

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26251010

研究課題名(和文) 極長鎖脂肪酸の産生及び代謝機構と代謝異常による病態の解明

研究課題名(英文) Production and metabolism of very long-chain fatty acids and pathology due to their abnormal metabolism

研究代表者

木原 章雄 (KIHARA, Akio)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：50333620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,600,000円

研究成果の概要(和文)：極長鎖脂肪酸の産生に関わる脂肪酸伸長サイクルでは、ELOVL1-7、KAR、HACD1-4、TERによって4つの反応が触媒される。本研究ではHACD遺伝子のノックアウトマウスあるいはノックアウト細胞を用いてミオパチーの分子機構、HACD1-4の基質特異性の違いを解明した。ELOVLの変異マウスや生化学的な解析によって、ELOVLの基質特異性、KARによる活性調節機構を解明した。皮膚バリア形成に重要な極長鎖脂質アシルセラミドの産生に関する脂肪酸オメガ水酸化酵素CYP4F22を同定し、魚鱗癬発症の分子機構を解明した。TERの脂肪酸伸長以外の新たな機能を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the fatty acid elongation cycle, which produces very long-chain fatty acids, four reactions are catalyzed by ELOVL1-7, KAR, HACD1-4, and TER. In the present study, we elucidated the molecular mechanism of myopathy and the differences in the substrate specificity of HACD1-4, using knockout mice or knockout cells of HACD genes. Analyses using ELOVL mutant mice and biochemical assays revealed the substrate specificity of ELOVLs and the mechanism of activity regulation of ELOVL6 by KAR. We identified fatty acid omega-hydroxylase CYP4F22 as the gene involved in the production of the very long-chain lipid acylceramide, which is important for skin barrier formation, and elucidated the molecular mechanism of ichthyosis. We revealed a new function of TER other than fatty acid elongation.

研究分野：脂質生化学

キーワード：脂質 代謝 脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

極長鎖脂肪酸とは炭素数(C)20を超える鎖長を持つ脂肪酸のことを指し、皮膚にはC38に至るものまでである。その長い鎖長により極長鎖脂肪酸は脂質二重層においては片側の脂質層に留まらず相手側の層にまで到達し、その高い疎水性は皮膚バリア形成など高度に疎水的環境を必要とする細胞機能において重要な役割を担う。このような極長鎖脂肪酸の特性は、生体内に多く存在するC16やC18の長鎖脂肪酸には見られない。そのため、極長鎖脂肪酸の産生異常は様々な疾患を引き起こす。例えば、皮膚バリア機能の低下によるアトピー性皮膚炎や魚鱗癬、精神遅滞、肝機能障害、網膜における黄斑変性などが知られている。また、我々は骨格筋における極長鎖脂肪酸産生異常(アシル CoA 脱水酵素 *HACD1* 遺伝子変異)がミオパチーを引き起こすことを本研究課題開始前に見いだした。

長鎖脂肪酸は小胞体において、縮合、還元、脱水、還元の4つの反応からなる脂肪酸伸長サイクルによって伸長し、極長鎖脂肪酸となる。それぞれの反応は異なる酵素によって触媒され、それぞれ *ELOVL1-7*、*KAR*、*HACD1-4*、*TER* が関与する(図1)。極長鎖脂肪酸に含まれる分子種は鎖長、飽和度の違いから多岐にわたる。そのため、これら多様な極長鎖脂肪酸を産生するために、律速段階を触媒する脂肪酸縮合酵素が哺乳類に7種(*ELOVL1-7*)も存在する。我々はこれまでにこれらアイソザイムがどの極長鎖脂肪酸産生に働くのかを包括的な解析により明らかにしてきた。三段階目の脱水反応を担うのは、我々が以前同定した *HACD1-4* の4種のアイソザイムである。これら *ELOVL* 7種と *HACD* 4種の組み合わせにより、生体内の多様な極長鎖脂肪酸が産生されるが、*HACD* の基質特異性が未解明なため極長鎖脂肪酸の多様性創出の分子機構は不明であった。また、脂肪酸伸長サイクルに関わる因子の制御機構も不明であった。

極長鎖脂肪酸のうち、飽和及び一価不飽和脂肪酸の大部分は生体膜脂質であるスフィンゴ脂質の構成成分として使用される(図1)。つまり、スフィンゴ脂質は極長鎖脂肪酸の主要代謝産物であると言える。しかし、極長鎖脂肪酸の代謝経路には未解明な経路も依然として存在する。例えば、皮膚のバリア機能において最も重要な脂質分子であるアシルセラミドの産生には生体内で最も長い極長鎖脂肪酸(C30-38)が使用されるが、アシルセラミド合成の分子メカニズムは殆ど分かっていなかった。極長鎖脂肪酸のうち、生体内で最も多く、広範な組織に存在するのはC24脂肪酸である。その殆どがスフィンゴ脂質(C24スフィンゴ脂質)合成に使用され、皮膚においてはさらに脂肪酸が伸長された後にアシルセラミドへと代謝される。我々はC24脂肪酸の産生に中心的な役割を果たす脂肪酸縮合酵素遺伝子 *Elov11* のノックアウト

(*KO*)マウスを作成し、アシルセラミド産生不全に起因する皮膚バリア機能の低下(魚鱗癬症状)が原因で新生致死となることを以前報告した。しかし、この新生致死性のために皮膚以外の組織でのC24脂肪酸の解析ができなかった。そこで、我々は皮膚特異的プロモーター制御下に *Elov11* 遺伝子を発現させるトランスジェニックマウスを作成し、*Elov11 KO* マウスと交配させることで、皮膚バリア機能をレスキューしたマウス(皮膚バリアレスキ

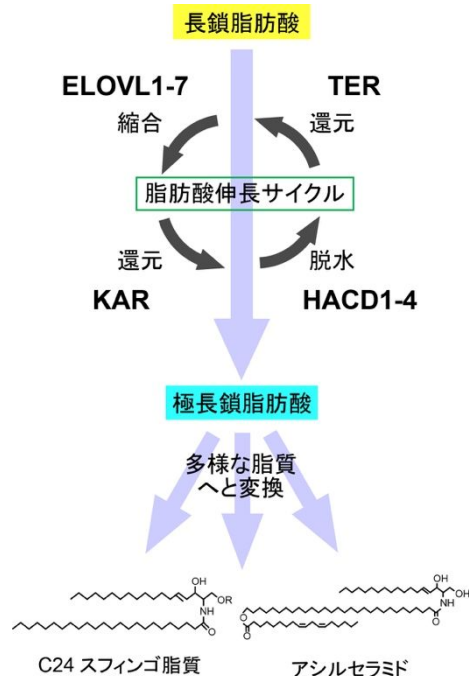


図1 極長鎖脂肪酸の産生と代謝

ュー *Elov11 KO* マウス) を樹立した。

2. 研究の目的

Hacd1 KO マウスの解析により、ミオパチー発症の分子メカニズムを解明する。脂肪酸伸長因子のうち、最後まで未解明なアシル CoA 脱水酵素 *HACD1-4* の基質特異性の違いを明らかにし、極長鎖脂肪酸多様性を生み出す分子機構の全体像を解明する。皮膚バリアレスキュー *Elov11 KO* マウスの解析により、*ELOVL1* の皮膚以外の組織における極長鎖脂肪酸合成への寄与を明らかにする。アシルセラミド産生に関わる新規遺伝子を同定し、皮膚バリア形成の分子機構を解明する。脂肪酸伸長サイクルに関わる因子の制御機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) *Hacd1 KO* マウス骨格筋の解析

ミオパチーモデルマウスとして作成した *Hacd1 KO* マウスの骨格筋の組織染色による形態、筋肉の萎縮と筋力、筋肉重量を解析した。また、*Hacd1 KO* マウス骨格筋の脂質組成を質量分析により調べた。*Hacd1 KO* マウスから筋芽細胞を初代培養し、分化能、増殖、脂質組成を調べた。

(2) *HACD* KO 細胞の作成と *HACD* の基質特異性の解析

CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集により *HACD1* KO, *HACD2* KO, *HACD3* KO, *HACD1 HACD2* 二重 KO (DKO) HAP1 細胞を作成した。これらの細胞を重水素標識した飽和脂肪酸, 一価不飽和脂肪酸, 多価不飽和脂肪酸 (n-3 系および n-6 系) でラベル後, それらの代謝産物を質量分析によって測定することで, *HACD1*, *HACD2*, *HACD3* の基質特異性を調べた。また, *HACD1 HACD2* DKO 細胞に各 *HACD* を過剰発現させ, 同様の解析を行った。

(3) 皮膚バリアレスキュー *Elovl1* KO マウスの解析

皮膚バリアレスキュー *Elovl1* KO マウスの様々な組織から脂質を抽出し, 質量分析によって脂質組成を調べた。皮膚バリアレスキュー *Elovl1* KO マウスの表現型を様々な生化学的検査, 組織形態観察によって調べた。

(4) 脂肪酸オメガ水酸化酵素 *CYP4F22* の同定と解析

HEK 293T に脂肪酸縮合酵素 *ELOVL4* とセラミド合成酵素 *CERS3* を過剰発現させることで, アシルセラミドの前駆体である C30-C36 極長鎖セラミドを産生させる系を確立した。アシルセラミド産生に関わる未同定の脂肪酸オメガ水酸化酵素を同定するために, 皮膚で発現しているシトクロム P450 *CYP4F* サブファミリー遺伝子を全てクローニングした。これらを, HEK 293T 細胞中に *ELOVL4* と *CERS3* と共に過剰発現させ, アシルセラミド産生の産生を [³H]スフィンゴシントレーサー実験あるいは質量分析によって調べた。*CYP4F22* 遺伝子に変異を持つ先天性魚鱗癬患者の角質層から脂質を抽出し, アシルセラミド量を質量分析によって調べた。

(5) 精製 *ELOVL6* の活性測定

HEK 293T 細胞中で 3xFLAG タグの付加した *ELOVL6* を過剰発現後, 精製し, プロテオリポソームに組み込み, *in vitro* 脂肪酸伸長アッセイを行った。また, 脂肪酸伸長サイクルの二段階目を触媒する *KAR* も同様に精製し, *ELOVL6* と同時にプロテオリポソームに組み込み, *in vitro* 脂肪酸伸長アッセイを行った。

4. 研究成果

(1) *Hacd1* KO マウス骨格筋の解析と *HACD* の基質特異性の解明

脂肪酸伸長サイクル三段階目を触媒する 3-ヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素として, 哺乳類には 4 種類のアイソザイム (*HACD1-4*) が存在する。このうち, *HACD1* は筋肉組織特異的に発現している。本研究において我々は *Hacd1* KO マウスの解析を行い, *Hacd1* 遺伝子欠損によって筋芽細胞の融合過程が損なわれ, 筋肉の発達異常, 筋力低下を伴うミ

オパチー症状が引き起こされることを明らかにした。*HACD1-4* の基質特異性について, *HACD1-3* KO 細胞または *HACD1 HACD2* DKO 細胞, *HACD1 HACD2* DKO 細胞にそれぞれの *HACD* を過剰発現した細胞を用いた解析を行った。その結果, *HACD1*, 2 が飽和, 一価不飽和, 多価不飽和脂肪酸のいずれに対しての脂肪伸長にも高い活性を示すこと, *HACD2* が *HACD1* よりも高い活性を示すことを明らかにした。一方, *HACD3* と *HACD4* には高い活性が認められなかった。これらの結果から, *HACD* の基質特異性の違いが明らかになった。

(2) 皮膚バリアレスキュー *Elovl1* KO マウスの解析

脂肪酸伸長サイクルの第一段階を触媒する *Elovl1* の皮膚バリアレスキュー KO マウスはドライアイ症状を示した。これは, 涙液に存在する極長鎖脂質 (コレステロールエステルとワックスエステル) の鎖長が飽和タイプで低下したためであった。一方, 一価不飽和極長鎖脂質の減少度は小さく, 他の脂肪酸縮合酵素 (*ELOVL3*, 4, 7) との基質特異性の重複性が明らかになった。これらの結果から, これまで不明であった一価不飽和極長鎖脂肪酸の産生経路が解明された。

(3) アシルセラミド産生に働く脂肪酸オメガ水酸化酵素 *CYP4F22* の同定

表皮において C30-36 の極長鎖脂肪酸はオメガ水酸化を受けた後, アシルセラミドへと変換する。これまでアシルセラミドの産生経路, 産生遺伝子については殆ど不明であったが, 我々は本研究においてシトクロム P450 の 1 つである *CYP4F22* がアシルセラミド産生経路において極長鎖脂肪酸のオメガ水酸化を触媒する酵素であることを明らかにした。*CYP4F22* 遺伝子変異は皮膚角化症である魚鱗癬を引き起こす。我々は, *CYP4F22* 変異を持つ魚鱗癬患者から脂質を抽出し, アシルセラミド産生が損なわれていることを見出した。また, *in vitro* の解析から *CYP4F22* の基質が \geq C26 極長鎖脂肪酸であることを明らかにした。

(4) *KAR* による *ELOVL6* の活性調節機構の解明

脂肪酸伸長酵素群の酵素間の相互調節機構を明らかにするために 精製した *ELOVL6* (脂肪酸伸長サイクルの一段階目を触媒) と *KAR* (脂肪酸伸長サイクルの二段階目を触媒) を用いて生化学的な解析を行った。その結果, *ELOVL6* は *KAR* によって活性が増強されること, *ELOVL6* 活性増強には *KAR* 活性に依存したものと依存しないものの 2 つの機構が存在することが明らかになった。

(5) セラミド合成酵素のリン酸化による調節機構の解明

極長鎖脂肪酸の多くはセラミド合成酵素によってセラミドへ代謝される。これまで、セラミド合成酵素の調節機構については殆ど不明であったが、我々は本研究においてセラミド合成酵素がリン酸化によって正に制御されていることを見出した。このうち、極長鎖セラミド産生を担うセラミド合成酵素 CERS2 がリン酸化による最も強い活性調節を受けていた。

(6) TER の新たな機能の解明

脂肪酸伸長サイクルの第四段階を触媒する TER には、極長鎖脂肪酸伸長以外にもスフィンゴシン 1-リン酸の代謝過程で働くという別の役割があることを明らかにした。極長鎖脂肪酸はスフィンゴ脂質の構成成分として用いられ、スフィンゴシン 1-リン酸代謝はスフィンゴ脂質分解経路である。このように TER はスフィンゴ脂質の合成と分解の両方に関わる重要な因子であることが明らかになった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 21 件)

1. Sassa T, Tadaki M, Kiyonari H, Kihara A. (2018) Very long-chain tear film lipids produced by fatty acid elongase ELOVL1 prevent dry eye disease in mice. *FASEB J.*, in press: fj201700947R, 査読有, 10.1096/fj.201700947R
2. Honda Y, Kitamura T, Naganuma T, Abe T, Ohno Y, Sassa T, Kihara A. (2018) Decreased skin barrier lipid acylceramide and differentiation-dependent gene expression in ichthyosis gene *Nipal4*-knockout mice. *J. Invest. Dermatol.*, 138: 741-749, 査読有, 10.1016/j.jid.2017.11.008
3. Sawai M, Uchida Y, Ohno Y, Miyamoto M, Nishioka C, Itoharu S, Sassa T, Kihara A. (2017) The 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases HACD1 and HACD2 exhibit functional redundancy and are active in a wide range of fatty acid elongation pathways. *J. Biol. Chem.*, 292: 15538-15551, 査読有, 10.1074/jbc.M117.803171
4. Ohno Y, Kamiyama N, Nakamichi S, Kihara A. (2017) PNPLA1 is a transacylase essential for the generation of the skin barrier lipid ω -O-acylceramide. *Nat. Commun.*, 8: 14610, 査読有, 10.1038/ncomms14610
5. Kitamura T, Seki N, Kihara A. (2017) Phytosphingosine degradation pathway includes fatty acid α -oxidation reactions in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 114: E2616-E2623, 査読有, 10.1073/pnas.1700138114
6. Sassa T, Hirayama T, Kihara A. (2016) Enzyme activities of the ceramide synthases CERS2-6 are regulated by phosphorylation in the C-terminal region. *J. Biol. Chem.*, 291: 7477-7487, 査読有, 10.1074/jbc.M115.695858
7. Narita T, Naganuma T, Sase Y, Kihara A. (2016) Long-chain bases of sphingolipids are transported into cells via the acyl-CoA synthetases. *Sci. Rep.*, 6: 25469, 査読有, 10.1038/srep25469
8. Naganuma T, Takagi S, Kanetake T, Kitamura T, Hattori S, Miyakawa T, Sassa T, Kihara A. (2016) Disruption of the Sjögren-Larsson syndrome gene *Aldh3a2* in mice increases keratinocyte growth and retards skin barrier recovery. *J. Biol. Chem.*, 291: 11676-11688, 査読有, 10.1074/jbc.M116.714030
9. Ohno Y, Nakamichi S, Ohkuni A, Kamiyama N, Naoe A, Tsujimura H, Yokose U, Sugiura K, Ishikawa J, Akiyama M, Kihara A. (2015) Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22 in the production of acylceramide, the key lipid for skin permeability barrier formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 112: 7707-7712, 査読有, 10.1073/pnas.1503491112
10. Blondelle J, Ohno Y, Gache V, Guyot S, Storck S, Blanchard-Gutton N, Barthelemy I, Walmsley G, Rahier A, Gadin S, Maurer M, Guillaud L, Prola A, Ferry A, Aubin-Houzelstein G, Demarquoy J, Relaix F, Piercy R J, Blot S, Kihara A, Tiret L, Pilot-Storck F. (2015) HACD1, a regulator of membrane composition and fluidity, promotes myoblast fusion and skeletal muscle growth. *J. Mol. Cell. Biol.*, 7: 429-440, 査読有, 10.1093/jmcb/mjv049
11. Wakashima T, Abe K, Kihara A. (2014) Dual functions of the *trans*-2-enoyl-CoA reductase TER in the sphingosine 1-phosphate metabolic pathway and in fatty acid elongation. *J. Biol. Chem.*, 289: 24736-24748, 査読有, 10.1074/jbc.M114.571869
12. Naganuma T, Kihara A. (2014) Two modes of regulation of the fatty acid elongase ELOVL6 by the 3-ketoacyl-CoA reductase KAR in the fatty acid elongation cycle. *PLoS One*, 9: e101823, 査読有, 10.1371/journal.pone.0101823

〔学会発表〕(計 65 件)

1. Kihara A. Long-chain base metabolism and α -oxidation in the ER. Gordon Research Conference on Glycolipid & Sphingolipid Biology, 2018
2. Kihara A. Skin barrier formation by acylceramide. Hokkaido University - Korean Society for Molecular and Cellular Biology Joint Symposium (HU-KSMCB Joint Symposium), 2017
3. 木原章雄. 脂質による体表面バリア形成機構と病態. 九州大学公開講演会 最新

化学談話シリーズ 平成 29 年度第 1 回談話会, 2017

4. 木原章雄. セラミドによる皮膚バリア形成の分子機構と病態. 第 41 回日本薬学会関東支部学術講演会, 2016
5. 木原章雄. セラミド多様性の分子機構. 第 9 回セラミド研究会学術集会, 2016
6. Kihara A. Human CYP4F22 in production of acylceramide for skin permeability barrier formation. 21st International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 2016
7. 木原章雄. シェーグレン・ラルソン症候群モデルマウスを用いた病態のメカニズム解析. 第 11 回スフィンゴセラピー研究会, 2016 年
8. Kihara A. Identification of genes involved in epidermal acylceramide production. Gordon Research Conference on Glycolipid & Sphingolipid Biology, 2016
9. Kihara A. Metabolic pathways and genes involved in the synthesis and degradation of ceramides. 6th International Singapore Lipid Symposium, 2015
10. Kihara A. Metabolism, function in skin barrier formation, and pathology of ceramide. International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology 2015, 2015
11. Kihara A. Ceramide metabolism and skin barrier formation. International Conference of Chung-Ang University on Life Science and Medical Research, 2015
12. Kihara A. Molecular mechanism generating acylceramide essential for skin barrier. 第 10 回スフィンゴセラピー研究会, 2015
13. 木原章雄. セラミドの合成と分解の経路・遺伝子の同定. 第 9 回スフィンゴセラピー研究会, 2014
14. 木原章雄. 表皮セラミドと長鎖塩基の代謝と生理機能. ifia JAPAN 2014(第 19 回国際食品素材 / 添加物展・会議), 2014

〔図書〕(計 1 件)

1. Kihara A. (2015) Sphingolipid metabolism via sphingosine 1-phosphate and its role in physiology pathology, and nutrition. Bioactive lipid mediators: current reviews and protocols, Springer Japan, pp 127-138

〔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

(2) 研究分担者

なし

(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・准教授

研究者番号 : 20342793

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