

機関番号：10101
 研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20687008
 研究課題名（和文）Phs1 ファミリーによるホスファチジルイノシトールの細胞内輸送機構の
 解明
 研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of intracellular phosphatidylinositol
 trafficking by the Phs1 family
 研究代表者
 木原 章雄（KIHARA AKIO）
 北海道大学・大学院薬学研究院・教授
 研究者番号：50333620

研究成果の概要（和文）：酵母 Phs1 は極長鎖脂肪酸の伸長に関わる 3-ヒドロキシアシル CoA 脱水酵素である。Phs1 は脂質代謝に関わる因子や小胞輸送因子と相互作用し、スフィンゴ脂質合成やホスファチジルイノシトール（PI）輸送を調節していることを明らかにした。Phs1 の哺乳類ホモログは未同定であったが、我々は HACD1-4 を同定することに成功した。また、哺乳類の極長鎖脂肪酸伸長経路の律速段階を触媒する酵素の基質特異性を明らかにすることにより、極長鎖脂肪酸伸長経路の全貌を解明した。さらに、極長鎖脂肪酸伸長と疾患との関わりについても知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Phs1 is a 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase involved in the elongation of very long-chain fatty acids (VLCFAs). We demonstrated here that Phs1 regulates sphingolipid synthesis and phosphatidylinositol transport through interacting with proteins involved in lipid metabolism and vesicular transport. We also succeeded in identifying mammalian homologs of Phs1, HACD1-4. By revealing substrate specificities of enzymes catalyzing the rate-limiting step of the VLCFA elongation, we have elucidated the entire VLCFA pathways in mammals. Moreover, we obtained some knowledge about relationship between VLCFA elongation and certain disorders.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2009年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
年度			
年度			
総計	19,600,000	5,880,000	25,480,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：脂質，代謝，細胞内輸送，脂肪酸，極長鎖脂肪酸，スフィンゴ脂質，遺伝子，タンパク質

1. 研究開始当初の背景

Phs1 ファミリーは真核生物に広く存在するタンパク質ファミリーであるが、その機能は不明であった。酵母においてこのファミリーに属する *PHS1* 遺伝子を欠損させると致死となることから、生育に必須な重要な機能を担っ

ていることが予測された。Phs1 は脂質合成の中心的な場である小胞体に局在し、その発現量を低下させた酵母変異株中ではスフィンゴ脂質の前駆体である長鎖塩基が蓄積するという報告があったことから、スフィンゴ脂質代謝過程のいずれかのステップに関わ

ることが予測された。酵母スフィンゴ脂質は極性基としてホスホイノシトールを持ち、ホスホイノシトールはゴルジ体において PI から供給されることが知られている。PI は小胞体で合成後、ゴルジ体、さらには細胞膜へと輸送されるが、これまで PI を輸送する因子、メカニズムは殆ど明らかになっていなかった。我々は Phs1 が PI の小胞体からゴルジ体への輸送に直接あるいは間接的に関わることで、結果としてスフィンゴ脂質合成に影響を与えると予測した。

2. 研究の目的

本研究では機能未知であり、生育に必須な役割を示す Phs1 及びその哺乳類ホモログの機能を明らかにし、その機能解明を通じて PI の輸送機構あるいは調節機構について知見を得ることを目的とした。具体的な項目は以下の通りである。

- (1) PI の輸送形態の同定と Phs1 の役割の解明
- (2) Phs1 ファミリーの脂質分子に対する特異性の解明
- (3) Phs1 の機能と構造の相関
- (4) Phs1 と相互作用する因子の同定
- (5) 哺乳類 Phs1 ファミリーの解析と病態への関与

3. 研究の方法

- (1) PI の輸送形態の同定と Phs1 の役割の解明

PI が小胞輸送によって運ばれる可能性を検討するために小胞輸送に関わる酵母変異株 (*sec13*, *sec18* など) を用いて、 $[^3\text{H}]$ イノシトールでラベルすることにより、PI のスフィンゴ脂質やホスホイノシチドの代謝への影響を調べた。PI が小胞輸送により小胞体からゴルジ体に運ばれているとすると、Phs1 ファミリーは小胞へ PI を特異的に選別する役割を持っていると考えられたので、Phs1 と小胞形成に関わる因子との結合を免疫共沈降実験により調べた。

- (2) Phs1 ファミリーの脂質分子に対する特異性の解明

in vivo において Phs1 ファミリーの機能低下による各種脂質の代謝に対する影響を調べた。酵母 Phs1 の発現低下株に脂質前駆体(放射ラベル体)を取り込ませてインキュベート後、脂質抽出、TLC プレートによる分離・同定を行なった。

- (3) Phs1 の機能と構造の相関

Phs1 ファミリーは小胞体に局在するマルチスパン膜タンパク質である。N 結合型糖鎖修飾部位を持つトポロジーレポーター遺伝子と *PHS1* の融合体を作成し、その融合タンパ

ク質の糖鎖修飾を指標として、Phs1 の膜トポロジーの決定を行なった。また、Phs1 ファミリー内で保存されたアミノ酸残基の変異体を作成し、生育の相補能と活性を調べた。

- (4) Phs1 と相互作用する因子の同定

Phs1 と脂質代謝、小胞輸送に関与する因子との相互作用を免疫共沈降法により調べた。また、遺伝学的に相互作用する因子を探索した。Phs1 の機能低下による生育阻害を回復させるマルチコピーサプレッサーを同定・解析した。

- (5) 哺乳類 Phs1 ファミリーの解析と病態への関与

哺乳類 Phs1 ホモログ (*HACD1/PTPLA*, *HACD2/PTPLB*, *HACD3/PTPLAd1*, *HACD4/PTPLAd2*) を酵母 Phs1 の発現低下株中で発現させ、生育及び機能の相補能を調べた。また、これらの因子を精製し、酵素学的な解析を行なった。不整脈源性右室異形成やミオパチーとの関連が指摘されている *HACD1* のノックアウトマウスを作成し、表現型を解析することで *HACD1* の生理機能、病態との関連を明らかにしようと試みた。不整脈源性右室異形成に見られる *K64Q* 変異体を作成し、酵素学的性質について解析した。さらに研究の過程で明らかとなった *HACD* 関連因子の中で、病態と関連が報告されていた *ELOVL4* に関してさらに病態の分子メカニズムに関する解析を進めた。

4. 研究成果

- (1) PI の輸送形態の同定と Phs1 の役割の解明

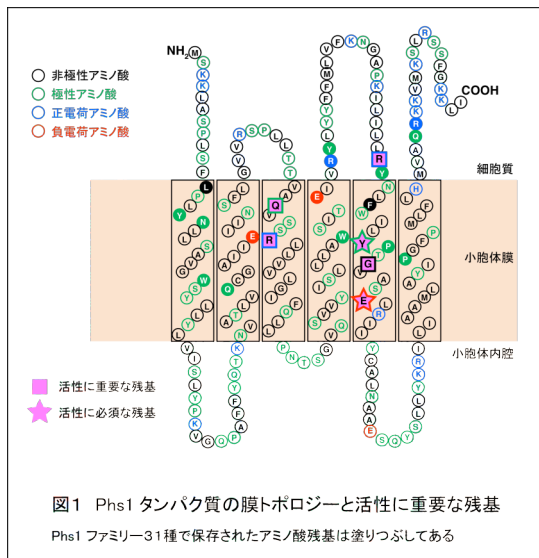
酵母変異株 (*sec13*, *sec18*) を用いて、 $[^3\text{H}]$ イノシトールでラベルすることにより、PI からスフィンゴ脂質やホスホイノシチドの代謝への影響を調べた結果、イノシトール含有スフィンゴ脂質及びホスホイノシチドの合成が低下していることが明らかとなった。これらの脂質はすべて小胞体ではなく、ゴルジ体あるいはゴルジ体以降のオルガネラで産生されるため、PI の小胞体からゴルジ体への輸送が小胞輸送によって行なわれていることが示唆された。また、Phs1 と小胞輸送関連因子との相互作用を免疫沈降で調べた結果、小胞輸送のコートタンパク質である *Sec13* や *Sec23* との相互作用は認められなかったものの *Erv29*, *Erv41*, *Emp24*, *Emp46*, *Erp5* などの積荷受容体と結合することが明らかとなった。これら積荷受容体の実際の積荷は明らかとなっていないが、PI を積荷としている可能性があり、Phs1 はこれら積荷受容体との相互作用を介して PI 輸送に関与している可能性がある。

(2) Phs1 ファミリーの脂質分子に対する特異性の解明

Phs1 が極長鎖脂肪酸伸長に関わる 3-ヒドロキシアシル CoA 脱水酵素であることが、本申請期間の直前に明らかにされた。この結果を踏まえ、我々は Phs1 の発現低下による極長鎖脂肪酸合成低下が脂質代謝に与える影響、特に極長鎖脂肪酸を構成脂質としているスフィンゴ脂質の代謝について検討した。Phs1 発現低下株をスフィンゴ脂質の前駆体である^[14C]セリンを用いてラベル後、脂質を抽出し、TLC で展開した結果、スフィンゴ脂質のうちセラミドの蓄積が観察された一方、イノシトール含有スフィンゴ脂質 (IPC など) の合成低下が観察された。このことはセラミドから IPC への変換のステップが影響を受けていることを示していた。しかし、IPC 合成酵素の活性及び局在には異常が見られなかった。そこで、基質となる PI の輸送が損なわれている可能性を調べるために Phs1 発現低下株を^[3H]イノシトールでラベルしたところ、イノシトール含有スフィンゴ脂質及びホスホイノシド共に合成が低下していることが明らかとなった。このことから、Phs1 の発現低下により PI の輸送低下が引き起こされていることが明らかとなった。前述の通り、Phs1 は積荷受容体との相互作用を介して PI 輸送に関わっている可能性がある。

(3) Phs1 の機能と構造の相関

トポロジーレポーター遺伝子 (*SUC2*) と *PHS1* の融合体を作成し、その融合タンパク質の糖鎖修飾を指標として、Phs1 の膜トポロジーの決定を行なった。その結果、Phs1 は 6 回膜貫通タンパク質で、N 末端と C 末端を細胞質側に配向した小胞体膜タンパク質であることを明らかにした (図 1)。また、Phs1 ファミリー内で保存された 22 個のアミ



ノ酸残基をアラニンに置換した変異体を作成し、Phs1 発現低下株の生育相補能及び精製タンパク質の活性測定を行なったところ、6つのアミノ酸残基が活性に重要であり、そのうちの2つが活性に必須であった (図 1)。この2つの残基 (Tyr149 と Glu156) は触媒基を構成していると予測された。

(4) Phs1 と相互作用する因子の同定

上述の通り、Phs1 は積荷受容体と相互作用するだけでなく、スフィンゴ脂質の合成に関わるセラミド合成酵素 Lac1 とも相互作用していることを見出した。このことから極長鎖脂肪酸の合成はスフィンゴ脂質合成、脂質輸送因子との協調的な働きによって調節されていることが示唆された。

極長鎖脂肪酸の合成ができない酵母の生育をレスキューするマルチコピーサプレッサーとして Vps21 を同定した。Vps21 は Rab タイプの低分子 G タンパク質で主にエンドソームを経由した液胞への小胞輸送に関与する。これらの結果から極長鎖脂肪酸が液胞への小胞輸送に関与していることが示唆された。

(5) 哺乳類 Phs1 ファミリーの解析と病態への関与

HACD1, HACD2 を Phs1 発現低下酵母株中で発現させたところ、生育を相補した。一方、HACD3, HACD4 は相補できなかった。また、これらを全て精製し、3-ヒドロキシパルミトイル CoA に対して活性測定を行なったところ、すべてのタンパク質が活性を示した。これらの結果から HACD1-4 が哺乳類 3-ヒドロキシアシル CoA 脱水酵素であることが明らかとなった。酵母の生育相補のためには炭素数 20 以上の 3-ヒドロキシアシル CoA に活性を示す必要があることから、HACD3 および HACD4 にはこのような長い鎖長の基質には働かないことが示唆された。また、それぞれの因子の組織発現を調べた結果、HACD2 と HACD3 はほとんど全ての組織で発現していたのに対し、HACD1 は筋肉系の組織、HACD4 は白血球に発現が限られていた。哺乳類の極長鎖伸長に働く縮合酵素には 7 種のアイソザイム ELOVL1-7 が存在する。我々は各 HACD がそれぞれの ELOVL 因子と相互作用することを見出した。

HACD1 のノックアウトマウスの作成を試みた。ターゲティングベクターの作成、ES 細胞における相同組み換えまでは終了し、現在ヘテロノックアウトマウスの作成中である。

HACD1(K64Q)変異体を作成し、酵素学的性質を調べた。この変異タンパク質は野生型と同様の 3-ヒドロキシパルミトイル CoA に対する活性測定を示し、Phs1 発現低下株の

生育を相補した。HACD1(K64Q)は正常に小胞体に局在し、ELOVL 因子との相互作用にも野生型タンパク質との差は認められなかった。また、HACD1(K64Q)変異との関連が指摘されている不整脈源性右室異形成は優性遺伝であるので、もしこの変異が病態と関連しているのであれば変異型タンパク質の発現は極長鎖脂肪酸伸長にドミナントネガティブ的な効果を示すと予測されたが、そのような結果は得られなかった。これらの結果から我々は HACD1(K64Q)変異は不整脈源性右室異形成とは関連しないと結論づけた。

ELOVL4 の C 末端側が欠損する変異 (ELOVL4ΔC) は 3 型シュタルガルト病を引き起こす。これまでこの変異を持つモデルマウスでは ELOVL4 が基質とする極長鎖脂肪酸の伸長だけではなく、広範囲の脂肪酸伸長が影響を受けていることが報告されていたが、その原因については不明であった。我々は ELOVL4ΔC が他の ELOVL と相互作用してその機能を阻害しているという仮説を立て、検証を行なった。その結果、ELOVL4ΔC は野生型 ELOVL4 よりも強く他の ELOVL 因子と結合し、実際にそれらの活性を阻害することを見出した。これらの効果は 3 型シュタルガルト病を発症に導く一端になっていると予測される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Ohno, Y., Suto, S., Yamanaka, M., Mizutani, Y., Mitsutake, S., Igarashi, Y., Sassa, T., and Kihara, A. (2010) ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 18439-18444, 査読有
2. Okuda, A., Naganuma, T., Ohno, Y., Abe, K., Yamagata, M., Igarashi, Y., and Kihara, A. (2010) Hetero-oligomeric interactions of an ELOVL4 mutant protein: implications in the molecular mechanism of Stargardt-3 macular dystrophy. *Mol. Vis.*, 16, 2438-2445, 査読有
3. Konishi, H., Okuda, A., Ohno, Y., and Kihara, A. (2010) Characterization of HACD1 K64Q mutant found in arrhythmogenic right ventricular dysplasia patients. *J. Biochem.*, 148, 617-622, 査読有
4. 木原章雄 (2010) 脂肪酸の多彩な代謝, 生理機能と関連疾患 *生化学*, 82, 591-605, 査読無

5. Mizutani, Y., Mitsutake, S., Tsuji, K., Kihara, A., and Igarashi, Y. (2009) Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie*, 91, 784-790, 査読有
6. Kihara, A., Sakuraba, H., Ikeda, M., Denpoh, A., and Igarashi, Y. (2008) Membrane topology and essential amino acid residues of Phs1, a 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase involved in very long-chain fatty acid elongation. *J. Biol. Chem.*, 283, 11199-11209, 査読有
7. Ikeda, M., Kanao, Y., Yamanaka, M., Sakuraba, H., Mizutani, Y., Igarashi, Y., and Kihara, A. (2008) Characterization of four mammalian 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases involved in very long-chain fatty acid synthesis. *FEBS Lett.*, 582, 2435-2440, 査読有
8. Mizutani, Y., Kihara, A., Chiba, H., Tojo, H., and Igarashi, Y. (2008) 2-Hydroxy-ceramide synthesis by ceramide synthase family: enzymatic basis for the preference of FA chain length. *J. Lipid Res.*, 49, 2356-2364, 査読有

[学会発表] (計 9 件)

1. 木原章雄 C24 アシル CoA の産生と C24 セラミド合成による制御機構, 第 3 回セラミド研究会学術集会, 東京, 2010. 11. 12.
2. Kihara, A. Specificity of elongation of saturated, very long-chain fatty acids provides a link to C24 sphingolipid synthesis. The 27th Naito Conference on Membrane Dynamics and Lipid Biology [I], Sapporo, 2010. 6. 30.
3. Kihara, A. and Igarashi, Y. Synthesis of very long-chain fatty acid and its relationship to sphingolipid metabolism. 50th International Conference on the Bioscience of Lipids, Regensburg, Germany, 2009. 9. 4.

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/seika/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木原 章雄 (KIHARA AKIO)
北海道大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号: 50333620

(3) 連携研究者

佐々 貴之 (SASSA TAKAYUKI)

北海道大学・大学院薬学研究院・講師
研究者番号：20342793

小原 圭介 (OBARA KEISUKE)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：30419858