HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	長鎖塩基の代謝に関わるアルデヒド脱水素酵素と新規α酸化経路の解明［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	北村, 拓也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第12735号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65256
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Takuya_Kitamura_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　　北 村　拓 也

学 位 論 文 題 名

長鎖塩基の代謝に関わるアルデヒド脱水素酵素と新規α酸化経路の解明

スフィンゴ脂質は生体膜を構成する主要な脂質の 1 つである他，皮膚バリアや精子，ミエリン鞘の形成等の生理機能にも関わっている。スフィンゴ脂質の基本骨格であるセラミドは長鎖塩基と脂肪酸から構成されており，両者の炭素鎖長や不飽和度，水酸化の差異によって多様な分子種が生体内に存在する。細胞内のスフィンゴ脂質量は厳密に制御されており，生合成及び分解代謝異常によるホメオスタシスの破綻は生体機能の異常及び疾患を引き起こす。我々はこれまでスフィンゴ脂質の分解経路について解析を行い，経路に関与する遺伝子群の同定を行ってきた。その中で，4 位に水酸基を持つ長鎖塩基フィトスフィンゴシン（PHS）は炭素数 15 の直鎖脂肪酸（C15 FA）へ代謝されることを見出した。PHS はリン酸化，開裂（2-3 位間の開裂による長鎖アルデヒドへの変換），酸化を経て脂肪酸へ変換される。この過程で PHS の 4 位水酸基は脂肪酸の 2 位水酸基（2-OH）となり，その後，α 酸化によって除去されることで奇数鎖脂肪酸となると考えられたが，その詳細は未解明であった。本研究では PHS 分解経路の全容解明を試みた。また，PHS の分解で生じる 2-OH パルミチン酸の 2 位水酸基除去に関わる新規 α 酸化の同定を試みた。PHS 及び PHS 誘導体を含むスフィンゴ脂質は植物及び酵母に豊富に含まれているため，これらを摂取した際の栄養学的観点からも PHS 代謝の解明は重要である。

長鎖塩基の分解で生じた長鎖アルデヒドは ALDH3A2 によって脂肪酸に酸化される。*ALDH3A2* は魚鱗癬，精神遅滞，痙性対麻痺を主症状とするシェーグレン・ラルソン症候群（SLS）の原因遺伝子であり，代謝できなかったアルデヒドの毒性発露が発症に関わると考えられている。一方，*Aldh3a2* 欠損マウスはヒト SLS 患者でみられる魚鱗癬様症状を示さず，皮膚の長鎖アルデヒド脱水素酵素活性は野生型と同等であった。このことは未知の長鎖アルデヒド脱水素酵素がマウスに存在していることを示唆しており，本研究では新規長鎖アルデヒド脱水素酵素の探索とその酵素学的性質についても解析した。

1．フィトスフィンゴシン分解経路及び新規 α 酸化経路の解明

PHS の分解経路において，中間体として 2-OH ヘキサデカナールが生じることを我々は既に明らかにしてきた。2-OH ヘキサデカナールは長鎖アルデヒドであるため，長鎖アルデヒド脱水素酵素 ALDH3A2 の関与が予測された。この可能性を確かめるため，[^{3}H]PHS によるトレーサー実験を行った。その結果，野生型 CHO-K1 細胞中では PHS は主に C15 FA へと変換後，グリセロ脂質へと代謝された。また，一部は代謝中間体である 2-OH パルミチン酸のまま，スフィンゴ脂質（AP グルコシルセラミド）へ取り込まれた。一方，*Aldh3a2* 欠損 CHO-K1 細胞では PHS からグリセロ脂質への代謝が抑制されており，さらに AP グルコシルセラミドは検出されなかった。このことから，PHS 分解経路において ALDH3A2 が関与しており，2-OH ヘキサデカナールを 2-OH パルミチン酸へ酸化することが示された。

PHS の代謝過程で生じた 2-OH パルミチン酸は α 酸化によって C15 FA へ変換される。我々はこれまでに酵母において新規遺伝子 *MPO1* がこの α 酸化に関わることを明らかにしたが，哺乳類には *MPO1* ホモログが存在しない。また，HeLa 細胞を用いて既知の α 酸化酵素遺伝子である *HACL1* のノックダウンを行ったが，PHS 代謝は影響を受けなかった。この結果は，HACL1 と異なるα酸化酵素の存在を示唆していた。そこで，本研究では *HACL1* と相同性が

高い機能未知遺伝子 *ILVBL*（*HACL2* と新たに命名）の関与を検討した。酵母 *mpo1* 欠損株にヒト *HACL1* 及び *HACL2* を導入し，α 酸化活性を調べた。その結果，*HACL1*，*HACL2* ともにα 酸化活性を示したが，特に *HACL2* が高い活性を示した。また，HACL2 を精製し，*in vitro* での活性測定を行った。その結果，HACL2 は HACL1 と同様にチアミン 2-リン酸を補酵素とし，2-OH アシル CoA を基質にアルデヒドを生成することが明らかになった。次に細胞内局在を間接蛍光抗体法で解析した結果，HACL 1 がペルオキシソーム局在，HACL2 は小胞体局在であった。このように両者は酵素活性が類似しているが，細胞内局在が異なっていることが明らかになった。また, HACL 活性によって生じたペンタデカナールは ALDH3A2 によってペンタデカン酸へと代謝されることを *Aldh3a2* 欠損 CHO-K1 細胞を用いた解析により明らかにした。

2．新規長鎖アルデヒド脱水素酵素の探索及び解析

新規長鎖アルデヒド脱水素酵素の探索においては ALDH3A2 と相同性の高い ALDH3 ファミリーに属する 4 種のタンパク質（ALDH3A1，ALDH3B1，ALDH3B2，ALDH3B3）に着目した。まず，これらを精製し，長鎖アルデヒドの一種であるヘキサデカナールに対する活性を測定した。その結果，ALDH3B1，B2，B3 は ALDH3A2 と同程度に，ヘキサデカナールに対して活性を示した。続いて，ALDH3B ファミリーの細胞内局在について間接蛍光抗体法を用いて調べた結果，B1 と B3 が細胞膜，B2 が脂肪滴に局在することが明らかとなった。ALDH3B ファミリーの細胞内局在については，脂質修飾の 1 種であるゲラニルゲラニル化（GG 化）されることが重要であることを明らかにした。ALDH3B ファミリーは細胞分画では膜画分に存在するが, GG 化阻害剤を用いると可溶性画分に存在する割合が増加した。また, GG 化阻害剤によってヘキサデカナールに対する活性も減少した。これらの結果から, ALDH3B ファミリーの GG 化は細胞内局在と酵素活性に重要であることが示された。また, ALDH3B1 については GG 化の近傍システイン残基（Cys462，Cys463）がパルミトイル化をうけることをアシル-ビオチン置換法によって明らかにした。ALDH3B2 の脂肪滴局在化に必要な配列についても解析を行った。ALDH3B2 の C 末端領域に存在するトリプトファン残基（Trp462，Trp469）をアラニンに置換すると脂肪滴局在が損なわれていたことから，この C 末端付近のトリプトファン残基が GG 化と同様に重要であることを明らかにした。

本研究より，これまで未解明であった PHS 分解経路の全容を解明した。PHS 分解経路で生じる 2-ヒドロキシパルミチン酸はα 酸化によってペンタデカン酸へと代謝されるが，このα 酸化は以前より知られていたペルオキシソーム経路だけでなく, 小胞体経路が存在することを明らかにした。また，小胞体の 2-OH アシル CoA リアーゼとして新たに HACL2 を同定した。*HACL2* は本研究によって初めて機能が明らかにされた遺伝子である。また，新規の長鎖アルデヒド脱水素酵素として ALDH3B1，ALDH3B2，ALDH3B3 を同定した。これらのタンパク質は GG 化修飾をうけており，GG 化は膜への結合と，長鎖アルデヒドに対する活性に重要あることを明らかにした。さらに ALDH3B1 はパルミトイル化修飾をうけていることも明らかにした。このような脂質修飾をうけるアルデヒド脱水素酵素は本研究によってはじめて明らかにされた。ALDHB1，B3 は細胞膜局在であるにも関わらず，B2 は脂肪滴に局在していた。この ALDH3B2 の脂肪滴局在には C 末端領域のトリプトファン残基が重要であることを明らかにした。ALDH3B2 の脂肪滴への局在は C 末端 GG 基とトリプトファン残基の相互作用によるものと考えられる。