

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06090

研究課題名(和文)新規複合スフィンゴ脂質の代謝システムの同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of metabolic pathway of novel sphingolipid

研究代表者

石橋 洋平 (Ishibashi, Yohei)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：90572868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：従来のカテゴリーに当てはまらない全く新しいスフィンゴ脂質、セラミドグリオキシルエタノールアミン(CGE)を発見し、その合成経路や機能の解明を目指した研究を行った。その結果、エタノールアミンが未知の中間体を經由してCGE合成に使われること、セラミドの構造はCGE合成酵素の活性に影響を及ぼさないことを明らかにした。また、偶然にもCGE合成不全株を取得し、そのゲノム解析によりCGE合成に関与する可能性のある機能未知遺伝子を見出した。今後、CGE合成不全株を活用することで、複合脂質の構造を形作る新しい反応機構や、そこに関与する新規遺伝子の発見につながることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セラミドグリオキシルエタノールアミン(CGE)は全く新しい構造であり、その合成経路を調べる際に既存の酵素遺伝子の情報などを参照することは出来ない。新しい遺伝子を同定する為には、CGEを合成できない変異株を樹立し、その原因となる遺伝子を同定するアプローチが必要であった。研究は困難を極めたが、幸いにも最終年度においてCGE合成不全株を得ることに成功した。この株を活用し、CGEの機能や合成機構を解明することで、脂質の機能や生体分子の形成に関する新しい知見が得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We discovered a novel sphingolipid, ceramide glyoxyethanolamine (CGE), which does not fit into any conventional category of complexed sphingolipids. Our research suggested that ethanolamine is used for the CGE synthesis via an unknown intermediate, and ceramide structure does not affect the activity of CGE synthase. Fortunately, we could obtain a CGE-deficient mutant strain and found a functionally unknown gene that may be involved in CGE synthesis through genomic analysis. Novel reaction mechanism and related genes to form unique head group of complexed lipid are expected to be clarified by using CGE-deficient mutant in future research.

研究分野：脂質生化学

キーワード：スフィンゴ脂質 セラミド ラビリンチュラ類

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴイド塩基と脂肪酸からなるセラミドを基本骨格とするスフィンゴ脂質は、細胞膜における重要な構成要素である。セラミドの水酸基に親水性頭部が結合したスフィンゴ脂質は複合スフィンゴ脂質と呼ばれ、リン酸基を有するスフィンゴリン脂質、糖および糖鎖を有するスフィンゴ糖脂質の2つに大別される(図1)。1884年にドイツの生化学者ツディカムによりスフィンゴ脂質が発見されてから今に至るまで、複合スフィンゴ脂質といえはこの2つのカテゴリーのいずれかに分類されてきた。ところが、その常識を覆す、従来のカテゴリーに当てはまらない全く新しいスフィンゴ脂質が存在することを我々は見出した(図1)。

ラビリントラはDHAなどの高度不飽和脂肪酸を高レベルで生産・蓄積するユニークな海洋性真核微生物である。この微生物の脂質組成を解析する過程で、報告例のない特殊な開裂パターンを有し、スフィンゴ脂質の特徴であるアルカリ耐性を示す未知の脂質を見出した。この脂質を完全精製し、2次元NMR解析、精密質量解析など、詳細な構造解析を行った結果、セラミドとエタノールアミンがグリオキシル酸のアルデヒドとアセタールを介して結合しており、アミノ基とカルボキシル基を有する全く新しいスフィンゴ脂質であることが判明した。現在、我々はこの脂質をセラミドグリオキシルエタノールアミン(CGЕ)と呼称している。CGЕがどのように合成、分解されるのか、CGЕにどのような機能があるのか、どのような生物がCGЕを持つのか、が本研究の問いである。

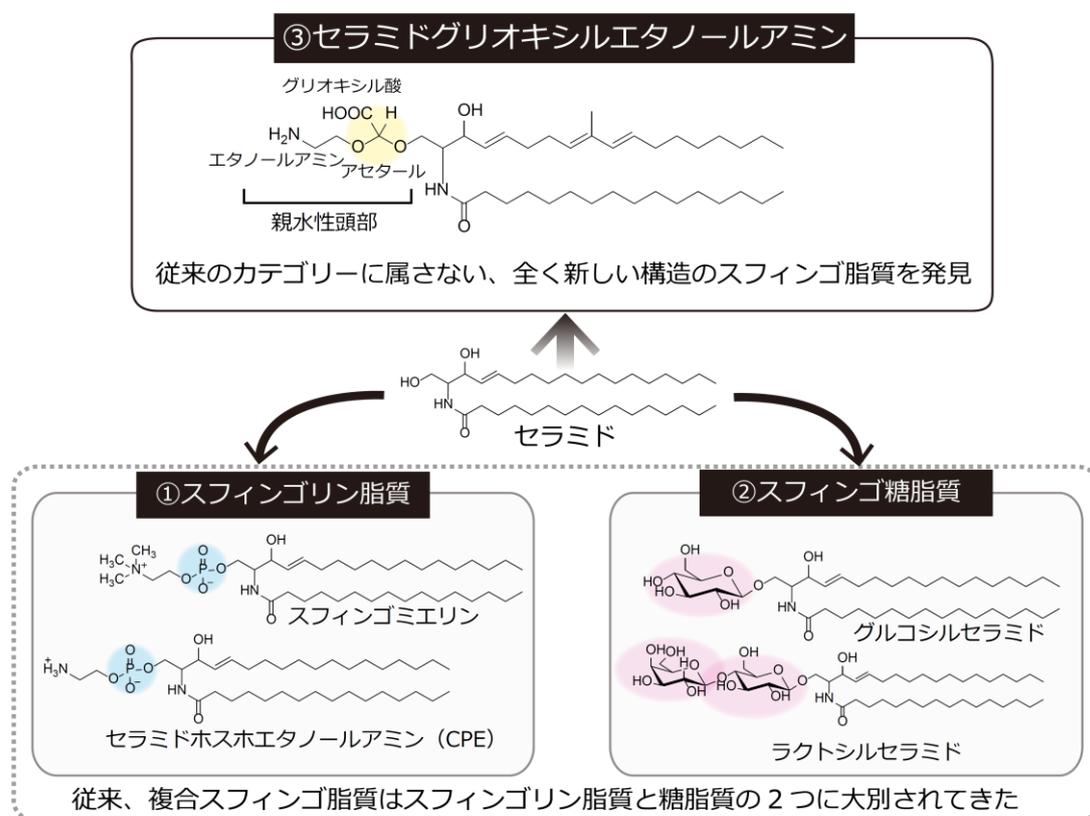


図1. 従来の複合スフィンゴ脂質とセラミドグリオキシルエタノールアミン

2. 研究の目的

本研究は、これまでに報告例のない構造をもつ CGE の代謝経路およびその責任酵素遺伝子の同定、CGE の機能解析、質量分析計を用いた高感度測定系による CGE 保有生物の探索を行い、上記の問いに対する答えを追究することを目的とした。新規酵素遺伝子や反応機構の発見、進化とスフィンゴ脂質との関係性、CGE の特殊構造が生み出す独自機能など、スフィンゴ脂質研究の新たな領域を切り拓くような知見が得られることを期待し研究を行った。

3. 研究の方法

安定同位体エタノールアミンを持ちいた代謝追跡実験：CGE はその構造からエタノールアミンを前駆体とする可能性が考えられた。そこで安定同位体標識されたエタノールアミンを用いて、CGE に至るまでの過程を追跡した。

セラミド構造と CGE 合成活性測定系の構築：CGE の合成経路を調べるために、*in vitro* の活性測定系の構築を試みた。それに先立ち、CGE 合成酵素がどのようなセラミド構造を認識できるのかを検証した。ラビリンチュラ類のセラミドは4位、8位および10位にトランス型の不飽和結合、9位にメチル基をもつユニークな構造(d18:3+Me)である。一方、活性測定に用いるセラミドは4位のみの不飽和結合をもつ d18:1 である。この構造の違いが CGE 合成活性に影響を及ぼす可能性がある。そこでラビリンチュラ類の8位に不飽和結合を導入するデサチュラーゼ遺伝子を同定し、その欠損株を作製し、d18:1 のセラミドをもつ CGE が合成されるかを検証し、セラミド構造が CGE の合成活性に及ぼす影響を検証した。

CGE 欠損株のスクリーニングとゲノム解析：CGE 欠損株は、抗生物質耐性遺伝子の発現コンストラクトをゲノム DNA にランダムに挿入させ、得られた各種変異株の CGE 量を測定することでスクリーニングした。得られた CGE 欠損株のゲノム DNA を精製し、次世代シーケンサーによりドラフトゲノムを解析した。

4. 研究成果

①CGE 合成経路の解析

安定同位体標識されたエタノールアミンを培地に添加し、その培養サンプルから脂質を抽出し、質量分析計によりエタノールアミンを前駆体として合成される脂質を解析した。この結果、ホスファチジルエタノールアミン (PE) のようなエタノールアミンを親水性頭部にもつグリセリン脂質は、エタノールアミン添加直後に標識されるのに対し、CGE は添加して数日経過しないと標識されないことを見出した。この結果より、エタノールアミンは CGE 合成には利用されるが、それは直接的な経路ではなく、未知の中間体を経由して最終的に CGE に組み込まれることが推測された。また、グリオキシル酸の合成酵素遺伝子を欠損させた変異株においても、CGE 量は低下しなかったことから、CGE の頭部構造はエタノールアミンとグリオキシル酸が単純に反応して出来る訳ではなく、当初の想定よりも複雑な経路により CGE は合成されることが支持された。現状では未知の前駆体の構造は未同定であるが、下記に示すように CGE 合成不全株の樹立に成功しており、この株において蓄積し、かつ野生株には見られないような化合物を探索することにより、前駆体の構造解明に繋げていく予定である。

②セラミド構造が CGE 合成に及ぼす影響の評価と CGE 合成酵素の活性測定系の構築

海洋微生物ラビリンチュラ類から見いだされた CGE には水酸基の数が 2 つ、不飽和結合の

数が3つ、メチル分岐が1つ存在する (d18:3+Me)。一方、in vitro 合成活性測定で用いている蛍光セラミドは水酸基が2つ、2重結合が1つの d18:1 である。このようなセラミド構造の違いに対する基質特異性が CGE 合成活性に影響を及ぼしている可能性がある。そこでセラミド構造と CGE 合成活性との相関を明らかにすることを目的とし、ラビリンチュラ類のセラミド修飾酵素遺伝子の同定と機能解析を行った。ラビリンチュラ類のセラミド構造 d18:3+Me を形成するためには、まず $\Delta 8$ デサチュラーゼの働きにより d18:1 が d18:2 に変換される必要がある。ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium limacinum* のドラフトゲノムより $\Delta 8$ デサチュラーゼ遺伝子を探査し、その候補遺伝子の欠損株を作製した。得られた株の脂質を抽出し、質量分析計を用いて CGE およびセラミドの構造を調べた結果、本来は主要な分子種である d18:3+Me が消失し、d18:1 に置き換わっていることが分かった。この結果より、セラミド構造は CGE 合成活性に影響を及ぼさないことが示されたことから、蛍光セラミドを用いた in vitro 合成活性測定系の構築を試みた。ラビリンチュラ類 *A. limacinum* の細胞から、CGE の前駆物質が含まれていることが予想される水溶性画分を抽出し、細胞破砕液と蛍光標識セラミドを混合させることで、蛍光 CGE が合成されるかを検証した。その結果、蛍光 CGE と思われる化合物が産生されることを見出した。現状では、CGE 合成の基質になる水溶性の化合物の構造は不明である。今後、CGE の合成活性を指標とし、精製を進めることで、その構造を同定することを目指す予定である。

また予想外の結果として、 $\Delta 8$ デサチュラーゼ欠損株では d18:1 を含むセラミドが大幅に増加していることが分かった。この理由は不明であるが、おそらくは本来ラビリンチュラ類がもつ d18:3+Me 含有セラミドの量を検知し、合成量を制御するシステムが存在する可能性が考えられる。 $\Delta 8$ デサチュラーゼ欠損株ではセラミドが d18:1 で止まり、以降の不飽和化が起こらず、d18:3+Me が合成されない為、d18:3+Me の合成量を増加させるシグナルが活性化するものと推測される。このフィードバック機構の過程で、セラミド合成に関わる各種酵素遺伝子の発現量が増加、または活性化すると考えられる。しかしながら、 $\Delta 8$ デサチュラーゼ欠損株においては最終産物である d18:3+Me は合成されないため、生成物阻害が起こらず、結果的には経路の途中産物である d18:1 含有セラミドのみが合成、蓄積されていくと考えられる。以上の結果は、セラミドの不飽和化がセラミド合成量を制御する未知の機構が存在することを示唆している。セラミドは真核生物に共通してみられる重要な生体膜構成脂質である。また、特に皮膚のバリア機能維持に関する機能性も知られており、産業的にも有用な脂質である。今後、セラミド構造の修飾機構がどのようにしてセラミド量を制御するのかを解明することで、微生物のセラミド産生量の増加に繋がる効果的な分子育種標的の同定に結び付くことが期待される。

③CGE 合成不全株の樹立とゲノム解析

CGE を合成できない変異株を樹立することが出来れば、その責任遺伝子を同定することで、CGE 合成遺伝子を見つけることが可能となる。これまでに変異導入剤を用いた実験を行ってきたが目的株を得ることは出来なかった。最終年度において、抗生物質耐性遺伝子がランダムにゲノムに挿入されることで、偶然にも CGE 合成に関与する可能性のある遺伝子が破壊された株を樹立することに成功した。この株を培養し、脂質を抽出し質量分析計により CGE 量を測定した結果、コントロール株で見られる CGE のピークが、変異株では消失していることが示された (図 2)。CGE 量の経時変化を検証したが、どの培養日数においても CGE は検出されなかったことから、この株は CGE 合成能を喪失したことが分かった。他のラビリンチュラ類においてはセラミドホスホエタノールアミン (CPE) と呼称されるスフィンゴリン脂質が確認されているが、*A. limacinum* は CPE を合成せず、CGE が主要なスフィンゴ脂質であることが分かっている。CGE 合成不全株が

なかなか樹立できなかったことから、CGEは*A. limacinum*の増殖、生存に不可欠な脂質である可能性も考えられたが、意外なことに実際に得られたCGE合成不全株は顕著な増殖異常を示さず、その他の表現型も今のところは観察されていない。培養条件を変えることで、CGE欠損に伴う変化がみられる可能性が考えられる。今後、CGEの機能解析を目指し、CGE合成不全株に現れる表現型の探索を続けていく予定である。

CGE合成不全株のゲノム解析を行い、どのような遺伝子が欠損しているのか検証した。その結果、機能未知遺伝子の途中に導入したコンストラクトが挿入されていることを見出した。CGEは従来のカテゴリーには属さない全く新しい構造の脂質であり、その合成酵素遺伝子は新規性の高いものと予想されたが、CGE合成不全株から見出された機能未知遺伝子は、既知のものとは全く相同性がないことが分かった。今後、この遺伝子の機能を調べるために、その欠損株や過剰発現株を樹立するとともに、セラミドを合成する生物を用いた異種発現を行い、CGE合成にどのように関与するのかを明らかにしていく予定である。

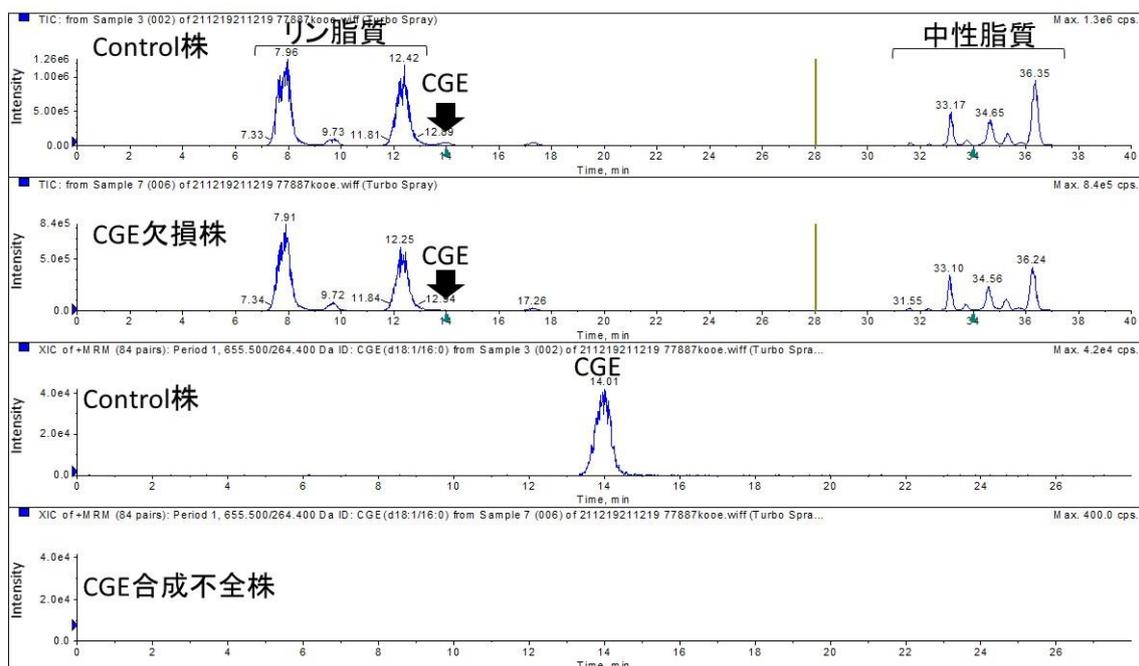


図2. CGE合成不全株の脂質解析結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ishibashi Yohei, Aoki Keisuke, Okino Nozomu, Hayashi Masahiro, Ito Makoto	4. 巻 9
2. 論文標題 A thraustochytrid-specific lipase/phospholipase with unique positional specificity contributes to microbial competition and fatty acid acquisition from the environment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16357
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-52854-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nutahara Eri, Abe Eriko, Uno Shinya, Ishibashi Yohei, Watanabe Takashi, Hayashi Masahiro, Okino Nozomu, Ito Makoto	4. 巻 14
2. 論文標題 The glycerol-3-phosphate acyltransferase PLAT2 functions in the generation of DHA-rich glycerolipids in Aurantiochytrium limacinum F26-b	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0211164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0211164	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石橋 洋平、青木 敬祐、沖野 望、林 雅弘、伊東 信
2. 発表標題 ラビリンチュラ類特有のリパーゼ/ホスホリパーゼのユニークな位置特異性は海洋微生物の種間競争と脂肪酸取り込みに関与する
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石橋 洋平、永富 正樹、富永 弦、長谷川 菜摘、宮本 智文、森本 恵、笠利 水斗、小原 淳一郎、山路 顕子、沖野 望、小林 俊秀、伊東 信
2. 発表標題 海洋原生生物におけるスフィンゴ脂質の構造、代謝および局在解析
3. 学会等名 第12回セラミド研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yohei Ishibashi, Keisuke Aoki, Nozomu Okino, Masahiro Hayashi, Makoto Ito
2. 発表標題 A novel thraustochytrid lipase/phospholipase with unique positional specificity contributes to microbial competition and fatty acid acquisition from the environment
3. 学会等名 First International Conference on Labyrinthine Protists
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minato Kasari, Natsumi Hasegawa, Yohei Ishibashi, Tomofumi Miyamoto, Masahiro Hayashi, Daisuke Honda, Nozomu Okino, Makoto Ito
2. 発表標題 Distribution of a novel sphingolipid, ceramide glyoxylic ethanolamine (CGE), in thraustochytrids
3. 学会等名 First International Conference on Labyrinthine Protists (ICoLP)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川 菜摘、石橋 洋平、宮本 智文、林 雅弘、沖野 望、伊東 信
2. 発表標題 新奇複合スフィンゴ脂質セラミドグリオキシルエタノールアミンの発見
3. 学会等名 第11回セラミド研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川 菜摘、石橋 洋平、宮本 智文、林 雅弘、沖野 望、伊東 信
2. 発表標題 海洋微生物ラビリンチュラが合成する新奇複合スフィンゴ脂質
3. 学会等名 平成30年度 日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川 菜摘、石橋 洋平、宮本 智文、林 雅弘、沖野 望、伊東 信
2. 発表標題 糖脂質にもリン脂質にも属さない新奇複合スフィンゴ脂質の発見
3. 学会等名 第60回脂質生化学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関