

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450139

研究課題名(和文) リン脂質カルジオリピンの生合成リモデリング系の分子機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of remodeling for cardiolipin

研究代表者

安部 真人 (Masato, Abe)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：30543425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：カルジオリピン(CL)は、ミトコンドリアに局在するリン脂質で種々の膜タンパク質や輸送担体の活性発現に必須である。CLの生合成では、リモデリング系によって脂肪酸部の選択性が得られるが、詳細は不明である。そこで本研究ではリモデリング系に関わるとされるトランスアシルラーゼ、タファジンの基質特異性を明らかにすることを目的とした。このために、種々のCL、リゾCL、ホスファチジルコリンの有機合成を行い、構造活性相関研究を展開した。結果は、酵母由来タファジンにおいて飽和脂肪酸のトランスアシル化が優位に遅いこと、およびホスファチジルコリンのsn-2位を主なアシルドナーとして認識することを初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Remodeling of the acyl chains of cardiolipin (CL) is responsible for final molecular composition of mature CL after de novo CL synthesis in mitochondria. In light of the diversity of the acyl compositions of mature CL between different organisms, the mechanism underlying tafazzin-mediated transacylation remains to be elucidated. We investigated the mechanism responsible for transacylation using purified *S. cerevisiae* tafazzin with liposomes composed of various sets of acyl donors and acceptors. The results revealed that tafazzin efficiently catalyzes transacylation in liposomal membranes with highly ordered lipid bilayer structure. Tafazzin elicited unique acyl chain specificity against phosphatidylcholine (PC) as follows: linoleoyl (18:2) > oleoyl (18:1) > palmitoleoyl (16:1) >> palmitoyl (16:0). In these reactions, tafazzin selectively removed the sn-2 acyl chain of PC and transferred it into the sn-1 and sn-2 positions of MLCL isomers at equivalent rates.

研究分野：生物有機化学

キーワード：カルジオリピン リン脂質 リモデリング tafazzin アシルトランスフェラーゼ ミトコンドリア  
ホスファチジルコリン リゾカルジオリピン

1. 研究開始当初の背景

カルジオリピン (図1) は3つのグリセロール構造に挟まれた2つのリン酸基から成る極性頭部と、4つの脂肪酸部で構成される疎水性尾部を有する陰性リン脂質であり、ミトコンドリア内膜に局在する。

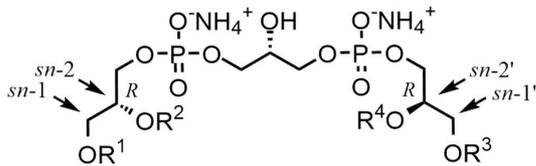


図1 カルジオリピンの化学構造

カルジオリピンは種々の膜タンパク質や輸送担体との相互作用によって活性制御に関わるとされる。カルジオリピンの生合成は、一旦は飽和脂肪酸で構成される未成熟なカルジオリピンを生成したうえでリモデリング系 (図2) と呼ばれる脂肪酸の組換え機構によって成熟カルジオリピンとして完成されると考えられている。しかし、どのような作用によってカルジオリピンの脂肪酸組成が選択されているのかについては分かっていない。

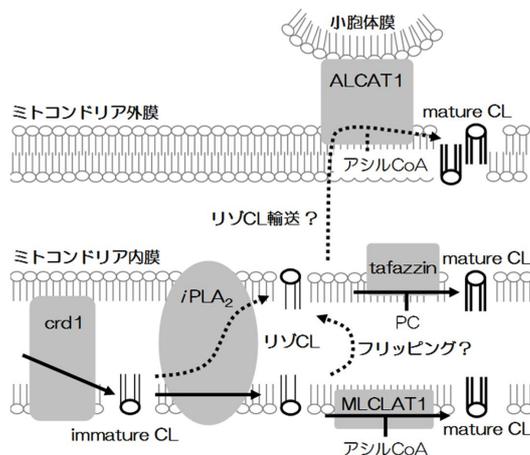


図2 カルジオリピンのリモデリング系

ミトコンドリア内膜に遍在する tafazzin はカルジオリピンの変異を特徴とするバース症候群の原因遺伝子から同定されたトランスアシラーゼである。近年、tafazzin がカルジオリピンのリモデリング系に参与していることが明らかになってきた。リモデリング系には主に次の2つの反応からなっている。一段階目は、未成熟なカルジオリピンの脂肪酸部が加水分解を受けてリゾカルジオリピンを生成する反応。二段階目はリゾカルジオリピンに対して脂肪酸部を導入することで成熟カルジオリピンを生成する反応である。Tafazzin はこの二段階目への関与が指摘されている。

これまでのところ、tafazzin はミトコンドリア内膜の主成分であるホスファチジルコリンをアシルドナー、リゾカルジオリピンをアシルアクセプターとしたトランスアシル

化が考えられているものの、基質特異性は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、カルジオリピンのリモデリング系に参与するアシルトランスフェラーゼ Tafazzin の基質特異性をあきらかにすることを目的とした。種々のカルジオリピン、リゾカルジオリピンおよびホスファチジルコリンの化学合成を通じた構造化相間研究を展開することで、「アシルアクセプターにはどのような脂肪酸が導入されやすいのか」および「アシルドナーはトランスアシル化を受けるアシル鎖の sn-1 または sn-2 について選択的であるのか」を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

本研究で用いたカルジオリピンの合成方法の概略を図3に示す。

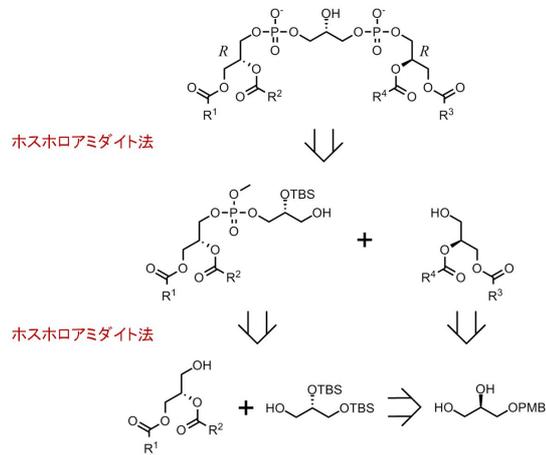


図3 カルジオリピン合成の概略

所望のカルジオリピンは2回の連続したホスホアミダイト法によりリン酸化に伴って得ることとし、それぞれ対応するジアシルグリセロールから誘導する経路を用いた。

具体的な合成経路を図4および5に脂肪酸部をリノール酸として例示する。

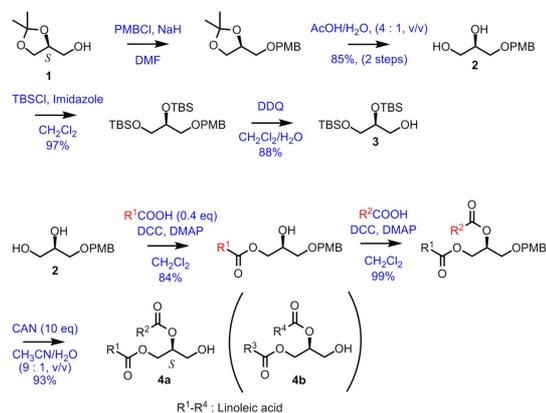


図4 カルジオリピンの合成経路 1

市販の立体選択的にアセタール化された

グリセロール1を出発原料とし、一級水酸基を保護したうえで脱アセタール化することで重要中間体2を得た。この重要中間体2をTBS化することによって極性頭部を担うグリセロール3を得た。別途、重要中間体2に対し、アシル鎖との一級水酸基選択的な縮合を行い、残る二級水酸基に自由に別のアシル鎖を入れられるよう工夫した。続く脱保護によってジアシルグリセロール4を得た。

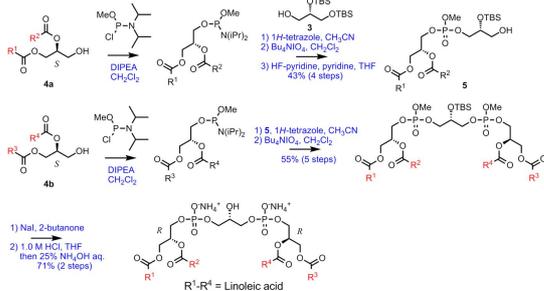


図5 カルジオリピンの合成経路2

ホスホロアミダイト法を連続して行い、脱保護によって目的のカルジオリピンを得た。さらに、リゾカルジオリピンの合成のため種々のホスホリパーゼを検討した。最終的に porcine phospholipase A<sub>2</sub> (aldrich) によって sn-2 選択的な脱保護を、Mucor javanicus lipase (aldrich) によって sn-1 選択的な加水分解反応を達成した。

ホスファチジルコリンの合成はジアシルグリセロールのホスホロアミダイト法にグリセロールではなくトシルコリンを加えることで対応する化合物を得た。

得られたカルジオリピンについて、tafazzin によるトランスアシル化反応のモニタリングに先立ち、HPLC-ELSD (蒸発光散乱検出) を用いた定量系の確立を行った。カルジオリピンを脂肪酸部の組成に応じて分離するために、独自の工夫として ion-pair HPLC を検討し、トリエチルアミン/酢酸を用いる手法を確立した (図6)。

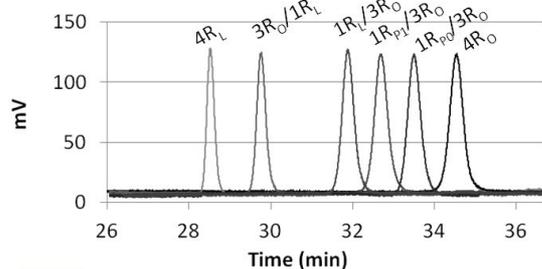


図6 Ion-pair HPLCの様子

さらに、それぞれのカルジオリピンについて ELSD に対する指数応答でフィッティングした検量線を作成することで、数  $\mu\text{g}$  レベルでの微量定量系を確立した (図7)。

以上により tafazzin によるトランスアシル化反応の分析手法を確立し、基質特異性の

解析を行った。

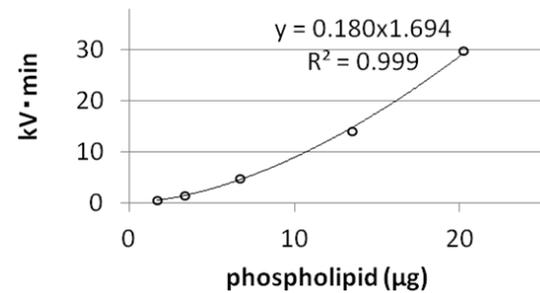


図7 カルジオリピンの検量線

反応の解析においては、リン脂質含有リボソームを用いて単離 tafazzin を用いて混合させることで精製するカルジオリピンをモニターした。本研究で確立した定量系であれば、反応溶液をそのまま HPLC に供することでロスなく直接的に生成したカルジオリピンをモニターすることが可能である。

#### 4. 研究成果

本研究ではカルジオリピンを 11 種類、リゾカルジオリピンを 7 種類、ホスファチジルコリンを 7 種類新たに合成した。

特に、sn-1 位を加水分解したリゾカルジオリピンの合成は初めての合成例となった。

Ion-pair HPLC-ELSD 法によるカルジオリピンの脂肪酸種による分離は極めて高い精度で実現し、リモデリング解析に関する技術的基盤を確立した。

酵母由来の単離 tafazzin を用いたトランスアシル化の進行の様子を図8に示す。アシルドナーとして用いるホスファチジルコリン (PC) の脂肪酸組成に応じて反応速度が異なることがわかった。

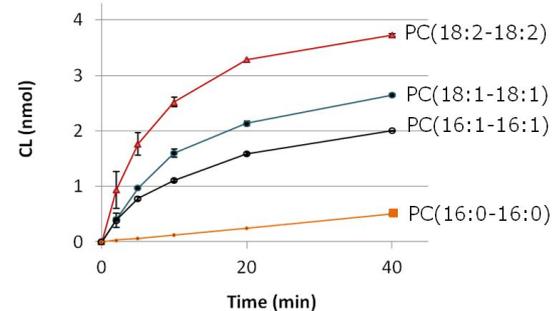


図8 トランスアシル化反応の比較

本研究により、初めて不飽和脂肪酸 (C16:0) のホスファチジルコリンがアシルドナーとして適さないことが明らかになった。この結果は、酵母ミトコンドリアにおけるカルジオリピンの組成が不飽和結合に富んでいることとよく符合する。また、トランスアシル化後の生成物を分析した結果、ホスファチジルコリンの sn-2 位が専らアシルドナーとして認識されていることが新たに分かった。

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)

該当なし

〔雑誌論文〕(計 1件)

Abe, M., Hasegawa, Y., Oku, M., Sawada, Y., Tanaka, E., Sakai, Y., and Miyoshi, H.\* (2016) Mechanism for remodeling of the acyl chain composition of cardiolipin catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* tafazzin. **J. Biol. Chem.** 291, 15491-15502. (査読有)

〔学会発表〕(計 2件)

○安部真人、長谷川裕以、奥公秀、澤田良樹、田中英里子、阪井康能、三芳秀人  
第89回日本生化学会大会(東北大学川内北キャンパス) 2016年9月25日  
Saccharomyces cerevisiae 由来 tafazzin によるカルジオリピンのトランスアシル化反応の基質特異性

○安部真人、長谷川裕以、奥公秀、澤田良樹、田中英里子、阪井康能、三芳秀人  
第38回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(名古屋市立大学大学院薬学研究科) 2016年11月18日  
カルジオリピン含有リポソームを用いた酵母由来 tafazzin の基質特異性の解明

〔図書〕(計 0件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)  
該当なし

取得状況(計 0件)  
該当なし

〔その他〕

<http://www.biofunc-chem.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

安部 真人 (ABE, Masato)  
京都大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号: 3543425

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

奥 公秀 (OKU, Masathide)  
京都大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号: 10511230

(4)研究協力者