

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590073

研究課題名(和文) 極長鎖脂肪酸伸長因子ELOVL1の機能と病態への関与

研究課題名(英文) Fatty acid elongase ELOVL1: function and diseases

## 研究代表者

佐々 貴之 (Sassa, Takayuki)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：20342793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：極長鎖脂肪酸伸長因子ELOVL1によって合成される飽和・一価不飽和の極長鎖脂肪酸合成の機能および病態への関与を解明するため、Elov11ノックアウトマウスを作製した。Elov11ノックアウトマウスは皮膚バリア不全により生後致死となることを明らかにした。Elov11ノックアウトマウスの表皮では皮膚バリア形成に重要なアシルセラミドの量が大きく低下しており、Elov11がアシルセラミド合成に關与する重要な酵素の一つであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the function of saturated and monounsaturated very long-chain fatty acids, we made mice lacking Elov11, the gene responsible for very long-chain-fatty acid production. Elov11 knockout mice exhibited impaired epidermal permeability barrier and died neonatally. In the epidermis of Elov11 knockout mice, the level of acylceramides, the lipids important for epidermal permeability barrier, was severely reduced, demonstrating that Elov11 is one of the enzyme essential for the synthesis of acylceramides.

研究分野：脂質生化学

キーワード：極長鎖脂肪酸 スフィンゴ脂質 皮膚バリア

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 極長鎖脂肪酸は、生体に微量(総脂質の数%)存在する炭素数 21 (C21) 以上の脂肪酸であり、小胞体において長鎖脂肪酸からの伸長により合成される。哺乳類には伸長反応の律速段階を触媒する酵素として

ELOVL1~7 のアイソザイムが存在する。研究代表者らは、各 ELOVL アイソザイムの基質特異性や酵素学的性質を明らかにした。このうち、ELOVL1 はスフィンゴ脂質に特徴的な C24 を含む C24-C26 の飽和・一価不飽和極長鎖脂肪酸の合成に関与する。研究代表者らは、C24 スフィンゴ脂質が脂質マイクロドメインを介したシグナル伝達やアポトーシスに関与することを報告した。このように、ELOVL1 により合成される C24-C26 極長鎖脂肪酸の機能が明らかにされつつあるが、生体における機能を解明するには *Elovl1* ノックアウトマウスの作製が不可欠であった。

(2) ELOVL1 により合成される C24-C26 極長鎖脂肪酸はペルオキシソームで分解される。その輸送に関与するトランスポーター *ABCD1* の変異により C24-C26 飽和極長鎖脂肪酸が蓄積すると副腎白質ジストロフィー(ALD)を引き起こす。Lorenzo's oil と呼ばれるエルカ酸(C22:1)とオレイン酸(C18:1)の1:4混合物がALD患者の血清中飽和極長鎖脂肪酸量を正常化できることが報告されている。これらの一価不飽和脂肪酸はELOVL1の基質(飽和・一価不飽和アシル CoA)と類似しており、ELOVL1の活性を制御していると予測し、研究代表者らが開発した *in vitro* 活性測定系により直接的に測定・検証した。

## 2. 研究の目的

本研究は極長鎖脂肪酸の機能と病態への関与を明らかにすることを目的とした。具体的には以下の2点を目的として研究を行った。

(1) *Elovl1* ノックアウトマウスの作製・解析による極長鎖脂肪酸の生体機能解明

(2) 極長鎖脂肪酸の代謝疾患である X-ALD において、作用機序が不明である Lorenzo's oil が ELOVL1 の活性を調節するかどうかを検証

## 3. 研究の方法

(1) ES 細胞を用いた相同組換え法により *Elovl1* ノックアウトマウスを作製した。解析方法として、経皮水分蒸散量の測定、トルイジンブルーアッセイ、光学顕微鏡および電子顕微鏡による組織学的解析、質量分析器による脂質分析等を用いてマウスの解析を行った。

(2) ELOVL1 を過剰発現させた哺乳類培養細胞の膜画分に基質として C22:0-CoA および [<sup>14</sup>C]malonyl-CoA を添加してインキュベート後、脂質抽出、TLC プレートによる反応物の分離・定量を行った。

## 4. 研究成果

### ***Elovl1* ノックアウトマウスは皮膚バリア不全を示し、生後致死となる**

*Elovl1* ノックアウトマウスは出生直後から体重減少を示し、出生後 1 2 時間程度で死亡した。*Elovl1* ノックアウトマウスでは経皮水分蒸散量が大きく亢進しており、体重減少は体表からの水分喪失によるものであった。また、水溶性色素(トルイジンブルー)は容易に *Elovl1* ノックアウトマウスの体表面から皮膚深部へ浸透した。これらの結果、*Elovl1* ノックアウトマウスは皮膚バリア不全を示すことが明らかになった。

電子顕微鏡解析により、*Elovl1* ノックアウトマウスの表皮では顆粒層のラメラ体が減少し、角層細胞間脂質がほぼ消失していることが明らかになった。表皮の脂質を質量分析等により解析した結果、*Elovl1* ノックアウトマウスの表皮では、皮膚バリアに必須なアシルセラミド量が大きく低下していることが明らかになった。これらの結果から、*Elovl1* はアシルセラミドの構成成分である炭素数 30 以上の極長鎖脂肪酸合成に必須の酵素であることが明らかになった。

*Elovl1* はほとんどの組織において炭素数 24 まで脂肪酸伸長を触媒するが、*Elovl1* ノックアウトマウスの解析から、表皮においては炭素数 26 まで伸長していた。*Elovl1* による脂肪酸伸長はセラミド合成酵素 CERS の制御を受けており、表皮特異的に発現している CERS3 存在下では *Elovl1* が炭素数 26 まで脂肪酸を伸長させることを明らかにした。

### **Lorenzo's oil は ELOVL1 を阻害し、飽和極長鎖脂肪酸の蓄積を抑制する**

ELOVL1 を過剰発現させた細胞の膜画分に Lorenzo's oil の構成脂肪酸であるオレイン酸(C18:1)あるいはエルカ酸(C22:1)を添加し ELOVL1 の飽和脂肪酸伸長活性への影響を調べたところ、これらの一価不飽和脂肪酸は濃度依存的に ELOVL1 を有意に阻害、あるいは阻害傾向を示すことが明らかになった。さらに、オレイン酸とエルカ酸を混合して添加すると阻害効果が増強し、特に Lorenzo's oil と同じ混合割合であるオレイン酸:エルカ酸=4:1 の場合に最も高い阻害効果を示した。

オレイン酸とエルカ酸混合物の ELOVL1 阻害様式は競合阻害では無かった。また、これらの一価不飽和脂肪酸は細胞内で CoA 体に変換され ELOVL1 の基質となり得ることから、Lorenzo's oil の ELOVL1 阻害作用として、オレイン酸およびエルカ酸による直接の阻害とこれらの CoA 体による競合阻害という2つの機構が働いている可能性を提唱した。

## 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6件)

1. Sassa T and Kihara A. (2014) Metabolism of very long-chain fatty acids: genes and pathophysiology. *Biomol. Ther.*, 22, 83-92, DOI: 10.4062/biomolther.2014.017, 査読有
2. Sassa T, Wakashima T, Ohno Y and 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, DOI: 10.1194/jlr.M044586, 査読有.
3. Abe S, Ohno Y, Sassa T, Taguchi R, Çalışkan M, Ober C and 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, DOI: 10.1074/jbc.M113.493221, 査読有.
4. Mizutani Y, Sun, H Ohno Y, Sassa T, Wakashima T, Obara M, Yuyama K, Kihara A and Igarashi Y. (2013) Cooperative synthesis of ultra long-chain fatty acid and ceramide during keratinocyte differentiation. *PLoS One* 8, e67317, DOI: 10.1371/journal.pone.0067317, 査読有.
5. Sassa T, Ohno Y, Suzuki S, Nomura T, Nishioka C, Kashiwagi T, Hirayama T, Akiyama M, Taguchi R, Shimizu H, Itohara S and Kihara A. (2013) Impaired epidermal permeability barrier in mice lacking *Elovl1*, the gene responsible for very-long-chain fatty acid production. *Mol. Cell. Biol.*, 33, 2787-2796, DOI: 10.1128/MCB.00192-13, 査読有.
6. Sassa T, Suto S, Okayasu Y and 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, DOI: 10.1016/j.bbali.2012.04.008, 査読有.

〔学会発表〕(計18件)

1. 佐々貴之 C24 極長鎖脂肪酸の生理機能と病態への関与 (招待講演), 第7回セラミド研究会学術集会, 東京ユビキタス協創広場 CANVAS, 東京, 2014.10.31.
2. Sassa T, Ohno Y, Suzuki S, Nomura T, Akiyama M, Taguchi R, Shimizu H,

Itohara S and Kihara A. Fatty acid elongase *Elovl1* is essential for the synthesis of  $\geq$ C26 ceramides and epidermal permeability barrier formation. Gordon Research Conference (Glycolipid & Sphingolipid Biology), Ventura, USA, 2014. 1. 14.

3. 佐々貴之, 大野祐介, 鈴木翔多朗, 乃村俊史, 秋山真志, 田口良, 清水宏, 糸原重美, 木原章雄. 極長鎖脂肪酸伸長酵素 *Elovl1* は表皮において層特異的な制御を受け皮膚バリアに必須の役割を果たす. 第86回日本生化学会大会, パシフィコ横浜, 横浜, 2013. 9. 13.
4. Sassa T, Ohno Y, Suzuki S, Nomura T, Akiyama M, Taguchi R, Shimizu H, Itohara S, Kihara A. Mice lacking the *Elovl1* gene responsible for very long-chain fatty acid production exhibit neonatal lethality due to impaired epidermal permeability barrier. FASEB Summer Research conferences (Lysophospholipid and Other Related Mediators - From Bench to Clinic), Niseko, 2013. 8. 7-8.
5. Sassa T and Kihara A. Functional characterization of very long-chain sphingolipids produced by *ELOVL1*. Gordon Research Conference (Glycolipid & Sphingolipid Biology), Lucca, Italy, 2012. 4. 23.
6. 佐々貴之, 須藤将太, 岡安佑里子, 木原章雄. C24 スフィンゴ脂質と C16 スフィンゴ脂質は HeLa 細胞におけるアポトーシスへ異なる影響を及ぼす. 日本薬学会第132年会, 北海道大学札幌キャンパス, 札幌, 2012. 3. 29.
7. 佐々貴之, 須藤将太, 岡安佑里子, 木原章雄. シスプラチン誘導性アポトーシスにおけるセラミドの脂肪酸鎖長の役割. 第84回日本生化学会大会, 国立京都国際会館, 京都, 2011.9.22.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/seika/index.html>

本研究成果は Global Medical Discovery の Key Scientific Article に取り上げられた。

<https://globalmedicaldiscovery.com/key-scientific-articles/impaired-epidermal-permeability-barrier-mice-lacking-elo11-gene-possible-long-chain-fatty-acidproduction/>

本研究成果は ASBMB Today のブログで紹介された。

<http://wildtypes.asbmb.org/2014/02/07/figuring-out-the-target-for-lorenzos-oil/>

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

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

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし