



Title	スフィンガジエンの代謝およびスフィンガジエン産生酵素FADS3の同定と酵素学的解析
Author(s)	城島, 啓佑
Citation	北海道大学. 博士(薬科学) 甲第15784号
Issue Date	2024-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k15784
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/92037
Type	theses (doctoral)
File Information	Keisuke_Jojima.pdf



[Instructions for use](#)

令和6年3月
博士学位論文

スフィンガジエンの代謝および
スフィンガジエン産生酵素 FADS3 の同定と酵素学的解析

北海道大学大学院生命科学院
生命科学専攻 生命医薬科学コース
生化学研究室
城島 啓佑

目次

目次.....	1
略語.....	3
脚注.....	5
1. 序論.....	6
1.1. スフィンゴ脂質の多機能性.....	6
1.2. スフィンゴ脂質の構造多様性.....	6
1.3. スフィンゴ脂質の生合成経路.....	8
1.4. 脂質メディエーターとしての SPH1P.....	11
1.5. 代謝中間体としての SPH1P.....	11
1.6. 脂肪酸不飽和化酵素.....	14
2. 研究背景と目的.....	17
3. 結果.....	18
3.1. FADS3 は SPD のシス二重結合導入を担う.....	18
3.2. FADS3 の主要な基質は SPH ではなく SPH-CER である.....	20
3.3. FADS3 は SPH-CER の FA 鎖長に対する特異性が低い.....	21
3.4. FADS3 は炭素数 16–20 の SPH を含有する CER に対して活性を示す.....	22
3.5. FADS3 は DHS-CER に対して活性を示す.....	24
3.6. FADS3 は CYB5A と共役して SPD を産生する.....	26
3.7. <i>Fads3</i> は広範な組織に発現し, 白色脂肪組織や腎臓で高発現する.....	28
3.8. SPD はスフィンゴ糖脂質よりも SM へ代謝されやすい.....	29
3.9. SPD および SPD 1-リン酸代謝酵素の活性解析.....	31
3.10. SPD は一価不飽和アシル CoA へ代謝される.....	33
3.11. SPD1P は SPH1P と同様の S1PR へのリガンド活性をもつ.....	34
4. 考察.....	39
4.1. SPD の生合成.....	39
4.2. FADS3 の酵素学的性質.....	40
4.3. SPD の複合スフィンゴ脂質代謝と組織分布.....	41
4.4. SPD1P の代謝と機能.....	42
4.5. SPD の生理的役割.....	43
4.6. 今後の展望.....	44
5. 材料と方法.....	46
5.1. マウス.....	46
5.2. 細胞培養.....	46

5.3. プラスミド	46
5.4. 遺伝子導入	47
5.5. イムノブロットイング	48
5.6. LC-MS/MS による脂質解析.....	48
5.7. <i>FADS3</i> および <i>DEGSI</i> 遺伝子欠損 HAP1 細胞の作製	50
5.8. 間接蛍光抗体法	50
5.9. <i>in vitro</i> における <i>FADS3</i> の不飽和化アッセイ	51
5.10. 定量的 RT-PCR.....	51
5.11. SPH キナーゼアッセイ	52
5.12. SPH1P ホスファターゼ/リアーゼアッセイ	52
5.13. TGF α 切断アッセイ	53
5.14. NanoBiT β アレスチンリクルートアッセイ	54
6. 表.....	55
7. 参考文献/URL	65
8. 謝辞	75

略語

14Z-SPH	14Z-sphingosine (14Z-スフィンゴシン)
4,8-SPD	4,8-sphingadiene (4,8-スフィンガジエン)
6-OH SPH	6-hydroxysphingosine (6-水酸化スフィンゴシン)
AP	alkaline phosphatase (アルカリホスファターゼ)
CER	ceramide (セラミド)
CERS	ceramide synthase (セラミド合成酵素)
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CYB5	cytochrome <i>b</i> ₅ (シトクロム <i>b</i> ₅)
DEGS	dihydroceramide desaturase/hydroxylase (ジヒドロセラミド不飽和化酵素/ 水酸化酵素)
DHS	dihydrosphingosine (ジヒドロスフィンゴシン)
DHS1P	dihydrosphingosine 1-phosphate (ジヒドロスフィンゴシン 1-リン酸)
FA	fatty acid (脂肪酸)
FADS	fatty acid desaturase (脂肪酸不飽和化酵素)
FB ₁	fumonisin B ₁ (フモニシン B ₁)
GPCR	G protein-coupled receptor (G タンパク質共役型受容体)
HexCER	monohexosylceramide (モノヘキソシルセラミド)
HSAN1	hereditary sensory and autonomic neuropathy1 (遺伝性感覚性自律神経 性ニューロパチー1)
IB	immunoblotting (イムノブロットイング)
KDSR	3-ketodihydrosphingosine reductase (3-ケトジヒドロスフィンゴシン還元酵 素)
KO	knockout (ノックアウト)
LCB	long-chain base (長鎖塩基)
LCBP	long-chain base 1-phosphate (長鎖塩基 1-リン酸)
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry (液体クロマトグラフィ ータンデム質量分析)
PEA	phosphoethanolamine (ホスホエタノールアミン)
PHS	phytosphingosine (フィトスフィンゴシン)
PHS1P	phytosphingosine 1-phosphate (フィトスフィンゴシン 1-リン酸)
PUFA	polyunsaturated fatty acid (多価不飽和脂肪酸)
RT-PCR	reverse transcription-PCR (逆転写 PCR)
S1PR	sphingosine 1-phosphate receptor (スフィンゴシン 1-リン酸受容体)

SCD	stearoyl-CoA desaturase (ステアロイル CoA 不飽和化酵素)
SGPL	sphingosine 1-phosphate lyase (スフィンゴシン 1-リン酸リアーゼ)
SGPP	sphingosine 1-phosphate phosphatase (スフィンゴシン 1-リン酸ホスファターゼ)
SLD	sphingolipid $\Delta 8$ desaturase (スフィンゴ脂質 $\Delta 8$ 不飽和化酵素)
SM	sphingomyelin (スフィンゴミエリン)
SPD	sphingadiene (4,14-スフィンガジエン)
SPD1P	sphingadiene 1-phosphate (スフィンガジエン 1-リン酸)
SPH	sphingosine (スフィンゴシン)
SPH1P	sphingosine 1-phosphate (スフィンゴシン 1-リン酸)
SPHK	sphingosine kinase (スフィンゴシンキナーゼ)
SPT	serine palmitoyltransferase (セリンパルミトイル転移酵素)
SREBP	sterol regulatory element binding protein (ステロール制御エレメント結合タンパク質)
TACE	TNF α -converting enzyme (TNF α 変換酵素)
TNF α	tumor necrosis factor- α (腫瘍壊死因子 α)
TGF α	transforming growth factor- α (トランスフォーミング成長因子 α)
UCP	uncoupling protein (脱共役タンパク質)
WT	wild type (野生型)

脚注

本研究では、ヒトのタンパク質を全て大文字で表記し、マウスのタンパク質を頭文字のみ大文字で表記する。遺伝子はイタリックで表記する。

(例)ヒト;タンパク質 FADS3, 遺伝子*FADS3*

マウス;タンパク質 Fads3, 遺伝子*Fads3*

脂肪酸の鎖長と不飽和度について、C 炭素鎖長:不飽和度で表記する。

(例)炭素鎖長 18, 不飽和度 1;C18:1

脂肪酸または長鎖塩基の ω 末端から数えて n 番目の炭素の二重結合を ω -n と表記する。

(例)オレイン酸(C18:1, C9 不飽和); ω -9

1. 序論

1.1. スフィンゴ脂質の多機能性

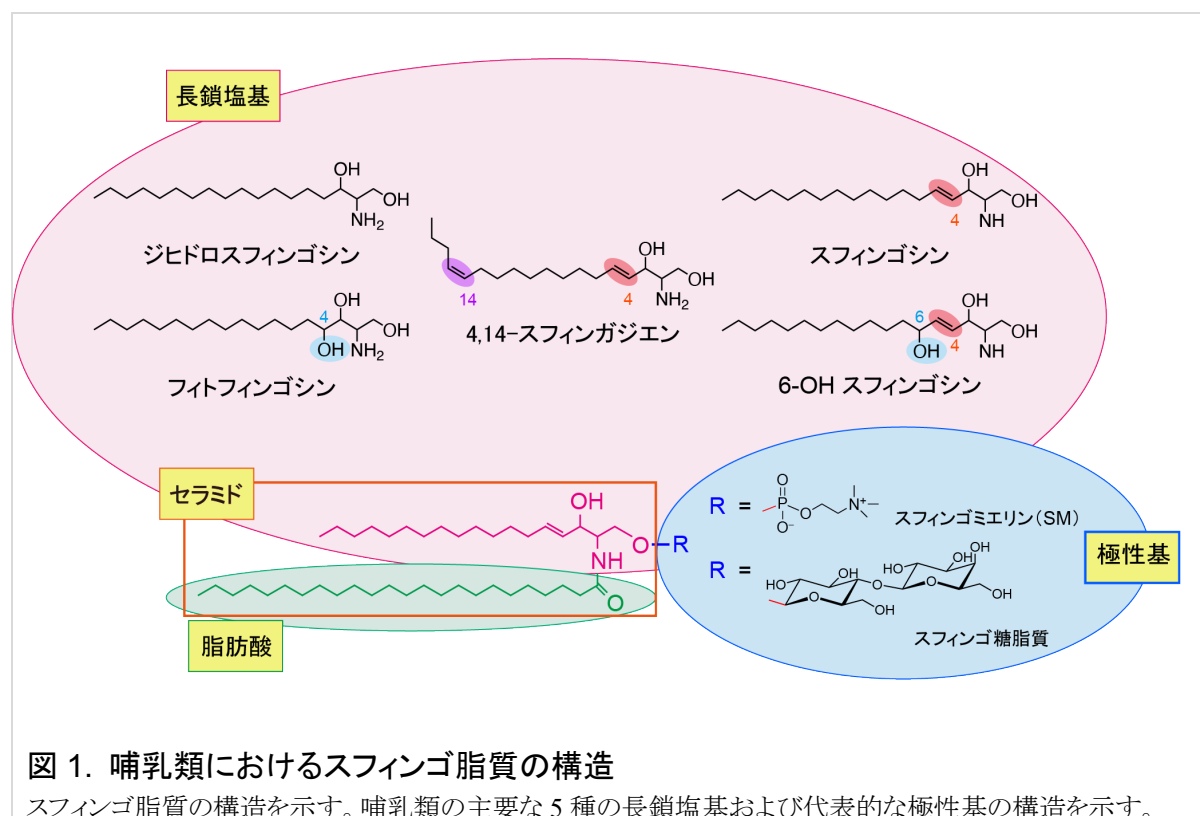
スフィンゴ脂質は真核生物および一部の原核生物に存在する多機能性脂質である¹⁾。スフィンゴ脂質は神経機能、皮膚バリア形成、免疫機能、精子形成、糖代謝の調節などの多彩な機能をもち、その機能破綻はさまざまな疾患の原因となる¹⁻⁴⁾。スフィンゴ脂質は生体内において生体膜の構成成分、神経や皮膚における脂質の多層構造体の成分、脂質メディエーターとしての役割によって上記の機能を果たしている。生体膜成分としてのスフィンゴ脂質は脂質マイクロドメインの形成に関わる。スフィンゴ脂質は生体膜の中でも特に細胞膜に多く存在し、コレステロールと会合して脂質マイクロドメインを形成する⁵⁾。脂質マイクロドメインには受容体やトランスポーターといったタンパク質が集積し、脂質マイクロドメインはシグナル伝達や細胞内輸送のプラットフォームとして機能する。また、スフィンゴ脂質は神経においてミエリン鞘、表皮において皮膚バリア機能に必須である脂質ラメラなどの脂質多層構造体を形成する。このことから、スフィンゴ脂質代謝関連遺伝子の変異は神経症状を主徴とするリソソーム病の一種であるスフィンゴリポドーシス⁶⁾や表皮の肥厚、過角化など重篤な皮膚症状を呈する魚鱗癬⁷⁾を引き起こす。脂質メディエーターとしてはスフィンゴシン 1-リン酸 (SPH1P) が有名であり、細胞表面の SPH1P 受容体 (S1PR) に結合することで血管新生や免疫などに関与する^{8,9)}。SPH1P の前駆体アナログであるフィンゴリモドは SPH1P の S1PR を介した作用を示し、多発性硬化症の治療薬として臨床応用されている^{10,11)}。このようにスフィンゴ脂質は生体内における多くの生命現象に重要な脂質である。

1.2. スフィンゴ脂質の構造多様性

スフィンゴ脂質の疎水骨格は長鎖アミノアルコールである長鎖塩基 (LCB) と脂肪酸 (FA) からなるセラミド (CER) であり、CER の 1 位の水酸基には極性基が結合する (図 1)。スフィンゴ脂質を構成する LCB, FA, 極性基の 3 つの構成要素の組み合わせの違いによってスフィンゴ脂質の構造多様性が創出されており、この構造多様性がスフィンゴ脂質の多機能性を支える分子的基盤である¹⁾。極性基をもつスフィンゴ脂質は複合スフィンゴ脂質と総称される。哺乳類において、複合スフィンゴ脂質を構成する極性基はホスホコリンまたは糖鎖であり、それぞれスフィンゴミエリン (SM)、スフィンゴ糖脂質と呼ばれる。スフィンゴ糖脂質の糖鎖構造は結合する糖の種類や位置によって数百種類にも及ぶ。最も単純な構造のスフィンゴ糖脂質はグルコースもしくはガラクトースを 1 分子のみ有するグルコシル CER とガラクトシル CER であり、これらはモノヘキソシル CER (HexCER) と総称される。疎水骨格である CER を構成する FA は炭素鎖長と不飽和度の違いによって分類することができる。炭素鎖長による分類には諸説あるが、本論文では C11 から C20 の FA を長鎖 FA, C21 以上のものを極長鎖 FA と呼ぶ¹²⁾。また、不飽和度の違いにより、二重結合をもたない FA を飽和 FA,

二重結合を1つもつものを一価不飽和FA, 2つ以上もつものを多価不飽和FA (PUFA)と呼ぶ。自然界に存在する殆どの不飽和FAの二重結合はシス二重結合である。グリセロリン脂質はスフィンゴ脂質と同様に生体膜の主要な構成脂質であるが, 網膜や神経細胞を除いて殆どが長鎖FAで構成されている¹⁾。一方でCERを構成するFAは長鎖FAだけでなく極長鎖, とりわけC24:0またはC24:1FAが殆どの組織に存在し, 特にミエリン, 肝臓, 腎臓などに豊富に存在する。また, グリセロリン脂質のsn-2位を構成するFAには飽和や一価不飽和以外にもPUFAをもつものも豊富であるが, CERでは精巣などを除いてPUFAを含有するものは微量である。極長鎖FAをもつ脂質の特徴は脂質分子同士の高い疎水性相互作用を示し, 脂質マイクロドメインにおける膜のパッキングや脂質ラメラにおける皮膚バリア形成に寄与している。LCBは共通して1位と3位に水酸基, 2位にアミノ基をもつ。これらの官能基は前述の脂質マイクロドメイン形成において, 脂質間相互作用に重要な水素結合の電子ドナーおよびアクセプターとしてはたらく^{13,14)}。また, 哺乳類のLCBは一般的にC18であり, 本論文では特に記載がない限りLCBはC18である。哺乳類には5種類のLCBが存在し^{1,15)}, その中でジヒドロスフィンゴシン(DHS)はLCBに共通の官能基以外をもたない最も単純な構造をもつ(図1)。DHSを基本構造として, その4位にトランス二重結合をもつものはスフィンゴシン(SPH), 4位に水酸基をもつものはフィトスフィンゴシン(PHS)と呼ばれる。さらにそれぞれSPHの6位に水酸基をもつ6-ヒドロキシ(6-OH)SPHと14位にシス二重結合をもつ4,14-スフィンガジエン(SPD)が存在する。これらLCBの組織分布についてはSPH, DHSが広範な組織に分布している一方で, PHSは表皮, 小腸, 腎臓などの上皮系組織, 6-OH SPHは表皮や口腔粘膜に局限している^{1,16-21)}。他のLCBよりも水酸基を1つ多くもつPHSと6-OH SPHは表皮を含めた上皮系組織において水素結合を介した脂質間相互作用を増強することで透過性バリア機能を向上させていると考えられる。一方, 哺乳類のLCBの中で唯一シス二重結合を有する構造をもつSPDは, シス二重結合の炭化水素鎖を折れ曲がらせるという特性によって, 脂質-脂質間相互作用を弱める。そのため, SPD含有スフィンゴ脂質はスフィンゴ脂質としては例外的に脂質マイクロドメイン外に多く存在する¹⁹⁾。植物においては4位にトランス, 8位にトランスまたはシス二重結合を有するSPD(4,8-SPD)が存在する²²⁾。SPDは1969年に発見されたものの^{23,24)}, 標準品が市販されておらず, 脂質の定量において汎用されている質量分析法(MS)では4,14-SPDと4,8-SPDを区別して解析することが困難であった。過去にヒトおよび, マウスの血漿やリンパ液, マウスの脳や肺においてSPDの存在が報告されていたが^{25,26)}, これらの多くは4,14-SPDと4,8-SPDの区別ができておらず, 定量解析にも至っていなかった。一方, 近年, SPDの標準品が市販されたことで, 当研究室では液体クロマトグラフィー-連結タンデム質量分析(LC-MS/MS)を用いて4,8-SPDと4,14-SPDをLCによって疎水性度の違いに基づき分離し, MS/MS解析によってSPDに特徴的なフラグメントを選択することで4,14-SPDを特異的に定性できる検出系を

確立した。また、フラグメントパターンやイオン化効率が SPH 含有セラミド (SPH-CER) と類似していることを明らかにし、SPH-CER の安定同位体を内部標準とした定量的な分析を行うことも可能となった¹⁹⁾。この解析法を用いて、当研究室では、SPD がマウスの広範な組織に分布し、腎臓や脳でその量が多いことを明らかにしている¹⁹⁾。



1.3. スフィンゴ脂質の生合成経路

スフィンゴ脂質の *de novo* 合成は小胞体におけるセリンとアシル CoA の縮合反応で始まる²⁷⁾(図 2)。この反応はセリンパルミトイル転移酵素 (SPT) により触媒され、基質となるアシル CoA の炭素鎖+2 の 3-ケトジヒドロスフィンゴシンが産生される。SPT は 2 つの大サブユニットと 1 つの小サブユニットから構成されるヘテロ三量体タンパク質である²⁸⁾。大サブユニットには SPTLC1, SPTLC2, SPTLC3 の 3 種類が存在し、小サブユニットには SPTSSA, SPTSSB の 2 種類が存在する^{27,28)}。SPTLC2 および SPTLC3 は補酵素であるピリドキサル 5'-リン酸と結合するリシン残基の活性中心をもつが、SPTLC1 はリシン残基をもたないため活性を示さない。一方、SPTLC1 は SPT 複合体の構造の安定化に寄与する^{27,29,30)}。これらの組み合わせによって 4 種類の SPT 複合体が形成される (SPTLC1/SPTLC2/SPTSSA, SPTLC1/SPTLC2/SPTSSB, SPTLC1/SPTLC3/SPTSSA, SPTLC1/SPTLC3/SPTSSB)。SPT 複合体のそれぞれがアシル CoA の鎖長に対して異なる基質特異性を示すため、合成される LCB の鎖長は異なる。SPTLC1/SPTLC2/SPTSSA は C16 のアシル CoA に高い活性をも

ち、スフィンゴ脂質で主要な C18 の LCB 産生を担う^{28,31-33})。SPTLC1/SPTLC3/SPTSSA および SPTLC1/SPTLC2/SPTSSB は C16 のアシル CoA に加え、それぞれ C14 および C18 のアシル CoA に対しても活性を示す^{28,31-33})。SPTLC1/SPTLC3/SPTSSB の組み合わせは C14-C24 のアシル CoA を基質とし、C16-C26 の幅広い鎖長の LCB 産生を担う^{28,33})。特にヒト表皮では、SPTLC1, SPTLC3, SPTSSB のいずれの発現も高く、ヒト角質層における広範な鎖長の LCB の産生を可能にしている^{28,33})。また、SPTLC1 または SPTLC2 の特定のミスセンス変異は遺伝性感覚性ニューロパチー1型(HSAN1)を引き起こす³⁴)。これらの変異は SPT の基質特異性を変化させ、セリン以外にアラニンやグリシンを基質として利用できるようになり、神経毒性のある 1-デオキシスフィンゴ脂質を産生する³⁴⁻³⁶)。SPT により産生された 3-ケトジヒドロスフィンゴシンは 3-ケトジヒドロスフィンゴシン還元酵素(KDSR)により還元され、DHS へ代謝される³⁷)。DHS は CER 合成酵素(CERS)によってアシル CoA と縮合し、DHS 含有 CER (DHS-CER)となる。哺乳類の CERS には CERS1-6 の6つのアイソザイムが存在し、基質となるアシル CoA 鎖長に対して特異性を有する(CERS1, C18-CoA; CERS2, C22,

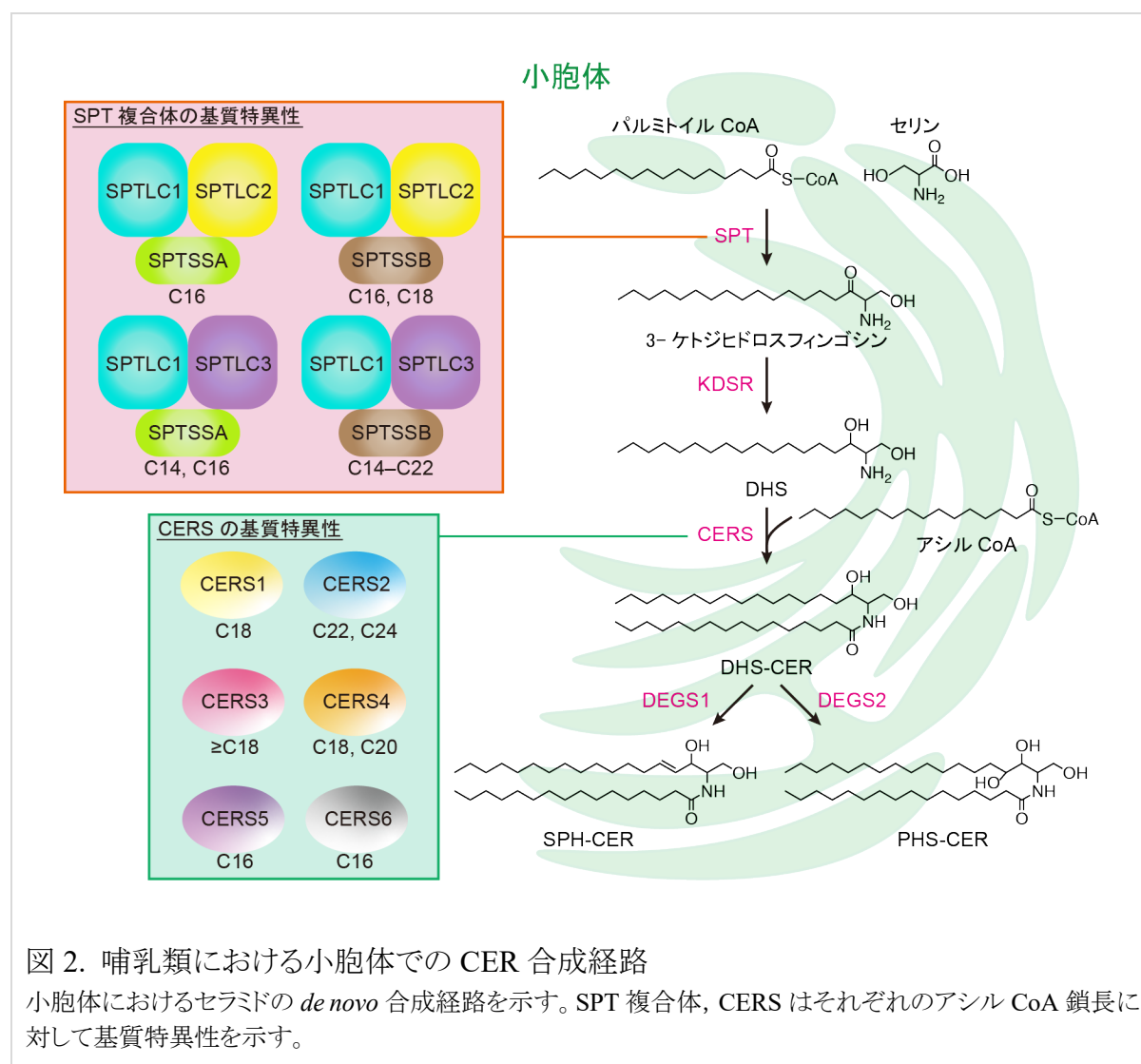


図 2. 哺乳類における小胞体での CER 合成経路

小胞体におけるセラミドの *de novo* 合成経路を示す。SPT 複合体, CERS はそれぞれのアシル CoA 鎖長に対して基質特異性を示す。

C24-CoA; CERS3, \geq C18-CoA; CERS4, C18, C20-CoA; CERS5, C16-CoA; CERS6, C16-CoA)^{1,38-40}。DHS-CER はジヒドロセラミド不飽和化酵素 DEGS1 (別名 FADS7) により, C4 位と C5 位の間にはトランス二重結合が導入され, SPH 含有 CER (SPH-CER) となる⁴¹。また, DHS-CER は DEGS1 による SPH-CER への代謝だけでなく, ジヒドロセラミド不飽和/水酸化酵素 DEGS2 (別名 FADS8) によって 4 位が水酸化されることで, PHS 含有 CER (PHS-CER) へ代謝される場合もある^{41,42}。ここまでの反応は全て小胞体で起こり, 産生された CER はゴルジ体へ輸送され, SM やスフィンゴ糖脂質といった複合スフィンゴ脂質へ変換される (図 3)。その後, 複合スフィンゴ脂質は細胞膜へ輸送され, 膜の構成脂質として機能する。複合スフィンゴ脂質が分解される場合にはリソソームへと輸送され, スフィンゴミエリナーゼまたはグリコシダーゼによって極性基が除去された後, セラミダーゼによって LCB にまで分解される。この分解経路は遊離の SPH や PHS の唯一の産生経路である。(DHS の不飽和化/水酸化によって SPH/PHS が直接合成される経路は存在しない)¹)。リソソームでのセラミドの分解によって産生された LCB は小胞体へ輸送され, CER 合成の基質として再利用される (サルベージ経路) か, SPH1P を介してアシル CoA へと代謝後にグリセロ脂質産生や β 酸化に利用される (後述)。

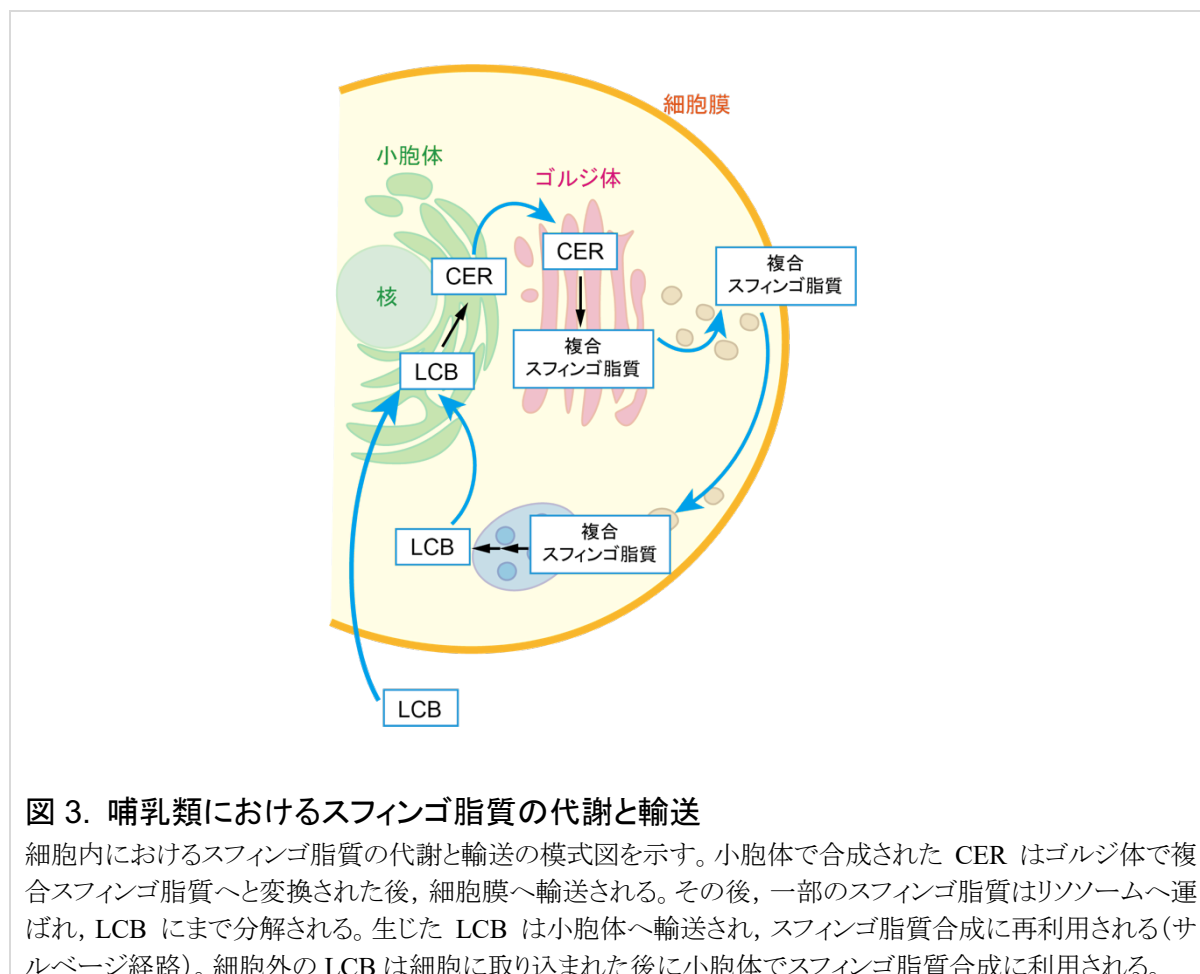


図 3. 哺乳類におけるスフィンゴ脂質の代謝と輸送

細胞内におけるスフィンゴ脂質の代謝と輸送の模式図を示す。小胞体で合成された CER はゴルジ体で複合スフィンゴ脂質へと変換された後, 細胞膜へ輸送される。その後, 一部のスフィンゴ脂質はリソソームへ運ばれ, LCB にまで分解される。生じた LCB は小胞体へ輸送され, スフィンゴ脂質合成に再利用される (サルベージ経路)。細胞外の LCB は細胞に取り込まれた後に小胞体でスフィンゴ脂質合成に利用される。

1.4. 脂質メディエーターとしての SPH1P

SPH の1位の水酸基にリン酸が結合した SPH1P は脂質メディエーターの 1 つとして知られており, S1PR を介して細胞増殖や細胞骨格制御, 細胞遊走促進もしくは抑制といった様々な細胞応答を引き起こす^{2,43}). SPH1P は血漿中に数百 nM 程度, リンパ液中に数十 nM 存在する⁴⁴⁻⁴⁶). 血漿中の SPH1P は赤血球, 血小板, 内皮細胞から供給され, リンパ液中の SPH1P は殆どが内皮細胞から供給される⁴⁵⁻⁴⁷). S1PR は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であり, 5 種類のサブタイプ (S1PR1-5) が存在する⁴⁸). GPCR は, G α , G β および G γ サブユニットからなる三量体 G タンパク質と共役している。G α サブユニットは G i , G q , G $12/13$ など複数のサブファミリーに分類される (図4)。S1PR の組織分布については, S1PR1-3 が広範な組織に発現している一方で, S1PR4 は免疫系の組織や肺, S1PR5 は脳や皮膚に局限して発現している⁴⁹⁻⁵¹). SPH1P は免疫系や血管新生において特に重要な役割を果たす。免疫系において SPH1P は, 成熟 T 細胞表面に高発現する S1PR1 を介したシグナル伝達を活性化することで, 胸腺や二次リンパ組織からの成熟 T 細胞の移出に重要な働きをもつ⁵²). SPH1P は, 胸腺-血漿間, あるいは二次リンパ組織-リンパ液-血漿間で低濃度から高濃度の勾配が存在する。そのため, 成熟 T 細胞は SPH1P 濃度の高い血漿へ向かって胸腺あるいは二次リンパ組織から移出する。T 細胞特異的 *Slpr1* ノックアウト (KO) マウスでは, 胸腺からの成熟 T 細胞の移出が減少する⁵³). また, 血管系において SPH1P は, 血管安定化にも重要な役割を果たす。血管内皮細胞には S1PR1 および S1PR3, 血管平滑筋細胞には S1PR1-3 が発現しており^{54Slpr1 KO マウスの胎仔は血管安定化不全による出血で胎生致死となる⁵³). また, *Slpr1 Slpr2* のダブル KO マウスや *Slpr1 Slpr2 Slpr3* のトリプル KO マウスは, *Slpr1* のシングル KO マウスよりも早い段階で胎生致死となる。これらのことから, S1PR1-3 は血管形成において協調して働くことが示唆されている⁵⁵).}

1.5. 代謝中間体としての SPH1P

SPH1P は脂質メディエーターとしてだけでなく, スフィンゴ脂質の分解経路における代謝中間体としても重要である。SPH1P は SPH が SPH リン酸化酵素 (SPHK) によってリン酸化を受けることで産生される (図 5)。SPHK には SPHK1 と SPHK2 の 2 つのアイソザイムが存在し, 両者は基質特異性が異なる^{56,57}). SPHK1 は基質特異性が高く, SPH, DHS にのみ高いリン酸化活性を示す。一方, SPHK2 の基質特異性は SPHK1 よりも低く, SPH, DHS だけではなく, PHS に対しても活性を示す^{56,57}). SPH1P は脱リン酸化反応または開裂反応により分解される。SPH1P の脱リン酸化は SPH1P ホスファターゼ (SGPP) が触媒する。SGPP には SGPP1, SGPP2 の 2 つのアイソザイムが存在し, どちらも SPH1P に加え, DHS 1-リン酸 (DHS1P) へ活性をもつことが報告されているが⁵⁸), 他の LCB 1-リン酸 (LCBP) に対する

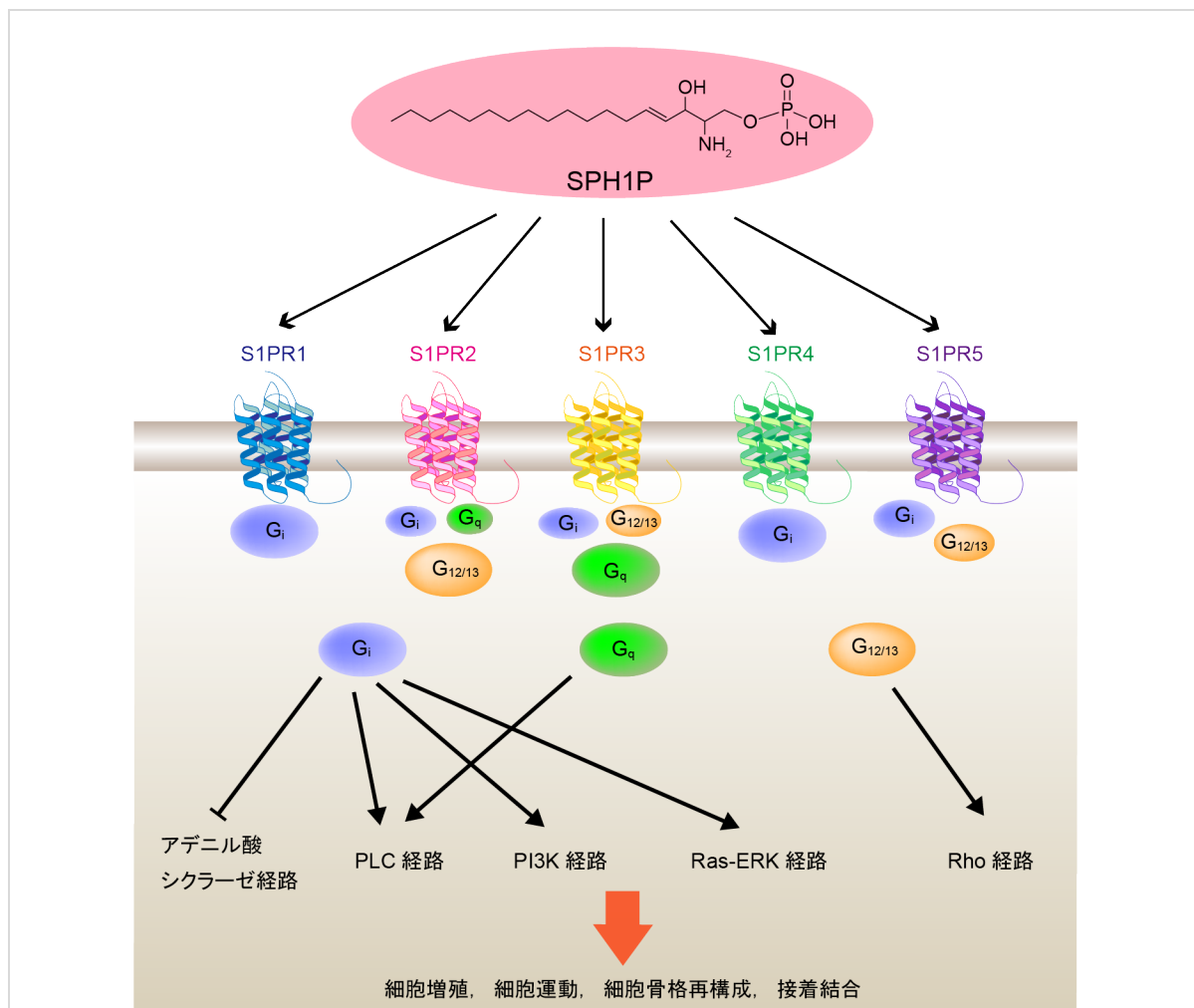
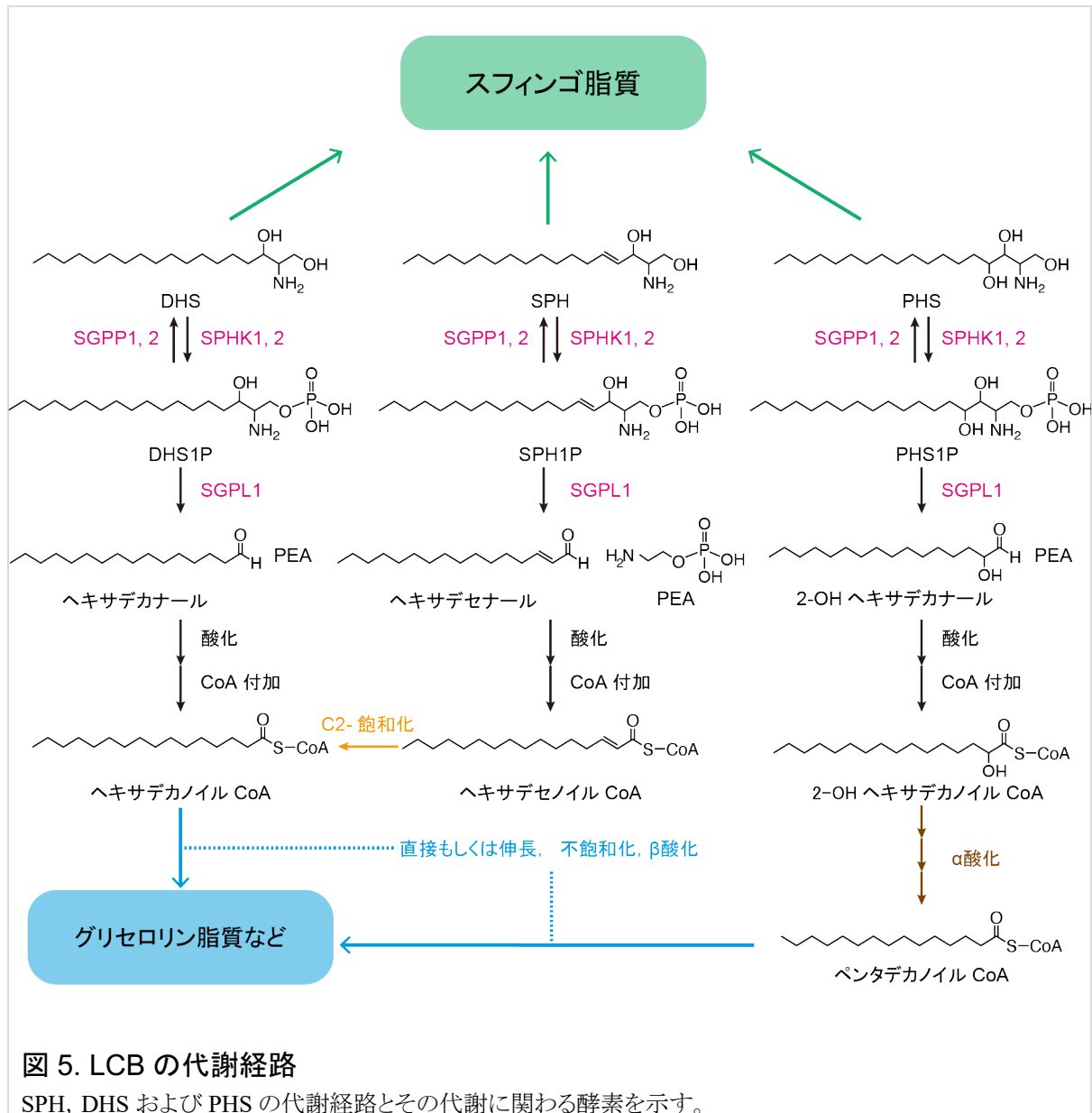


図 4. S1PR のシグナル伝達経路

S1PR の共役する $G\alpha$ タンパク質とその下流のシグナル経路を示す。SPH1P は S1PR のリガンドとして作用し、様々な細胞応答を引き起こす。

活性は不明である。脱リン酸化によって生じた LCB はスフィンゴ脂質の再合成に利用される。SPH1P の開裂は SPH1P リアーゼ (SGPL1) が担い、SPH1P はホスホエタノールアミン (PEA) とヘキサデセナルへ分解される。Sgpl1 KO マウスは肝臓での脂質代謝異常や肺、心臓、尿管および骨の形態異常、骨髄の過形成などの多臓器不全により生後 1 か月程度で死亡する^{59,60}。また、ヒトでは SPGL1 変異により低タンパク血症や浮腫を引き起こすステロイド抵抗性ネフローゼ症候群を発症する⁶¹。LCB の分解経路は SPH, DHS, PHS で異なり、当研究室ではその全容を明らかにしている。これらの LCB は上述のリン酸化と C2-C3 間開裂によるアルデヒド産生に加え、アルデヒドから FA への酸化と CoA 付加という共通した反応ステップを経てアシル CoA へと代謝される¹。SPH と PHS はそれぞれに特徴的な追加の反応 (SPH, C2 位の飽和化; PHS, α 酸化) を受ける⁶²⁻⁶⁴。これらの反応によって DHS と SPH は 2 炭素短くなった飽和アシル CoA, PHS は 3 炭素短くなった飽和 (非水酸化) ア

シル CoA へと変換される。これらのアシル CoA は直接、あるいは $\Delta 9$ 不飽和化/FA 伸長後、脂質合成(主にグリセロリン脂質)あるいは β 酸化による分解を受ける。この経路はスフィンゴ脂質を分解する唯一の経路であり、生体内のスフィンゴ脂質量の制御に重要な役割をもつ⁶³⁻⁶⁵。



1.6. 脂肪酸不飽和化酵素

脂質に二重結合を導入する酵素として脂肪酸不飽和化酵素 (FADS)ファミリーが知られている。ヒトでは FADS1, FADS2, FADS3, FADS4, FADS5, FADS6, FADS7/DEGS1, FADS8/DEGS2 の 8 つのメンバーが属し^{66,67)}, このうち FADS3 と FADS6 の機能は不明である。FADS1, FADS2, FADS4, FADS5 はアシル CoA 不飽和化酵素であり, FADS1 が C5 位, FADS2 が C6 位, FADS4 と FADS5 が C9 位にシス二重結合を導入する^{68,69)}。FADS1, FADS2 遺伝子は FADS3 遺伝子とともにヒト 11 番染色体上 (マウスでは 19 番染色体) に隣り合って位置し, 遺伝子クラスターを形成している⁷⁰⁾。FADS1, FADS2 は幅広い組織に発現するが, 特に副腎や脳で高発現する⁷¹⁾。FADS1 と FADS2 は ω -3 と ω -6 系列の PUFA 合成に重要である (図 6)。生体内の PUFA は食事からの摂取と体内での生合成に由来する。PUFA を制限した餌を摂取させた *Fads1* および *Fads2* KO マウスは様々な表現型を示す。例えば, エイコサノイドの前駆体であるアラキドン酸 (ω -6, C20:4) を欠乏させた食餌を与えた *Fads1* KO マウスは生後 12 週までに死亡する⁷²⁾。このマウスではプロスタグランジン類の産生低下によって CD3 陽性 T 細胞の減少が見られている。また, *Fads1* KO マウスに高脂肪食負荷を行うと耐糖能の増加とインスリン抵抗性が改善し, 腫瘍を形成させると腫瘍の成長が抑制される⁷³⁾。これらのことから PUFA はエネルギー代謝や炎症に関与し, その制御に FADS1 が重要であることが示唆される。*Fads2* KO マウスでは肝臓におけるステロール制御エレメント結合タンパク質 1 (SREBP1) 依存的な脂質合成の亢進と, 超低比重リポ

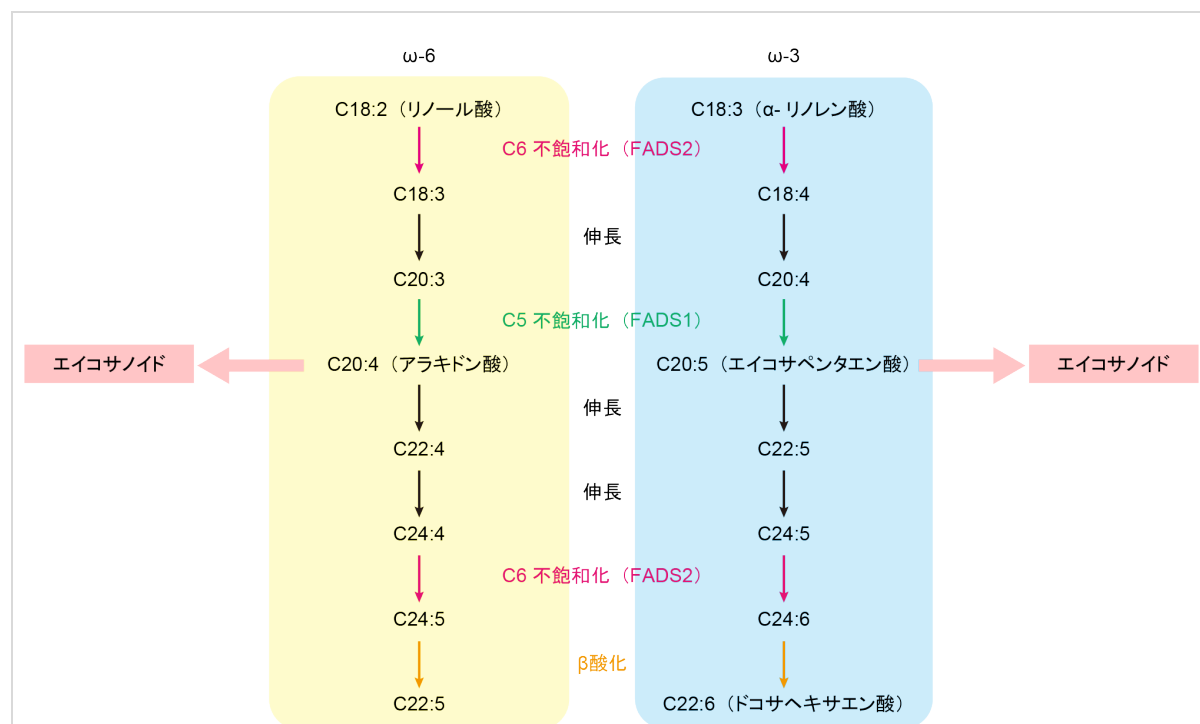


図 6. 哺乳類における PUFA の代謝経路

PUFA の代謝経路とそれぞれの反応における FADS の関与について示す。

タンパク質を介した肝臓からのトリグリセリド排出の低下による肝臓での脂肪蓄積が報告されている⁷⁴⁾。また、*Fads2* KO マウスは雌雄ともに不妊であり、雄では精巣血液関門とセルトリ細胞の極性の崩壊、雌では卵巣の透明帯の形成不全が見られる⁷⁵⁾。その他にも潰瘍性皮膚炎の発症や腎臓、脾臓などの肥大も見られる⁷⁶⁾。このように広範な組織で表現型が観察されることから生体内における PUFA や FADS2 の重要性が伺える。また、ヒトの皮脂ではマウスなどの有毛哺乳類と異なり、サピエン酸(ω -6, C16:1)が豊富に含まれている。これはヒトの皮脂腺において FADS2 が高発現していることに起因しており、皮脂の流動性の制御に関与していると考えられている⁷⁷⁾。FADS4 と FADS5 はステアロイル CoA 不飽和化酵素 (SCD)としての別名もち、FADS4 が SCD5, FADS5 が SCD1 と呼ばれる。SCD はその名の通りステアロイル CoA (C18:0)を基質にするが、パルミトイル CoA (C16:0)などに対しても活性を示し、それぞれオレオイル CoA (ω -9, C18:1)とパルミトオレオイル CoA (ω -7, C16:1)を産生する。SCD1 は全身に発現する一方で、SCD5 は脳や脂肪組織に限局して発現する⁶⁸⁾。マウスにはヒトに存在する *Scd1* に加えて *Scd2*, *Scd3*, *Scd4* の計 4 つのアイソザイムが存在する一方で、*Scd5* は存在しない。*Scd1* は広範な組織に発現し、特に肝臓、脂肪組織、脂腺、皮膚などで高発現する。*Scd2* は神経、*Scd3* は脂腺、*Scd4* は心臓に特異的に発現する。*Scd1* KO マウスは高脂肪食に対するインスリン抵抗性の改善や体重増加の抑制など肥満の改善が見られる⁷⁸⁾。また、脱毛、脂漏性皮膚炎、ドライアイ様症状など皮脂腺やマイボーム腺(眼瞼に存在する特殊な皮脂腺)に関連した表現型も見られる⁷⁹⁻⁸¹⁾。

前述のように、DEGS1 と DEGS2 の基質は DHS-CER であり、DEGS1 は DHS の C4 位にトランス二重結合を導入して SPH-CER を産生する⁶⁶⁾。*DeGS1* KO マウスは魚鱗癬様症状や神経症状を呈し、生後 10 週以内に死亡する。また、*DEGS1* の変異患者では錐体および錐体外路混合の運動障害や進行性の小脳萎縮による発達障害が見られる⁸²⁾。この患者や *DEGS1* の KO 細胞では、DHS-CER だけでなく、C14 位に二重結合をもつ SPH 含有 CER (14Z-SPH-CER)が観察された。SPD の C14 位にシス二重結合を導入する酵素は不明であるが、SPD と同様 C14 位に二重結合をもつこの LCB の合成にも、SPD 合成酵素が関与していることが予想される。DEGS2 は DHS-CER の C4 位水酸化活性と C4 位不飽和化活性をもつ二機能酵素であり、それぞれ PHS-CER, SPH-CER を産生する^{20,41,66)}。DEGS2 は皮膚や小腸、腎臓など特異的な組織に発現パターンを示すが *DeGS2* KO マウスでは目立った表現型は観察されない²⁰⁾。

一部の FADS では基質の鎖長に対する活性の違いが知られている。マウスの 4 つの *Scd* アイソザイムでは *Scd1*, *Scd2*, *Scd4* がパルミトイル CoA と比較してステアロイル CoA に対する活性の方が高い一方で、*Scd3* はステアロイル CoA に対する活性が殆どなく、パルミトイル CoA に対して高い活性を示す⁸³⁾。また、いずれのアイソザイムも C20 以上のアシル CoA に対しては活性を示さない。また、DEGS2 は DHS-CER の FA 部分の長さによって水酸化活性と不飽和化活性に違いがみられ、特に C24 以上の FA をもつものに対しては水酸化活

性が高く, C16, C18 の FA をもつものに対しては不飽和化活性が高い傾向をもつ²⁰⁾。アシル CoA の構造の違いに対する FADS の活性についても報告されている。哺乳類では直鎖の FA に加えて ω -2(*iso*)または ω -3(*anteiso*)位がモノメチル化された分岐鎖 FA が広範な組織に存在し, 特にマイボーム腺や皮膚(皮脂), 肝臓などに多い^{84,85)}。興味深いことに FADS1 や SCD は分岐鎖アシル CoA に対する活性を示さず, FADS2 のみが分岐鎖アシル CoA に対して活性を示すことが報告されている⁸⁶⁾。

FADS ファミリーメンバーが担う不飽和化/水酸化反応では NADH または NADPH の電子がシトクロム b_5 還元酵素へ受け渡されることで始まる(図 7)^{41,68)}。シトクロム b_5 還元酵素が受け取った電子はシトクロム b_5 である CYB5 に授与され, さらにこの電子が FADS に受け渡されることで基質の不飽和化/水酸化と分子状酸素の水への変換が起こる。FADS ファミリーメンバーの中で FADS1-3 はシトクロム b_5 様ドメインを有する⁷⁰⁾。FADS2 は CYB5 非存在下でも活性を示すものの, CYB5 存在下ではより高い活性を示す⁸⁷⁾。これらのことから, FADS2 は自身のシトクロム b_5 様ドメインを反応に使用するだけでなく, CYB5 と共役した反応も行うことを示している。また, FADS は補因子である非ヘム鉄に配位するヒスチジンボックスを 3 つもち, 分子状酸素を活性化することで不飽和化反応を行う^{88,89)}。

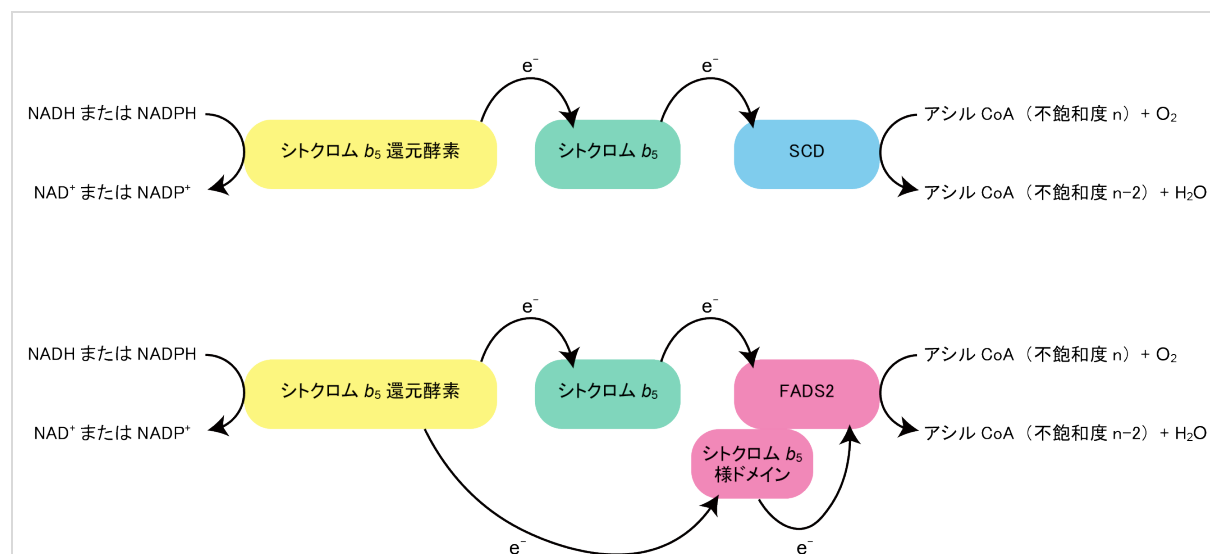


図 7. SCD および FADS2 のシトクロム b_5 電子伝達経路

SCD と FADS2 のシトクロム b_5 を介した電子伝達経路を示す。NADH もしくは NADPH の還元電位はシトクロム b_5 還元酵素をシトクロムまたは FADS2 が有するシトクロム b_5 様ドメインに受け渡され, アシル CoA と分子状酸素から不飽和化されたアシル CoA と水が生成される。

2. 研究背景と目的

スフィンゴ脂質の構造多様性はその多彩な機能を支える分子的基盤である。LCB はスフィンゴ脂質の構造多様性の一端を担っているが、SPD は約半世紀前に発見されて以来^{23,24,90}、機能や代謝、生合成経路について殆ど未知である。SPD は哺乳類の LCB では唯一シス二重結合を有するユニークな構造であることから、生体膜において他の長鎖塩基とは異なる役割を担っている可能性がある。また、その構造の違いから、その代謝やリン酸化体の受容体へのリガンド活性も特徴的であることが予想される。そこで本研究では、SPD の代謝様式や機能の解明および、SPD に特徴的なシス二重結合を導入する酵素の同定、本酵素の生化学的な性質の解明を目的として解析を行なった。

3. 結果

3.1. FADS3 は SPD のシス二重結合導入を担う

SPD の生合成経路については不明な点が多く、特に 14 位のシス二重結合を導入する酵素は不明である。そこで不飽和化酵素の候補として、アシル CoA や DHS-CER の不飽和化を担うメンバーが属する FADS ファミリーに着目した。まず、3×FLAG-FADS1-8 をそれぞれ過剰発現させた HEK 293T 細胞に重水素標識 SPH (d_7 -SPH, 7 分子の水素原子が重水素に置換)を取り込ませた。その後、細胞から脂質を抽出し、産生された d_7 -SPD 含有セラミド (SPD-CER) の量を LC-MS/MS を用いて測定した。 d_7 -SPH は内在的に存在しないため、 d_7 -SPH に由来する d_7 -SPD-CER 量を調べることで、SPD-CER の新規合成活性を評価することができる。各 FADS をイムノブロッティングにより検出したところ、発現量は異なっているものの、いずれの FADS タンパク質も発現していることが確認された(図 8A)。全ての FADS が分子量から予想される位置にバンドが見られるものの、FADS5 は予想される分子量(44 kDa)の他に 35 kDa 付近にもバンドが確認された。各 FADS タンパク質を過剰発現させた細胞のうち、FADS3 を過剰発現させた細胞でのみ、 d_7 -SPD-CER 量がベクター導入細胞と比べて約 10 倍に増加していた(図 8B)。このことから、FADS3 が SPD のシス二重結合導入に関与することが明らかとなった。一方で、産生された d_7 -SPH-CER の量に有意な差は見られなかった。また、FADS3 過剰発現細胞において d_7 -SPD-CER を構成する FA 鎖長は、 d_7 -SPH-CER と同様 C24:0 や C24:1 FA を含むものが多かったことから、FADS3 は FA 鎖長に対して特異性を示さないことが示唆された。

次に、遺伝子 KO が容易な一倍体細胞株であるヒト慢性骨髄性白血病由来細胞株 HAP1 細胞を用いて、CRISPR/Cas9 システムによって FADS3 遺伝子を KO させた。FADS3 遺伝子が KO されたクローンとして、エキソン 1 の開始コドンを含む 480 bp を欠失したクローン(KO1)と開始コドンを含まない 28 bp を欠失したクローン(KO2)の 2 クローンを得た(図 8C)。これらの細胞に d_7 -SPH を取り込ませ、産生された d_7 -SPD-CER の量を LC-MS/MS を用いて調べたところ、KO1 と KO2 いずれの KO 細胞クローンにおいても、 d_7 -SPD-CER 量は野生型(WT)細胞の 1%未満に低下した(図 8D)。このことから FADS3 が HAP1 細胞において SPD のシス二重結合を導入する唯一の酵素であることが明らかとなった。一方、 d_7 -SPH-CER 量は WT 細胞に比べて増加しており、SPD-CER に代謝されなかった分が増加したと推測される。

FADS3 の細胞内局在を明らかにするため、HeLa 細胞に 3×FLAG-FADS3 を過剰発現させ、抗 FLAG 抗体を用いた間接蛍光抗体法により FADS3 の局在解析を行なった。その結果、FADS3 は網目状の局在を示し、蛍光像が小胞体局在マーカーである calnexin と重なることから、他のスフィンゴ脂質合成酵素や FADS と同様に小胞体に局在することが明らかになった(図 8E)。

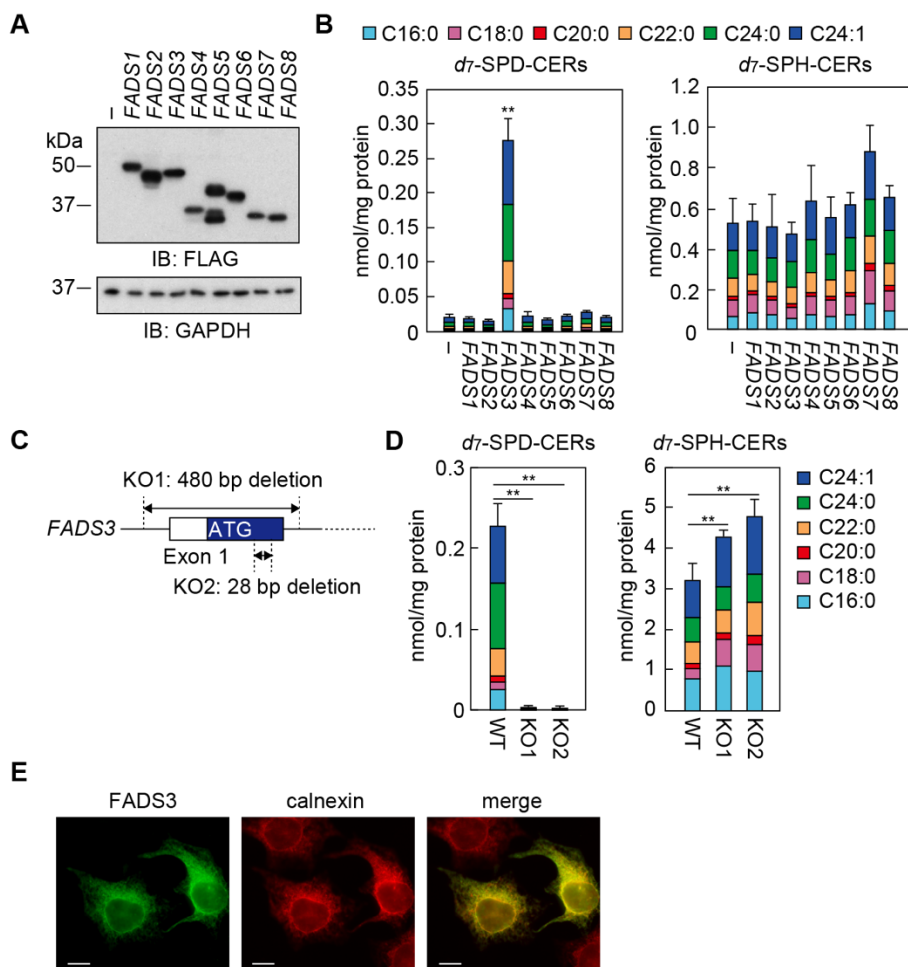


図 8. FADS3 は SPD を産生する

(A, B) HEK 293T 細胞に空ベクター (pCE-puro 3×FLAG-1), pMED8 (3×FLAG-FADS1), pMED9 (3×FLAG-FADS2), pJK22 (3×FLAG-FADS3), pJK23 (3×FLAG-FADS4), pJK24 (3×FLAG-FADS5), pTK174 (3×FLAG-FADS6), pTK265 (3×FLAG-FADS7) または pAN15 (3×FLAG-FADS8) プラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションから 24 時間後、2.5 μM *d7*-SPH を添加して 4 時間培養後、細胞を回収した。(A) 総細胞抽出液 (タンパク質 5 μg 分) を SDS-PAGE で分離し、抗 FLAG 抗体および抗 GAPDH 抗体 (総細胞抽出液のローディングコントロール) を用いたイムノブロッティングを行なった。(B) 総細胞抽出液から脂質を抽出し、FA 部分に C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0, C24:1 をもつ *d7*-SPD-CER および *d7*-SPH-CER を LC-MS/MS で検出し、定量を行なった。数値は CER 総量 (FA 鎖長を色分けして表示) の平均値+標準偏差を示す (n=3; **, P<0.01; Tukey's test)。(C) CRISPR/Cas9 システムを用いて、FADS3 遺伝子を KO した HAP1 細胞を作製した。FADS3 遺伝子のエクソン 1 (白四角, 5'-UTR; 青四角, コーディングシークエンス) 周辺のゲノム構造および単離した細胞 (2 クローン) の遺伝子欠損部位を示す。(D) 血清由来の LCB の取り込みを防ぐために、無血清培地である OPTI-MEM I 培地で FADS3 KO 細胞を 24 時間培養後、2 μM *d7*-SPH を加え 4 時間培養した。脂質を抽出し、FA 部分に C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0, C24:1 をもつ *d7*-SPD-CER および *d7*-SPH-CER を LC-MS/MS により定量した。数値は CER 総量 (FA 鎖長を色分けして表示) の平均値+標準偏差を示す (n=3; **, P<0.01; Tukey's test)。(E) HeLa 細胞に pJK22 (3×FLAG-FADS3) プラスミドをトランスフェクトした。24 時間後に細胞の固定、膜透過処理を行ない、抗 FLAG 抗体および小胞体マーカーである抗 calnexin 抗体を用いた間接蛍光抗体法による顕微鏡観察を行なった (スケールバー; 10 μm)。

3.2. FADS3 の主要な基質は SPH ではなく SPH-CER である

FADS3 の基質は不明なため、まず FADS3 の SPH-CER から SPD-CER への不飽和化活性を評価した。一般的に C16–C24 の FA からなる内在性 CER および C8 以上の FA をもつ合成 CER は細胞膜を透過することができないが、C6:0 の FA をもつ SPH-CER (C6-SPH-CER) は細胞に内在的に存在せず、細胞膜を透過して細胞内へ取り込まれる。そのため、細胞に C6-SPH-CER を取り込ませ、産生された C6-SPD-CER を測定した。HEK 293T 細胞に FADS3 を過剰発現させた細胞では、ベクター導入細胞に比べて産生された C6-SPD-CER の量は 52 倍であり、C6-SPH-CER 量は 33%であった(図 9A)。このことから FADS3 が細胞内において SPH-CER を基質とすることが明らかとなった。続いて、FADS3 の遊離の SPH に対する活性を調べるため、CER 合成酵素 CERS の阻害剤フモニシン B₁ (FB₁) の存在下における FADS3 の活性測定を行った。FB₁ は LCB とアシル CoA の縮合による CER 産生を阻害するため、FB₁ 処理によって細胞内で LCB が蓄積する。もし、FADS3 が遊離の SPH に対して活性をもつのであれば、基質となる SPH 量が FB₁ 処理によって増加するため、遊離の SPD 量も増加することが予想される。そこで FADS3 を過剰発現させた HEK 293T 細胞を *d*₇-SPH で 4 時間ラベル後、脂質を抽出し、*d*₇-CER (*d*₇-SPD-CER と *d*₇-SPH-CER) および遊離の *d*₇-LCB (*d*₇-SPD と *d*₇-SPH) の量を LC-MS/MS で調べた。FB₁ 非存在下においてベクターを導入した HEK 293T 細胞中では *d*₇-SPH-CER は産生されたものの、*d*₇-SPD-CER は殆ど検出されなかった(図 9B, 左)。一方、FADS3 過剰発現細胞では *d*₇-SPH-CER に加えて *d*₇-SPD-CER が産生された。*d*₇-SPH-CER, *d*₇-SPD-CER とともに FB₁ 処理によって産生量が大きく減少した。このことは FB₁ が働いていることを示していた。遊離の *d*₇-SPH の量はベクター導入細胞と FADS3 過剰発現細胞で同等であり、FB₁ 処理によって増加傾向を示した。一方、*d*₇-SPD は FB₁ 処理の有無に関わらず、ベクター導入細胞と FADS3 過剰発現細胞共に検出限界以下であった(図 9B, 右)。

次に、FADS3 の SPH-CER と遊離の SPH に対する *in vitro* での活性測定を行った。ベクター導入あるいは FADS3 過剰発現 HEK 293T 細胞から調製した総細胞抽出液を C6-SPH-CER または *d*₇-SPH とインキュベートし、産生された C6-SPD-CER または *d*₇-SPD 量をそれぞれ LC-MS/MS で測定した。その結果、ベクター導入細胞に比べて FADS3 発現細胞の細胞抽出液と反応させた場合、約 3,000 倍の C6-SPD-CER が産生された(図 9C)。一方、FADS3 発現細胞の細胞抽出液によって *d*₇-SPD は産生されなかった。以上より、FADS3 の基質は遊離の SPH ではなく SPH-CER であることが明らかとなった(図 9D)。

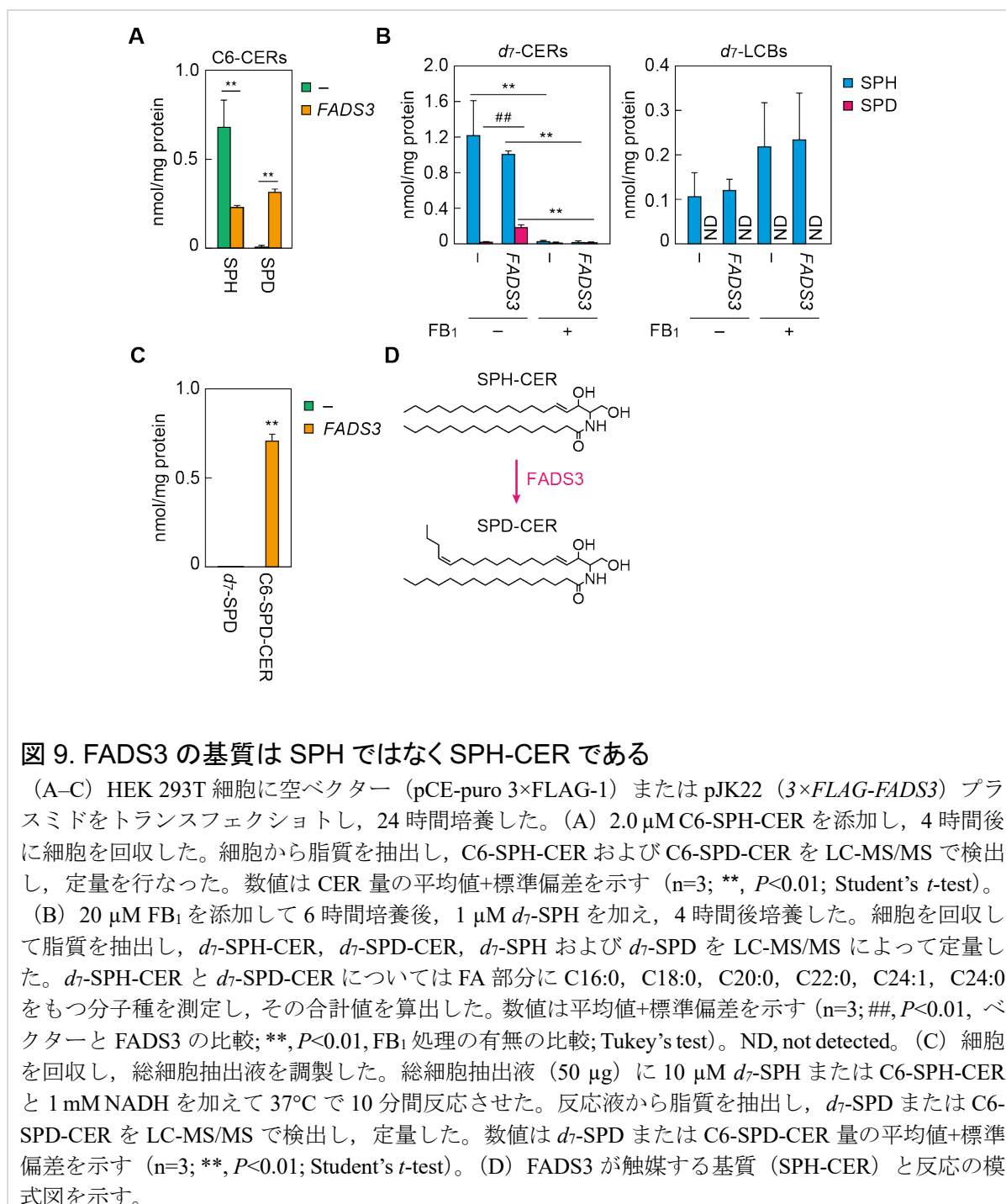


図 9. FADS3 の基質は SPH ではなく SPH-CER である

(A–C) HEK 293T 細胞に空ベクター (pCE-puro 3×FLAG-1) または pJK22 (3×FLAG-FADS3) プラスミドをトランスフェクションし、24 時間培養した。(A) 2.0 μM C6-SPH-CER を添加し、4 時間後に細胞を回収した。細胞から脂質を抽出し、C6-SPH-CER および C6-SPD-CER を LC-MS/MS で検出し、定量を行なった。数値は CER 量の平均値+標準偏差を示す (n=3; **, P<0.01; Student's *t*-test)。

(B) 20 μM FB₁ を添加して 6 時間培養後、1 μM *d*₇-SPH を加え、4 時間後培養した。細胞を回収して脂質を抽出し、*d*₇-SPH-CER、*d*₇-SPD-CER、*d*₇-SPH および *d*₇-SPD を LC-MS/MS によって定量した。*d*₇-SPH-CER と *d*₇-SPD-CER については FA 部分に C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:1, C24:0 をもつ分子種を測定し、その合計値を算出した。数値は平均値+標準偏差を示す (n=3; ##, P<0.01, ベクターと FADS3 の比較; **, P<0.01, FB₁ 処理の有無の比較; Tukey's test)。ND, not detected。(C) 細胞を回収し、総細胞抽出液を調製した。総細胞抽出液 (50 μg) に 10 μM *d*₇-SPH または C6-SPH-CER と 1 mM NADH を加えて 37°C で 10 分間反応させた。反応液から脂質を抽出し、*d*₇-SPD または C6-SPD-CER を LC-MS/MS で検出し、定量した。数値は *d*₇-SPD または C6-SPD-CER 量の平均値+標準偏差を示す (n=3; **, P<0.01; Student's *t*-test)。(D) FADS3 が触媒する基質 (SPH-CER) と反応の模式図を示す。

3.3. FADS3 は SPH-CER の FA 鎖長に対する特異性が低い

FADS3 の基質である SPH-CER には FA あるいは LCB 部分の鎖長が異なる複数の分子種が存在する。しかし、FADS3 のこれら SPH-CER 分子種に対する基質特異性は不明である。そこでまず、FA 鎖長が異なる SPH-CER 分子種に対する FADS3 の基質特異性を調べた。そのためにベクターを導入、もしくは FADS3 を過剰発現させた HEK 293T 細胞中で CERS1–6 をそれぞれ共過剰発現させた。CERS1–6 は基質となるアシル CoA 鎖長に特異

性を有するため (CERS1, C18-CoA ; CERS2, C22, C24-CoA ; CERS3, \geq C18-CoA ; CERS4, C18, C20-CoA ; CERS5, C16-CoA ; CERS6, C16-CoA), それぞれを過剰発現させた細胞ではその活性に従った CER 分子種が増加する⁹¹⁾。CERS および FADS3 の発現量をイムノブロッティングで確認したところ, それぞれの CERS と FADS3 の発現が確認された (図 10A)。これらの細胞を *d*₇-SPH でラベルし, 産生された *d*₇-SPH-CER および *d*₇-SPD-CER の量を LC-MS/MS を用いて測定した。これまでの報告と一致して⁹¹⁾, ベクター導入細胞では各 CERS の過剰発現によってそれぞれの CERS の活性に依存した FA を含む *d*₇-SPH-CER 分子種の量が増加した (図 10B)。FADS3 過剰発現細胞における *d*₇-SPD-CER の FA 組成は, CERS の発現に依存した *d*₇-SPH-CER の FA 組成と同様であった。HEK 293T 細胞には C26 以上の FA をもつ SPH-CER が殆ど存在しないため, 上述の実験ではこれらに対する FADS3 の活性を評価できなかった。このことを解決するために C26 または C28 アシル CoA 産生を担う脂肪酸伸長酵素 ELOVL1⁹²⁻⁹⁴⁾ と CERS3 を FADS3 と共過剰発現させることで, FADS3 の C26 以上の FA をもつ SPH-CER に対する活性を調べた。イムノブロッティングによってこれら全てのタンパク質の発現が確認された (図 10C)。ELOVL1 と CERS3 の共過剰発現によって C26, C28 の飽和および一価不飽和 FA をもつ *d*₇-SPH-CER が産生された (図 10D)。FADS3 の過剰発現によって, C26, C28 の飽和および一価不飽和 FA をもつ *d*₇-SPD-CER も産生され, その FA 組成は *d*₇-SPH-CER のものと類似していた。以上の結果から, FADS3 は SPH-CER の FA 鎖長に対しては基質特異性を示さないことが明らかとなった。

3.4. FADS3 は炭素数 16–20 の SPH を含有する CER に対して活性を示す

FADS3 の SPH 鎖長に対する特異性について解析を行なった。LCB は水酸基の数 (*d*, 2 つ; *t*, 3 つ), 炭素鎖長, 二重結合の数によって表記され, 例えば炭素鎖長 18 の SPH と SPD はそれぞれ *d*18:1, *d*18:2 と表記される。以後, LCB の炭素鎖長は FA の炭素鎖長に対する C 表記と区別するため *d/t* による表記を行う。脳や表皮では *d*20 や *d/t*16–26 の LCB がそれぞれ存在するが, 一般的な組織や細胞には *d*18 以外の SPH を含有する CER が少ない。そのため, *d*18 以外の SPH を含有する CER に対する FADS3 の活性測定は困難である。そこで, *d*18 以外の LCB を細胞内で産生させるため, 4 種の SPT 複合体のうち, 幅広い鎖長の LCB を産生する SPTLC1/SPTLC3/SPTSSB 複合体^{28,33)}の全てのサブユニットを FADS3 と共に HEK 293T 細胞に過剰発現させた。SPTLC1, SPTLC3, SPTSSB および FADS3 の発現量をイムノブロッティングで確認したところ, 全てのタンパク質の発現が確認された (図 11A)。*d*16–24 の SPH-CER および SPD-CER を LC-MS/MS を用いて定量した結果, *d*23 以外の鎖長をもつ SPH-CER と SPD-CER が検出された (図 11B)。FADS3 過剰発現細胞では *d*17:1–*d*20:1 を含有する SPH-CER がベクター導入細胞と比較して有意に減少

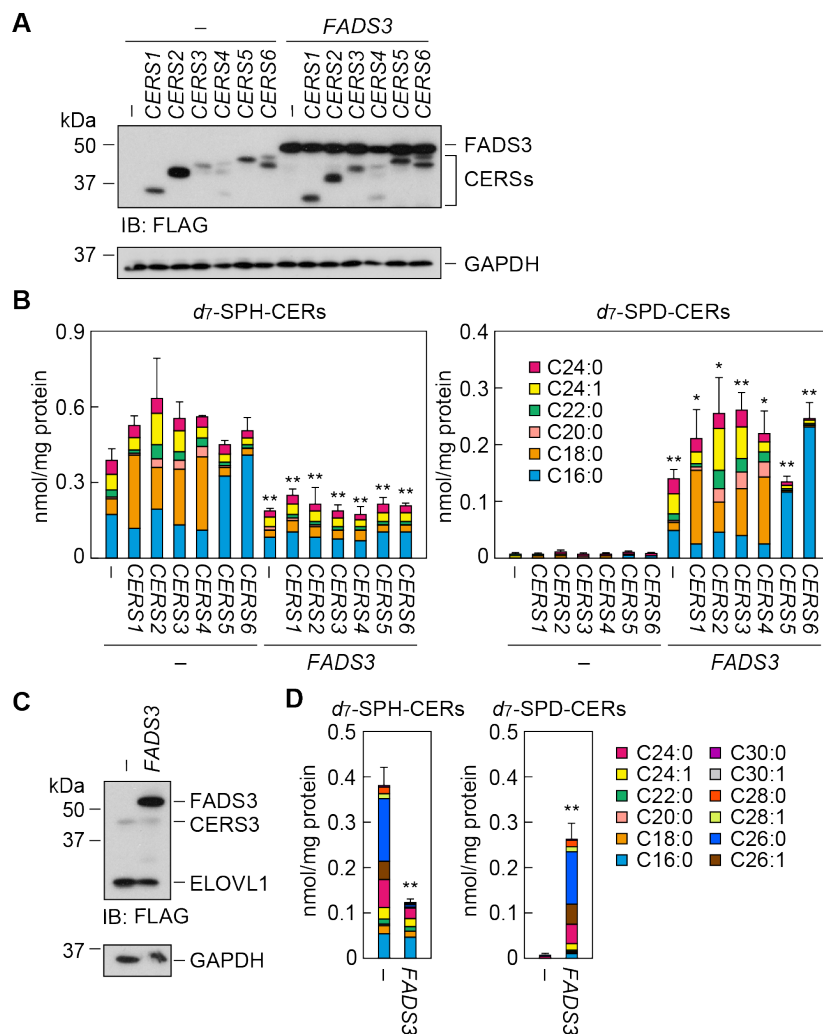


図 10. FADS3 は SPH-CER の FA 鎖長に特異性を示さない

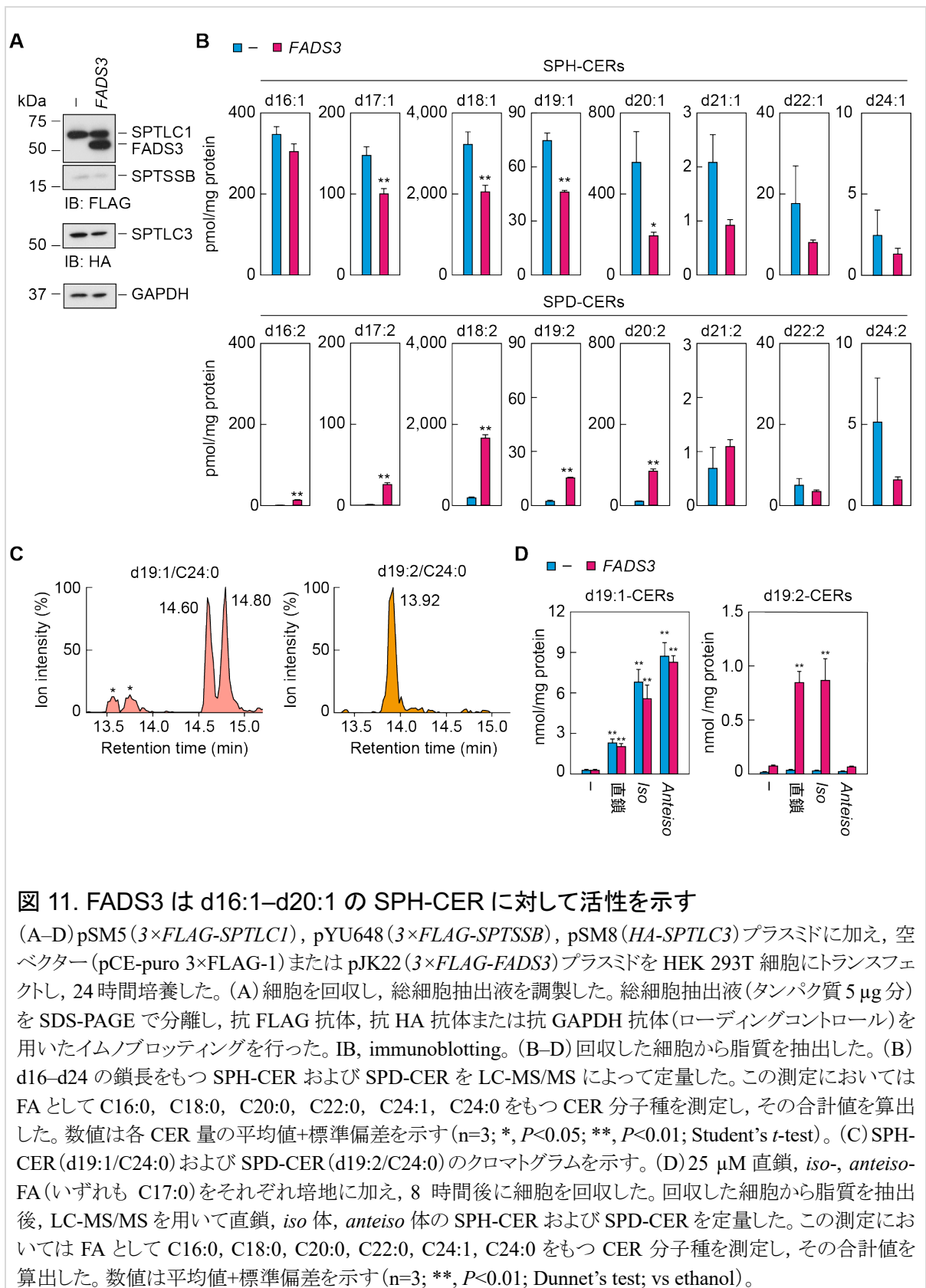
(A, B) HEK 293T 細胞に図に記した組み合わせで空ベクター (pCE-puro 3×FLAG-1), pJK22 (3×FLAG-FADS3), pYU524 (3×FLAG-CERS1), pYU394 (3×FLAG-CERS2), pNS9 (3×FLAG-CERS3), pYU525 (3×FLAG-CERS4), pYU526 (3×FLAG-CERS5) または pYU527 (3×FLAG-CERS6) プラスミドをトランスフェクトし, 24 時間培養した。(A) 細胞を回収し, 総細胞抽出液を調製した。総細胞抽出液 (タンパク質 5 μg 分) を SDS-PAGE で分離し, 抗 FLAG 抗体または抗 GAPDH 抗体 (ローディングコントロール) を用いたイムノブロットングを行なった。IB, immunoblotting。(B) 1 μM d_7 -SPH を含む培地で細胞を 4 時間培養し, 脂質を抽出した。C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:1, C24:0 の FA を含む d_7 -SPH-CER と d_7 -SPD-CER を LC-MS/MS により定量した。値は d_7 -SPH-CER または d_7 -SPD-CER の総量 (FA 鎖長を色分けして表示) の平均 + 標準偏差である (n=3; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; Student's *t*-test; ベクター導入細胞と FADS3 発現細胞の比較)。(C, D) pNS9 (3×FLAG-CERS3), pAK935 (3×FLAG-ELOVL1) プラスミドに加え, 空ベクター (pCE-puro 3×FLAG-1) または pJK22 (3×FLAG-FADS3) プラスミドを HEK 293T 細胞にトランスフェクトし, 24 時間培養した。(C) 細胞を回収し, 総細胞抽出液を調製した。総細胞抽出液 (タンパク質 5 μg 分) を SDS-PAGE で分離し, 抗 FLAG 抗体または抗 GAPDH 抗体 (ローディングコントロール) を用いたイムノブロットングを行なった。IB, immunoblotting。(D) 1 μM d_7 -SPH を加えた培地で細胞を 4 時間培養し, 脂質を抽出した。C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:1, C24:0, C26:1, C26:0, C28:1, C28:0, C30:1, C30:0 の FA を含む d_7 -SPH-CER と d_7 -SPD-CER を LC-MS/MS によって定量した。数値は d_7 -SPH-CER または d_7 -SPD-CER の総量 (FA 鎖長を色分けして表示) の平均値 + 標準偏差を示す (n=3; **, $P < 0.01$; Student's *t*-test)。

した。一方, FADS3 過剰発現細胞において, d16:2–d20:2 含有 SPD-CER の量がベクター導入細胞と比較して増加した。これらのことから, FADS3 が d16–d20 の SPH-CER に対して活性を示すものの, d21 以上の SPH-CER には活性を示さないことが明らかとなった。

哺乳類に存在する LCB の殆どは直鎖であるが, ヒト血漿中には ω -2 位 (*iso*) あるいは ω -3 位 (*anteiso*) がメチル化した分岐鎖も存在する⁹⁵⁾。その産生には SPTLC3 が関わり, SPTLC3 を過剰発現させた HEK 293 細胞中では d19:1 をもつ直鎖 SPH-CER に加えて *anteiso*-SPH-CER が産生される⁹⁵⁾。上記の実験においても SPTLC3 を含む 3 つの SPT サブユニットを HEK 293T 細胞中で過剰発現していることから, *anteiso*-SPH-CER が産生されたと予測された。実際, d19:1 の SPH-CER として, LC クロマトグラム上で 2 本の隣接したピークが検出された。一般的に分岐型は直鎖型よりも逆相カラムで前に溶出されるため, 先と後に溶出されたピークはそれぞれ *anteiso* 型と直鎖型であると思われた (図 11C)。一方で, d19:2 の SPD-CER については単一のピークしか見られなかったことから, FADS3 が直鎖型 SPH-CER へのみ活性を示し, *anteiso* 型 SPH-CER には活性を示さない可能性が示唆された。この可能性を調べるため, 直鎖, *iso*-, *anteiso*-の C17:0 FA (d19-CER の前駆体) を SPTLC1, SPTLC3, SPTSSB および FADS3 が過剰発現した細胞に取り込ませ, d19:1 の SPH-CER 量および d19:2 の SPD-CER 量を LC-MS/MS で定量した。その結果, d19:1 の SPH-CER は FADS3 の過剰発現の有無に関わらず, いずれの FA を添加した細胞でも合成された (図 11D)。一方, d19:2 の SPD-CER については FADS3 過剰発現細胞において直鎖および *iso*-FA 添加によって産生された一方, *anteiso*-FA 添加では産生されなかった。このことから, FADS3 が直鎖および *iso* 型の SPH-CER に対して活性を示すものの, *anteiso* 型の SPH-CER には活性を示さないことが明らかとなった。

3.5. FADS3 は DHS-CER に対して活性を示す

DHS-CER の 4 位に二重結合を導入する不飽和化酵素をコードする *DEGSI* の変異患者や KO 細胞では, 健常人や WT のヒト培養細胞では見られない, 4 位に二重結合をもたず 14 位に二重結合をもつ 14Z-SPH-CER が存在する⁸²⁾。この 14Z-SPH-CER は FADS3 が DHS-CER を基質として産生している可能性が考えられた。そこでこのことを検証するために, *DEGSI* を KO させた HAP1 細胞 (*DEGSI* KO 細胞) に FADS3 を過剰発現し, *d*₇-DHS でラベルし, 産生された *d*₇-14Z-SPH-CER を LC-MS/MS で定量した。その結果, FADS3 を過剰発現させた細胞ではベクター導入細胞と比較して *d*₇-14Z-SPH-CER の量が 4 倍程度多く産生された (図 12A)。このことから FADS3 が SPH-CER に加えて DHS-CER に対しても活性を示すことが明らかとなった。次に, ベクターを導入あるいは FADS3 を過剰発現させた HEK 293T 細胞から総細胞抽出液を用いて, C6-SPH-CER と C6-DHS-CER に対する *in vitro* の FADS3 活性を調べた。FADS3 は C6-14Z-SPH-CER と C6-SPD-CER のどちらも産生したが,



産生された量は C6-14Z-SPH-CER に比べて C6-SPD-CER の方が 2 倍程度多かった(図 12B)。これらのことから、FADS3 は DHS-CER よりも SPH-CER に対して高い活性を示すことが明らかとなった。

SPD-CER の合成には 2 つの経路が考えられる。1 つ目の経路(経路 1)では、DHS-CER は DEGS1 によって SPH-CER に変換され、次に FADS3 によって SPD-CER に変換される(図 12C)。DEGS1 が DHS-CER に対して活性を示すことは過去の報告で知られており⁴¹⁾、FADS3 が SPH-CER に対して活性を示すことは本研究で明らかにしているため(図 9)、この経路の存在は証明されている。2 つ目の経路(経路 2)では、DHS-CER は FADS3 によって 14Z-SPH-CER に変換され、次に DEGS1 によって SPD-CER に変換される。FADS3 が DHS-CER を 14Z-SPH-CER に変換することは先述の実験で示したが(図 12B)、14Z-SPH-CER に対する DEGS1 の活性は未だ不明であった。そこで、この活性の有無を調べるため、HAP1 WT 細胞と *DEGS1* KO 細胞に 14Z-SPH を加えインキュベートした後、産生された 14Z-SPH-CER と SPD-CER を LC-MS/MS で定量した。WT 細胞では SPD-CER 産生が 14Z-SPH 処理によって増加したが、*DEGS1* KO 細胞では変化しなかった(図 12D)。一方で *DEGS1* KO 細胞における 14Z-SPH-CER の量は WT 細胞よりも多かった。これらの結果から 14Z-SPH-CER を介しても SPD-CER を生成できること(経路 2)が示された。

3.6. FADS3 は CYB5A と共役して SPD を産生する

これまで FADS3 による不飽和化反応において NADH と NADPH のどちらが電子供与体として働くかは不明であった。そこで、不飽和化反応へのこれらの電子供与体の関与の違いを調べるため、FADS3 を過剰発現させた HEK 293T 細胞から調製した総細胞抽出液を酵素源とし、C6-SPH-CER を基質に用いて、NADH または NADPH の存在下での FADS3 の活性を調べた。その結果、NADH の NADPH どちらかを加えた場合でも、C6-SPD-CER は産生され、その産生量は同等であった(図 13A)。このことから FADS3 の不飽和化反応では NADH と NADPH の両方が電子供与体として働くことが示された。

FADS3 はシトクロム *b*₅ 様ドメインをもつが、CYB5 と共役して反応を行うかは不明であった。そこで、FADS3 による不飽和化反応への CYB5 の関与を明らかにするため、HEK 293T 細胞に小胞体膜局在性の CYB5 である CYB5A を FADS3 と共過剰発現させて解析を行った。CYB5A と FADS3 の発現量をイムノブロットングで確認したところ、いずれの発現も確認された(図 13B)。これらの細胞を *d*₇-SPH でラベルし、産生された *d*₇-SPD-CER 量を LC-MS/MS で調べた。その結果、FADS3 を単独で過剰発現させた細胞中でも *d*₇-SPD-CER が産生されたが、その産生量は CYB5A と共過剰発現によって約 2.1 倍に増加した(図 13C)。このことから、FADS3 の活性は CYB5 との共役によって促進されることが明らかとなった。

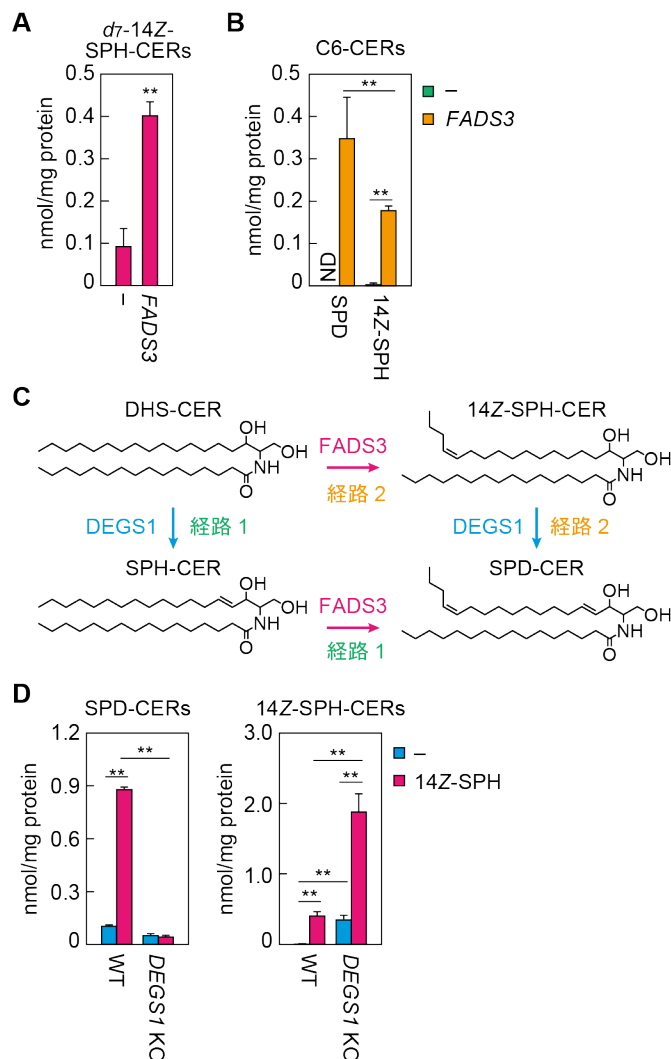


図 12. FADS3 は DHS-CER に対して活性を示す

(A) 空ベクター (pCE-puro 3×FLAG-1) または pJK22 (3×FLAG-FADS3) プラスミドを *DEGS1* KO 細胞にそれぞれトランスフェクトし、24 時間培養した。2 μM *d7*-DHS を培地に加え、4 時間後に細胞を回収した。回収した細胞から脂質を抽出後、*d7*-14Z-SPH-CER を LC-MS/MS によって定量した。この測定においては FA として C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:1, C24:0 をもつ CER 分子種を測定し、その合計値を算出した。数値は平均値+標準偏差を示す (n=3; *, $P<0.05$; Student's *t*-test)。(B) 空ベクター (pCE-puro 3×FLAG-1) または pJK22 (3×FLAG-FADS3) プラスミドを HEK 293T 細胞に導入し、24 時間培養した。細胞を回収し、総細胞抽出液を調製した。総細胞抽出液 (50 μg) に 10 μM C6-DHS-CER または C6-SPH-CER と 1 mM NADH を加えて 37 °C で 10 分間反応させた。反応液から脂質を抽出し、C6-DHS-CER を基質として用いた場合は C6-14Z-SPH-CER, C6-SPH-CER を基質として用いた場合は C6-SPD-CER をそれぞれ LC-MS/MS によって定量した。数値はそれぞれの CER 量の平均値+標準偏差を示す (n=3; **, $P<0.01$; Tukey's test)。(C) DHS-CER から SPD-CER への 2 つの予測される合成経路を示す。DHS-CER から SPD-CER への変換には SPH-CER と 14Z-SPH-CER を介する 2 つの経路の存在が推定される。(D) *DEGS1* KO 細胞を血清および抗生物質を含まない培地で 24 時間培養後、10 mg/mL の FA-free BSA を含む培地に置換し、1 μM 14Z-SPH を加え、4 時間培養した。細胞から脂質を抽出し、SPD-CER および 14Z-SPH-CER を LC-MS/MS によって定量した。この測定においては FA 側に C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:1, C24:0 をもつ CER 分子種を測定し、その合計値を算出した。数値は平均値+標準偏差を示す (n=3; *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; Tukey's test)。

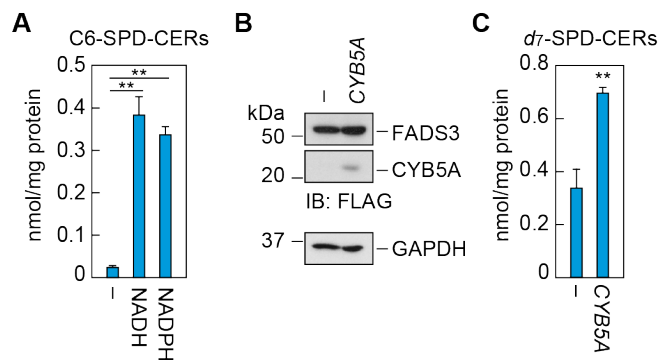


図 13. FADS3 は CYB5A と共役して SPD を産生する

(A) HEK 293T 細胞に 3×FLAG-FADS3 を発現させるプラスミドをトランスフェクトし、24 時間培養後、細胞を回収し、総細胞抽出液を調製した。総細胞抽出液 (50 μg) に C6-SPH-CER と 1 mM NADH または NADPH を加えて 37°C で 10 分間反応させた。反応液から脂質を抽出し、C6-SPD-CER を LC-MS/MS によって解析した。数値は C6-SPD-CER 量の平均値+標準偏差を示す (n=3; **, P<0.01; Tukey's test)。 (B, C) 3×FLAG-FADS3 発現プラスミドに加えて、空ベクター (pCE-puro 3×FLAG-1) または 3×FLAG-CYB5A 発現プラスミドを HEK 293T 細胞にトランスフェクトし、24 時間培養した。 (B) 細胞を回収し、総タンパク質抽出液を調製した。総タンパク質抽出液 (5 μg 分) を SDS-PAGE で分離し、抗 FLAG 抗体または抗 GAPDH 抗体 (ローディングコントロール) を用いたイムノブロットングを行なった。 (C) トランスフェクトした細胞を 1 μM *d7*-SPH を加えた培地で 4 時間培養し、脂質を抽出した。C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:1, C24:0 を脂肪酸部分にもつ *d7*-SPD-CER を LC-MS/MS によって定量し、その合計値を求めた。数値は平均値+標準偏差を示す (n=3; **, P<0.01; Student's *t*-test)。

3.7. *Fads3* は広範な組織に発現し、白色脂肪組織や腎臓で高発現する

Fads3 はタンパク質レベルでは、マウスおよびラットの肺、心臓、腎臓、肝臓、骨格筋で発現していることが明らかにされているものの⁹⁶⁾、mRNA レベルでの発現は調べられていない。また、当研究室ではマウスにおける SPD-CER の組織分布を明らかにし¹⁹⁾、血漿中にスフィンガジエン 1-リン酸 (SPD1P) が存在することが報告にされているが²⁶⁾、*Fads3* の発現分布との関係性は不明である。そこで、マウス 14 組織 (大脳、肺、肝臓、腎臓、骨格筋、白色脂肪組織、血球、小腸、心臓、褐色脂肪組織、脾臓、大腸、精巣、皮膚) から RNA を抽出し、*Fads3* mRNA の発現量を定量的逆転写 PCR (RT-PCR) によって解析した。その結果、*Fads3* は全ての組織で発現しており (図 14)、広範な組織に SPD が存在するという報告と一致した¹⁹⁾。その中でも *Fads3* の発現量は白色脂肪組織で特に高く、次いで腎臓、肺、心臓の順に高い発現を示した。腎臓では白色脂肪組織の 25.8% の発現量であり、肺、心臓ではそれぞれ白色脂肪組織の 16.9%、13.8% であった。脳、骨格筋、脾臓、大腸、褐色脂肪組織では白色脂肪組織の 10% 未満、肝臓、精巣、血球、皮膚では 1% 未満であった。以上のことから、*Fads3* は広範な組織に発現しているものの、その発現量は組織によって大きく異なることが明らかになった。

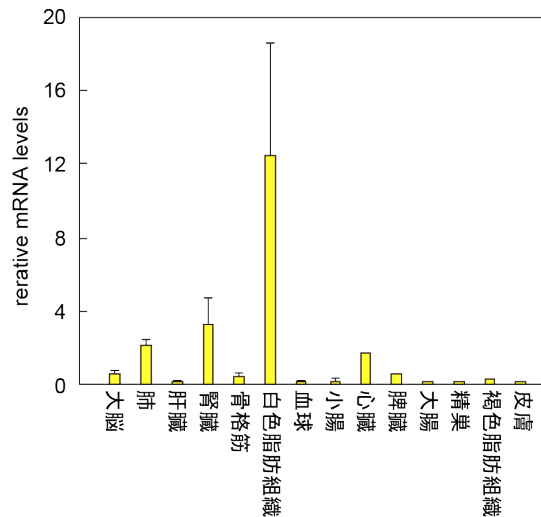


図 14. *Fads3* はマウスの広範な組織に発現する

1 か月齢の雄マウスの脳、肺、肝臓、腎臓、骨格筋、白色脂肪組織、血球、小腸 (n=3)、心臓、脾臓、大腸、精巣、褐色脂肪組織、皮膚 (n=1) から総 RNA を抽出し、*Fads3* に特異的なプライマーを用いて定量的 RT-PCR で発現量を解析した。mRNA 量は脳の Ct 値を 1 とした時の、各組織における Ct 値の平均値 + 標準偏差を示す。

3.8. SPD はスフィンゴ糖脂質よりも SM へ代謝されやすい

複合スフィンゴ脂質への代謝の流れは CER ごとに異なる。SPH-CER と DHS-CER は SM とスフィンゴ糖脂質の両方に代謝されるのに対して、PHS-CER はスフィンゴ糖脂質へ代謝されやすく、SM に代謝されづらい^{63,64}。しかし、これまで SPD の複合スフィンゴ脂質への代謝は不明であった。このことを調べるため、細胞を *d*₇-SPD または *d*₇-SPH でラベルし、それらの複合スフィンゴ脂質への代謝のタイムコースを比較した。ただし、内在的な FADS3 による *d*₇-SPH の *d*₇-SPD-CER への代謝を避けるため、細胞として *FADS3* KO HAP1 細胞を用いた。*d*₇-SPH または *d*₇-SPD 含有 CER, SM および HexCER の量を LC-MS/MS によって調べた。CER の産生は *d*₇-SPH-CER あるいは *d*₇-SPD-CER に関わらず、*d*₇-SPH/*d*₇-SPD を細胞に添加して 5 時間で最大となり、その後減少した (図 15A)。*d*₇-CER の産生量とキネティクス of いずれも *d*₇-SPH と *d*₇-SPD 間で差は見られなかった。*d*₇-HexCER の産生はラベルから 10 時間後に最大値に達し、その後減少した。この減少はより複雑なスフィンゴ糖脂質への変換によるものであると考えられる。どの時間においても、産生された *d*₇-SPH 含有 HexCER の量は *d*₇-SPD 含有 HexCER の量よりも多く、1.7–4.1 倍であった。*d*₇-SPH 含有 SM の量はラベルから 10 時間までは直線的に増加し、24 時間後にさらに若干増加した。*d*₇-SPD 含有 SM の量は *d*₇-SPH 含有 SM 量よりも多く、ラベルから 10 時間の時点で 1.4 倍であった。以上の結果から SPD が SPH と比較して HexCER に代謝されづらく、SM に代謝されやすいことが示唆された。

続いて, *in vivo* における SPD の代謝の流れを調べるため, マウスにおいて SPD-CER 量が多い脳と腎臓¹⁹⁾から脂質を抽出し, SPH または SPD を含有する CER, SM および HexCER 量を LC-MS/MS で調べた。以前の報告と一致して, 脳と腎臓には SPD-CER が多く存在し, SPH-CER 量に対して脳では 19.3%, 腎臓では 46.6%の存在量であった(図 15B, 表 1)。脳には高いレベルの SPH 含有 HexCER(殆どがガラクトシル CER⁹⁷⁾)が存在しているが, SPD 含有 HexCER の量は少なく, SPH 含有 HexCER の 3.2%であった。一方, SPH 含有 SM 量に対する SPD 含有 SM 量は 7.2%であった。このことは SPD-CER が HexCER よりも SM に代謝されやすいという上記の結果と一致した。脳において HexCER(ガラクトシルセラミド)は最終産物である。一方, 腎臓において HexCER はスフィンゴ糖脂質産生経路の代謝中間体であり, 産生後, 大部分が速やかに複雑な糖鎖構造をもつスフィンゴ糖脂質へ変換される。そのため, SPH 含有 HexCER, SPD 含有 HexCER の腎臓における存在量はともに少なかった。SPH 含有 SM と SPD 含有 SM は共に多く存在し, SPH 含有 SM 量に対する SPD 含有 SM のパーセントは 30.0%であった。以上の結果から, SPD の代謝の流れはスフィンゴ糖脂質よりも SM への流れが優勢であることが明らかとなった。

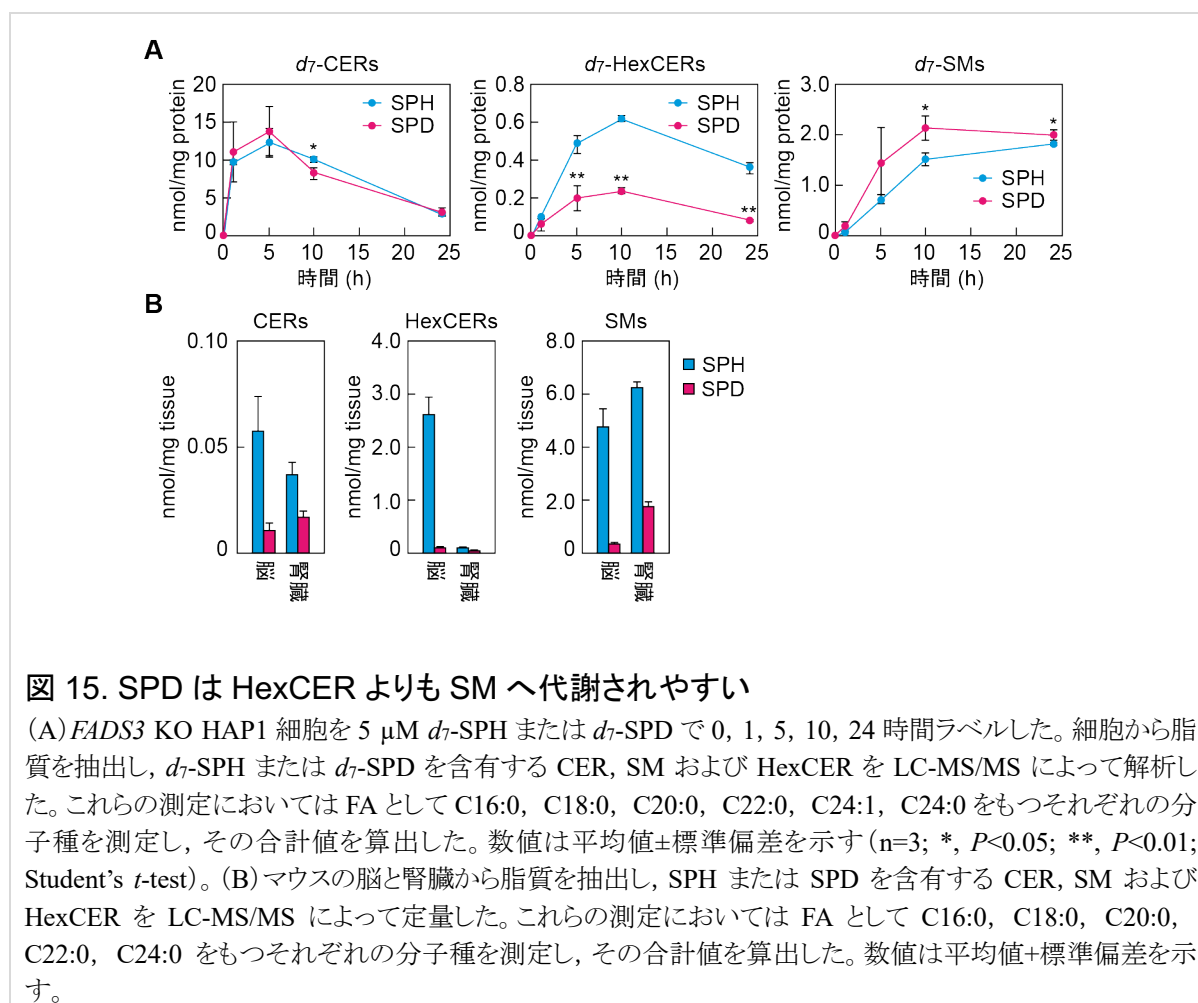


図 15. SPD は HexCER よりも SM へ代謝されやすい

(A) *FADS3* KO HAP1 細胞を 5 μ M *d7*-SPH または *d7*-SPD で 0, 1, 5, 10, 24 時間ラベルした。細胞から脂質を抽出し, *d7*-SPH または *d7*-SPD を含有する CER, SM および HexCER を LC-MS/MS によって解析した。これらの測定においては FA として C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:1, C24:0 をもつそれぞれの分子種を測定し, その合計値を算出した。数値は平均値 \pm 標準偏差を示す (n=3; *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; Student's *t*-test)。(B) マウスの脳と腎臓から脂質を抽出し, SPH または SPD を含有する CER, SM および HexCER を LC-MS/MS によって定量した。これらの測定においては FA として C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0 をもつそれぞれの分子種を測定し, その合計値を算出した。数値は平均値+標準偏差を示す。

3.9. SPD および SPD 1-リン酸代謝酵素の活性解析

LCBはCER, 複合スフィンゴ脂質へ代謝されるだけでなく, SPHK (SPHK1 および SPHK2) によるリン酸化を受けて LCB1P へと代謝される。そこでまず, SPD を含めた LCB 間の構造の違いによるリン酸化への影響を調べるため, *in vitro* における SPHK 活性測定を行なった。3×FLAG-SPHK1 または 3×FLAG-SPHK2 を過剰発現させた HEK 293T 細胞から総細胞抽出液を調製し, イムノブロットングによって発現を確認した(図 16A)。その結果, 発現量は SPHK2 と比較して SPHK1 の方が高かった。調製した総細胞抽出液を用いて 4 種類の LCB (SPH, DHS, PHS および SPD) に対するキナーゼ活性をそれぞれ測定したところ, SPHK1, 2 ともに SPH と DHS に対して高い活性を示し, PHS に対して低い活性を示した(図 16B)。SPD に対しては SPHK1, 2 ともに SPH や DHS と同様に高い活性を示した。アイソザイム間で比較すると, SPH, DHS, SPD に対しては SPHK2 と比べ, SPHK1 の方が活性が高いものの, SPHK1 の発現量が SPHK2 より高いことを考慮すると, アイソザイム間での活性の差は殆どないと考えられる。PHS に対して SPHK1 は殆ど活性を示さず, SPHK2 のみが活性を示した。このことは過去の報告と一致している^{56,57)}。

産生された LCB1P は SPH1P ホスファターゼ (SGPP1 および SGPP2) による脱リン酸化または SPH1P リアーゼ (SGPL1) による開裂を受ける。次に, これらの酵素の活性に対する SPD1P を含めた LCB1P 間の構造の違いの影響を調べた。3×FLAG-SGPP1, 3×FLAG-SGPP2 または 3×FLAG-SGPL1 を過剰発現させた HEK 293T 細胞から膜画分を調製し, それぞれの発現をイムノブロットングによって確認した(図 16C)。その結果, SGPP2 と比較して SGPP1 の発現量の方が高かった。さらに, 調製した膜画分を用いて SGPP1, 2 の 4 種類の LCB1P (SPH1P, DHS1P, PHS 1-リン酸 (PHS1P) および SPD1P) に対する脱リン酸化活性を測定した。SGPP1 は SPH1P, DHS1P, SPD1P に対して高い活性を示し, SGPP2 は SPH1P, DHS1P に対して高い活性を示したが, SPD1P に対しては SPH1P や DHS1P よりやや低い活性を示した(図 16D)。しかし, SGPP1 の方が SGPP2 よりも発現量が高いことを考慮すると, SPD1P へのアイソザイム間での活性の違いは小さいと考えられる。一方, PHS1P に対する SGPP1, SGPP2 の活性は低く, 特に SGPP1 は低い活性を示した。SGPL1 の LCBP に対する開裂活性を調べたところ, SGPL1 は SPH1P, DHS1P に対して高い活性を示し, PHS1P に対して低い活性を示した。一方で, SPD1P に対する SGPL1 の開裂活性は, SPH1P や DHS1P と比較して低く, PHS1P と同程度であった(図 16E)。以上の結果から, LCB は代謝のされやすさについて 3 グループに分類することができた(図 16F)。SPD と DHS に対しては, SPHK, SGPP, SGPL1 いずれも高い活性を示す一方で, PHS に対する活性はいずれも低かった。SPD に対しては, SPHK および SGPP の活性は高いものの, SGPL1 の活性は低く, 他の LCB とは異なる代謝を受けることが示唆された。

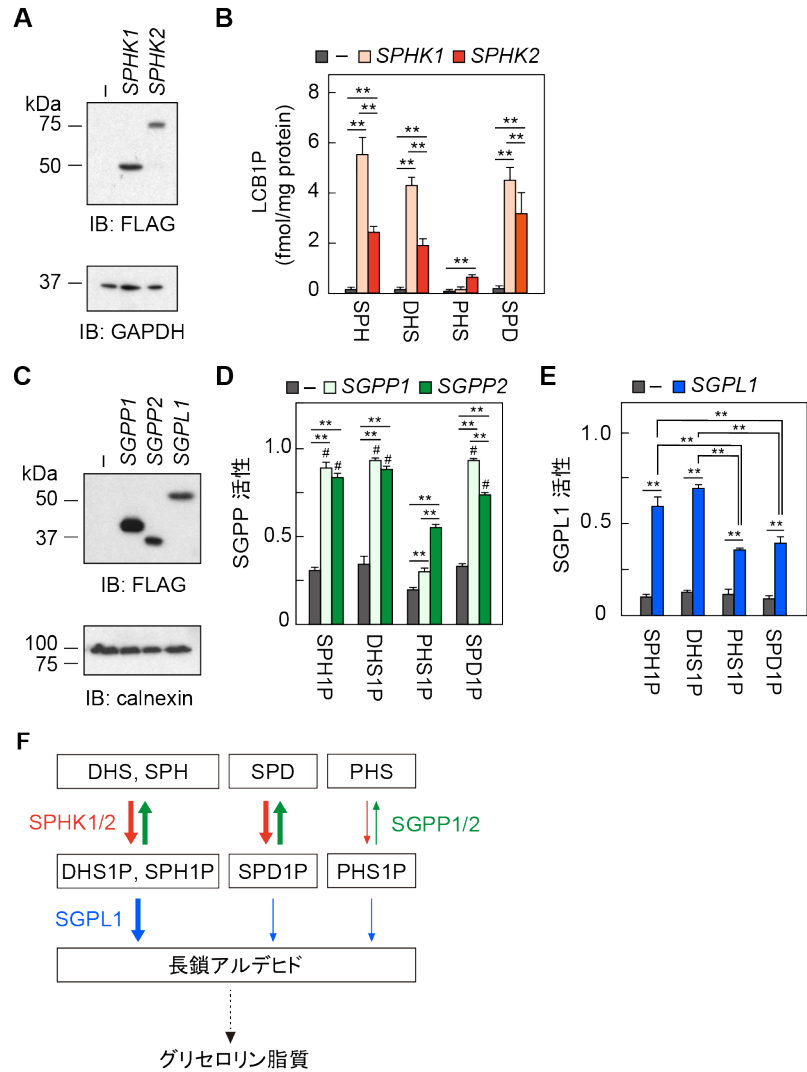


図 16. SPD1P に対する SGPL1 の活性は低い

(A, B) HEK 293T 細胞に空ベクター (pCE-puro 3×FLAG-1), pJK11 (3×FLAG-SPHK1) または, pJK15 (3×FLAG-SPHK2) プラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションから 24 時間後, 細胞を回収し, 総細胞抽出液を調製した。(A) 総細胞抽出液 (タンパク質 5 μg 分) を SDS-PAGE で分離し, 抗 FLAG 抗体, または抗 GAPDH 抗体 (ローディングコントロール) を用いたイムノブロッティングを行った。IB, immunoblotting。(B) 総細胞抽出液 (10 μg) に, 10 μM LCB (SPH, DHS, PHS または SPD) と 0.2 μCi [γ - 33 P]ATP, 0.5 μM ATP を加えて 37°C で 15 分間反応させた。反応後, 脂質を抽出し, TLC により分離した。BAS-2500 を用いて [33 P]LCBP の検出・定量を行なった。数値は [33 P]LCBP 量の平均値+標準偏差を示す (n=3; *, P<0.05, **, P<0.01; Tukey's test)。(C-E) HEK 293T 細胞に空ベクター (pCE-puro 3×FLAG-1; C-E), pCY6 (3×FLAG-SGPP1; C, D), pJK9 (3×FLAG-SGPP2; C, D) および pIKD476 (3×FLAG-SGPL1; C, E) プラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションから 24 時間後, 細胞を回収し, 膜画分を調製した。(C) 膜画分 (5 μg) を SDS-PAGE で分離し, 抗 FLAG 抗体および抗 calnexin 抗体 (膜画分のローディングコントロール) を用いてイムノブロッティングを行なった。IB, immunoblotting。(D, E) 膜画分 (10 μg) に, 22.1 pCi [33 P]LCBP (SPH1P, DHS1P, PHS1P または SPD1P) を加えて 37°C で 10 分間反応させた。反応液を TLC で分離後, BAS-2500 で, [33 P]LCBP, [33 P]正リン酸 (D) および [33 P]PEA (E) の検出, 定量を行なった。(D) SGPP 活性は [33 P]正リン酸量を [33 P]正リン酸量と [33 P]LCBP 量の和で割ることで算出した。各値の平均値+標準偏差を示す (n=3; *, P<0.05; **, P<0.01; vector, SGPP1 および SGPP2 間の活性の比較; #, P<0.01, PHS1P と他の LCBP 間に対する活性の比較; Tukey's test)。(E) SGPL1 活性は [33 P]PEA 量を

[³³P]PEA 量と [³³P]LCBP 量の和で割ることで算出した。各値の平均値+標準偏差を示す(n=3; *, P<0.05; **, P<0.01; Tukey's test)。(F)LCB/LCBP に対する代謝酵素の活性の違いによる LCBP の分類。矢印の太さは各反応を担う酵素の活性の強さを反映している。

3.10. SPD は一価不飽和アシル CoA へ代謝される

LCB の分解経路において、LCB は数段階の反応を経てアシル CoA に代謝される(図 5)。LCB からアシル CoA への代謝は共通の 4 反応(リン酸化, C2-C3 間開裂によるアルデヒド産生, アルデヒドから FA への酸化, CoA 付加)とそれぞれの LCB 毎に特徴的な追加の反応(SPH, 飽和化; PHS, α 酸化)によって行われる⁶²⁻⁶⁴)。これらの反応によって DHS と SPH は 2 炭素短くなった飽和アシル CoA, PHS は 3 炭素短くなった飽和(非水酸化)アシル CoA へと変換される。これらのアシル CoA はそのまま, あるいは $\Delta 9$ 不飽和化/FA 伸長後, 脂質合成(主にグリセロ脂質)あるいは β 酸化による分解を受ける。これまで, SPD がどのようなアシル CoA に代謝されるのかは不明であった。このことを調べるために *d*₇-SPD (d18:2) または, 比較のために *d*₇-SPH (d18:1) で, *FADS3* KO 細胞を 0, 1, 5, 10, 24 時間ラベルし, 産生された *d*₇-FA (アルカリ処理でグリセロ脂質のエステル結合を開裂し, 遊離した *d*₇-FA) の量を LC-MS/MS で調べた。*d*₇-FA の量は 5-10 時間でピークに達し, 24 時間にかけてその量は維持された(図 17A)。*d*₇-SPD と *d*₇-SPH ラベルの間に産生された *d*₇-FA の量と産生のキネティクスに大きな差は見られなかった。*d*₇-SPH (d18:1) から産生された FA 分子種はラベル 1 時間の時点で C16:0 FA が最も多く(55.0%), C18:0 FA (25.1%), C18:1 FA (16.2%)と続いた。ラベルの時間が長くなると C16:0 FA の割合が減少し, C18:1 FA の割合が増加した。このことは, SPH はまず C16:0 アシル CoA へ代謝され, その後 FA 伸長と不飽和化を受けることを示している。一方, *d*₇-SPD (d18:2) から産生された FA 分子種はラベル 1 時間の時点で C16:1 FA が最も多く(52.8%), 次いで C18:1 FA (39.0%), C18:2 FA (4.4%)であった。ラベルの時間が長くなると C16:1 FA の割合が減少し, C18:1 FA と C18:2 FA の割合が増加した。このことは, d18:2 *d*₇-SPD の最初の代謝産物は C16:1-アシル CoA であり, SPD は分解経路で 2 つの二重結合(C14 シスまたは C4 トランス)の一方を失い, *cis*-12-C16:1 または *trans*-2-C16:1 アシル CoA になることを意味している。d18:2 *d*₇-SPD から生成した *d*₇-C16:1 FA の LC における保持時間(4.3 分)は *trans*-2-C16:1 FA (5.6 分)とは大きく異なり, *cis*-9-C16:1 FA (4.4 分)に近かった(図 17B)。このことから, d18:2 SPD の代謝物は *cis*-12-C16:1 FA であると考えられる。SPH の C4 トランス二重結合は代謝の過程で *trans*-2-エノイル CoA レダクターゼによって飽和化される⁶²)。SPD に存在する C4 トランス二重結合に関しても代謝の過程で同様に飽和化される, つまり SPD の C4 トランス二重結合は分解経路で飽和化し, C14 シス二重結合はそのまま残ると考えられる(図 17C)。

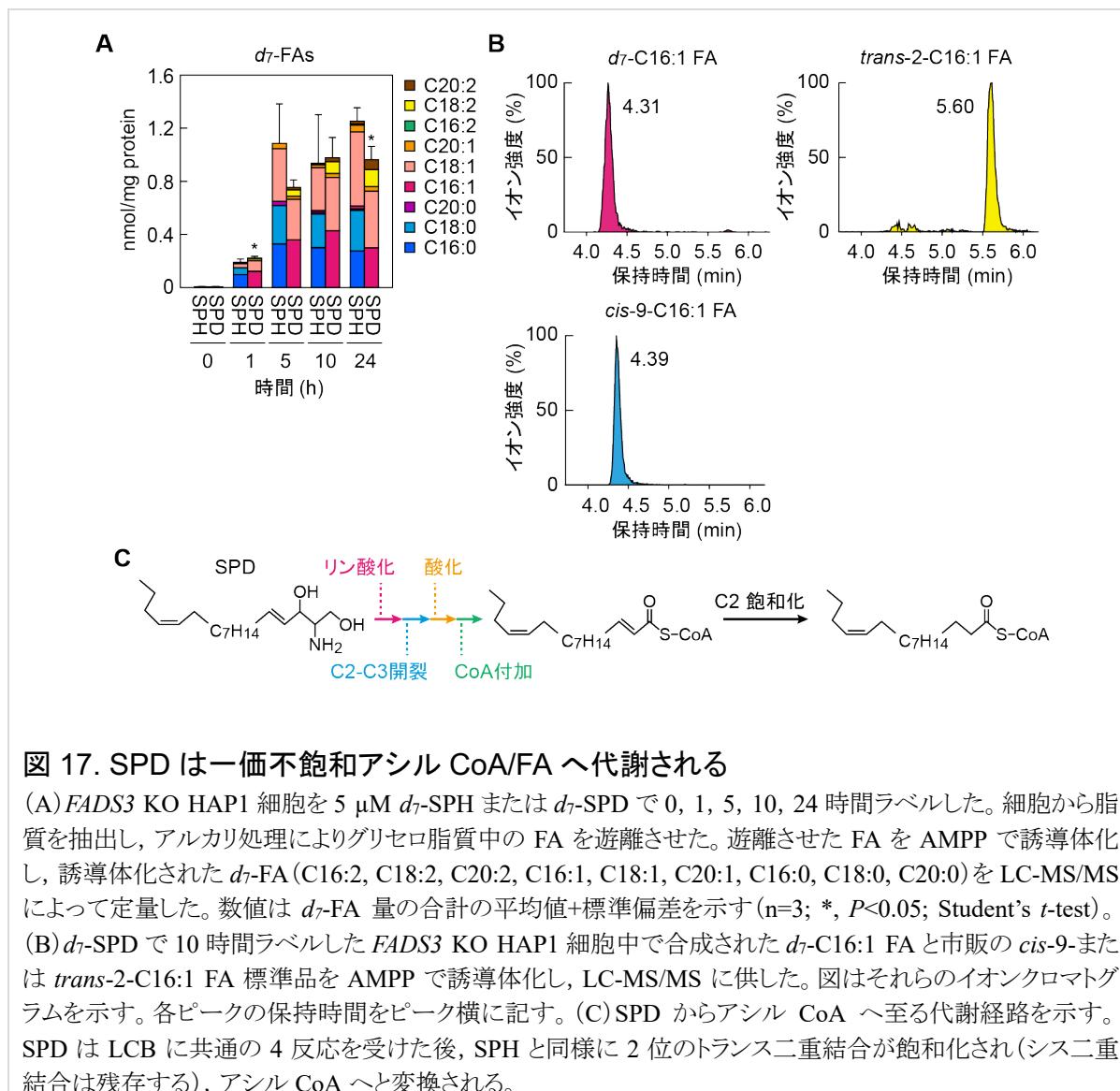


図 17. SPD は一価不飽和アシル CoA/FA へ代謝される

(A) *FADS3* KO HAP1 細胞を 5 μ M *d7*-SPH または *d7*-SPD で 0, 1, 5, 10, 24 時間ラベルした。細胞から脂質を抽出し、アルカリ処理によりグリセロ脂質中の FA を遊離させた。遊離させた FA を AMPP で誘導体化し、誘導体化された *d7*-FA (C16:2, C18:2, C20:2, C16:1, C18:1, C20:1, C16:0, C18:0, C20:0) を LC-MS/MS によって定量した。数値は *d7*-FA 量の合計の平均値+標準偏差を示す (n=3; *, $P < 0.05$; Student's *t*-test)。(B) *d7*-SPD で 10 時間ラベルした *FADS3* KO HAP1 細胞中で合成された *d7*-C16:1 FA と市販の *cis*-9-または *trans*-2-C16:1 FA 標準品を AMPP で誘導体化し、LC-MS/MS に供した。図はそれらのイオンクロマトグラムを示す。各ピークの保持時間をピーク横に記す。(C) SPD からアシル CoA へ至る代謝経路を示す。SPD は LCB に共通の 4 反応を受けた後、SPH と同様に 2 位のトランス二重結合が飽和化され(シス二重結合は残存する)、アシル CoA へと変換される。

3.11. SPD1P は SPH1P と同様の S1PR へのリガンド活性をもつ

LCB1P の S1PR に対するリガンド活性は LCB 構造の違いによってそれぞれ異なることが報告されている^{98,99}。しかし、SPD1P の S1PR に対するリガンド活性は明らかにされていない。そこで、SPD1P の S1PR へのリガンド活性を調べるため、近年開発された GPCR へのリガンド活性解析手法であるトランスフォーム成長因子 α (TGF α) 切断アッセイおよび NanoBiT β アレスチンリクルートアッセイを行なった^{100,101}。TGF α 切断アッセイは、G_{12/13} サブユニットに共役する GPCR の活性化が、TNF α 変換酵素 (TACE) による TGF α の細胞外ドメイン切断を誘導することを応用した GPCR の活性測定法である(図 18A)。TGF α の細胞外ドメインにはアルカリホスファターゼ (AP) が融合しており、切断によって細胞表面から遊離した TGF α -AP 融合タンパク質の AP 活性を測定することで、受容体に対するリガンド活性を評価できる。この方法では、TACE による TGF α 切断活性の誘導能が高い G_{12/13} およ

び G_q 共役型 GPCR の活性測定が可能である。また、 $G\alpha_q$ サブユニットと $G\alpha_i$ または $G\alpha_s$ サブユニットの融合タンパク質を発現させることで G_i および G_s 共役型受容体の活性測定も可能である。NanoBiT β アレスチンリクルートアッセイは、GPCR の活性化後、リン酸化された GPCR に結合し、GPCR の細胞内移行に寄与することが知られる β アレスチンを利用した活性測定法である¹⁰²⁾(図 18B)。この方法では、GPCR と β アレスチンそれぞれにルシフェラーゼタンパク質サブユニット (Small BiT; SmBiT および Large BiT; LgBiT) を融合させる。リガンド刺激により GPCR と β アレスチンが結合すると、ルシフェラーゼのサブユニット同士がそれぞれ近接し、結合できるようになる。サブユニット同士が結合することでルシフェラーゼ活性を発揮できるようになるため、発光基質を加えて発光強度を測定することで、リガンドによる GPCR の活性化を定量的に評価できる。 β アレスチンの結合は $G\alpha$ サブユニットの種類に依存しないため、多くの GPCR の活性測定に利用できる。まず、TGF α 切断アッセイにより、S1PR に対する SPD1P のリガンド活性測定を行なった。ただし、TGF α 切断アッセイでは S1PR4 の活性評価ができないことが報告されているため¹⁰⁰⁾、S1PR1、S1PR2R、S1PR3、S1PR5 に対する SPD1P のリガンド活性測定を行なった。S1PR1、S1PR2 および S1PR5 は、単独発現では TACE 活性が低いため、各受容体と AP-TGF α に加え、 $G\alpha_q$ と $G\alpha_{i3}$ との融合タンパク質 ($G\alpha_{q/i3}$) を共過剰発現する必要がある¹⁰⁰⁾。一方、S1PR3 は単独発現でも TACE 活性の誘導活性が高く、S1PR3 に対するリガンド活性は S1PR3 と AP-TGF α を共過剰発現させることで評価できる¹⁰⁰⁾。そこで、S1PR3 の活性化の評価にはベクターのみを導入した細胞のコントロール(図 19A)、S1PR1、S1PR2 および S1PR5 の活性化の評価にはベクターと $G\alpha_{q/i3}$ を共過剰発現した細胞のコントロールを用意した(図 19B)。その結果、いずれのコントロール細胞においても SPH1P、SPD1P とともに 1,000 nM 以外では殆ど活性を示さなかった。SPH1P、SPD1P とともに S1PR1 および S1PR2 に対して同程度のリガンド活性を示した(図 19C, D)。S1PR3 へのリガンド活性は SPH1P と比較して、0.1 nM までは SPD1P の活性が低いが、1–10 nM においては SPD1P の方が高く、1,000 nM では SPD1P の方が低い活性を示した(図 19E)。しかし、これらの活性の差は小さいことからリガンド活性の違いは殆どないと考えられる。また、S1PR5 に対する活性は、100–1,000 nM において SPD1P は SPH1P よりも 15%程度低く、高濃度における活性が低いことが明らかになった(図 19F)。

これらの活性の違いを別の系によっても検証し、また S1PR4 へのリガンド活性を評価するため、NanoBiT β アレスチンリクルートアッセイを行なった。S1PR1–5 それぞれに改変ルシフェラーゼの断片である SmBiT を融合したタンパク質 (S1PR1-SmBiT, S1PR2-SmBiT, S1PR3-SmBiT, S1PR4-SmBiT または S1PR5-SmBiT) と β アレスチンに改変ルシフェラーゼの断片である LgBiT を融合したタンパク質を共過剰発現させ、各濃度の SPH1P または SPD1P をそれぞれ添加し、ルシフェラーゼ活性を調べた。その結果、ベクター導入細胞においては SPH1P、SPD1P どちらも低いリガンド活性を示した(図 20A)。SPD1P は SPH1P と比較して、S1PR1 に対しては 10–320 nM、S1PR2 には 3.2–32 nM、S1PR3 には 10–32 nM

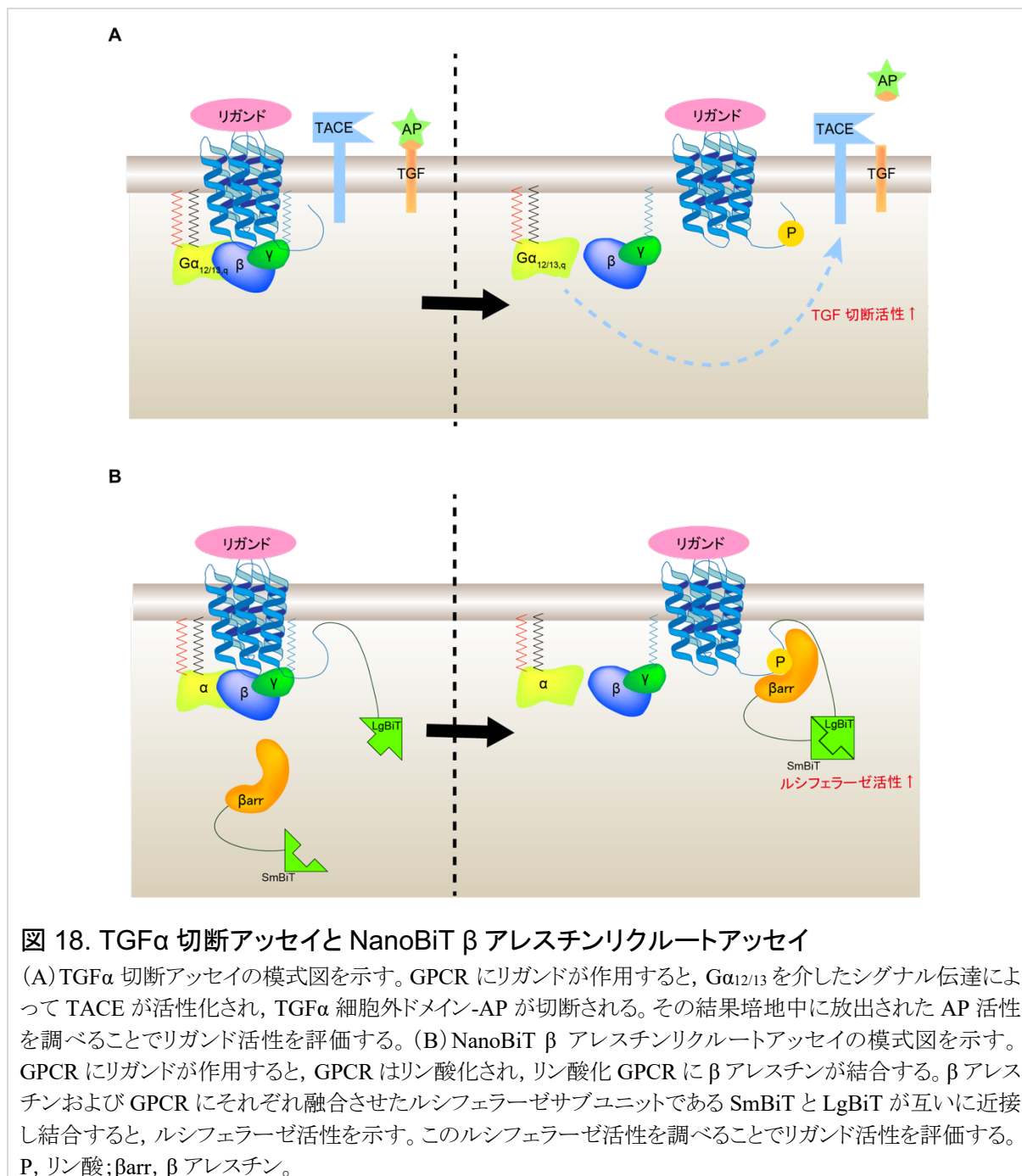


図 18. TGFα 切断アッセイと NanoBiT β アレスチンリクルートアッセイ

(A) TGFα 切断アッセイの模式図を示す。GPCR にリガンドが作用すると、Gα_{12/13} を介したシグナル伝達によって TACE が活性化され、TGFα 細胞外ドメイン-AP が切断される。その結果培地中に放出された AP 活性を調べることでリガンド活性を評価する。(B) NanoBiT β アレスチンリクルートアッセイの模式図を示す。GPCR にリガンドが作用すると、GPCR はリン酸化され、リン酸化 GPCR に β アレスチンが結合する。β アレスチンおよび GPCR にそれぞれ融合させたルシフェラーゼサブユニットである SmBiT と LgBiT が互いに近接し結合すると、ルシフェラーゼ活性を示す。このルシフェラーゼ活性を調べることでリガンド活性を評価する。P, リン酸; βarr, β アレスチン。

の濃度において、高いリガンド活性を示した(図 20B-D)。一方で、SPD1P は S1PR2 に対しては 3,200 nM, S1PR3 に対しては 320-3,200 nM の濃度において SPH1P よりも低いリガンド活性であった。また、S1PR1 に対しても、3,200 nM における SPD1P のリガンド活性は SPH1P よりもやや低い傾向を示した。しかし、その活性の差は小さいことから両者のリガンド活性に大きな違いはなく、生物学的に意味のある差ではないと考えられる。また、SPD1P は S1PR4 に対しては 320 nM 以上の濃度において、S1PR5 に対しては 32 nM 以上の濃度で SPH1P よりも低いリガンド活性を示した(図 20E, F)。このことから、SPD1P の S1PR4, 5 へのリガンド活性は高濃度域において SPH1P より低いことがわかった。SPH1P と SPD1P の S1PR に対

するリガンド活性を比較すると両アッセイ間でやや違いが見られた。これは受容体の活性をモニターする方法が異なることに起因すると考えられる。しかし、いずれのアッセイ系においても SPH1P と SPD1P のリガンド活性には大きな違いが認められなかったことから、S1PR に対する SPH1P と SPD1P のリガンド活性は同程度であると考えられる。

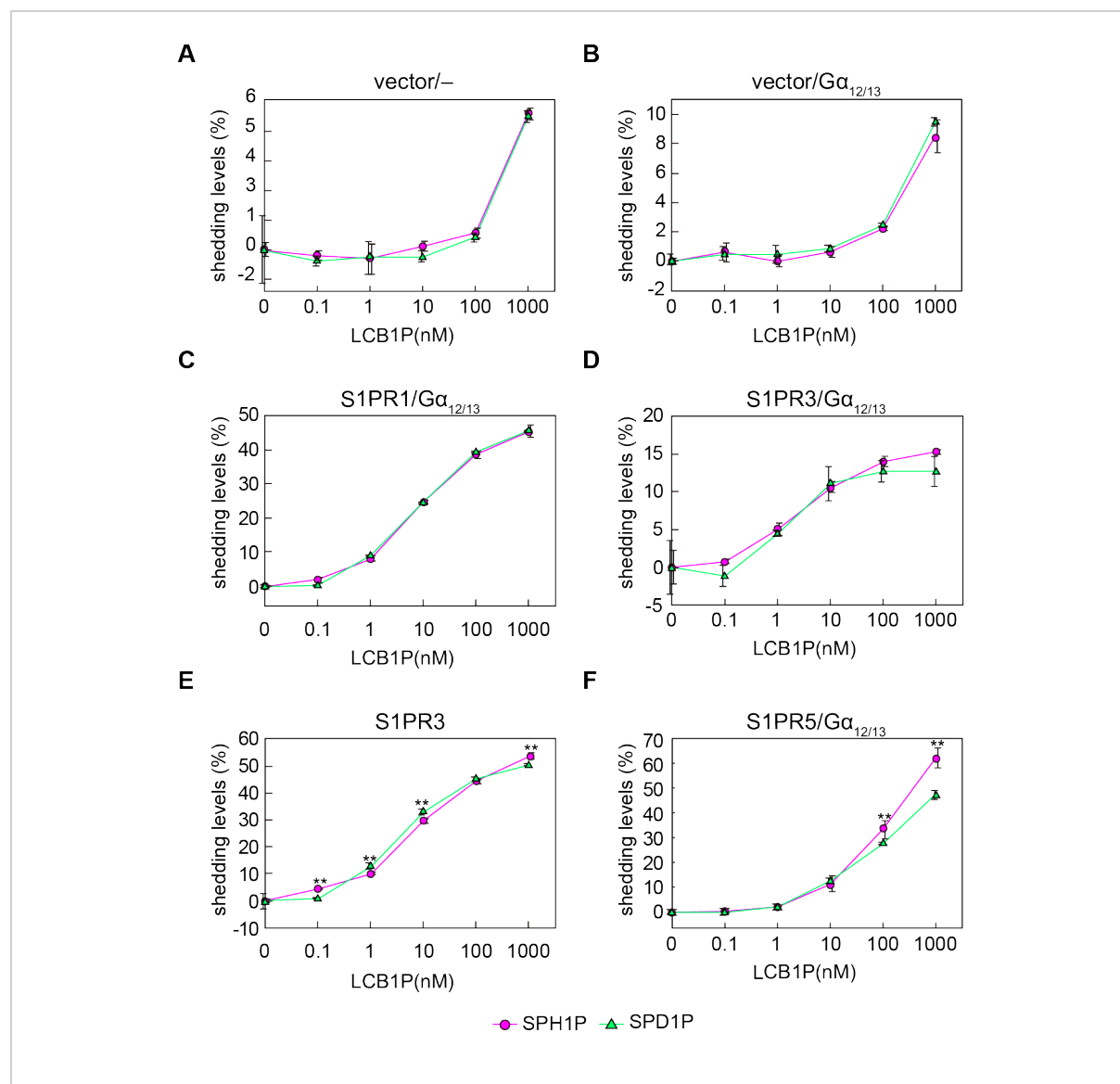


図 19. TGFα 切断アッセイを用いた SPD1P のリガンド活性解析

(A-E) HEK 293A 細胞に AP-TGFα 融合タンパク質, pCAGGS (vector; A), pCAGGS と Gα_{q/i3} (B), S1PR1 と Gα_{q/i3} (C), S1PR2 と Gα_{q/i3} (D), S1PR3 (E) および S1PR5 と Gα_{q/i3} (F) をコードするプラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションから 24 時間後, 96-well プレートに細胞を播種し, 30 分培養した。SPH1P または SPD1P を 0, 0.1, 1, 10, 100 または 1,000 nM の濃度でそれぞれ添加した。グラフの横軸はリガンド濃度の常用対数値で示す。縦軸 (shedding levels) には 0 nM の時の TGFα 切断活性を 0% とした時の各濃度における切断活性の平均値 ± 標準偏差を示す (n=3; **, P<0.01; Student's t-test)。

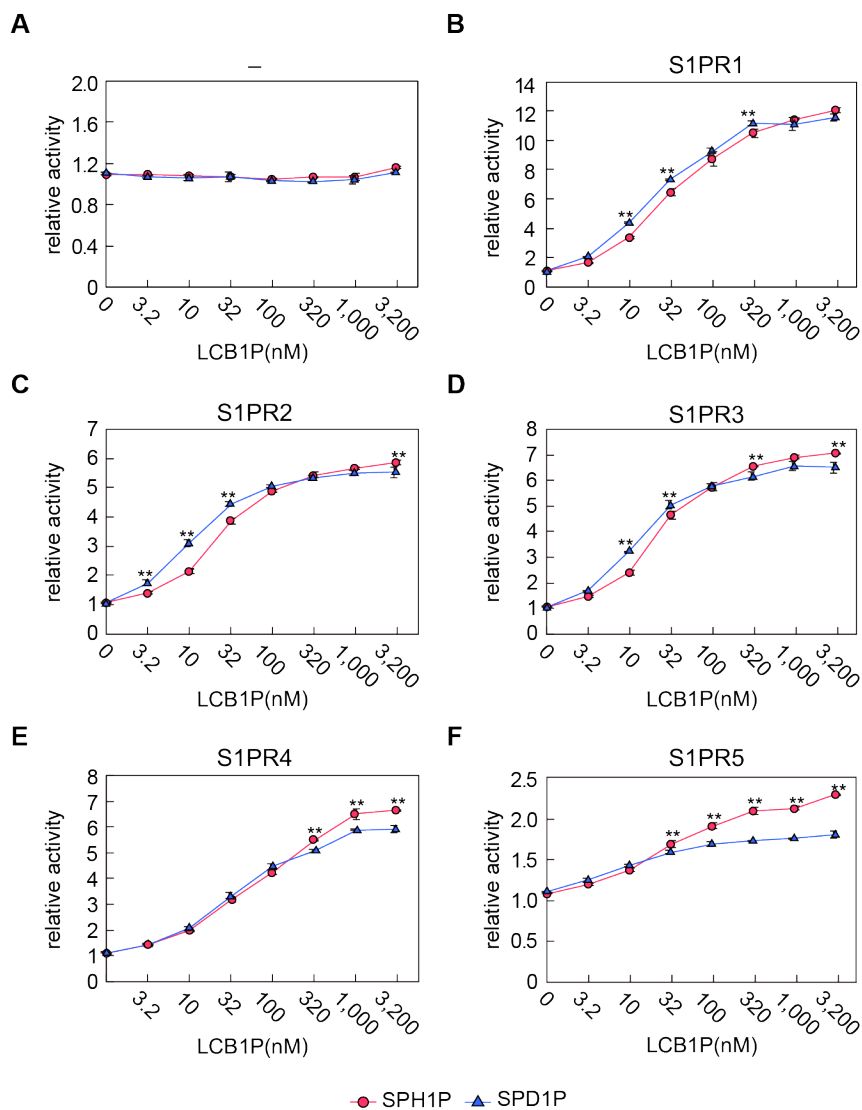


図 20. NanoBiT β アレスチンリクルートアッセイを用いた SPD1P のリガンド活性解析

(A-F) HEK 293A 細胞に *LgBiT- β arrestin1* と pCAGGS (vector; A), *S1PR1-SmBiT* (B), *S1PR2-SmBiT* (C), *S1PR3-SmBiT* (D), *S1PR4-SmBiT* (E) および *S1PR5-SmBiT* (F) をコードするプラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションから 24 時間後、96-well プレートに細胞を播種し、発光基質として *coelenterazin* (終濃度 10 μ M) を加え、暗条件、室温で 2 時間インキュベートした。SpectraMax L でベースラインの発光強度を測定後、SPH1P または SPD1P を 0, 3.2, 10, 32, 100, 320, 1,000 または 3,200 nM の濃度でそれぞれ添加し、添加直後から 20 秒ごと 15 分間の発光強度について SpectraMax L を用いたカイネティクス測定を行なった。グラフの横軸はリガンド濃度の常用対数値で示す。縦軸はベースラインの活性値を 1 とした時の各濃度のリガンド添加時における活性値の平均値 \pm 標準偏差を示す (n=2; **, $P < 0.01$; Student's *t*-test)。

4. 考察

4.1. SPD の生合成

SPD の 14 位シス二重結合を導入する酵素は未同定であったが、本研究により、機能未知タンパク質であった FADS3 が同定された(図 8)。FADS3 の基質としては遊離の SPH または SPH-CER が考えられたが、本研究では 3 種類の実験を行い、その基質を調べた。まず、FADS3 の SPH-CER に対する活性を検証するために、FADS3 過剰発現細胞に取り込ませた C6-SPH-CER が C6-SPD-CER へ代謝されるかを調べたところ、FADS3 が細胞系において SPH-CER に対して活性を示すことが明らかになった(図 9A)。次に遊離の SPH に対する活性を調べるために、FB₁ 処理した FADS3 過剰発現細胞に *d*₇-SPH を取り込ませ、*d*₇-SPD に代謝されるか調べたところ、FB₁ 処理の有無に関わらず *d*₇-SPD は検出されなかった(図 9B)。さらに、FADS3 の *in vitro* における活性測定を行い、C6-SPH-CER と *d*₇-SPH それぞれに対する不飽和化活性を調べた。その結果、FADS3 は C6-SPH-CER に対してのみ活性を示し、FADS3 が *in vitro* においても SPH-CER に対して活性を示すことが明らかになった(図 9C)。これらの結果から、FADS3 の基質は遊離の SPH ではなく SPH-CER であることが示唆された。加えて、我々は以前の研究で HEK 293T 細胞を *d*₇-SPH あるいは *d*₇-DHS でラベルし、*d*₇-SPD-CER 合成へのタイムコースを調べた¹⁹⁾。前述の通り、細胞内の DHS が遊離の SPH に代謝される際、DHS が直接不飽和化されることはなく、サルベージ経路を介さなければ SPH は産生されない(図 3)。すなわち、FADS3 が遊離の SPH を基質とする場合、*d*₇-SPH でラベルした細胞と比較して *d*₇-DHS でラベルした細胞の方が *d*₇-SPD-CER 産生が遅れると考えられた。しかし、両者の *d*₇-SPD-CER 産生のタイムコースは類似しており、このことは FADS3 が SPH-CER を基質とする裏付けであると考えられる。一方、FADS3 が SPH-CER に加えて遊離の SPH に対しても活性を示すという相反する報告もなされている¹⁰³⁾。その報告では、本研究と同様に FB₁ を添加した細胞における活性測定と *in vitro* の活性測定の結果に基づいて結論が導き出されていた。前者の実験では、FB₁ を添加することで *d*₇-SPH と *d*₇-SPD の比率が 30%程度まで減少するが、FB₁ を添加しても *d*₇-SPD の産生が完全に消失していないことを、FADS3 が SPH を基質にできる根拠としていた。しかし、その実験では FADS3 を過剰発現させていない細胞を用いていたため、内在性の FADS3 に由来する低い活性で評価しており、*d*₇-SPD/*d*₇-SPH 比が FB₁ 添加前後でそれぞれ約 0.03, 0.01 と低く、正確な活性評価ができていない可能性が高い。また、*in vitro* における活性測定においては、FADS3 過剰発現細胞の総細胞抽出液と C6-SPH-CER または *d*₇-SPH と反応させた 5 分後に C6-SPD-CER 及び *d*₇-SPD が増加したことが SPH も FADS3 の基質であるという根拠とされた。しかし、その実験では使用した補酵素が還元型の NADH ではなく酸化型の NAD⁺であり、FADS3 への電子供与ができないものであった。実際、産生された C6-SPH-CER と *d*₇-SPD の量は使用した基質に対してそれぞれ、<0.1%、

<1%であり、活性測定が正確に行われていないことが考えられる。また、この実験においてはベクターコントロールのデータが測定されていなかった。我々が今回行った *in vitro* における活性測定では、基質として用いた C6-SPH-CER の約 3.5%が C6-SPD-CER へと変換されており(図 9C)、前報の約 50 倍近くの活性であった。また、ベクターコントロールと比較して 3,000 倍近い活性の上昇が見られているため、FADS3 の正確な活性測定ができていると考えられる。これらの結果から、FADS3 の主要な基質は SPH ではなく SPH-CER であると結論づけた。

一般的な酵素の基質認識には基質の極性基の構造が重要である。SPH と SPH-CER が有する窒素原子はそれぞれアミンとアミドの構造をとり、前者は立体的な構造、後者は平面構造であることから構造が大きく異なる。そのため、酵素が基質に対して高い特異性を示すという観点からみても FADS3 が SPH と SPH-CER どちらにも活性を示すとは考え難い。さらに、FADS3 と同じ FADS ファミリーに属する DEGS1/FADS7 と DEGS2/FADS8 の基質は DHS-CER であり、遊離の DHS を基質としないことから FADS3 の基質が SPH-CER であり、遊離の SPH は基質としないという本研究の結果が支持される。FADS ファミリーの基質はカルボン酸やケトン、アルデヒドではなく、チオエステル(FADS1, FADS2, FADS4/SCD5, FADS5/SCD1)もしくはアミド(FADS3, FADS7/DEGS1, FADS8/DEGS2)由来のカルボニル基をもっているという点で共通しており、これらのカルボニル基の基質認識への重要性が窺える。実際、ヒト SCD1 の結晶構造解析において 262 番目のトリプトファン残基の水素原子とアシル CoA のカルボニル基の酸素原子が水素結合によって結合していることが明らかになっている^{104,105}。

FADS3 が SPH-CER に対して活性を示すことから、SPD-CER は DEGS1 による DHS-CER の SPH-CER への変換後、FADS3 による不飽和化によって産生されると想定される。加えて、FADS3 は DHS-CER に対しても活性を示し、DEGS1 が 14Z-SPH-CER に対して活性を示したことから(図 12)、SPD-CER は DHS-CER, 14Z-SPH-CER, SPD-CER の順でも産生されることが明らかとなった。ただし、*in vitro* の活性測定において、DHS-CER に対する FADS3 の活性は SPH-CER の半分程度であった(図 12B)。さらに、WT の細胞では 14Z-SPH-CER が殆ど検出されなかったこと(図 12D)からも、主要な SPD 合成経路は DHS-CER, SPH-CER, SPD-CER の順であると推測される。

4.2. FADS3 の酵素学的性質

本研究では SPH-CER を構成する FA と SPH のそれぞれの鎖長に対する FADS3 の基質特異性についても明らかにした。FA 部分に関して FADS3 は C16-C30 の幅広い鎖長に対して活性を示した(図 10B, D)が、SPH 部分の鎖長については d16-d24 のうち d16-d20 のものにのみに対して活性を示した(図 11B)。FADS ファミリータンパク質のうち、マウスの

SCD は C20 よりも長いアシル CoA に活性を示さない⁸³⁾。また、ヒト SCD1 の結晶構造解析から基質のアシル鎖が疎水性のトンネルに入り込んでいることがわかっており、このトンネルの奥行きに制限があることが SCD が C20 よりも長いアシル CoA に活性を示さない理由であると考えられている¹⁰⁴⁾。FADS3 についても同様の疎水ポケットがあると仮定すると、疎水ポケットに収まらない鎖長の長い SPH 部分をもつ CER に対しては活性を示さない一方で、FA 部分はポケットに入らないため自由度が高いと推測できる。また、FADS3 は *anteiso-d19:1* SPH-CER に対して活性を示さなかった(図 11D)。FADS3 は SPH の 14–15 間のシス二重結合を導入するが、*anteiso-d19:1* SPH は二重結合形成位置に隣接した 16 位の炭素が分岐していることから、その立体障害によって FADS3 の活性が発揮されないと考えられる。

FADS3 の反応における電子供与体については、解析が行われている他の FADS と同様、NADH と NADPH であることが明らかとなった(図 13A)。CYB5 を還元する酵素はシトクロム *b*₅ レダクターゼとシトクロム P450 オキシドレダクターゼが知られており、それぞれ主に NADH と NADPH から電子を供給する^{106,107)}。FADS3 の不飽和化活性において NADH と NADPH の間に選択性がないことから、この反応において両者のシトクロム *b*₅ 還元酵素から電子供給が行われていることが示唆された。FADS3 は FADS1 や FADS2 と同様シトクロム *b*₅ 様ドメインをもつ。FADS2 は CYB5 が非存在においても活性を示す一方で、CYB5 存在下で活性が増強することが報告されている⁸⁷⁾。今回、FADS3 の反応においても CYB5A が活性を増強した(図 13B)。このことから、FADS3 の不飽和化反応における電子伝達ではシトクロム *b*₅ 還元酵素から直接 FADS3 のシトクロム *b*₅ 様ドメインへ電子伝達する経路と、シトクロム *b*₅ 還元酵素から CYB5A を介して FADS3 の活性中心へ電子伝達する経路の 2 種類が存在し、後者の方がより効率的であることが示唆された。

4.3. SPD の複合スフィンゴ脂質代謝と組織分布

SPD は LCB の中で唯一シス二重結合を有しているため、代謝という点で他の LCB とは異なることが予測された。事実、*FADS3* KO 細胞への LCB 添加実験から、SPD が SPH に比べて HexCER に代謝されづらく、SM に代謝されやすいことが明らかとなった(図 15A)。このことと一致して、マウス脳において SPD 含有 HexCER 量は少なかった(図 15B, 表 1)。SPD 含有 HexCER が細胞や組織で少ない理由としては CER から HexCER への代謝がされづらく可能性が高いが、一般的な細胞や組織に豊富なグルコシルセラミドの多くがガングリオシドといった複数の糖が結合したスフィンゴ糖脂質へ代謝されるため、SPD はそれらに豊富である可能性も残されている。また、細胞を用いたトレーサー実験の結果とは異なり、マウス脳において SPD 含有 SM 量は多く存在していなかった(図 15B)。*FADS3* KO 細胞への LCB 添加実験では一過的な SPD の代謝をトレースしており、組織での SPD 含有スフィンゴ脂質量は SPD の定常状態での存在形態を表している。SM は細胞膜に多く存在し、脂

質マイクロドメインを形成する⁵⁾が、SPD はマイクロドメイン形成に不利なシス二重結合をもつ。実際、我々は以前に SPD 含有 HexCer が脂質マイクロドメイン外部に多く局在していることを明らかにしている¹⁹⁾。このから、脂質マイクロドメイン形成を阻害する SPD 含有 SM は、細胞膜上で一定の量に制御され、余剰分は速やかに分解されている可能性がある。

当研究室ではこれまでに SPD-CER がマウスの広範な組織およびヒト培養細胞に存在することを明らかにしてきた¹⁹⁾。今回、マウス組織で *Fads3* の発現量を調べたところ、調べたすべての組織で *Fads3* mRNA が発現していた(図 14)。*Fads3* の発現量が高い腎臓、肺、心臓などは SPH-CER に対する SPD-CER の割合が高い組織と一致していた¹⁹⁾。白色脂肪組織において SPD 量を測定した報告はないが、*Fads3* の発現量を考慮すると SPD の存在量は多い可能性が考えられる。また、最も発現量が高い白色脂肪組織に対して 1/10 以下の発現量であった骨格筋、肝臓、小腸、脾臓、大腸、精巣、皮膚では、SPH-CER に対する SPD-CER の量が少なく¹⁹⁾、SPD-CER の組織分布と *Fads3* の発現量に相関が見られた。また、脳では SPD-CER が SPH-CER の 30%程度と多く存在していることを明らかにしているが¹⁹⁾、*Fads3* の発現量は高くはなかった。脳のエリノ鞘には、SM やガラクトシルセラミドが豊富に存在していることが知られている⁹⁷⁾。しかし、本実験結果から SPD は脳において HexCer に代謝されづらいことが明らかになった(図 15B, 表 2)。このことを考慮すると脳、特にエリノ鞘では SPD-CER は SM やガラクトシルセラミドに代謝されずに蓄積した一方、SPD-CER としての量は多いが、SPD 含有スフィンゴ脂質の全体量としては多くないことが推測される。

4.4. SPD1P の代謝と機能

LCB および LCB1P に対する代謝酵素の活性は SPH や DHS, PHS に対しては明らかになっているものの^{56,58,63,64,108)}、SPD に対する活性は不明であった。本研究では、*in vitro* 活性測定により、LCB/LCBP の代謝に関連する酵素(SPHK, SGPP および SGPL)が LCB 毎に異なった活性を示すことを明らかにした(図 16)。SPH/SPH1P と DHS/DHS1P はこれらいずれの酵素に対しても代謝を受けやすく、逆に PHS/PHS1P はいずれの代謝酵素に対しても代謝を受けづらかった。SPD はこれらの中間的な特徴を示し、SPHK と SGPP に対しては代謝されやすいものの、SGPL に対しては代謝を受けづらいたことが明らかとなった。これらのことから、SPD は SPH や DHS と比べてグリセロリン脂質へ代謝されづらいたことが示唆された。しかし、細胞を用いた *d7*-SPD のトレーサー実験では *d7*-SPH と同様のキネティクスで FA へ代謝された(図 17A)ことから、実際の細胞内での代謝に影響する程度の活性の差ではないことが示唆された。SPH1P は SGPL1 により開裂を受け、長鎖アルデヒドになった後、数段階の反応を経て C16:0-CoA へ変換され、主にグリセロリン脂質へ代謝される¹⁰⁹⁾。*d7*-SPD のトレーサー実験から SPD も細胞内で同様の異化経路において、まず C16:1 FA に代謝され、

その後 FA 伸長あるいは不飽和化を受けて C18:1 FA や C18:2 FA などの FA へ変換されることが明らかとなった(図 17A)。このように、SPD がもつ 2 つの二重結合の一方が飽和化されずに残っていることが明らかとなったが、その後の LC-MS/MS 解析の LC の保持時間から残存しているのは C14 シス二重結合であることが示された(図 17B)。つまり、SPD の代謝産物は C16:1 (ω -4) FA であることが明らかとなった。 ω -4 系列の FA の存在はこれまで哺乳類では報告されておらず、本研究で初めてその存在が示唆された。SPD 代謝産物と推定される ω -4 系の C16:1 FA, C18:1 FA, C18:2 FA の殆どは遊離の状態ではなく、グリセロ脂質中に存在していた。生体内の SPD の量はグリセロ脂質の量に比べて圧倒的に少ないため、SPD の代謝産物であるこれらの FA の存在は見逃されてきたと思われる。

SPD1P の機能に関して、S1PR へのリガンド活性測定により、SPD1P は S1PR1-3 に対して SPH1P と同程度のリガンド活性を有することが明らかとなった。(図 19, 20)。一方で、S1PR4, 5 に対しては高濃度域におけるリガンド活性が SPH1P より低かった。今回、SPD1P に SPH1P と明確に異なるリガンド活性は認められなかったが、SPH1P が血漿中に数百 nM 程度存在しているのに対して⁴⁴⁾、SPD1P もその 1/10 程度存在していることから^{25,26,110)}、生体において SPD1P は SPH1P と同様、S1PR の内因性アゴニストとして作用していると考えられる。

4.5. SPD の生理的役割

多くの LCB は飽和炭素またはトランス二重結合で構成されているため、直線的な構造をもつ。そのため、疎水性相互作用や水素結合による脂質同士の会合がおこりやすい。また、SM や HexCER などの極性基間の水素結合も脂質マイクロドメイン形成に寄与している^{111,112)}。一方、SPD のシス二重結合は炭素鎖を大きく湾曲させるため、マイクロドメイン形成においては不利な構造であると考えられ、実際に HEK 293T 細胞における SPD 含有 HexCER が脂質マイクロドメインの外部に多く局在していることを当研究室では明らかにしている¹⁹⁾。また、組織では SPD は CER としての存在量が多く、マイクロドメイン形成に関わる SM や HexCER が相対的に少ないことを考えると、SPD は SPH 含有スフィンゴ脂質と異なり、膜の流動性を高めてマイクロドメイン形成を負に制御することで、生体膜の機能調節に関与していると考えられる。SPD が多く存在し、*Fads3* の発現量が高い腎臓では、体内の水分や塩の調節に関わるトランスポーターが複数存在しており、その中にはマイクロドメイン中に局在しているものも存在する^{113,114)}。そのため、SPD はそのトランスポーターの足場である細胞膜の物理的性質を変化させることでトランスポーター活性の調節に重要である可能性が考えられる。脂質膜は温度が低くなるにつれ、流動性の高い液晶相から流動性の低いゲル相へと相転移する。相転移温度は脂質膜の構成脂質の炭素鎖長が短く、不飽和度が高くなると低下する¹¹⁵⁾。そのため、細菌や植物では寒冷時に膜脂質の不飽和化によって膜の

流動性を保持し、低温下でも生育を維持する機構が存在する。その一例として、シロイヌナズナは SPH の 8 位にシスまたはトランス不飽和化を行なうスフィンゴ脂質 $\Delta 8$ 不飽和化酵素 (SLD) をもっており、この酵素の欠損株では低温感受性の成長不全を起こす¹¹⁶⁾。こうした低温環境への適応は、生物にとって重要な役割を果たすことから、シス二重結合を持つ脂質が低温ストレスに対して重要である可能性が考えられる。白色脂肪組織の白色脂肪細胞は寒冷刺激に応じて熱産生機能をもつベージュ細胞へ分化する^{117,118)}。その分化には脱共役タンパク質 1 (UCP1) が関わるが¹¹⁹⁾、その発現と FADS の発現には相関性が認められている¹²⁰⁾。FADS3 が白色脂肪組織に高発現していることから、寒冷刺激と SPD の関係について今後解析する必要があると考えられる。さらに、SPD の細胞内機能に関連した報告として、アポトーシス時に外膜の透過性を亢進させる *Bak/Bax* の二重 KO 細胞ではミトコンドリアの C16:0-SPD-CER が増加することが報告されており、SPD がアポトーシスシグナルと何らかの関与があることが示唆されている¹²¹⁾。また、遺伝子欠損マウスの網羅的解析 (International Mouse Phenotyping Consortium) から、*Fads3* KO マウスでは耳介反射異常、血中アルブミンの増加、聴性脳幹反応の閾値増加および欠如、血中リン酸塩減少が認められている¹²²⁾ことから、SPD 含有スフィンゴ脂質が脳や腎臓においても重要な機能を有している可能性がある。

4.6. 今後の展望

本研究では SPD-CER の生合成酵素として FADS3 を同定し、その基質特異性や補酵素、発現分布を解明した。また、SPD の代謝について複合スフィンゴ脂質への代謝や SPD1P ならびに FA への代謝について詳細に明らかにした。さらに、SPD1P が SPH1P と同様のリガンド活性を示すことを明らかにした。*Fads3* KO マウスは既に作製され、脳と肝臓における PUFA 量の変化が報告されているが¹²³⁾、詳細な表現型解析や SPD に着目した脂質解析は行われていない。当研究室でも *Fads3* KO マウスの作製を既に完了しているが、みかけ上の目立った表現型は見つかっていない。今後は *Fads3* KO マウスの特に腎臓や白色脂肪組織といった SPD-CER が多く存在する組織の機能に着目し、高脂肪食負荷、寒冷刺激や腎臓負荷をかけた際の表現型解析および脂質組成解析により、SPD 含有スフィンゴ脂質の生理機能を解明していきたい。SPD の機能や代謝の詳細が明らかになることで、スフィンゴ脂質が生み出す多彩な生理機能の一端が明らかとなり、スフィンゴ脂質多様性の生理的意義の解明につながることを期待される。

なお、本研究の成果は以下の 2 報の国際学術誌に報告している。

1. Jojima K., Edagawa M., Sawai M., Ohno Y., and Kihara A. (2020) Biosynthesis of the anti-lipid-microdomain sphingoid base 4,14-sphingadiene by the ceramide desaturase FADS3. *FASEB J.*, **34**, 3318-3335.
2. Jojima K., and Kihara A. (2023) Metabolism of sphingadiene and characterization of the sphingadiene-producing enzyme FADS3. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, **1868**, 159335.

5. 材料と方法

5.1. マウス

本研究では C57BL/6J 系統のマウスを用いた。室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、12 時間の明暗サイクル条件下において、通常食 (PicoLab Rodent Diet 20; LabDiet, St. Louis, 米国) および水が常に摂取できる状態でマウスの飼育を行なった。動物実験は北海道大学の動物実験委員会の承認を受け、当委員会の規定を遵守して行なった。

5.2. 細胞培養

細胞は全て 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下で培養した。ヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLa 細胞の培養には $1,000 \text{ mg/L}$ グルコース、ヒト胎児腎由来細胞株 HEK 293T 細胞の培養には $4,500 \text{ mg/L}$ グルコースを含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Merck, Darmstadt, ドイツ) を使用した。ヒト慢性骨髄性白血病由来一倍体細胞株 HAP1 細胞の培養には Iscove's modified Dulbecco's medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, 米国) を用いた。各培地には 10% ウシ胎児血清 (Thermo Fischer Scientific) と 100 units/mL ペニシリン、 $100 \mu\text{g/mL}$ ストレプトマイシン (Merck) を加え、培養に使用した。HEK 293T 細胞は 3% コラーゲン (Cellmatrix Type I-P; 新田ゼラチン, 大阪) でコートしたディッシュで培養した。ヒト胎児腎由来細胞株 HEK 293A 細胞の培養には $1,000 \text{ mg/L}$ グルコースを含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (日水製薬, 東京) を使用し、各培地には 10% ウシ胎児血清 (Thermo Fischer Scientific) と 100 units/mL ペニシリン (Merck) および $100 \mu\text{g/mL}$ ストレプトマイシン (Thermo Fischer Scientific) を加え、培養に使用した。

5.3. プラスミド

N 末端に $3 \times \text{FLAG}$ タグを融合させたタンパク質を細胞に発現させるベクターとして、pCE-puro- $3 \times \text{FLAG}$ -1 または pEFh- $3 \times \text{FLAG}$ -1 ベクターを、N 末端に HA タグを融合させたタンパク質を哺乳類細胞に発現させるベクターとして pCE-puro-HA-1 を用いた¹²⁴⁾。FADS1, FADS2, FADS3, FADS4, FADS5, FADS6, FADS7, FADS8, CERS1, CERS2, CERS3, CERS4, CERS5, CERS6, ELOVL1, SPTLC1, SPTSSB, CYB5A, SGPP1, SGPP2, SGPL1 の過剰発現には各遺伝子を pCE-puro- $3 \times \text{FLAG}$ -1 に導入したプラスミドを使用した (pMED8, $3 \times \text{FLAG}$ -FADS; pMED9, $3 \times \text{FLAG}$ -FADS2; pJK22, $3 \times \text{FLAG}$ -FADS3; pJK23, $3 \times \text{FLAG}$ -FADS4; pJK24, $3 \times \text{FLAG}$ -FADS5; pTK174, $3 \times \text{FLAG}$ -FADS6; pTK265, $3 \times \text{FLAG}$ -FADS7; pAN15, $3 \times \text{FLAG}$ -FADS8; pYU524, $3 \times \text{FLAG}$ -CERS1; pYU394, $3 \times \text{FLAG}$ -CERS2; pNS9, $3 \times \text{FLAG}$ -CERS3; pYU525, $3 \times \text{FLAG}$ -CERS4; pYU526, $3 \times \text{FLAG}$ -CERS5; pYU527, $3 \times \text{FLAG}$ -CERS6; pAK935, $3 \times \text{FLAG}$ -ELOVL1; pSM5, $3 \times \text{FLAG}$ -SPTLC1; pYU648, $3 \times \text{FLAG}$ -SPTSSB; pJK84, $3 \times \text{FLAG}$ -CYB5A; pCY6, $3 \times \text{FLAG}$ -SGPP1; pJK9, $3 \times \text{FLAG}$ -

SGPP2; pIKD476, 3×FLAG-SGPL1)。SPHK1, SPHK2 の過剰発現には各遺伝子を pEFh-3×FLAG-1 に導入したプラスミドを用いた (pJK11, 3×FLAG-SPHK1; pJK15, 3×FLAG-SPHK2)。SPTLC3 の過剰発現には SPTLC3 遺伝子を pCE-puro-HA-1 に導入したプラスミドを使用した (pSM8, HA-SPTLC3)。TGF α 切断アッセイに用いるプラスミドは, pCAGGS ベクターに G $\alpha_{q/13}$, S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR5 をそれぞれ導入したもの (東京大学大学院薬学系研究科薬科学専攻 生物薬科学講座 青木淳賢教授, 東北大学大学院 薬学研究科医療薬学専攻 機能解析薬学講座 分子細胞生化学分野 井上飛鳥教授から分与)を用い¹⁰⁰⁾, NanoBiT β アレスチンリクルートアッセイで用いるプラスミドは pCAGGS ベクターに S1PR1-SmBiT, S1PR2-SmBiT, S1PR3-SmBiT, S1PR4-SmBiT, S1PR5-SmBiT を導入したもの (同 青木淳賢教授, 井上飛鳥教授から分与)を用いた。

5.4. 遺伝子導入

細胞への遺伝子導入操作を伴う殆どの実験では Lipofectamine Plus (Thermo Fisher Scientific)を用い, 手順は添付文書に従った。放射性同位体標識 LCBP の作製に用いる 3×FLAG-SPHK2 過剰発現膜画分の調製を行なう際には, PEI-Max (Polysciences, Inc., Warrington, 英国)を用いて下記のように遺伝子導入を行なった。1.5 mL OPTI-MEM I (Thermo Fisher Scientific)と 24 μ L 1 mg/mL PEI-Max を混合して室温で 5 分間インキュベートした。別のチューブに 1.5 mL OPTI-MEM I と 12 μ g プラスミド DNA を混合し, PEI-Max/OPTI-MEM I 混合溶液へ加え, 室温で 20 分間インキュベートした。HEK 293T 細胞 (10 cm ディッシュ, 8.7×10^6 cells)を 5 mL OPTI-MEM I で洗浄し, 8 mL OPTI-MEM I に置換後, PEI-Max と DNA の混合溶液を細胞に添加した。4 時間培養後, ウシ胎児血清と抗生物質を含む培地に置換し, さらに 20 時間培養した。TGF α 切断アッセイの際の遺伝子導入は PEI-Max を用いて下記のように行なった。1 mL OPTI-MEM I と 5 μ L 1 mg/mL PEI-Max を混合して室温で 5 分間インキュベートした。別のチューブに OPTI-MEM I 1 mL とそれぞれのプラスミド DNA が 1 μ g 分になるように混合し, PEI-Max/OPTI-MEM I 混合溶液へ加え, 室温で 20 分間インキュベートした。HEK 293A 細胞 (6-well プレート, 8.0×10^5 cells)に, これら混合溶液を培地の置換を行わず添加し, 24 時間後アッセイを行なった。NanoBiT β アレスチンリクルートアッセイの際の遺伝子導入は, PEI-Max を用いて下記のように行なった。5 mL OPTI-MEM I と 25 μ L 1 mg/mL PEI-Max を混合して室温で 5 分間インキュベートした。別のチューブに OPTI-MEM I 5mL とそれぞれのプラスミド DNA が 5 μ g 分になるように混合し, PEI-Max/OPTI-MEM I 混合溶液へ加え, 室温で 20 分間インキュベートした。HEK 293A 細胞 (10 cm ディッシュ, 4.0×10^6 cells)に, これら混合溶液を培地の置換を行わず添加し, 24 時間後アッセイを行なった。

5.5. イムノブロットイング

タンパク質を SDS-PAGE により分離し, Immobilon-P メンブレン (Merck) に転写した。転写後メンブレンをスキムミルク溶液 (5% スキムミルク(w/v), TBS, 0.1% Tween20) に浸し, 室温で 30 分間震盪した。一次抗体として, anti-FLAG polyclonal antibody (1,000 倍希釈)⁶⁴, anti-FLAG M2 antibody (1,000 倍希釈, Merck), anti-GAPDH monoclonal 5A12 antibody (0.5 µg/mL; 富士フイルム和光純薬, 大阪) または, anti-calnexin monoclonal 4F10 antibody (1 µg/mL; Medical & Biological Laboratories, 愛知) を用いた (反応は室温, 1 時間)。二次抗体として anti-rabbit IgG HRP-Linked F(ab')₂ fragment (7,500 倍希釈; Cytiva, Marlborough, 米国) または anti-mouse IgG HRP-Linked F(ab')₂ fragment (7,500 倍希釈; Cytiva) を用いた (反応は室温, 1 時間)。抗体は全てスキムミルク溶液で希釈した。メンブレンを 0.1% Tween20 を含んだ 1×TBS で洗浄後, 検出液 (100 mM Tris-HCl [pH 8.5], 0.2 mM *p*-クマル酸, 2.5 mM ルミノール, 0.02% H₂O₂ [v/v]) または, Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer, Waltham, 米国) を用いて発光させ, X 線フィルムに感光, 検出した。

5.6. LC-MS/MS による脂質解析

脂質の LC-MS/MS 解析は超高速液体クロマトグラフィー連結三連四重極型質量分析計 (Xevo TQ-S; Waters, Milford, 米国) を用いて行った。LC での分離は Triart C18 (Metal free column; length 150 mm, particle size 1.9 µm, inner diameter 2.1 mm; YMC, 京都) または ACQUITY UPLC CSH C18 column (length 100 mm; particle size 1.7 µm, inner diameter 2.1 mm; Waters) を用いて, カラム温度 55°C, 流速 0.3 mL/min の条件で移動相 A (acetonitrile/water [3:2, v/v] containing 5 mM ammonium formate) と移動相 B (2-propanol/acetonitrile [9:1, v/v] containing 5 mM ammonium formate) のバイナリーグラジエントによる分離を行なった。LC で分離した脂質はエレクトロスプレーイオン化法でイオン化し, multiple reacting monitoring モードによる MS/MS によって分析した。それぞれの脂質分子種のプリカーサーイオンの *m/z* を Q1 に, プロダクトイオンの *m/z* を Q3 に設定し, 最適化したコリジョンエネルギーを用いてポジティブイオンを検出した。脂質量はそれぞれのマススペクトラムのピーク面積を内部標準または外部標準 (*d*₇-SPD の測定のみ) のピーク面積と比較して算出した。データの解析には MassLynx software (Waters) を用いた。それぞれの脂質の抽出, 分離および検出の詳細は下記の通りである。

マウスの脳, 腎臓からの CER, SM, HexCER の LC-MS/MS 解析は以下のように行なった。3 か月齢のマウスより摘出した脳, 腎臓 (10 mg) をジルコニアビーズ入りチューブに移し, 450 µL chloroform/methanol (1:2, v/v) と内部標準 (100 pmol *d*₉-SPH-CER [*N*-palmitoyl(*d*₉) D-erythro-sphingosine; Avanti Polar Lipids, Alabaster, 米国]; 500 pmol (脳) または 100 pmol (腎臓) *d*₃-HexCER [C16 glucosylceramide-*d*₃ (d18:1/16:0-*d*₃); Cayman Chemical, Ann Arbor,

米国]; 250 pmol d_9 -SM [C16 sphingomyelin- d_9 (d18:1/16:0- d_9); Cayman Chemical]) を加えた。その後、Micro Smash MS-100 (TOMY Seiko, 東京) を用いて激しく浸透することで (4500 rpm, 4°C, 1 分), 組織を破碎した。遠心後 (20,400 × g, 4°C, 3 分), 上清を回収した。残ったペレットに 450 μL chloroform/methanol (1:2, v/v) を加え, 再度組織を破碎し, 遠心後, 上清を回収した。これらの上清を合わせ, 22.5 μL 4 M KOH を加え, インキュベーション (37°C, 1 時間) することで, グリセロ脂質のエステル結合を加水分解した。22.5 μL 4 M ギ酸を加えて中和後, 300 μL chloroform と 540 μL H₂O を加えて激しく攪拌し, 遠心を行なうことで (20,400 × g, 室温, 3 分), 二層分配をおこなった。脂質を含む有機層 (下層) を回収し, 乾燥後, 500 μL の chloroform/methanol (1:2, v/v) に溶解, 希釈 (脳, 200 倍希釈 (CER), 2,000 倍希釈 (HexCER, SM); 腎臓, 200 倍希釈 (CER, HexCER), 2,000 倍希釈 (SM)) して 5 μL を LC-MS/MS 解析に供した。LC での分離は Triart C18 を用いて, 下記の条件 (条件 1) のバイナリグラジエントによる分離を行なった (0 分, 40% B; 0–33 分, 100% B; 33–38 分, 100% B; 38–38.1 分, 40% B; 38.1–40 分, 40% B)。SPH および SPD 含有 CER, HexCER, SM の Q1, Q3, コリジョンエネルギーの値は表 8 の通りに設定した。

細胞からの CER, SM, HexCER, LCB の LC-MS/MS 解析は基本的に以下のように行なった。 d_7 -SPH (Avanti Polar Lipids), d_7 -DHS (Avanti Polar Lipids), d_7 -SPD (Avanti Polar Lipids), 14Z-SPH (Cayman chemical), 直鎖 C17:0 FA (Merck), *iso*-C17:0 FA (Larodan AB, Solna, スウェーデン), あるいは *anteiso*-C17:0 FA (Merck) を含んだ培地で培養した細胞, あるいはコントロールとして FA の溶媒として用いたエタノールのみを添加した培地で培養した細胞から下記のように脂質を抽出した。6-well または 12-well ディッシュで培養した細胞 (80–100%コンフルエント) を, スクレーパーを用いてディッシュから掻き取ることで回収した。細胞を 150 μL の水に懸濁させ, 50 μL をタンパク質定量用に分取し, 残り 100 μL を脂質抽出に用いた。タンパク質の定量は Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて, 添付の説明書通りに行った。細胞懸濁液に 375 μL の chloroform/methanol (1:2, v/v) と内部標準 (1 または 2 pmol d_9 -SPH-CER [SPH-CER, SPD-CER 測定用]; 1 または 2 pmol d_9 -DHS-CER [Avanti Polar Lipids; 14Z-SPH-CER 測定用]; 25 pmol LIPIDMAPS™ Mass Spec Internal Standard, Ceramide/Sphingoid Internal Standard Mix II [Avanti Polar Lipids; d_7 -SM, d_7 -HexCER 測定用]) を加えて激しく攪拌した。その後, 上記と同様に KOH によるアルカリ処理, 中和, 二層分配, 有機層の回収, 乾燥を行った。得られた脂質は 100 μL または 200 μL (それぞれ 12-または 6-well dish サンプル) の chloroform/methanol (1:2, v/v) に溶解させ, 適当な濃度に希釈後, 5 μL を LC-MS/MS 解析に供した。LC では ACQUITY UPLC CSH C18 column を用いて, 下記のグラジエント条件で分離を行った。CER, HexCER, SM の測定 (条件 2): (0 分, 40% B; 0–18 分, 100% B; 18–23 分, 100% B; 13–23.1 分, 40% B; 23.1–25 分, 40% B)。非標識または d_7 -標識された

CER, HexCER, SM, LCB の値は表 8 の通りに設定した。

培養細胞からの FA 測定は以下のように行なった。細胞から上記と同様に脂質を抽出した。内部標準として 50 pmol の oleic acid-*d*₉ (Avanti Polar Lipids) を使用した。乾燥させた脂質は 100 μL chloroform/methanol (1:2, v/v) に溶解後、アルカリ処理サンプルでは 1 μL, アルカリ未処理サンプルでは 2 μL を AMP+ Mass Spec Kit (Cayman Chemical) を用いて *N*-(4-aminomethylphenyl) pyridinium (AMPP) で誘導体化した。誘導体化はキットに付属の説明書に従って行った。誘導体化後のサンプルに 80 μL methanol を加えて 100 μL にし、5 μL を LC-MS/MS 解析に供した。LC での分離は ACQUITY UPLC CSH C18 column を用いて、グラジエント条件 3 で分離を行った (0 分, 10% B; 0–18 分, 100% B; 18–23 分, 100% B; 23–23.1 分, 10% B; 23.1–25 分, 10% B)。MS/MS における Q1, Q3, コリジョンエネルギーの値は表 2 の通りである。

5.7. *FADS3* および *DEGS1* 遺伝子欠損 HAP1 細胞の作製

CRISPR/Cas9 システムによる KO 細胞の作製には, GeneArt™ CRISPR Nuclease Vector (Thermo Fisher Scientific) に nickase 型変異 (D10A) を導入した *Cas9* 遺伝子配列, GFP 発現カセットおよび, puromycin *N*-acetyltransferase 発現カセットを組み込んだ改変ベクター (pYU417) を用いた。*FADS3* 遺伝子 KO 用プラスミド (pJK34, pJK35) および *DEGS1* 遺伝子 KO 用プラスミド (pJK78, pJK79) は pYU417 の *BaeI* 切断部位に, guide RNA のターゲット配列部分を含むオリゴ DNA (hFADS3_F1 と hFADS3_R1, hFADS3_F2 と hFADS3_R2; hDEGS1_F1 と hDEGS1_R1, hDEGS1_F2 と hDEGS1_R2) をアニーリングさせたものをそれぞれ導入して作製した (表 3, 5)。pJK34, pJK35 または pJK78, pJK79 を共に HAP1 細胞 (6-well プレート, 1.0×10⁶ cells) に導入して 48 時間後, プラスミドが導入された細胞のみを選択するために, プューロマイシン (Merck) を終濃度 2.0 μg/mL となるように添加し, さらに 24 時間培養した。細胞を 10 cm ディッシュに 1 枚あたり 10–50 cells となるように播種し, 生育したコロニーを回収することで単クローンを単離した。単離したクローンのゲノム DNA を回収し, ターゲット配列周辺の DNA 配列を増幅するプライマー (表 4, 6) を用いて *FADS3* および *DEGS1* 遺伝子配列の解析を行なった。

5.8. 間接蛍光抗体法

HeLa 細胞をカバーガラス上で培養し, pJK22 (3×*FLAG-FADS3*) をトランスフェクションした。24 時間後, カバーガラスに接着した細胞を PBS で 2 回洗浄し, 3.7% ホルムアルデヒド/PBS 溶液で固定した (37°C, 10 分)。再度 PBS で 2 回洗浄し, 0.1% Triton X-100/PBS 溶液を用いて膜透過処理 (室温, 5 分) を行なった。PBS で 2 回洗浄後, 10 mg/mL BSA/PBS 溶液を用いてブロッキングし, 続いて一次抗体, 二次抗体処理を行なった。一次抗体として,

anti-FLAG polyclonal antibody (2,000 倍希釈), anti-calnexin monoclonal 4F10 antibody (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (室温, 1時間), 二次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG antibody および, Alexa Fluor 594-conjugated anti-mouse IgG antibody (それぞれ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Thermo Fisher Scientific) を用いた (室温, 1時間)。ProLong™ Gold Antifade reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いてスライドガラスへマウントし, 蛍光顕微鏡 DM5000B (Leica Microsystems, Wetzlar, ドイツ) を用いて観察, 画像取得を行なった。

5.9. *in vitro* における FADS3 の不飽和化アッセイ

細胞を Lysis Buffer A (50 mM HEPES-NaOH [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 \times protease inhibitor cocktail [Complete, EDTA-free protease inhibitor Cocktail; Merck]) に懸濁して超音波処理により破碎した。遠心後 (400 \times g, 4°C, 3分), 上清を回収し, 総細胞抽出液とした。総細胞抽出液 (50 μg) と 10 μM C6-SPH-CER, C6-DHS-CER または d_7 -SPH (すべて Avanti Polar Lipids から購入) を Assay Buffer A (50 mM リン酸カリウム [pH 7.5], 1 mM NADH, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 \times protease inhibitor cocktail) 中で反応させた (100 μL の反応系, 37°C, 10分)。反応後, サンプル 100 μL に 375 μL の chloroform/methanol (1:2, v/v) と内部標準 (20 pmol d_9 -SPH-CER [C6-SPD-CER 測定用], 20 pmol d_9 -DHS-CER [C6-14Z-SPH-CER 測定用]) を加えて激しく攪拌した。その後, 上記と同様に KOH によるアルカリ処理, 中和, 二層分配, 有機層の回収, 乾燥を行った。得られた脂質を 200 μL chloroform/methanol (1:2, v/v) に溶解し, 希釈後 (C6-SPD-CER および C6-14Z-SPH-CER, 100 倍希釈; d_7 -SPD, 10 倍希釈), 5 μL を LC-MS/MS 測定に供した。LC での分離は ACQUITY UPLC CSH C18 column を用いて, グラジエント条件 3 により行った。MS/MS における Q1, Q3, コリジョンエネルギーの値は表 2 の通りである。 d_7 -SPD の定量は d_7 -SPD を外部標準として使用した。

5.10. 定量的 RT-PCR

TRIzol Reagent (Thermo Fischer Scientific) を用いて, 添付の説明書通りに各組織 (約 5–30 mg) から RNA を回収した。得られた RNA と *Fads3* に対するプライマー (表 7) と PrimeScript One step RT-PCR Kit (Takara Bio, 滋賀) を用いて CFX96 Touch Real-time PCR Detection System (Bio-Rad, California, 米国) により定量的 RT-PCR を行った。大脳から抽出した RNA の希釈系列を測定し, 得られた Ct 値をもとに検量線を作製した。各組織の遺伝子発現の Ct 値を検量線より求め, 総 RNA 重量で補正した値を遺伝子発現量の値とした。

5.11. SPH キナーゼアッセイ

In vitro SPH キナーゼ活性測定は、SPHK1 および SPHK2 の活性を共に測定できるバッファー系を用いて行なった。細胞を Lysis buffer B (50 mM HEPES-NaOH [pH 7.5], 10 mM KCl, 0.05% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1×protease inhibitor cocktail) に懸濁させ、超音波処理により破碎した。遠心後 (400×g, 4°C, 3 分), 上清を回収し, 総細胞抽出液とした。総細胞抽出液 (10 µg) に 0.2 µCi [γ -³³P]ATP (American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, 米国), 2 mg/mL FA-free BSA (Merck), 10 µM LCB, 0.5 µM ATP を Assay buffer B (50 mM HEPES-NaOH [pH 7.5], 10 mM KCl, 0.05% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1×protease inhibitor cocktail [Complete, EDTA-free protease inhibitor Cocktail; Merck]), 1 mM MgCl₂, 10 mM NaF [ホスファターゼ阻害剤], 5 mM Na₃VO₄ [ホスファターゼ阻害剤], 0.5 mM 4-deoxypyridoxine [リアーゼ阻害剤]) に加えて反応させた (100 µL の反応系, 37°C, 15 分)。反応溶液に 375 µL の chloroform/methanol/12 M HCl (100:200:1, v/v) を加えて激しく攪拌した。125 µL chloroform および 125 µL 1% KCl を加えて激しく攪拌し, 遠心により (20,400 × g, 室温, 3 min) 二層に分離させた。有機層 (下層) を回収し, 溶媒を留去させた。脂質を 20 µL の chloroform/methanol (1:2, v/v) に溶解させた。全量を high performance TLC silica gel 60 plate (Merck) にスポットし, 1-butanol/acetic acid/H₂O (3:1:1, v/v) で分離した。生成した [³³P]LCB1P を BAS-2500 (Cytiva) で検出し, 定量を行なった。

5.12. SPH1P ホスファターゼ/リアーゼアッセイ

基質として用いる LCBP を以下のように作製した。3×FLAG-SPHK2 を HEK 293T 細胞に過剰発現させ, Lysis buffer B に懸濁, 総細胞抽出液を調製した。この総細胞抽出液 (10 µg) に 2 mg/mL FA-free BSA, 10 µM LCB, 200 µCi [γ -³³P]ATP, 0.5 µM ATP を加え, Assay buffer B 中で反応させた (100 µL の反応系, 37°C, 1 時間)。未反応の SPH を除くため, 以下のようにアルカリ条件下と酸性条件下における 2 段階抽出を行なった¹²⁵⁾。反応液に 7.5 µL 15 M NH₃, 375 µL chloroform/methanol (1:2, v/v) を加えて攪拌した。125 µL chloroform および 125 µL 1% KCl 水溶液を加え, 遠心後 (20,400 × g, 室温, 3 分), 水層 (上層, LCBP を含む) を回収した。回収した水層に 77 µL 5 M HCl, 375 µL chloroform を加え, 遠心後 (20,400 × g, 室温, 3 分), 有機層 (下層, LCBP を含む) を回収した。残った水層に再度 200 µL chloroform を加えて激しく攪拌し, 遠心後, 有機層を回収した。先に回収した有機層と合わせて溶媒を留去後, ethanol に再溶解し, 一部を high performance TLC silica gel 60 plate にスポットした。1-butanol/acetic acid/H₂O (3:1:1, v/v) で分離後, [³³P]LCBP を BAS-2500 で検出し, 定量を行なった。

In vitro における LCBP の脱リン酸化および開裂活性測定は以下のように行なった。細胞

を Lysis buffer C (50 mM HEPES-NaOH [pH 7.5], 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1×protease inhibitor cocktail) に懸濁し、超音波処理により破碎した。遠心後 (400 × g, 4°C, 3 分), 上清を回収し, 超遠心 (100,000×g, 4°C, 35 分)を行なった。上清を除き, ペレット(膜画分)を Lysis buffer C に懸濁させた。ホスファターゼ活性測定は, 膜画分 (2 μg) に [³³P]LCB1P (22.1 pCi; 1.5 pM), 2 mg/mL FA-free BSA を Assay buffer C [50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1×protease inhibitor cocktail, 0.5 mM 4-deoxy pyridoxine] に加えて反応させた (50 μL の反応系, 37°C, 10 分)。リアーゼ活性測定は, 膜画分 (2 μg) に [³³P]LCBP (22.1 pCi; 1.5 pM), 2 mg/mL FA-free BSA を Assay buffer C (50 mM HEPES-NaOH [pH 7.5], 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1×protease inhibitor cocktail, 10 mM NaF, 5 mM Na₃VO₄) に加えて反応させた (50 μL の反応系, 37°C, 10 分)。各反応後, high performance TLC silica gel 60 plate に反応液 2.5 μL をスポットし, 1-buthanol/aceticacid/H₂O (2:1:1, v/v) で分離した。 [³³P]LCBP および生成した [³³P]正リン酸, [³³P]PEA を BAS-2500 で検出し, 定量を行なった。

5.13. TGFα 切断アッセイ

HEK 293A 細胞 (6-well プレート, 8.0×10⁵ cells) に各種 S1PR 発現プラスミド, Gα サブユニット発現プラスミドおよび AP-TGFα 融合タンパク質発現プラスミドを導入した。24 時間後 PBS で洗浄し, 0.05% Trypsin/0.53 mM EDTA (Thermo Fisher Scientific) を含む PBS 溶液を用いて細胞をプレートから剥離させ, 15 mL 遠沈管に回収した。遠心後 (190 × g, 室温, 5 分), 細胞を 4 mL Hank's 平衡塩溶液 (HBSS) に懸濁した。96-well プレートに 90 μL ずつ細胞を播種し, 37°C で 30 分静置した (Cell プレート)。10 μL の基質を細胞に添加し, 培養した (37°C, 5% CO₂, 1時間)。プレートを遠心し (190 × g, 室温, 2 分), 上清 80 μL を別の 96-well プレートに移し, プレートが室温になるまで静置した (CM プレート)。Cell プレートと CM プレートそれぞれに 80 μL *p*-NPP 溶液 (10 mM *p*-nitrophenylphosphate disodium salt hexahydrate, 40 mM Tris [pH 9.5], 40 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) を加え, それぞれのプレートの 0 時間後と 1 時間後の OD₄₀₅ を SpectraMax 340 PC384 (Molecular Devices, 東京) で測定した。0 時間後と 1 時間後の OD₄₀₅ の差 (ΔOD₄₀₅) を算出し, CM プレートの ΔOD₄₀₅ と Cell プレートの ΔOD₄₀₅ の和に対する CM プレートの ΔOD₄₀₅ の割合を (% CM) として求めた。活性値 (shedding levels) はリガンド非添加時の % CM を 0 とした時の各リガンド添加時の % CM として算出した。

5.14. NanoBiT β アレスチンリクルートアッセイ

HEK 293A 細胞(10 cm ディッシュ, 2.0×10^6 cells)に各種 S1PR と SmBiT(改変ルシフェラーゼのサブユニット)の融合タンパク質発現プラスミドおよび, β アレスチン 1 と LgBiT(改変ルシフェラーゼのサブユニット)の融合タンパク質発現プラスミドを導入した。24 時間後 PBS で 1 回洗浄し, 2 mL の 0.53 mM EDTA を加え, 30 秒間インキュベートした後, 2 mL HBSS を加え懸濁し, 15 mL 遠沈管に回収した。遠心後($190 \times g$, 室温, 5 分), 上清を除去し, 2 mL 0.01% BSA/PBS で細胞に懸濁させ, 発光測定用の 96-well プレートに 80 μ L ずつ細胞を播種した。発光基質として 20 μ L の 50 μ M coelenterazine (Cayman Chemical) を細胞に添加し, インキュベートした(室温, 暗条件, 2 時間)。ベースラインとしてリガンド添加前の発光強度を SpectraMax L (Molecular Devices) で測定後, 0.01% BSA/HBSS に懸濁したリガンド 20 μ L を添加した。添加直後から 20 秒毎, 15 分間の発光強度について SpectraMax L を用いたカイネティクス測定を行なった。発光強度はベースラインで標準化し, リガンド添加後 5–10 分の値の倍率変化の曲線下面積を算出した。活性値は, ベースラインの曲線下面積を 1 とした時の各濃度のリガンド添加時の曲線下面積で示した。

6. 表

表 1. マウス組織におけるスフィンゴ脂質の組成

CER

FA 鎖長	SPH		SPD	
	脳	腎臓	脳	腎臓
C16:0	1.505±0.627	16.54±2.199	0.113±0.046	4.557±0.945
C18:0	53.19±15.56	1.537±1.681	10.38±3.406	0.107±0.025
C20:0	1.759±0.320	1.002±0.795	0.385±0.069	0.107±0.016
C22:0	0.88±0.200	4.145±0.661	0.156±0.069	1.707±0.105
C24:0	0.601±0.170	14.46±1.544	0.052±0.014	11.03±1.317

HexCER

FA 鎖長	SPH		SPD	
	脳	腎臓	脳	腎臓
C16:0	7.912±3.991	14.95±1.704	ND	3.216±0.336
C18:0	358.7±32.04	0.984±0.322	5.500±2.112	0.002±0.004
C20:0	114.4±23.06	2.777±0.743	3.116±1.858	0.088±0.021
C22:0	705.9±112.7	16.66±1.935	32.44±10.50	4.832±1.156
C24:0	1426±181.4	52.54±5.959	44.58±9.904	33.35±1.953

SM

FA 鎖長	SPH		SPD	
	脳	腎臓	脳	腎臓
C16:0	143.7±28.92	3386±84.25	3.240±0.820	418.0±28.54
C18:0	3986±577.6	133.5±1.717	304.2±39.53	11.35±0.181
C20:0	332.4±59.27	207.0±20.11	17.16±5.280	17.07±3.236
C22:0	156.1±29.65	830.5±36.13	15.98±6.490	201.7±25.90
C24:0	158.5±18.84	1691.5±193.7	4.647±1.183	1122±114.8

数値は脂質量 (nmol/mg tissue) の平均値±標準偏差を示す (n=3)。ND, not detected (検出限界以下)。

表 2. LC-MS/MS に用いた Q1, Q3 の m/z 値およびコリジョンエネルギー値

CER	プリカーサーイオン(Q1)		プロダクトイオン (Q3)	コリジョンエネルギー (eV)
	$[M-H_2O + H]^+$	$[M + H]^+$		
d16:1/C16:0	492.5		236.3	20
d16:1/C18:0	520.5		236.3	20
d16:1/C20:0	548.5		236.3	20
d16:1/C22:0	576.6		236.3	20
d16:1/C24:1	602.6		236.3	25
d16:1/C24:0	604.6		236.3	25
d17:1/C16:0	506.5		250.3	20
d17:1/C18:0	534.5		250.3	20
d17:1/C20:0	562.5		250.3	20
d17:1/C22:0	590.6		250.3	20
d17:1/C24:1	616.6		250.3	25
d17:1/C24:0	618.6		250.3	25
d18:1/C16:0	520.5		264.3	20
d18:1/C18:0	548.5		264.3	20
d18:1/C20:0	576.5		264.3	20
d18:1/C22:0	604.6		264.3	25
d18:1/C24:1	630.6		264.3	25
d18:1/C24:0	632.6		264.3	30
d19:1/C16:0	534.5		278.3	20
d19:1/C18:0	562.5		278.3	20
d19:1/C20:0	590.5		278.3	20
d19:1/C22:0	618.6		278.3	25
d19:1/C24:1	644.6		278.3	30
d19:1/C24:0	646.6		278.3	30
d20:1/C16:0	548.5		292.3	20
d20:1/C18:0	576.5		292.3	20
d20:1/C20:0	604.5		292.3	25

d20:1/C22:0	632.6		292.3	30
d20:1/C24:1	658.6		292.3	30
d20:1/C24:0	660.6		292.3	30
d21:1/C16:0	562.5		306.3	20
d21:1/C18:0	590.5		306.3	20
d21:1/C20:0	618.5		306.3	25
d21:1/C22:0	646.6		306.3	30
d21:1/C24:1	672.6		306.3	30
d21:1/C24:0	674.6		306.3	30
d22:1/C16:0	576.5		320.3	20
d22:1/C18:0	604.5		320.3	25
d22:1/C20:0	632.5		320.3	30
d22:1/C22:0	660.6		320.3	30
d22:1/C24:1	686.6		320.3	30
d22:1/C24:0	688.6		320.3	30
d23:1/C16:0	590.5		334.3	20
d23:1/C18:0	618.5		334.3	25
d23:1/C20:0	646.5		334.3	30
d23:1/C22:0	674.6		334.3	30
d23:1/C24:1	700.6		334.3	30
d23:1/C24:0	702.6		334.3	30
d24:1/C16:0	604.5		348.3	25
d24:1/C18:0	632.5		348.3	30
d24:1/C20:0	660.5		348.3	30
d24:1/C22:0	688.6		348.3	30
d24:1/C24:1	714.6		348.3	35
d24:1/C24:0	716.6		348.3	35
d16:2/C16:0	490.5		234.3	20
d16:2/C18:0	518.5		234.3	20
d16:2/C20:0	546.5		234.3	20
d16:2/C22:0	574.6		234.3	20

d16:2/C24:1	600.6		234.3	25
d16:2/C24:0	602.6		234.3	25
d17:2/C16:0	504.5		248.3	20
d17:2/C18:0	532.5		248.3	20
d17:2/C20:0	560.5		248.3	20
d17:2/C22:0	588.6		248.3	25
d17:2/C24:1	614.6		248.3	30
d17:2/C24:0	616.6		248.3	30
d18:2/C6:0	518.5		262.3	20
d18:2/C16:0	546.5		262.3	20
d18:2/C18:0	574.5		262.3	20
d18:2/C20:0	602.6		262.3	25
d18:2/C22:0	628.6		262.3	30
d18:2/C24:1	630.6		262.3	30
d18:2/C24:0	532.5		276.3	20
d19:2/C16:0	560.5		276.3	20
d19:2/C18:0	588.5		276.3	25
d19:2/C20:0	616.6		276.3	30
d19:2/C22:0	642.6		276.3	30
d19:2/C24:1	644.6		276.3	30
d19:2/C24:0	546.5		290.3	20
d20:2/C16:0	574.5		290.3	20
d20:2/C18:0	602.5		290.3	25
d20:2/C20:0	630.6		290.3	30
d20:2/C22:0	656.6		290.3	30
d20:2/C24:1	658.6		290.3	30
d20:2/C24:0	560.5		304.3	20
d21:2/C16:0	588.5		304.3	25
d21:2/C18:0	616.5		304.3	30
d21:2/C20:0	644.6		304.3	30
d21:2/C22:0	670.6		304.3	30
d21:2/C24:1	672.6		304.3	30
d21:2/C24:0	574.5		318.3	20

d22:2/C16:0	602.5		318.3	25
d22:2/C18:0	630.5		318.3	30
d22:2/C20:0	658.6		318.3	30
d22:2/C22:0	672.6		318.3	30
d22:2/C24:1	684.6		318.3	30
d22:2/C24:0	686.6		318.3	30
d23:2/C16:0	588.5		332.3	25
d23:2/C18:0	616.5		332.3	30
d23:2/C20:0	644.5		332.3	30
d23:2/C22:0	672.6		332.3	30
d23:2/C24:1	698.6		332.3	30
d23:2/C24:0	700.6		332.3	30
d24:2/C16:0	602.5		346.3	25
d24:2/C18:0	630.5		346.3	30
d24:2/C20:0	658.5		346.3	30
d24:2/C22:0	686.6		346.3	30
d24:2/C24:1	712.6		346.3	35
d24:2/C24:0	714.6		346.3	35
<i>d</i> ₇ -d18:1/C16:0	527.5		271.3	20
<i>d</i> ₇ -d18:1/C18:0	555.6		271.3	20
<i>d</i> ₇ -d18:1/C20:0	583.6		271.3	20
<i>d</i> ₇ -d18:1/C22:0	611.6		271.3	25
<i>d</i> ₇ -d18:1/C24:1	637.6		271.3	30
<i>d</i> ₇ -d18:1/C24:0	639.6		271.3	30
<i>d</i> ₇ -d18:1/C26:1	665.6		271.3	30
<i>d</i> ₇ -d18:1/C26:0	667.6		271.3	30
<i>d</i> ₇ -d18:1/C28:1	693.6		271.3	30
<i>d</i> ₇ -d18:1/C28:0	695.6		271.3	30
<i>d</i> ₇ -d18:1/C30:1	721.6		271.3	35
<i>d</i> ₇ -d18:1/C30:0	723.6		271.3	35
d18:1/ <i>d</i> ₉ -C16:0	536.5		264.3	20
<i>d</i> ₇ -d18:2/C16:0	525.5		269.3	20
<i>d</i> ₇ -d18:2/C18:0	553.6		269.3	20
<i>d</i> ₇ -d18:2/C20:0	581.6		269.3	20

d_7 -d18:2/C22:0	609.6		269.3	25
d_7 -d18:2/C24:1	635.6		269.3	30
d_7 -d18:2/C24:0	637.6		269.3	30
d_7 -d18:2/C26:1	663.6		269.3	30
d_7 -d18:2/C26:0	665.6		269.3	30
d_7 -d18:2/C28:1	691.6		269.3	30
d_7 -d18:2/C28:0	693.6		269.3	30
d_7 -d18:2/C30:1	719.6		269.3	35
d_7 -d18:2/C30:0	721.6		269.3	35
d18:1(14Z)/C6:0		398.3	282.3	25
d18:1(14Z)/C16:0		538.5	282.3	20
d18:1(14Z)/C18:0		566.6	282.3	20
d18:1(14Z)/C20:0		594.6	282.3	20
d18:1(14Z)/C22:0		622.6	282.3	25
d18:1(14Z)/C24:1		648.6	282.3	30
d18:1(14Z)/C24:0		650.6	282.3	30
d_7 - d18:1(14Z)/C16:0		545.5	289.3	20
d_7 - d18:1(14Z)/C18:0		573.6	289.3	20
d_7 - d18:1(14Z)/C20:0		601.6	289.3	20
d_7 - d18:1(14Z)/C22:0		629.6	289.3	25
d_7 - d18:1(14Z)/C24:1		655.6	289.3	30
d_7 - d18:1(14Z)/C24:0		657.6	289.3	30
d18:0/ d_9 -C16:0		549.5	284.3	20

HexCER	プリカーサーイオン(Q1)	プロダクトイオン (Q3)	コリジョンエネルギー (eV)
	[M-H ₂ O + H] ⁺		
d18:1/C16:0	682.6	264.3	40

d18:1/C18:0	710.6	264.3	40
d18:1/C20:0	738.6	264.3	40
d18:1/C22:0	766.6	264.3	40
d18:1/C24:0	794.7	264.3	40
d18:2/C16:0	680.6	262.3	40
d18:2/C18:0	708.6	262.3	40
d18:2/C20:0	736.6	262.3	40
d18:2/C22:0	764.6	262.3	40
d18:2/C24:1	792.7	262.3	40
<i>d</i> ₇ -d18:1/C16:0	689.6	271.3	40
<i>d</i> ₇ -d18:1/C18:0	717.6	271.3	40
<i>d</i> ₇ -d18:1/C20:0	745.6	271.3	40
<i>d</i> ₇ -d18:1/C22:0	773.6	271.3	40
<i>d</i> ₇ -d18:1/C24:1	799.7	271.3	40
<i>d</i> ₇ -d18:1/C24:0	801.7	271.3	40
<i>d</i> ₇ -d18:2/C16:0	687.6	269.3	40
<i>d</i> ₇ -d18:2/C18:0	715.6	269.3	40
<i>d</i> ₇ -d18:2/C20:0	743.6	269.3	40
<i>d</i> ₇ -d18:2/C22:0	771.6	269.3	40
<i>d</i> ₇ -d18:2/C24:1	797.7	269.3	40
<i>d</i> ₇ -d18:2/C24:0	799.7	269.3	40

SM	プリカーサーイオン(Q1)	プロダクトイオン (Q3)	コリジョンエネルギー (eV)
	[M+ H] ⁺		
d18:1/C16:0	703.7	184.2	60
d18:1/C18:0	731.7	184.2	60
d18:1/C20:0	759.8	184.2	60
d18:1/C22:0	787.8	184.2	60
d18:1/C24:0	815.8	184.2	60

d18:2/C16:0	701.7	184.2	60
d18:2/C18:0	729.7	184.2	60
d18:2/C20:0	757.8	184.2	60
d18:2/C22:0	785.8	184.2	60
d18:2/C24:0	813.8	184.2	60
<i>d</i> ₇ -d18:1/C16:0	710.7	184.2	60
<i>d</i> ₇ -d18:1/C18:0	738.7	184.2	60
<i>d</i> ₇ -d18:1/C20:0	766.8	184.2	60
<i>d</i> ₇ -d18:1/C22:0	794.8	184.2	60
<i>d</i> ₇ -d18:1/C24:1	820.8	184.2	60
<i>d</i> ₇ -d18:1/C24:0	822.8	184.2	60
<i>d</i> ₇ -d18:2/C16:0	708.7	184.2	60
<i>d</i> ₇ -d18:2/C18:0	736.7	184.2	60
<i>d</i> ₇ -d18:2/C20:0	764.8	184.2	60
<i>d</i> ₇ -d18:2/C22:0	792.8	184.2	60
<i>d</i> ₇ -d18:2/C24:1	818.8	184.2	60
<i>d</i> ₇ -d18:2/C24:0	820.8	184.2	60

LCB	プリカーサーイオン(Q1)	プロダクトイオン (Q3)	コリジョンエネルギー (eV)
	[M-H ₂ O + H] ⁺		
<i>d</i> ₇ -d18:1	289.2	271.2	15
<i>d</i> ₇ -d18:2	287.2	269.2	15

FA	プリカーサーイオン(Q1)	プロダクトイオン (Q3)	コリジョンエネルギー (eV)
	[M + AMPP] ⁺		
C16:1	421.4	239.0	48
<i>d</i> ₇ -C16:3	424.4	239.0	48
<i>d</i> ₇ -C16:2	426.4	239.0	48
<i>d</i> ₇ -C16:1	428.4	239.0	48

<i>d</i> ₇ -C16:0	430.4	239.0	50
<i>d</i> ₇ -C18:3	452.4	239.0	44
<i>d</i> ₇ -C18:2	454.4	239.0	44
<i>d</i> ₇ -C18:1	456.4	239.0	48
<i>d</i> ₇ -C18:0	458.4	239.0	50
<i>d</i> ₇ -C20:3	480.4	239.0	48
<i>d</i> ₇ -C20:2	482.4	239.0	48
<i>d</i> ₇ -C20:1	484.4	239.0	48
<i>d</i> ₇ -C20:0	486.4	239.0	50
<i>d</i> ₉ -C18:1	458.4	239.0	48

表 3. *FADS3* 遺伝子 KO 用プラスミド作製に用いたオリゴ DNA 配列

guide RNA 名	DNA 配列
h <i>FADS3</i> _F1	5'-TCCCAGCAGAAGGTGGGCAGGTTTT-3'
h <i>FADS3</i> _R1	5'-CTGCCCACCTTCTGCTGGGACGGTG-3'
h <i>FADS3</i> _F2	5'-ACGACCAGCCCGGCGACAAGGTTTT-3'
h <i>FADS3</i> _R2	5'-CTTGTCGCCGGGCTGGTCGTCGGTG-3'

表 4. *FADS3* KO HAP1 細胞のジェノタイピングに用いたプライマー配列

プライマー名	DNA 配列
h <i>FADS3</i> _CHECK_F1	5'-AACAGGTGCGTGTTGTGTCCCCAGG-3'
h <i>FADS3</i> _CHECK_R1	5'-ATGCTAAGGCCCCACAGGTGGAGCG-3'

表 5. *DEGS1* 遺伝子 KO 用プラスミド作製に用いたオリゴ DNA 配列

guide RNA 名	DNA 配列
h <i>DEGS1</i> _F1	5'-CATTGCTTTGCAGTTGCCAAGTTTT-3'
h <i>DEGS1</i> _R1	5'-TTGGCAACTGCAAAGCAATGCGGTG-3'
h <i>DEGS1</i> _F2	5'-ATGTTTGCTAATCTTCCTATGTTTT-3'
h <i>DEGS1</i> _R2	5'-ATAGGAAGATTAGCAAACATCGGTG-3'

表 6. *DEGS1* KO HAP1 細胞のジェノタイピングに用いたプライマー配列

プライマー名	DNA 配列
hDEGS1_CHECK_F1	5'-AAAGTCCTTGATGAAACCTGATCCC-3'
hDEGS1_CHECK_R1	5'-TACCGATGATGATCCATGTGATACC-3'

表 7. 定量的 RT-PCR に用いた *Fads3* 用プライマー配列

プライマー名	DNA 配列
mFads3_qPCR_F1	5'-GCAGATACCTGCCCTACAACC-3'
mFads3_qPCR_R1	5'-CGGGAGTAGAAACTGGCAGC-3'

7. 参考文献／URL

- 1) Kihara A. (2016) Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Prog. Lipid Res.*, **63**, 50-69.
- 2) Rivera J., Proia R. L., and Olivera A. (2008) The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 753-763.
- 3) Wennekes T., van den Berg R. J., Boot R. G., van der Marel G. A., Overkleeft H. S., *et al.* (2009) Glycosphingolipids—nature, function, and pharmacological modulation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **48**, 8848-8869.
- 4) Rabionet M., Bayerle A., Jennemann R., Heid H., Fuchser J., *et al.* (2015) Male meiotic cytokinesis requires ceramide synthase 3-dependent sphingolipids with unique membrane anchors. *Hum. Mol. Genet.*, **24**, 4792-4808.
- 5) Lingwood D. and Simons K. (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, **327**, 46-50.
- 6) Yu R. K., Tsai Y. T., Ariga T., and Yanagisawa M. (2011) Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides-an overview. *J. Oleo Sci.*, **60**, 537-544.
- 7) Eckl K. M., Tidhar R., Thiele H., Oji V., Hausser I., *et al.* (2013) Impaired epidermal ceramide synthesis causes autosomal recessive congenital ichthyosis and reveals the importance of ceramide acyl chain length. *J. Invest. Dermatol.*, **133**, 2202-2211.
- 8) Kluk M. J. and Hla T. (2002) Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. *Biochim. Biophys. Acta*, **1582**, 72-80.
- 9) Taha T. A., Argraves K. M., and Obeid L. M. (2004) Sphingosine-1-phosphate receptors: receptor specificity versus functional redundancy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1682**, 48-55.
- 10) Kappos L., Antel J., Comi G., Montalban X., O'Connor P., *et al.* (2006) Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.*, **355**, 1124-1140.
- 11) Bigaud M., Guerini D., Billich A., Bassilana F., and Brinkmann V. (2014) Second generation S1P pathway modulators: Research strategies and clinical developments. *Biochim. Biophys. Acta*, **1841**, 745-758.
- 12) Kihara A. (2012) Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *J. Biochem.*, **152**, 387-395.
- 13) Slotte J. P. (2016) The importance of hydrogen bonding in sphingomyelin's membrane interactions with co-lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 304-310.
- 14) Sezgin E., Levental I., Mayor S., and Eggeling C. (2017) The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*,

- 18**, 361-374.
- 15) Pruett S. T., Bushnev A., Hagedorn K., Adiga M., Haynes C. A., *et al.* (2008) Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols. *J. Lipid Res.*, **49**, 1621-1639.
 - 16) Iwamori M., Costello C., and Moser H. W. (1979) Analysis and quantitation of free ceramide containing nonhydroxy and 2-hydroxy fatty acids, and phytosphingosine by high-performance liquid chromatography. *J. Lipid Res.*, **20**, 86-96.
 - 17) Nishimura K. (1987) Phytosphingosine is a characteristic component of the glycolipids in the vertebrate intestine. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **86**, 149-154.
 - 18) t'Kindt R., Jorge L., Dumont E., Couturon P., David F., *et al.* (2012) Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **84**, 403-411.
 - 19) Jojima K., Edagawa M., Sawai M., Ohno Y., and Kihara A. (2020) Biosynthesis of the anti-lipid-microdomain sphingoid base 4,14-sphingadiene by the ceramide desaturase FADS3. *FASEB J.*, **34**, 3318–3335.
 - 20) Ota A., Morita H., Naganuma T., Miyamoto M., Jojima K., *et al.* (2023) Bifunctional DEGS2 has higher hydroxylase activity toward substrates with very-long-chain fatty acids in the production of phytosphingosine ceramides. *J. Biol. Chem.*, **299**, 104603.
 - 21) Sassa T. and Kihara A. (2023) Involvement of ω -O-acylceramides and protein-bound ceramides in oral permeability barrier formation. *Cell Rep.*, 112363.
 - 22) Karlsson K. A. (1970) Sphingolipid long chain bases. *Lipids*, **5**, 878-891.
 - 23) Polito A. J., Akita T., and Sweeley C. C. (1968) Gas chromatography and mass spectrometry of sphingolipid bases. Characterization of sphinga-4,14-dienine from plasma sphingomyelin. *Biochemistry*, **7**, 2609-2614.
 - 24) Renkonen O. and Hirvisalo E. L. (1969) Structure of plasma sphingadienine. *J. Lipid Res.*, **10**, 687-693.
 - 25) Colsch B., Afonso C., Popa I., Portoukalian J., Fournier F., *et al.* (2004) Characterization of the ceramide moieties of sphingoglycolipids from mouse brain by ESI-MS/MS: identification of ceramides containing sphingadienine. *J. Lipid Res.*, **45**, 281-286.
 - 26) Liu X., Hoene M., Yin P., Fritsche L., Plomgaard P., *et al.* (2018) Quality control of serum and plasma by quantification of (4E,14Z)-sphingadienine-C18-1-phosphate uncovers common preanalytical errors during handling of whole blood. *Clin. Chem.*, **64**, 810-819.
 - 27) Hanada K. (2003) Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid

- metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, **1632**, 16-30.
- 28) Han G., Gupta S. D., Gable K., Niranjankumari S., Moitra P., *et al.* (2009) Identification of small subunits of mammalian serine palmitoyltransferase that confer distinct acyl-CoA substrate specificities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 8186–8191.
 - 29) Yasuda S., Nishijima M., and Hanada K. (2003) Localization, topology, and function of the LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, **278**, 4176-4183.
 - 30) Hornemann T., Richard S., Rutti M. F., Wei Y., and von Eckardstein A. (2006) Cloning and initial characterization of a new subunit for mammalian serine-palmitoyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **281**, 37275-37281.
 - 31) Harmon J. M., Bacikova D., Gable K., Gupta S. D., Han G., *et al.* (2013) Topological and functional characterization of the ssSPTs, small activating subunits of serine palmitoyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **288**, 10144-10153.
 - 32) Zhao L., Spassieva S., Gable K., Gupta S. D., Shi L. Y., *et al.* (2015) Elevation of 20-carbon long chain bases due to a mutation in serine palmitoyltransferase small subunit b results in neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **112**, 12962-12967.
 - 33) Suzuki M., Ohno Y., and Kihara A. (2022) Whole picture of human stratum corneum ceramides, including the chain-length diversity of long-chain bases. *J. Lipid Res.*, **63**, 100235.
 - 34) Duan J. and Merrill A. H., Jr. (2015) 1-Deoxysphingolipids encountered exogenously and made *de novo*: Dangerous mysteries inside an enigma. *J. Biol. Chem.*, **290**, 15380-15389.
 - 35) Eichler F. S., Hornemann T., McCampbell A., Kuljis D., Penno A., *et al.* (2009) Overexpression of the wild-type SPT1 subunit lowers desoxysphingolipid levels and rescues the phenotype of HSAN1. *J. Neurosci.*, **29**, 14646-14651.
 - 36) Penno A., Reilly M. M., Houlden H., Laura M., Rentsch K., *et al.* (2010) Hereditary sensory neuropathy type 1 is caused by the accumulation of two neurotoxic sphingolipids. *J. Biol. Chem.*, **285**, 11178-11187.
 - 37) Kihara A. and Igarashi Y. (2004) FVT-1 Is a mammalian 3-ketodihydrosphingosine reductase with an active site that faces the cytosolic side of the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.*, **279**, 49243-49250.
 - 38) Mizutani Y., Kihara A., and Igarashi Y. (2005) Mammalian Lass6 and its related family members regulate synthesis of specific ceramides. *Biochem. J.*, **390**, 263-271.
 - 39) Mizutani Y., Kihara A., and Igarashi Y. (2006) LASS3 (longevity assurance homologue

- 3) is a mainly testis-specific (dihydro)ceramide synthase with relatively broad substrate specificity. *Biochem. J.*, **398**, 531-538.
- 40) Tidhar R. and Futerman A. H. (2013) The complexity of sphingolipid biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 2511-2518.
- 41) Omae F., Miyazaki M., Enomoto A., Suzuki M., Suzuki Y., *et al.* (2004) DES2 protein is responsible for phytoceramide biosynthesis in the mouse small intestine. *Biochem. J.*, **379**, 687-695.
- 42) Mizutani Y., Kihara A., and Igarashi Y. (2004) Identification of the human sphingolipid C4-hydroxylase, hDES2, and its up-regulation during keratinocyte differentiation. *FEBS Lett.*, **563**, 93-97.
- 43) Mendelson K., Evans T., and Hla T. (2014) Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development*, **141**, 5-9.
- 44) Burla B., Arita M., Arita M., Bendt A. K., Cazenave-Gassiot A., *et al.* (2018) MS-based lipidomics of human blood plasma: a community-initiated position paper to develop accepted guidelines. *J. Lipid Res.*, **59**, 2001-2017.
- 45) Mendoza A., Breart B., Ramos-Perez W. D., Pitt L. A., Gobert M., *et al.* (2012) The transporter *Spns2* is required for secretion of lymph but not plasma sphingosine-1-phosphate. *Cell Rep.*, **2**, 1104-1110.
- 46) Nagahashi M., Kim E. Y., Yamada A., Ramachandran S., Allegood J. C., *et al.* (2013) *Spns2*, a transporter of phosphorylated sphingoid bases, regulates their blood and lymph levels, and the lymphatic network. *FASEB J.*, **27**, 1001-1011.
- 47) Ito K., Anada Y., Tani M., Ikeda M., Sano T., *et al.* (2007) Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **357**, 212-217.
- 48) Kihara A., Mitsutake S., Mizutani Y., and Igarashi Y. (2007) Metabolism and biological functions of two phosphorylated sphingolipids, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate. *Prog. Lipid Res.*, **46**, 126-144.
- 49) Glickman M., Malek R. L., Kwitek-Black A. E., Jacob H. J., and Lee N. H. (1999) Molecular cloning, tissue-specific expression, and chromosomal localization of a novel nerve growth factor-regulated G-protein-coupled receptor, *nrg-1*. *Mol. Cell Neurosci.*, **14**, 141-152.
- 50) Graler M. H., Bernhardt G., and Lipp M. (1998) EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. *Genomics*, **53**, 164-169.
- 51) Ishii I., Friedman B., Ye X., Kawamura S., McGiffert C., *et al.* (2001) Selective loss of

- sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LP_{B3}/EDG-3. *J. Biol. Chem.*, **276**, 33697-33704.
- 52) Kihara A. and Igarashi Y. (2008) Production and release of sphingosine 1-phosphate and the phosphorylated form of the immunomodulator FTY720. *Biochim. Biophys. Acta*, **1781**, 496-502.
- 53) Allende M. L., Yamashita T., and Proia R. L. (2003) G-protein-coupled receptor S1P₁ acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood*, **102**, 3665-3667.
- 54) Lee M. J., Thangada S., Claffey K. P., Ancellin N., Liu C. H., *et al.* (1999) Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell*, **99**, 301-312.
- 55) Kono M., Mi Y., Liu Y., Sasaki T., Allende M. L., *et al.* (2004) The sphingosine-1-phosphate receptors S1P₁, S1P₂, and S1P₃ function coordinately during embryonic angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, **279**, 29367-29373.
- 56) Kohama T., Olivera A., Edsall L., Nagiec M. M., Dickson R., *et al.* (1998) Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 23722-23728.
- 57) Liu H., Sugiura M., Nava V. E., Edsall L. C., Kono K., *et al.* (2000) Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J. Biol. Chem.*, **275**, 19513-19520.
- 58) Ogawa C., Kihara A., Gokoh M., and Igarashi Y. (2003) Identification and characterization of a novel human sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase, hSPP2. *J. Biol. Chem.*, **278**, 1268-1272.
- 59) Bektas M., Allende M. L., Lee B. G., Chen W., Amar M. J., *et al.* (2010) Sphingosine 1-phosphate lyase deficiency disrupts lipid homeostasis in liver. *J. Biol. Chem.*, **285**, 10880-10889.
- 60) Vogel P., Donoviel M. S., Read R., Hansen G. M., Hazlewood J., *et al.* (2009) Incomplete inhibition of sphingosine 1-phosphate lyase modulates immune system function et prevents early lethality and non-lymphoid lesions. *PLoS One*, **4**, e4112.
- 61) Prasad R., Hadjidemetriou I., Maharaj A., Meimaridou E., Buonocore F., *et al.* (2017) Sphingosine-1-phosphate lyase mutations cause primary adrenal insufficiency and steroid-resistant nephrotic syndrome. *J. Clin. Invest.*, **127**, 942-953.
- 62) Wakashima T., Abe K., and Kihara A. (2014) Dual functions of the *trans*-2-enoyl-CoA reductase TER in the sphingosine 1-phosphate metabolic pathway and in fatty acid elongation. *J. Biol. Chem.*, **289**, 24736-24748.
- 63) Kondo N., Ohno Y., Yamagata M., Obara T., Seki N., *et al.* (2014) Identification of the

- phytosphingosine metabolic pathway leading to odd-numbered fatty acids. *Nat. Commun.*, **5**, 5338.
- 64) Kitamura T., Seki N., and Kihara A. (2017) Phytosphingosine degradation pathway includes fatty acid α -oxidation reactions in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **114**, E2616-E2623.
- 65) Nakahara K., Ohkuni A., Kitamura T., Abe K., Naganuma T., *et al.* (2012) The Sjögren-Larsson syndrome gene encodes a hexadecenal dehydrogenase of the sphingosine 1-phosphate degradation pathway. *Mol. Cell*, **46**, 461-471.
- 66) Ternes P., Franke S., Zahringer U., Sperling P., and Heinz E. (2002) Identification and characterization of a sphingolipid Δ 4-desaturase family. *J. Biol. Chem.*, **277**, 25512-25518.
- 67) Castro L. F., Tocher D. R., and Monroig O. (2016) Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of Fads and Elovl gene repertoire. *Prog. Lipid Res.*, **62**, 25-40.
- 68) Guillou H., Zadavec D., Martin P. G., and Jacobsson A. (2010) The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog. Lipid Res.*, **49**, 186-199.
- 69) Igal R. A. and Sinner D. I. (2021) Stearoyl-CoA desaturase 5 (SCD5), a Δ -9 fatty acyl desaturase in search of a function. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, **1866**, 158840.
- 70) Marquardt A., Stohr H., White K., and Weber B. H. (2000) cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics*, **66**, 175-183.
- 71) Reynolds L. M., Howard T. D., Ruczinski I., Kanchan K., Seeds M. C., *et al.* (2018) Tissue-specific impact of *FADS* cluster variants on *FADS1* and *FADS2* gene expression. *PLoS One*, **13**, e0194610.
- 72) Fan Y. Y., Monk J. M., Hou T. Y., Callway E., Vincent L., *et al.* (2012) Characterization of an arachidonic acid-deficient (*Fads1* knockout) mouse model. *J. Lipid Res.*, **53**, 1287-1295.
- 73) Powell D. R., Gay J. P., Smith M., Wilganowski N., Harris A., *et al.* (2016) *Fatty acid desaturase 1* knockout mice are lean with improved glycemic control and decreased development of atheromatous plaque. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.*, **9**, 185-199.
- 74) Hayashi Y., Lee-Okada H. C., Nakamura E., Tada N., Yokomizo T., *et al.* (2021) Ablation of fatty acid desaturase 2 (*FADS2*) exacerbates hepatic triacylglycerol and cholesterol accumulation in polyunsaturated fatty acid-depleted mice. *FEBS Lett.*, **595**,

1920-1932.

- 75) Stoffel W., Holz B., Jenke B., Binczek E., Gunter R. H., *et al.* (2008) Δ 6-desaturase (FADS2) deficiency unveils the role of ω 3- and ω 6-polyunsaturated fatty acids. *EMBO J.*, **27**, 2281-2292.
- 76) Stroud C. K., Nara T. Y., Roqueta-Rivera M., Radlowski E. C., Lawrence P., *et al.* (2009) Disruption of FADS2 gene in mice impairs male reproduction and causes dermal and intestinal ulceration. *J. Lipid Res.*, **50**, 1870-1880.
- 77) Ge L., Gordon J. S., Hsuan C., Stenn K., and Prouty S. M. (2003) Identification of the Δ -6 Desaturase of Human Sebaceous Glands: Expression and Enzyme Activity. *J. Invest. Dermatol.*, **120**, 707-714.
- 78) Ntambi J. M., Miyazaki M., Stoehr J. P., Lan H., Kendzioriski C. M., *et al.* (2002) Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 11482-11486.
- 79) Sundberg J. P., Boggess D., Sundberg B. A., Eilertsen K., Parimoo S., *et al.* (2000) Asebia-2J (*Scd1^{ab2J}*): a new allele and a model for scarring alopecia. *Am. J. Pathol.*, **156**, 2067-2075.
- 80) Miyazaki M., Man W. C., and Ntambi J. M. (2001) Targeted disruption of stearoyl-CoA desaturase1 gene in mice causes atrophy of sebaceous and meibomian glands and depletion of wax esters in the eyelid. *J. Nutr.*, **131**, 2260-2268.
- 81) Inaba T., Tanaka Y., Tamaki S., Ito T., Ntambi J. M., *et al.* (2018) Compensatory increases in tear volume and mucin levels associated with meibomian gland dysfunction caused by stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency. *Sci. Rep.*, **8**, 3358.
- 82) Karsai G., Kraft F., Haag N., Korenke G. C., Hanisch B., *et al.* (2019) DEGS1-associated aberrant sphingolipid metabolism impairs nervous system function in humans. *J. Clin. Invest.*, **129**, 1229-1239.
- 83) Miyazaki M., Bruggink S. M., and Ntambi J. M. (2006) Identification of mouse palmitoyl-coenzyme A Δ 9-desaturase. *J. Lipid Res.*, **47**, 700-704.
- 84) Nicolaidis N. (1974) Skin lipids: their biochemical uniqueness. *Science*, **186**, 19-26.
- 85) Tanno H., Sassa T., Sawai M., and Kihara A. (2021) Production of branched-chain very-long-chain fatty acids by fatty acid elongases and their tissue distribution in mammals. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, **1866**, 158842.
- 86) Wang Z., Park H. G., Wang D. H., Kitano R., Kothapalli K. S. D., *et al.* (2020) Fatty acid desaturase 2 (FADS2) but not FADS1 desaturates branched chain and odd chain saturated fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, **1865**, 158572.
- 87) Michinaka Y., Aki T., Inagaki K., Higashimoto H., Shimada Y., *et al.* (2001) Production

- of polyunsaturated fatty acids by genetic engineering of yeast. *J. Oleo Sci.*, **50**, 359-365.
- 88) Shanklin J. and Cahoon E. B. (1998) Desaturation and related modification of fatty acids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**, 611-641.
- 89) Sperling P., Ternes P., Zank T. K., and Heinz E. (2003) The evolution of desaturases. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **68**, 73-95.
- 90) Panganamala R. V., Geer J. C., and Cornwell D. G. (1969) Long-chain bases in the sphingolipids of atherosclerotic human aorta. *J. Lipid Res.*, **10**, 445-455.
- 91) Sassa T., Hirayama T., and Kihara A. (2016) Enzyme activities of the ceramide synthases CERS2-6 are regulated by phosphorylation in the C-terminal region. *J. Biol. Chem.*, **291**, 7477-7487.
- 92) Ohno Y., Suto S., Yamanaka M., Mizutani Y., Mitsutake S., *et al.* (2010) ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 18439-18444.
- 93) Sassa T., Ohno Y., Suzuki S., Nomura T., Nishioka C., *et al.* (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.
- 94) Yamamoto M., Sassa T., Kyono Y., Uemura H., Kugo M., *et al.* (2021) Comprehensive stratum corneum ceramide profiling reveals reduced acylceramides in ichthyosis patient with *CERS3* mutations. *J. Dermatol.*, **48**, 447-456.
- 95) Lone M. A., Hulsmeier A. J., Saied E. M., Karsai G., Arenz C., *et al.* (2020) Subunit composition of the mammalian serine-palmitoyltransferase defines the spectrum of straight and methyl-branched long-chain bases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **117**, 15591-15598.
- 96) Blanchard H., Legrand P., and Pedrono F. (2011) Fatty acid desaturase 3 (*Fads3*) is a singular member of the *Fads* cluster. *Biochimie*, **93**, 87-90.
- 97) Schmitt S., Castelvetti L. C., and Simons M. (2015) Metabolism and functions of lipids in myelin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1851**, 999-1005.
- 98) Candelore M. R., Wright M. J., Tota L. M., Milligan J., Shei G. J., *et al.* (2002) Phytosphingosine 1-phosphate: a high affinity ligand for the S1P₄/Edg-6 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **297**, 600-606.
- 99) Wu J., Spiegel S., and Sturgill T. W. (1995) Sphingosine 1-phosphate rapidly activates the mitogen-activated protein kinase pathway by a G protein-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, **270**, 11484-11488.
- 100) Inoue A., Ishiguro J., Kitamura H., Arima N., Okutani M., *et al.* (2012) TGF α shedding

- assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nat. Methods*, **9**, 1021-1029.
- 101) Dixon A. S., Schwinn M. K., Hall M. P., Zimmerman K., Otto P., *et al.* (2016) NanoLuc complementation reporter optimized for accurate measurement of protein interactions in cells. *Acs. Chem. Biol.*, **11**, 400-408.
- 102) Whalen E. J., Rajagopal S., and Lefkowitz R. J. (2011) Therapeutic potential of β -arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends Mol. Med.*, **17**, 126-139.
- 103) Karsai G., Lone M., Kutalik Z., Brenna J. T., Li H., *et al.* (2020) FADS3 is a Δ 14Z sphingoid base desaturase that contributes to gender differences in the human plasma sphingolipidome. *J. Biol. Chem.*, **295**, 1889-1897.
- 104) Bai Y., McCoy J. G., Levin E. J., Sobrado P., Rajashankar K. R., *et al.* (2015) X-ray structure of a mammalian stearyl-CoA desaturase. *Nature*, **524**, 252-256.
- 105) Wang H., Klein M. G., Zou H., Lane W., Snell G., *et al.* (2015) Crystal structure of human stearyl-coenzyme A desaturase in complex with substrate. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 581-585.
- 106) Oshino N., Imai Y., and Sato R. (1971) A function of cytochrome *b5* in fatty acid desaturation by rat liver microsomes. *J. Biochem.*, **69**, 155-167.
- 107) Porter T. D. (2002) The roles of cytochrome *b5* in cytochrome P450 reactions. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **16**, 311-316.
- 108) Billich A., Bornancin F., Devay P., Mechtcheriakova D., Urtz N., *et al.* (2003) Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases. *J. Biol. Chem.*, **278**, 47408-47415.
- 109) Ikeda M., Kihara A., Kariya Y., Lee Y. M., and Igarashi Y. (2005) Sphingolipid-to-glycerophospholipid conversion in *SPL*-null cells implies the existence of an alternative isozyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **329**, 474-479.
- 110) Jones J. W., Carter C. L., Li F., Yu J., Pierzchalski K., *et al.* (2017) Ultrapformance convergence chromatography-high resolution tandem mass spectrometry for lipid biomarker profiling and identification. *Biomed. Chromatogr.*, **31**
- 111) Bieberich E. (2018) Sphingolipids and lipid rafts: Novel concepts and methods of analysis. *Chem. Phys. Lipids*, **216**, 114-131.
- 112) Hoetzl S., Sprong H., and van Meer G. (2007) The way we view cellular (glyco)sphingolipids. *J. Neurochem.*, **103**, 3-13.
- 113) Ticozzi-Valerio D., Raimondo F., Pitto M., Rocco F., Bosari S., *et al.* (2007) Differential expression of AQP1 in microdomain-enriched membranes of renal cell carcinoma. *Proteomics Clin. Appl.*, **1**, 588-597.

- 114) Welker P., Bohlick A., Mutig K., Salanova M., Kahl T., *et al.* (2008) Renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter activity and vasopressin-induced trafficking are lipid raft-dependent. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **295**, F789-802.
- 115) Huang C. and Li S. (1999) Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1422**, 273-307.
- 116) Chen M., Markham J. E., and Cahoon E. B. (2012) Sphingolipid $\Delta 8$ unsaturation is important for glucosylceramide biosynthesis and low-temperature performance in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **69**, 769-781.
- 117) Cousin B., Cinti S., Morroni M., Raimbault S., Ricquier D., *et al.* (1992) Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J. Cell Sci.*, **103 (Pt 4)**, 931-942.
- 118) Ghorbani M. and Himms-Hagen J. (1997) Appearance of brown adipocytes in white adipose tissue during CL 316,243-induced reversal of obesity and diabetes in Zucker *fa/fa* rats. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **21**, 465-475.
- 119) Okamatsu-Ogura Y., Fukano K., Tsubota A., Uozumi A., Terao A., *et al.* (2013) Thermogenic ability of uncoupling protein 1 in beige adipocytes in mice. *PLoS One*, **8**, e84229.
- 120) Bond L. M. and Ntambi J. M. (2018) UCP1 deficiency increases adipose tissue monounsaturated fatty acid synthesis and trafficking to the liver. *J. Lipid Res.*, **59**, 224-236.
- 121) Zhang T., Barclay L., Walensky L. D., and Saghatelian A. (2015) Regulation of mitochondrial ceramide distribution by members of the BCL-2 family. *J. Lipid Res.*, **56**, 1501-1510.
- 122) <https://www.mousephenotype.org/data/search?term=FADS3&type=gene>.
- 123) Zhang J. Y., Qin X., Liang A., Kim E., Lawrence P., *et al.* (2017) *Fads3* modulates docosahexaenoic acid in liver and brain. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **123**, 25-32.
- 124) Kihara A., Anada Y., and Igarashi Y. (2006) Mouse sphingosine kinase isoforms SPHK1a and SPHK1b differ in enzymatic traits including stability, localization, modification, and oligomerization. *J. Biol. Chem.*, **281**, 4532-4539.
- 125) Yatomi Y., Ohmori T., Rile G., Kazama F., Okamoto H., *et al.* (2000) Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells. *Blood*, **96**, 3431-3438.

8. 謝辞

本研究の遂行に際しまして手厚いご指導、ご鞭撻賜りました北海道大学大学院 薬学研究院 生化学研究室 木原章雄教授に深謝申し上げます。研究はもちろんのこと、生活面や精神面でも多くのことを学ばせていただきました。木原先生は私の中で第二の父のような存在であり、木原先生のもとでなければ博士課程への進学自体考えていなかったと思います。この研究室で学生時代の 6 年半を過ごし、恵まれた環境で研究できたことは大変幸運なことであったと感じております。今後は自分自身の成長だけでなく、他の学生たちが自分と同じように研究や実験を好きになれるような研究室づくりを目指したいと思っておりますのでよろしくお願い致します。

本研究において有益なご助言、ご指導賜りました同研究室 佐々貴之准教授、大野祐介助教授、永沼達郎助教授に厚く御礼申し上げます。佐々先生には、マウスの扱いを含めた実験手法のご教授や学生指導の際の手助けをしていただきました。大野先生は普段の実験だけでなく、国際論文や修士論文の作成指導、そして本論文に関しましても作成指導にあたっていただき大変お世話になりました。永沼先生は細胞系における実験のご教授や新しい視点からのご助言をいただき、私の研究がより発展的なものになりました。

御多忙の中で本論文の査読をしてくださり、懇切丁寧なご指導・ご助言を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 認知症先進予防・解析学分野 鈴木利治教授、多留偉功准教授に心より御礼申し上げます。

本研究において、GPCR の活性測定法のご教授賜りました東京大学大学院薬学系研究科 衛生化学教室 青木淳賢教授、東北大学薬学研究科医療薬科学専攻 機能解析薬学講座 分子細胞生化学分野 井上飛鳥教授に深く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、経済的なご支援を賜りました日本学術振興会 (JP22J12598) ならびに北海道大学 DX 博士人材フェローシップに厚く御礼申し上げます。

最後にここまで私を応援し、支えてくださった家族、友人に感謝申し上げます。本当にありがとうございました。これからもよろしくお願い致します。