



Title	トランス2-エノイルCoAレダクターゼ TERの役割と病態の解明 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	安部, 健介
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第12372号
Issue Date	2016-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62529
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kensuke_Abe_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士(薬科学) 氏 名 安部 健介

学 位 論 文 題 名

トランス 2-エノイル CoA レダクターゼ TER の役割と病態の解明

[序論]

スフィンゴ脂質は真核生物に広く保存されている脂質分子であり、皮膚バリアや精子形成、ミエリン鞘の安定化に寄与する等、様々な生理機能を有している。スフィンゴ脂質の分解産物であるスフィンゴシン (Sph) はリン酸化されることでスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) へと変換され、受容体を介して様々な細胞応答を引き起こす。S1Pは開裂反応を受けた後、多段階の反応によって不可逆的にパルミトイルCoAへと代謝され、主にグリセロ脂質合成に用いられる。この分解経路はスフィンゴ脂質をグリセロ脂質へと代謝する唯一の経路であり、生体内のスフィンゴ脂質量の調節を担う重要な経路である。これまでにS1P分解経路の各反応を担う酵素群の殆どは明らかとなっているが、この経路の最終反応(ヘキサデセノイルCoAからパルミトイルCoAへの還元)を行う酵素(トランス 2-エノイルCoAレダクターゼ)遺伝子のみが未だ同定されていない。そこで、本研究ではこの酵素遺伝子の同定を試みた。

TERは小胞体膜上で炭素数21以上の脂肪酸である極長鎖脂肪酸の合成過程で生じるトランス 2-エノイルCoAをアシルCoAへと還元するトランス 2-エノイルCoAレダクターゼである。また、この酵素遺伝子の変異によって家族性精神遅滞が引き起こされることが既に報告されている。この変異は1塩基置換によってTERの182番目のプロリンがロイシンへと置換されたTER P182L変異タンパク質を生じる。しかし、これまでの報告ではP182L変異体の酵素活性及び脂質代謝への影響は検討されていなかった。

極長鎖脂肪酸合成においてトランス 2-エノイルCoAレダクターゼはTERのみがその酵素活性を確認されているが、哺乳類にはTERとアミノ酸の相同性の高いTERLが存在し、骨格筋に発現していることが知られている。しかし、TERLの機能は明らかとなっていない。

以上の点から本研究ではS1P分解経路におけるトランス 2-エノイルCoAレダクターゼ遺伝子を同定すること、P182L変異による脂質代謝経路への影響を明らかにすること、TERLの解析を行い、その機能を明らかにすることで生体における脂質代謝と脂質の役割について新たな知見を得ることを目的とした。

[結果及び考察]

1. S1P分解経路におけるTERの役割

これまでに得られたS1P分解経路に対する知見から、S1P分解経路におけるトランス 2-エノイルCoAレダクターゼは小胞体に局在し、組織発現は広範であることが予想された。この様な特徴を持つ酵素としてTERに着目し、S1P分解経路への関与を検討した。TERの出芽酵母ホモログであるTSC13の遺伝子欠損株(*tsc13Δ*)を作製し、³H]Sphを用いて代謝トレーサー実験を行った。その結果、*tsc13Δ*株は野生型に比べ、Sphのグリセロ脂質への代謝が大きく低下していることが明らかとなった。また、このグリセロ脂質への代謝低下はヒトTER遺伝子の導入によって回復したことから、TERがS1P分解経路に

関与することが示唆された。次に、哺乳類細胞を用いてこの結果を確認するため、*TER* をノックダウンしたHeLa細胞を用いてトレーサー実験を行った。その結果、HeLa 細胞においても*TER* ノックダウンによってSphのグリセロ脂質への代謝は低下していた。*TER*は極長鎖脂肪酸合成に関わる酵素であるため、*TER*のノックダウンによって極長鎖脂肪酸の合成量が低下した結果、その間接的な影響としてS1P分解が抑制された可能性も考えられた。そこで、*TER*がS1P分解経路における還元反応に直接関与しているかを解析するためにHeLa細胞の膜画分を用いて*in vitro*でのS1P分解アッセイを行った。その結果、*TER*のノックダウンによってヘキサデセノイルCoAの蓄積が見られ、S1P分解経路における還元反応が実際に低下しており、*TER*はS1P分解反応における還元反応を触媒する酵素であることが明らかとなった。

2. 家族性精神遅滞を引き起こす*TER* P182L変異体の解析

TER P182L変異体をHEK 293T細胞に過剰発現させたところ、野生型*TER*と比べ、タンパク質量の減少が観察された。このことから、*P182L*変異によって*TER*が不安定化している可能性が考えられたため、パルスチェイス法で変異体の安定性を評価した。その結果、実際に*P182L*変異によって*TER*が不安定化していることが明らかとなった。次に、*P182L*変異による極長鎖脂肪酸合成への影響を明らかにするため、*P182L*ホモ変異を持つ患者由来Bリンパ芽球様細胞株 (B-LCL) から膜画分を調製し、*in vitro*での脂肪酸伸長アッセイを行った。その結果、*P182L*変異によって伸長された脂肪酸の量の減少とトランス-2-脂肪酸の蓄積が観察された。また、*P182L*変異による活性低下が下流の代謝産物へ与える影響を検討するため、B-LCLから脂質を抽出し、極長鎖脂肪酸の主要な代謝産物であるスフィンゴ脂質をアシル基の鎖長毎にマスマススペクトロメトリーで検出した。その結果、*P182L*ホモ変異を持つB-LCLでは極長鎖であるC24:1のアシル基を持つスフィンゴ脂質が減少し、長鎖であるC16のアシル基を持つスフィンゴ脂質が増加していることが明らかとなった。極長鎖スフィンゴ脂質は中枢神経系においてミエリン鞘の安定化に寄与していることが知られている。そのため、本研究における結果は、*P182L*変異によってミエリンの機能低下が起きている可能性を示唆している。一方、*TER*は全身で発現しており、他の臓器や組織でも極長鎖スフィンゴ脂質が減少していることが予想されるが、この変異は精神遅滞のみを示す。このことから精神発達は極長鎖スフィンゴ脂質減少の影響を強く受けやすいことが強く示唆された。

3. *TER*ホモログ*TERL*の解析

*TERL*の骨格筋以外の組織発現は不明であったため、*TERL*の組織発現分布をRT-PCRにより解析した。その結果、*TERL*は骨格筋と心臓に特異的に発現していることが明らかとなった。次に、*TERL*の骨格筋における役割を明らかにするため、マウス筋芽細胞株であるC2C12細胞を用いてCRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集によって*Terl*ノックアウト細胞株を樹立した。樹立した細胞株に対して分化を誘導したところ、筋管細胞への分化が抑制された。このことから、筋分化過程では脂質代謝の変化が筋管の形成において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

以上の結果より、*TER*がS1P分解経路に関わることが示され、これまで極長鎖脂肪酸合成にのみ関わると考えられてきた*TER*の新たな役割が明らかとなった。極長鎖脂肪酸は主にスフィンゴ脂質の合成に用いられることから、*TER*は極長鎖スフィンゴ脂質の合成と分解の両方向に関与し、スフィンゴ脂質の恒常性の維持に重要な役割を持つ酵素であることが明らかとなった。更に、*TER* *P182L*変異による脂質代謝の変化を明らかにすることで、精神発達は極長鎖スフィンゴ脂質量の低下の影響を受けやすいことが強く示唆された。また、*Terl*は筋管形成過程において重要な役割を持ち、筋管形成における脂質代謝の変化が重要な役割を担っていることが示唆された。