

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870001

研究課題名(和文) 極長鎖脂肪酸合成の多様性の分子基盤および筋分化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms underlying the diversity of very long-chain fatty acid synthesis and the muscle development.

研究代表者

大野 祐介 (Ohno, Yusuke)

北海道大学・薬学研究科(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)：炭素数(C)が20より長い脂肪酸は極長鎖脂肪酸と呼ばれ、生体内での存在量は長鎖脂肪酸に比べ微量であるものの、長鎖脂肪酸では代替できない様々な生理機能に關与している。HACDファミリー(HACD1-4)は極長鎖脂肪酸の合成過程における脱水反応を担うが、HACDファミリーの生理機能には不明な点が多い。本研究では、酵母、培養細胞、マウス、ヒトサンプルを用いた解析により、ヒトHACD1遺伝子変異によりミオパチーが発症すること、HACD1はC24:1の合成活性、細胞膜の流動性および筋形成における細胞融合に寄与することを明らかにし、極長鎖脂肪酸の新たな生理機能を見出すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Fatty acids with a carbon (C) chain-length longer than 20 are called very long-chain fatty acids (VLCFAs). Although amounts of VLCFAs are quite smaller than that of long chain fatty acids (LCFAs) in organisms, VLCFAs exert a variety of biological functions that are not complemented by LCFAs. HACD family proteins (HACD1-4) catalyze a dehydration reaction in the VLCFAs elongation cycle, yet the biological functions of HACD family proteins have remained elusive. In this project, we investigated the roles of VLCFAs and HACD1 in the muscle development by using yeasts, mammalian cells, HACD1 knockout mice, and human biopsies as experimental materials, and we discovered that human HACD1 gene mutation causes myopathy. Furthermore, we demonstrated that HACD1 is involved in the synthesis of C24:1 fatty acid, regulation of membrane fluidity, and cell fusion during myogenesis.

研究分野：生化学

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

### 1. 研究開始当初の背景

生体を構成する脂肪酸は炭素数 16 (C16) や C18 といった長鎖脂肪酸が 80%以上を占めるが、C20 より長い脂肪酸である極長鎖脂肪酸は、C16 や C18 の脂肪酸では代替できない生理機能を有する。極長鎖脂肪酸は、小胞体膜上に存在する極長鎖脂肪酸伸長サイクルにより長鎖アシル CoA が伸長されることで合成される。極長鎖脂肪酸伸長サイクルは ELOVL ファミリーによる長鎖アシル CoA と マロニル CoA の縮合反応、KAR による還元反応、HACD ファミリーによる脱水反応、TER による還元 の 4 段階の反応から成る。HACD ファミリーは当研究室により世界に先駆けて同定された因子であるが、HACD ファミリーの生理機能や合成に関与する極長鎖脂肪酸の特異性には不明な点が多い。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示唆されている。これまでに申請者は *Hacd1* ノックアウトマウスでは体重、筋力、運動量が減少していることを見出したが、筋肉における極長鎖脂肪酸の機能および分子メカニズムは不明であった。

### 2. 研究の目的

HACD ファミリーの基質特異性解析による極長鎖脂肪酸合成の分子基盤の構築と筋分化およびミオパチー発症に関わる極長鎖脂肪酸の同定と作用機構の解明を目的に研究を行った。

### 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を行うためのモデル生物として出芽酵母を用いた。酵母にヒトセラミド合成酵素 CERS5 を導入し、酵母の *PHS1* (HACD の酵母ホモログ) 欠損株を作成し、各 HACD を発現させるプラスミドを導入した。各酵母から膜画分を調製し、各種脂肪酸アシル CoA の伸長活性を解析した。

#### (2) HACD1 変異体 Tyr248stop の解析

744 番目のシトシンをアデニンに置換した HACD1 変異体 Tyr248stop に FLAG タグを融合したタンパク質を発現させるプラスミドを作製した。野生型および変異体を HEK 293T に発現させ、FLAG タグを用いた精製を行い、 $[^{14}\text{C}]3$ -ヒドロキシパルミトイル CoA の脱水活性を解析した。

#### (3) *Hacd1* ノックアウト細胞およびノックダウン細胞を用いた解析

*Hacd1* ノックアウトマウスより採取した筋芽細胞または *Hacd1* 遺伝子をノックダウンした筋芽細胞株 C2C12 細胞の分化能を解析した。*Hacd1* ノックダウン細胞の脂質組成解析を液

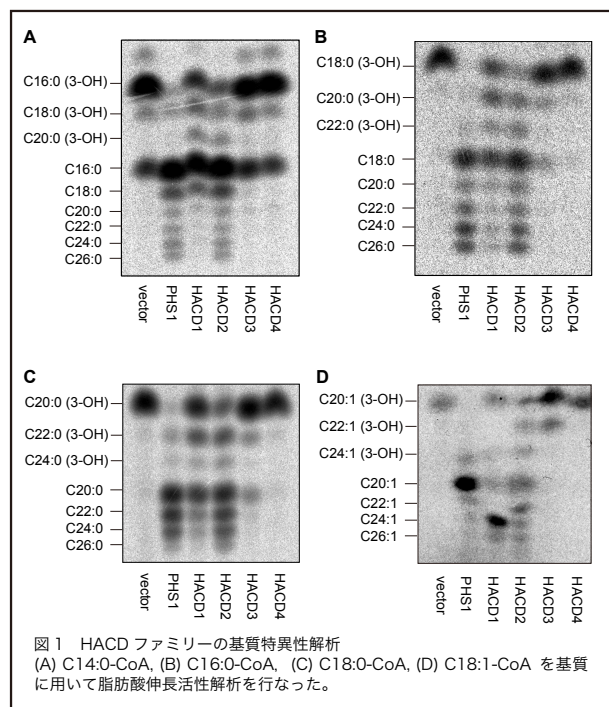
体クロマトグラフィー連結型質量分析計を用いて行なった。また、DPH (dipheyl hexatriene) をプローブに用いた細胞の膜流動性解析を行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) HACD ファミリーの基質特異性解析

HACD の基質特異性を明らかにするため、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 の酵母ホモログである *PHS1* 遺伝子を欠損させると致死となるが、ヒトセラミド合成酵素 CERS5 を発現させることにより *PHS1* 遺伝子欠損による致死性を回避できることを見出し、内在的な HACD 活性を完全に喪失した酵母の作製に成功した。この株にヒト HACD (HACD1~4) をそれぞれ発現させ、脂肪酸の伸長活性を解析した (図 1)。HACD1 は飽和の C16 から C26 の 3-ヒドロキシアシル CoA に活性を示すが、その中でも一価不飽和の C24 の 3-ヒドロキシアシル CoA の脱水活性が高いことを見出した。HACD2 は飽和および一価不飽和の C16 から C26 の、HACD3 は C16 から C20 の 3-ヒドロキシアシル CoA に対する脱水活性を有することを明らかにした。

この成果によりこれまで全く不明であった HACD ファミリー間の基質特異性の違いが初めて見出された。今後は多価不飽和脂肪酸を含めた活性解析を行い、HACD ファミリーの基質特異性および極長鎖脂肪酸伸長経路の全貌を解明へと発展させる。

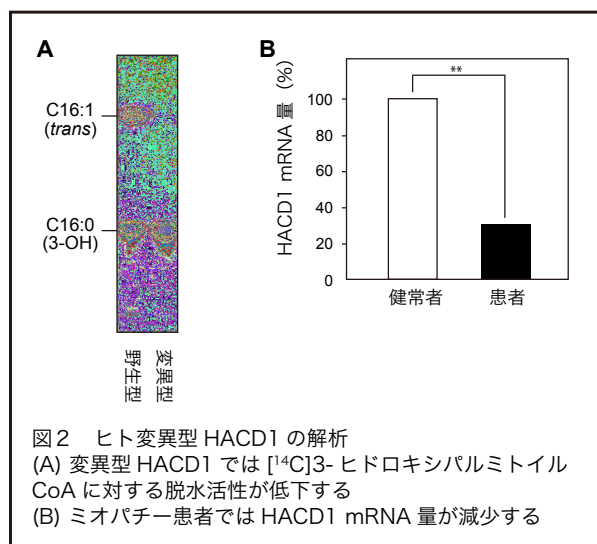


#### (2) HACD1 変異体 Tyr248stop の解析

Parvari 博士 (Ben-Gurion University of the Negev, イスラエル) らとの共同研究により、*HACD1* 遺伝子変異を持つミオパチー患者を特定した。ミオパチー患者では、ナンセンス

変異 (744 番目のシトシンがアデニンに置換) を有しており、この変異により 248 番目のチロシンで翻訳が終了した HACD1 変異体 Tyr248stop が産生される。この変異体の 3-ヒドロキシアシル CoA 脱水酵素活性を調べるために、3xFLAG タグを融合した野生型および変異型 HACD1 を HEK 293T 細胞に発現させ、各 HACD1 を抗 FLAG 抗体を用いて精製した。野生型および変異型 HACD1 の [<sup>14</sup>C]-ヒドロキシパルミトイル CoA に対する脱水活性を解析したところ、変異型 HACD1 では脱水活性が消失していることを見出した (図 2A)。また、患者および健常者の筋生検より抽出した RNA を用いて RT-qPCR を行ったところ、変異型 HACD1 mRNA 量がコントロールの 31% に低下していることを見出し、HACD1 遺伝子変異患者では HACD1 の発現レベルと活性レベルの双方が顕著に低下していることを明らかにした (図 2B)。

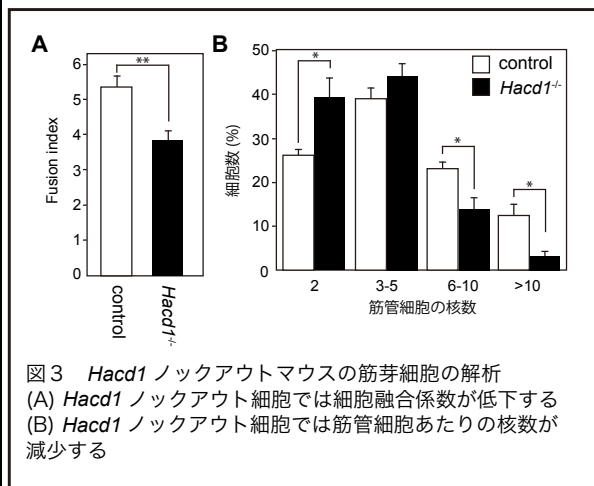
これまで HACD1 の筋疾患への関与はイヌを用いた解析のみ報告されていたが、本研究の結果から、ヒトにおいても HACD1 がミオパチー発症と深く関連していることが初めて証明された。



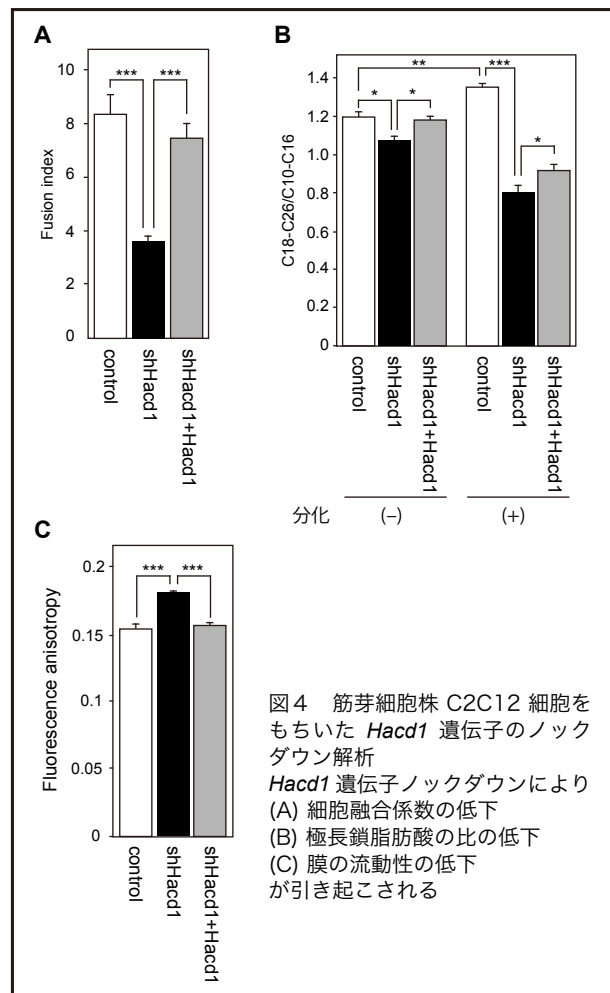
### (3) *Hacdl* ノックアウト細胞およびノックダウン細胞を用いた解析

*Hacdl* の機能低下によるミオパチー発症機構の分子メカニズムを明らかにするために、*Hacdl* ノックアウトマウスより採取した筋芽細胞および *Hacdl* 遺伝子ノックダウンした筋芽細胞株 C2C12 細胞を用いた解析を行なった。筋芽細胞を分化誘導したところ、*Hacdl* ノックアウトマウス由来筋芽細胞では、筋管細胞の平均核数 (Fusion index) が低下しており、6 個以上核を持つ筋管細胞数の減少し、核を 2 個持つ細胞数が増加していた (図 3)。このことから、*Hacdl* の機能消失により、筋管形成過程における細胞融合に異常が生じていることが示唆された。同様に *Hacdl* 遺伝子をノックダウンした C2C12 細胞においても Fusion index が低下し、*Hacdl* 遺伝子を再

導入すると Fusion index はコントロールと同レベルまで回復した (図 4A)。細胞の分化誘



導時の脂肪酸組成の変化を調べたところ、筋芽細胞は分化誘導により、C18-C26 の脂肪酸の割合が増加することが明らかとなった (図 4B)。*Hacdl* 遺伝子をノックダウンした細胞では、分化非誘導時、分化誘導時ともに C18-C26 の脂肪酸が低下していた。また、*Hacdl* ノックアウト細胞では分化誘導時の一価不飽和脂肪酸の割合が低下していた。脂肪酸の不飽和度は細胞膜の流動性と深く関与しており、不飽和脂肪酸は細胞膜の流動性を上昇させると考えられている。そこで筋芽細胞



胞の分化誘導時の細胞膜の流動性を解析したところ、*Hacd1* ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べ細胞膜の流動性が低下していることがわかった。

筋芽細胞は分化に伴い、細胞が融合し多核化することで筋管を形成する。この際に細胞膜の再編成が行われると考えられるが、細胞融合時の膜の流動性は非常に重要である。特に *Hacd1* は図 1 D, 図 4B の結果よりは C24:1 の合成に寄与しており、細胞融合時の再編成にはこの極長鎖一価不飽和脂肪酸 C24:1 がキーとなることが示唆された。極長鎖脂肪酸の筋機能への寄与はこれまで明らかになっていなかったが、本研究によって筋芽細胞の筋肉へ発達する細胞融合の過程において極長鎖脂肪酸の重要性を新たに見出すことに成功した。

#### 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 3 件)

1. Muhammad E, Reish O, Ohno Y, Scheetz T, DeLuca A, Searby C, Regev M, Benyamini L, Fellig Y, Kihara A, Sheffield VC, Parvari R. Congenital myopathy is caused by mutation of HACD1. *Human Molecular Genetics*, **22**, 5229-5236, 2013. DOI: 10.1093/hmg/ddt380. 査読有.

2. Abe K, Ohno Y, Sassa T, Taguchi R, Caliskan M, Ober C, Kihara A. Mutation for non-syndromic mental retardation in the trans-2-enoyl-CoA reductase TER gene involved in fatty acid elongation impairs the enzyme activity and stability leading to change in sphingolipid profile. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 36741-36749, 2013. DOI: 10.1074/jbc.M113.493221. 査読有.

3. Blondelle J\*, Ohno Y\*, Gache V, Guyotd S, Storcke S, Blanchard N, Barthélémy I, Walmsley G, Rahier A, Gadin S, Maurer M, Guillaud L, Ferryh A, Aubin-Houzelstein G, Demarquoy J, Piercy R, Blot S, Kihara A, Tiret L, Storck F. \*equally contributed. HACD1, a regulator of membrane composition and fluidity, promotes myoblast fusion and is essential for skeletal muscle growth. *Journal of Molecular Cell Biology*. In press. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

Blondelle J, Ohno Y, Guyot S, Storck S, Blanchard-Gutton N, Walmsley G, Guillaud L, Maurer M, Barthélémy I, Demarquoy J, Piercy RJ, Blot S, Kihara A, Tiret L, Pilot-Storck F.

Défaut de fusion des myoblastes: un nouveau mécanisme pathogénique responsable de l'hypotrophie musculaire observée dans des myopathies congénitales, révélé par des analyses comparées en cellules, chez le chien et la souris. 7èmes Assises de Génétique Humaine et Médicale, Bordeaux, France, 2014. 1. 30.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

北海道大学大学院薬学研究院生化学研究室  
<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