

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890001

研究課題名（和文） 極長鎖脂肪酸伸長因子 HACD1 の生理的役割と筋変性疾患発症メカニズムの解明

研究課題名（英文） Analysis of physiological roles of HACD1 and pathogenesis of myopathies.

研究代表者 大野 祐介 (OHNO YUSUKE)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：50611498

研究成果の概要（和文）：HACD ファミリー（HACD1-4）のうち HACD1 は炭素数が 20 より大きい脂肪酸である極長鎖脂肪酸の伸長因子で、心臓や骨格筋に特異的に発現している。本研究では、HACD ファミリーの基質特異性を解析し、HACD1 が炭素数 16 から 26 の飽和脂肪酸の伸長に関与することを明らかにした。Hacd1 ノックアウト（KO）マウスを作製し、KO マウスでは、体重、筋肉量、運動量が減少していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：HACD1 is a protein engaged in elongation of very long-chain fatty acids, and is specifically expressed in heart and skeletal muscle. In this study, we demonstrated that HACD1 is involved in elongation of saturated fatty acids, whose carbon chain lengths are 16 to 26. We created Hacd1 knockout mice, and decreases in weight, muscle mass, and locomotor activity were observed in Hacd1 knockout mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学・

キーワード：極長鎖脂肪酸，3-ヒドロキシアシル CoA 脱水酵素，ミオパチー

1. 研究開始当初の背景

極長鎖脂肪酸とは炭素数 20 以上の脂肪酸を指し、生体内での存在量が最も多い炭素数 16 や 18 の脂肪酸では代替できない特有の機能を持つ。極長鎖脂肪酸は長鎖脂肪酸アシル CoA とマロニル CoA が ELOVL ファミリーによる縮合，KAR による還元，HACD ファミリーによる脱水，TER による還元反応のサイクルを繰り返すことで合成される。生体には様々な極長鎖脂肪酸が存在するが、それらがどのような機構で作分けされては明らか

かではない。2008 年に当研究室で世界に先駆けて同定した HACD ファミリーは、極長鎖脂肪酸伸長過程における脱水反応を触媒する酵素で、基質とする脂肪酸の鎖長、不飽和度に対して特異性を持つことが推測されているがその詳細は不明である。HACD1 は心臓、骨格筋に高発現し、心疾患、筋変性疾患の関連遺伝子として注目されているが、心臓、骨格筋における極長鎖脂肪酸と生理機能や疾患との関連性も不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、HACD ファミリーの基質特異性と極長鎖脂肪酸伸長機構の解明および HACD1 によって産生される極長鎖脂肪酸の心臓、骨格筋における作用メカニズム、心疾患、筋変性疾患の病因解明を目的に解析を行った。

3. 研究の方法

(1) HACD ファミリーの基質特異性解析

HACD の基質特異性の解析系を構築するため、HACD が保存されており遺伝子操作が容易な出芽酵母を用いた。HACD の酵母ホモログ PHS1 をドキシサイクリン存在下で発現を抑制できる変異株に各 HACD を発現させるプラスミドを導入した。この株では内在性の HACD 活性が除かれているため、導入した HACD の活性解析に非常に有用である。各酵母株をドキシサイクリン存在下で培養、膜面分を調製し、各種脂肪酸アシル CoA の伸長活性を解析した。

(2) *Hacd1* ノックアウトマウスの解析

① *Hacd1* ノックアウトマウスの作製

Hacd1 遺伝子のエキソン 6 を Neomycin 耐性に置換するターゲティングベクターを ES 細胞に導入後、相同組換え体を得た。取得した組換え ES 細胞を用いてキメラマウスを作製し、戻し交配を繰り返すことで、*Hacd1* ヘテロノックアウトマウスを作製した。*Hacd1* ヘテロノックアウトマウス同士を交配し、*Hacd1* ノックアウトマウスを得た

② *Hacd1* ノックアウトマウスの表現型解析

生後 12 週齢または 24 週齢のマウスを用いて筋肉量、筋力、運動能の測定、筋組織の Hemalun/Eosin 染色を行った。また、筋組織から調製した膜面分を用いて HACD の [¹⁴C]3-ヒドロキシパルミトイル CoA の脱水活性を測定した。

4. 研究成果

(1) HACD ファミリーの基質特異性解析

HACD ファミリーの基質特異性を解析するため、各種飽和脂肪酸アシル CoA を基質に用いて伸長活性を解析した (図 1)。C14:0-CoA を基質に用いた場合、コントロールでは C16:0 (3-OH) が蓄積し、C18:0 以上の生成物が見られないのに対し、HACD1 および HACD2 を導入したものでは、C26:0 まで伸長反応が進んでいることが明らかとなった。同様に、HACD1、HACD2 は C16:0-CoA、C18:0-CoA、C20:0-CoA を基質に用いた場合にも C26:0 まで伸長反応が進んでいた。また、HACD3 を導入したものでも、コントロールに比べ、伸長反応が進行した産物がわずかに増加していた。一方 HACD4 は、今回用いた基質のいずれに対しても活性を示さなかった。以上の結果

から HACD1、HACD2 は飽和脂肪酸に対して高い活性を示し、極長鎖脂肪酸伸長サイクルを C26:0 脂肪酸の生成まで駆動させることができることが明らかとなった。一方、HACD3 は飽和脂肪酸に弱く活性を示し、HACD4 は活性を示さないことが明らかとなった。これらの結果から、本研究では HACD 間には明確に基質特異性が存在すること初めて見出した。

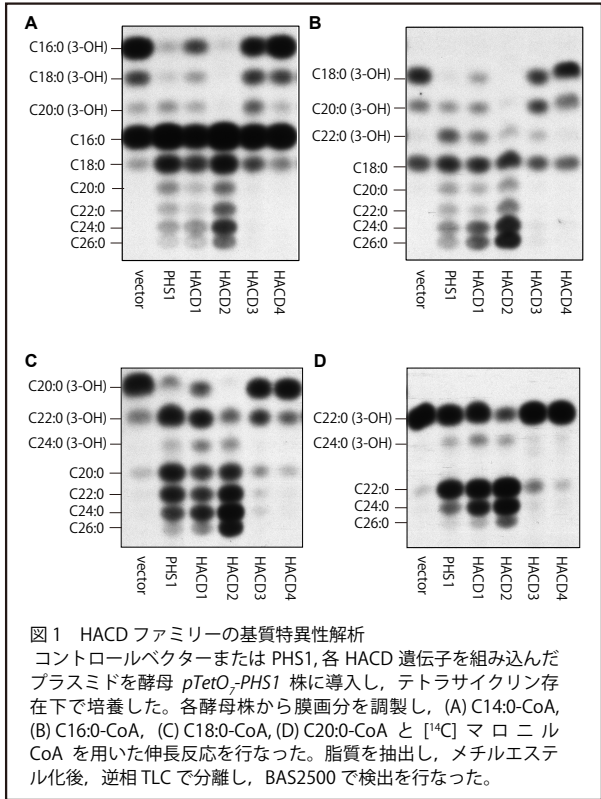


図 1 HACD ファミリーの基質特異性解析
コントロールベクターまたは PHS1、各 HACD 遺伝子を組み込んだプラスミドを酵母 *pTetO₂-PHS1* 株に導入し、テトラサイクリン存在下で培養した。各酵母株から膜面分を調製し、(A) C14:0-CoA、(B) C16:0-CoA、(C) C18:0-CoA、(D) C20:0-CoA と [¹⁴C] マロニル CoA を用いた伸長反応を行った。脂質を抽出し、メチルエステル化後、逆相 TLC で分離し、BAS2500 で検出を行った。

(2) *Hacd1* ノックアウトマウスの解析

Hacd1 ノックアウトマウスを作製したところ、ノックアウトマウスは外見上からも明らかに体が小さいことが確認された。そこで各マ

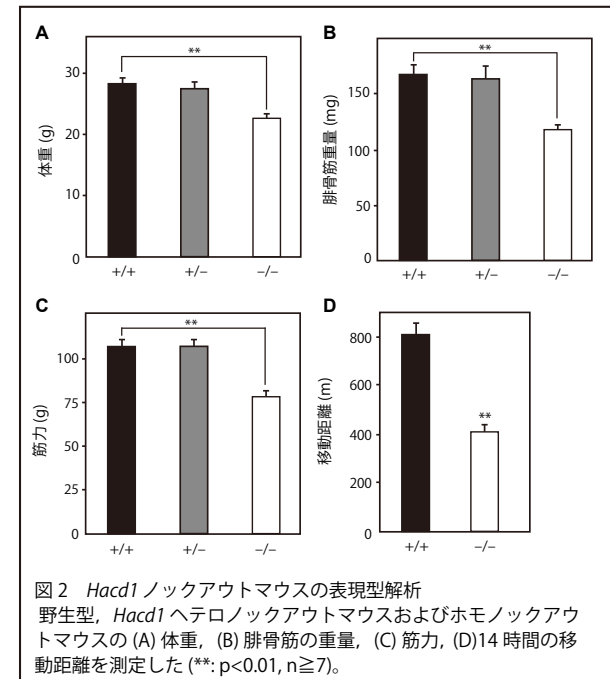
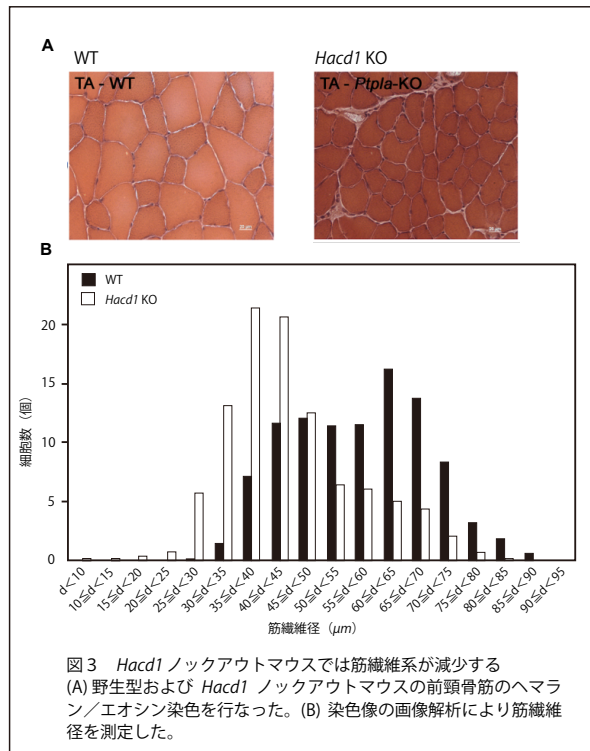


図 2 *Hacd1* ノックアウトマウスの表現型解析
野生型、*Hacd1* ヘテロノックアウトマウスおよびホモノックアウトマウスの (A) 体重、(B) 腓骨筋の重量、(C) 筋力、(D) 14 時間の移動距離を測定した (**: $p < 0.01$, $n \geq 7$)。

ウスの体重を測定したところ、体重が有意に減少していることが明らかとなった(図2A)。体重の減少はいずれの生後から24週齢までのいずれの週齢においても観察された。また、HACD1の高発現部位である骨格筋も有意に減少していることも見出した(図2B)。続いて、筋肉系における表現型を解析するために、筋力、運動量を測定したところ、*Hacd1* ホモノックアウトマウスでは筋力、運動量ともに減少していることがわかった。また、骨格筋における筋繊維径を解析したところ、*Hacd1* ノックアウトマウスでは、筋繊維系が減少していることを見出した(図3)。



続いて、骨格筋における HACD 活性を測定したところ、*Hacd1* ノックアウトマウスでは、HACD 活性が半分程度まで減少していることが明らかとなった。心臓および肝臓でも活性解析を行なったが、これらの臓器では HACD 活性の減少は認められなかった。以上の結果から、本研究では HACD1 が骨格筋の成長に重要であることが示唆された。HACD は中心核ミオパチーの原因遺伝子であるため、骨格筋が減少している原因として骨格筋の変性の可能性が考えられる。そのため現在は *Hacd1* ノックアウトマウスから採取した筋芽細胞の分化生育や、細胞死への *Hacd1* の関与を解析している。また、(1)の結果から HACD1 は飽和脂肪酸の伸長を行なうことが明らかとなったが、骨格筋の分化には多価不飽和脂肪酸が関与することも示唆されているため、多価不飽和脂肪酸に対する活性を解析し、筋組織の成長および機能維持に関わる極長鎖脂肪酸を同定することを計画している。

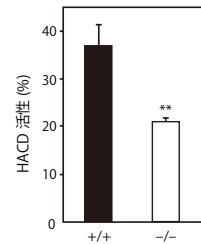


図4 *Hacd1* ノックアウトマウスでは HACD 活性が減少する
24週齢のマウスの腓骨筋から膜画分を調製し、 $[^{14}C]$ -ヒドロキシパルミトイル CoA と反応させ、脂質抽出後、TLC で展開し BAS2500 で検出、定量を行なった。

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1件)

Naganuma Tatsuro, Sato Yuichiro, Sassa Takayuki, Ohno Yusuke, Kihara Akio. Biochemical characterization of the very long-chain fatty acid elongase ELOVL7. 査読有, FEBS Letters, 585, 3337-3341, 2011.

〔学会発表〕(計2件)

(1) Jordan Blondelle, Yusuke Ohno, Marie Maurer, Gemma Walmsley, Sébastien Storck, Laurent Guillaud1, Jean Demarquoy, Richard Piercy, Akio Kihara, Laurent Tiret, and Fanny Pilot-Storck
Of Dogs, Mice, and Cells: Role of HACD1 in Muscle Development and Physiology. 53rd International conference on the Bioscience of Lipids. 5 - 8 September 2012, Banff, Canada. Banff Centre.

(2) Yusuke Ohno, Akio Kihara.

Sphingolipids with different fatty acid composition exhibit distinct physiological functions. The 30th Naito Conference on Membrane Dynamics and Lipid Biology [II], 30 June, 2011, Sapporo, Japan. Gateaux Kingdom Sapporo.

〔図書〕(計1件)

大野祐介, 木原章雄, 食品化学新聞社
極長鎖脂肪酸伸長とセラミド合成. ここまできたセラミド研究最前線 セラミド-基礎と応用-(セラミド研究会編), 2011, 43-49.

〔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

大野 祐介 (OHNO YUSUKE)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：50611498

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし