-MS にて測定した。(B) PC の不飽和度の変化 (C) PC の炭素数の変化

データは平均値±標準誤差で表す。

統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った (n=4~5; *, p < 0.05)

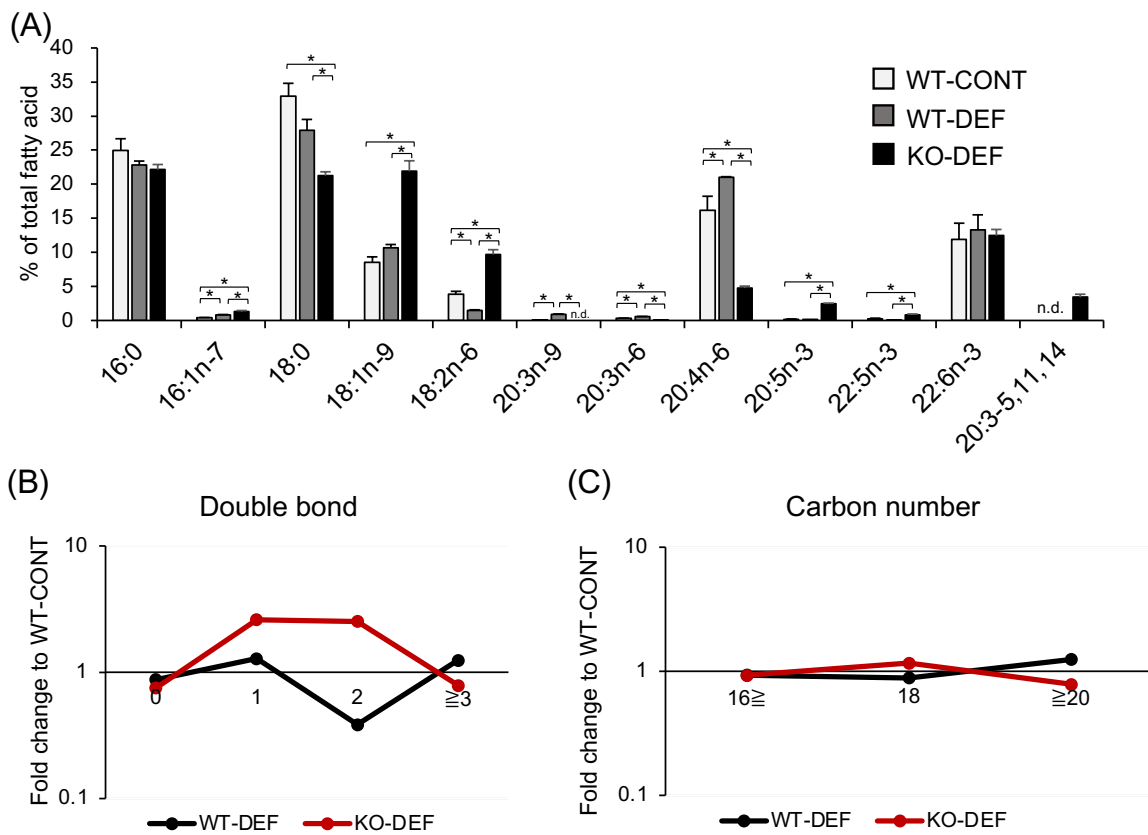


Fig. 3-2-3 肝臓の PE における脂肪酸組成の変化

(A) 脂肪酸組成を GC-MS にて測定した。(B) PE の不飽和度の変化 (C) PE の炭素数の変化

データは平均値±標準誤差で表す。

統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った (n=4~5; *, p < 0.05)

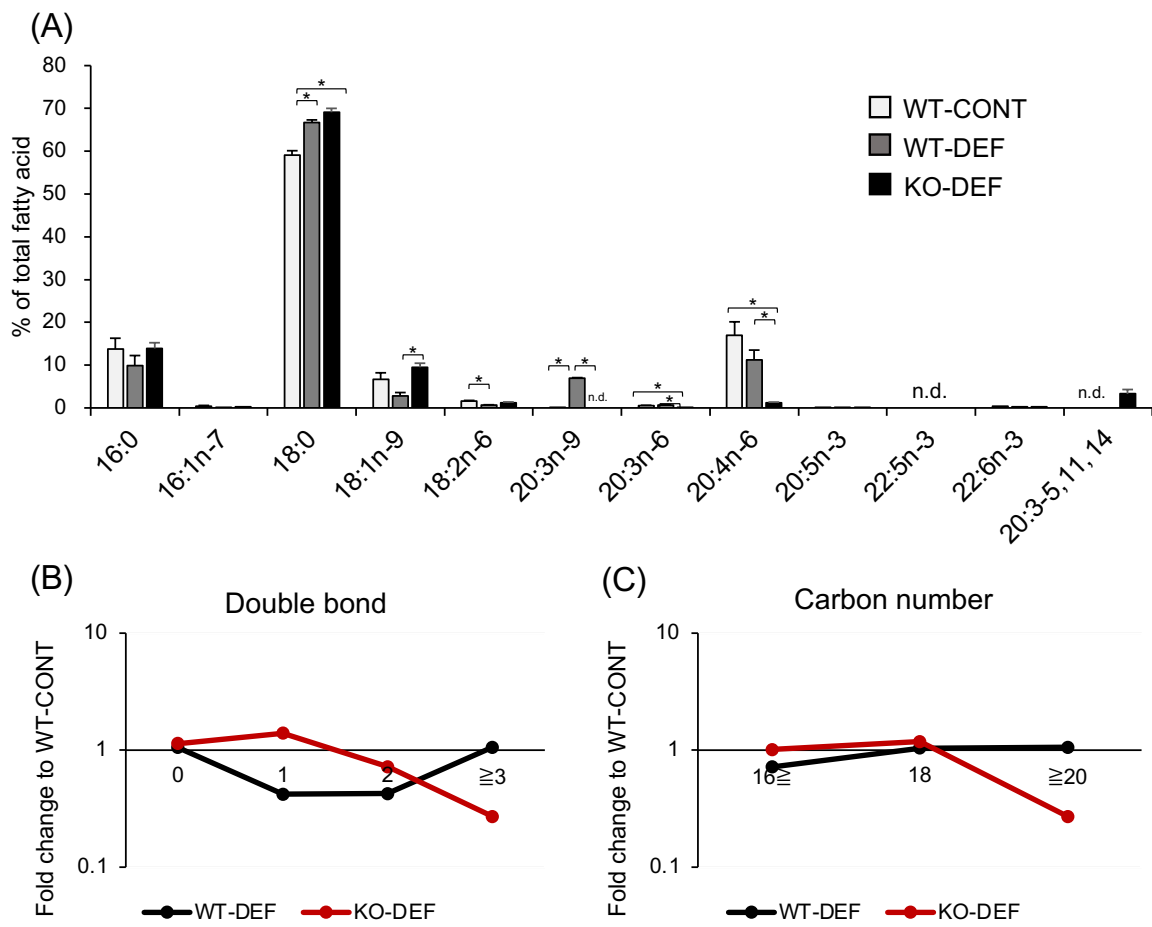


Fig. 3-2-4 肝臓のPIにおける脂肪酸組成の変化

(A) 脂肪酸組成をGC-MSにて測定した。(B) PIの不飽和度の変化 (C) PIの炭素数の変化

データは平均値±標準誤差で表す。

統計処理はTukey-Kramer法による多重比較検定を行った (n=4~5; *, p < 0.05)

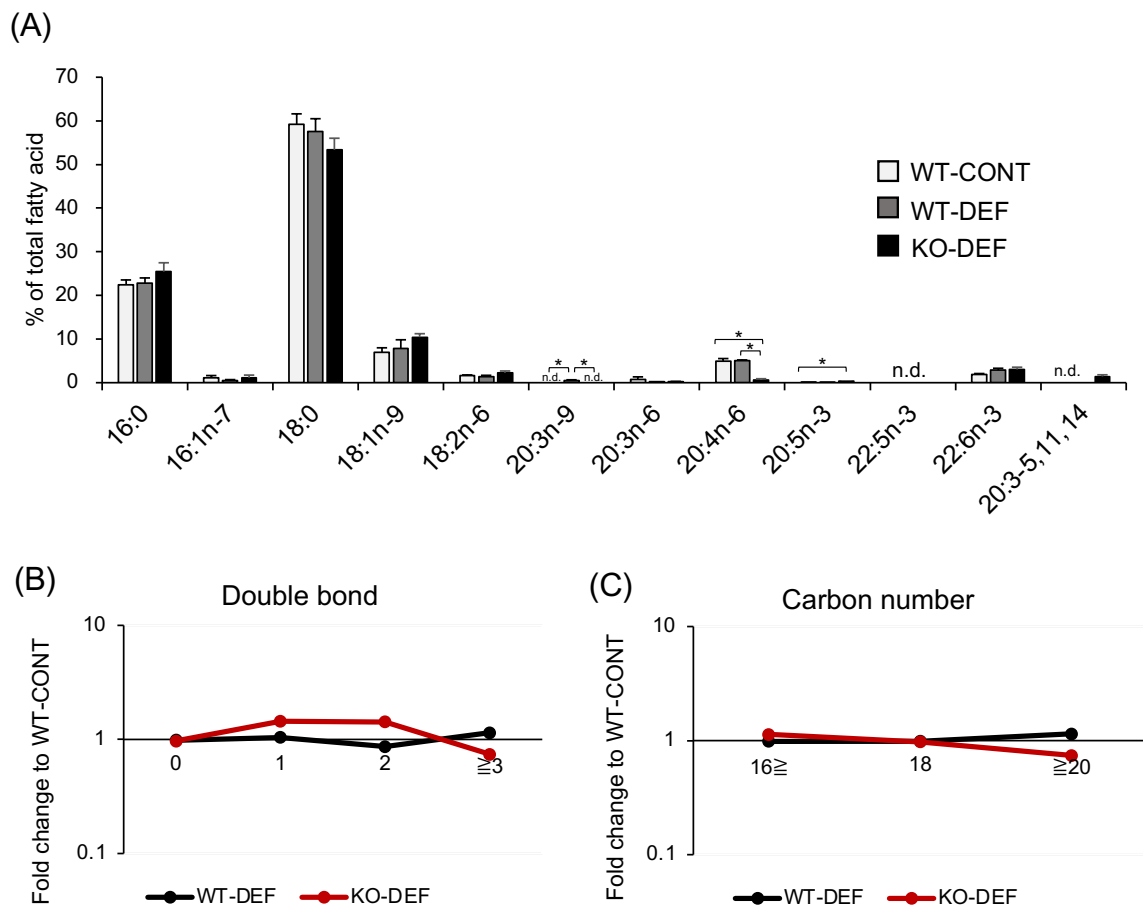


Fig. 3-2-5 肝臓の PS における脂肪酸組成の変化

(A) 脂肪酸組成を GC-MS にて測定した。(B) PS の不飽和度の変化 (C) PS の炭素数の変化

データは平均値±標準誤差で表す。

統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った (n=4~5; *, p < 0.05)

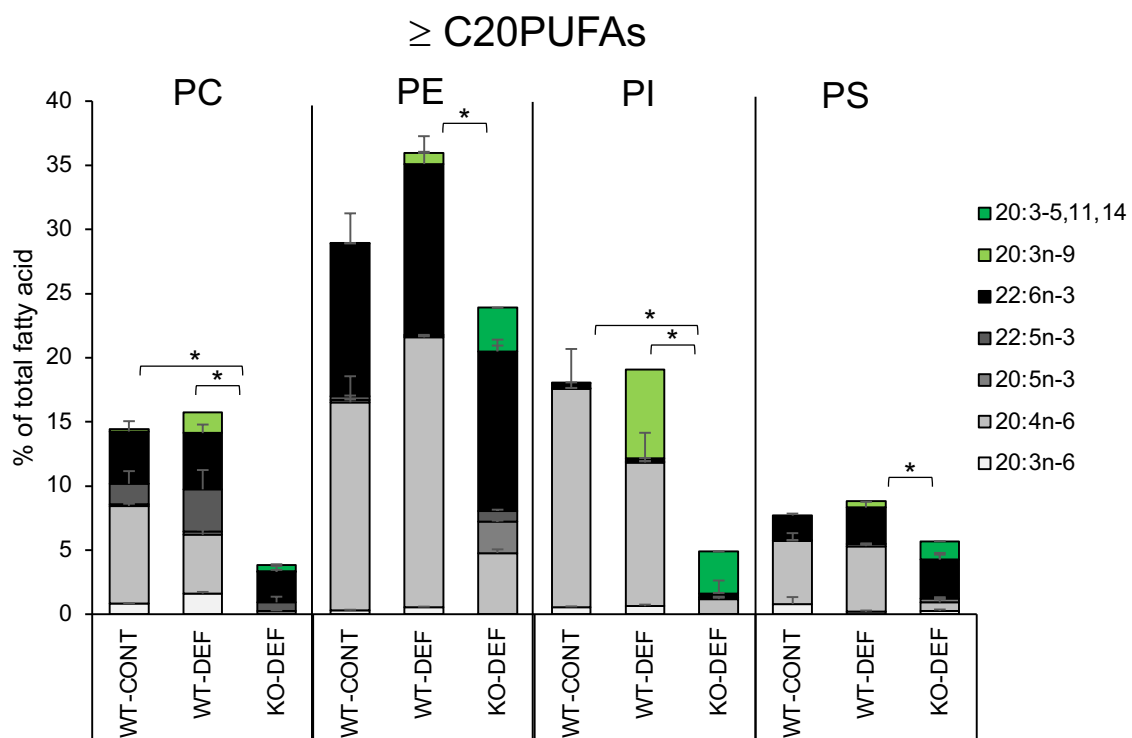


Fig. 3-2-6 各種リン脂質における \geq C20PUFA の割合

データは平均値 \pm 標準誤差で表す。

統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った (n=4~5; *, p < 0.05)

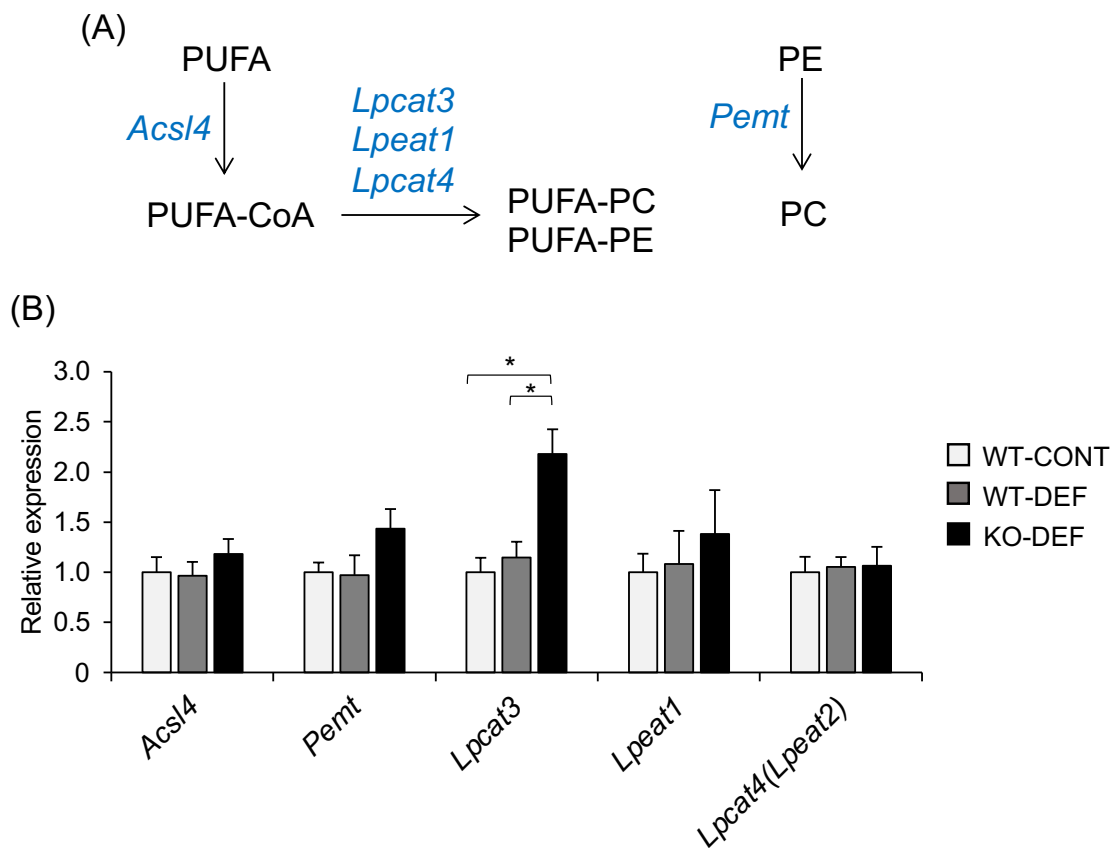


Fig. 3-2-7 PE の脂肪酸鎖の決定に關与する遺伝子の発現変化

(A) PE の脂肪酸鎖を決定する経路 (B) 肝臓における遺伝子発現の変化

データは平均値±標準誤差で表す。

統計処理は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った (n=5~6; *, p < 0.05)

第四章 総括

PUFA は生体の恒常性の維持に不可欠な必須の栄養素であり、欠乏すると成長遅延や皮膚炎、脂肪肝といった障害をきたす。アラキドン酸や EPA、DHA などの n-6 系や n-3 系の PUFA は、肝臓における脂質合成を抑制し、脂肪肝の治療に有効であると期待されている[65]。しかし、PUFA 欠乏時の脂肪肝に関する研究は少なく、発症機序は不明瞭である。我々の以前の研究では、飽和脂肪酸を脂質源とする必須脂肪酸欠乏食を与えたマウスの肝臓において、C18PUFA の顕著な減少が確認された一方で、 \geq C20PUFA の減少は穏やかであることがわかった[69]。哺乳動物では n-6 系や n-3 系 PUFA のような食事由来の PUFA が欠乏すると、通常は存在しない n-9 系の PUFA であるミード酸が合成される。このように、必須の栄養素の供給や通常の酵素の活性が失われると、代償的な代謝の変化が生じ、機能が補填される可能性がある。脂肪酸不飽和化酵素 FADS2 は n-6 系や n-3 系の C18PUFA から \geq C20PUFA の産生酵素であるだけでなく、ミード酸の産生酵素でもあることから、FADS2 欠損マウスに必須脂肪酸欠乏食を与えると内在性および外在性の全ての PUFA の供給が絶たれると予想される。従って、本研究では、FADS2 の遺伝子欠損マウスを用いて、C18PUFA だけでなく \geq C20PUFA も著しく減少するマウスを作成し、 \geq C20PUFA の欠乏が肝臓の脂質蓄積に及ぼす影響とその制御機構について検討した。さらに、PUFA が著しく欠乏した FADS2 欠損マウスにおいて代替的に産生される脂肪酸を探索することで、PUFA 欠乏時に代償的な脂肪酸代謝の変化が生じることを示した。そして、PUFA が局在するリン脂質の脂肪酸鎖の網羅的な解析を行い、FADS2 欠損マウスにおけるリン脂質脂肪酸鎖の特徴を明らかにした。

必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスにおける肝臓の脂質蓄積

必須脂肪酸欠乏食を与えた野生型マウスの肝臓における C18PUFA の総量は、通常食を与えた野生型マウスの 30%程度まで減少したが、 \geq C20PUFA の総量は通常食を与えた野生

型マウスの 70%程度の減少に留まっており、C18PUFA に比べると穏やかな減少であった。一方、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスの C18PUFA の総量は必須脂肪酸欠乏食を与えた野生型マウスと同程度まで減少していたが、 \geq C20PUFA の総量は 20%以下まで減少していた。従って、FADS2 欠損マウスに必須脂肪酸欠乏食を与えることで、HUFA が著しく欠乏することが分かった。そして、FADS2 欠損マウスでは野生型マウスの 2 群と比較して、肝臓の中性脂肪だけでなく、コレステロールも 4 倍程度増加していた。必須脂肪酸欠乏食摂食下における脂肪肝が FADS2 欠損マウスにおいて著しく増悪したことから、FADS2 を介して産生される \geq C20PUFA が脂肪肝の抑制に重要な機能を有している可能性が考えられた。

まず、C20 以上の PUFA が欠乏した際に肝臓に中性脂肪が蓄積する要因について、肝臓における中性脂肪の合成と肝臓から血中への中性脂肪の分泌の観点から検討を行なった。まず、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスでは、脂質合成のマスターレギュレーター転写因子である SREBP-1 の活性化と、SREBP-1 の標的遺伝子の発現が上方制御されていることがわかった。これまでに、PUFA は SREBP-1 の核移行による活性化と遺伝子発現を抑制することが報告されているが[80]、多くの知見は培養細胞への PUFA の添加や PUFA 添加食を与えた実験動物の解析に基づくものである。哺乳動物は生体内で C18PUFA を \geq C20PUFA へと変換できることから、C18PUFA や \geq C20PUFA など個々の PUFA に関して、欠乏の影響を評価することは困難であった。本研究の結果より、リノール酸や α -リノレン酸といった C18PUFA とアラキドン酸や DHA といった \geq C20PUFA の両方が欠乏すると肝臓において SREBP-1 の活性化が著しく誘導される可能性が示唆された。さらに、FADS2 欠損マウスでは肝臓から血中の脂質の移行を担う VLDL 粒子の分泌が減少しており、この分泌低下も肝臓の中性脂肪の蓄積に寄与していることが示唆された。アラキドン酸のような \geq C20PUFA が結合したリン脂質は膜構造や膜機能の維持に重要であり[3]、アラキドン酸含有 PC が減少した Lpcat3 欠損マウスでは VLDL 粒子の分泌が阻害される[29, 31]。必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスにおいても PC の \geq C20PUFA が著しく減少していたことから、膜機能が通常と異なることで VLDL の分泌が行われにくくなった可能性がある。また最近、DHA をリン

脂質に導入する脂肪酸転移酵素 LPAAT3 をコードする遺伝子 *Agpat3* を肝臓特異的に欠損させたマウスでは、DHA 含有リン脂質が減少するが、*Lpcat3* 欠損マウスのような VLDL 分泌障害は見られないことから、VLDL 粒子の形成に重要な機能を果たす PUFA の種類は限られていることが示唆された[98]。さらに、この *Agpat3* 欠損マウスでは肝臓において SREBP-1 を介した脂質合成が亢進したことから、DHA 含有リン脂質の過剰および欠乏に応答して SREBP-1 依存的な脂質合成が制御されるというモデルが提唱された。また、先述の *Lpcat3* 欠損マウスでは脂質合成に関与する遺伝子の発現増加は見られていない。これらの知見を考慮すると、 \geq C20PUFA が欠乏した *FADS2* 欠損マウスでは、肝臓における脂質合成の亢進と、アラキドン酸含有リン脂質の減少に伴う VLDL 分泌低下の二方向の経路を介して、肝臓における中性脂肪の蓄積が誘導されたという構図が浮かび上がる (Fig. 4-1)。より正確な制御機構の解明のためには、各リン脂質において特定の PUFA 分子種を特異的に操作した動物や培養細胞における表現型の解析が必要である。

これまで、必須脂肪酸欠乏食を与えた通常のマウスにおいて肝臓のコレステロールが蓄積したという報告はない。必須脂肪酸欠乏食を与えた *FADS2* 欠損マウスを用いた本研究において、初めて C18PUFA と \geq C20PUFA の欠乏により肝臓においてコレステロールも蓄積することが明らかとなった。そして、必須脂肪酸欠乏食を与えた *FADS2* 欠損マウスでは、肝臓においてコレステロール合成に関与する酵素の遺伝子発現と、Lanosterol や Desmosterol などコレステロール合成の中間物質のステロールが増加しており、肝臓のコレステロール合成が亢進している可能性が示唆された。しかしながら、*FADS2* 欠損マウスにおいてコレステロール合成のマスターレギュレーター転写因子である SREBP-2 の活性化の変化は確認できなかった。SREBP-1 と SREBP-2 の活性化は、S1P および S2P 依存的なタンパク質切断が共通した機構であるが、両者のタンパク質切断のメカニズムは異なっていることを示すエビデンスも示されてきている。例えば、SREBP-2 における S1P/S2P による切断の標的配列に変異を挿入すると SREBP-2 の活性化が抑制されるが、SREBP-1 には同様の現象は見られないことが報告されている[99]。従って、本研究の HUFA が欠乏した *FADS2* 欠損マウスでは、SREBP-1 に選択

的な活性化が誘導された可能性がある。また、*Hmgcr* や *Fbps* といったコレステロール合成に関与する酵素の遺伝子発現は SREBP-1 依存的にも誘導されることが報告されており[44, 81]、HUFA 欠乏時のコレステロール合成の亢進は、SREBP-1 依存的な機構もしくはその他の SREBP-2 非依存的なコレステロール合成酵素の活性化によるものである可能性がある。

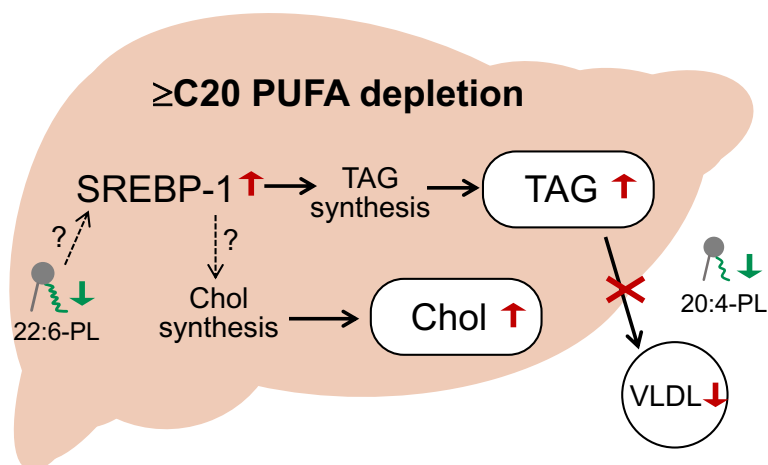


Fig. 4-1 \geq C20PUFA 欠乏時における肝臓脂質蓄積のメカニズム

結論として、炭素数 20 以上の PUFA が欠乏すると、肝臓における中性脂肪とコレステロールの蓄積が亢進することが明らかとなった (Fig. 4-1)。必須脂肪酸欠乏状態でも肝臓では FADS2 を介した \geq C20PUFA の合成が常に行われており、 \geq C20PUFA は肝臓の中性脂質蓄積の制御に重要であることが示唆された。FADS 遺伝子座における一塩基多型 (SNP) のマイナーアレルを有するヒトは、血漿 HUFA レベルが低く [100, 101]、FADS 活性の減少は NAFLD の発症、進展と関連している [102]。従って、HUFA 合成が正常に行われない可能性のあるヒトにおいては、肝臓への中性脂質の蓄積および NAFLD の進行を予防するために、十分な量の HUFA を食事から供給する必要があると考えられる。本研究の成果が NAFLD 患者に対する食事療法や、NAFLD 予防のための栄養管理計画の策定における基盤となることを期待する。

必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスにおけるリン脂質の脂質組成の変化

C18 及び \geq C20 の PUFA が著しく欠乏した FADS2 欠損マウスにおけるリン脂質の脂肪酸組成について調べたところ、非メチレン介在型不飽和脂肪酸であるシアドン酸 (20:3^{5,11,14}) が特異的に増加する脂肪酸として同定された。シアドン酸は、 \geq C20 以上の PUFA をほとんど含まない大豆油食を 4 ヶ月間与えた FADS2 欠損マウスの組織中に存在することが以前に報告されているが[88]、本研究の結果より飽和脂肪酸食を 4 週間与えた FADS2 欠損マウスにおいてもシアドン酸が合成されることが分かった。FADS1 は通常、 Δ 8 位に二重結合を持たない 20:2n-6 (Δ 11,14) を不飽和化しないが、PUFA 欠乏状態になると FADS1 による Δ 5 位の不飽和化が行われてシアドン酸が産生されたと考えられる。

PUFA はリン脂質膜に流動性を与え多様な生体膜機能をもたらすことから、PUFA が著しく欠乏した FADS2 欠損マウスでは、リン脂質において代償的な脂質代謝が行われている可能性がある。そこで、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスにおける主要なリン脂質分子種の脂肪酸鎖の変化を比較した。測定したリン脂質のうち、PC 及び PI では必須脂肪酸欠乏食を与えた WT マウスと比較して KO マウスにおいて不飽和度 3 以上の PUFA と炭素 20 以上の脂肪酸が減少し、不飽和度 1 あるいは 2 の脂肪酸が増加した。このことから、不飽和度 3 以上の HUFA が欠乏した条件下において、PC 及び PI では膜機能を維持するためにオレイン酸やリノール酸といった不飽和脂肪酸が代替的に導入された可能性がある。また、FADS2 欠損マウスで特異的に増加したシアドン酸も PI に存在していたことから、これらの非メチレン介在型不飽和脂肪酸もリン脂質膜の物性の維持に貢献した可能性がある。一方、PE における変化を比較すると、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスでも WT マウスの 2 群に比べてアラキドン酸は減少した。しかし、EPA (20:5n-3) や DPA (22:5n-3)、シアドン酸が増加していたことから、PE における HUFA の総量は通常食を与えた WT マウスと同程度に維持されていた。また、PE の DHA は FADS2 欠損マウスでも減少しなかった。以上の結果より、必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスの肝臓において、全脂質の脂肪酸組成とリン脂質の脂肪酸組成は大きく異なることがわかった。そして、PC や PI では HUFA 量は減

少したが、PE では HUFA が強く保持されており、HUFA の変化はリン脂質種により異なることが示された。このことから、肝臓における HUFA 含有 PE は生理的に必須の役割を担っている可能性が提起される。しかしながら、現在のところ HUFA 含有 PE の機能的な重要性は明らかにされていない。リン脂質リモデリング回路におけるリゾリン脂質の再アシル化を触媒するアシル転移酵素は膜タンパク質であることから同定には精製技術が必要であり、各種リン脂質に特異的な活性を有するアシル転移酵素が同定されたのは 2004 年～2010 年と比較的最近のことである。その後、各酵素の欠損動物を用いた機能解析が進められ、PUFA 含有リン脂質が重要な生理学的機能を有することが示されてきている。しかし、PE 中の PUFA が特異的に減少する動物や細胞モデルはこれまでに報告されておらず、PUFA 含有 PE が欠乏した際の生態への影響は不明である。LPCAT3 はアラキドン酸などの PUFA-CoA に高い基質特異性を有するアシル転移酵素であり[103]、リゾ PC だけでなくリゾ PE に対してもアシル転移活性を有することから、LPCAT3 欠損マウスでは PC と PE の両方においてアラキドン酸が減少する[31]。必須脂肪酸欠乏食を与えた FADS2 欠損マウスでは *Lpcat3* の遺伝子発現が WT マウスと比較して上昇したことから、LPCAT3 による HUFA のリン脂質への転移が増加した可能性が考えられる。しかし、本研究のリン脂質解析の結果を見ると、HUFA 欠乏状態にある FADS2 欠損マウスにおいて PE の HUFA が維持された一方で PC の HUFA は減少しており、LPCAT3 の単純な発現や活性の増加では PE において特異的に HUFA が保持された現象を説明することができない。今回、FADS2 欠損マウスにおいて HUFA 含有 PE が維持された要因は明らかでないが、LPCAT3 の基質選択性や、リン脂質アシル鎖の切断を触媒するホスホリパーゼの活性が変化した可能性がある。今後、PE の脂肪酸鎖における HUFA の保持に関与する酵素の同定により、PE における HUFA の生理的機能が解明されることが期待される。

本研究では、FADS2 の遺伝的欠損によって HUFA が著しく欠乏したマウスの肝臓における脂質代謝の変化を調べた。HUFA 産生が阻害された FADS2 欠損マウスにおいて、必須脂肪酸欠乏時の脂肪肝が著しく増悪したことから、FADS2 を介して産生される HUFA が肝臓の正常な脂質代謝の維持に重要である可能性が示唆された。また、FADS2 欠損マウスでは特

定のリン脂質において代償性の脂肪酸組成の変化が観察されたことから、哺乳動物においてリン脂質の HUFA が著しく減少すると、その欠乏を補填する代替的な脂質代謝の変化が生じる可能性が示唆された。本研究の成果が今後、必須脂肪酸の代謝物である HUFA や HUFA が導入されたリン脂質といった個々の脂質分子種の機能の理解に貢献することを期待する。

参考文献

1. Wallis JG, Watts JL, Browse J. Polyunsaturated fatty acid synthesis: What will they think of next? *Trends Biochem Sci* 2002, 27; 467-473.
2. Spector SS, Yorek MA. Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res* 1985, 26; 1015-1035.
3. Leifert WR, Jahangiri A, McMurchie EJ. Membrane fluidity changes are associated with the antiarrhythmic effects of docosahexaenoic acid in adult rat cardiomyocytes. *J Nutr Biochem* 2000, 11; 38-44.
4. Horrobin DF. Essential fatty acids in clinical dermatology. *J Am Acad Dermatol* 1989, 20; 1045-1053.
5. Innis SM. Essential fatty acids in growth and development. *Prog Lipid Res* 1991, 30; 39-103.
6. Mead JF, Slaton Jr WH. Metabolism of essential fatty acids, III. Isolation of 5,8,11-eicosatrienoic acid from fat-deficient rats. *J Biol Chem* 1956, 219; 705-709.
7. Klein PD, Johnson RM. A study of the onset of unsaturated fatty acid deficiency in subcellular particles of rat livers. *Arch Biochem Biophys* 1954, 48; 380-385.
8. Siguel EN, Chee KM, Gong JX, Schaefer EJ. Criteria for essential fatty acid deficiency in plasma as assessed by capillary column gas-liquid chromatography. *Clin Chem* 1987, 33; 1869-1873.
9. Fokkema M, Smit E, Martini I, Woltil H, Boersma E, Muskiet F. Assessment of essential fatty acid and ω 3-fatty acid status by measurement of erythrocyte 20:3 ω 9 (Mead acid), 22:5 ω 6/20:4 ω 6 and 22:5 ω 6/22:6 ω 3. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002, 67; 345-356.
10. Martins FM, Wennberg A, Meurling S, Kihlberg R, Lindmark L. Serum lipids and fatty acid composition of tissues in rats on total parenteral nutrition (TPN). *Lipids* 1984, 19; 728-737.

11. Paassilta M, Kuusela E, Korppi M, Lemponen R, Kaila M, Nikkari ST. Food allergy in small children carries a risk of essential fatty acid deficiency, as detected by elevated serum mead acid proportion of total fatty acids. *Lipids Health Dis* 2014, 13; 180.
12. Sojo A, Vazquez C, Aldamiz-Echevarria L, Martinez N, Baranda F, Garcia A, Prieto J. Fatty acids and cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2010, 9; S93.
13. Koletzko B, Bretschneider A, Bremer HJ. Fatty acid composition of plasma lipids in acrodermatitis enteropathica before and after zinc supplementation. *Eur J Pediatr* 1985, 143; 310-314.
14. Ducheix S, Montagner A, Polizzi A, Lasserre F, Marmugi A, Bertrand-Michel J, Guillou H. Essential fatty acids deficiency promotes lipogenic gene expression and hepatic steatosis through the liver X receptor. *J Hepatol* 2013, 58; 984-992.
15. Nakajima T, Yang Y, Lu Y, Kamijo Y, Yamada Y, Nakamura K, Aoyama T. Decreased fatty acid β -oxidation is the main cause of fatty liver induced by polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. *Tohoku J Exp Med* 2017, 242; 229-239.
16. Lakananurak N, Tienchai K. Incidence and risk factors of parenteral nutrition-associated liver disease in hospitalized adults: A prospective cohort study. *Clin Nutr ESPEN* 2019, 34; 81-86.
17. Bechynska K, Daskova N, Vrzackova N, Harant K, Heczková M, Podzimkova K, Cahova M. The effect of ω -3 polyunsaturated fatty acids on the liver lipidome, proteome and bile acid profile: Parenteral versus enteral administration. *Sci Rep* 2019, 9; 19097.
18. Stoffel W, Holz B, Jenke B, Binczek E, Günter RH, Kiss C, Addicks K. D6-desaturase (FADS2) deficiency unveils the role of omega3- and omega6- polyunsaturated fatty acids. *EMBO J* 2008, 27; 2281-2292.
19. Stroud CK, Nara TY, Roqueta-Rivera M, Radlowski EC, Lawrence P, Zhang Y, Nakamura MT. Disruption of FADS2 gene in mice impairs male reproduction and causes dermal and intestinal ulceration. *J Lipid Res* 2009, 50; 1870-1880.

20. Roqueta-Rivera M, Stroud CK, Haschek WM, Akare SJ, Segre M, Brush RS, Nakamura MT. Docosahexaenoic acid supplementation fully restores fertility and spermatogenesis in male delta-6 desaturase-null mice. *J Lipid Res* 2009, 51; 360-367.
21. Ichi I, Kono N, Arita Y, Haga S, Arisawa K, Yamano M, Arai H. 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 Mol Cell Biol Lipids* 2014, 1841; 204-213.
22. Tanford C. Amphiphile orientation: physical chemistry and biological function. *Biochem Soc Trans* 1987, 15; Suppl:1S-7S
23. Vance JE. Thematic review series: Glycerolipids. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. *J Lipid Res* 2008, 49; 1377-1387.
24. Yang Y, Lee M, Fairn GD. Phospholipid subcellular localization and dynamics. *J Biol Chem* 2018, 293; 6230-6240.
25. Chen B, Jiang Y, Zeng S, Yan J, Li X, Zhang Y, Wang X. Endocytic sorting and recycling require membrane phosphatidylserine asymmetry maintained by TAT-1/CHAT-1. *PLOS Genetics* 2010, 6; e1001235.
26. Shindou H, Shimizu T. Acyl-coa:lysophospholipid Acyltransferases. *J Biol Chem* 2008, 284; 1-5.
27. Yamashita A, Hayashi Y, Nemoto-Sasaki Y, Ito M, Oka S, Tanikawa T, Sugiura T. Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. *Prog Lipid Res* 2014, 53; 18-81.
28. Pinot M, Vanni S, Pagnotta S, Lacas-Gervais S, Payet L, Ferreira T, Barelli H. Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins. *Science* 2014, 345; 693-697.

29. Rong X, Wang B, Dunham MM, Hedde PN, Wong JS, Gratton E, Tontonoz P. Lpcat3-dependent production of arachidonoyl phospholipids is a key determinant of triglyceride secretion. *eLife* 2015, 4; e06557.
30. Lee H, Inoue T, Sasaki J, Kubo T, Matsuda S, Nakasaki Y, Arai H. LPIAT1 regulates arachidonic acid content in phosphatidylinositol and is required for cortical lamination in mice. *Mol Biol Cell* 2012, 23; 4689-4700.
31. Hashidate-Yoshida T, Harayama T, Hishikawa D, Morimoto R, Hamano F, Tokuoka SM, Shimizu T. Fatty acid remodeling by LPCAT3 enriches arachidonate in phospholipid membranes and regulates triglyceride transport. *eLife* 2015, 4; e06328.
32. Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* 2014, 53; 124-144.
33. DeBose-Boyd RA, Ye J. SREBPs in lipid metabolism, insulin signaling, and beyond. *Trends Biochem Sci* 2018, 43; 358-368.
34. Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Brown MS. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* 1993, 75; 187-197.
35. Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL, Wang X. SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci* 1993, 90; 11603-11607.
36. Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, Goldstein JL. SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* 1994, 77; 53-62.
37. Hua X, Sakai J, YK Ho, Goldstein JL, Brown MS. Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection. *J Biol Chem* 1995, 270; 29422-29427.

38. Hua X, Nohturfft A, Goldstein JL, Brown MS. Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell* 1996, 87; 415-426.
39. Nohturfft A, Brown MS, Goldstein JL. Topology of SREBP cleavage-activating protein, a Polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain. *J Biol Chem* 1998, 273; 17243-17250.
40. Sakai J, Nohturfft A, Cheng D, Ho YK, Brown MS, Goldstein JL. Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activatin. *J Biol Chem* 1997, 272; 20213-20221.
41. Sakai J, Duncan EA, Rawson RB, Hua X, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a Transmembrane segment. *Cell* 1996, 85; 1037-1046.
42. Sakai J, Rawson RB, Espenshade PJ, Cheng D, Seegmiller AC, Goldstein JL, Brown MS. Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol Cell* 1998, 2; 505-514.
43. Rawson RB, Zelenski NG, Nijhawan D, Ye J, Sakai J, Hasan MT, Goldstein JL. Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol Cell* 1997, 1; 47-57.
44. Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, Goldstein JL. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci* 2003, 100; 12027-12032.
45. Tian J, Goldstein JL, Brown MS. Insulin induction of SREBP-1c in rodent liver requires LXR α -C/EBP β complex. *Proc Natl Acad Sci* 2016, 113; 8182-8187.
46. Caron A, Richard D, Laplante M. The roles of mTOR complexes in lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 2015, 35; 321-348.

47. Radhakrishnan A, Goldstein JL, McDonald JG, Brown MS. Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: A delicate balance. *Cell Metab* 2008, 8; 512-521.
48. Jin W, Matthew AM, Dieter L, Jonathan CC, Xiao-Song X, Helen HH. Relative roles of ABCG5/ABCG8 in liver and intestine. *J Lipid Res* 2015, 56; 319-330.
49. Wu JE, Basso F, Shamburek RD, Amar MJ, Vaisman B, Szakacs G, Santamarina-Fojo S. Hepatic ABCG5 and ABCG8 overexpression increases hepatobiliary sterol transport but does not alter aortic atherosclerosis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2004, 279; 22913-22925.
50. Kusters A, Frijters RJ, Schaap FG, Vink E, Plösch T, Ottenhoff R, Groen AK. Relation between hepatic expression of ATP-binding cassette transporters G5 and G8 and biliary cholesterol secretion in mice. *J Hepatol* 2003, 38; 710-716.
51. Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, Iqbal SN, Edelman ER, Krieger M. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* 1997, 387; 414-417.
52. Ji Y, Wang N, Ramakrishnan R, Sehayek E, Huszar D, Breslow JL, Tall AR. Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. *J Biol Chem* 1999, 274; 33398-33402.
53. EASL-EASD-EASO. Clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Obes Facts* 2016, 9; 65-90.
54. Musso G, Cassader M, Rosina F, Gambino R. Impact of current treatments on liver disease, glucose metabolism and cardiovascular risk in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Diabetologia* 2012, 55; 885-904.
55. Lonardo A, Ballestri S, Marchesini G, Angulo P, Loria P. Non alcoholic fatty liver disease: A precursor of the metabolic syndrome. *Dig Liver Dis* 2015, 47; 181–190
56. DelBen M, Polimeni L, Baratta F, Pastori D, Loffredo L, Angelico F. Modern approach to the clinical management of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014, 20, 8341-8350.

57. Lottenberg AM, AfonsoMda S, Lavrador MS, Machado RM, Nakandakare ER. Theroleofdietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. *J Nutr Biochem* 2012, 23; 1027–1040.
58. Lopez-Vicario C, Gonzalez-Periz A, Rius B, Moran-Salvador E, Garcia-Alonso V, Lozano JJ, Bataller R, Cofan M, Kang JX, Arroyo V. Molecular interplay between delta5/delta6 desaturases and long-chain fatty acids in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2014, 63; 344–355.
59. Tanaka T, Shen J, Abecasis GR, Kisialiou A, Ordovas JM, Guralnik JM, Ferrucci L. Genome-wide association study of plasma polyunsaturated fatty acids in the InCHIANTI study. *PLOS Genet* 2009, 5; e1000338.
60. Gillingham LG, Harding SV, Rideout TC, Yurkova N, Cunnane SC, Eck PK, Jones PJ. Dietary oils and FADS1-FADS2 genetic variants modulate [¹³C]α-linolenic acid metabolism and plasma fatty acid composition. *Am J Clin Nutr* 2012, 97; 195-207.
61. Li S, Lin K, Ma P, Zhang Z, Zhou Y, Lu S, Liu S. FADS gene polymorphisms confer the risk of coronary artery disease in a Chinese Han population through the altered Desaturase activities: Based on high-resolution melting analysis. *PLOS ONE* 2013, 8; e55869.
62. Song Z, Cao H, Qin L, Jiang Y. A case-control study between gene polymorphisms of polyunsaturated fatty acid metabolic rate-limiting enzymes and acute coronary syndrome in Chinese Han population. *BioMed Res Int* 2013, 2013; 928178.
63. Vernekar M, Amarapurkar D, Joshi K, Singhal R. Gene polymorphisms of desaturase enzymes of polyunsaturated fatty acid metabolism and adiponutrin and the increased risk of nonalcoholic fatty liver disease. *Meta Gene* 2017, 11; 152-156.
64. Li Y, Yang L, Sha K, Liu T, Zhang L, Liu X. Efficacy of poly-unsaturated fatty acid therapy on patients with nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2015, 21; 7008-7013.

65. Musa-Veloso K, Venditti C, Lee HY, Darch M, Floyd S, West S, Simon R. Systematic review and meta-analysis of controlled intervention studies on the effectiveness of long-chain omega-3 fatty acids in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Rev* 2018, 76; 581-602.
66. Silva Figueiredo P, Carla Inada A, Marcelino G, Maiara Lopes Cardozo C, De Cássia Freitas K, De Cássia Avellaneda Guimarães R, Aiko Hiane P. Fatty acids consumption: The role metabolic aspects involved in obesity and its associated disorders. *Nutrients* 2017, 9; 1158.
67. Sekiya M. Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology* 2003, 38; 1529-1539.
68. Dentin R. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest* 2005, 115; 2843-2854.
69. Hayashi Y, Shimamura A, Ishikawa T, Fujiwara Y, Ichi I. FADS2 inhibition in essential fatty acid deficiency induces hepatic lipid accumulation via impairment of very low-density lipoprotein (VLDL) secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2018, 496; 549-555.
70. Bligh EG, Dyer WJ. A Rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959, 37; 911-917.
71. Wang C, Liu W, Yao L, Zhang X, Zhang X, Ye C, Ai D. Hydroxyeicosapentaenoic acids and epoxyeicosatetraenoic acids attenuate early occurrence of nonalcoholic fatty liver disease. *Br J Pharmacol* 2017, 174; 2358-2372.
72. Maciejewska D, Marlicz W, Ryterska K, Banaszczak M, Jamioł-Milc D, Stachowska E. Changes of the fatty acid profile in erythrocyte membranes of patients following 6-Month dietary intervention aimed at the regression of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Can J Gastroenterol Hepatol* 2018, 2018; 5856201.
73. Qin Y, Zhou Y, Chen S, Zhao X, Ran L, Zeng X, Mi M. Fish oil supplements lower serum lipids and glucose in correlation with a reduction in plasma fibroblast growth factor 21 and prostaglandin

- E2 in nonalcoholic fatty liver disease associated with hyperlipidemia: A randomized clinical trial. *PLOS ONE* 2015, 10; e0133496.
74. Luong A. Identification of three novel SREBP-activated target genes: acetyl CoA synthetase, 3- β -hydroxysterol dehydrogenase, and CL-6/INSIG1. Ph.D. dissertation. (Dallas: University of Texas South-western Medical Center at Dallas) 2000, 1–137.
 75. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Lehmann JM. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Proc Natl Acad Sci* 1997, 94; 4318-4323.
 76. Krey G, Braissant O, L'Horset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W. Fatty acids, Eicosanoids, and Hypolipidemic agents identified as ligands of Peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 1997, 11; 779-791.
 77. Musso G, Gambino R, Cassader M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Prog Lipid Res* 2013, 52; 175-191.
 78. DeBose-Boyd RA, Ou J, Goldstein JL, Brown MS. Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA in rat hepatoma cells requires endogenous LXR ligands. *Proc Natl Acad Sci* 2001, 98; 1477-1482.
 79. Ou J, Tu H, Shan B, Luk A, DeBose-Boyd RA, Bashmakov Y, Goldstein JL, Brown MS. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98; 6027-6032.
 80. Takeuchi Y, Yahagi N, Izumida Y, Nishi M, Kubota M, Teraoka Y, Shimano H. Polyunsaturated fatty acids selectively suppress sterol regulatory element-binding protein-1 through proteolytic processing and Autoloop regulatory circuit. *J Biol Chem* 2010, 285; 11681-11691.

81. Jossic-Corcus C LE, Gonthier C, Zaghini I, Logette E, Shechter I, Bournot P. Hepatic farnesyl diphosphate synthase expression is suppressed by polyunsaturated fatty acids. *Biochem J* 2005, 385; 787-794.
82. Bloch K. The biological synthesis of cholesterol. *Science* 1965, 150; 19-28.
83. Kandutsch AA, Russell AE. Preputial gland tumor sterols.2. The identification of 4 alpha-methyl-Delta 8-cholesten-3 beta-ol. *J Biol Chem* 1960, 235; 2253–2255.
84. Kandutsch AA, Russell AE. Preputial gland tumor sterols. 3. A metabolic pathway from lanosterol to cholesterol. *J Biol Chem* 1960, 235; 2256–2261.
85. Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, Iqbal SN, Edelman ER, Krieger M. (1997). Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* 1997, 387; 414-417.
86. Ji Y, Wang N, Ramakrishnan R, Sehayek E, Huszar D, Breslow JL, Tall AR. Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. *J Biol Chem* 1999, 274; 33398-33402.
87. Liu W, Qin L, Yu H, Lv F, Wang Y. Apolipoprotein A-I and adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1 expression alleviates lipid accumulation in hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol* 2014, 29; 614-622.
88. Stoffel W, Hammels I, Jenke B, Binczek E, Schmidt-Soltau I, Brodessaer S, Thevis M. Obesity resistance and deregulation of lipogenesis in $\Delta 6$ -fatty acid desaturase (FADS2) deficiency. *EMBO rep* 2013, 15; 110-120.
89. Tanaka T, Takimoto T, Morishige J, Kikuta Y, Sugiura T, Satouchi K. Non-methylene-Interrupted polyunsaturated fatty acids: Effective substitute for Arachidonate of Phosphatidylinositol. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 264; 683-688.

90. Pédrone F, Boulier-Monthéan N, Boissel F, Ossemond J, Viel R, Fautrel A, Dupont D. Sciadonic acid derived from pine nuts as a food component to reduce plasma triglycerides by inhibiting the rat hepatic $\Delta 9$ -desaturase. *Sci Rep* 2020, 10; 6223.
91. Yuki K, Shindou H, Hishikawa D, Shimizu T. Characterization of mouse lysophosphatidic acid acyltransferase 3: An enzyme with dual functions in the testis. *J Lipid Res* 2008, 50; 860-869.
92. Koeberle A, Shindou H, Harayama T, Shimizu T. Role of lysophosphatidic acid acyltransferase 3 for the supply of highly polyunsaturated fatty acids in TM4 Sertoli cells. *FASEB J* 2010, 24; 4929-4938.
93. Eto M, Shindou H, Shimizu T. A novel lysophosphatidic acid acyltransferase enzyme (LPAAT4) with a possible role for incorporating docosahexaenoic acid into brain glycerophospholipids. *Biochem Biophys Res Commun* 2014, 443; 718-724.
94. Shindou H, Koso H, Sasaki J, Nakanishi H, Sagara H, Nakagawa KM, Shimizu T. Docosahexaenoic acid preserves visual function by maintaining correct disc morphology in retinal photoreceptor cells. *J Biol Chem* 2017, 292; 12054-12064.
95. Iizuka-Hishikawa Y, Hishikawa D, Sasaki J, Takubo K, Goto M, Nagata K, Shimizu T. Lysophosphatidic acid acyltransferase 3 tunes the membrane status of germ cells by incorporating docosahexaenoic acid during spermatogenesis. *J Biol Chem* 2017, 292; 12065-12076.
96. Harayama T, Riezman H. Author correction: Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019, 20; 715-715.
97. Hicks AM, DeLong CJ, Thomas MJ, Samuel M, Cui Z. Unique molecular signatures of glycerophospholipid species in different rat tissues analyzed by tandem mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2006, 1761; 1022-1029.
98. Hishikawa D, Yanagida K, Nagata K, Kanatani A, Iizuka Y, Hamano F, Shimizu T. Hepatic levels of DHA-containing phospholipids instruct SREBP1-mediated synthesis and systemic delivery of polyunsaturated fatty acids. *iScience* 2020, 23; 101495.

99. Nakakuki M, Kawano H, Notsu T, Imada K, Mizuguchi K, Shimano H. A novel processing system of sterol regulatory element-binding protein-1c regulated by polyunsaturated fatty acid. *J Biochem* 2014, 155; 301-313.
100. Cormier H, Rudkowska I, Lemieux S, Couture P, Julien P, Vohl M. Effects of FADS and ELOVL polymorphisms on indexes of desaturase and elongase activities: Results from a pre-post fish oil supplementation. *Genes Nutr* 2014, 9; 437.
101. Schaeffer L, Gohlke H, Müller M, Heid IM, Palmer LJ, Kompauer I. Common genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster and their reconstructed haplotypes are associated with the fatty acid composition in phospholipids. *Hum Mol Genet* 2006, 15; 1745-1756.
102. Araya J, Rodrigo R, Pettinelli P, Araya AV, Poniachik J, Videla LA. Decreased liver fatty acid Δ -6 and Δ -5 Desaturase activity in obese patients. *Obesity* 2010, 18; 1460-1463.
103. Hishikawa D, Shindou H, Kobayashi S, Nakanishi H, Taguchi R, Shimizu T. Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity. *Proc Natl Acad Sci* 2008, 105; 2830-2835.

謝辞

本博士論文は、筆者がお茶の水女子大学人間文化創成科学研究科ライフサイエンス専攻博士後期課程在学中に、栄養化学研究室において行った研究をまとめたものです。本研究を進めるにあたりお世話になった皆様に感謝致します。

本研究を進めるに際して、終始ご指導くださいました、お茶の水女子大学基幹研究院自然科学系 市育代 講師に感謝致します。研究方針を定めるにあたっても多くのご指導を賜り、充実した研究を進めることができました。また、藤原葉子 教授からは、豊富な知識と経験に基づいて的確なご助言やご指摘を頂きました。ご多忙の中、いつも丁寧かつ熱心なご指導と温かいご配慮を頂きましたことに感謝致します。

本論文の審査にあたり論文をご覧いただき審査くださいました飯田薫子 教授、小林哲幸 教授、森光康次郎 教授に厚く御礼申し上げます。

また、研究に際してご指導・ご助言くださいました独立行政法人 医薬品医療機器総合機構の新井洋由 教授、東京大学大学院薬学系研究科衛生化学教室 河野望 准教授に感謝申し上げます。豊富な知識と鋭い洞察力からいつも有益なアドバイスをいただきました。また、実験機器や試薬も快く提供していただき、心より感謝致します。FADS2 欠損マウスをご提供くださいました順天堂大学医学部生化学第一講座 横溝岳彦 教授、李 賢喆 助教に感謝致します。

栄養化学研究室の先輩方からは、実験の技術的な面でのご指導をいただきました。先輩方の研究に取り組む姿勢が見本となり研究を進める活力となりました。また、研究室の同期や後輩の皆様と切磋琢磨しあいながら研究室生活を共にしてきたことで、多くの困難を乗り越えることができました。

最後に、いつも私を支えてくれた家族、友人の皆様に深く感謝致します。多くの方々に支えられて研究生生活を送ってきたことに心から感謝し、謝辞とさせていただきます。

令和3年3月