

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06556

研究課題名(和文)トリグリセリド分解活性化因子ABHD5の新規生理機能の解明

研究課題名(英文)Elucidation of a novel physiological function of triglyceride hydrolase activator ABHD5

研究代表者

大野 祐介 (Ohno, Yusuke)

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：50611498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：中性脂質トリグリセリド(TG)は全身の組織で合成と分解が適切にコントロールされており、そのバランスの破綻は様々な疾患を引き起こす。ABHD5はTG分解酵素PNPLA2の活性化因子であるが、本研究ではABHD5はPNPLA2に加えセラミドアシル転移酵素PNPLA1およびTG分解酵素PNPLA3とも相互作用し、それらの活性化を担うことを見出した。PNPLA1はTGの中でもリノール酸を構成脂肪酸にもつTG特異的にアシル転移活性を示すと考えられていたが、その特異性はPNPLA1の基質特異性ではなく、表皮にのみ存在する未知のメカニズムにより生み出されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ABHD5 遺伝子変異により重篤な皮膚疾患である魚鱗癬が引き起こされ、肝疾患、神経疾患も併発する。本研究では、ABHD5遺伝子変異による魚鱗癬および肝障害がそれぞれPNPLA1およびPNPLA3の活性化障害に起因するTG代謝異常によって引き起こされることを明らかにした。これまでの多くの研究はTGの貯蔵を担う脂肪組織や肝臓などに焦点が当てられており、そのほかの組織における解析は進んでいなかったが、本研究で存在を示唆した表皮におけるユニークなTG代謝機構の分子メカニズムが今後解明されることにより、TGの様々な組織における生理的役割が明らかにされることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Synthesis and degradation of triglycerides (TGs), one of the neutral lipids, are properly regulated in the tissue throughout the body, and an impairment of their balance causes various disorders. In this study, we found that ABHD5, an activator of the TG lipase PNPLA2, interacts with and activates the ceramide acyltransferase PNPLA1 and the TG lipase PNPLA3 as well as PNPLA2. Although PNPLA1 was assumed to exhibit transacylation activity specifically against linoleic acid-containing TGs, we demonstrated that the specificity is not attributed to the substrate specificity of PNPLA1 but to an epidermis-specific unidentified mechanism.

研究分野：生化学

キーワード：トリグリセリド 中性脂質 魚鱗癬 アシルセラミド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トリグリセリド(TG)はTGリパーゼであるPNPLA2により分解され、遊離脂肪酸とジアシルグリセロールとなる。この反応は脂肪分解の律速段階であり、PNPLA2によるTG分解には活性化因子ABHD5が必要である。ABHD5遺伝子はシャナリン-ドルフマン症候群の原因遺伝子として知られており、ABHD5遺伝子変異患者では全身でTGが蓄積し、皮膚疾患である魚鱗癬をはじめ肝肥大、神経障害(運動失調、精神遅滞など)を発症する。Abhd5遺伝子欠損(KO)マウスは、皮膚バリアの形成不全により生後数時間で死亡する。一方、PNPLA2遺伝子変異患者およびPnpla2KOマウスはミオパチーを発症するのみで、魚鱗癬や肝障害、神経障害は発症しない。そのためABHD5遺伝子変異により生じるこれらの症状は、PNPLA2の活性化異常だけでは説明できない。すなわち、ABHD5がPNPLA2の活性化以外にも別の生理機能を持つことが推察された。本研究課題申請中に我々は、ABHD5がPNPLA1の活性化にも関与し、皮膚バリア脂質であるアシルセラミドの産生に関与していることを報告していた。

2. 研究の目的

本研究では、ABHD5遺伝子変異患者に見られる皮膚、肝臓、神経疾患発症に関与するタンパク質としてPNPLAファミリータンパク質(PNPLA1-9)に着目し、それらに対するABHD5の活性化因子としての寄与、PNPLAファミリータンパク質の機能異常によるTG代謝への影響および疾患発症メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ABHD5によるPNPLAタンパク質の活性化解析

HEK293T細胞にPNPLAタンパク質(PNPLA1-9)およびABHD5を過剰発現させ、放射ラベル脂肪酸を用いて細胞をラベルし、脂質を回収、TLCで分離、オートラジオグラフィーによる検出を行なった。また、過剰発現させた細胞より脂質を抽出し、液体クロマトグラフィー-連結型タンデム質量分析(LC-MS/MS)により、グリセロ脂質およびスフィンゴ脂質の定量を行った。

(2) ABHD5のPNPLAタンパク質の細胞内局在への影響と相互作用解析

HeLa細胞にPNPLAタンパク質およびABHD5を発現させ、間接蛍光抗体法によってPNPLAタンパク質の細胞内局在を調べた。また、Proximity Ligation AssayによりPNPLAタンパク質とABHD5の相互作用解析を行なった。

(3) プロテオリポソームを用いた活性化および基質特異性解析

コムギ無細胞翻訳系を用いたPNPLA1またはABHD5を組み込んだプロテオリポソームを作成した。リポソームには各種脂肪酸組成を持つTGおよび ω 水酸化セラミドを加えたものを用いた。37°Cで1時間インキュベート後、脂質を抽出し、LC-MS/MSによりアシルセラミドの定量を行なった。

4. 研究成果

(1) ABHD5によるPNPLAファミリータンパク質の活性化解析

HEK293T細胞にPNPLA1-9およびABHD5を過剰発現させ、 ^{14}C オレイン酸、 ^{14}C リノール酸または ^3H アラキドン酸で細胞をそれぞれラベルし、代謝された脂質クラスを調べた。その結果、PNPLA2は単独発現に比べてABHD5との共発現時にはTG量(^{14}C オレイン酸、 ^{14}C リノール酸ラベル時ともに)が5倍増加した。また、PNPLA3も同様にABHD5との共発現によりTG量が2.5倍増加していることを新たに見出した。リパーゼやアシルトランスフェラーゼは、過剰発現実験では本来の活性とは逆の活性が促進されることがある。本実験においてもTGリパーゼとしての知見が確立しているPNPLA2においてABHD5の存在下でTG量が増加していた。したがって、PNPLA3によるTG分解に関してもABHD5が関与していると考えられる。

HEK293T細胞に脂肪酸伸長酵素ELOVL4、脂肪酸 ω 水酸化酵素CYP4F22、セラミド合成酵素CERS3、PNPLA1およびABHD5を過剰発現させることで、アシルセラミドを産生させることができる。アシルセラミドは通常リノール酸を構成脂肪酸に持つが、HEK293T細胞を用いた本実験系ではリノール酸からなる分子種だけでなく、オレイン酸からなる分子種も産生されることを新たに見出し、その脂肪酸の特異性にはABHD5は関与しないことを明らかにした。一方、ケラチノサイトを用いた解析ではオレイン酸からなるアシルセラミドはほとんど産生されず、リノール酸からなるアシルセラミドが主要であった。このことはPNPLA1によるTGの利用にはABHD5以外の皮膚特異的な因子が関与することを示唆している。

(2) ABHD5のPNPLAタンパク質の細胞内局在への影響と相互作用解析

ABHD5は脂肪滴に局在し、PNPLA2と相互作用することが知られている。また、我々は本課題申請期間中に、ABHD5がPNPLA1を脂肪滴への移行させること、PNPLA1と相互作用することを明らかにしている。そこで、その他のPNPLAタンパク質(PNPLA3-9)の局在に対するABHD5の影響を調べたところ、ABHD5はPNPLAタンパク質(PNPLA3-9)の局在に影響は及ばなかつ

た。次に ABHD5 との相互作用解析を Proximity Ligation Assay により調べたところ、ABHD5 は PNPLA1, PNPLA2 に加え、PNPLA3 とも相互作用することを見出した。

PNPLA1 は皮膚疾患である先天性魚鱗癬の原因遺伝子の 1 つであり、多数の遺伝子変異が同定されている。そのうち、16 種の PNPLA1 のミスセンス変異体の脂肪滴局在に対する ABHD5 の影響を調べたところ、ABHD5 は 3 種の PNPLA1 変異体を脂肪滴へ移行させたが、13 種の変異体を脂肪滴へ移行させることができないことを明らかにした。

(3) ABHD5 による *in vitro* での PNPLA タンパク質の活性化能解析

PNPLA タンパク質の活性化、基質特異性に ABHD5 が関与するかどうかを *in vitro* で明らかにするためにプロテオリポソームを用いた活性解析系の構築を試みた。既に確立していた PNPLA1 単独でのアシルセラミド合成活性解析に ABHD5 を同じリポソームに組み込む、または ABHD5 を組み込んだ別のプロテオリポソームで混合することでアシルセラミド合成活性を調べた。その結果、いずれもアシルセラミド産生の活性化は認められなかった。これは PNPLA1 が細胞内では基質となる TG へのアクセスが ABHD5 により促進されるが、プロテオリポソーム中ではすでに基質が近接して存在しているために活性化が認められなかったためであると考えられる。また、リノール酸以外の脂肪酸鎖をもつ TG に対する PNPLA1 の活性を調べたところ、PNPLA1 はオレイン酸またはパルミチン酸からなる TG に対しても活性を示した。この結果は成果項目 (1) における HEK 293T 細胞を用いた解析と同様であり、皮膚においてリノール酸含有 TG をアシルセラミド産生に特異的に利用するための別の因子が存在することを強く示唆している。

プロテオリポソームを用いた系では ABHD5 による活性化は評価できなかったため、プロテオリポソームを用いない *in vitro* における PNPLA タンパク質の TG リパーゼ活性解析系の構築を試みた。重水素標識オレイン酸を含む培地で細胞を培養し、細胞から脂質を抽出、TG を精製した。精製した TG を PC/PI を用いてバッファ系に乳化させることで基質を調製した。TG 基質と PNPLA2 および ABHD5 を過剰発現させた膜画分と混合し、産生された重水素標識オレイン酸を LC-MS/MS で測定した。その結果、PNPLA2 の TG リパーゼ活性を測定することに成功し、fmol レベルの基質に対しても活性を検出することができた。この系では、用いる重水素標識脂肪酸の種類を変えることで様々な重水素標識 TG の作製が可能であり、今後の PNPLA タンパク質の活性、基質特異性解析および ABHD5 による活性化解析に有用なツールとして用いられることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto Haruka, Hattori Miku, Chamulitrat Walee, Ohno Yusuke, Kihara Akio	4. 巻 117
2. 論文標題 Skin permeability barrier formation by the ichthyosis-causative gene FATP4 through formation of the barrier lipid -O-acylceramide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences, USA	6. 最初と最後の頁 2914 ~ 2922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1917525117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawana Momoko, Miyamoto Masatoshi, Ohno Yusuke, Kihara Akio	4. 巻 61
2. 論文標題 Comparative profiling and comprehensive quantification of stratum corneum ceramides in humans and mice by LC/MS/MS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 884 ~ 895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1194/jlr.RA120000671	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川名桃子, 宮本政宗, 大野祐介, 木原章雄
2. 発表標題 LC-MS/MSを用いた測定によるヒトおよびマウス角質層セラミドプロファイルのアップデート
3. 学会等名 第12回セラミド研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本春佳, 服部未来, 大野祐介, 木原章雄
2. 発表標題 アシルCoA合成酵素FATP4 / ACSVL4は皮膚バリア脂質アシルセラミドの合成に関与する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野原知博, 大野祐介, 木原章雄
2. 発表標題 脂肪酸-水酸化酵素CYP4F22及びトランスアシラーゼPNPLA1の魚鱗癬変異による皮膚バリア脂質アシルセラミド産生への影響
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木まどか, 大野祐介, 木原章雄
2. 発表標題 ヒト角質層セラミドの長鎖塩基鎖長の多様性
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ohno Y, Suzuki M, Kawana M, Kihara A
2. 発表標題 Comprehensive analysis of human stratum corneum ceramides by LC-MS/MS-based targeted lipidomics
3. 学会等名 10th International Singapore Lipid Symposium (iSLS10) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 酒井祥太, 大野祐介	4. 発行年 2019年
2. 出版社 食品化学新聞社	5. 総ページ数 337
3. 書名 セラミド研究の新展開 ~基礎から応用へ~	

〔産業財産権〕

〔その他〕

生化学研究室webページ
<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/seika/index.html>
発表論文のプレスリリース
<https://www.hokudai.ac.jp/news/2020/01/post-616.html>
生化学研究室Webページ
<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/seika/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------