HOKKAIDO UNIVERSITY

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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12372
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62530
Type	doctoral thesis
File Information	Kensuke_Abe.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士学位論文

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

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

安部　健介

序論 5
1．スフィンゴ脂質 5
2．長鎖塩基 6
2-1. 長鎖塩基 6
2-2. 長鎖塩基 1-リン酸 6
2-3. S1P の合成と分解 7
2-3-1. スフィンゴシン 1-リン酸リアーゼ 8
2-3-2. アルデヒドデヒドロゲナーゼ 9
2-3-3. アシル CoA シンテターゼ 9
3．脂肪酸 9
3-1. 脂肪酸の分類と生理機能 9
3-2. 脂肪酸伸長サイクル 10
3-2-1. 脂肪酸エロンガーゼ 11
3-2-2. 3-ケトアシル CoA レダクターゼ 15
3-2-3. 3-ヒドロキシアシル CoA デヒドラターゼ 15
3-2-4. トランス 2-エノイル CoA レダクターゼ 16
3-3. 家族性精神遅滞を引き起こす *TER P182L* 変異 16
3-4. *TER* ホモログ *TERL* 17
研究背景・目的 19
結果 21
1. S1P 分解経路における TER の関与の解析 21
1-1. 培養細胞を用いた Sph 代謝の定量的解析 21
1-2. *TER* は Sph のグリセロ脂質への代謝に関与する 24
1-2. *TER* ノックダウンは S1P 分解経路における還元反応を低下させる 27
2．家族性精神遅滞を引き起こす TER P182L 変異体の解析 30
2-1. *TER P182L* 変異によって TER タンパク質は不安定化する 30
2-2. *TER P182L* 変異は酵素活性を低下させる 31
2-3. *TER P182L* ホモ変異を持つ B リンパ芽球様細胞株では TER 活性が低下している 32
2-4. *TER P182L* 変異は極長鎖脂肪酸伸長サイクルに影響し，3-ヒドロキシアシル CoA 中間体を蓄積させる 34
2-5. *P182L* 変異によって極長鎖スフィンゴ脂質が減少する 35

2-6. *TER P182L* 変異は S1P 分解経路に影響しない 36
3. TER ホモログ TERL の解析 36
3-1. *TERL* は筋特異的に発現している 36
3-2. *Terl* 遺伝子ノックアウト C2C12 細胞は筋管形成に異常を示す 37
考察 39
1. S1P 分解経路における TER の役割の解析 39
2. TER P182L 変異体の解析 40
3. 筋特異的に発現する TER ホモログ TERL 43
材料と方法 45
細胞の培養と遺伝子導入 45
本研究で用いたベクター 46
遺伝子のクローニング 46
本研究で用いた酵母株と培養方法 48
動物細胞を用いた Sph 代謝トレーサー実験 48
出芽酵母 Sph 代謝トレーサー実験 49
RNA 干渉 50
RT-PCR 50
膜画分の調製 50
***in vitro* S1P 代謝反応実験 51**
SDS-PAGE 52
イムノブロッティング 53
パルスチェイス 53
TER 酵素活性測定 54
極長鎖脂肪酸伸長活性の測定 55
マススペクトロメトリーによるセラミド及びスフィンゴミエリンの検出 ... 56
***Terl* ノックアウト C2C12 細胞の作製 56**
表 1. 本研究で用いたプライマー 58
表 2.本研究で用いた酵母株 58
表 3. RNA 干渉に用いた dsRNA 59
表 4. *Terl* ノックアウト C2C12 細胞作製に用いたオリゴ DNA 配列 59
参考文献 60

略語

5-FU	5-fluorouracil
5-FOA	5-fluoroorotic acid
ACP	acyl carrier protein
ACS	acyl-CoA synthetase
ALDH	aldehyde dehydrogenase
ATP	adenosine 5'-triphosphate
B-LCL	B-lymphoblastoid cell line
Cer	ceramide
CERS	ceramide synthase
CoA	coenzyme A
DTT	dithiothreitol
ELOVL	elongation of very long-chain fatty acid
ESI	electrospray ionization
FA	fatty acid
FAS	fatty acid synthase
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HACD	3-hydroxyacyl-CoA dehydratase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HexCer	hexosylceramide
HPTLC	high-perfomance TLC
IPC	inositol phosphorylceramide
KAR	3-ketoacyl-CoA reductase
MIPC	mannosylinositol phosphorylceramide
$M(IP)_2C$	mannnosydiinositol phosphorylceramide
mRNA	messenger ribonucleic acid
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PBS	phosphate-buffered saline
PC	phosphatidylcholine
PCR	polymerase chain-reaction
PE	phosphatidylethanolamine

PI	phosphatidylinositol
PMSF	phenylmethane sulfonylfluoride
PS	phosphatidylserine
RT-PCR	reverse transcription PCR
S1P	sphingosine 1-phosphate
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SM	sphingomyelin
Sph	sphingosine
SPHK	sphingosine kinase
SPL	sphingosine 1-phosphate lyase
TBS-T	tris-buffered saline with Tween 20
TG	triglyceride
TER	*trans*-2-enoyl-CoA reductase
TERL	*trans*-2-enoyl-CoA reductase-like
TLC	thin layer chromatography
Tris	tris(hydroxymethyl) aminomethane

序論

1．スフィンゴ脂質

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種であり，グリセロリン脂質，ステロールと共に生体膜を形成する。スフィンゴ脂質は長鎖塩基のアミノ基と脂肪酸がアミド結合したセラミド（Cer）を基本骨格とし，1 位の水酸基に付加された極性基によって複合スフィンゴ脂質へと代謝される（図 1A）。哺乳類ではセラミドにホスホコリンが付加されたスフィンゴミエリンと糖が付加されたスフィンゴ糖脂質が主な複合スフィンゴ脂質である。また，スフィンゴ糖脂質は付加された糖の数や種類によって多様性が生み出されている。一方，出芽酵母ではホスホイノシトールが付加されたイノシトールホスホリルセラミド（IPC），IPC にマンノースが付加されたマンノシルイノシトールホスホリルセラミド（MIPC），MIPC に更にホスホイノシトールが付加されたマンノシルジイノシトールホスホリルセラミド（$M(IP)_2C$）の 3 種類が存在している（1）。

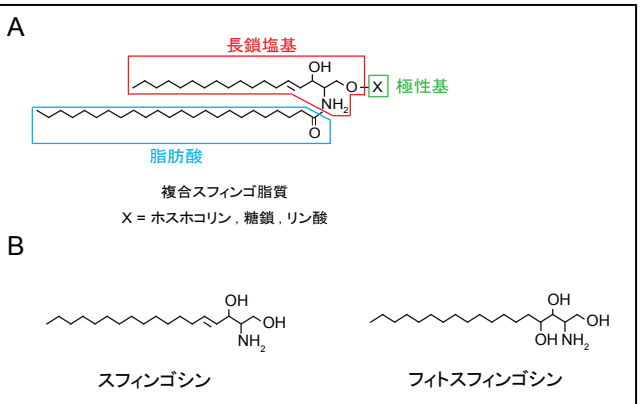


図 1 スフィンゴ脂質と長鎖塩基の構造
（A）スフィンゴ脂質はセラミドを基本骨格とし，構成する長鎖塩基，脂肪酸の種類とセラミドに付加する極性基によって多様性を生み出している。
（B）長鎖塩基の構造。哺乳類で主要な長鎖塩基であるスフィンゴシン（左）と出芽酵母で主要な長鎖塩基であるフィトスフィンゴシン（右）の構造を示す。

スフィンゴ脂質は単なる生体膜構成脂質として働くだけでなく，様々な生命現象に関連している。セラミドは皮膚バリア機能（2,3）や精子形成（4,5）に必須であることや，アポトーシスに関与する（6,7）こと等が知られている。また，スフィンゴ糖脂質の 1 種である GM3 の合成不全は聴覚障害を引き起こすことが GM3 合成酵素をコードする遺伝子のノックアウトマウスを用いた解析によって明らかとなっている（8）。また，複合スフィンゴ脂質の代謝異常は疾患と関連する。例えば，スフィンゴミエリンの分解酵素の機能欠損または低下は A，B 型ニーマン・ピック病を引き起こし（9），グルコシルセラミド分解酵素の機能欠損または低下はゴーシェ病を引き起こす（9）。更に，ここに述べた以外にもスフィンゴ脂質の代謝異常は様々な疾患を引き起こすことが報告されている（9）。

これらのことから，哺乳類ではスフィンゴ脂質の多様性とそのホメオスタシ

スの維持が正常な生命活動に重要であると考えられる。また，スフィンゴ脂質の多様性は極性基のみならず，セラミド骨格を構成する脂肪酸と長鎖塩基の組み合わせによっても生み出されている。

2．長鎖塩基

2-1．長鎖塩基

長鎖塩基は炭素数 18 または 20 の長鎖 1, 3 ジオールの 2 位にアミノ基が付加した構造を共通骨格とする分子である。哺乳類では 4 位と 5 位の炭素間に二重結合を持つスフィンゴシン（Sph）が主要な長鎖塩基であり，出芽酵母では 4 位に水酸基を持つフィトスフィンゴシン（PHS）が主要な長鎖塩基として存在している（図 1B）(10)。また，PHS は哺乳類では皮膚，小腸等に特異的に存在している。乾癬やアトピー性皮膚炎では PHS を含むスフィンゴ脂質が減少しており，PHS は皮膚バリアにおいて重要な役割を担っていることが示唆されている (11,12)。長鎖塩基はスフィンゴ脂質として生体膜に用いられる他，スフィンゴシン 1-リン酸（S1P）へと代謝され，脂質メディエーターとして働く。

2-2．長鎖塩基 1-リン酸

長鎖塩基 1-リン酸 は長鎖塩基の 1 位の炭素に付加している水酸基がリン酸化された構造をしており，哺乳類では主要な長鎖塩基であるスフィンゴシンに由来するスフィンゴシン 1-リン酸（S1P）が主要な長鎖塩基 1-リン酸として存在している。S1P は G タンパク質共役型受容体を介して細胞内にシグナルを伝達する。S1P 受容体はこれまでに 5 種類($S1P_{1-5}$)が報告されており，S1P は $S1P_{1-5}$ を介して細胞の遊走，接着，増殖，細胞骨格の再編成等を引き起こす (13,14)。S1P によるシグナル伝達は特に血管形成や免疫系において重要な役割を担っている（図 2)。血管形成において，S1P は血管内皮細胞

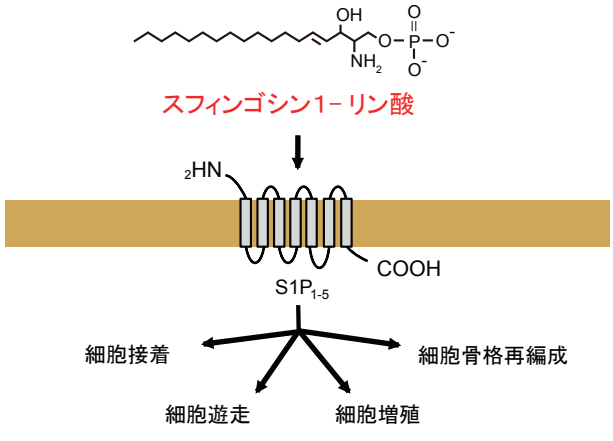


図 2　スフィンゴシン 1-リン酸は受容体を介して様々な細胞応答を引き起こす
スフィンゴシン 1-リン酸 （S1P） は G タンパク質共役型受容体である $S1P_{1-5}$ を介して様々な細胞応答を引き起こす。

に作用し，胎生期の血管安定化に寄与していることが *S1P*$_1$ ノックアウトマウスを用いた解析によって明らかとなっている（15）。また，免疫系において S1P は T リンパ球の胸腺から血中への移出，二次リンパ組織からリンパ液への移出段階で重要な役割を担っている。胸腺と血漿，二次リンパ組織とリンパ液間では S1P の濃度勾配が形成されており，濃度勾配に従って T リンパ球の移出が起こる（16)。Sph のアナログであるフィンゴリモドは S1P の免疫における機能を抑制することで自己免疫疾患の 1 つである多発性硬化症の治療薬として用いられている。

2-3. S1P の合成と分解

S1P はセラミドの分解によって生じるスフィンゴシンがスフィンゴシンキナーゼ（SPHK1，2）によってリン酸化されることで合成され（17,18)，その後可逆的にスフィンゴ脂質へと代謝される経路（ホスファターゼ経路）と不可逆的な代謝を受けてグリセロ脂質へと代謝される経路（S1P 分解経路）の 2 種類の経路によって代謝される（図 3)。ホスファターゼ経路では S1P は S1P ホスファターゼ(SGPP1, 2)による脱リン酸化によってスフィンゴシンへと変換され，セラミドを経て複合スフィンゴ脂質へと代謝される（19,20)。一方，S1P 分解経路では S1P はスフィンゴシン 1-リン酸リアーゼ（SPL）による開裂反応によってアルデヒドであるヘキサデセナールへと代謝される（21)。生じたアルデヒドは酸化されカルボン酸となり， CoA 付加を受けて 2 位にトランス二重結合を持つヘキサデセノイル CoA へと代謝される。ヘキサデセノイル CoA はトランス二重結合の還元を受けてパルミトイル CoA へと代謝された後，主にグリセロ脂質合成に用いられる（図 3）(22)。この経路において酸化反応を触媒するアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ALDH3A2）と，CoA 付加反応を触媒するアシル CoA シンテターゼ（ACSL1-6，ACSVL1，4，ACSBG1）は当研究室の中原，大國等によって明らかとなっている（23,24)。また，S1P 分解経路は出芽酵母においても保存されており，S1P リアーゼとして Dpl1，アルデヒドデヒドロゲナーゼとして Hfd1，アシル CoA シンテターゼとして Faa1，Faa4 が働くことが明らかとなっている（23-25)。S1P 分解経路はスフィンゴ脂質を不可逆的にグリセロ脂質へと代謝する。そのため, S1P は脂質メディエーターとしての役割のみならず，スフィンゴ脂質からグリセロ脂質へと代謝される際の分岐点に位置する代謝中間体としての側面を持っている。また，S1P 分解経路はスフィンゴ脂質を分解

する唯一の経路であるため，この経路は生体内のスフィンゴ脂質量の調節において重要な役割を担っていると考えられる。前述の通り，これまでの解析によって S1P 分解経路に関わる酵素群はその殆どが明らかとなっているが，ヘキサデセノイル CoA の 2 位のトランス二重結合を還元するトランス 2-エノイル CoA レダクターゼは未だ同定されていない。

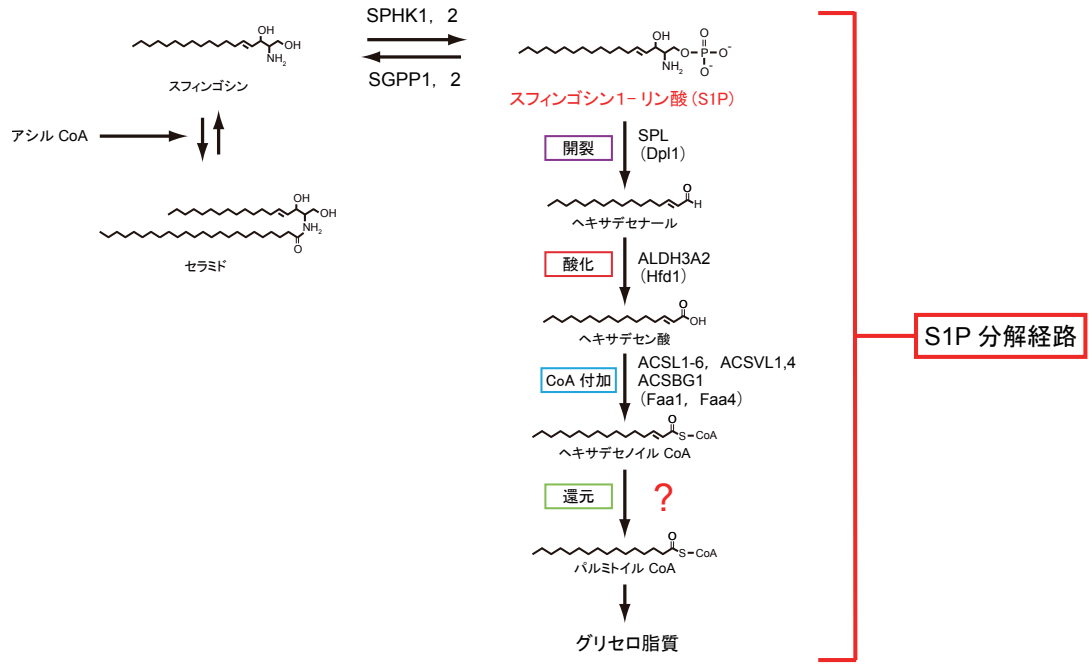


図 3　S1P の生合成と分解
スフィンゴシン 1-リン酸（S1P）はスフィンゴ脂質の基本骨格であるセラミドの分解によって生じたスフィンゴシンがスフィンゴシンキナーゼ（SPHK1，2）によってリン酸化されることで生成する。スフィンゴシン 1-リン酸リアーゼ （SPL） による S1P の開裂によって生じたヘキサデセナールは ALDH3A2 による酸化，ACS による CoA 付加，未同定のトランスエノイル還元酵素による還元を経てパルミトイル CoA となりグリセロリン脂質へと代謝される。S1P からグリセロリン脂質への代謝経路は S1P 分解経路と呼ばれる。図中の括弧内は出芽酵母における各反応を触媒する酵素を表す。

2-3-1. スフィンゴシン 1-リン酸リアーゼ

スフィンゴシン 1-リン酸リアーゼは S1P をヘキサデセナールとホスホエタノールアミンに分解する反応を触媒する酵素である（21）。*Spl* のノックアウトマウスでは肺や心臓の形態形成異常や骨形成異常，肝臓の代謝異常を引き起こし，生後 1 ヶ月程度で致死となることが報告されている（26,27）。このことから，S1P の分解によるスフィンゴ脂質量調節は生存のために重要であることが示されている。

2-3-2．アルデヒドデヒドロゲナーゼ

アルデヒドデヒドロゲナーゼはアルデヒドを NAD^+ または $NADP^+$ 依存的にカルボン酸へと酸化する反応を触媒する酵素である。ヒトではアルデヒドデヒドロゲナーゼは 19 種類が知られている (28)。S1P 分解経路においては ALDH3A2 がヘキサデセナールをヘキサデセン酸へと代謝することが明らかとなっている (23)。生体内では ALDH3A2 は S1P 分解経路に由来するヘキサデセナールの他にロイコトリエン B_4 の代謝過程で生じるアルデヒド，食餌由来のプリスタナールなどの分岐鎖アルデヒドの酸化を行っていると考えられている (29,30)。ヒト肝臓から精製した ALDH3A2 を用いた *in vitro* での解析では ALDH3A2 は炭素数 6-24 のアルデヒドに対して活性を示した (31)。また，*ALDH3A2* は魚鱗癬，痙性対麻痺，精神遅滞を示す Sjögren-Larsson 症候群の原因遺伝子としても知られている (32)。

2-3-3．アシル CoA シンテターゼ

アシル CoA シンテターゼは脂肪酸に ATP 依存的に CoA を付加する反応を触媒する酵素である。アシル CoA シンテターゼはヒトでは 26 種類が存在する (33)。S1P 分解経路においては ACSL1-6，ACSVL1,4，ACSBG1 がヘキサデセン酸をヘキサデセノイル CoA へと変換する (23,24)。

3．脂肪酸

3-1．脂肪酸の分類と生理機能

脂肪酸は炭化水素鎖とカルボキシル基からなり，炭化水素鎖の二重結合の数（不飽和度）及び炭素数（鎖長）によって分類される。脂肪酸は炭化水素鎖の二重結合の数によって，二重結合を持たない飽和脂肪酸，二重結合を 1 つ持つ一価不飽和脂肪酸，二重結合を 2 つ以上持つ多価不飽和脂肪酸に大別され，更に多価不飽和脂肪酸はカルボキシル基の反対側の末端炭素から数えて最初の二重結合の位置によって n-3 系列，n-6 系列に分類される。また，脂肪酸は炭素数によっても分類される。炭素数 12-20 の脂肪酸は長鎖脂肪酸，炭素数が 21 以上の脂肪酸は極長鎖脂肪酸として分類され，鎖長 x，不飽和度 n の脂肪酸は C x:n と表記される。

生体内の脂肪酸の多くは C16，C18 の飽和または一価不飽和脂肪酸であり (34,35)，スフィンゴ脂質やグリセロ脂質へと代謝されて生体膜として働く他，

トリグリセリドの様にエネルギー源に用いられる。

飽和及び一価不飽和の極長鎖脂肪酸は主にスフィンゴ脂質へと代謝され，生体内で様々な役割を担っている。炭素数 30 以上の非常に長い極長鎖脂肪酸を含むセラミドは皮膚バリア機能に必須である (2,3)。また，C24:0 及び C24:1 の極長鎖脂肪酸はスフィンゴ脂質へと代謝され (36,37)，コレステロールと共に脂質マイクロドメインを形成することが報告されている (38-40)。好中球ではマイクロドメインに存在する C24 のラクトシルセラミドが Src ファミリーキナーゼである Lyn の活性化及び Lyn を介したシグナル伝達に重要であることが報告されている (41,42)。出芽酵母の極長鎖脂肪酸はほぼ全てが C24，C26 の飽和脂肪酸であり，スフィンゴ脂質合成に用いられる (43)。

多価不飽和脂肪酸は主にグリセロ脂質へと代謝される。アラキドン酸（C20:4（n-6））はホスホリパーゼ A_2 によってグリセロ脂質から遊離し，プロスタグランジンやロイコトリエン，トロンボキサン等に代謝され，炎症に関与する (44)。ドコサヘキサエン酸（C22:6（n-3)），エイコサペンタエン酸（C20:5（n-3））といった n-3 系列の多価不飽和脂肪酸はレゾルビンやプロテクチンへと代謝され，炎症収束作用を示すことが知られている (45)。

多価不飽和脂肪酸の多くはグリセロ脂質へと代謝されるが，精子形成過程では C24 以上の多価不飽和脂肪酸がスフィンゴ脂質へと代謝され，精子形成において重要な役割を担っていることが知られている (5,46,47)。

また，脂肪酸は他の脂質に代謝されるだけでなく，受容体のリガンドとして働く。GPR120 は多価不飽和脂肪酸をリガンドとし，GPR120 ノックアウトマウスでは高脂肪食によるインスリン抵抗性の増悪や体重の増加が見られることから，肥満抑制的に働くことが報告されている (48)。また，GPR40 は長鎖脂肪酸をリガンドとし，膵 β 細胞においてインスリンの分泌を促進することが報告されている (49)。

3-2. 脂肪酸伸長サイクル

生体内の C16 の脂肪酸は脂肪酸合成酵素（Fatty acid synthase：FAS）によって細胞質ゾル中で合成される (50,51)。C16 より炭素数の大きい脂肪酸は CoA 付加によってアシル CoA に変換された後，脂肪酸伸長サイクルによって合成される (52-54)。脂肪酸伸長サイクルは小胞体膜上で脂肪酸エロンガーゼ（ELOVL1-7）による縮合反応，3-ケトアシル CoA レダクターゼ（KAR）によ

る還元反応，3-ヒドロキシアシル CoA デヒドラターゼ（HACD1-4）による脱水反応，トランス 2-エノイル CoA レダクターゼ（TER）による 4 段階の反応からなる（図 4）。マロニル CoA を炭素供与体としてこれらの 4 段階の反応を経てアシル CoA は 2 炭素伸長され，サイクルが連続的に駆動することで更に鎖長の大きい極長鎖脂肪酸が合成される（図 4，5）。出芽酵母では縮合反応を Elo2，Elo3 が，2 段階目の還元反応を Ybr159w が，脱水反応を Phs1 が，4 段階目の還元反応を Tsc13 がそれぞれ担う（55）。

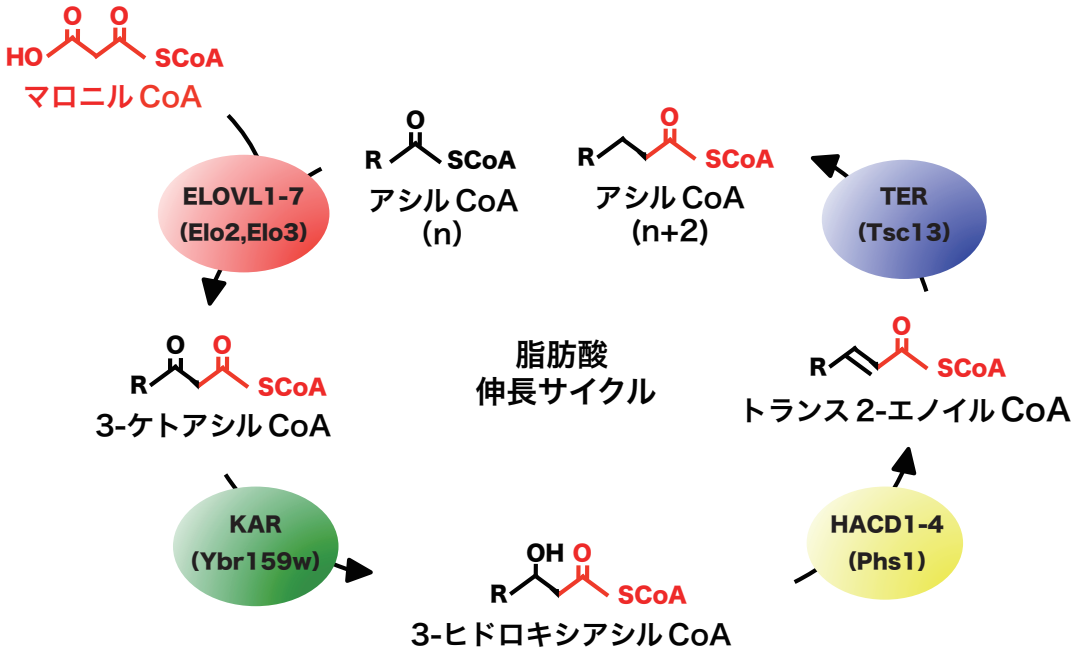


図 4　脂肪酸伸長サイクルによる極長鎖脂肪酸合成
脂肪酸伸長サイクルは小胞体膜上で複合体を形成し，C16 以上のアシル CoA とマロニル CoA を基質に縮合，還元，脱水，還元の 4 段階の反応を経て合成される。各反応はそれぞれ ELOVL1-7（Elo2，Elo3），KAR（Ybr159w），HACD1-4（Phs1），TER（Tsc13）が触媒する。括弧内は出芽酵母伸長サイクルにおける各反応を担う酵素を表す。

3-2-1．脂肪酸エロンガーゼ

脂肪酸エロンガーゼはアシル CoA とマロニル CoA を基質とし，両基質の縮合により 3-ケトアシル CoA を合成する反応を触媒する酵素である。ELOVL には 7 つのアイソザイムが存在し，それぞれ組織発現や基質とするアシル CoA の炭素数及び不飽和度に特異性を持つことが明らかとなっている（図 5）（42）。

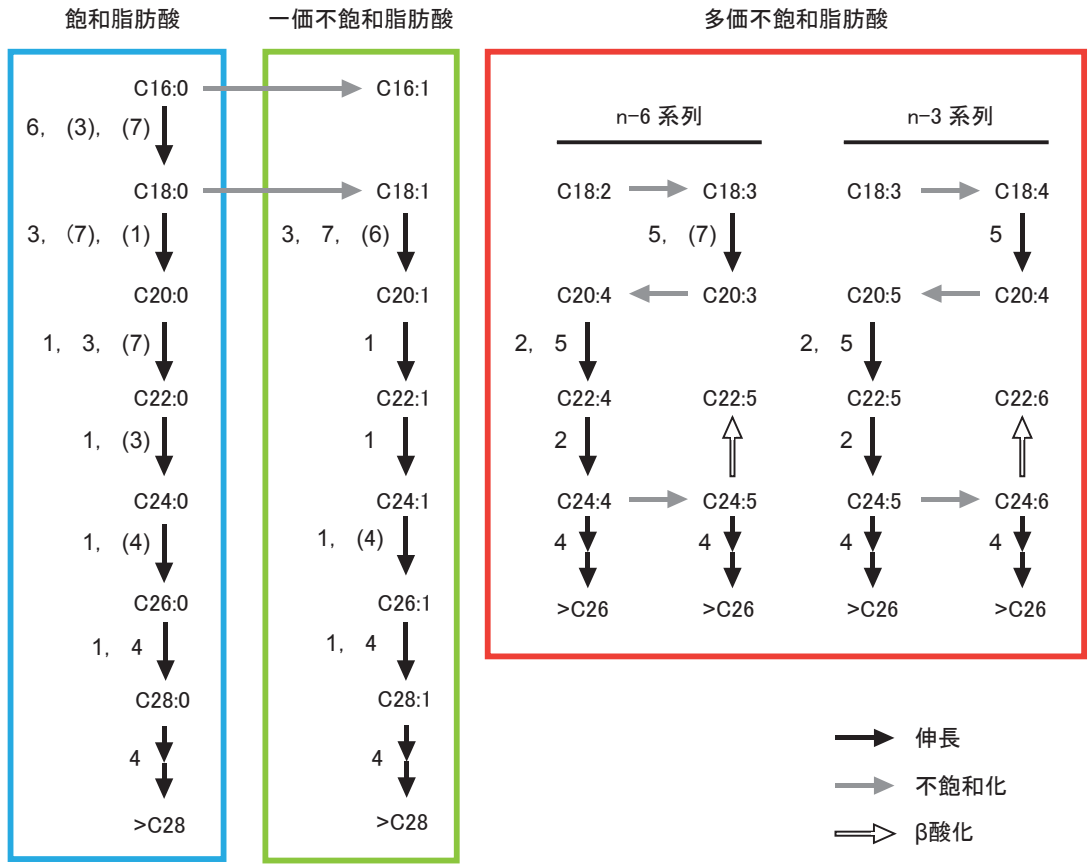


図 5　脂肪酸伸長経路と脂肪酸エロンガーゼ ELOVL の基質特異性
図は哺乳類における極長鎖脂肪酸伸長経路を示す。矢印横の数字はそれぞれの伸長反応を担う ELOVL アイソザイムを示し，弱い伸長活性を持つものは括弧で表す。

・ELOVL1

ELOVL1 は C18-26 の飽和アシル CoA 及び C20-24 の一価不飽和アシル CoA に対して活性を示す（42)。*ELOVL1* は全身に広く発現している（54)。*Elovl1* 遺伝子ノックアウトマウスの皮膚では C26 以上の極長鎖脂肪酸を含むスフィンゴ脂質が合成出来なくなる。そのため，皮膚バリアの形成が損なわれ，水分が保持出来なくなり，生後数時間で死亡することが当研究室の解析により明らかとなっている（56)。

・ELOVL2

ELOVL2 は C20:5（n-3)，C22:5（n-3）及び C20:4（n-6)，C22:4（n-6）の多価不飽和アシル CoA に対して活性を示す（42)。*ELOVL2* は肝臓及び精巣に特異的に発現していることが報告されている（4,5,54)。*Elovl2* 遺伝

子ノックアウトマウスを用いた解析では *Elovl2* のヘテロ及びホモノックアウトによって精子の成熟不全が観察され，雄性不妊の表現型を示した(5)。*Elovl2* ノックアウトマウスの精巣では Elovl2 により合成された多価不飽和脂肪酸を含むスフィンゴ脂質が減少しており，精子成熟過程での多価不飽和極長鎖スフィンゴ脂質の重要性が示されている(5)。

・ELOVL3

ELOVL3 は C16-22 の飽和アシル CoA 及び C18 の一価不飽和アシル CoA に対して活性を示す（42)。*ELOVL3* は皮膚，毛嚢や皮脂腺と褐色脂肪組織に発現している（54)。*Elovl3* ノックアウトマウスは皮膚バリア機能の低下が観察されている。また，このマウスでは表皮や毛のトリグリセリドに含まれる C22 以上の脂肪酸が減少しており，C20:1 の脂肪酸が増加していることが報告されている。このことから，皮脂に含まれるトリグリセリドの組成が変化することで皮膚バリア機能を低下させているものと考えられている（57)。また，褐色脂肪組織において *Elovl3* は寒冷に暴露された際に発現が上昇していること，トリグリセリド合成に関与することから熱産生に関与していることが示唆されている（57,58)。

・ELOVL4

ELOVL4 は炭素数 24 以上のアシル CoA に活性を示す（42)。*ELOVL4* は主に脳，網膜，皮膚，精巣に発現しており，特に網膜に強く発現していることが報告されている（54)。*Elovl4* ノックアウトマウスは皮膚バリアを形成する極長鎖脂肪酸が合成出来なくなるため，水分の保持が出来なくなり，新生致死となる（59)。また，*ELOVL4* は常染色体優性遺伝性若年性黄斑変成疾患である 3 型シュタルガルト病の原因遺伝子である。3 型シュタルガルト病では *ELOVL4* 遺伝子にフレームシフト変異が起きた結果，ELOVL4 の C 末端に存在する小胞体貯留シグナルを欠いた ELOVL4ΔC を遺伝子産物として生じる（60)。*Elovl4ΔC* のトランスジェニックマウスのヘテロ体ではシュタルガルト病様の症状を呈する。3 型シュタルガルト病では ELOVL4ΔC が野生型 ELOVL4 や他の ELOVL アイソザイムと凝集体を形成し，脂肪酸伸長を阻害することが報告されている（61,62)。

・ELOVL5

ELOVL5 は C18:3（n-6），C20:4（n-6），C18:4（n-3），C20:5（n-3）のアシル CoA に対して活性を示す（42)。ELOVL5 は広範な組織に発現が認められる。*Elovl5* ノックアウトマウスは脂肪肝を呈することが報告されている（63)。このマウスの肝臓では脂質合成関連遺伝子群の転写因子である SREBP1c が恒常的に活性化している。SREBP1c の活性は C20，C22 の多価不飽和脂肪酸によって制御されていることが報告されている(63,64)。*Elovl5* のノックアウトマウスでは多価不飽和脂肪酸の合成低下が SREBP1c の活性化を引き起こし，その結果，トリグリセリド等の脂質合成が亢進して脂肪肝を呈すると考えられている。

・ELOVL6

ELOVL6 は C16 の飽和アシル CoA に対して活性を示す（42)。*Elovl6* は広範な組織に発現しており，*Elovl6* の遺伝子ノックアウトマウスは 3 分の 2 が胎生もしくは新生致死となる（65)。しかし，生存したマウスは高脂肪，高ショ糖食飼育下で肥満や脂肪肝になるものの，インスリン抵抗性を示さないことが報告されている。褐色脂肪細胞では寒冷暴露時にミトコンドリア電子伝達系による H^+勾配を用いて熱産生が行われ, 体温の調節に寄与している。*Elovl6* ノックアウトマウスでは寒冷刺激下でのミトコンドリア機能が野生型と比べて低下し，熱産生能が低下していることが報告されている（66)。

・ELOVL7

ELOVL7 は C16-20 の飽和アシル CoA 及び C18 の一価不飽和，多価不飽和アシル CoA に対して主に活性を示す（42,67)。*ELOVL7* は広範な組織発現を見せるが，特に前立腺，膵臓，腎臓，副腎に高い発現を示している(68)。*ELOVL7* をノックダウンした前立腺癌細胞では，生育の低下やテストステロン分泌量の減少が報告されている。また，この細胞では飽和の C20-24 の脂肪酸が減少しており，Elovl7 による脂肪酸の合成は前立腺癌細胞の増殖に関与していることが示唆されている（68)。

3-2-2. 3-ケトアシル CoA レダクターゼ

3-ケトアシル CoA レダクターゼは 3-ケトアシル CoA の 3 位のケト基を NADPH 依存的に還元し，3-ヒドロキシアシル CoA へと変換する反応を触媒する酵素である。哺乳類では現在のところ KAR の 1 種類のみが伸長サイクルにおける 3-ケトアシル CoA レダクターゼ活性を持つことが報告されている（69)。*KAR* の組織発現は広範で，基質とする 3-ケトアシル CoA に特異性を持たないと考えられている（69)。*Kar* 遺伝子のノックアウトマウスは発生段階で致死となることから，伸長サイクルによる脂肪酸合成は発生過程で必須となることが示されている（70)。

3-2-3. 3-ヒドロキシアシル CoA デヒドラターゼ

3-ヒドロキシアシル CoA デヒドラターゼは 3-ヒドロキシアシル CoA の 3 位のヒドロキシ基を脱水反応によってトランス 2-エノイル CoA へと変換する反応を触媒する酵素である。哺乳類では HACD1-4 の 4 つのアイソザイムが存在し，ELOVL と同様にアイソザイム毎に組織発現が異なる（71,72)。また，精製した HACD を用いた酵素活性測定によって HACD1-4 は炭素数 16 の飽和 3-ヒドロキシアシル CoA に対して酵素活性を持つことが明らかとなっている（72)。

・HACD1

HACD1 は骨格筋及び心筋に特異的に発現している（73)。出芽酵母 *HACD* ホモログ *PHS1* の遺伝子発現抑制株に *HACD1* 遺伝子を発現させると，極長鎖脂肪酸合成低下による生育低下を回復させることから，C16-26 の飽和の 3-ヒドロキシアシル CoA に対して活性を持つことが示唆されている(72) 。*Hacd1* の変異によりイヌでは中心核ミオパチーを引き起こし（74,75)，ヒトにおいてもミオパチー症状を引き起こす *HACD1* 変異が知られている（76)。更に，*Hacd1* ノックアウトマウスでは筋肉量が減少することが当研究室とフランスのグループとの共同研究により明らかとなっていることから（77)，HACD1 は骨格筋形成において重要な役割を担っていることが示唆されている。

・HACD2

HACD2 は全身に発現している（78)。*PHS1* の発現抑制株に *HACD2* を

発現させると生育低下を回復させることから，*HACD1* と同様に C16-26 までの飽和の 3-ヒドロキシアシル CoA に対して活性を持つことが示唆されている（72)。

・HACD3

HACD3 は多くの組織に発現しており，特に脳や心臓，腎臓，肺，胎盤に強く発現している（71)。酵素活性については前述の通り，C16 の飽和 3-ヒドロキシアシル CoA に対する活性のみが報告されている。

・HACD4

*HACD4*は白血球に特異的に発現している。酵素活性については*HACD3* と同様に C16 の飽和 3-ヒドロキシアシル CoA に対する活性のみが報告されている（72）。

3-2-4．トランス 2-エノイル CoA レダクターゼ

トランス 2-エノイル CoA レダクターゼはトランス 2-エノイル CoA の 2 位の二重結合を NADPH 依存的に還元し，アシル CoA へと変換する反応を触媒する酵素である。伸長サイクルにおけるトランス 2-エノイル CoA レダクターゼは現在 TER のみが報告されている。*TER* はヒト及びマウスにおいて全身に発現していることが報告されている（69)。KAR と同様に基質とするトランス 2-エノイル CoA の炭素数や不飽和度に特異性を持たないと考えられている。

3-3．家族性精神遅滞を引き起こす *TER P182L* 変異

2011 年に家族性精神遅滞患者における遺伝子解析によって *TER* 遺伝子の劣性遺伝の変異が報告され，極長鎖脂肪酸合成と精神遅滞の関連が示唆された(79)。この変異は 1 塩基置換によるミスセンス変異であり，TER の 182 番目のプロリンがロイシンへと置換された TER P182L 変異体が遺伝子産物として産生される（図 6A)。また，この変異による精神遅滞は他の病態を示さないことが報告されている。これまでの報告では遺伝子解析が行われたのみであり，TER P182L タンパク質についての解析はなされておらず，変異による精神遅滞発症の詳細な分子メカニズムは不明である。脂肪酸伸長サイクルの一連の反応はア

シル CoA の局在から小胞体脂質二重層の細胞質ゾル側で起こることが考えられている（55)。このため，TER による還元も小胞体膜細胞質ゾル側で行われると考えられる。一方，TER のシロイヌナズナホモログのトポロジー解析結果から予測される TER の膜トポロジーでは変異残基は小胞体内腔側に位置している（図 6B）(80)。また，これまでに TER の機能ドメイン等の解析は行われていないため，*TER P182L* 変異が TER タンパク質の活性や安定性にどのような影響を及ぼすかを予想するのは難しく，変異による影響は不明である。

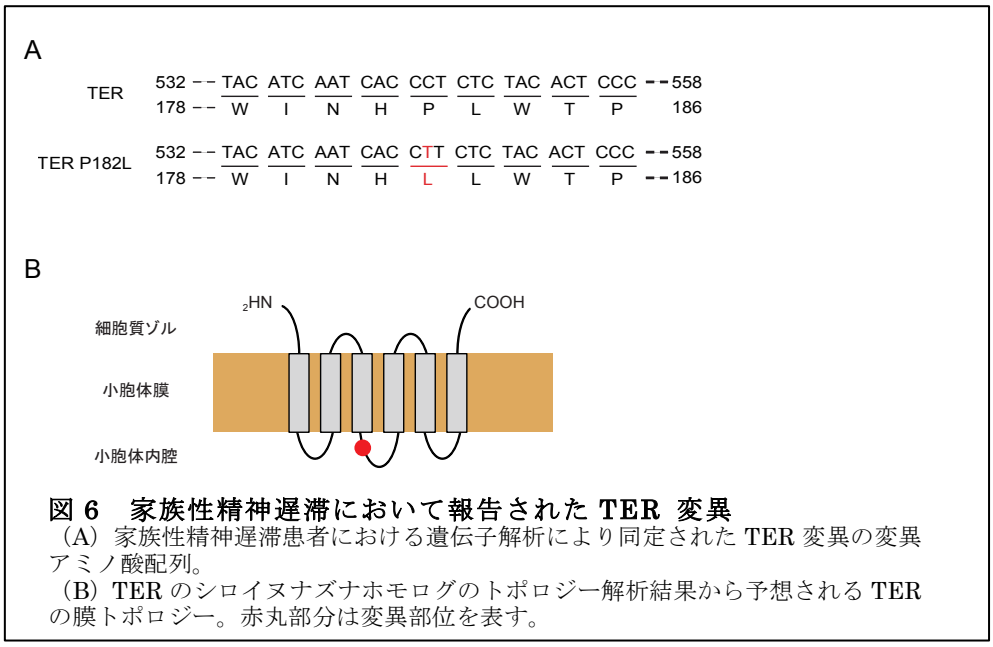


図 6　家族性精神遅滞において報告された TER 変異
（A）家族性精神遅滞患者における遺伝子解析により同定された TER 変異の変異アミノ酸配列。
（B）TER のシロイヌナズナホモログのトポロジー解析結果から予想される TER の膜トポロジー。赤丸部分は変異部位を表す。

3-4. *TER* ホモログ *TERL*

前述の通り脂肪酸伸長サイクルにおいてトランス 2-エノイル CoA レダクターゼ活性を有することが確認されている酵素は TER のみであるが，TER と高いホモロジー（相同性 43%，類似性 59%）を示す TERL（TER like）が National Center for Biotechnology Information（NCBI）データベースに報告されている（図 7)。TERL は TER との高い相同性から伸長サイクルにおいてトランス 2-エノイル CoA レダクターゼとして働くことが予想されるが，その酵素活性は明らかとなっていない。また，マウス 16 番染色体がトリソミーとなることでダウン症候群の症状を示す Ts65Dn マウスの骨格筋において野生型マウスに比べて *Terl* の発現上昇が見られることが報告されている（81）。このことから *TERL*

は骨格筋に発現しており，筋肉において何らかの働きをしていることが示唆されたものの，*TERL* のその他の臓器，組織における発現や機能については不明である。

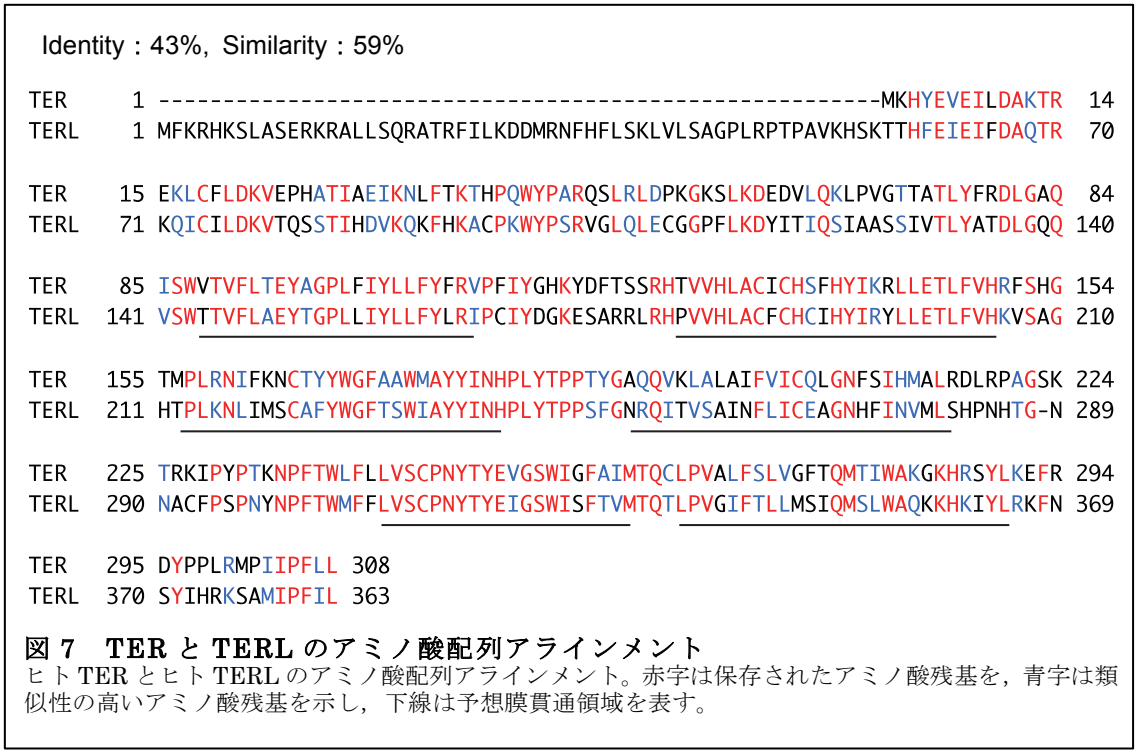


図 7　TER と TERL のアミノ酸配列アラインメント
ヒト TER とヒト TERL のアミノ酸配列アラインメント。赤字は保存されたアミノ酸残基を，青字は類似性の高いアミノ酸残基を示し，下線は予想膜貫通領域を表す。

研究背景・目的

1. S1P 分解経路におけるトランス 2-エノイル CoA 還元酵素の同定

序論でも述べたように，*Spl* ノックアウトマウスは重篤な表現型を示し，生後 1 ヶ月程度で致死となる。また，S1P 分解経路はスフィンゴ脂質の唯一の分解経路であるため，この経路はスフィンゴ脂質のホメオスタシス維持を担っていると考えられる。これらのことから，S1P 分解経路は生命の維持に重要な役割を持つ代謝経路であり，その全貌を明らかにすることは有意である。これまでに S1P 分解経路に関わる酵素はその多くが明らかとなったが，ヘキサデセノイル CoA をパルミトイル CoA へと代謝するトランス 2-エノイル CoA レダクターゼは同定に至っていない。現在，S1P 分解経路で働くことが明らかとなっている SPL，ALDH3A2，ACS は組織発現が広範であり，小胞体に局在することが知られている。このことから S1P 分解は多くの組織，臓器で起きる代謝反応であり，S1P 分解経路の一連の反応は小胞体膜上で行われることが予想される(82)。以上のことから，本研究では広範な組織発現を示し，小胞体に局在する唯一のトランス 2-エノイル CoA レダクターゼである TER に着目し，TER が S1P 分解経路に関わる可能性を検討した。

2. 家族性精神遅滞原因遺伝子 *TER P182L* の解析

TER P182L 変異により，家族性精神遅滞が引き起こされることが報告され，TER による脂質代謝と精神遅滞との関連が示唆された。この変異による TER の酵素活性や脂質代謝への影響は不明であったため，本研究では *TER P182L* 変異による脂質代謝への影響を解析し，病態メカニズムを解明することを目指した。また，この解析を通して精神発達過程における脂肪酸とその代謝産物の役割について新たな知見を得ることができると考えられる。

3. *TER* ホモログ *TERL* の解析

TERL は TER と高いアミノ酸相同性を示すことから，トランス 2-エノイル CoA レダクターゼとして働くことが予想されるが，その酵素活性については不明である。ダウン症候群モデルマウスを用いた解析では *TERL* は骨格筋での発現上昇が見られ，筋肉において何らかの働きをしていることが示唆されている。しかし，*TERL* の骨格筋における役割やその他の臓器，組織での発現とその役割については明らかとなっていない。*TERL* の解析によってその役割が明らか

となれば，生体における脂肪酸合成と骨格筋における脂肪酸の新たな役割について知見を得ることが出来ると期待される。よって本研究では *TERL* の解析を行い，*TERL* の役割を明らかにすることを目的とした。

序論でも述べたように，スフィンゴ脂質や脂肪酸は生体で様々な役割を担っており，その役割についての新たな知見を得ることは生命現象の理解や疾患の治療において非常に有益であると考えられる。上記3つの解析が成された際にはスフィンゴ脂質の代謝や中枢神経系，骨格筋等の組織特異的な脂肪酸の代謝について新たな知見を得ることが出来ると期待される。そこで本研究では上記の解析を通して脂質代謝について新たな知見を得ることを目的に研究を行った。

結果

1. S1P 分解経路における TER の関与の解析

1-1. 培養細胞を用いた Sph 代謝の定量的解析

細胞に取り込まれた Sph はセラミドを介して複合スフィンゴ脂質へと代謝される他，S1P を介してパルミトイル CoA へとされた後，グリセロ脂質へと代謝される (23,83)。S1P はエステル型のグリセロ脂質だけでなく，エーテル型グリセロ脂質にも代謝される (83,84)。また，パルミトイル CoA は β 酸化によりアセチル CoA へと分解された後，クエン酸回路によって CO_2 へと変換される (83,84)。しかし， S1P 分解経路によって生じたパルミトイル CoA がそれぞれの分子種にどのような割合で代謝されるのかは明らかとなっていなかった。そこでまず始めに HeLa 細胞に[^{3}H]Sph を用いて Sph の代謝トレーサー実験を行い，Sph の代謝を定量的に解析した。また， Sph 代謝の経時的な変化を調べるため，[^{3}H]Sph を細胞の培地に添加してから 2 時間，24 時間時点での脂質代謝を解析した。24 時間時点で培地中の放射活性は 2 時間時点と比べ半分以下にまで減少していた（図 8A)。また，その減少分が細胞中の放射活性の時間経過による増加分と同等であったため，時間経過によって Sph は細胞内に取り込まれ，代謝を受けていることが明らかとなった。24 時間時点での細胞と培地の放射活性の総量は 2 時間時点の放射活性の総量と同程度であった。このことは，S1P 分解経路によって生じたパルミトイル CoA が β 酸化を経て CO_2 へ分解される割合が極めて低いことを示している（図 8A)。

さらに Sph の代謝を詳細に解析するため, 培地中及び細胞中の脂質を回収し，薄層クロマトグラフィーで分離，[^{3}H]Sph に由来する脂質を分子種毎に分離した。また，この展開系ではスフィンゴ脂質とグリセロ脂質の移動度が重複し，分離することが出来ない脂質が一部あったため，抽出した脂質を 2 つに分け，片方をアルカリ処理した後，展開した。アルカリ処理により，グリセロ脂質のエステル結合は加水分解され，脂肪酸を遊離させる。そのため，アルカリ処理無しで見られた各グリセロ脂質に由来するスポットはアルカリ処理を行った場合は消失し，脂肪酸のスポットとして観察される。また，スフィンゴ脂質はアルカリ処理によって分解されないため，アルカリ処理無しのスポットと有りのスポットを比較することでグリセロ脂質とスフィンゴ脂質の区別をすることが出来る。2 時間時点では培地中の主要な脂質は代謝を受けていない Sph であり，取り込まれる前の状態であることが確認された。24 時間時点では Sph はほぼ

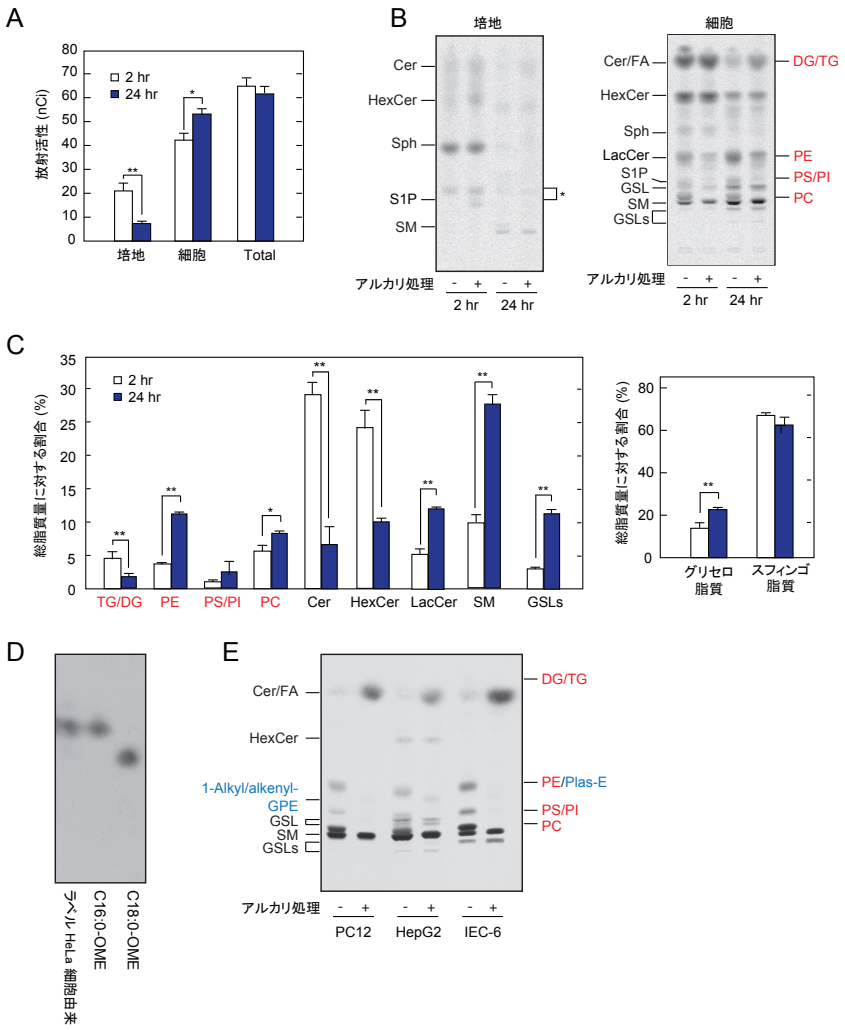


図 8 培養細胞を用いた Sph 代謝の定量的解析

（A-C）HeLa 細胞に 0.07 μCi [^{3}H] Sph を加えて 2 時間または 24 時間培養した。

（A）回収した細胞及び培地の放射活性を液体シンチレーションカウンター（LSC-3600; Aloka）で測定し，グラフ化した縦軸は放射活性を表す。（平均値±標準偏差，t-test *p<0.05，**p<0.01）

（B）回収した細胞及び培地から脂質を抽出し，2 つに分けた後，一方にアルカリ処理を行い TLC（1−ブタノール／酢酸／水＝3：1：1）により展開，オートラジオグラフィーによって検出した。赤字はグリセロ脂質，黒字はスフィンゴ脂質を表す。PE，ホスファチジルエタノールアミン；PC，ホスファチジルコリン；PS，ホスファチジルセリン；PI，ホスファチジルイノシトール；DG，ジアシルグリセロール；TG，トリグリセリド；SM，スフィンゴミエリン；Cer，セラミド；HexCer，ヘキソシルセラミド；DHS，ジヒドロスフィンゴシン；Sph，スフィンゴシン；LacCer，ラクトシルセラミド；GSL，スフィンゴ糖脂質

（C）（B）の細胞の結果を定量し，各脂質の割合をグラフ化した（左）。また，グリセロ脂質の総量とスフィンゴ脂質の総量についても同様にグラフ化を行った（右）。

（D）HeLa 細胞に 0.16 μCi [^{3}H] Sph を加えて 2 時間または 24 時間培養した。培養後に脂質を回収，アルカリ処理によってグリセロ脂質のエステル結合を切断し，脂肪酸を回収した。回収した脂肪酸をメチルエステル化し，逆相 TLC で展開した（クロロホルム／メタノール／水 ＝5：15：1）。また，移動度のスタンダードとして[^{3}H]パルミチン酸メチル（C16:0-OME）[^{14}C]ステアリン酸メチル（C18:0-OME）をスポットし，展開した。

（E）PC12 細胞，HepG2 細胞及び IEC-6 細胞に 0.07 μCi [^{3}H] Sph を加えて 24 時間培養した。細胞から脂質を回収し，2 つに分けた後，一方にアルカリ処理を行い TLC（1−ブタノール／酢酸／水＝3：1：1）により展開，オートラジオグラフィーによって検出した。赤字はグリセロ脂質，黒字はスフィンゴ脂質，青字はエーテル型グリセロ脂質を表す。1-Alkyl/alkenyl-GPE，1-アルキル/アルケニルグリセロホスホエタノールアミン；Plas-E，プラズマニル/プラズメニルエタノールアミン

検出されないことから，Sph は 24 時間でほぼ全てが細胞内に取り込まれ，代謝を受けていることが明らかとなった（図 8B)。細胞中の主要な代謝産物はセラミドとセラミドに糖が 1 つ付加されたヘキソシルセラミドであった（図 8B, C)。24 時間時点ではこれらのスフィンゴ脂質は更に代謝を受け，スフィンゴミエリンやセラミドに 2 つ糖が付加されたラクトシルセラミド，更に糖が付加されたスフィンゴ糖脂質へと代謝されていた（図 8B，C)。Sph の S1P 分解経路を介した代謝は 2 時間時点では代謝産物の内の 17%であったが，時間経過によって増加し，24 時間時点では 23%に増加していた。ホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンは時間経過で有意に増加していた一方で，トリグリセリド，ジアシルグリセロールは時間経過によって減少していた（図 8B, C)。また，S1P やエーテル型グリセロ脂質は培地中，細胞内のどちらも殆ど観察されなかった（図 8B)。細胞内では S1P が検出されなかったことから，HeLa 細胞では合成された S1P が S1P 分解経路によって速やかにグリセロ脂質へと代謝されていることが明らかとなった。

脂肪酸伸長サイクルでは C16 以上の脂肪酸を基質に伸長反応が行われる。そのため，S1P 分解経路で生じたパルミトイル CoA も伸長サイクルによって伸長を受けている可能性が考えられた。その可能性を検討するため，HeLa 細胞に [^{3}H]Sph を代謝させて生じたグリセロ脂質をアルカリ条件により加水分解し，脂肪酸を回収した。回収した脂肪酸をメチルエステル化し，逆相 TLC で分離して脂肪酸メチルエステルの炭素数を確認した。 [^{3}H]Sph 代謝によって生じた脂肪酸はパルミチン酸メチル（C16:0-OMe）の標品と同じ移動度を示した。このことから，S1P 分解経路で生じたパルミチン酸は伸長サイクルによる脂肪酸伸長にほとんど用いられずにグリセロ脂質へと代謝されることが明らかとなった（図 8D)。

次に，他の細胞種でも Sph の代謝を解析した。ラット副腎髄質褐色細胞腫由来細胞である PC12 細胞，ヒト肝臓癌由来細胞である HepG2 細胞，ラット小腸由来細胞である IEC-6 細胞を用いて[^{3}H]Sph による代謝トレーサー実験を行った。PC12 細胞は神経成長因子（NGF）存在化で培養すると神経細胞様に分化するため，本実験では神経細胞のモデルとして分化後のものを使用した。上記 3 種の細胞の培地に[^{3}H]Sph を添加，24 時間培養した後に細胞から脂質を回収し，TLC で展開した。これらの細胞では取り込まれた[^{3}H]Sph の 30-40%がグリセロ脂質に代謝されていた。更に PC12 細胞及び HepG2 細胞ではアルカリ処理に耐

性のあるエーテル結合を持つ脂質のスポットが観察された。このことから，PC12 細胞及び HepG2 細胞では Sph は S1P 分解経路を経た後にアルコールへと変換され，エーテル型リン脂質へと代謝されることが明らかとなった。

1-2. *TER* は Sph のグリセロ脂質への代謝に関与する

TER の S1P 分解経路への関与を検討するにあたり，まず S1P 分解経路が保存されており，遺伝子操作が容易な出芽酵母を用いて解析を行うことにした。序論でも述べた通り，出芽酵母のスフィンゴ脂質はほぼ全てが極長鎖脂肪酸をアシル基として含む (43)。そのため，*TER* の出芽酵母ホモログ *TSC13* の遺伝子欠損は極長鎖脂肪酸の合成ができなくなり，スフィンゴ脂質合成不全を招き致死となる (80)。しかし，近年の報告により綿花由来のセラミド合成酵素を発現させた酵母株では長鎖脂肪酸を含むセラミドを合成出来るようになり，極長鎖セラミドを合成する出芽酵母セラミド合成酵素の欠損による致死性を回避できることが示唆された (85)。そこで，*TSC13* 遺伝子の欠損による致死性も長鎖スフィンゴ脂質を合成するヒトセラミド合成酵素 *CERS5* 遺伝子の導入によって回避できるのではないかと考え，以下のような生育相補実験を行った。まず，ゲノム上の *TSC13* 遺伝子が欠損し， *TSC13* 遺伝子を発現させるプラスミド（*URA3* マーカー）を保持した株を作製した。その株に *CERS5* を発現させるプラスミド（*HIS3* マーカー）を形質転換し，得られた株を 5-フルオロオロチン酸（5-FOA）を含む寒天培地にストリークした。*URA3* はオロチジン 5’-リン酸脱炭酸酵素をコードしており，ウラシル合成過程でオロチジン 5’-リン酸をウリジン 5’-リン酸へと代謝する酵素である。5-FOA は Ura3 によって，毒性を示す 5-フルオロウラシル（5-FU）に代謝されるため，5-FOA 存在下では *URA3* 遺伝子を持つ株は生育出来ない。また， *URA3* を持つプラスミドを失った細胞はプラスミド上の *TSC13* 遺伝子も同時に失うため，致死となる。よって *CERS5* の導入によって *TSC13* 遺伝子欠損の致死性を回避できるのなら，その株は 5-FOA 培地で生育出来ると考えられた（図 9A)。生育相補実験の結果，5-FOA を含む寒天培地においてポジティブコントロールである *TSC13* 遺伝子発現プラスミドを保持する株に加え，*CERS5* 遺伝子発現プラスミドを保持する株が生育しており，*CERS5* 遺伝子の導入によって *TSC13* 遺伝子欠損による致死性が回避できることが明らかとなった（図 9B)。

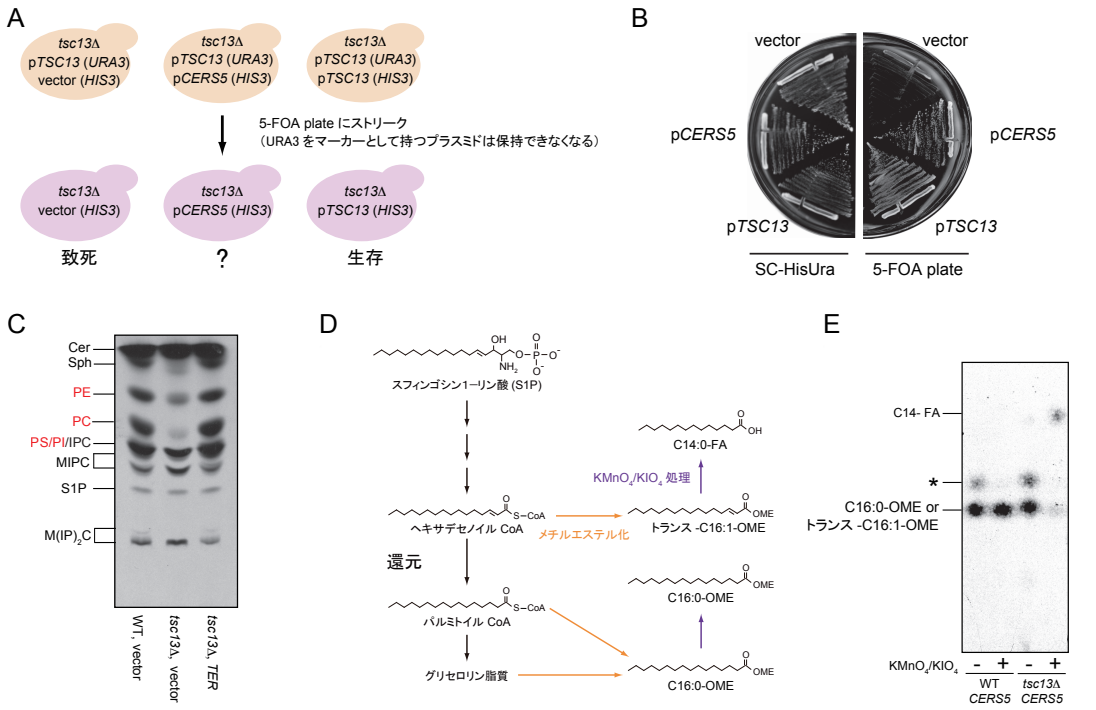


図 9 *TSC13* 欠損酵母株に *TER* を遺伝子導入するとスフィンゴシンからグリセロリン脂質への代謝が回復する

（A）生育相補実験の概要。5-FOA を含む培地では *URA3* マーカーのプラスミドを保持することが出来ないため，ゲノム上の *TSC13* 遺伝子を欠損し，pTW6（*TSC13 URA3* マーカー）を保持した酵母株を作製した。作製した酵母株に *HIS3* マーカーの pAKNF313（vector），pAB119（*3x-FLAG-CERS5*）または pAB134（3xFLAG-*TSC13*）を導入し，5-FOA を含む培地での株の生育を確認した。

（B）（A）の概要で示した株を SC -HisUra plate（左）または 1 mg/ml 5-FOA 含有 SC -His plate（右）で培養した。

（C）BY4741（WT）に pAB119 と pAK158（vector）を導入した株（WT/vector）及び *TSC13* 遺伝子を欠損させた株に pAB119 と pAK158 を導入した株（*tsc13*Δ/vector），*TSC13* 遺伝子を欠損させた株に pAB119 と pAK を導入した株（*tsc13*Δ/vector）に pAB119 と pAB128（*2xHA-TER*）を導入した株に 0.07 μCi [^{3}H] Sph を加えて 2 時間培養した。その後脂質を抽出，TLC 展開（クロロホルム/メタノール/4.2 N アンモニア＝9：7：2）で分離後，オートラジオグラフィーによって検出した。赤字はグリセロ脂質を，黒字はスフィンゴ脂質を表す。

PE，ホスファチジルエタノールアミン；PC，ホスファチジルコリン；PS，ホスファチジルセリン；PI，ホスファチジルイノシトール

IPC，イノシトールホスホリルセラミド；Cer，セラミド；MIPC，マンノシルイノシトールホスホリルセラミド；M(IP)$_2$C，マンノシルジイノシトールホスホリルセラミド；Sph，スフィンゴシン；S1P，スフィンゴシン 1-リン酸

（D）グリセロ脂質に取り込まれた脂肪酸部分の不飽和度の判別の概要。S1P 分解経路における還元反応が正常に起きている場合にはメチルエステル化によってパルミチン酸メチル（C16:0-OME）が生じ，$KMnO_4/KIO_4$ による炭素間二重結合の開裂処理の影響は受けない。還元反応が起きていない際にはメチルエステル化によってヘキサデセン酸メチル（C16:1-OME）が生じ，$KMnO_4/KIO_4$ による炭素間二重結合の開裂処理によってミリスチン酸（C14:0-FA）が生じる。

（E）BY4741 と *TSC13* 遺伝子欠損株にそれぞれ pAB119 を導入し，（C）と同様に[^{3}H] Sph を加えて 2 時間培養した。その後脂質を抽出，アルカリ処理によって脂肪酸を回収した。回収した脂肪酸にメチルエステル化，$KMnO_4/KIO_4$ による炭素間二重結合の開裂処理処理を行った。処理後脂質を抽出し，逆相 TLC（クロロホルム／メタノール／水 ＝5：15：1）で展開，オートラジオグラフィーによって検出した。（＊は非特異的なスポットを示す。）

TSC13 遺伝子欠損が可能となったので，*CERS5* 遺伝子を導入した野生型酵母株（WT/*CERS5* 株）及び *TSC13* 遺伝子欠損株（*tsc13*Δ/*CERS5* 株）を作製した。*tsc13*Δ/*CERS5* 株にベクター，ヒト *TER* を発現するプラスミドをそれぞれ導入した株を作製し，[^{3}H]Sph を用いて代謝トレーサー実験を行った。WT/*CERS5* 株では Sph はスフィンゴ脂質, グリセロ脂質の両方へと代謝されているのに対し, *tsc13*Δ/*CERS5*株ではPC, PE 等のグリセロ脂質が大きく減少し，S1P から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（図 9C)。また, この代謝の低下はヒト *TER* 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可能性が示唆された。*TSC13* 遺伝子欠損によってグリセロ脂質への代謝は大きく低下していたが，完全には消失しておらず，一部残存が認められた。残存が認められたグリセロ脂質に含まれる脂肪酸はヘキサデセノイル CoA が還元を受けず，そのままグリセロ脂質へと代謝された可能性が考えられた。この可能性を検討するため，WT/*CERS5* 株及び *tsc13*Δ/*CERS5* 株に[^{3}H]Sph を代謝させた後, アルカリ加水分解によってグリセロ脂質のエステル結合を切断し，グリセロ脂質のアシル基部分に由来する脂肪酸を回収した。回収した脂肪酸をメチルエステル化し，KIO_4/$KMnO_4$ 処理を行い，逆相 TLC で展開した。脂肪酸メチルエステルに二重結合が存在していた場合, KIO_4/$KMnO_4$ 処理によって二重結合部分が開裂し, 脂肪酸が生じる（図 9D)。WT/*CERS5* 株及び *tsc13*Δ/*CERS5* 株に[^{3}H]Sph を代謝させた結果を見ると，WT/*CERS5* 株では KIO_4/$KMnO_4$ 処理によっても開裂しないパルミチン酸メチルであることが確認された。その一方で，*tsc13*Δ/*CERS5* 株では C16 メチルエステルの位置に観察されたスポットは KIO_4/$KMnO_4$ 処理によって全てが C14 の脂肪酸へと変換されていた（図 9E)。このことから，*tsc13*Δ/*CERS5* 株では残存が見られたグリセロ脂質はヘキサデセノイル CoA がグリセロ脂質へと代謝されたものであることが示され，出芽酵母では Tsc13 が S1P 分解経路に関与していることが明らかとなった。

次に，哺乳類細胞でも同様に TER が S1P 分解経路へと関与するかを検討するため，*TER* をノックダウンした HeLa 細胞に対し，[^{3}H]Sph を用いた代謝トレーサー実験を行った。si*TER* を導入した HeLa 細胞では *TER* の mRNA がノックダウンされていることを RT-PCR によって確認した（図 10A)。この細胞に[^{3}H]Sph を加えてグリセロ脂質への代謝を検討した。control siRNA を導入した細胞では Sph はグリセロ脂質へと代謝されているのに対し，si*TER* を導入し

た細胞ではグリセロ脂質への代謝が control の半分程度まで減少していることが明らかとなった（図 10B, C）。以上の結果から，TER が S1P 分解経路に関与することが示された。

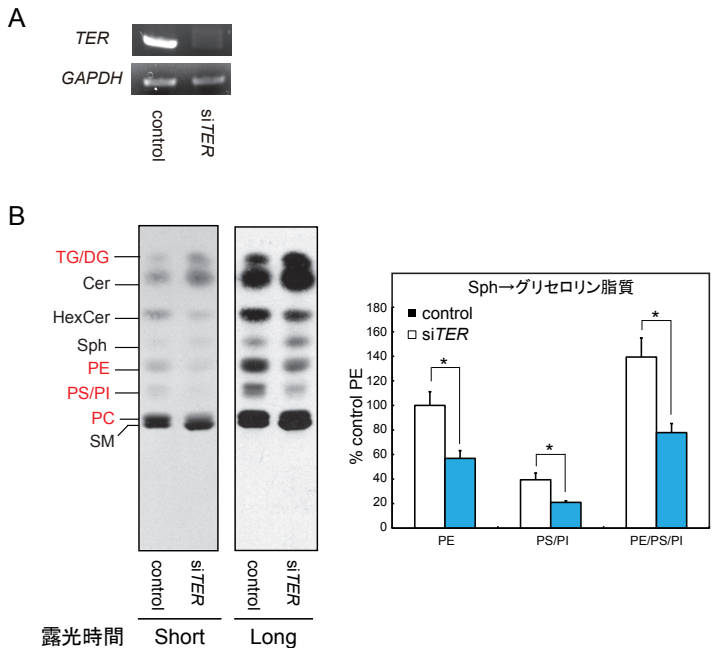


図 10　*TER* をノックダウンした HeLa 細胞では Sph からグリセロ脂質への代謝が低下する
Control siRNA または TER の siRNA を HeLa 細胞に導入し，4 日間培養した。
（A）各細胞から総 RNA を抽出し，*TER* 及び *GAPDH* に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。
（B）　各細胞に 0.09 μCi [^{3}H] Sph を加え，37C°で 4 時間培養した。その後脂質を抽出し，TLC 展開（1-ブタノール／酢酸／水＝3：1：1）で分離，オートラジオグラフィーによって検出した。また，グリセロリン脂質（PE，PC，PS，PI）のバンドの放射活性をバイオイメージングアナライザー BAS-2500 で定量し，グラフ化した。横軸は各脂質，縦軸は control siRNA を導入した場合の PE の放射活性に対する割合を示す(平均値±標準偏差，t-test *p<0.01)。赤字はグリセロ脂質を，黒字はスフィンゴ脂質を示す。
PE，ホスファチジルエタノールアミン；PC，ホスファチジルコリン；PS，ホスファチジルセリン；PI，ホスファチジルイノシトール；DG，ジアシルグリセロール；TG，トリグリセリド
SM，スフィンゴミエリン；Cer，セラミド；HexCer，ヘキソシルセラミド；DHS，ジヒドロスフィンゴシン；Sph，スフィンゴシン

1-2. *TER* ノックダウンは S1P 分解経路における還元反応を低下させる

TER は極長鎖脂肪酸合成にも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，その応答として脂質代謝が変化し，間接的に S1P 分解が抑制された可能性も考えられた。そこで，TER の S1P 分解経路への関与をより直接的に解析するため，*TER* をノックダウンした HeLa 細胞の膜画分を用いて *in vitro* での解析を行った。

解析にあたり，S1P 分解経路を再現する実験系の構築を行った。S1P 分解経路における各反応は補酵素を必要とする（酸化反応：NAD^+，CoA 付加反応：ATP 及び CoA，還元反応：NADPH）（図 11A)。そこで HeLa 細胞の膜画分に各反応の補酵素を加えることで S1P 代謝が進行するかを検討した。

膜画分に NAD^+のみを加えた場合，S1P はトランス-C16:1-FA の標品と同じ移動度を示す脂肪酸に変換された（図 11B)。この脂肪酸の炭素数と二重結合の位置を脂肪酸のメチルエステル化，KIO_4/$KMnO_4$ 処理を行い，逆相 TLC で展開することで確認した（図 11C)。KIO_4/$KMnO_4$ 処理によって C16-OME /トランス-C16:1-OME のスポットが C14-FA へと変換されたことから，C16-OME /トランス-C16:1-OME のスポットはヘキサデセン酸に由来するものであることが確認された（図 11C)。膜画分に NAD^+と ATP 及び CoA を加えて S1P を代謝させた場合にはトランス-C16:1-FA の標品と同じ位置のスポットと C16-FA の標品と同じ位置のスポットの 2 つのスポットが観察された（図 11B)。この脂肪酸をメチルエステル化し，逆相 TLC で分離したところ，C16-OME /トランス-C16:1-OME と C14:0-OME の移動度にスポットが検出された。この脂肪酸メチルエステルを KIO_4/$KMnO_4$ 処理したところ，C16-OME /トランス-C16:1-OME のスポットは消失したことから, C16-OME /トランス-C16:1-OME に位置するスポットはヘキサデセノイル CoA（C16:1-CoA）に由来するメチルエステルのスポットであることが確認された。また，C14-OME はヘキサデセノイル CoA が β 酸化を受けて生じた C14-CoA に由来するものと考えられる。膜画分に NAD^+，ATP，CoA，NADPH を加えて S1P を代謝させると，パルミチン酸の標品と同じ移動度の脂肪酸へと代謝された。この脂肪酸をメチルエステル化し，逆相 TLC で分離したところ，飽和のパルミチン酸であることが確認された。以上より，HeLa 細胞膜画分を用いて *in vitro* で S1P 分解経路が再現する系を構築することが出来た。

系の構築が出来たので，*TER* をノックダウンした HeLa 細胞の膜画分を用いて S1P 分解アッセイを行った。コントロールでは S1P は代謝を受けて全てがパルミチン酸へと変換されている。一方，*TER* をノックダウンした膜画分ではパルミチン酸の他，ヘキサデセン酸が検出され，ヘキサデセノイル CoA の還元反応が抑制されていることが確認された（図 11D)。以上の結果から *TER* のノックダウンによって S1P 分解経路が抑制されることが *in vitro* の実験でも示された。

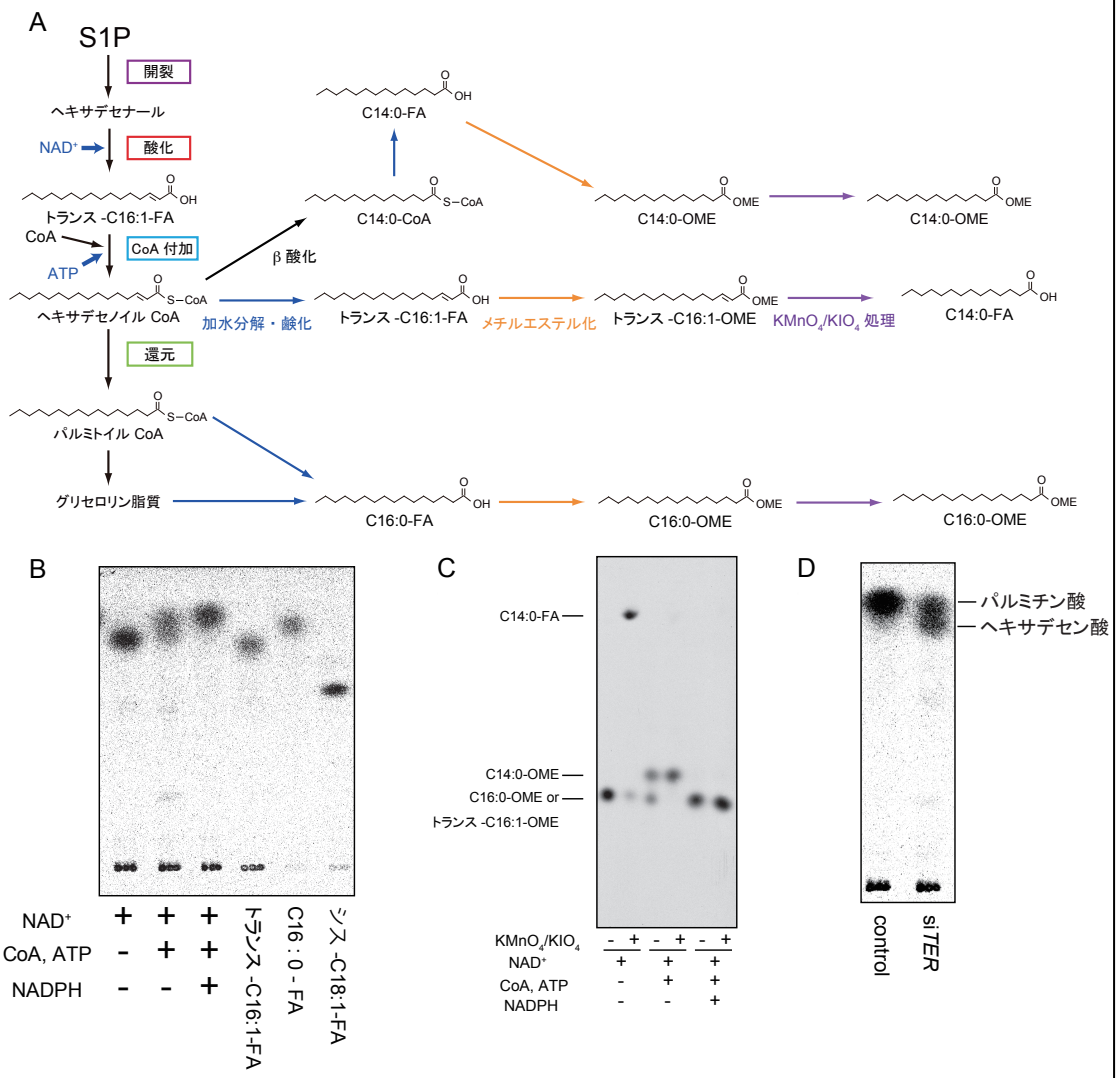


図 11　*TER* のノックダウンによって S1P 分解経路における還元反応が低下する

（A）S1P の代謝経路と脂肪酸部分の不飽和度の判別の概要。S1P 分解経路における還元反応が起こらない場合はトランス二重結合が残る。トランス二重結合の有無を硝酸銀 TLC 展開（ヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸 = 50：50：1）また代謝産物のトランスメチル化，$KMnO_4/KIO_4$ による炭素間二重結合の開裂処理によって生じると予想された生成物を示す。

（B，C）HeLa 細胞から調製した膜画分（40 μg）に 0.02 μCi [^{3}H] S1P を加え，37°C で 1 時間反応させた。この際，NAD^+，CoA と ATP，NADPH を表記の通りに加えた。

（B）反応後，加水分解を行い，生じた脂肪酸を抽出して硝酸銀 TLC で展開（ヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸 = 50：50：1），バイオイメージングアナライザーBAS-2500 で検出した。また，展開の際に[^{14}C]ヘキサデセン酸（C16:1-FA），[^{3}H]パルミチン酸（C16:0-FA），[^{3}H]オレイン酸（C18:1-FA）をスタンダードとしてスポットした。

（C）反応後，生成物の脂肪酸部分をメチルエステル化し，$KMnO_4/KIO_4$ による炭素間二重結合の開裂処理処理を行った。処理後脂質を抽出し，逆相 TLC 展開（クロロホルム／メタノール／水 = 5：15：1）で分離後，オートラジオグラフィーによって検出した。

（D）control siRNA，または si*TER* を導入した Hela 細胞を 4 日間培養し，各細胞から調製した膜画分 （30 μg）に 0.02 μCi [^{3}H] S1P を加え，37°C で 1 時間反応させた。反応後鹸化した後，生成物の脂肪酸を抽出した。抽出物を硝酸銀 TLC で展開（ヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸 = 50：50：1），バイオイメージングアナライザーBAS-2500 で検出した

2. 家族性精神遅滞を引き起こす TER P182L 変異体の解析

2-1. *TER P182L* 変異によって TER タンパク質は不安定化する

TER P182L 変異体を解析するため，まず始めに HEK 293T 細胞において N 末端に 3xFLAG を付加した野生型 TER 及び TER P182L をプラスミドから発現させ,イムノブロッティングにより TER のタンパク質量を確認した(図 12A)。その結果，TER P182L 変異タンパク質量は野生型 TER より顕著に少ないことが観察された。野生型 TER，TER P182L はプラスミドから発現させており，どちらも同じプロモーターの制御下で発現している。そのため，野生型 *TER* と *TER P182L* 変異体の mRNA の転写量は同程度であると予想された。このことから，TER P182L のタンパク質の減少は転写量が減少したのではなく，*P182L* 変異によって TER タンパク質の安定性が低下している可能性が示唆された。そこで，3xFLAG-TER，3xFLAG-TER P182L 変異体を HEK 293T 細胞に一過的に発現させ, [^{35}S]メチオニン/システインを用いたパルスチェイス実験を行った。チェイス 1 時間時点では野生型 TER，TER P182L 変異体のどちらも同程度の放射活性を示していることから，野生型と変異型の転写，翻訳は同程度であることが示唆された。しかし，野生型 TER はチェイス 8 時間後でも 80%程度残存しているのに対して, P182L 変異体は 4 時間経過後で 45%にまで減少していた。一方, P182L 変異体はチェイス 8 時間経過後で 15%程度にまで減少していた(図 12B，C)。以上の結果から，変異体は不安定化していることが明らかとなった。

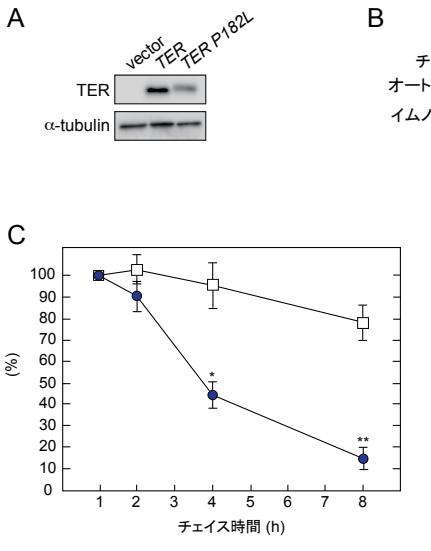


図 12　*TER P182L* 変異はタンパク質の安定性を低下させる

（A） HEK 293T 細胞に pAK500（vector），pAK933（*3xFLAG-TER*）及び pAB97（*3xFLAG-TER P182L*）をそれぞれ導入，48 時間後に総タンパク質抽出液を調製した。これらを SDS-PAGE で分離後，抗 FLAG 抗体及び抗チューブリン抗体を用いたイムノブロッティングにより検出した。

（B）HEK 293T 細胞に pAK933, pAB97 をそれぞれ導入, 48 時間後にシステイン及びメチオニンを含まない培地に交換し, 1 時間培養した。その後[^{35}S]Cys / Met を加えて 1 時間培養した後に培地を交換し，1，2，4，8 時間後に細胞を回収，タンパク質を抽出した。抽出したタンパク質を抗 FLAG 抗体ビーズで免疫沈降し，SDS-PAGE で分離，オートラジオグラフィー及び抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロッティングによって検出した。

（C）（B）のオートラジオグラフィーによって検出された各バンドを定量し，野生型（四角）,P182L 変異型（丸）それぞれの一時間時点の各 TER の放射活性を 100%としてグラフ化した（平均値±標準偏差，t-test *p<0.05，**p<0.01）。

2-2. *TER P182L* 変異は酵素活性を低下させる

次に *P182L* 変異が安定性以外にも TER の酵素活性に影響を及ぼす可能性を検討した。出芽酵母 *tsc13*Δ 株に *TER*，*TER P182L* を発現するプラスミドを導入後，膜画分を調製した。なお，出芽酵母においても HEK 293 T 細胞と同様に TER P182L の不安定化によるタンパク質量の減少が見られた。そこで，量を揃えるため，野生型 *TER* を *ADH* プロモーターの制御下で発現させたのに対し，*TER P182L* はより強力な *GAPDH* プロモーターから発現させた。TER または TER P182L タンパク質量をそれぞれ 2.5 ng，5 ng，10 ng，20 ng，40 ng 分含む様に希釈を行い，イムノブロッティングを行った。その結果，野生型と変異型の TER タンパク質の量が各希釈系列において同程度であることを確認した（図 11A)。TER の活性を測定するにあたり，TER の基質であるトランス 2-エノイル CoA の放射標識体は市販されていないため，脂肪酸伸長サイクルにおいて TER の 1 段階前の反応の基質である[^{14}C]3-ヒドロキシパルミトイル CoA を用いて TER 活性の検討を行った。TER は補酵素として NADPH を必要とするため，NADPH 非存在条件下では活性を示さず，1 段階前の脱水反応の生成物であるトランス 2-パルミトイル CoA のみが検出される。NADPH 非存在下では野生型 TER を 2.5 ng 含む膜画分は 40 ng 含む膜画分と比べて同程度 3-ヒドロキシパルミトイル CoA をトランス 2-パルミトイル CoA へと変換していたことから，HACD による脱水反応は飽和していることが明らかとなった。TER P182L を含む膜画分も野生型を含む膜画分と同様にいずれの量でも反応は飽和していた。また，TER，TER P182L のどちらを含んだ膜画分も同程度 3-ヒドロキシパルミトイル CoA をトランス 2-パルミトイル CoA へと変換したことから脱水反応は正常であることが確認された（図 13B，C)。NADPH 存在下において野生型 TER を含んだ膜画分は効率良く 3-ヒドロキシパルミトイル CoA をパルミトイル CoA へと変換した。最小量である 2.5 ng の野生型 TER を含んだ膜画分によってさえも，3-ヒドロキシパルミトイル CoA の約 60%がパルミトイル CoA まで変換され，中間体であるトランス 2-パルミトイル CoA は殆ど検出されなかった。一方，TER P182L を 2.5 ng 含んだ膜画分を用いた反応では，3-ヒドロキシパルミトイル CoA の約 36%がトランス 2-パルミトイル CoA として留まっており，パルミトイル CoA まで変換されたものはわずか 15%程度であった（図 13B，C)。TER P182L を含む膜画分ではその量の増加に従ってパルミトイル CoA への変換量は多くなるが，最も多い 40 ng を含んだ膜各分でも野生型 TER

を 2.5 ng 含む膜画分よりもパルミトイル CoA への変換量は少なかった（図 13B, C）。以上の結果から P182L 変異は安定性だけでなく，TER の酵素活性も低下させることが明らかとなった。

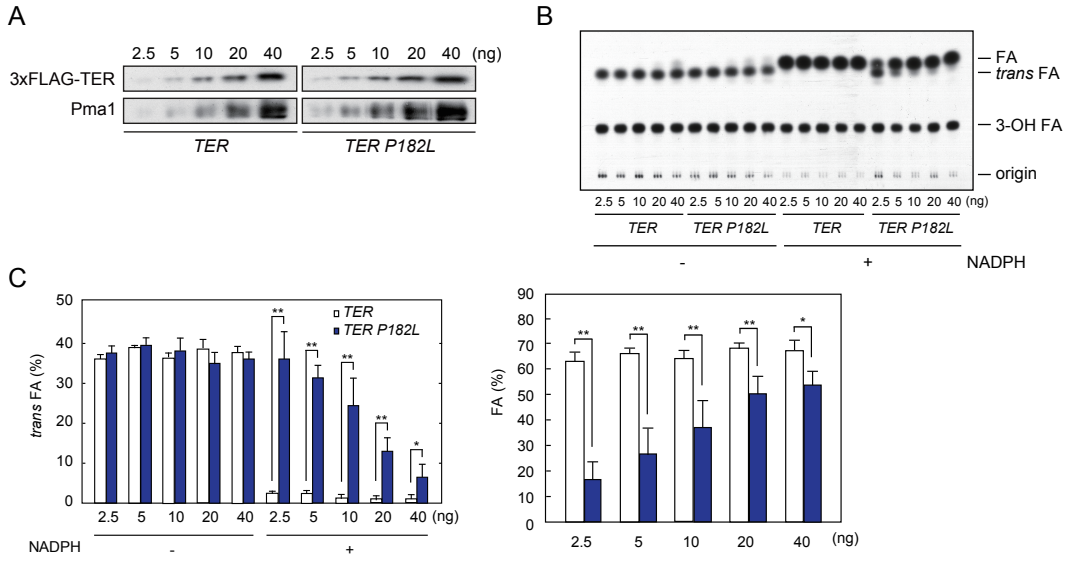


図 13　*TER P182L* 変異は TER の酵素活性を低下させる
TSC13 遺伝子欠損株に pAB114（*ADH* プロモーターの制御下で 3xFLAG-TER を発現させるプラスミド）または pAB110（*GAPDH* プロモーターの制御下で *3xFLAG-TER P182L* を発現させるプラスミド）を導入した株を作製した。
（A）作製した酵母株からそれぞれ膜画分を回収し，TER 及び TER P182L のタンパク質が等量になるように調製した。TER タンパク量が 2.5, 5, 10, 20, 40 ng になるように希釈系列を作製，抗 FLAG 抗体及び抗 Pma1 抗体を用いたイムノブロッティングにより検出した。
（B）（A）と同じ希釈系列の膜画分に NADPH の存在下，または非存在下で[^{14}C] 3-ヒドロキシパルミトイル CoA （5 nCi，1.8 μM）を加えて 30 分間反応させた。反応後，脂質を鹸化，抽出した後に展開溶媒としてヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸 =30:70:1 を用いて HPTLC で展開し，イメージングアナライザーBAS 2500 により検出，定量した。
（C）（B）の結果を野生型，ヘテロ変異体，ホモ変異体毎にグラフ化を行った。横軸は生成物，縦軸は総脂質量に対する生成物の割合を表す。（平均値±標準偏差，t-test　$^{*}p<0.05$，$^{**}p<0.01$）
FA，パルミチン酸；*trans*FA，トランス 2-パルミチン酸；3-OH FA，3-ヒドロキシパルミチン酸

2-3. *TER P182L* ホモ変異を持つ B リンパ芽球様細胞株では TER 活性が低下している

TER P182L 変異による精神遅滞発症メカニズムを明らかにするため，野生型，ヘテロ変異，ホモ変異をもつ患者由来 B リンパ芽球様細胞株（B-LCL）をそれぞれ 3 クローンずつ用いて解析を行った。まず始めに，各 B-LCL クローンの *TER* の mRNA 量を RT-PCR によって確認したところ，野生型，ヘテロ変異，ホモ変異のいずれにおいても *TER* の mRNA は同程度検出され，*TER* の転写量は変異による影響を受けていないことが明らかになった（図 14A）。次に，各ク

ローンから調製した膜画分を用いて *in vitro* での TER の活性測定を行った。TER 活性の測定は酵母膜画分を用いた活性測定と同様 に[^{14}C]3-ヒドロキシパルミトイル CoA を用いて行った。NADPH 非存在下では野生型，ヘテロ変異，ホモ変異のいずれのクローン由来の膜画分においても 3-ヒドロキシパルミトイル CoA をトランス 2-パルミトイル CoA へと変換していた（図 14B)。このことは膜画分に含まれる HACD の活性が正常であることを表している。一方，NADPH 存在下において，野生型ではトランス 2-パルミトイル CoA が代謝されてパルミトイル CoA のみが検出されるのに対し，ヘテロ変異及びホモ変異ではパルミトイル CoA だけでなくトランス 2-パルミトイル CoA も検出された。パルミトイル CoA の生成量は野生型と比べ，ヘテロ変異では 85%，ホモ変異では 34%まで低下していた（図 14B， C)。以上の結果から， *TER P182L* 変異は酵母や動物細胞過剰発現系だけでなく，実際の患者由来細胞中においても活性を低下させていることが明らかとなった。

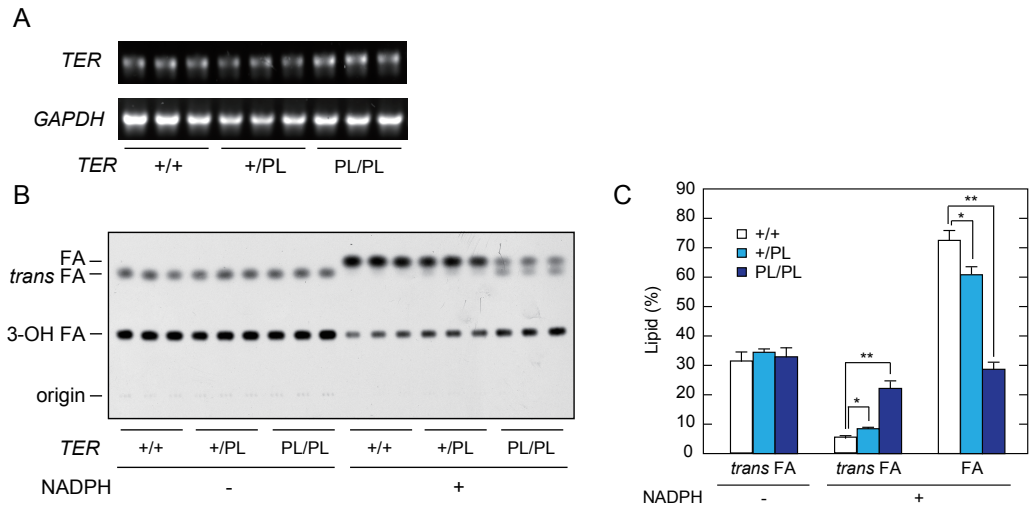


図 14　*TER P182L* ホモ変異による精神遅滞患者由来細胞ではトランス 2-エノイル CoA 還元活性が低下している

野生型（+/+)， P182L ヘテロ変異（+/PL)，P182L ホモ変異（PL/PL）患者由来の B-LCL （各 3 人ずつ，計 9 クローン）を用いて実験を行った。

（A) 各細胞からそれぞれ RNA を抽出し，*TER* 及び *GAPDH* に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。

（B）各細胞からそれぞれ膜画分（20 μg）を調製し，NADPH の存在下，または非存在下で[^{14}C] 3-ヒドロキシパルミトイル CoA（5 nCi，1.8 μM）を 30 分間反応させた。反応後，脂質を鹸化，抽出した後に展開溶媒としてヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸 =30:70:1 を用いて HPTLC で展開し，オートラジオグラフィー検出した。

（C）（B）の結果をイメージングアナライザーBAS 2500 により定量し，グラフ化を行った。横軸は生成物，縦軸は総脂質量に対する生成物の割合を表す。（平均値±標準偏差，t-test　*p＜0.05，**p＜0.01）

FA，パルミチン酸；*trans*FA，トランス 2-パルミチン酸；3-OH FA，3-ヒドロキシパルミチン酸

2-4. *TER P182L* 変異は極長鎖脂肪酸伸長サイクルに影響し，3-ヒドロキシアシル CoA 中間体を蓄積させる

極長鎖脂肪酸伸長サイクルは 4 つの酵素の複合体により駆動されるため，*P182L* 変異は TER の活性だけではなく，極長鎖脂肪酸合成全体に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで，野生型，ヘテロ変異，ホモ変異をもつ患者由来 B-LCL の膜画分を用いて，パルミトイル CoA と[^{14}C]マロニル CoA を基質として *in vitro* での脂肪酸伸長アッセイを行った。

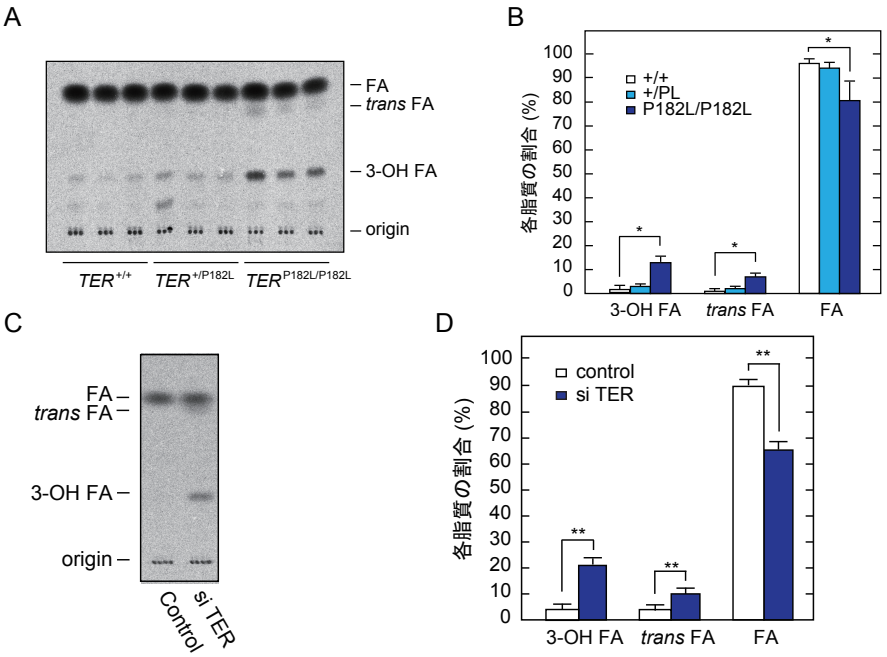


図 15　*TER P182L* ホモ変異は極長鎖脂肪酸伸長サイクルにおいて 3-ヒドロキシ脂肪酸中間体を蓄積させる

（A）野生型（TER$^{+/+}$），*P182L* ヘテロ変異（*TER*$^{+/P182L}$），*P182L* ホモ変異（*TER*$^{P182L/P182L}$）由来の B リンパ芽球様細胞株からそれぞれ膜画分（20 μg）を調製し，[^{14}C]マロニル CoA（75 nCi, 27.3 μM）とパルミトイル CoA（20 μM）を加え 30 分間反応させた。反応後脂質を鹸化，抽出した後に展開溶媒としてヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸 =30:70:1 を用いて HPTLC で展開し，イメージングアナライザーBAS2500 により検出した。
(B)(A)の結果を定量し，横軸は生成物，縦軸は各生成物の総和に対する生成物の割合を表す（平均値±標準偏差，t-test　*p＜0.01）。
FA，脂肪酸；*trans*FA，トランス 2-脂肪酸；3-OH FA，3-ヒドロキシ脂肪酸

野生型 *TER* を持つ B-LCL 由来の膜画分ではサイクルが駆動し，伸長されたアシル CoA 由来である脂肪酸のスポットが観察される（図 15A）。また，僅かではあるが，サイクルの中間体である 3-ヒドロキシアシル CoA に由来するスポットが観察される。ヘテロ変異をもつ B-LCL の膜画分では野生型と同様の傾向を示している。一方，*P182L* ホモ変異を持つ B-LCL 由来の膜画分では，アシル CoA の合成量が野生型より 20%程度低下していることが明らかとなった（図

15A，B)。また，この際，トランス 2-エノイル CoA の蓄積も観察された。さらに， *P182L* ホモ変異により，TER の 1 段階前の反応の基質である 3-ヒドロキシアシル CoA も大きく蓄積していた。このことから，*P182L* 変異は TER 自身の活性だけでなく，一段階前の HACD の活性にも影響を与えることが示唆された。この 3-ヒドロキシパルミトイル CoA の蓄積は TER の減少や活性低下に伴う現象であることを確認するため，*TER* をノックダウンした HeLa 細胞の膜画分を用いてパルミトイル CoA と[^{14}C]マロニル CoA を基質として *in vitro* での脂肪酸伸長アッセイを行った。その結果，3-ヒドロキシアシル CoA は *TER* のノックダウンによって蓄積し, P182L ホモ変異をもつ B-LCL 膜画分と同様の結果を示した（図 15C，D)。

2-5. *P182L* 変異によって極長鎖スフィンゴ脂質が減少する

P182L 変異による脂質代謝への影響を明らかにするため，極長鎖脂肪酸の主要な代謝産物であるスフィンゴ脂質の脂質組成を解析した。野生型，ヘテロ変異，ホモ変異を持つ患者由来細胞から脂質を抽出し，セラミド及びスフィンゴミエリン量を脂肪酸部分の組成毎にマススペクトロメトリーにより測定した。

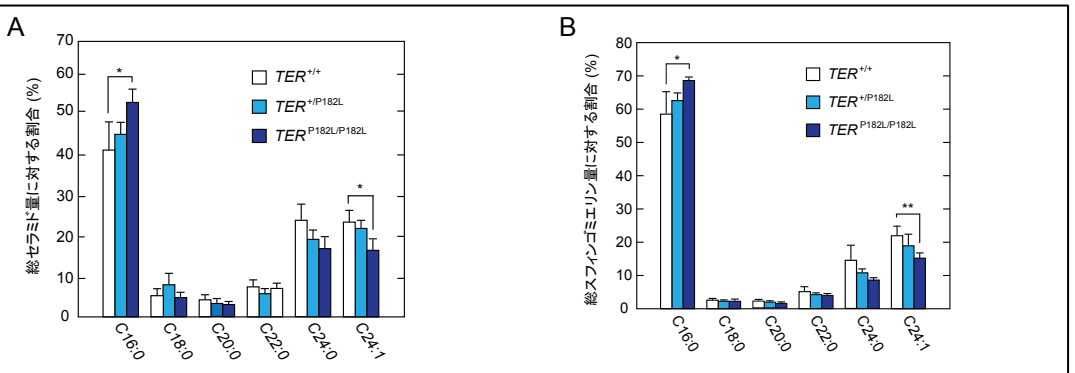


図 16　*TER P182L* ホモ変異によって極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質が減少する

（A）野生型（+/+），P182L ヘテロ変異（+/P182L），P182L ホモ変異（P182L/P182L）患者由来の B-LCL からそれぞれ脂質を抽出し，ESI-MS/MS によって各鎖長のアシル基を持つセラミド及びスフィンゴミエリンを検出し，グラフ化を行った。縦軸は総セラミド量または総スフィンゴミエリン量に対する割合を示し，横軸はアシル基の鎖長を示す。(平均値±標準偏差，t-test $^{*}p<0.05$，$^{**}p<0.01$)

P182L ホモ変異を持つ B-LCL は野生型 *TER* を持つ B-LCL と比べ，極長鎖である炭素数 C24:1 のアシル基を持つセラミドが減少していることが明らかとな

った。また，C24:0 セラミドも減少傾向を示し，長鎖である C16:0 のセラミドが増加していることが明らかとなった（図 16A)。スフィンゴミエリンもセラミドと同様に C24:1 のアシル基を持つセラミドが減少，C24:0 のアシル基を持つセラミドが減少傾向を示し，C16:0 のアシル基を持つセラミドが増加していることが明らかとなった(図 16B)。以上の結果より，*P182L* ホモ変異を持つ B-LCL では極長鎖スフィンゴ脂質を減少させることが示された。

2-6. *TER P182L* 変異は S1P 分解経路に影響しない

これまでの結果から S1P 分解経路の 2 つの経路に関わることが明らかとなった。*TER P182L* 変異によって S1P 分解経路に影響することで精神遅滞を引き起こしている可能性が考えられた。その可能性を検討するため，患者由来 B-LCL に対して[^{3}H]Sph によるトレーサー実験を行い TER P182L 変異による S1P 分解経路への影響を解析した。その結果，TER P182L ホモ変異を持つ B-LCL のいずれのクローンも野生型 TER を持つクローンと同程度に Sph をグリセロ脂質へと代謝していた。このことから，*P182L* 変異は S1P 分解経路には影響しないことが明らかとなった（図 17)。

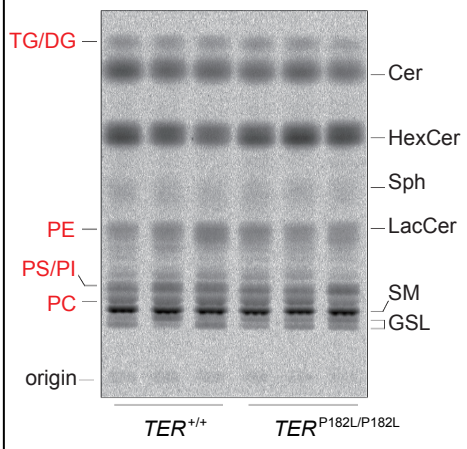


図 17　*TER P182L* 変異は S1P 分解経路に影響しない
野生型（+/+)，P182L ホモ変異　(P182L/P182L)　患者由来の B リンパ芽球様細胞に 0.09 μCi [^{3}H] Sph を加え，37℃で 8 時間培養した。その後脂質を抽出し，TLC（1−ブタノール／酢酸／水＝3：1：1)により展開，オートラジオグラフィーによって検出した。赤字はグリセロ脂質，黒字はスフィンゴ脂質を表す。
PE，ホスファチジルエタノールアミン；PC，ホスファチジルコリン；PS，ホスファチジルセリン；PI，ホスファチジルイノシトール；DG，ジアシルグリセロール；TG，トリグリセリド
SM，スフィンゴミエリン；Cer，セラミド；HexCer，ヘキソシルセラミド；DHS，ジヒドロスフィンゴシン；

3. TER ホモログ TERL の解析

3-1. *TERL* は筋特異的に発現している

TERL は骨格筋に発現していることは報告されているが，その他の臓器，組織での発現は不明であった。そこで，*TERL* 遺伝子の組織発現を明らかにするため，ヒト cDNA ライブラリーを用いた PCR を行った。また，比較のため，既

に広範な発現を示すことが明らかとなっている *TER* についても同様に PCR を行った。その結果，*TER* は全ての臓器，組織において発現しているのに対し，*TERL* は心臓，骨格筋に特異的に発現していることが明らかとなった（図 18）。

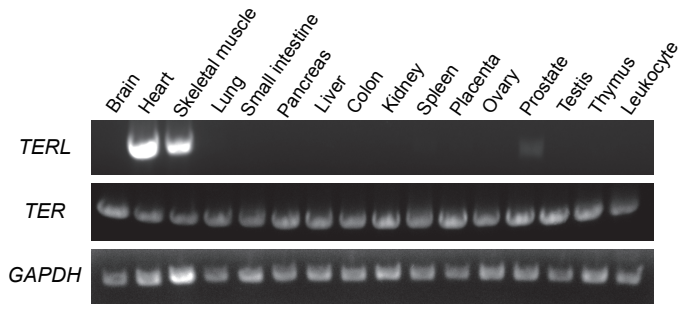


図 18　*TERL* は筋組織特異的に発現している
ヒト cDNA ライブラリーを用いた PCR により *TERL*，*TER*，*GAPDH* の組織毎の発現量を解析した。

3-2. *Terl* 遺伝子ノックアウト C2C12 細胞は筋管形成に異常を示す

TERL が筋組織特異的に発現していたため，筋組織において何らかの機能を持つことが考えられた。そこで，マウス横紋筋由来細胞株である C2C12 細胞を用いて Terl の機能解析を試みた。C2C12 細胞は筋芽細胞としての形質を有しており，分化誘導に伴って融合し，筋管細胞を形成する。Terl の筋分化における関与の可能性を検討するため， CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術を用いて *Terl* ノックアウト C2C12 細胞を作製した（図 19A，B）。CRIPR/Cas9 システムは Cas9 がターゲット配列部分を切断し，切断されたゲノムの修復時に塩基の挿入や欠失が起こることで変異を導入するシステムである。TER の活性中心や機能ドメイン等は明らかとなっていないため，*Terl* ノックアウト細胞作製にあたり，翻訳の際により上流となるエキソン 1 内にターゲット配列を設定した（図 19A）。シークエンシングにより作製した細胞の全てのアレルに欠失または挿入によるフレームシフト変異が確認された（図 19B）。また，ターゲットとする配列は 23bp と小さいため，オフターゲットな効果を観察してしまう可能性が考えられた。この可能性を排除するため，2 つのクローン（クローン 2，クローン 5）を以降の解析に用いた（図 19B）。

作製した細胞に対して分化誘導を行ったところ，筋管細胞の分化マーカーである *MyoG* の発現上昇が確認された（図 20A）。しかし，分化誘導後の細胞の形態を観察したところ，野生型では細胞が融合してチューブ状の筋管細胞が形成

されているのに対し，*Terl* ノックアウト細胞ではクローン 2，クローン 5 のどちらでも融合が見られず，筋管形成が起こっていないことが明らかとなった（図 20B）。以上の結果から TERL は，分化誘導ではなく，筋管形成において重要な役割を担っていることが示された。

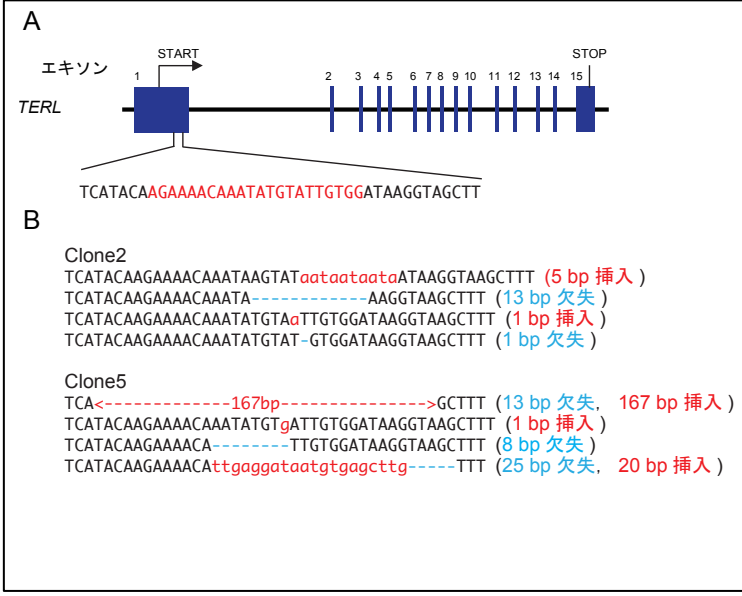


図 19 CRISPR/Cas9 を用いた *Terl* 欠損 C2C12 細胞の作製

（A）*Terl* のゲノム配列の模式図とターゲット配列。模式図における四角は各エキソンを表す。また，START はスタートコドンの位置を，STOP はストップコドンの位置を表す。

（B）作製した *Terl* 欠損細胞の各アレルの配列

ccAB5 と pAK10 を C2C12 細胞にトランスフェクションし，ピューロマイシンでプラスミドが導入された細胞を選択した。その後，得られた細胞をシングルコロニー化し，シークエンシングによってゲノムの *Terl* のエキソン 1 の配列を確認した。

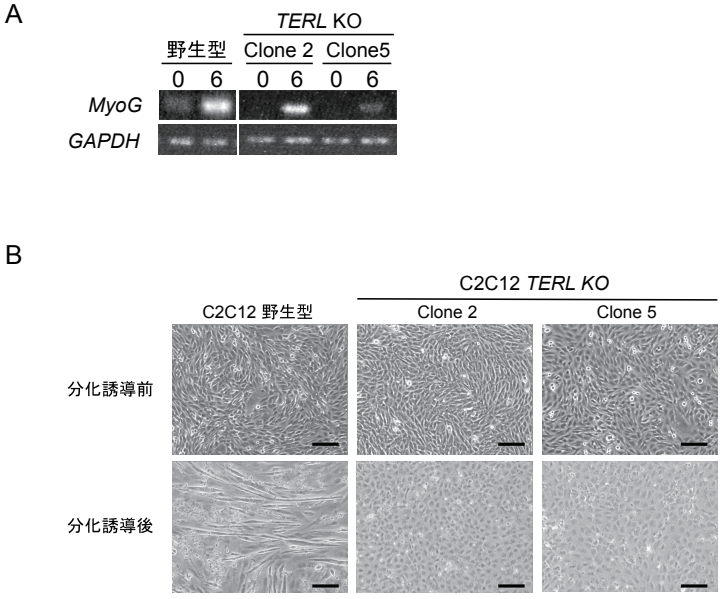


図 20　*Terl* ノックアウト C2C12 細胞は筋管形成異常を示す

野生型 C2C12，*Terl* 欠損 C2C12 細胞を 1%ウマ血清含有培地で 6 日間培養し，筋管細胞への分化誘導を行った。

（A）分化誘導前後の細胞から mRNA を抽出し，筋管細胞の分化マーカーである *MyoG* と *GAPDH* に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。

（B）分化誘導前後の細胞の形態を顕微鏡（Axio Vert.A1（Carl Zeiss））によって観察した。スケールバーは 200 µm を示す。

考察

1. S1P 分解経路における TER の役割の解析

本研究において用いた細胞（HeLa, PC12, HepG2, IEC-6）の全てが[^{3}H]Sph をグリセロ脂質に代謝していた（図 8)。また，これまでの当研究室の解析により，CHO-K1 細胞においても Sph のグリセロ脂質への代謝が見られたことから(23)，S1P 分解経路による Sph のグリセロ脂質の代謝は生体内で普遍的に起きている反応であることが推察される。また，グリセロ脂質への代謝は取り込まれた Sph の 20-40%と少なくないにも拘らず, S1P は殆ど検出されなかった（図 8)。このことから S1P は細胞内で合成された後，速やかにグリセロ脂質へと代謝されていることが明らかとなった。*TER* をノックダウンした膜画分を用いた *in vitro* の解析ではヘキサデセノイル CoA は β 酸化を受け, C14-CoA として代謝されていた（図 11)。ヘキサデセノイル CoA の持つ不飽和結合はカルボニルの二重結合と共役しており，反応性が高いことが予想される。そのため，β 酸化によって毒性の低い脂肪酸へと代謝しているのかもしれない。

本研究によって TER は S1P 分解経路においてヘキサデセノイル CoA をパルミトイル CoA へと変換する酵素であることが示された。*TER* をノックダウンした HeLa 細胞では Sph のグリセロ脂質への代謝は減少しているが，完全には遮断されなかった。しかし，3-ヒドロキシパルミトイル CoA を用いたアッセイでは *TER* をノックダウンした膜画分は活性低下が見られるものの, パルミトイル CoA へと変換していた（図 15C)。このことから，*TER* ノックダウン細胞における Sph のグリセロ脂質への代謝は TER の残存活性によるものであると考えられるが, S1P 分解経路において TER 以外にも還元反応を触媒している酵素が存在する可能性は否定できない。この可能性を検討するには *TER* のノックアウト細胞を作製するのが望ましいが, TER は伸長サイクルにも関わる酵素であり，TER と同様に伸長サイクルにおいて 1 種類のみが酵素活性を示す *Kar* のノックアウトマウスは発生段階で致死となる（70)。しかし，*Kar* のノックアウトマウスは発生途中で致死となるものの，発生初期には細胞分裂が起きているため，TER のノックアウトによっても致死とならない細胞が存在すると考えられる。今後は CRISPR/Cas9 システムを用いて *TER* ノックアウト細胞を作製し, S1P 分解経路における還元酵素についての解析を行っていきたいと考えている。

本研究によって TER が S1P 分解経路におけるトランス 2-エノイル CoA 還元酵素として同定され, TER が生体内において S1P 分解と極長鎖脂肪酸合成とい

う 2 つの役割を持つことが明らかとなった。この 2 つの役割はスフィンゴ脂質代謝という点で無関係ではない。これまで述べてきたように S1P 分解経路はスフィンゴ脂質の唯一の分解経路であるため，TER が S1P 分解経路に関わる酵素群と共に働く時はスフィンゴ脂質の分解が進むと考えられる。また，極長鎖脂肪酸，特に飽和や一価不飽和のものはスフィンゴ脂質の構成要素として用いられることから，TER が伸長サイクルに関わる際にはスフィンゴ脂質の合成が進むと考えられる。伸長サイクルは複合体を形成すること，また，先に述べたように S1P 分解経路は合成された S1P を速やかに分解していることから，TER は S1P 分解経路と伸長サイクルのどちらの反応を行うかの制御が行われていると予想される。今後は TER と伸長サイクル，S1P 分解経路に関わる酵素群との相互作用についてより詳細な解析を行うことで，両経路に対する TER の制御機構について知見を広げていきたいと考えている。

2. TER P182L 変異体の解析

本研究では *P182L* 変異が TER タンパク質を不安定化させ，さらに酵素活性も低下させることを明らかにした（図 12，13)。P182L 変異体はプロリン残基がロイシン残基に置換されたものだが，プロリンはその環状の構造から立体配座が制限されており，ターン構造などのタンパク質の高次構造の形成に重要であることが知られている。TER の 2 次構造予測では 182 番目のプロリンは β-ストランドの末端部分に位置しており，ターン構造を形成していることが示唆される。したがって，この変異体ではプロリン 182 残機がロイシンに置換されることで二次構造が影響を受け，不安定化と酵素活性の低下が引き起こされたと考えられる。

本研究において *P182L* 変異による TER 活性の低下は伸長サイクルに影響することが明らかとなったが（図 15A)，TER が基質とするトランス 2-エノイル CoA の蓄積だけでなく，1 段階前の反応を担う HACD の基質である 3-ヒドロキシアシル CoA も蓄積していた。また，*TER* をノックダウン HeLa 細胞から調製した膜画分を用いた解析でも同様に 3-ヒドロキシアシル CoA の蓄積が見られた（図 15C)。脂肪酸伸長サイクルを構成する酵素群は複合体を形成し，伸長過程において各酵素は生成物を次の反応を担う酵素へと受け渡すことがサイクルの効率的な駆動に必要であると考えられている。実際，当研究室の永沼による精製した ELOVL6 タンパク質を用いた *in vitro* の活性解析によって，脂肪酸伸長

サイクル２段階目を担う KAR の共存は，一段階目の反応を行う ELOVL6 の活性を増加させることが明らかとなっている（86)。このことを踏まえると， *TER P812L* 変異による 3-ヒドロキシアシル CoA の蓄積は TER タンパク質の量の減少と TER の活性が低下したため，HACD の生成物であるトランス 2-エノイル CoA の受け渡し先が減少し，HACD が次の反応に移行することが出来なくなったことが原因であると考えられる。あるいは，*P182L* 変異による TER の構造変化が HACD 等の他の伸長サイクル相互作用に影響し，TER が複合体を形成し難くなったために TER 活性の低下や不安定化を引き起こしたのかも知れない。

患者由来 B リンパ芽球様細胞株（B-LCL）から抽出した脂質を用いた質量分析によるスフィンゴ脂質の検出結果では C24:1 のアシル基を含むセラミド及びスフィンゴミエリンが減少していることが明らかとなった（図 16)。極長鎖脂肪酸の合成は伸長サイクルが一周する毎に 2 炭素伸長されることから，炭素数が大きいアシル CoA 程合成の際にサイクルが連続的に駆動する必要がある。そのため， C18-C22 のアシル基を持つスフィンゴ脂質には *P182L* ホモ変異による影響が見られず，より炭素数の大きい C24 のアシル基を持つものが変異による影響受けたものと考えられる。本研究で用いた B-LCL はスフィンゴ脂質の半分以上が C16 のアシル基を含むものであったが，実際に変異により影響が出ている中枢神経系は極長鎖スフィンゴ脂質が豊富に存在していることが知られており，変異による減少は B-LCL より大きいと推察される。

これまでにも脂肪酸合成サイクルにおける他の酵素の活性低下や不全は様々な組織，器官に影響することが報告されている。伸長サイクルの第一段階の酵素である ELOVL ファミリーに関しては，C20-24 のアシル CoA を基質とする *Elovl1* や，C26 以上の鎖長のアシル CoA を基質とする *Elovl4* 遺伝子をノックアウトしたマウスでは C26 以上の極長鎖脂肪酸が合成出来なくなるため，皮膚バリアの形成が損なわれ，生後数時間で死亡することが報告されている（56,87)。また，ヒトにおいて *ELOVL4* の優性変異による 3 型シュタルガルト病が引き起こされることが知られている（88,89)。第二段階を担う Kar のノックアウトマウスは発生段階で致死となることが報告されており(70)，第三段階を担う Hacd ファミリーでは，主に筋肉系の細胞に発現する *Hacd1* の変異によりイヌでは中心核ミオパチーを引き起こし（74,75)，ヒトにおいてもミオパチー症状を引き起こす変異が知られている（76)。さらに，*Hacd1* ノックアウトマウスでは筋肉量が減少することが明らかとなっている（77)。このように極長鎖脂肪酸合

成の低下や不全は様々な病態・表現型を示す。TER は組織発現や基質に対して特異性を持たないことから, 変異による影響は全身に及ぶと考えられるが, *TER* 変異による精神遅滞患者は他の病態を示さない (79)。このことから *TER P182L* 変異による影響は弱く，活性は低下するものの，脳以外の組織，器官の機能維持においては充分な量の極長鎖脂肪酸が合成されていると予想される。しかし，他の臓器や組織に影響がない程度の活性低下でも精神遅滞を示すことから，精神発達は極長鎖脂肪酸の代謝低下の影響を最も受けやすいことが強く示唆された。

生体内で合成された極長鎖脂肪酸の多くはスフィンゴ脂質へと代謝され，様々な役割を担っている。極長鎖スフィンゴ脂質は脳においても重要な役割を持つことが知られており，C24:0，C24:1 のアシル基を含むセラミドを合成するセラミド合成酵素 *CerS2* のノックアウトマウスではミエリン鞘が不安定化し，形態異常を引き起こすことが報告されている (90)。*CerS2* ノックアウトマウスのミエリン鞘ではガラクトシルセラミド及びその代謝産物であるスルファチドが減少していることが報告されている。ミエリン鞘では C24:0，C24:1 のアシル基をもつガラクトシルセラミドやスルファチドが豊富に存在している (91)。また，*CerS2* ノックアウトマウスのミエリン鞘では，ミエリン鞘の裏打ちタンパク質であるミエリン塩基性タンパク質の減少が見られており，このことがミエリンの不安定化を引き起こしていることが示唆されている (90)。このことから，*TER P182L* 変異により，C24 のアシル基を持つガラクトシルセラミドやスルファチドが減少することでミエリン塩基性タンパク質が減少し，ミエリンの機能低下及び精神発達の遅滞が引き起こされている可能性が考えられる。

また，これまでに精神遅滞の統一的な発症メカニズムについては未だ明らかとなっていないが，精神遅滞患者の中にはスパインの形成に異常が見られるケースも報告されている (92)。スパインには受容体が多く存在し，前シナプス細胞からの情報を受け取るのに重要な役割を担っている (93)。また，スパインは消失，新生を繰り返すことでシナプス可塑性を生じ，記憶や学習に寄与していると予想されている。当研究室の解析により，出芽酵母において極長鎖脂肪酸を含むスフィンゴ脂質の減少はマルチベシキュラーボディを介した小胞輸送を遅延させることが明らかとなっている (94)。その原因として，極長鎖脂肪酸を含むスフィンゴ脂質がクラスターを形成することで，輸送小胞が出芽する際にできる曲率の大きい膜構造を安定化させていると推測されている。このことか

ら，*TER P182L* 変異による極長鎖アシル基を含むスフィンゴ脂質の減少は，スパイン部分のエンドサイトーシスを遅延させ，シナプス可塑性に影響する可能性が考えられる。あるいはスフィンゴ脂質のクラスターの形成が上手くいかず，曲率の大きいスパインのネック部分の不安定化が引き起こされているのかもしれない。スパイン部分に局在して働くタンパク質の多くは足場タンパク質を介してアクチン骨格と結合し，安定化している (95,96)。序論でも述べたように C24 のスフィンゴ脂質はコレステロールと共に脂質マイクロドメインを形成し，膜局在するタンパク質の安定化やシグナル伝達の効率化に寄与することが知られている。*TER P182L* 変異による精神遅滞患者ではスパイン部分においてマイクロドメイン構造の減少が起こり，そこに局在する受容体やシグナル分子，それらを安定化させる足場タンパク質が影響を受けているのかもしれない。

本研究の結果から，*TER P182L* 変異は TER の不安定化と酵素活性の低下を引き起こすことが明らかとなった。また，変異による TER 活性の低下は脂肪酸伸長サイクル全体に影響し，細胞のスフィンゴ脂質組成を変化させることで精神遅滞を引き起こすことが強く示唆された。今後，先に述べたミエリン鞘の機能低下と精神遅滞への影響やスパイン部分における極長鎖脂肪酸の役割について検討し，精神遅滞発症の詳細な分子メカニズムを解明することで極長鎖脂肪酸代謝が神経機能に及ぼす影響について新たな知見を得ることが出来ると考えられる。

3．筋特異的に発現する TER ホモログ TERL

TERL は筋特異的に発現していることが明らかとなり（図 16），*Terl* 遺伝子ノックアウト C2C12 細胞では筋管形成異常をきたす（図 18B）ことから TERL は筋管形成過程において重要な役割を担っていることが示唆された。序論でも述べたように，ダウン症候群モデルマウスである Ts65Dn マウスの骨格筋では野生型マウスに比べて *Terl* の発現上昇が見られることが報告されている（81）。ダウン症候群では神経系の異常により起こる低筋張が筋肉量を減少させることが知られている。Terl は筋管形成に寄与しているため，Ts65Dn マウスでは筋肉量の低下に対する応答として発現が上昇しているのかも知れない。

TERL は筋特異的に発現しているが，*TER* も骨格筋に発現している（図 18）。TER は特定の鎖長，不飽和度の基質に特異性を示さない (42,69)。筋管形成過程において Ter は Terl の機能を相補しないことから，Terl は Ter では代替出来

ない機能を有していることが予想される。脂肪酸伸長サイクル複合体を形成する酵素群は相互作用し，複合体を形成することが知られている。また，伸長サイクルの 1 段階目の反応を担う酵素である ELOVL には 7 つのアイソザイムが存在し, それぞれ基質特異性が異なることが知られている (42)。このことから，TERL は特定の ELOVL，HACD とより相互作用しやすく，より効率良く筋管形成に必要な脂肪酸を合成している可能性が考えられる。筋特異的に発現する *Hacd1* をノックダウンした C2C12 細胞は分化誘導時に筋芽細胞の融合が抑制されることが明らかとなっている。この *Hacd1* ノックダウン C2C12 細胞では一価不飽和脂肪酸が減少していることが観察されている (77)。飽和脂肪酸を含む脂質は不飽和脂肪酸を含む脂質よりも細胞膜の流動性を低下させることが報告されている。また，膜流動性の低下は筋芽細胞の融合を抑制させることが報告されていることから (97,98)，*Hacd1* のノックダウンによる C2C12 の分化抑制は一価不飽和脂肪酸の減少によって膜流動性が低下し，細胞融合の抑制を引き起こしていると考えられている。このことから, Terl は Hacd1 と相互作用し，一価不飽和脂肪酸の合成に関与している可能性が考えられる。今後は TERL と HACD1 や他の伸長サイクル酵素群との相互作用解析を行うことで, TERL の基質特異性や筋管形成における役割についての知見を得る足がかりとなると考えられる (77)。また，*Hacd1* ノックダウン C2C12 細胞はリゾホスファチジルコリンの増加が観察されている (77)。また，リゾホスファチジルコリンは細胞の膜融合を阻害する方向に働くことが報告されている (99,100)。このことから，*Terl* はリゾホスファチジルコリンの合成を抑制する働きを持ち，*Terl* ノックアウト C2C12 細胞では筋芽細胞の融合が抑制された可能性が考えられる。今後，TERL の機能解析や筋管形成時における脂質代謝変化の詳細な解析を行うことで，筋管形成における脂肪酸の役割の解明と共に筋分化に対する新たな知見が得られることが期待される。

材料と方法

細胞の培養と遺伝子導入

細胞は全て 37 ℃，5% CO_2 条件下で培養を行った。

ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞及びヒト肝臓癌由来の HepG2 細胞は 1 mg/ml グルコースを含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium（DMEM，Sigma）に 10% fetal bovine serum（FBS，Thermo Fisher scientific）と 100 units/ml ペニシリン及び 100 μg/ml ストレプトマイシン（Sigma）を加えた培地を用いて培養した。

ラット小腸由来の IEC-6 細胞は 4.5 mg/ml グルコースを含む DMEM（Sigma）に，10% FBS と 100 units/ml ペニシリン及び 100 μg/ml ストレプトマイシン（Sigma）と 4 μg/ml リコンビナントヒトインスリン（Wako Pure Chemical Industries）を加えた培地で培養した。

ラット副腎髄質褐色細胞腫由来の PC12 細胞は 1 mg/ml グルコースを含む DMEM に 10%ウマ血清と 100 units/ml ペニシリン及び 100 μg/ml ストレプトマイシンを加えた培地を用いて培養した。また，トレーサー実験に用いた際には 50 ng/ml Nerve Growth Factor（TOYOBO）を培地に添加し，24 時間培養した後に実験に用いた。

ヒト胚性腎臓由来の HEK 293T 細胞は 4.5 mg/ml グルコースを含む DMEM に 10%FBS，と 100 units/ml ペニシリン及び 100 μg/ml ストレプトマイシンを加えた培地を用いてコラーゲン Type I でコートしたディッシュで培養した。

マウス横紋筋由来 C2C12 細胞は 1 mg/ml グルコースを含む DMEM に 20% FBS と 100 units/ml ペニシリン及び 100 μg/ml ストレプトマイシンを加えた培地を用いて培養した。筋管細胞への分化を誘導する際には C2C12 細胞を 1 mg/ml グルコースを含む DMEM に 1%ウマ血清と 100 units/ml ペニシリン及び 100 μg/ml ストレプトマイシンを加えた培地を用いて培養した。細胞の形態は分化誘導から 6 日後に顕微鏡（Axio Vert.A1，Carl Zeiss）で観察，画像を取得した。

精神遅滞患者由来 B リンパ芽球様細胞株（B-LCL）はシカゴ大学 Carole Ober 博士より提供された。B-LCL は RPMI Medium 1640（Thermo Fisher scientific）に 20% FBS と 100 units/ml ペニシリン及び 100 μg/ml ストレプトマイシンを加えた培地を用いて培養した。

HEK 293T 細胞にプラスミドを導入する際には Lipofectamine™及び Plus™

reagent（Thermo Fisher scientific）を，C2C12 細胞にプラスミドを導入する際には ViaFect™ Transfection Reagent（Promega）を用いた。

本研究で用いたベクター

pGEM®-T Easy（Promega）：TA クローニング用ベクター。T7 及び SP6 RNA ポリメラーゼプロモーターの認識配列，アンピシリン耐性遺伝子を含む

pCE-puro 3xFLAG-1： ヒト elongation factor 1a プロモーターの制御のもとに N 末端に FLAG タグを 3 つ付加したタンパク質を哺乳類細胞に発現させるベクター。ピューロマイシン耐性遺伝子を持つ。

pRS316 :出芽酵母発現ベクター。*CEN* 複製起点とマーカーとして *URA3* を持つ。

pAKNF313：*GAPDH* プロモーターの制御のもとに N 末端に FLAG タグを 3 つ付加したタンパク質を出芽酵母に発現させるベクター。*CEN* 複製起点とマーカーとして *HIS3* 遺伝子を含む。

pAKNF315：*GAPDH* プロモーターの制御のもとに N 末端に FLAG タグを 3 つ付加したタンパク質を出芽酵母に発現させるベクター。*CEN* 複製起点とマーカーとして *LEU2* 遺伝子を含む。

pAK1172 : *ADH* プロモーターの制御のもとに N 末端に FLAG タグを 3 つ付加したタンパク質を出芽酵母に発現させるベクター。*CEN* 複製起点とマーカーとして *HIS3* 遺伝子を含む。

pAK10：哺乳類細胞にピューロマイシン耐性遺伝子を発現させるベクター。

遺伝子のクローニング

野生型 *TER* 遺伝子はヒト肝臓由来 cDNA（Human Multiple Tissue cDNA（MTC）Panel I，Clontech）を鋳型にプライマーTER-1，TER-2（表 1）と KOD Polymerase（TOYOBO）を用いて PCR で増幅した。増幅した PCR 産物は Taq polymerase（Sigma）を用いて 3’ 末端に dA を付加した後，pGEM®-T Easy にクローニングし，シークエンシングにより DNA 配列を確認した。pGEM®-T Easy に組み込んだ *TER* 遺伝子を *Bam*HI 認識部位と pGEM®-T Easy に含まれる *Not* I 認識部位で切断し，アガロース電気泳動後，QIAquick® Gel Extraction Kit（QIAGEN）を用いて目的の DNA 断片を抽出，精製した。精製した DNA 断片を Ligation Mix（TaKaRa）を用いて，pCE-puro 3xFLAG-1 及

び pAK158，pAK1172 に組み込み，それぞれ pAK933，pAB124，pAB114 とした。*TER P182L* は野生型 *TER* を pGEM®-T Easy に組み込んだプラスミドを鋳型としてプライマーTER P182L-F，TER P182L-R（表 1）と QuikChange mutagenesis kit（STRATAGENE）を用いて作製した。PCR 反応溶液に制限酵素 *Dpn* I を加えて鋳型 DNA を切断し，大腸菌 Mach1 に形質転換後，プラスミドを抽出した。シークエンシングにより DNA に変異が導入されたのを確認し，野生型 *TER* と同様に pCE-puro 3xFLAG-1 及び pAKNF313 に組み込み，それぞれ pAB97，pAB110 とした。

TSC13 遺伝子は酵母ゲノム DNA を鋳型にプライマー*TSC13* -1，*TSC13* -6（表 1）と KOD Fx（TOYOBO）を用いて PCR で増幅した。増幅した PCR 産物は Taq polymerase (Sigma)を用いて 3'末端に dA を付加した後， pGEM®-T Easy にクローニングし，シークエンシングにより DNA 配列を確認した。そして pGEM®-T Easy に組み込んだ *TSC13* 遺伝子を pGEM®-T Easy に含まれる *Not*I 認識部位で切断し，アガロース電気泳動後，QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて目的の DNA 断片を抽出，精製した。精製した DNA 断片を Ligation Mix (TaKaRa)を用いて pRS316 に組み込み，pTW6 とした。

N 末端に FLAG タグを付加した Tsc13 発現プラスミドは酵母ゲノム DNA を鋳型にプライマーTSC13 -5，TSC13 -6（表 1）と KOD Fx（TOYOBO）を用いて PCR で増幅した。増幅した PCR 産物は Taq polymerase (Sigma)を用いて 3'末端に dA を付加した後，pGEM®-T Easy にクローニングし，シークエンシングにより DNA 配列を確認した。そして pGEM®-T Easy に組み込んだ *TSC13* 遺伝子を *Bam*HI 認識部位と pGEM®-T Easy に含まれる *Not*I 認識部位で切断し，アガロース電気泳動後，QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて目的の DNA 断片を抽出，精製した。精製した DNA 断片を Ligation Mix (TaKaRa)を用いて pAKNF313 に組み込み pAB134 とした。

CERS5 遺伝子はヒト肝臓由来 cDNA（Human Multiple Tissue cDNA (MTC) Panel I, Clontech)を鋳型にプライマーhLASS5-F, hLASS5 -R (表 1)と KOD Fx（TOYOBO）を用いて PCR で増幅した。増幅した PCR 産物は Taq polymerase (Sigma)を用いて 3'末端に dA を付加した後，pGEM®-T Easy にクローニングし，シークエンシングにより DNA 配列を確認した。その後，pGEM®-T Easy に組み込んだ *TER* 遺伝子を *Bam*HI 認識部位と pGEM®-T Easy に含まれる *Not*I 認識部位で切断し，アガロース電気泳動後，QIAquick® Gel

Extraction Kit（QIAGEN）を用いて目的の DNA 断片を抽出，精製した。精製した DNA 断片を Ligation Mix（TaKaRa）を用いて pAKNF313 に組み込み，pAB119 とした。

Terl ノックアウトに用いたプラスミドは mTERL T1-1 sense，mTERL T1-1 antisense（表 4）をアニールさせた DNA 断片を GeneArt® CRISPR Nuclease All-in-one Vector（Thermo Fisher Scientific）に組み込み，ccAB5 とした。

本研究で用いた酵母株と培養方法

本研究では，*Saccharomyces cerevisiae* を用いた。

本研究で作製，使用した酵母株とその遺伝子型は表 2 に示す。酵母の培養には完全合成培地である SC（0.67% yeast nitrogen base without amino acid,（Sigma），2% D-glucose（Sigma），0.5% Bacto casamino acids（Becton, Dickinson and Company），必要なアミノ酸を添加）培地を用いて 30℃で培養を行った。

動物細胞を用いた Sph 代謝トレーサー実験

細胞を FBS の含まない培地で 37℃，30 分レインキュベートした後，培地に 0.07 μCi [^{3}H] Sph を加えて HeLa 細胞は 2 時間，4 時間，または 24 時間培養した。また，PC12 細胞，HepG2 細胞，IEC-6 細胞は 24 時間，B-LCL は 8 時間培養した。このとき[^{3}H]Sph は 1 mg/ml BSA を含む培地と混和し，BSA に吸着させた状態で加えた。培養後，1 ml PBS で細胞を洗浄し，細胞を回収，200 μl PBS に懸濁した。細胞懸濁液に 750 μl クロロホルム/メタノール/12 N 塩酸 = 100：200：1，250 μl クロロホルム，250 μl 1% KCl 水溶液を順に加えて二層分配し，有機層を回収した。各サンプルの放射活性を液体シンチレーションカウンター（LSC-3600，Aloka）で測定してサンプル間の放射活性を揃えた。培地からの脂質抽出は培地の容量の 3.75 倍のクロロホルム/メタノール/12 N 塩酸 = 100：200：1 を加えた後，培地の容量の 1.25 倍のクロロホルム，KCl 水溶液を順に加えて二層分配し，有機層を回収した。アルカリ処理を行う際には，脂質抽出液の 0.32 倍の容量の 0.5 M NaOH メタノール溶液を加えて 37℃で 1 時間処理した。その後，中和のため 0.16 倍の容量の 1 M HCl メタノール溶液を加えた。中和後，0.61 倍の容量のメタノールと 0.95 倍の容量の 1% KCl 水溶液を加え，再度二層分配を行った。有機層を回収した後，バキュームコンセントレ

ーターで溶媒を留去した。その後，20 µl クロロホルム/メタノール = 2 / 1 に溶解させた。順相 TLC プレートにスポットし，展開（ブタノール/酢酸/水 = 3：1：1）した。その後オートラジオグラフィーによる検出及びバイオイメージングアナライザーBAS2500 による定量を行った。メチルエステル化，$KMnO_4/KIO_4$ を行う際には，溶媒留去後の脂質を 5%ジメトキシプロパンを含む 400 µl 1 M methanolic/HCl に懸濁した。80˚C で 1 時間反応を行い，脂肪酸をメチルエステル化した後 400 µl ヘキサンを加えて二層分配を行った。バキュームコンセントレーターでヘキサンを留去した後に 100 µl 90%酢酸に懸濁し，50 µl ずつ 2 つに分注した。75 µl 0.5% $KMnO_4/KIO_4$ = 1：1 またはコントロールとして水を加えて 37˚C で 1 時間開裂処理を行った。反応後 15 µl 20% 亜硫酸水素ナトリウムを加えて還元または水を加えてから 50 µl 15 N NH_3 を加えて中和し，250 µl クロロホルムを加えて二層分配を行った。有機層を回収し，バキュームコンセントレーターで溶媒を留去してから 20 µl クロロホルムに溶解させた。脂質を逆相 TLC（Silica Gel 60 RP-18 F_{254} TLC plates，Merck Millipore）にスポットし，展開（クロロホルム/メタノール/水 = 5：15：1）した。その後，蛍光試薬（2.8 mg/ml 2,5-diphenyl-oxazole（PPO）を含む 2-methylnaphthalene/1-buthanol（1:3.3，v/v））を噴霧し，-80℃で X 線フィルムに感光させ，オートラジオグラフィーによる検出を行った。

出芽酵母 Sph 代謝トレーサー実験

OD_{600}=1.0 まで培養した酵母株 0.5 OD_{600} 分の細胞を回収し，培地に 0.07 µCi [11, 12-^{3}H] Sph を加えて 2 時間培養した。[11, 12-^{3}H] Sph の調製は過去の報告に従って調製した (23)。このとき，Sph は 1 mg/ml BSA を含む培地と混和し，BSA に吸着させた状態で加えた。培養後，遠心によって集菌し，培地を除いてから 200 µl エタノール/水/ジエチルエーテル/ピリジン/15 N アンモニア＝15：15：5：1：0.018 (v/v)に懸濁し 60℃, 15 分インキュベートして脂質を抽出した。各サンプルの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定し，サンプル間の放射活性を揃えた後，バキュームコンセントレーターで溶媒を留去した。メチルエステル化，20 µl クロロホルム/メタノール/水 = 5：4：1 (v/v)に溶解して HPTLC プレート（HPTLC Silica gel 60，MerckMillipore）にスポットし，展開（クロロホルム/メタノール/4.2 N アンモニア = 9：7：2)した。その後，PPO を噴霧し，-80℃で X 線フィルム（Fuji film）に露光させて検出を行った。

アルカリ処理，メチルエステル化，$KMnO_4/KIO_4$ を行う際には動物細胞と同様の操作を行った。

RNA 干渉

control siRNA は Qiagen より購入し，final 16 nM で使用した。ヒト *TER* の siRNA は *TER*-1 と *TER*-2（表 3）を final 各 8 nM で混合して使用した。dsRNA は Lipofectamine™ RNAiMAX reagent (Thermo Fisher scientific)を用いて細胞に導入した。

RT-PCR

細胞を PBS で洗浄後，Nucreospin RNA Ⅱ （MACHEREY-NAGEL）を用いて総 RNA を抽出し，50 ng 分の総 RNA を鋳型としてプライマー TER-2, TER-3（表 1, それぞれ 5 μM）, またはプライマー h/mGAPDH-F, h/mGAPDH-R（表 1，それぞれ 5 μM）と SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq（Thermo Fisher scientific）を用いて RT-PCR を行った。

TERL の組織発現分布の確認は cDNA（Human Multiple Tissue cDNA（MTC） Panel 1，Panel 2，Clontech）を鋳型にプライマーTERL-1，TERL-2（表 1 ）と KOD Fx（TOYOBO）を用いて PCR で増幅した。

反応後のサンプルを 0.5 μg/ml 臭化エチジウムを含むアガロースゲルで電気泳動を行い，LAS 4000（GE Healthcare）を用いて UV による観察及び画像の取得を行った。

膜画分の調製

哺乳類細胞から調製する際には細胞を PBS（10 mM Na_2HPO_4，1.76 mM KH_2PO_4，137 mM NaCl，2.68 mM KCl ）で洗浄し，Lysis buffer（50 mM HEPES-NaOH（pH 6.8），150 mM NaCl，10% グリセロール，1 mM ジチオトレイオール（DTT，Wako），1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF, Wako）, 1xプロテアーゼインヒビターカクテル（Complete EDTA-free, Roche））に懸濁，超音波破砕後に超遠心（100,000 x g，4℃，30 分）を行った。

出芽酵母から調製する際には細胞を精製水で洗浄し，Lysis buffer に懸濁，Glass beads（acid-washed，SIGMA）を加えて細胞を破砕した。その後，非破砕細胞を除くために遠心（2,000 x g, 4℃, 3 分）し, 上清を回収, 超遠心（100,000

x g，4℃，30 分）を行った。超遠心後の沈降物を Lysis buffer に懸濁し，膜画分とした。また，膜画分の一部を BCA protein assay kit（Thermo Fisher scientific）を用いてタンパク質の定量を行った。出芽酵母膜画分中の 3xFLAG-TER または 3xFLAG-TER P182L タンパク質量は過去の報告に従い，FLAG ペプチドとマルトース結合タンパク質の融合タンパク質をスタンダードとし，抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロッティングにより定量を行った（101)。

in vitro S1P 代謝反応実験

in vitro S1P 代謝反応実験は以下に示す反応系で行った（反応容量 200 µl)。

40 µg 膜画分（siRNA を作用させた場合は 30 µg）
50 mM HEPES/NaOH（pH 7.4）
150 mM NaCl
1 mM PMSF
1x プロテアーゼインヒビターカクテル
1 mM DTT
2 mM $MgCl_2$
1 mM $CaCl_2$
5 µM フモニシン B_1（セラミド合成酵素阻害剤，Cayman Chemical）
1 mM グリセロール 3−リン酸（S1P ホスファターゼ阻害剤，Wako）
5 mM β−グリセロールリン酸（S1Pホスファターゼ阻害剤，Sigma）
5 mM オルトバナジン酸ナトリウム（S1P ホスファターゼ阻害剤，Wako）
250 µM ピリドキサールリン酸（Sigma）
1 mM NAD^+（Sigma）

以下は必要に応じて加えた。

200 µM CoA（Sigma）
5 mM ATP（Sigma）
1 mM NADPH（Sigma）

0.05 µCi [11, 12-^{3}H] S1P を 4 mg/ml BSA を含む Lysis buffer に混ぜて BSA に吸着させて反応系に加え，37˚C で 1 時間反応させた。反応後，反応溶液を 50 µl（ⅰ）と 150 µl（ⅱ）に分け，硝酸銀 TLC による展開に用いるための CoA の

鹸化（ｉ）と，逆相 TLC による展開に用いるためのメチルエステル化及び $KMnO_4/KIO_4$ 処理（ii）を行った。

（ｉ）25 µl KOH（w/v）及び 50 µl エタノールを加えて 70 ˚C，１時間鹸化反応を行った。100 µl 5 N 塩酸，50 µl エタノールを加えて溶液を中和した後に 700 µl ヘキサンを加えて二層分配を行った。ヘキサン層を回収し，バキュームコンセントレーターでヘキサンを留去した後に 20 µl クロロホルムに溶解させた。脂質の不飽和結合の数によって分離するため，硝酸銀 TLC plate（順相 TLC プレートを 5%硝酸銀水溶液に浸して乾燥させたもの）にスポットし，展開（ヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸 = 50：50：1）した。その後，バイオイメージングアナライザーBAS 2500 で検出した。

（ii）50 µl水を加えて液量を200 µlとしてから750 µlクロロホルム/メタノール/12 N 塩酸 = 100：200：1，250 µl クロロホルム，250 µl 水を順に加えて二層分配した。有機層を回収し，バキュームコンセントレーターで溶媒を留去した後に5%ジメトキシプロパンを含む400 µl 1 M methanolic/HClに懸濁した。80˚Cで１時間反応を行い，脂肪酸をメチルエステル化した後に400 µlヘキサンを加えて二層分配を行った。バキュームコンセントレーターでヘキサンを留去した後に100 µl 90%酢酸に懸濁し，50 µlずつ2つに分注した。75 µl 0.5% $KMnO_4/KIO_4$ = 1：1またはコントロールとして水を加えて37˚Cで１時間開裂処理を行った。反応後15 µl 20% 亜硫酸水素ナトリウムを加えて還元または水を加えてから50 µl 15 N NH_3を加えて中和し，250 µlクロロホルムを加えて二層分配を行った。有機層を回収し，バキュームコンセントレーターで溶媒を留去してから20 µlクロロホルムに溶解させた。脂質を逆相TLC（Silica Gel 60 RP-18 F_{254} TLC plates，Merck Millipore）にスポットし，展開（クロロホルム/メタノール/水 = 5：15：1）した。その後，PPOを噴霧し，-80℃でX線フィルムに感光させ，オートラジオグラフィーによる検出を行った。

SDS-PAGE

ポリアクリルアミドゲルの作製はレムリ法に従った。ゲルの作製には 30% Acrylamide/Bis Solution，37.5 : 1 （Bio-Rad）を使用した。分離ゲル溶液（11% アクリルアミド，375 mM Tris-HCl （pH 8.8），0.1% SDS），濃縮ゲル溶液 （5% アクリルアミド，125 mM Tris-HCl （pH 6.8），0.1% SDS）に過硫酸アンモニウム（分離ゲルでは 0.013%（w/v），濃縮ゲルでは 0.05%（w/v））と *N,N,N',N'*-

テトラメチルエチレンジアミン（分離ゲル，濃縮ゲル共に 0.2%（v/v））を加えてゲル化させた。泳動は泳動バッファー（25 mM Tris, 192 mM グリシン, 0.1% SDS）を用いて定電流で行った。

イムノブロッティング

SDS-PAGE により分離したタンパク質は Immobilon™ polyvinyliden diflioride membrane （Merck Millipore）にセミドライ式により定電流で転写した。転写には transfer buffer（25 mM Tris，192 mM グリシン，20% メタノール）を用いた。転写したメンブレンを 5%スキムミルク含有 TBS-T（137 mM NaCl，20 mM Tris-HCl （pH 7.5），0.05% Tween20）を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行い，続いて一次抗体を下記の濃度に希釈して室温で 1 時間震盪した。その後，TBS-T で 3 回洗浄し，二次抗体として peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG F (ab')$_2$ fragment （1/7500，GE Healthcare Biosciences）を室温で 1 時間震盪し，TBS-T で 3 回洗浄後，PBS で 1 回洗浄した。その後 ECL™ Western Blotting Detection Reagents（Thermo Fisher scientific）を用い，X 線フィルムに露光後，検出を行った。

イムノブロッティングに用いた一次抗体
抗 FLAG M2 抗体（1 μg/ml，STRATAGENE）
抗 α-チューブリン抗体 （1/1000，Sigma Aldrich）
抗 Pma1 抗体（1/2000，Molecular Probes）

パルスチェイス

細胞に遺伝子を導入し，48 時間後に細胞の培地を 4.5 mg/ml グルコースを含み，システイン，メチオニンを含まない DMEM（D0422，Sigma）に 4 mM L-グルタミン（Sigma）と 100 units/ml ペニシリン及び 100 μg/ml ストレプトマイシンを加えた培地に置換した。その後，37 ℃，5% CO_2 条件下で 1 時間培養し，55 μCi EXPRE^{35}S^{35}S Protein Labeling Mix（Perkin Elmer Life & Analytical Sciences）を加えて 37 ℃，5% CO_2 条件下で 1 時間培養した。1 時間後，通常の培地に置換し，1，2，4，8 時間後に総細胞抽出液を調製した。細胞を PBS で二回洗浄後, RIPA buffer（50 mM Tris-HCl（pH8.0）, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA，1% Triton X-100，0.1% SDS，0.1% デオキシコール酸ナトリウム，1 mM DTT，1 mM PMSF，1x プロテアーゼインヒビターカクテル）を加

えて細胞を溶解させ，遠心（20400 x g，4℃，5 分）した上清を回収し，総細胞抽出液とした。総細胞抽出液に anti-FLAG M2 affinity Gel（M2 ビーズ，Sigma）を加えて，免疫沈降により TER を回収した。ビーズを加えた後，4℃，一晩転倒混和し，遠心して M2 ビーズを沈殿させ，RIPA buffer で 2 回，10 mM Tris-HCl で 1 回洗浄した。沈降物に 2xSDS sample buffer（125 mM Tris-HCl（pH 6.8），4% SDS，20% グリセロール，0.02% ブロモフェノールブルー）を加えてタンパク質を溶出し，一部をイムノブロッティング用に，残りをオートラジオグラフィー用に SDS-PAGE で分離した。フルオログラフィーのため，ゲルは 10% 酢酸を含む 20% メタノールで 30 分間固定，Amplify fluorographic reagent（GE Healthcare）で 30 分間震盪し， 2 時間乾燥させた。検出は-80℃で X 線フィルムに露光して行った。

TER 酵素活性測定

TER の酵素活性測定は以下に示す反応系で行った（反応容量 50 µl）。

膜画分
50 mM HEPES-NaOH（pH 6.8）
150 mM NaCl
2 mM $MgCl_2$
1 mM $CaCl_2$
10% グリセロール
1 mM DTT
1 mM PMSF
1x プロテアーゼインヒビターカクテル
5 nCi [^{14}C]3-ヒドロキシパルミトイル CoA（1.8 µM，American Radiolabeled Chemicals）

出芽酵母を用いた際には 5 ng，10 ng，20 ng，40 ng の TER タンパク質を含む膜画分量で行った。
B-LCL を用いた際には 20 µg 分の膜画分を用いた。
NADPH 存在条件の際には上記の反応系に終濃度 1 mM の NADPH を加えた。

上記の反応溶液を 37℃，30 分で反応させた後，25 µl 75% KOH（w/v）及び 50 µl エタノールを加えて 70℃，1 時間鹸化反応を行った。100 µl 5N HCl，50 µl エタノールを加えて溶液を酸性にした後に 700 µl ヘキサンを加えて二層分配を行った。ヘキサン層を回収し，バキュームコンセントレーターでヘキサンを留去した後に 20 µl クロロホルムに溶解させて HPTLC プレート（HPTLC Silica gel 60，Merck Millipore）にスポット，展開溶媒としてヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸=30:70:1 を用いて展開した。HPTLC プレートをイメージングプレート（Fuji Film）に露光させ，イメージングアナライザーBAS 2500（Fuji Film）で検出，定量を行った。

極長鎖脂肪酸伸長活性の測定

極長鎖脂肪酸伸長サイクル活性測定は以下に示す反応系で行った（反応容量 50 µl）。

20 µg 膜画分
50 mM HEPES-NaOH（pH 6.8）
150 mM NaCl
2 mM $MgCl_2$
1 mM $CaCl_2$
1 mM NADPH
10% グリセロール
1 mM DTT
1 mM PMSF
1x プロテアーゼインヒビターカクテル
20 µM パルミトイル CoA（Sigma Aldrich）
75 nCi [^{14}C] マロニル CoA（27.3 µM，American Radiolabeled Chemicals）

パルミトイル CoA は 4 mg/ml BSA を含む Lysis buffer で 1 mM に用事希釈したものを使用した。上記の反応溶液を 37℃，30 分で反応させた後，25 µl 75% KOH（w/v）及び 50 µl エタノールを加えて 70℃，1 時間鹸化反応を行った。100 µl 5 N HCl，50 µl エタノールを加えて溶液を酸性にした後に 700 µl ヘキサンを加えて二層分配を行った。ヘキサン層を回収し，バキュームコンセント

レーターでヘキサンを留去した後に，20 µl クロロホルムに溶解させて HPTLC プレート（HPTLC Silica gel 60，Merck Millipore）にスポット，展開溶媒としてヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸=30:70:1 を用いて展開した。HPTLC プレートをイメージングプレート（Fuji Film）に露光させ，イメージングアナライザーBAS 2500（Fuji Film）で検出，定量を行った。

マススペクトロメトリーによるセラミド及びスフィンゴミエリンの検出

B-LCL は RPMI Medium 1640 に 20% FBS と 100 units/ml ペニシリン及び 100 µg/ml ストレプトマイシンを加えた培地を用い，37 ℃，5% CO_2 条件下で培養を行った。FBS は CHARCOAL，ACTIVATED（C-5510，Sigma）と共に 4℃で 1 晩震盪して脂質を除いた後，フィルター滅菌したものを用いた。細胞を PBS で洗浄し，Lysis buffer に懸濁，超音波破砕し，細胞抽出液を調製した。細胞抽出液に KOH（終濃度 0.1 N）を加えて 37℃，1 時間グリセロ脂質を分解した後，ギ酸（終濃度 0.3 N）を加え溶液を酸性にした。酸性にした溶液にクロロホルム/メタノール=1:2（vol/vol）を加えて撹拌後，クロロホルム/メタノール/水=1:1:1 になるようにクロロホルム，水を加えて二層分配を行った。有機層を回収し，バキュームコンセントレーターで溶媒を留去した後に脂質を 50 µl のクロロホルム/メタノール=1:2 に溶解させ， 4000 QTRAP® MS/MS （AB SCIEX）を用いて MS/MS 解析を行った。サンプルのマススペクトロメーターへのインジェクションには TriVersa Nanomate（Advion Biosystems）を用いた。イオンスプレー電圧は 1.6 kV，流速は 167 nl/min でインジェクションを行った。MS 解析は電圧 100 V でイオン化を行い，電圧 40 V（セラミド）または 60 V（スフィンゴミエリン）で衝突誘起解離を行った。ポジティブイオンモードで m/z 264.4（セラミド）または 184.1（スフィンゴミエリン）の質量を持つプロダクトイオンに対するプリカーサーイオンスキャンの取得を行った。検出されたセラミド及びスフィンゴミエリンのプロトン付加体 $[M+H]^+$ のイオン強度の総和を総スフィンゴミエリン量とし，各鎖長のアシル基を持つスフィンゴミエリンに対する割合を算出した。

Terl ノックアウト C2C12 細胞の作製

ccAB5 と pAK10 を C2C12 細胞にトランスフェクションし，48 時間後に 10 µg/ml ピューロマイシンを含む培地に交換し，プラスミドが導入された細胞を

選択した。その後，得られた細胞を希釈して播種し，シングルコロニーを形成させた。シングルコロニーを 18 クローン回収し，シークエンシングによってゲノムの *Terl* のエキソン 1 の配列を確認した。全てのアレルで *Terl* のコーディングシークエンス領域に塩基の挿入または欠失によるフレームシフト変異を持つことが確認された細胞を *Terl* ノックアウト細胞とした。確認されたノックアウト細胞 6 クローンの内 2 クローンを本研究に用いた。

表 1. 本研究で用いたプライマー

プライマー名	DNA 配列
TER-1	5’-AGGATCCATGAAGCATTACGAGGTGGAGATTCTG-3’（*Bam*HI）
TER-2	5’-TTCAGAGCAGGAAGGGGATGATGGGC-3’
TER-3	5’-GTCACTCATTCCACTACATCAAGCG-3
TSC13-1	5’-AACCCGGGTTACCTCTAGCAATGTAAACACCG-3’
TSC13-5	5’-AGGATCCATGCCTATCACCATAAAAAGCCGCTC-3’（*Bam*HI）
TSC13-6	5’-GACGAAGATGACGTTGTCAGCTCAAGC-3’
hLASS5-F	5’-GGGATCCATGGCGACAGCAGCGCAGGGACC-3’（*Bam*HI）
hLASS5-R	5’-TTACTCTTCAGCCCAGTAGCTGCCTCCC-3’
TER P182L-F	5'-TATTACATCAATCACCTTCTCTACACTCCCCCT-3'
TER P182L-R	5'-AGGGGGAGTGTAGAGAAGGTGATTGATGTAATA-3'
TERL-1	5’-AGATCTATGTTCAAAAGGCACAAGTCCCTCG-3’（BglⅡ）
TERL-2	5’-TTACAATATGAATGGAATCATTGCTG-3’
h/m-GAPDH-F	5’-CCAAGGTCATCCATGACAACTTTGG-3’
h/m-GAPDH-R	5’-GGTCCACCACCCTGTTGCTGTAGCC-3’

プライマーの下線部は括弧内の制限酵素の認識配列を示す。

表 2.本研究で用いた酵母株

酵母株	遺伝子型
BY4741	*MAT***a** *his3Δ 1 leu2Δ 0 met15Δ 0 ura3Δ 0*
ABY58	BY4741, *tsc13*Δ*::LEU2* /pAB114
ABY62	BY4741, *tsc13*Δ*::LEU2* /pAB110
ABY80	BY4741, *tsc13*Δ*::LEU2* /pAB119
ABY83	BY4741, *tsc13*Δ*::LEU2* /pTW6

表 3. RNA 干渉に用いた dsRNA

siRNA 名	RNA 配列
siTER-1	5’-GUCACUCAUUCCACUACAUCA-3’（sense） 5’-AUGUAGUGGAAUGAGUGACAG-3’（antisense）
siTER-2	5’-CGCUCGCCAUCUUUGUGAUCU-3’（sense） 5’-AUCACAAAGAUGGCGAGCGCC-3’（antisense）

表 4. *Terl* ノックアウト C2C12 細胞作製に用いたオリゴ DNA 配列

オリゴ DNA 名	DNA 配列
mTERL T1-1 sense	5'-AAGAAAACAAATATGTATTGGTTTT-3'
mTERL T1-1 antisense	5'-CAATACATATTTGTTTTCTTCGGTG-3'

参考文献

1. Dickson, R. C., and Lester, R. L. (2002) Sphingolipid functions in Saccharomyces cerevisiae. *Biochim Biophys Acta* **1583**, 13-25
2. Mizutani, Y., Mitsutake, S., Tsuji, K., Kihara, A., and Igarashi, Y. (2009) Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie* **91**, 784-790
3. Uchida, Y., and Holleran, W. M. (2008) Omega-O-acylceramide, a lipid essential for mammalian survival. *J Dermatol Sci* **51**, 77-87
4. Furland, N. E., Maldonado, E. N., Aresti, P. A., and Aveldaño, M. I. (2007) Changes in lipids containing long- and very long-chain polyunsaturated fatty acids in cryptorchid rat testes. *Biol Reprod* **77**, 181-188
5. Zadravec, D., Tvrdik, P., Guillou, H., Haslam, R., Kobayashi, T., Napier, J. A., Capecchi, M. R., and Jacobsson, A. (2011) ELOVL2 controls the level of n-6 28:5 and 30:5 fatty acids in testis, a prerequisite for male fertility and sperm maturation in mice. *J Lipid Res* **52**, 245-255
6. Pettus, B. J., Chalfant, C. E., and Hannun, Y. A. (2002) Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta* **1585**, 114-125
7. Sassa, T., Suto, S., Okayasu, Y., and Kihara, A. (2012) A shift in sphingolipid composition from C24 to C16 increases susceptibility to apoptosis in HeLa cells. *Biochim Biophys Acta* **1821**, 1031-1037
8. Yoshikawa, M., Go, S., Takasaki, K., Kakazu, Y., Ohashi, M., Nagafuku, M., Kabayama, K., Sekimoto, J., Suzuki, S., Takaiwa, K., Kimitsuki, T., Matsumoto, N., Komune, S., Kamei, D., Saito, M., Fujiwara, M., Iwasaki, K., and Inokuchi, J. (2009) Mice lacking ganglioside GM3 synthase exhibit complete hearing loss due to selective degeneration of the organ of Corti. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 9483-9488
9. Kolter, T., and Sandhoff, K. (2006) Sphingolipid metabolism diseases. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 2057-2079
10. Dickson, R. C., Sumanasekera, C., and Lester, R. L. (2006) Functions

and metabolism of sphingolipids in Saccharomyces cerevisiae. *Prog Lipid Res* **45**, 447-465

11. Di Nardo, A., Wertz, P., Giannetti, A., and Seidenari, S. (1998) Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* **78**, 27-30
12. Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Caputo, R., Carelli, S., and Ghidoni, R. (1993) Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta* **1182**, 147-151
13. 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
14. Hla, T., and Dannenberg, A. J. (2012) Sphingolipid signaling in metabolic disorders. *Cell Metab* **16**, 420-434
15. Liu, Y., Wada, R., Yamashita, T., Mi, Y., Deng, C. X., Hobson, J. P., Rosenfeldt, H. M., Nava, V. E., Chae, S. S., Lee, M. J., Liu, C. H., Hla, T., Spiegel, S., and Proia, R. L. (2000) Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest* **106**, 951-961
16. Matloubian, M., Lo, C. G., Cinamon, G., Lesneski, M. J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M. L., Proia, R. L., and Cyster, J. G. (2004) Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **427**, 355-360
17. Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S. (1998) Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J Biol Chem* **273**, 23722-23728
18. Liu, H., Sugiura, M., Nava, V. E., Edsall, L. C., Kono, K., Poulton, S., Milstien, S., Kohama, T., and Spiegel, S. (2000) Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J Biol Chem* **275**, 19513-19520
19. Mandala, S. M., Thornton, R., Galve-Roperh, I., Poulton, S., Peterson, C., Olivera, A., Bergstrom, J., Kurtz, M. B., and Spiegel, S. (2000) Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase

that degrades sphingosine-1- phosphate and induces cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7859-7864

20. 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
21. Zhou, J., and Saba, J. D. (1998) Identification of the first mammalian sphingosine phosphate lyase gene and its functional expression in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **242**, 502-507
22. Kihara, A. (2014) Sphingosine 1-phosphate is a key metabolite linking sphingolipids to glycerophospholipids. *Biochim Biophys Acta* **1841**, 766-772
23. Nakahara, K., Ohkuni, A., Kitamura, T., Abe, K., Naganuma, T., Ohno, Y., Zoeller, R. A., and Kihara, A. (2012) The Sjogren-Larsson syndrome gene encodes a hexadecenal dehydrogenase of the sphingosine 1-phosphate degradation pathway. *Mol Cell* **46**, 461-471
24. Ohkuni, A., Ohno, Y., and Kihara, A. (2013) Identification of acyl-CoA synthetases involved in the mammalian sphingosine 1-phosphate metabolic pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **442**, 195-201
25. Kim, S., Fyrst, H., and Saba, J. (2000) Accumulation of phosphorylated sphingoid long chain bases results in cell growth inhibition in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **156**, 1519-1529
26. Vogel, P., Donoviel, M. S., Read, R., Hansen, G. M., Hazlewood, J., Anderson, S. J., Sun, W., Swaffield, J., and Oravecz, T. (2009) Incomplete inhibition of sphingosine 1-phosphate lyase modulates immune system function yet prevents early lethality and non-lymphoid lesions. *PLoS One* **4**, e4112
27. Bektas, M., Allende, M. L., Lee, B. G., Chen, W., Amar, M. J., Remaley, A. T., Saba, J. D., and Proia, R. L. (2010) Sphingosine 1-phosphate lyase deficiency disrupts lipid homeostasis in liver. *J Biol Chem* **285**, 10880-10889
28. Marchitti, S. A., Brocker, C., Stagos, D., and Vasiliou, V. (2008) Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase

superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**, 697-720

29. Willemsen, M. A., Rotteveel, J. J., de Jong, J. G., Wanders, R. J., L, I. J., Hoffmann, G. F., and Mayatepek, E. (2001) Defective metabolism of leukotriene B4 in the Sjogren-Larsson syndrome. *J Neurol Sci* **183**, 61-67
30. Verhoeven, N. M., Jakobs, C., Carney, G., Somers, M. P., Wanders, R. J., and Rizzo, W. B. (1998) Involvement of microsomal fatty aldehyde dehydrogenase in the alpha-oxidation of phytanic acid. *FEBS Lett* **429**, 225-228
31. Kelson, T. L., Secor McVoy, J. R., and Rizzo, W. B. (1997) Human liver fatty aldehyde dehydrogenase: microsomal localization, purification, and biochemical characterization. *Biochim Biophys Acta* **1335**, 99-110
32. Rizzo, W. B. (2007) Sjogren-Larsson syndrome: molecular genetics and biochemical pathogenesis of fatty aldehyde dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab* **90**, 1-9
33. Watkins, P. A., Maiguel, D., Jia, Z., and Pevsner, J. (2007) Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome. *J Lipid Res* **48**, 2736-2750
34. Poulos, A. (1995) Very long chain fatty acids in higher animals--a review. *Lipids* **30**, 1-14
35. Hodson, L., Skeaff, C. M., and Fielding, B. A. (2008) Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog Lipid Res* **47**, 348-380
36. 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
37. Park, H., Haynes, C. A., Nairn, A. V., Kulik, M., Dalton, S., Moremen, K., and Merrill, A. H., Jr. (2010) Transcript profiling and lipidomic analysis of ceramide subspecies in mouse embryonic stem cells and embryoid bodies. *J Lipid Res* **51**, 480-489
38. Hakomori, S. (2000) Traveling for the glycosphingolipid path. *Glycoconj J* **17**, 627-647

39. Iwabuchi, K., Nakayama, H., Iwahara, C., and Takamori, K. (2010) Significance of glycosphingolipid fatty acid chain length on membrane microdomain-mediated signal transduction. *FEBS Lett* **584**, 1642-1652
40. Simons, K., and Gerl, M. J. (2010) Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 688-699
41. Iwabuchi, K., and Nagaoka, I. (2002) Lactosylceramide-enriched glycosphingolipid signaling domain mediates superoxide generation from human neutrophils. *Blood* **100**, 1454-1464
42. Ohno, Y., Suto, S., Yamanaka, M., Mizutani, Y., Mitsutake, S., Igarashi, Y., Sassa, T., and Kihara, A. (2010) ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 18439-18444
43. Ejsing, C. S., Sampaio, J. L., Surendranath, V., Duchoslav, E., Ekroos, K., Klemm, R. W., Simons, K., and Shevchenko, A. (2009) Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2136-2141
44. Buczynski, M. W., Dumlao, D. S., and Dennis, E. A. (2009) Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. *J Lipid Res* **50**, 1015-1038
45. Kohli, P., and Levy, B. D. (2009) Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *Br J Pharmacol* **158**, 960-971
46. Furland, N. E., Maldonado, E. N., Aresti, P. A., and Aveldano, M. I. (2007) Changes in lipids containing long- and very long-chain polyunsaturated fatty acids in cryptorchid rat testes. *Biol Reprod* **77**, 181-188
47. Sandhoff, R. (2010) Very long chain sphingolipids: tissue expression, function and synthesis. *FEBS Lett* **584**, 1907-1913
48. Ichimura, A., Hirasawa, A., Poulain-Godefroy, O., Bonnefond, A., Hara, T., Yengo, L., Kimura, I., Leloire, A., Liu, N., Iida, K., Choquet, H., Besnard, P., Lecoeur, C., Vivequin, S., Ayukawa, K., Takeuchi, M., Ozawa, K., Tauber, M., Maffeis, C., Morandi, A., Buzzetti, R., Elliott, P., Pouta, A., Jarvelin, M. R., Körner, A., Kiess, W., Pigeyre, M.,

Caiazzo, R., Van Hul, W., Van Gaal, L., Horber, F., Balkau, B., Lévy-Marchal, C., Rouskas, K., Kouvatsi, A., Hebebrand, J., Hinney, A., Scherag, A., Pattou, F., Meyre, D., Koshimizu, T. A., Wolowczuk, I., Tsujimoto, G., and Froguel, P. (2012) Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature* **483**, 350-354

49. Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K., Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., Tanaka, H., Maruyama, M., Satoh, R., Okubo, S., Kizawa, H., Komatsu, H., Matsumura, F., Noguchi, Y., Shinohara, T., Hinuma, S., Fujisawa, Y., and Fujino, M. (2003) Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* **422**, 173-176
50. Lynen, F. (1980) On the structure of fatty acid synthetase of yeast. *Eur J Biochem* **112**, 431-442
51. Smith, S. (1994) The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J* **8**, 1248-1259
52. Nugteren, D. H. (1965) The enzymic chain elongation of fatty acids by rat-liver microsomes. *Biochim Biophys Acta* **106**, 280-290
53. Luthria, D. L., and Sprecher, H. (1997) Studies to determine if rat liver contains multiple chain elongating enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1346**, 221-230
54. Jakobsson, A., Westerberg, R., and Jacobsson, A. (2006) Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res* **45**, 237-249
55. Denic, V., and Weissman, J. S. (2007) A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length. *Cell* **130**, 663-677
56. Sassa, T., Ohno, Y., Suzuki, S., Nomura, T., Nishioka, C., Kashiwagi, T., Hirayama, T., Akiyama, M., Taguchi, R., Shimizu, H., Itohara, S., and Kihara, A. (2013) Impaired epidermal permeability barrier in mice lacking elovl1, the gene responsible for very-long-chain fatty acid production. *Mol Cell Biol* **33**, 2787-2796
57. Westerberg, R., Månsson, J. E., Golozoubova, V., Shabalina, I. G., Backlund, E. C., Tvrdik, P., Retterstøl, K., Capecchi, M. R., and

Jacobsson, A. (2006) ELOVL3 is an important component for early onset of lipid recruitment in brown adipose tissue. *J Biol Chem* **281**, 4958-4968

58. Jakobsson, A., Jörgensen, J. A., and Jacobsson, A. (2005) Differential regulation of fatty acid elongation enzymes in brown adipocytes implies a unique role for Elovl3 during increased fatty acid oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289**, E517-526
59. Li, W., Sandhoff, R., Kono, M., Zerfas, P., Hoffmann, V., Ding, B. C., Proia, R. L., and Deng, C. X. (2007) Depletion of ceramides with very long chain fatty acids causes defective skin permeability barrier function, and neonatal lethality in ELOVL4 deficient mice. *Int J Biol Sci* **3**, 120-128
60. Li, W., Chen, Y., Cameron, D. J., Wang, C., Karan, G., Yang, Z., Zhao, Y., Pearson, E., Chen, H., Deng, C., Howes, K., and Zhang, K. (2007) Elovl4 haploinsufficiency does not induce early onset retinal degeneration in mice. *Vision Res* **47**, 714-722
61. Grayson, C., and Molday, R. S. (2005) Dominant negative mechanism underlies autosomal dominant Stargardt-like macular dystrophy linked to mutations in ELOVL4. *J Biol Chem* **280**, 32521-32530
62. Okuda, A., Naganuma, T., Ohno, Y., Abe, K., Yamagata, M., Igarashi, Y., and Kihara, A. (2010) Hetero-oligomeric interactions of an ELOVL4 mutant protein: implications in the molecular mechanism of Stargardt-3 macular dystrophy. *Mol Vis* **16**, 2438-2445
63. Moon, Y. A., Hammer, R. E., and Horton, J. D. (2009) Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice. *J Lipid Res* **50**, 412-423
64. Xu, J., Nakamura, M. T., Cho, H. P., and Clarke, S. D. (1999) Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J Biol Chem* **274**, 23577-23583
65. Matsuzaka, T., Shimano, H., Yahagi, N., Kato, T., Atsumi, A., Yamamoto, T., Inoue, N., Ishikawa, M., Okada, S., Ishigaki, N.,

Iwasaki, H., Iwasaki, Y., Karasawa, T., Kumadaki, S., Matsui, T., Sekiya, M., Ohashi, K., Hasty, A. H., Nakagawa, Y., Takahashi, A., Suzuki, H., Yatoh, S., Sone, H., Toyoshima, H., Osuga, J., and Yamada, N. (2007) Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elovl6, in obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* **13**, 1193-1202

66. Tan, C. Y., Virtue, S., Bidault, G., Dale, M., Hagen, R., Griffin, J. L., and Vidal-Puig, A. (2015) Brown Adipose Tissue Thermogenic Capacity Is Regulated by Elovl6. *Cell Rep* **13**, 2039-2047
67. Naganuma, T., Sato, Y., Sassa, T., Ohno, Y., and Kihara, A. (2011) Biochemical characterization of the very long-chain fatty acid elongase ELOVL7. *FEBS Lett* **585**, 3337-3341
68. Tamura, K., Makino, A., Hullin-Matsuda, F., Kobayashi, T., Furihata, M., Chung, S., Ashida, S., Miki, T., Fujioka, T., Shuin, T., Nakamura, Y., and Nakagawa, H. (2009) Novel lipogenic enzyme ELOVL7 is involved in prostate cancer growth through saturated long-chain fatty acid metabolism. *Cancer Res* **69**, 8133-8140
69. Moon, Y. A., and Horton, J. D. (2003) Identification of two mammalian reductases involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade. *J Biol Chem* **278**, 7335-7343
70. Rantakari, P., Lagerbohm, H., Kaimainen, M., Suomela, J. P., Strauss, L., Sainio, K., Pakarinen, P., and Poutanen, M. (2010) Hydroxysteroid (17{beta}) dehydrogenase 12 is essential for mouse organogenesis and embryonic survival. *Endocrinology* **151**, 1893-1901
71. Courilleau, D., Chastre, E., Sabbah, M., Redeuilh, G., Atfi, A., and Mester, J. (2000) B-ind1, a novel mediator of Rac1 signaling cloned from sodium butyrate-treated fibroblasts. *J Biol Chem* **275**, 17344-17348
72. Ikeda, M., Kanao, Y., Yamanaka, M., Sakuraba, H., Mizutani, Y., Igarashi, Y., and Kihara, A. (2008) Characterization of four mammalian 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases involved in very long-chain fatty acid synthesis. *FEBS Lett* **582**, 2435-2440
73. Li, D., Gonzalez, O., Bachinski, L. L., and Roberts, R. (2000) Human protein tyrosine phosphatase-like gene: expression profile, genomic

structure, and mutation analysis in families with ARVD. *Gene* **256**, 237-243

74. Gentilini, F., Zambon, E., Gandini, G., Rosati, M., Spadari, A., Romagnoli, N., Turba, M. E., and Gernone, F. (2011) Frequency of the allelic variant of the PTPLA gene responsible for centronuclear myopathy in Labrador Retriever dogs as assessed in Italy. *J Vet Diagn Invest* **23**, 124-126
75. Maurer, M., Mary, J., Guillaud, L., Fender, M., Pele, M., Bilzer, T., Olby, N., Penderis, J., Shelton, G. D., Panthier, J. J., Thibaud, J. L., Barthelemy, I., Aubin-Houzelstein, G., Blot, S., Hitte, C., and Tiret, L. (2012) Centronuclear myopathy in Labrador retrievers: a recent founder mutation in the PTPLA gene has rapidly disseminated worldwide. *PLoS One* **7**, e46408
76. Muhammad, E., Reish, O., Ohno, Y., Scheetz, T., Deluca, A., Searby, C., Regev, M., Benyamini, L., Fellig, Y., Kihara, A., Sheffield, V. C., and Parvari, R. (2013) Congenital myopathy is caused by mutation of HACD1. *Hum Mol Genet* **22**, 5229-5236
77. Blondelle, J., Ohno, Y., Gache, V., Guyot, S., Storck, S., Blanchard-Gutton, N., Barthelemy, I., Walmsley, G., Rahier, A., Gadin, S., Maurer, M., Guillaud, L., Prola, A., Ferry, A., Aubin-Houzelstein, G., Demarquoy, J., Relaix, F., Piercy, R. J., Blot, S., Kihara, A., Tiret, L., and Pilot-Storck, F. (2015) HACD1, a regulator of membrane composition and fluidity, promotes myoblast fusion and skeletal muscle growth. *J Mol Cell Biol* **7**, 429-440
78. Wang, B., Pelletier, J., Massaad, M. J., Herscovics, A., and Shore, G. C. (2004) The yeast split-ubiquitin membrane protein two-hybrid screen identifies BAP31 as a regulator of the turnover of endoplasmic reticulum-associated protein tyrosine phosphatase-like B. *Mol Cell Biol* **24**, 2767-2778
79. Caliskan, M., Chong, J. X., Uricchio, L., Anderson, R., Chen, P., Sougnez, C., Garimella, K., Gabriel, S. B., dePristo, M. A., Shakir, K., Matern, D., Das, S., Waggoner, D., Nicolae, D. L., and Ober, C. (2011) Exome sequencing reveals a novel mutation for autosomal recessive

non-syndromic mental retardation in the TECR gene on chromosome 19p13. *Hum Mol Genet* **20**, 1285-1289

80. Paul, S., Gable, K., and Dunn, T. M. (2007) A six-membrane-spanning topology for yeast and Arabidopsis Tsc13p, the enoyl reductases of the microsomal fatty acid elongating system. *J Biol Chem* **282**, 19237-19246
81. Cowley, P. M., Keslacy, S., Middleton, F. A., DeRuisseau, L. R., Fernhall, B., Kanaley, J. A., and DeRuisseau, K. C. (2012) Functional and biochemical characterization of soleus muscle in Down syndrome mice: insight into the muscle dysfunction seen in the human condition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **303**, R1251-1260
82. Ito, K., Anada, Y., Tani, M., Ikeda, M., Sano, T., Kihara, A., and Igarashi, Y. (2007) Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **357**, 212-217
83. Stoffel, W., and Sticht, G. (1967) Metabolism of sphingosine bases, I. Degradation and incorporation of (3-14C)erythro-DL-dihydrosphingosine and (7-3H2)erythro-DL-sphingosine into sphingolipids of rat liver. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **348**, 941-943
84. Stoffel, W., LeKim, D., and Heyn, G. (1970) Metabolism of sphingosine bases. XIV. Sphinganine (dihydrosphingosine), an effective donor of the alk-1-enyl chain of plasmalogens. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **351**, 875-883
85. Epstein, S., Castillon, G. A., Qin, Y., and Riezman, H. (2012) An essential function of sphingolipids in yeast cell division. *Mol Microbiol* **84**, 1018-1032
86. Naganuma, T., and Kihara, A. (2014) Two modes of regulation of the fatty acid elongase ELOVL6 by the 3-ketoacyl-CoA reductase KAR in the fatty acid elongation cycle. *PLoS One* **9**, e101823
87. Raz-Prag, D., Ayyagari, R., Fariss, R. N., Mandal, M. N., Vasireddy, V., Majchrzak, S., Webber, A. L., Bush, R. A., Salem, N., Jr., Petrukhin, K., and Sieving, P. A. (2006) Haploinsufficiency is not the key

mechanism of pathogenesis in a heterozygous Elovl4 knockout mouse model of STGD3 disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 3603-3611

88. Zhang, K., Kniazeva, M., Han, M., Li, W., Yu, Z., Yang, Z., Li, Y., Metzker, M. L., Allikmets, R., Zack, D. J., Kakuk, L. E., Lagali, P. S., Wong, P. W., MacDonald, I. M., Sieving, P. A., Figueroa, D. J., Austin, C. P., Gould, R. J., Ayyagari, R., and Petrukhin, K. (2001) A 5-bp deletion in ELOVL4 is associated with two related forms of autosomal dominant macular dystrophy. *Nat Genet* **27**, 89-93
89. Molday, R. S., and Zhang, K. (2010) Defective lipid transport and biosynthesis in recessive and dominant Stargardt macular degeneration. *Prog Lipid Res* **49**, 476-492
90. Ben-David, O., Pewzner-Jung, Y., Brenner, O., Laviad, E. L., Kogot-Levin, A., Weissberg, I., Biton, I. E., Pienik, R., Wang, E., Kelly, S., Alroy, J., Raas-Rothschild, A., Friedman, A., Brugger, B., Merrill, A. H., Jr., and Futerman, A. H. (2011) Encephalopathy caused by ablation of very long acyl chain ceramide synthesis may be largely due to reduced galactosylceramide levels. *J Biol Chem* **286**, 30022-30033
91. Ben-David, O., Pewzner-Jung, Y., Brenner, O., Laviad, E. L., Kogot-Levin, A., Weissberg, I., Biton, I. E., Pienik, R., Wang, E., Kelly, S., Alroy, J., Raas-Rothschild, A., Friedman, A., Brügger, B., Merrill, A. H., and Futerman, A. H. (2011) Encephalopathy caused by ablation of very long acyl chain ceramide synthesis may be largely due to reduced galactosylceramide levels. *J Biol Chem* **286**, 30022-30033
92. Kaufmann, W. E., and Moser, H. W. (2000) Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex* **10**, 981-991
93. Saneyoshi, T., Fortin, D. A., and Soderling, T. R. (2010) Regulation of spine and synapse formation by activity-dependent intracellular signaling pathways. *Curr Opin Neurobiol* **20**, 108-115
94. Obara, K., Kojima, R., and Kihara, A. (2013) Effects on vesicular transport pathways at the late endosome in cells with limited very long-chain fatty acids. *J Lipid Res* **54**, 831-842
95. Shirao, T., and Sekino, Y. (2001) Clustering and anchoring

mechanisms of molecular constituents of postsynaptic scaffolds in dendritic spines. *Neurosci Res* **40**, 1-7

96. Boda, B., Dubos, A., and Muller, D. (2010) Signaling mechanisms regulating synapse formation and function in mental retardation. *Curr Opin Neurobiol* **20**, 519-527
97. Nakanishi, M., Hirayama, E., and Kim, J. (2001) Characterisation of myogenic cell membrane: II. Dynamic changes in membrane lipids during the differentiation of mouse C2 myoblast cells. *Cell Biol Int* **25**, 971-979
98. Briolay, A., Jaafar, R., Nemoz, G., and Bessueille, L. (2013) Myogenic differentiation and lipid-raft composition of L6 skeletal muscle cells are modulated by PUFAs. *Biochim Biophys Acta* **1828**, 602-613
99. Vogel, S. S., Leikina, E. A., and Chernomordik, L. V. (1993) Lysophosphatidylcholine reversibly arrests exocytosis and viral fusion at a stage between triggering and membrane merger. *J Biol Chem* **268**, 25764-25768
100. Yeagle, P. L., Smith, F. T., Young, J. E., and Flanagan, T. D. (1994) Inhibition of membrane fusion by lysophosphatidylcholine. *Biochemistry* **33**, 1820-1827
101. Abe, K., Ohno, Y., Sassa, T., Taguchi, R., Çalışkan, M., Ober, C., and Kihara, A. (2013) Mutation for nonsyndromic mental retardation in the trans-2-enoyl-CoA reductase TER gene involved in fatty acid elongation impairs the enzyme activity and stability, leading to change in sphingolipid profile. *J Biol Chem* **288**, 36741-36749

謝辞

本研究の遂行にあたり，懇篤なる御指導，御鞭撻を賜りました，北海道大学大学院薬学研究院　生化学研究室　木原章雄教授に心から感謝申し上げます。充実した研究環境を与えて頂いたことに始まり，研究者としての心構えや研究戦略の立て方，実験手法，プレゼンテーションや論文執筆等，研究全般に渡り懇切丁寧に御指導賜りましたことを心から御礼申し上げます。

本研究において，有益な御助言，御指導を頂きました北海道大学薬学研究院生化学研究室　佐々貴之准教授，並びに，同研究室　小原圭介助教，同研究室大野祐介助教に深く感謝申し上げます。佐々貴之准教授には，本論文の審査もして頂き併せて御礼申し上げます。また，大野祐介助教には研究室配属当初から研究に関わる幅広い御指導頂きましたことを深く御礼申し上げます。

本論文を審査して頂き，有益なる御教示，御助言を賜りました北海道大学大学院薬学研究院　生体分子機能学研究室　前仲勝実教授，尾瀬農之准教授に深く感謝申し上げます。

本研究において精神遅滞患者由来 B-LCL を提供して下さったシカゴ大学 Carole Ober 教授に深く感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり，日常の議論を通じて多くの示唆や有益な知識を頂きました北海道大学大学院薬学研究院　生化学研究室の皆様に感謝申し上げます。特に，永沼達郎氏，北村拓也氏とは日々活発な御助言，御討論頂いたことを深く御礼申し上げます。

本学入学から博士課程の修了まで勉学及び研究環境を整備して頂きました北海道大学職員の皆様に厚く御礼申し上げます。

大学院生活を共に励まし合い，切磋琢磨し合った同輩である柿田浩輔氏，千葉杏子氏に深く感謝申し上げます。

最後にこれまで，あらゆる面において私を支えて下さった家族，友人に心から感謝申し上げます。