

学位論文題名

極長鎖脂肪酸の合成経路および生理機能の解明

学位論文内容の要旨

蛋白質, 糖質, 核酸とならび, 脂質は生体を構成する成分の1つであり, 生命の維持に必須の物質である。脂肪酸は炭化水素鎖とカルボキシル基から成る単純な構造の分子であるが, 生体内の様々な脂質分子の構成成分であり, 脂質の多様性に大きく寄与している。脂質の多様性は, 極性基の種類, 脂肪酸の炭素数, 不飽和度の違いにより生み出されている。細胞内脂肪酸のうち炭素数 16 (C16) または C18 の長鎖脂肪酸がその大半を占めており, 細胞膜成分であるグリセリン脂質やエネルギー貯蔵物質であるトリグリセリド, コレステロールエステルなどにその多くが用いられている。C20 以上の脂肪酸である極長鎖脂肪酸は, 生体内の脂肪酸の中でも非常に微量であるが, C16, C18 の長鎖脂肪酸には見られない様々な生理機能に関与することが知られている。例えば, 飽和及び一価不飽和の極長鎖脂肪酸は細胞膜の主要構成脂質であるスフィンゴ脂質に多く見られ, C24 の極長鎖脂肪酸を持つスフィンゴ脂質は神経機能, 肝臓の病態に関与し, C32 の極長鎖脂肪酸を持つスフィンゴ脂質は皮膚のバリア機能に必須である。また, アラキドン酸 (C20:4), EPA (C20:5), DHA (C22:6) などの多価不飽和脂肪酸は, エイコサノイドやレゾルビン, プロテクチンに変換されることにより, 炎症やアレルギーに関与している。長鎖脂肪酸はトリグリセリドといった貯蔵脂質やリン脂質の主要構成成分で, これらの合成機構や代謝異常による肥満や動脈硬化, 高脂血症, 糖尿病, 心不全などのメタボリックシンドロームや生活習慣病に関する研究がこれまで活発に行われてきている。しかし一方で, 極長鎖脂肪酸は長鎖脂肪酸とは異なる生理機能に関与していることが知られているが, その詳細な合成機構や作用機序は未だ明らかになっていない。

極長鎖脂肪酸は, 小胞体における4種類の酵素によって縮合, 還元, 脱水, 還元の四段階の反応を受け, 1 サイクルごとに2炭素伸長することで合成される。ELOVLはその第一段階(律速段階)である縮合反応を触媒する酵素で, 哺乳類において7種類 (ELOVL1~7) のアイソフォームが報告されており, 各 ELOVL がそれぞれ異なる炭素数および不飽和度のアシル CoA を基質とすることが報告されている。しかし, これまでの ELOVL の解析は, 7種のうちの特定の ELOVL を用いた解析しかされておらず, 用いられたアシル CoA または脂肪酸も一部の限られたものであった。また, 報告ごとに解析手法は様々で, 生化学的解析はほとんどなされていなかった。そこで本研究では, 7種すべての ELOVL, 11種類のアシル CoA を用いた包括的, 生化学的解析を行うことで, 詳細な極長鎖脂肪酸伸長経路の解明を試みた。

ELOVL の基質特異性を解析するため, 各 ELOVL を一過的に発現させた HEK 293T 細胞の総膜画分, [^{14}C]マロニル CoA, 11 種のアシル CoA (C16:0-, C18:0-, C18:1(n-9)-, C18:2(n-6)-, C18:3(n-3)-, C18:3(n-6)-, C20:0-, C20:4(n-6)-, C22:0-, C24:0-, C26:0-CoA) を用いて, *in vitro* 伸長活性測定を行なった。その結果, ELOVL1 は C18:0 から C26:0 のアシル CoA に伸長活性を示し, C22:0-CoA に最も高い活性を示したが, 不飽和のアシル CoA には伸長活性を示さなかった。ELOVL2, 5 は多価不飽和のアシル CoA に伸長活性を示し, それぞれ C20:4(n-6)-CoA, C18:3(n-6)-CoA に最も高い活性を示した。ELOVL3, 7 は基質特異性が似ており, 二重結合の有無にかかわらず, C18 を中心としたアシル CoA に対して伸長活性を示したが, ELOVL3 は C18:0-CoA に, ELOVL7 は C18:3(n-3)-CoA に対して最も高い活性を示した。また, ELOVL3

はC16:0~C22:0-CoAに、ELOVL7はC16:0、C20:0-CoAに対しても活性を示した。ELOVL4はC24:0、C26:0-CoAに伸長活性を示した。ELOVL6はこれまでの報告と同様にC16:0-CoAに対して特異的に高い伸長活性を持っていた。また、各ELOVLはそれぞれ特徴的な発現様式をもつことが知られていたが、その詳細についても不明であったため、各ELOVL mRNAの組織発現様式を解析した。16種のヒト組織由来cDNAを用いてPCRを行なったところ、ELOVL1, 5, 6は用いたすべての組織に発現し、ELOVL2, 3は精巣など一部の組織特異的に、ELOVL4, 7は発現が認められない組織が一部みられたが、ほとんどの組織で発現していることが明らかになった。

酵母の極長鎖脂肪酸伸長酵素であるFEN1, SUR4を同時に欠損させると酵母は致死となり、 $\Delta sur4$ 株では酵母の複合スフィンゴ脂質合成が低下していることが報告されている。ELOVL1を二重欠損株に導入するとその生育は相補され、さらには $\Delta sur4$ 株の複合スフィンゴ脂質の合成を相補することが観察されていたが、哺乳類のスフィンゴ脂質合成へのELOVL1の関与は不明であった。哺乳類ではC24:0、C24:1-CoAはそのほとんどがスフィンゴ脂質合成に用いられ、*in vitro*伸長活性解析によりELOVL1がC24:0-CoA合成活性を示したことから、ELOVL1がC24スフィンゴ脂質合成に関与していることが強く示唆された。そこで、ELOVL1ノックダウン時のHeLa細胞におけるC24スフィンゴ脂質合成への影響を解析したところ、ELOVL1がC24スフィンゴ脂質合成に中心的な役割を持つことが明らかになった。スフィンゴ脂質は様々な鎖長の脂肪酸を持ち、その脂肪酸組成は組織によって異なることから、脂肪酸部分の鎖長の違いが異なる生理機能に寄与していると考えられている。マイクロドメインに存在するC24ラクトシルセラミドは好中球においてSrcチロシンキナーゼLYNを介したシグナル伝達に重要であることが示唆されている。このことを検証するために、ELOVLまたはセラミド合成酵素CERSノックダウン時のHeLa細胞におけるLYNの活性化を調べた。その結果、ELOVL3やC18、C20セラミド合成酵素であるCERS4をノックダウンした細胞ではLYNの活性化が正常に起こっていたのに対し、ELOVL1、C24セラミド合成酵素CERS2をノックダウンした細胞ではLYNの活性化が抑制されていた。これらのうち、ELOVL1、CERS2のみがC24スフィンゴ脂質の合成に必要であることから、C24スフィンゴ脂質がマイクロドメインを介したシグナル伝達に重要であることが明らかになった。

本研究では、極長鎖脂肪酸伸長活性の包括的、生化学的解析により、生体内での多くの極長鎖脂肪酸伸長経路を解明した。また、7種のELOVLの中でもELOVL1のみが、C24スフィンゴ脂質合成に必要なことを明らかにした。さらに、C24スフィンゴ脂質の生理機能は不明であったが、C24スフィンゴ脂質がマイクロドメインを介したシグナル伝達に非常に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 原 章 雄
副 査 教 授 鈴 木 利 治
副 査 准教授 山 本 融
副 査 講 師 佐 々 貴 之

学 位 論 文 題 名

極長鎖脂肪酸の合成経路および生理機能の解明

脂肪酸は殆どの脂質分子の基本骨格であり、多彩な生理機能とメタボリックシンドロームを始めとする数多くの疾患と密接に関わっている。極長鎖脂肪酸とは脂肪酸の中でも炭素数 20 以上のものを指し、生体内における量は炭素数 (C) 16 や 18 の長鎖脂肪酸よりは圧倒的に少ないものの、長鎖脂肪酸では代替できない固有の性質を有する。極長鎖脂肪酸は鎖長、不飽和度の異なる多様な分子群であり、その機能も多岐にわたる。極長鎖脂肪酸の伸長は4つのステップ (縮合、還元、脱水、還元) を1サイクルとした反応によって行われるが、最初の律速段階を触媒する縮合酵素には7種類 (ELOVL1-7) のアイソザイムが存在する。

それぞれの ELOVL には特徴的な基質特異性が存在することはこれまでの研究から示唆されていたが、詳細については不明であり、多様な極長鎖脂肪酸産生の分子メカニズムの解明には至っていなかった。本研究において申請者は7種全ての ELOVL をクローニングし、それぞれの酵素活性を11種のアシル CoA を用いた生化学的な解析により明らかにした。例えば、ELOVL1 は C20-26 飽和脂肪酸、ELOVL2 は C20 以上の多価不飽和脂肪酸、ELOVL3 は C18 または C20 脂肪酸、ELOVL4 は C24 以上の脂肪酸、ELOVL5 は C18 または C20 多価不飽和脂肪酸、ELOVL6 は C16 飽和脂肪酸、ELOVL7 は C18 または C20 脂肪酸のそれぞれ CoA 体を基質とすることを明らかとした。また、基質特異性だけでなく、それぞれのアイソザイムの組織発現についても本研究で明らかにしており、これらの結果から極長鎖脂肪酸伸長経路の全貌と組織特有な極長鎖脂肪酸組成を産み出す分子基盤が解明された。

極長鎖脂肪酸の中で生体内で最も多い C24 脂肪酸は、スフィンゴ脂質 (C24 スフィンゴ脂質) の構成成分である。生体のスフィンゴ脂質の殆どは炭素数 16 (C16 スフィンゴ脂質) か 24 であり、組織により存在比率が異なる。しかし、なぜスフィンゴ脂質にのみ C24 のような長い脂肪酸が使用されるのか、C16 と C24 という炭素数が 8 も異なるものが存在するスフィンゴ脂質の不連続性 (C18, 20, 22 ではなく) の生理的意味は何か等、多くのことが未解明のまま残されていた。申請者は上記の結果から ELOVL の中でも ELOVL1 が主に C24 スフィンゴ脂質合成に関与すると考え、siRNA によるノックダウン及び液体クロマトグラフィー/質量分析器を用いた解析により、そのことを証明した。スフィンゴ脂質は脂質マイクロドメイン形成に関わっており、C24 のような長い脂肪酸を持つスフィンゴ脂質は脂質二重膜の厚みを変化させてタンパク質の局在を制御する等、いくつかの説が提唱されていたが、これまで C24 スフィンゴ脂質の量を制御できる方法が無かったので実証されていなかった。しかし、申請者は *ELOVL1* の siRNA を行なうことにより、C24 スフィンゴ脂質

量が低下した細胞を産み出しことができるようになったことを利用して、実際に脂質マイクロドメイン機能に C24 スフィンゴ脂質が重要であることを明らかにした。具体的には Src ファミリーキナーゼの Lyn の活性化が *ELOVL1* のノックダウン細胞においては顕著に抑制されていることを明らかにした。

このように本研究はこれまで不明であった極長鎖脂肪酸伸長経路の全貌解明と C24 スフィンゴ脂質の合成経路の同定と生理機能の解明に成功しており、学術的に極めて価値が高いといえる。その重要性が評価され、この内容は *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* に掲載された。また、第 134 回日本薬学会北海道支部例会では本研究内容に関する発表「極長鎖脂肪酸伸長酵素 ELOVL の機能およびスフィンゴ脂質合成調節機構の解析」が学生優秀発表賞に選ばれている。よって、申請者は博士（生命科学）の学位を受領するに十分な資質を有するものであることを認めた。