

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370057

研究課題名(和文) 極長鎖脂肪酸産生の分子メカニズムと病態，生理機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the synthetic mechanism, disorders, and physiological functions of very long-chain fatty acids

研究代表者

木原 章雄 (Kihara, Akio)

北海道大学・薬学研究科(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) 15,300,000円、(間接経費) 4,590,000円

研究成果の概要(和文)：炭素数20を超える脂肪酸である極長鎖脂肪酸の細胞内量は長鎖脂肪酸(C11-C20)よりも少ないものの、長鎖脂肪酸では代替できない特長な生理機能を有し、様々な疾患と関連する。本研究課題において我々はノックアウトマウスや培養細胞を用いた生理学的・細胞生物学的な解析、精製した極長鎖脂肪酸合成酵素を用いた生化学的な解析、酵母を用いた遺伝学的な解析により、極長鎖脂肪酸の皮膚バリアにおける役割、病態との関連(副腎白質ジストロフィー、ミオパチー、精神遅滞)、セラミド合成酵素による調節機構、エンドソームを介した小胞輸送での働きを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Although cellular level of very long-chain fatty acids (VLCFAs), which have carbon chain-length greater than 20 (>C20), is less abundant than that of long-chain fatty acids (LCFAs; C11-C20), VLCFAs possess important functions that cannot be substituted for by LCFAs and related to some disorders. In this research project, we revealed the functions of VLCFAs in skin barrier formation, relationship between metabolism of VLCFAs and several disorders such as adrenoleucodystrophy, myopathy, and mental retardation, regulatory mechanism of the VLCFA synthetic enzymes by the ceramide synthases, and the roles of VLCFAs in the vesicular transport via endosomes, by physiological and cell biological analyses using knockout mice and cultured cells, by biochemical assays using purified VLCFA synthetic enzymes, and by yeast genetic approach.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：脂質 代謝 脂肪酸 生体膜 極長鎖脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

極長鎖脂肪酸は1サイクル4つのステップ(縮合,還元,脱水,還元)からなる脂肪酸伸長サイクルによって2炭素ずつ伸長する。最初の縮合段階が極長鎖脂肪酸伸長の律速段階であり、ヒトには7種の縮合酵素(エロンガーゼ;ELOVL1-7)が存在する。2番目と4段階目の反応を触媒する酵素はそれぞれ3-ヒドロキシアシル CoA還元酵素とトランス-2-エノイル CoA還元酵素であり、ヒトには1種類ずつ(KARとTER)存在する。3番目の反応を触媒する酵素は3-ヒドロキシアシル CoA脱水素酵素(HACD1-4)であり、この酵素は2008年に我々が同定したものである。これまで、極長鎖脂肪酸関連疾患としては極長鎖脂肪酸の分解異常に起因する副腎白質ジストロフィー(極長鎖脂肪酸を分解の場であるペルオキシソームに輸送するためのトランスポーターABCD1の変異)とエロンガーゼELOVL4変異による若年性黄斑変成疾患(3型シュタルガルト病)のみが知られていた。また、これら極長鎖脂肪酸関連遺伝子のノックアウトマウスについてはElovl3, Elovl4, Elovl6遺伝子に報告があるが、他の大多数の極長鎖脂肪酸関連遺伝子については報告がなかった。このような解析の遅れから、極長鎖脂肪酸の生理機能、病態の関わりについては不明なことが多く残されていた。

極長鎖脂肪酸伸長因子は小胞体に局在する膜タンパク質である。膜タンパク質の精製にはTriton X-100のような非イオン性界面活性剤による可溶化が必要だが、可溶化状態では活性を示さないものも多く、*in vitro*のアッセイには技術的な困難さが伴う。そのため、これまでに精製した極長鎖脂肪酸伸長因子を用いた生化学的な解析は全く行われておらず、生化学的な性質、活性調節機構には不明な点が多く残されていた。

疾患との関連やノックアウトマウスの解析から、極長鎖脂肪酸の組織・器官レベルでの役割は徐々に明らかにされつつある。しかし、極長鎖脂肪酸の分子レベルでの役割は殆ど分かっていなかった。酵母は最も単純な真核生物であるが、極長鎖脂肪酸関連因子はヒトとの間で高度に保存されている。酵母は変異株やマルチコピーサプレッサーの単離等、遺伝学的な解析が可能である。このような解析は極長鎖脂肪酸の分子レベルでの機能解析に有用であるが、これまで行われたことはなかった。

2. 研究の目的

極長鎖脂肪酸の新たな生理機能、病態との関わり、生化学的な特徴付け、制御機構、分子レベルでの機能解析を行うために下記の4つの項目の解析を行った。

(1) 皮膚バリア形成における極長鎖脂肪

酸の役割と制御機構の解明

- (2) 極長鎖脂肪酸代謝異常と病態の解析
- (3) 極長鎖脂肪酸伸長因子の生化学的解析
- (4) 酵母を用いた極長鎖脂肪酸の遺伝学的解析

3. 研究の方法

(1) ノックアウトマウスの作成
マウスES細胞(AB2.2)のElovl1遺伝子領域を含むBACクローンを入手し、1つのloxP配列をElovl1遺伝子のイントロン1に、もう1つのloxP配列及びNeo遺伝子をイントロン8に組み込んだターゲティングベクターを作成した。線状化したこのターゲティングベクターをE14 ES細胞に導入し、相同組み替えを起こした細胞を単離した。得られたES細胞をC57BL/6Jマウスの胚盤胞にインジェクトし、キメラマウスを作成した。キメラマウスをC57BL/6Jマウスを交配させて生じたElovl1^{+/flox}マウスをさらにCAG-Creトランスジェニックマウスと交配させることでElovl1^{+/+}マウスを得た。Elovl1^{+/+}マウス同士を交配させてElovl1ノックアウトマウス(Elovl1^{-/-})を得た。

(2) 脂質分子の質量分析による定量
Elovl1ノックアウトマウスの表皮から脂質を抽出し、AB Sciex社の4000 QTRAP tandem MS systemを用いた液体クロマトグラフィー質量分析法により、セラミド及びスフィンゴミエリンの定量を行った。セラミドはプリカーサーイオンスクリーン法によりm/z = 264.4, スフィンゴミエリンは同様にm/z = 184.1の質量を持つ分子の測定により行った。

(3) 極長鎖脂肪酸伸長アッセイ
極長鎖脂肪酸伸長アッセイは膜画分に基質となるアシル CoAと[¹⁴C]マロニル CoAを加え、37°Cでインキュベートすることにより行った。反応後、脂質を抽出、アルカリによる加水分解、中和、抽出、乾燥を行い、順相TLCにより展開した。バンドはX線フィルムによるオートラジオグラフィーまたはイメージングアナライザーBAS2500により検出・定量を行った。精製タンパク質を用いたアッセイでは、細胞膜画分をTriton X-100で可溶化後、抗FLAG抗体結合ビーズを用いてFLAG融合タンパク質をアフィニティー精製し、リン脂質存在下でパイオビーズSM2によってTriton X-100を除去することにより、プロテオリポソームに再構成した。

(4) 酵母における極長鎖関連因子の遺伝学的スクリーニング
酵母極長鎖脂肪酸低下株(MRY9; P_{tet07}-PHS1 sur4Δ)に酵母ゲノミックライブラリーを導入し、約30,000のトランスフォ

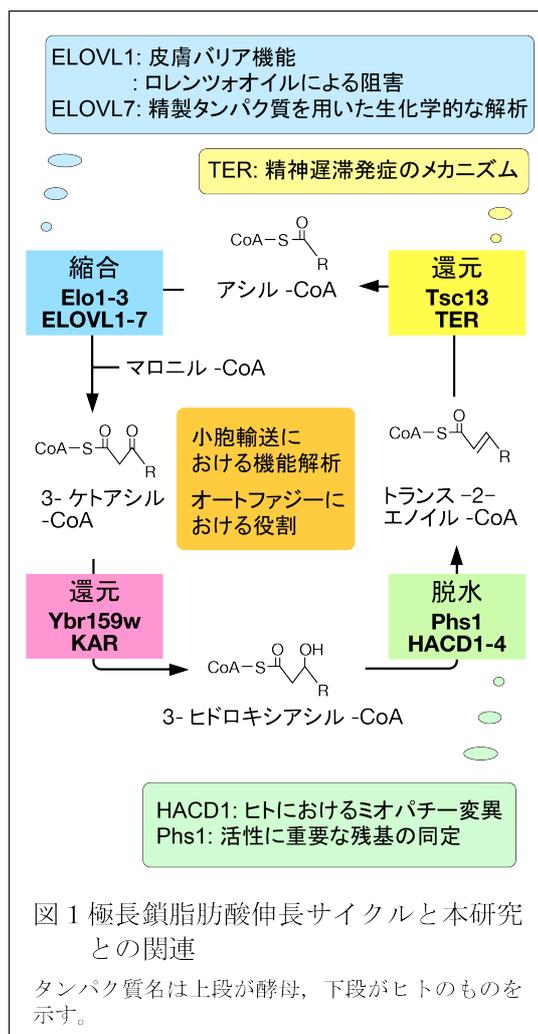
ーメントを得た。これらを希釈してプレートに撒き、39°C、4日間インキュベートした。得られた酵母からプラスミドを調製し、再度MRY9に導入することによりサプレッサー能を確認した。プラスミドにコードされた遺伝子はシーケンシングにより同定した。

4. 研究成果

(1) 皮膚バリア形成における極長鎖脂肪酸の役割と制御機構の解明

皮膚角質層の細胞間脂質（脂質ラメラ）はバリアを形成し、外界からの化学物質や病原菌の侵入及び、体内からの水分の損失を防ぐ役割を持つ。脂質ラメラの中で量・質共に最も重要な働きを示すのが、スフィンゴ脂質骨格のセラミドである。セラミドは他の組織では通常C24までだが、表皮のセラミドは特徴的に長く、最大C38に及ぶ。また、その長い脂肪酸の先端（ ω 位）にリノール酸が付加したアシルセラミドも表皮特異的に存在し、バリア機能に必須の役割を果たしている。我々は以前、エロンガーゼ ELOVL1 が飽和あるいは1価不飽和のC18からC26までのアシルCoAに活性を示すことを報告した。本申請では *Elov11* ノックアウトマウスを作成し、*in vivo*における *Elov11* および *Elov11* の産生する極長鎖脂肪酸の生理機能の解明を行った。作成した *Elov11* ノックアウトマウスは皮膚におけるバリア機能の低下が原因で、生後1日目に死亡した。このマウスの表皮角質層においては脂質ラメラが低形成であった。また、質量分析器で表皮の脂質組成を調べたところ、C26以上のセラミドの量が著しく低下していた。これらの結果から *Elov11* が皮膚バリア形成において必須な極長鎖脂肪酸含有セラミド産生に働くことが明らかとなった（図1）。また、我々は *Elov11* がセラミド合成酵素（*CerS*）のアイソザイムの違いにより異なった制御を受け、伸長するアシルCoAの長さが規定されていることも見いだした。

(2) 極長鎖脂肪酸代謝異常と病態の解析
極長鎖脂肪酸の分解はペルオキシソームで行われるが、ペルオキシソームに極長鎖脂肪酸を輸送するトランスポーター（*ABCD1*）遺伝子変異は副腎白質ジストロフィーを引き起こす。この疾患の患者ではC24およびC26飽和極長鎖脂肪酸が脳のミエリンと副腎に蓄積して機能障害を引き起こす。この疾患に有効な治療薬は存在しないが、ロレンツォオイルと呼ばれるオレイン酸とエルカ酸のトリグリセリド混合物に効果があるという報告がある。我々はC24/C26飽和極長鎖脂肪酸の産生に ELOVL1 が中心的な役割を果たすことを見いだしたことから、ロレンツォオイルのターゲットが ELOVL1 である可能性が高いと考え、解析を行った。その結果、ロレンツォオイルは実際混合阻害様式により ELOVL1 を阻害し、C24/C26飽和極長鎖



脂肪酸含有スフィンゴ脂質量を低下させることが明らかとなった（図1）。

極長鎖脂肪酸伸長サイクルの3段階目を触媒する3-ヒドロキシアシルCoA脱水酵素（HACD1-4）のうち、*HACD1*はこれまでイヌにおけるミオパチーの原因遺伝子であることが知られていたが、我々はヒトにおいてもこの遺伝子変異がミオパチーを引き起こすことを明らかにした（図1）。この変異は *Tyr248* をストップコドンに変異させるナンセンス変異であった。

極長鎖脂肪酸伸長サイクルの4段階目を触媒するトランス-2-エノイルCoA還元酵素（TER）の *P182L* 置換を生じさせる変異は精神遅滞を発症させることが知られていた。我々は精神遅滞発症の分子メカニズムを明らかにするためにこの変異タンパク質の生化学的解析を行った。その結果、この変異タンパク質では酵素活性と安定性の低下が見られ、患者由来のリンパ芽球細胞ではC24スフィンゴ脂質量が低下していた。C24スフィンゴ脂質は脳ミエリンの機能に重要であることから、C24スフィンゴ脂質の低下が精神遅滞発症と関連していることが示唆された（図1）。

(3) 極長鎖脂肪酸伸長因子の生化学的解析

極長鎖脂肪酸伸長サイクルの1段階目を触媒するエロンガーゼ ELOVL7 を精製し、酵素学的な解析を行った。ELOVL7 は複数回膜貫通タンパク質であり、精製には Triton X-100 のような非イオン性界面活性剤による可溶化が必要だが、可溶化状態では活性を示さない。そこで我々は精製後にプロテオリポソームに再構成することにより酵素活性を測定した。ELOVL7 は試した 11 種のアシル CoA の中でも C18:3 (n-3) に最も高い基質特異性を示し、我々はその V_{max} , K_m 値も決定して、生化学的な特徴を明らかにした。

ヒト Hacd の酵母ホモログである Phs1 の保存された 7 個のアミノ酸を置換した変異タンパク質の生化学的解析を行った。これらの解析から Glu60, Gln79, Arg141 が構造維持に重要であること、Arg83 と Gly152 が触媒機能に重要であることが明らかとなった (図 1)。

(4) 酵母を用いた極長鎖脂肪酸の遺伝学的解析

極長鎖脂肪酸の細胞中での分子レベルでの役割を明らかにするために、極長鎖脂肪酸合成が低下して高温での生育に感受性を示す酵母変異株のマルチコピーサプレッサーの単離を行った。その結果、Rab GTPase をコードする *VPS21* 遺伝子を同定した。Vps21 はエンドソームを介した小胞輸送に働き、*VPS21* 遺伝子と極長鎖脂肪酸伸長因子の変異との二重欠損株の解析から、極長鎖脂肪酸もエンドソームを介した小胞輸送において重要な働きがあることが明らかとなった (図 1)。

酵母において極長鎖脂肪酸は殆ど全てスフィンゴ脂質の合成に用いられる。我々はスフィンゴ脂質のうちイノシトールホスホリルセラミドの産生が飢餓時に誘導されるオートファジーの進行に必要なことを明らかにした。また、マンノシルイノシトールホスホリルセラミドが産生できない酵母は窒素飢餓時において、急速に死滅することも見いだした。これらのことから正常なスフィンゴ脂質合成が飢餓時における細胞応答に重要であることが明らかとなった (図 1)。

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 15 件)

1. Sassa T, Wakashima T, Ohno Y, Kihara A. (2014) Lorenzo's oil inhibits ELOVL1 and lowers the level of sphingomyelin with a saturated very long-chain fatty acid. *J. Lipid Res.*, 55: 524-530, 査読有, DOI 10.1194/jlr.M044586

2. Sassa T, Kihara A. (2014) Metabolism of very long-chain fatty acids: genes and pathophysiology. *Biomol. Ther.*, 22: 83-92, 査読有, DOI 10.4062/biomolther.2014.017

3. Sassa T, Ohno Y, Suzuki S, Nomura T, Nishioka C, Kashiwagi T, Hirayama T, Akiyama M, Taguchi R, Shimizu H, Itohara S, Kihara A. (2013) Impaired epidermal permeability barrier in mice lacking the *Elovl1* gene responsible for very long-chain fatty acid production. *Mol. Cell. Biol.*, 33: 2787-2796, 査読有, DOI 10.1128/MCB.00192-13

4. Yamagata M, Obara K, Kihara A. (2013) Unperverted synthesis of complex sphingolipids is essential for cell survival under nitrogen starvation. *Genes Cells*, 18: 650-659, 査読有, DOI 10.1111/gtc.12062

5. Abe K, Ohno Y, Sassa T, Taguchi R, Çalışkan, M, Ober C, Kihara A. (2013) Mutation for nonsyndromic 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. *J. Biol. Chem.*, 288: 36741-36749, 査読有, DOI 10.1074/jbc.M113.493221

6. Muhammad E, Reish O, Ohno Y, Scheetz T, Deluca A, Searby C, Regev M, Benyamini L, Fellig Y, Kihara A, Sheffield VC, Parvari R. (2013) Congenital myopathy is caused by mutation of *HACD1*. *Hum. Mol. Genet.*, 22: 5229-5236, 査読有, DOI 10.1093/hmg/ddt380

7. Mizutani Y, Sun H, Ohno Y, Sassa T, Wakashima T, Obara M, Yuyama K, Kihara A, Igarashi Y. (2013) Cooperative synthesis of ultra long-chain fatty acid and ceramide during keratinocyte differentiation. *PLoS One*, 8: e67317, 査読有, DOI 10.1371/journal.pone.0067317

8. Obara K, Kojima R, Kihara A. (2013) Effects on vesicular transport pathways at the late endosome in cells with limited very long-chain fatty acids. *J. Lipid Res.*, 54: 831-842, 査読有, DOI 10.1194/jlr.M034678

9. Yazawa T, Naganuma T, Yamagata M, Kihara A. (2013) Identification of residues important for the catalysis, structure maintenance, and substrate specificity of yeast 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase Phs1. *FEBS Lett.*, 587: 804-809, 査読有, DOI 10.1016/j.febslet.2013.02.006

10. Sassa T, Suto S, Okayasu Y, Kihara A. (2012) A shift in sphingolipid composition from C24 to C16 increases susceptibility to apoptosis in HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1821: 1031-1037, 査読有, DOI 10.1016/j.bbalip.2012.04.008

11. Tanigawa M, Kihara A, Terashima M, Takahara T, Maeda T. (2012) Sphingolipids regulate the yeast high osmolarity-responsive

HOG pathway. *Mol. Cell. Biol.*, 32: 2861-2870, 査読有, DOI 10.1128/MCB.06111-11

12. Kihara A. (2012) Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *J. Biochem.*, 152: 387-395, 査読有, DOI 10.1093/jb/mvs105
13. Yamagata M, Obara K, Kihara A. (2011) Sphingolipid synthesis is involved in autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 410: 786-791, 査読有, DOI 10.1016/j.bbrc.2011.06.061
14. Naganuma T, Sato Y, Sassa T, Ohno Y, Kihara A. (2011) Biochemical characterization of the very long-chain fatty acid elongase ELOVL7. *FEBS Lett.*, 585: 3337-3341, 査読有, DOI 10.1016/j.febslet.2011.09.024
15. Yamagata M, Obara K, Kihara A. (2011) Involvement of sphingolipids in autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem. Phys. Lipids*, 164: S34-35, 査読無, DOI 10.1016/j.chemphyslip.2011.05.110

[学会発表] (計 23 件)

1. Kihara, A. The fatty acid elongase ELOVL1 and the P450 family member CYP4F22 are involved in the production of epidermal acylceramide. Gordon Research Conference (Glycolipid & Sphingolipid Biology), Ventura, USA, 2014. 1. 16.
2. 木原章雄. 皮膚アシルセラミド産生における脂肪酸伸長酵素と水酸化酵素の解析. 第 6 回セラミド研究会学術集会, 札幌, 2013. 11. 7.
3. 木原章雄. 極長鎖脂肪酸の生理機能の解明. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡, 2012. 12. 14.
4. 木原章雄. 極長鎖脂肪酸の皮膚バリア, 小胞輸送における役割. 第 54 回日本脂質生化学会, 福岡, 2012. 6. 8.

[図書] (計 1 件)

1. 大野祐介, 木原章雄 (2011) 「極長鎖脂肪酸伸長とセラミド合成」ここまでのセラミド研究最前線 セラミドー基礎と応用一. 食品化学新聞社, p 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

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・講師
研究者番号：20342793

小原 圭介 (OBARA Keisuke)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：30419858

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