

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570236

研究課題名(和文) エーテルリン脂質プラスマローゲンのアシル基の多様性形成と生合成調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of plasmalogen synthesis and establishment of plasmalogen diversity

## 研究代表者

本庄 雅則 (HONSHO, Masanori)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：90372747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：エーテルリン脂質プラスマローゲンの多様性形成およびプラスマローゲンの生合成制御機構の解明を目的とした。プラスマローゲンの多様性は、脂肪酸のリモデリングを介して形成された。プラスマローゲンの生合成は、特有な脂肪酸を有するプラスマローゲン分子種依存的な機構によりペルオキシソーム膜に局在するプラスマローゲン合成律速酵素の安定性調節によって制御され、その制御には、律速酵素の膜貫通部位近傍の領域が重要であることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate molecular mechanism of the regulation of plasmalogen synthesis. Plasmalogen is a subtype of glycerophospholipids, in which a long chain fatty alcohol is linked at sn-1 position through a vinyl ether bond. Peroxisomal fatty acyl-CoA reductase 1 (Far1) is essential for supplying fatty alcohols required for ether bond formation in plasmalogen synthesis. Plasmalogen synthesis is regulated by modulating Far1 stability in a plasmalogen-dependent manner.

Here I found that Far1 is a peroxisomal tail-anchored protein. Far1, but not Far2, was preferentially degraded in response to the cellular level of plasmalogens. The region flanking the transmembrane domain of Far1 is required for plasmalogen-dependent degradation of Far1. The diversity of plasmalogens was formed through remodeling of fatty acids and Far1 stability is regulated in a manner dependent on certain type of plasmalogens.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：プラスマローゲン エーテルリン脂質 生体膜 ペルオキシソーム

## 1. 研究開始当初の背景

生体膜は、頭部極性基に加え、脂肪酸鎖の異なる多様なリン脂質で構成されており、各リン脂質の存在量は組織で異なっている。各組織におけるリン脂質の恒常性すなわちリン脂質の多様性と各リン脂質の存在量の維持は、組織の適切な機能と密接に関連している。

グリセロリン脂質の一種で、頭部極性基にエタノールアミンを、グリセロール骨格の *sn*-1 位にビニルエーテル結合を有するエーテルリン脂質プラスマローゲンは、生体に広く分布するが、とくに脳・中枢神経系に多く存在し、脳では全リン脂質の約 20% を占める。プラスマローゲンは、*sn*-1 位に炭素数 16 および 18 の長鎖アルコールを、*sn*-2 位には飽和、モノ不飽和、多価不飽和脂肪酸を有している。プラスマローゲンの多様性の変化やプラスマローゲンの存在量の低下は、生理活性分子による受容体の活性化や、生体膜の特性変化の障害など、個体恒常性に障害を有する疾患を引き起こすと予測される。しかしながら、プラスマローゲンの多様性形成機構は不明であり、また、プラスマローゲンの恒常性維持機構は、プラスマローゲン合成の律速酵素であるペルオキシソーム膜局在性酵素 Fatty acyl-CoA reductase 1 (Far1) の安定性調節による生合成制御機構が報告 (Honsho et al., *JBC* 2010) されているのみである。

## 2. 研究の目的

新規に分離した特定プラスマローゲン分子種の合成に障害を有する“特定プラスマローゲン分子種合成障害性変異細胞”では、Far1 依存的なプラスマローゲン合成制御に障害を有することから、プラスマローゲンの多様性形成とプラスマローゲンの生合成調節が密接に関連することが示唆された。本研究では、プラスマローゲンの多様性形成機構を解明し、

プラスマローゲンの多様性の変化がプラスマローゲンの生合成に与える影響を明らかにすることを含めプラスマローゲンの生合成制御機構の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

プラスマローゲンの多様性形成機構と生合成制御機構を解明するため、以下に述べる三項目を中心に研究を遂行した。

- (1) グリセロリン脂質の *sn*-2 位の脂肪酸の多様性は、ランズ回路 (Lands' cycle) 依存的なリモデリングによって形成されることが報告されている。グリセロリン脂質と同様の機構でプラスマローゲンの多様性が形成されるか検討する。
- (2) プラスマローゲン欠損性変異細胞に特定のプラスマローゲンのみを供給し限定的なプラスマローゲン分子種が存在する細胞におけるプラスマローゲンの生合成を検討する。
- (3) Far1 のアイソフォームである Far2 と Far1 のプラスマローゲン生合成の制御における機能的相違を明らかにする。

## 4. 研究成果

まず、Lands' cycle においてリン脂質の多様性形成に機能する脂肪酸転移酵素がプラスマローゲンの脂肪酸多様性形成に関与するか検討した。精製プラスマローゲンから *sn*-2 位の脂肪酸を特異的に遊離させる手法を確立し、得られた 1-アルケニルプラスマローゲンをプラスマローゲン欠損性変異細胞に添加した。その結果、野性型細胞とほぼ同様の脂肪酸組成を有するプラスマローゲンが回復された。さらに、脂肪酸のリモデリングに必須なホスホリパーゼ A2 の阻害剤により多価不飽和脂肪酸を有するプラスマローゲン量が減少した。また、プラスマローゲン欠損性変異細胞に、飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪酸のみを有する

プラスマローゲンを添加し細胞内プラスマローゲンの分子種を解析したところ、投与したプラスマローゲン分子種に加えあらたに脂肪酸種の異なるプラスマローゲンが検出された。以上の結果から、プラスマローゲンの脂肪酸の多様性も Lands' cycle によって形成されると推察した。

次に、プラスマローゲン生合成制御機構の解明に向けて、まず細胞内プラスマローゲン量を認識する機構の解明を試みた。プラスマローゲンの生合成は、ペルオキシソームで合成が開始され、小胞体においてその合成が完了される。プラスマローゲンの生合成制御は、細胞内プラスマローゲン量依存的にペルオキシソーム膜に局在する Far1 の安定性制御によって調節される。しかしながら、ペルオキシソームにはプラスマローゲンが存在せず、小胞体あるいは細胞膜などのポストゴルジ領域におけるプラスマローゲン量が感知されるものと推察される。細胞内プラスマローゲン量の認識機構に関しては、特定のプラスマローゲン分子種が感知されるのかという問題も含め未解決である。そこで、プラスマローゲン欠損性変異細胞にモノ不飽和脂肪酸あるいは多価不飽和脂肪酸を有するプラスマローゲンを導入し、プラスマローゲン生合成律速酵素である Far1 の発現量を検討した。その結果、いずれのプラスマローゲンを添加した場合もほぼ同程度のプラスマローゲン量が回復されたが、添加したプラスマローゲンの分子種によって Far1 の分解を誘導する効果が異なった。以上の結果から、特定の脂肪酸種を有するプラスマローゲンの認識によって細胞内プラスマローゲン量が検出されるものと推察された。

プラスマローゲンの生合成制御機構を解明するため、Far1 のトポロジーとペルオキシソームへの局在化機構を解析した。その結果、

Far1 の C 末端部に存在する疎水性領域によってペルオキシソーム膜を貫通し、機能領域を細胞質側に向けて存在するいわゆる C 末アンカー型タンパク質であること、次いで多くのペルオキシソーム膜タンパク質と同様に Pex19p 依存的にペルオキシソームへと局在化されることを明らかにした。さらに、Far1 と高い相同性を示す Far2 もペルオキシソームに局在する C 末アンカー型タンパク質であることを見いだした。

Far2 は Far1 とは異なり組織特異的な発現様式を示すことが報告されている。本研究では、Far2 および Far1 がヒト乳癌由来 MCF-7 細胞に発現していることを見いだすとともに、MCF-7 細胞はプラスマローゲン合成不全細胞であることも明らかにした。そこで、Far2 も Far1 と同様にプラスマローゲン依存的な発現量の調節がなされるのか、MCF-7 細胞のプラスマローゲンを回復させることで検討した。その結果、Far2 は一次構造およびトポロジーにおいて Far1 と非常に類似性の高い分子であるが、Far1 とは異なりプラスマローゲン依存的な発現量の調節を受けないことを見いだした。さらに、プラスマローゲン依存的な Far1 と Far2 の挙動の違いに着目し、Far1 と Far2 の特定の領域を部分的に置換したキメラタンパク質を作成し、Far1 におけるプラスマローゲン依存的な分解に必要な領域の同定を試みた。その結果、Far1 のペルオキシソームマトリクスに配向する領域がプラスマローゲン依存的な Far1 の分解に必要なではあるが十分ではないことを明らかにした。Far1 の分解に必要な領域はペルオキシソームのマトリクスに配向していることから、プラスマローゲン依存的な Far1 の分解には、ペルオキシソーム型 Lon プロテアーゼなどのようなペルオキシソームマトリクス局在性プロテアーゼの関与が推察された。しかしながら、ペルオキシソ

ムマトリクスタンパク質の輸送に障害を有する変異細胞でも Far1 の分解が誘導されたことから、ペルオキシソーム膜タンパク質の関与が示唆された。

#### 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 5 件)

以下全て査読有り。

- ①. Fujiki, Y., Itoyama, A., Abe, Y., and Honsho, M.: Molecular complex coordinating peroxisome morphogenesis. In: Brocard, C. and Hartig, A. (eds) *Molecular Machines Involved in Peroxisomes Maintenance*, in press. Berlin, Springer-Verlag (2014).
- ②. Abe, Y., Honsho, M., Nakanishi, H., Taguchi, R., and Fujiki, Y. Very-long-chain polyunsaturated fatty acids accumulate in phosphatidylcholine of fibroblasts from patients with Zellweger syndrome and acyl-CoA oxidase1 deficiency. *Biochim Biophys Acta.-Mol. Cell Biol. Lipids.* **1841**, 610-619 (2014).  
doi: 10.1016/j.bbalip.2014.01.001
- ③. Honsho, M., Asaoku, S., Fukumoto, K., and Fujiki, Y. Topogenesis and Homeostasis of Fatty Acyl-CoA Reductase 1. *J. Biol. Chem.* **288**, 34588-34598 (2013).  
doi: 10.1074/jbc.M113.498345
- ④. Itoyama, A., Michiyuki, S., Honsho, M., Yamamoto, T., Moser, A., Yoshida, Y., and Fujiki, Y. Mff functions with Pex11p  $\beta$  and DLP1 in peroxisomal fission. *Biol. Open.* **14**, 998-1006 (2013).  
doi: 10.1242/jcs.087452
- ⑤. Itoyama, A., Honsho, M., Abe, Y., Moser, A., Yoshida, Y., and Fujiki, Y. Docosahexaenoic acid mediates peroxisomal elongation, a prerequisite for peroxisome division. *J. Cell Sci.* **125**, 589-602 (2012).  
doi: 10.1242/jcs.087452

[学会発表] (計 5 件)

- ①. 本庄雅則 エーテルリン脂質プラスマローゲンによるコレステロール生合成の制御: 第 86 回日本生化学会大会 平成 25 年 9 月 13 日 パシフィコ横浜
- ②. 本庄雅則 細胞内プラスマローゲン量によるコレステロール生合成調節: 第 85 回日本生化学会大会 平成 24 年 12 月 15 日 福岡国際会議場
- ③. 本庄雅則 細胞内プラスマローゲン量によるコレステロール生合成調節: 第 54 回日本脂質生化学会 平成 24 年 6 月 7 日 九州大学医学部百年講堂 (福岡市)
- ④. 本庄雅則 Fatty Acyl-CoA reductase 1, a peroxisomal C-tail anchored protein, controls plasmalogen biosynthesis : International Symposium on New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine 2011 平成 23 年 11 月 15 日 ホテルルイガンズ (福岡市)
- ⑤. 本庄雅則 エーテルリン脂質プラスマローゲンの生合成を制御する Fatty acyl-CoA reductase 1 の活性制御にはペルオキシソーム膜タンパク質が関与する: 第 84 回日本生化学会 平成 23 年 9 月 22 日 国立京都国際会館 (京都)

[図書] (計 2 件)

- ①. ペルオキシソームの脂質代謝 藤木幸夫、本庄雅則 医学のあゆみ 248 巻 1143-1149. 医歯薬出版株式会社 平成 26 年 3 月
- ②. ペルオキシソームの形成・制御とその障害 藤木幸夫、宮田暖、奥本寛治、田村茂彦、糸山彰徳、本庄雅則 生体の科学 63 巻 448-451. 医学書院 平成 24 年 10 月

[その他]

ホームページ等

<http://133.5.206.69>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

本庄 雅則 (HONSHO, Masanori)

九州大学・大学院理学研究院・特任准教授

研究者番号: 90372747