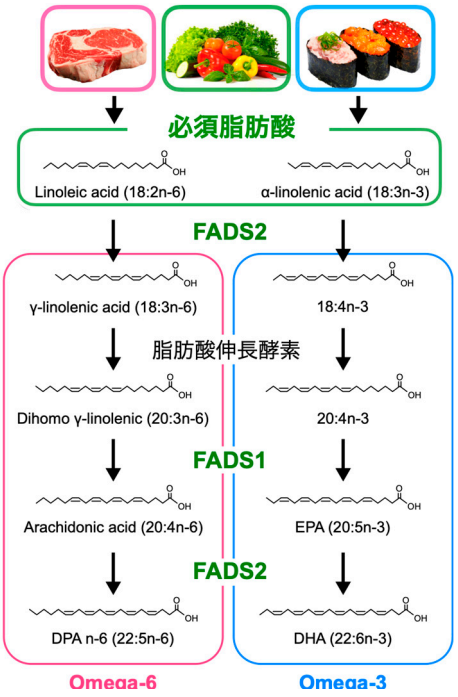
56　高度不飽和脂肪酸分子種の発生における役割の解明	横溝　岳彦

【目的】分子内に 2 つ以上の二重結合を有する脂肪酸を高度不飽和脂肪酸（PUFA）と総称する。生体内や食物には多種類の PUFA が含まれており、近年ではω3PUFA（エイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸）の抗炎症作用が強調され、これらを含有するサプリメントが広く販売されている。PUFA には多数の分子種が存在するものの、その分子種ごとの役割の違いの詳細は必ずしも明らかになっていない。その原因の一つに、マウスをはじめとした実験動物で PUFA の分子種と量を人為的にコントロールする実験系が存在しなかったことがあげられる。本研究では、マウス PUFA 合成に必須の不飽和化酵素 *FADS2* 遺伝子欠損マウスを作製し、1）PUFA を含有しない餌を投与することで PUFA 欠乏状態を作り出し、表現型を解析すること、2）特定の分子種の PUFA を餌に混ぜて PUFA 欠乏マウスに投与し、表現型の回復を観察することで、PUFA 分子種の生体内における役割の解明を試みた。

【方法】C57BL/6J マウスの受精卵を材料に CRISPR/Cas9 システムを用いて *FADS2* 遺伝子欠損マウスを作製した。このマウスを、PUFA を含有しない特殊餌で 8 週間飼育することで PUFA 欠乏マウスを樹立した。PUFA 欠乏マウスの肝臓と精巣の脂質を回収して網羅的リン脂質解析を行った。精巣ライディッヒ細胞をゴナドトロピン（hCG）で刺激してステロイドを産生させた際の PUFA 欠乏の影響を観察した。PUFA 欠乏ライディッヒ細胞におけるステロイドホルモン産生をレスキューする PUFA 分子種の探索を行った。

【結果】*FADS2* 遺伝子欠損マウスを樹立し、全ての臓器で FADS2 の発現が消失していることを見いだした。これらのマウスを、PUFA を含有しない特殊餌で 8 週間飼育することで作製した PUFA 欠乏マウスの臓器では、アラキドン酸（ARA）やドコサペンタエン酸（DPA）などのω6PUFA を含有するリン脂質がほぼ消失するのに対し、ω3PUFA であるドコサヘキサエン酸（DHA）を含有するリン脂質は比較的保持されており、特に精巣で保たれていた。FADS2 が高発現する精巣ライディッヒ細胞におけるステロイドホルモン産生は PUFA 欠乏によって大きく減弱し、ω6 脂肪酸の添加によりレスキューされた。以上より、ライディッヒ細胞におけるステロイドホルモン産生にはω6PUFA が必要である事が明らかになった。

ωPUFA の生合成系路



56. 高度不飽和脂肪酸分子種の発生における役割の解明

横溝　岳彦

順天堂大学 医学研究科 生化学・細胞機能制御学

Key words：デサチュラーゼ，ステロイドホルモン，アラキドン酸，DHA，ω6 脂肪酸

緒　言

分子内に 2 つ以上の二重結合を有する脂肪酸を高度不飽和脂肪酸（PUFA）と総称する［1］。生体内や食物には多種類の PUFA が含まれているが、PUFA 分子種ごとの役割の違いの詳細はアラキドン酸を除いては明らかになっていない。その原因の一つに、マウスをはじめとした実験動物で PUFA の分子種と量を人為的にコントロールする実験系が存在しなかったことがあげられる。そこで本研究では、マウス PUFA 合成に必須の不飽和化酵素 *FADS2* 遺伝子欠損マウスを作製し、1) PUFA を含有しない餌を投与することで PUFA 欠乏状態を作り出し、表現型を解析すること、2）特定の分子種の PUFA を餌に混ぜて PUFA 欠乏マウスに投与し、表現型の回復を観察することで、PUFA 分子種の生体内における役割の解明を試みた。

方　法

1. PUFA 欠乏マウスの作製と PUFA 投与によるレスキュー実験

PUFA 欠乏マウスは、脂肪酸不飽和化酵素 *FADS2* の遺伝子欠損マウスに PUFA 非含有食を摂食させることで樹立した。C57BL/6J マウスの受精卵に Cas9 mRNA とガイド RNA をインジェクションし、24 時間 Whitten's medium で培養した後、ICR 系統の偽妊娠雌マウスの子宮内に移植した。生まれたマウスの尾からゲノム DNA を抽出し、T7E1 酵素アッセイと塩基配列決定によって *FADS2* 遺伝子欠損マウスのラインをスクリーニングした。翻訳開始コドンの下流に 65 塩基対の欠失を有するラインと、翻訳開始コドンを含む 81 塩基対の欠失を有するラインを確認した。これらの 2 系統のマウスを少なくとも 2 世代にわたって C57BL/6J マウスにバッククロスした後にヘテロ欠損マウス同士の交配を行い、得られたホモ欠損マウスと野生型マウスを以降の実験に供した。両系統の *FADS2* ホモ欠損マウスはいずれも FADS2 タンパク質を発現しておらず、後述する脂質解析において同様の変化を示した。

これらのマウスを 3 週齢で離乳させた後、PUFA を含有しない特殊餌（AIM-93G）で 8 週間飼育したのちに様々な実験に供した。PUFA 投与によるレスキューは、AIM-93G での 10 週間飼育する際の、最後の 6 週間、400 mg/kg 体重の PUFA 分子種を、ゾンデを用いて経口投与することで行った。

2. 抗 FADS2 抗体の作製、Western blotting、免疫組織化学染色

マウス FADS2 配列を有するペプチド（EIQKHNLRTDRWLVIDRKV と DIVSSLKKSGELWLDAYLHK）を用いてウサギを免疫することで抗 FADS2 抗血清を得た。イムノグロブリン画分は Protein G セファロースを用いて精製した。免疫と精製は免疫生物研究所（藤岡市）に外注した。Western blotting と免疫組織化学染色は常法に従って行った。

3. ライディッヒ細胞の回収と培養

ライディッヒ細胞の回収は文献［2］に従って行った。回収した細胞は、20 U/ml hCG 含有 Waymouth's solution で培養した。

4. 質量分析を用いた網羅的脂質解析

Bligh & Dyer 法を用いてマウス臓器や細胞から総脂質画分を抽出した。有機層を窒素ガスにて乾固し、メタノールにて溶解後、測定まで−80℃で保存した。研究室にて確立したリン脂質一斉定量は、ACQUITY UPLC BEH C18 column（1.7 μm、2.1×100 mm ; Waters、Milford、MA、USA）で脂質を分離後、タンデムに接続した三連四重極型質量分析計（Xevo™ TQ-S micro）を用いて行った。

結果および考察

1. *FADS2* 欠損マウスの作製（図 1）

FADS2 は、必須不飽和脂肪酸であるリノール酸やα-リノレン酸から PUFA を生合成する律速酵素である（図 1A）。CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した *FADS2* ホモ欠損マウスの脳、肝臓、精巣、副腎、腎臓の Western blotting では FADS2 タンパク質の欠損が確認された（図 1B）。免疫組織染色において、FADS2 は精巣のライディッヒ細胞に特異的に発現していた（図 1C）。

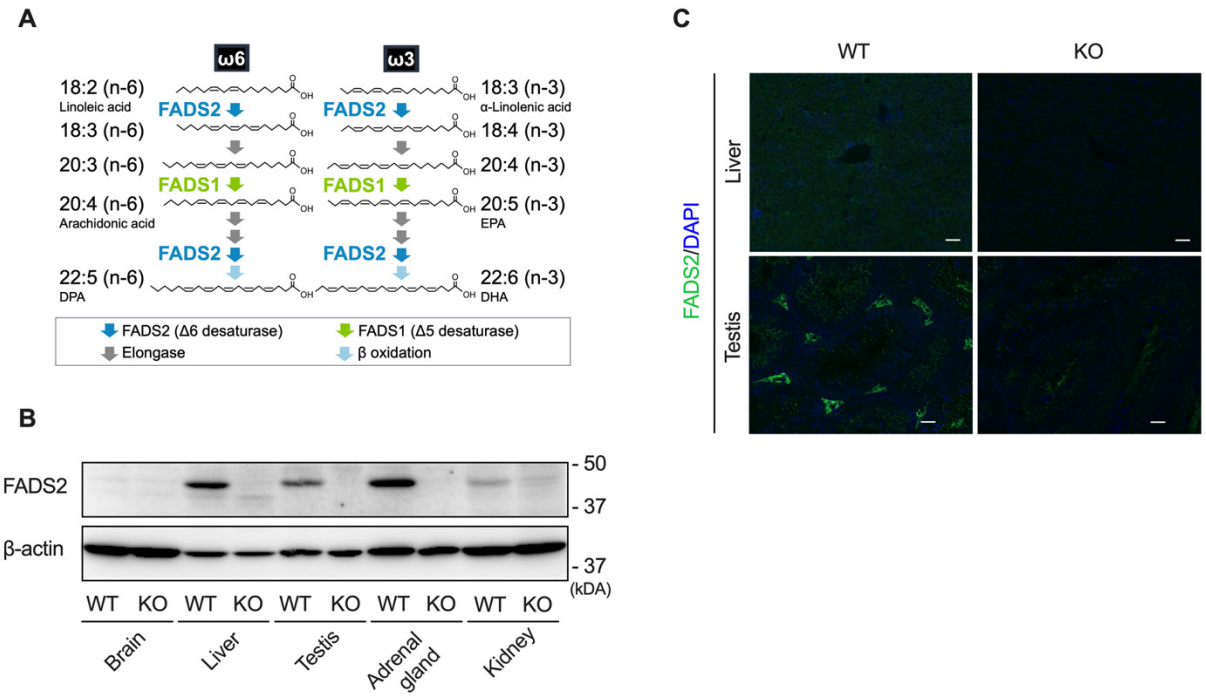


図 1. *FADS2* 遺伝子欠損マウスの樹立

A）必須不飽和脂肪酸からの PUFA 産生系路。

B）野生型マウス（WT）と *FADS2* ホモ欠損マウス（KO）の臓器を用いた Western blotting。

C）肝臓と精巣における FADS2 の免疫組織染色（スケールバー：50 μm）。

2. *FADS2* 欠損マウスの精巣ではω6 系列の PUFA が大きく減少していた

マウス餌に含まれている魚油由来の PUFA の影響を避けるため、PUFA を含有しない特殊餌（AIM-95G）で 8 週間マウスを飼育し、様々な臓器の網羅的脂質解析を行った。図 2 に肝臓と精巣の脂質解析の結果を示す。肝臓において、*FADS2* 欠損マウスではリン脂質（フォスファチジルコリン PC、フォスファチジルエタノールアミン PE）中の PUFA が大きく減少していた。*FADS2* 欠損マウスの肝臓で PUFA 含有 PC がほぼ完全に消失していたのに対し、アラキドン酸（ARA）や DHA 含有 PE は比較的保たれていた（図 2A～D）。*FADS2* 欠損マウス

の精巣では、肝臓と比較して、ARA や DPA などのω6 系列の PUFA を含有する PE の消失が顕著であった（図 2E、H）。一方、ω3 系列の PUFA である DHA 含有リン脂質は *FADS2* 欠損マウスでも比較的保たれており、特に DHA 含有 PE の量は *FADS2* 欠損マウスと野生型マウスの間で差を認めなかった（図 2G）。

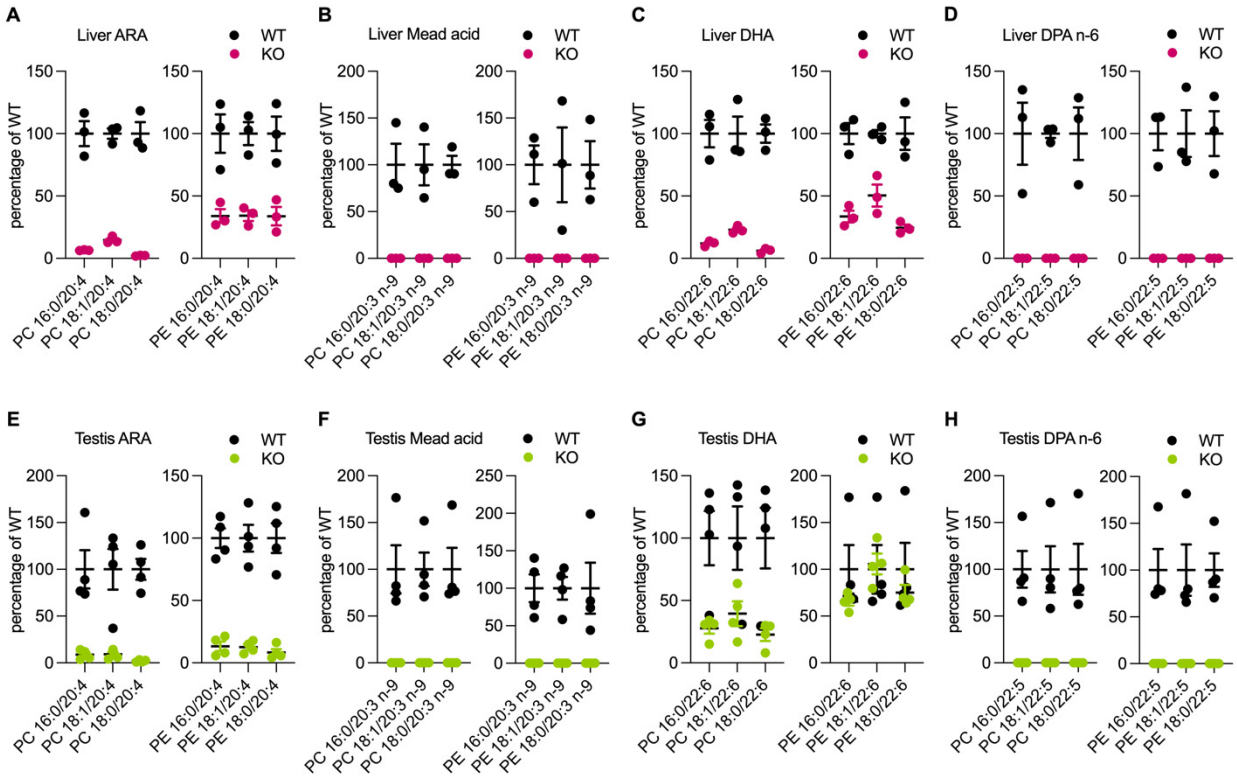


図 2. PUFA 欠乏マウスの樹立

野生型マウス（WT）と *FADS2* ホモ欠損マウス（KO）を、PUFA を含有しない特殊餌で 8 週間飼育し、肝臓（A～D）と精巣（E～H）の網羅的リン脂質解析を行った。この図では、それぞれの PUFA 分子種（ARA、Mead acid、DHA、DPA）を含有する PC と PE の相対量を、野生型マウスを 100%として表記した。

3. ω6 系列 PUFA はステロイドホルモン産生に必要である

ライディッヒ細胞の細胞株である MA-10 細胞を用いた *in vitro* の解析から、ω6 系列の PUFA 添加が様々なステロイドホルモンの産生を促進することが示唆された（データ示さず）ため、*FADS2* 欠損マウスのライディッヒ細胞のステロイド産生における PUFA の必要性を検討した。野生型マウスと *FADS2* 欠損マウスの精巣からライディッヒ細胞を回収して脂質解析を行った。ω6 脂肪酸である ARA や DPA を含むリン脂質 PC や PE は、*FADS2* 欠損によってほとんど完全に消失していた（図 3A、C）が、ω3 脂肪酸である DHA を含有するリン脂質は比較的保たれていた（図 3B）。これらのライディッヒ細胞を hCG で刺激し、培養上清中に放出されたステロイドホルモンを定量したところ、*FADS2* 欠損ライディッヒ細胞で、アンドロステンジオン、テストステロン、ジヒドロテストステロン（DHT）など、男性ホルモンの産生が優位に減少していた（図 3D）。この培養系に ARA、DPA、DHA を添加するレスキュー実験を行った。いずれの PUFA 添加でもステロイドホルモンの産生が上昇したが、その効果はω3 脂肪酸である DHA（図 3G）よりも、ω6 脂肪酸である ARA（図 3E）や DPA（図 3F）で顕著であった。

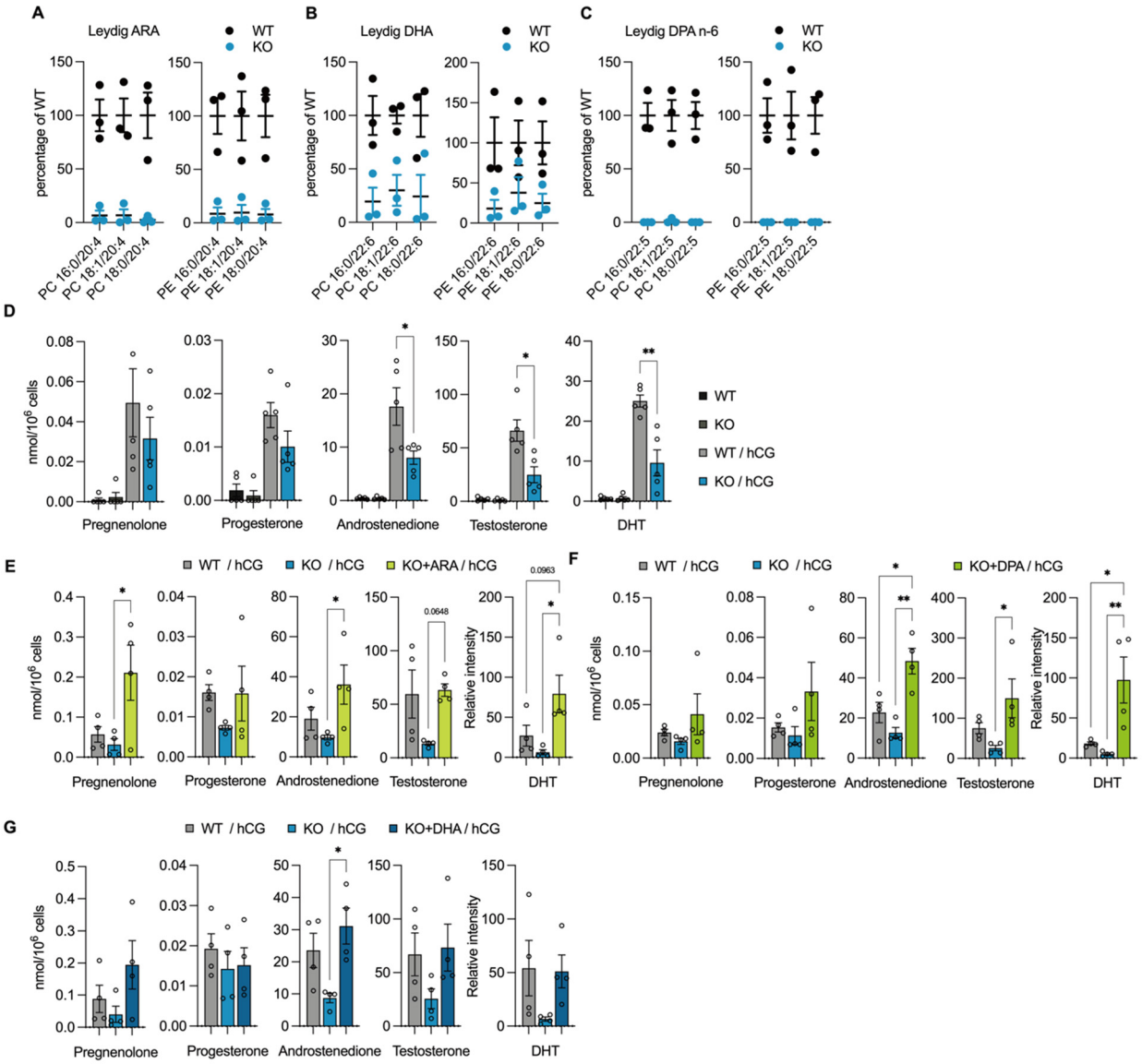


図 3.　ω6 系列の PUFA はステロイドホルモンの産生を促進する

A～C）野生型マウスと *FADS2* 欠損マウスのライディッヒ細胞のリン脂質定量解析。

D）野生型マウスと *FADS2* 欠損マウスのライディッヒ細胞におけるステロイドホルモン産生。

E～G）ライディッヒ細胞のステロイドホルモン産生における PUFA 補充の効果。

Dunnett's multiple comparisons test（*p＜0.05、***p＜0.001、****p＜0.0001）。

以上から、ライディッヒ細胞の PUFA 欠乏によって男性ホルモンの産生・放出が減少すること、これがω6 系列の PUFA によってレスキューされることが明らかになった。本研究によって、ライディッヒ細胞におけるステロイドホルモン、特に、男性ホルモンの産生をω6 脂肪酸が促進することが明らかになった。*FADS2* 欠損マウスに PUFA 欠乏食を摂食させると不妊の表現型が出現するとの報告がある［3，4］がその分子機序は不明である。本研究で見いだされた男性ホルモンの産生不全が、この不妊の原因となっている可能性が考えられる。現段階では、ステロイドホルモン産生におけるω6 脂肪酸の役割の詳細な分子機序は不明であるが、ステロイドホルモン産生に必要なチトクローム P450 分子群や、ステロイドホルモンの前駆体であるコレステロールの産生酵素の発現をω6 脂肪酸が制御している可能性を含め、今後、詳細に検討していきたいと考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、順天堂大学大学院医学研究科生化学細胞機能制御学研究室の李賢哲助教と李慶顕博士である。九州大学大学院医学研究科の諸橋憲一郎教授には本研究において多大なるサポートを頂いた。

文　献

1) Uauy, R, Mena, P, Rojas, C. Essential fatty acids in early life: structural and functional role. Proc Nutr Soc. 2000 Feb;59(1):3-15. EPUB: 2000/05/29. PMID: doi: 10.1017/s0029665100000021

2) Geng, X J, Zhao, D M, Mao, G H, Tan, L. MicroRNA-150 regulates steroidogenesis of mouse testicular Leydig cells by targeting STAR. Reproduction. 2017 Sep;154(3):229-236. EPUB: 2017/06/15. PMID: doi: 10.1530/REP-17-0234

3) Stoffel, W, Holz, B, Jenke, B, Binczek, E, Gunter, R H, Kiss, C, Karakesisoglou, I, Thevis, M, Weber, A A, Arnhold, S, Addicks, K. Delta6-desaturase (FADS2) deficiency unveils the role of omega3- and omega6-polyunsaturated fatty acids. EMBO J. 2008 Sep 3;27(17):2281-2292. EPUB: 2009/01/28. PMID: PMC2529369 doi: 10.1038/emboj.2008.156

4) Stroud, C K, Nara, T Y, Roqueta-Rivera, M, Radlowski, E C, Lawrence, P, Zhang, Y, Cho, B H, Segre, M, Hess, R A, Brenna, J T, Haschek, W M, Nakamura, M T. Disruption of FADS2 gene in mice impairs male reproduction and causes dermal and intestinal ulceration. J Lipid Res. 2009 Sep;50(9):1870-1880. EPUB: 2009/04/09. PMID: PMC2724775 doi: 10.1194/jlr.M900039-JLR200