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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12735
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68529
Type	doctoral thesis
File Information	Takuya_Kitamura.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

平成 28 年度
博士学位論文

長鎖塩基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

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

北村拓也

平成 29 年 3 月

目次

略語一覧 5
脚注 7
1. 序論 8
1-1. スフィンゴ脂質の構造と機能 8
1-1-1. スフィンゴ脂質 8
1-1-2. セラミドの表記 8
1-1-3. 長鎖塩基 8
1-1-4. 脂肪酸 11
1-1-5. アシルセラミド 12
1-1-6. 皮膚バリアとスフィンゴ脂質 13
1-1-7. スフィンゴ脂質の応用 14
1-2. α 酸化 15
1-3. 長鎖塩基分解経路 16
1-4. 長鎖アルデヒド脱水素酵素 17
1-4-1. アルデヒド脱水素酵素 17
1-4-2. ALDH3 サブファミリー 19
1-4-3. Sjögren-Larsson 症候群 20
1-4-4. *Aldh3a2* KO マウス 21
1-5. プレニル化及びパルミトイル化 21
1-6. 脂肪滴 22
2. フィトスフィンゴシン分解経路と新規 α 酸化経路の解明 23
2-1. 研究背景・目的 23
2-2. 結果 24
2-2-1. ALDH3A2 は 2-ヒドロキシヘキサデカナールを酸化する 24
2-2-2. 2-ヒドロキシパルミチン酸の α 酸化に関わる新規因子 HACL2 の同定 26
2-2-3. HACL2 は 2-ヒドロキシアシル CoA リアーゼである 29
2-2-4. HACL2 は小胞体に局在する 31
2-2-5. HACL の開裂で生じたペンタデカナールは ALDH3A2 が酸化する 33
2-3. 考察 34
2-3-1. α 酸化 35
2-3-2. α 酸化が 2 経路存在する意義 38
2-3-3. HACL2（ILVBL）について 39

2-3-4. ALDH3A2 とα酸化 40
2-3-5. α酸化の今後の課題 40
2-4.材料と方法 41
2-4-1. プラスミドの作製 41
2-4-2. 酵母株と培地 42
2-4-3. 細胞培養及びトランスフェクション 42
2-4-4. 動物細胞への[^{3}H]標識脂質ラベルアッセイ 42
2-4-5. LC-MS/MS を用いた細胞内セラミド及び PC の解析 43
2-4-6. イムノブロッティング 43
2-4-7. RNA の調製と cDNA 化及び定量的 PCR 44
2-4-8. *Hacl1* 及び *Hacl2* のノックアウト細胞の作製 44
2-4-9. タンパク質の精製と *in vitro* 活性測定 45
2-4-10. 間接蛍光抗体法 45
2-4-11. 細胞分画 46
2-4-12. proteinase K 処理 46
3. 長鎖アルデヒド脱水素酵素の解析 47
3-1. 研究背景と研究目的 47
3-2. 結果 47
3-2-1. Aldh3b タンパク質は *in vitro* において長鎖アルデヒドに対して活性を示す 47
3-2-2. *Aldh3* ファミリーの組織発現分布 49
3-2-3. Aldh3b タンパク質の細胞内局在 50
3-2-4. Aldh3b2，Aldh3b3 の C 末端配列はそれぞれの細胞内局在に必要である 53
3-2-5. ヒト ALDH3B1 は酵母長鎖アルデヒド脱水素酵素 Hfd1 の機能を相補する 55
3-2-6. ヒト ALDH3B1 はヘキサデセナールに対して高い親和性を示す 55
3-2-7. ヒト ALDH3B1 の過剰発現は ALDH3A2 の機能を相補する 56
3-2-8. ALDH3B1 は 2 種類の脂質修飾を受ける 58
3-2-9. 脂質修飾は ALDH3B1 の細胞膜局在に重要である 60
3-2-10. プレニル化は ALDH3B1 の長鎖アルデヒドに対する活性に必要である 60
3-2-11. マウス Aldh3b1-3 タンパク質は脂質修飾される 60
3-2-12. *Aldh3a2* 欠損細胞は長鎖塩基高感受性を示す 62
3-3. 考察 64
3-3-1. Aldh3b1 の役割 66
3-3-2. Aldh3b2 及び Aldh3b3 の役割 66

3-3-3. Aldh3 ファミリーの細胞内局在.....67
3-3-4. Aldh3b タンパク質における脂質修飾の役割.....68
3-3-5. アルデヒド脱水素酵素についての今後の課題.....70
3-4. 材料と方法.....71
3-4-1. プラスミドの作製.....71
3-4-2. 酵母株及び細胞の培養.....72
3-4-3. ALDH タンパク質の精製.....72
3-4-4. *in vitro* ALDH 活性測定.....73
3-4-5. RNA 精製と RT-PCR.....73
3-4-6. 細胞分画.....73
3-4-7. イムノブロッティング.....73
3-4-8. オイルレッド O 染色と間接蛍光抗体法.....74
3-4-9. His_6-Myc-ALDH3B1 安定発現 FAA-K1A 細胞株の作製.....74
3-4-10. [^{3}H]DHS ラベルアッセイ.....74
3-4-11. アシル-ビオチン置換法.....74
3-4-12. MTT アッセイ.....75
4. 本研究の総括.....77
5. 表一覧.....78
6. 参考文献.....84

略語一覧

ACP	acyl-carrier protein
ACS	acyl-CoA synthetase
ALDH	aldehyde dehydrogenase
BAT	brown adipose tissue
CHO	Chinese hamstar ovary
CoA	coenzyme A
CRISPR/CAS9	clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9
CT	computed tomography
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ESI	electron spray ionization
FA	fatty acid
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazone ethane sulfonic acid
HPTLC	high perphormance thin-layer chromatography
IPC	inositol phosphorylceramide
KO	knockout
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
$M(IP)_2C$	mannosyldiinositol phosphorylceramide
MIPC	mannosylinositol phosphorylceramide
MRI	magnetic resonance imaging
MRM	multiple reaction monitoring
mRNA	messenger ribonucleic acid
NAD(P)+	nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)
PBS	phosphate-buffered saline
PC	phosphatidylcholine
PCR	polymerase chain-reaction
PE	phosphatidylethanolamine
PEX	peroxisomal biogenesis factor (peroxin)
PI	phosphatidylinositol
PIC	protease inhibitor cocktail
PIP_2	phosphatidylinositol bis-phosphate

PlsC	plasmanyl choline
PlsE	plasmenyl ethanolamine
PPARγ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
PS	phosphatidylserine
PTS	peroxisome targeting signal
RT-PCR	reverse transcription PCR
S1P	sphingosine 1-phosphate
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	tris-buffered saline
TER	*trans*-enoyl-CoA reductase
TLC	thin-layer chromatography
TPP	thiamine pyrophosphate
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
WAT	white adipose tissue

脚注

本研究では，ヒトのタンパク質をすべて大文字で表記し，マウスのタンパク質を頭文字のみ大文字で表記する。マウスタンパク質もすべて大文字で表記する規定があるが，ヒトのタンパク質との混同を避けるための措置である。遺伝子はイタリックで表記する。

また，本論文は 1.フィトスフィンゴシン分解経路とα酸化の解析と 2. 長鎖アルデヒド脱水素酵素の解析の二部構成となっており，研究背景・目的，結果，考察，材料と方法は二部間で独立している。

1. 序論

1-1. スフィンゴ脂質の構造と機能

1-1-1. スフィンゴ脂質

スフィンゴ脂質はグリセロ脂質と並び，生体膜を構成する主要な脂質の 1 つである。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がアミド結合したものであり(図 1A)，セラミドの 1 位水酸基に様々な官能基が結合することで多様なスフィンゴ脂質が生体内に存在する。ホスホコリンが結合したスフィンゴミエリンは哺乳類の主要なスフィンゴ脂質である。スフィンゴミエリンは細胞膜の脂質二重層の外層に多く，コレステロールとともに脂質ドメインを形成する(1)。セラミドに糖鎖が結合したスフィンゴ糖脂質は糖の種類や数によって多様性に富んでいる(2)。また，スフィンゴ脂質の多様性は極性基だけに留まらない。疎水骨格であるセラミド部分にも長鎖塩基と脂肪酸の鎖長，不飽和度，水酸基の有無などに違いがある。これらの違いを考慮に入れると数百に及ぶセラミド分子種が存在する。スフィンゴ脂質は生体膜を構成するだけでなく，皮膚バリア形成(3，4)，免疫系(5)，神経機能(6)，精子形成(7)，血管形成(8)，アポトーシス(9)など様々な生体機能にも関わっている。こういった重要性から，スフィンゴ脂質の代謝異常はニーマンピック病，ファブリー病，ゴーシェ病などの様々な代謝異常症を引き起こす(10，11)。

1-1-2. セラミドの表記

セラミドは異なった長鎖塩基，脂肪酸の組み合わせからなる多様性に富む（図 1B)。本稿ではセラミド分子種を区別するためにそれぞれの長鎖塩基，脂肪酸の頭文字による略記を用いて記載する。長鎖塩基に関してはスフィンゴシンを[S]，ジヒドロスフィンゴシンを[DS]，フィトスフィンゴシンを[P]，6-ヒドロキシスフィンゴシンを[H]という略記を使用する。脂肪酸に関しては水酸基のない脂肪酸（ノンヒドロキシ脂肪酸）を[N]，α ヒドロキシ脂肪酸を[A]，ω ヒドロキシ脂肪酸を[O]，エステル化 ω ヒドロキシ脂肪酸を[EO]と表記する。これらの略記の組み合わせを用いて，セラミドを記載する（各長鎖塩基，脂肪酸についてはそれぞれ 1-1-3，1-1-4 で後述する)。例えば長鎖塩基がフィトスフィンゴシン[P]，脂肪酸が α ヒドロキシ脂肪酸[A]をもつセラミドの場合は AP セラミドと表記する。また，本論文では X 型セラミドと表記した場合，セラミド中の長鎖塩基または脂肪酸構造が X であり，他方の構造は任意である（構造の区別はしない）ことを示す。例えば P 型セラミドなら長鎖塩基構造がフィトスフィンゴシンであり，脂肪酸側は任意であるという意味である。

1-1-3. 長鎖塩基

長鎖塩基は 2 位にアミノ基をもつ 1, 3-ジオールで, 炭素鎖長は 18 のものがほとんどである。

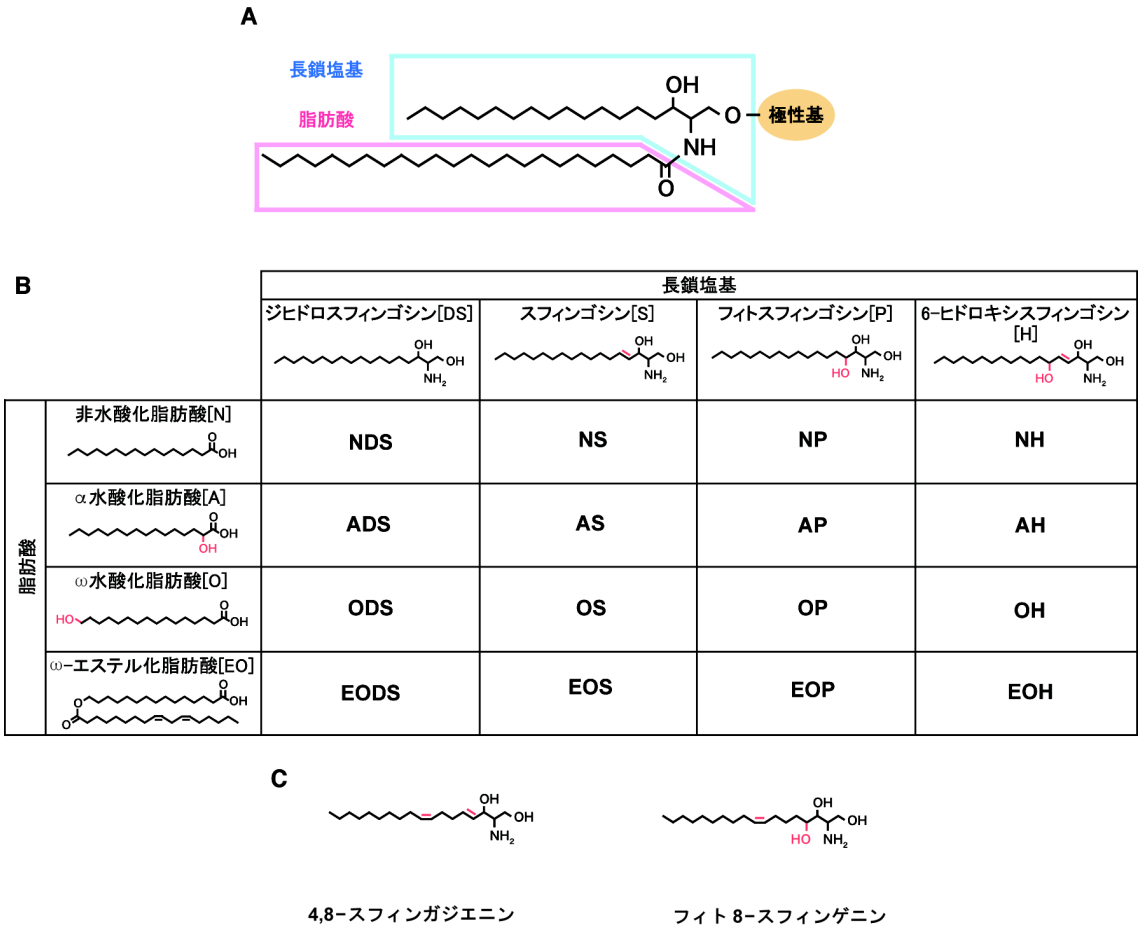


図 1 スフィンゴ脂質の構造

（A）スフィンゴ脂質は長鎖塩基と脂肪酸からなるセラミドと極性基より構成される。（B）セラミドは含まれる長鎖塩基と脂肪酸の種類の組み合わせによって分類，区別される。（C）植物固有の長鎖塩基の構造を示す。

哺乳類の長鎖塩基はジヒドロスフィンゴシン（dihydrosphingosine; DHS），スフィンゴシン（sphingosine; SPH），フィトスフィンゴシン（phytosphingosine; PHS），6-ヒドロキシスフィンゴシン(12，13)の少なくとも 4 種類が知られている。長鎖塩基生合成過程はまず，パルミトイル CoA とセリンの縮合反応によって 3-ケトジヒドロスフィンゴシンが生成することで始まる(14)。続いて 3-ケトジヒドロスフィンゴシンの 3 位カルボニル基が還元されることで DHS が生じる(15)。DHS がアシル CoA とアミド結合することでジヒドロセラミド（DS 型セラミド）が生成する(16)。DS 型セラミドがスフィンゴ脂質Δ4 不飽和化酵素 DES1 によって 4，5-不飽和化されると S 型セラミドとなる(17)。DS 型セラミドがスフィンゴ脂質 4 位水酸化酵素 DES2 によって 4 位水酸化されると P 型セラミドとなる(18，19)。これらのセラミドのアミド結合が加水分解されると，それぞれ DHS，SPH，PHS が生じる。6-ヒドロキシスフィンゴシンの生合成過

程は不明である。

また，長鎖塩基は細胞内で生合成されるだけでなく，細胞外からも取り込まれる(20)。長鎖塩基は２通りの経路によって代謝される。１つ目はセラミド再合成に利用される経路である。もう１つは，異化反応によってアシル CoA となり，他の脂質（主にグリセロ脂質）へと代謝される経路である(16)。

DHS は前述のように，スフィンゴ脂質の *de novo* 合成過程で生じるために，SPH に比べて少量ではあるものの，すべての組織に存在する。SPH は哺乳類においてスフィンゴ脂質を構成する主要な長鎖塩基であり，出芽酵母には存在しない。SPH は 4，5 位 *trans* 二重結合をもち，SPH の 1 位がリン酸化されたスフィンゴシン 1-リン酸（S1P）は脂質メディエーターとしての役割がある(21)。哺乳類の DES1 は DS 型セラミドのΔ4 位不飽和化を触媒し，S 型セラミドを生成する。DES1 は出芽酵母のジヒドロスフィンゴシン 4 位水酸化酵素 Sur2 との相同性から機能が明らかにされた(17)。*DES1* は生体内では広範な組織に発現している。*Des1* ノックアウト（KO; knockout）マウスの殆どは皮膚バリア不全によって出生後まもなく死亡する(22)。生き残った個体も魚鱗癬（1-1-5 にて後述）様の皮膚，まばらな毛，体の震え，発育の遅滞などの表現型を示す。また，ショウジョウバエでは *Des1* ホモログである *Degs1* の変異によって雄性不妊となる(7)。このように，哺乳類，昆虫における長鎖塩基のΔ4 不飽和化は生理的に極めて重要であるが，表現型との関連は不明である。

PHS は 4 位に水酸基をもつ長鎖塩基である。フィト（phyto-; 植物の意）という接頭辞からも分かるように PHS 誘導体（4 位水酸化長鎖塩基；フィト 8-スフィンゲニンなど；図 1C）は植物に多くみられる。また，PHS は出芽酵母における主要な長鎖塩基である(23，24)。ヒトをはじめとする哺乳類では，PHS は小腸，表皮に多く，腎臓，脳にも少量存在する。出芽酵母において, PHS はジヒドロスフィンゴシン 4 位水酸化酵素 Sur2 による DHS の 4 位水酸化によって生合成される。また，Sur2 は DS 型セラミドを P 型セラミドにすることもできる。一方，哺乳類においては PHS が *de novo* 合成経路で直接合成されることはなく，ジヒドロセラミド 4 位水酸化酵素 DES2 によって DS 型セラミドの 4 位が水酸化されて P 型セラミドとなった後，セラミダーゼによる P 型セラミドのアミド結合切断によって産生される(18)。このように哺乳類と酵母間では PHS の生合成経路が異なっている。*DES2* は小腸上皮，表皮，腎臓，脳などに発現しており(18，19，25)，これらの発現部位はフィトセラミドが存在する領域と重なる(26)。哺乳類における PHS の生理的役割は未だはっきりしていないが，*DES2* には統合失調症に関連する一塩基多型（SNP; single nucreotide polymorphism）がみつかっている(25，27)。PHS は他の長鎖塩基に比べて水酸基が 1 つ多いため，より多くの水素結合によって分子間で会合できると考えられる。このことから PHS 含有のスフィンゴ脂質は脂質–脂質相互作用の増強によって，脂質マイクロドメインの形成，表皮で見られるような脂質多層構造体の安定化などに寄与する

可能性がある。また，アトピー性皮膚炎や乾癬といった皮膚疾患において，P 型セラミドの減少が報告されている(28，29)。病態との関連は不明であるが，皮膚バリア形成において重要な機能を担っている可能性がある。

6-ヒドロキシスフィンゴシン型セラミドはヒト表皮に存在するという報告はあるものの，他の組織及び他の生物中に存在するかはよく分かっていない(12，13)。生合成過程及び機能も不明である。植物スフィンゴ脂質中の長鎖塩基は哺乳類と同様に 4，5-不飽和や 4 位水酸基をもつが，さらに 8，9-不飽和化されたものが主要に存在する（図 1C）(30，31)。

1-1-4. 脂肪酸

脂肪酸とは炭化水素鎖をもつカルボン酸のことを指し，定義によって異なるが炭素数 7 以下のものを短鎖脂肪酸，8-10 を中鎖脂肪酸，11 から 20 を長鎖脂肪酸，21 以上を極長鎖脂肪酸と呼ぶ。また炭素数 26 以上の極長鎖脂肪酸は超長鎖脂肪酸と呼ばれることがある。極長鎖脂肪酸はグリセロ脂質中には少ないが，スフィンゴ脂質中には多く存在する。また，スフィンゴ脂質中の脂肪酸には水酸基を有するものが存在するのも特徴的である(32，33)。

奇数鎖脂肪酸とは炭化水素鎖の炭素数が奇数の脂肪酸を指す。脂肪酸の生合成は炭素数 2 のアセチル CoA／ACP（acyl-carrier protein）より 2 炭素ずつ伸長される反応のため，生体内に存在する脂肪酸のほとんどは偶数鎖脂肪酸であり，奇数鎖脂肪酸の量は極めて少ない。奇数鎖脂肪酸が生成される経路としては炭素数 3 のプロピオニル CoA／ACP の伸長に由来するもの(34，35)と脂肪酸のα酸化によるもの（1-2 にて後述）(36，37)が挙げられる。

セラミドを構成するヒドロキシ脂肪酸としては 2 位が水酸化されたαヒドロキシ脂肪酸とω末端が水酸化されたωヒドロキシ脂肪酸が知られている(16)。脂肪酸のα水酸化は酵母では Scs7，哺乳類では FA2H が担う(38，39)。ヒトにおいて *FA2H* の変異は先天性の痙性麻痺を引き起こす(40)。FA2H の発現は脳，表皮で高く，これらの組織にはαヒドロキシセラミドが豊富に存在する。脂肪酸のω水酸化は一般的にシトクロム P450 に属する CYP4 ファミリーによって行われるが，ω水酸化セラミド（O 型セラミド）合成に利用される超長鎖脂肪酸のω水酸化は CYP4F22 が触媒する(41)。CYP4F22 は表皮特異的に発現しており，その遺伝子変異は先天性魚鱗癬（1-1-5 にて後述）を引き起こす(42)。O 型セラミドは後述する皮膚バリア機能に重要なアシルセラミド（EO 型セラミド）の代謝中間体である。また，O 型セラミドは表皮の構成タンパク質とω位で共有結合した結合型セラミドとしても存在し，皮膚バリア機能の維持に重要である。

マウスの表皮に脂肪酸の 3 位が水酸化されたβヒドロキシセラミドが存在することを示唆する報告がある(43)。ただし，この報告では 2 位とは異なる位置に水酸基をもつセラミドの存在を示しただけであり，実際に3位が水酸化されているかは実験的に証明されていない。また，その

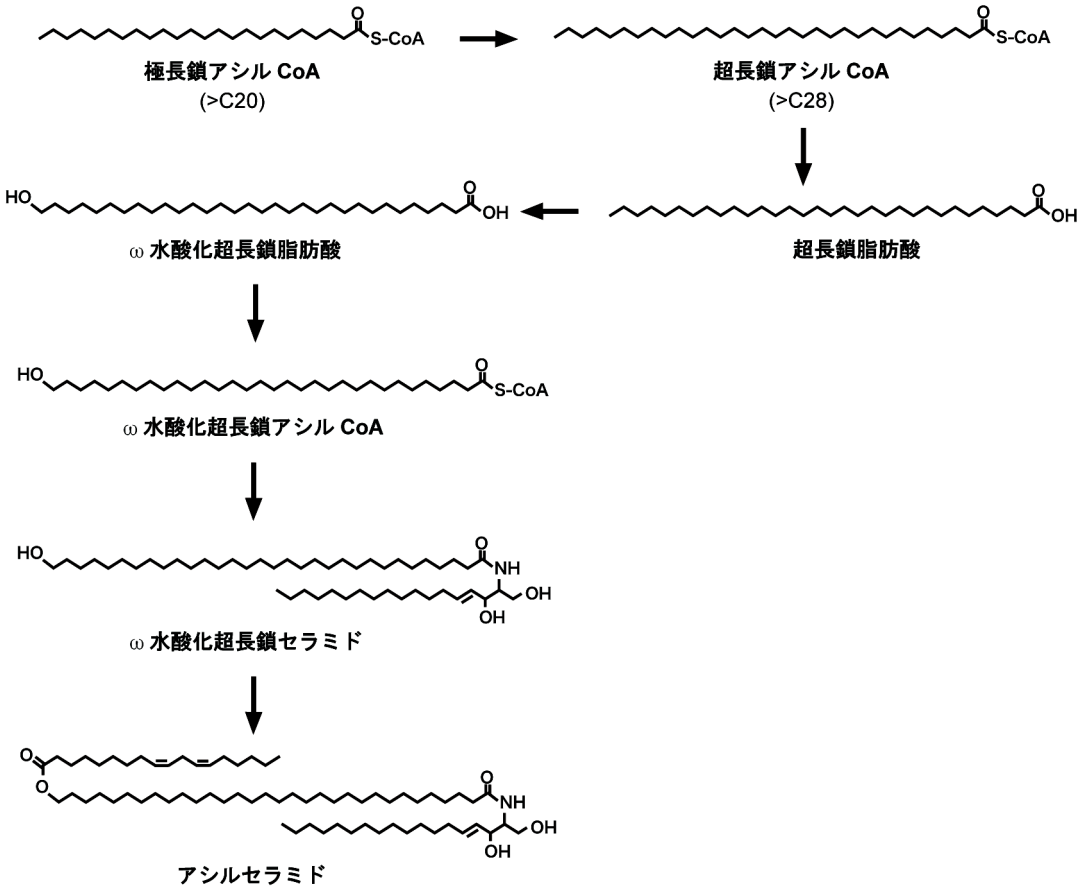


図 2 アシルセラミド（EO 型セラミド）の生合成経路

超長鎖脂肪酸は脂肪酸伸張酵素 ELOVL1，ELOVL4 によって極長鎖アシル CoA が伸張後，脱 CoA 化されることで産生される。超長鎖脂肪酸は CYP4F22 によって ω位が水酸化されてω水酸化超長鎖脂肪酸となる。セラミド合成酵素 CERS3 はω水酸化超長鎖脂肪酸と長鎖塩基の縮合反応を触媒し，ω水酸化超長鎖セラミドが産生される。そして，トランスアシラーゼ PNPLA1 によってω水酸化超長鎖セラミドの ω水酸基にリノール酸が付加されることで EO 型セラミドは生成される。

水酸化に関わる酵素も不明である。β水酸化脂肪酸は生体内に僅かながら存在し，脂肪酸の β 酸化もしくは伸長過程で生じた中間体に由来する(44，45)。

1-1-5. アシルセラミド

アシルセラミド（EO 型セラミド）は皮膚バリア機能において重要な役割をもつ(16)。実際，EO 型セラミド量は魚鱗癬やアトピー性皮膚炎などの皮膚疾患患者中で顕著に減少している(29)。魚鱗癬は皮膚の肥厚，乾燥，落屑を特徴とする症状で，皮膚表面が魚鱗のような形態を示すことからその名が付けられた。魚鱗癬は皮膚バリア疾患であり，形態的異常のみならず，感染症

になりやすい。また，皮膚の肥厚化によって汗腺が埋没，発汗が障害されることから，体温調節が困難となる場合がある。EO 型セラミドは長鎖塩基に炭素数 28 以上の ω 水酸化超長鎖脂肪酸が結合し，その ω 位にリノール酸がエステル結合した独特な構造を持つ（図 2)。EO 型セラミドの生合成過程ではまずアシル CoA が極長鎖脂肪酸伸長酵素である ELOVL1，ELOVL4 によって伸長される。炭素数 28 以上にまで伸長したアシル CoA は，CoA が脱離した後に CYP4F22 によって ω 水酸化を受ける。続いて ω 水酸化超長鎖脂肪酸はアシル CoA 合成酵素（ACS）によって CoA 付加を受け，産生した ω 水酸化超長鎖アシル CoA はセラミド合成酵素 CERS3 によって ω 水酸化超長鎖セラミドへと変換される(4)。最後に ω 水酸化超長鎖セラミドの ω 位はトランスアシラーゼ PNPLA1 によってリノール酸の付加を受ける(46，47)。リノール酸欠乏症の症状の 1 つである魚鱗癬様症状，乾燥肌は EO 型セラミド量の減少によって生じると考えられている。

EO 型セラミドの一部はリノール酸部分が脱離後，角化細胞辺縁帯の構造タンパク質と共有結合し，結合型セラミドへと変換される(48)。EO 型セラミドから結合型セラミドへの変換はアシルセラミドのリノール酸部分がリポキシゲナーゼ ALOX12B，ALOXE3 によってヒドロキシ化／エポキシ化されることが引き金となって引き起こされる(49，50)。辺縁帯タンパク質との結合はトランスグルタミナーゼ TGM1 が触媒するという報告があるものの，詳細は依然不明である(51)。EO 型セラミド産生において働く *CYP4F22*，*CERS3*，*PNPLA1*，*ALOX12B*，*ALOXE3*，*TGM1* 遺伝子には先天性魚鱗癬患者で変異が見つかっている(4，42，46，51)。

1-1-6. 皮膚バリアとスフィンゴ脂質

表皮は体の最外層に位置する組織である。表皮の主な役割の一つとして，体内の水分の過度な蒸散を防ぎ，体外からの異物侵入を防ぐ透過性バリア機能がある。表皮の最外層に位置する角質層には，角化細胞の細胞間隙に脂質の多層構造体（脂質ラメラ）が存在しており，この脂質ラメラの高い疎水性がバリア機能に最も重要な役割を果たしている(3，52)。脂質ラメラの主成分はセラミドであり，表皮総脂質重量の 4-5 割を占める(3，52)。セラミドは前述した長鎖塩基，脂肪酸の鎖長，不飽和度，水酸化レベルの違いによる多様性に富むが，表皮での多様性は特に顕著である。表皮では他の組織と異なり，脂肪酸の鎖長が 28-36 に達する超長鎖セラミド，EO 型セラミド，H 型セラミドといった固有なセラミドが存在する(33)。ヒトにおいてはセラミドの 3 分の 1 を P 型セラミドが占めている(33)。表皮におけるセラミドの多様性は皮膚バリア機能に重要であると考えられている。上述の通り，EO 型セラミドは皮膚バリア形成に必須であり，その産生不全は魚鱗癬を引き起こす(16)。P 型セラミドは乾癬，アトピー性皮膚炎の病変部で減少することから，皮膚バリア機能において役割を持つと考えられている(28，29)。

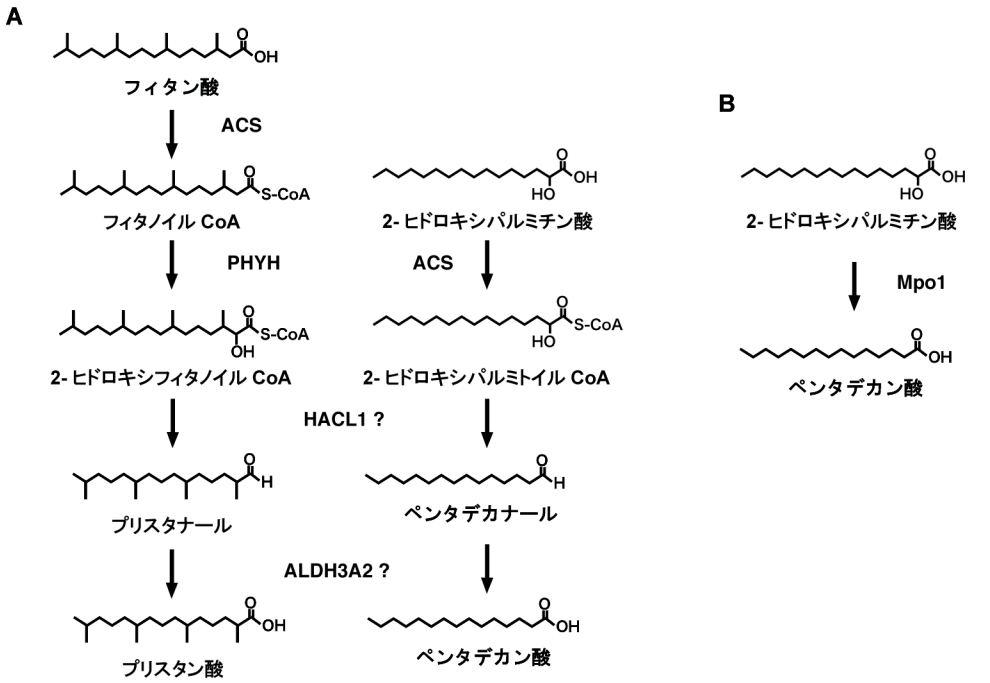


図 3 哺乳類及び酵母の α 酸化

（A-B）はそれぞれ哺乳類，酵母の α 酸化を示している。（A）食餌に由来するフィタン酸はアシル CoA 合成酵素（ACS）による CoA 付加ののちに，フィタノイル CoA 水酸化酵素（PHYH）によって 2 位が水酸化される。2 位に水酸基をもつアシル CoA（2-ヒドロキシフィタノイル CoA, 2-ヒドロキシパルミトイル CoA）は 2-ヒドロキシアシル CoA リアーゼ（HACL1）による開裂反応で炭素数が 1 減じた長鎖アルデヒド（プリスタナール，ペンタデカナール）になる。この反応は *in vitro* における活性測定の報告があるのみで、*in vivo* で実際に HACL1 が 2-ヒドロキシアシル CoA リアーゼとして働くかは不明である。生じた長鎖アルデヒドは ALDH3A2 によって酸化されると推測されるが, 未解明である。(B)酵母においては 2-ヒドロキシパルミチン酸は Mpo1 による 1 段階反応でペンタデカン酸へと代謝されるため, 哺乳類とは代謝経路が異なっている。

1-1-7. スフィンゴ脂質の応用

スフィンゴ脂質は医薬，化粧品，食品への応用が進められている。医薬品への応用として，S1P の免疫系での機能を利用した多発性硬化症治療薬フィンゴリモドが知られている(53, 54)。近年では，セラミドあるいはセラミド誘導体が皮膚の保湿効果をねらって化粧品へ配合されているほか，特定保健用食品，機能性表示食品といった健康食品の成分として添加されている。化粧品や食品には主にコメやコンニャクなどの植物に由来するグルコシルセラミドが利用されている。2015 年の機能性表示食品制度の発足から今後さらにスフィンゴ脂質の健康食品への利用が進むものと考えられる。しかし，これら植物由来のスフィンゴ脂質による生物活性については盛んに解析が行われているが，これらがどの程度腸管より吸収されるのか，取り込まれた

後にどのように代謝されるのかといった解析は十分になされていない。前述のように，植物や酵母のセラミドの構造はヒトと異なっているために，体内でどのように代謝されるのかという解析は栄養学的にも重要である。

1-2. α 酸化

脂肪酸の鎖長が 1 炭素分減少する代謝経路を α 酸化と呼び，哺乳類細胞ではペルオキシソームで行われるとされている（図 3A）(37，55，56)。一般的な脂肪酸分解経路である β 酸化は 3 位にメチル側鎖をもつ脂肪酸（フィタン酸など）及び 2 位に水酸基をもつ脂肪酸（2-ヒドロキシ脂肪酸）を代謝できない。そのため，このような脂肪酸の代謝では，まず α 酸化によって 3 位側鎖が 2 位へシフトするか，水酸基が除去される必要がある。クロロフィルの分解産物であるフィタン酸の代謝において，フィタン酸はまず CoA 付加を受けた後，フィタノイル CoA 2 位水酸化酵素 PHYH によって 2 位が水酸化され(57，58)，さらに 2-ヒドロキシフィタノイル CoA が 2-ヒドロキシアシル CoA リアーゼ HACL1 によって 1 炭素減じた長鎖アルデヒド（プリスタナール）へと代謝される（図 3A）(36)。2-ヒドロキシ脂肪酸も同様に CoA 付加を受けた後，HACL1 によって 1 炭素減じた直鎖の長鎖アルデヒドへと代謝される(36，59，60)。これらの長鎖アルデヒドは長鎖アルデヒド脱水素酵素によって酸化されて，奇数鎖脂肪酸となる。このように奇数鎖脂肪酸の一部は α 酸化を受けた 2-ヒドロキシ脂肪酸に由来しており，2-ヒドロキシ脂肪酸が多く存在する脳や皮膚においては奇数鎖脂肪酸を含む脂質が多い(61，62)。

α 酸化はこれまでペルオキシソームでのみ行われると考えられてきたが，酵母においてはペルオキシソームへのタンパク質輸送が損なわれた変異体でも 2-ヒドロキシパルミチン酸の α 酸化が遮断されないことを当研究室では見出している(63)。当研究室ではまた，酵母における 2-ヒドロキシパルミチン酸の α 酸化に関わる新規因子として，小胞体に局在する Mpo1 を同定した(63)。Mpo1 依存的な α 酸化は上記の経路とは異なり，CoA 付加を介さずに起きる（図 3B）。一方，哺乳類において酵母 Mpo1 のホモログは存在せず，酵母と同様にペルオキシソームを介さない α 酸化経路が存在するかは不明である。

PHYH の変異によるフィタン酸代謝不全は，魚鱗癬，網膜色素変性，末梢神経障害を呈する Refsum 病を引き起こすことから(55，64，65)，α 酸化が生体機能に重要であることがわかる。PHYH は N 末にペルオキシソーム移行シグナルである PTS2 をもつ(57)。このため，先天的にペルオキシソームへのタンパク質輸送機構に異常がある疾患（ペルオキシソーム病；*PEX1*，*PEX2*，*PEX7*，*PEX12*，*PEX26* 変異）においても同様の病態を示す(57，66，67)。HACL1 は C 末端にペルオキシソーム移行シグナル PTS1 をもつが(36，60)，*HACL1* の変異によって生じる疾患は現在知られていない。

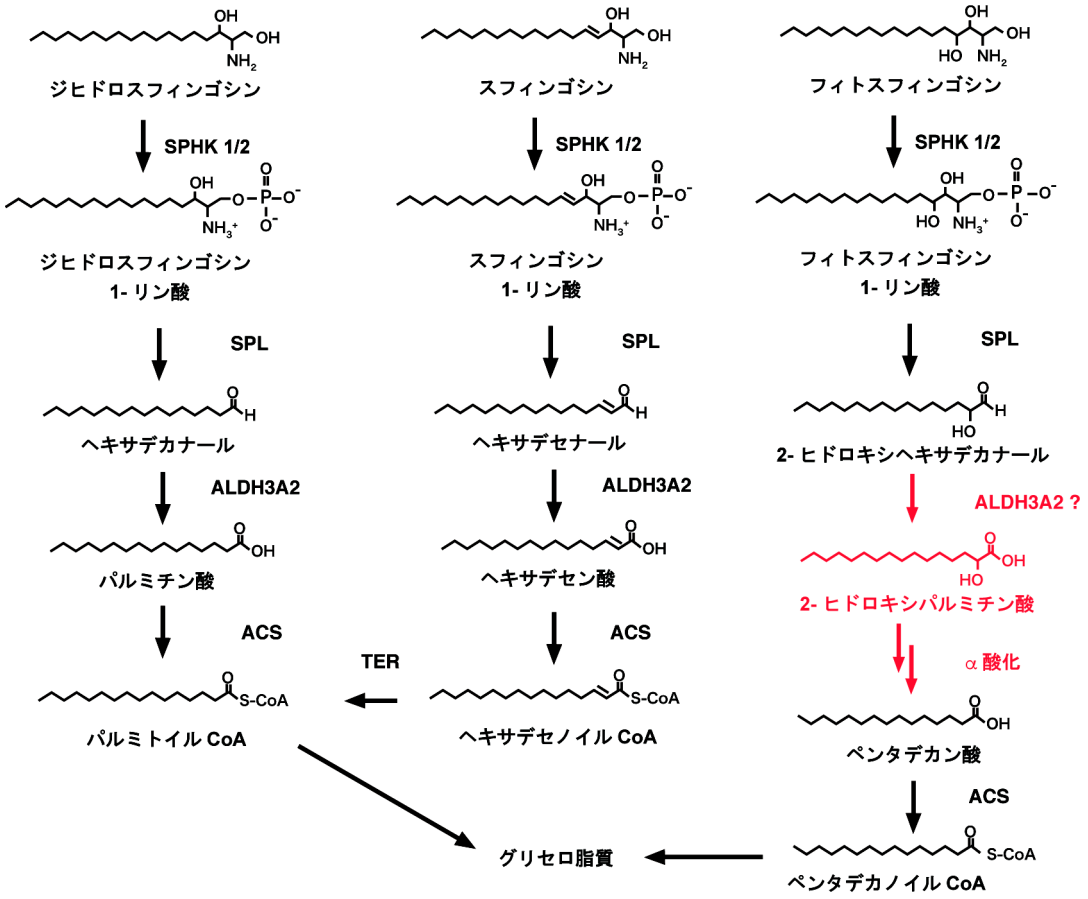


図 4 哺乳類長鎖塩基分解経路

長鎖塩基は脂肪酸へと分解されてグリセロ脂質などの脂質合成に再利用される。ジヒドロスフィンゴシン，スフィンゴシン，フィトスフィンゴシンはともにスフィンゴシンキナーゼ 1/2（SPHK1/2）によってリン酸化，S1P リアーゼ（SPL）によって開裂して長鎖アルデヒド（それぞれヘキサデカナール，ヘキサデセナール，2-ヒドロキシヘキサデカナール）を生じる。ヘキサデカナール，ヘキサデセナールは ALDH3A2 によってそれぞれパルミチン酸，ヘキサデセン酸に酸化され，続いてアシル CoA 合成酵素（ACS）によって CoA が付加される。ヘキサデセノイル CoA は TER によって二重結合が還元されて，パルミトイル CoA となり，2 つの経路が合流する。2-ヒドロキシヘキサデカナールの場合も ALDH3A2 によって酸化されて 2-ヒドロキシパルミチン酸となることが推測されるが，未解明である。また，中間体として生じると推測される 2-ヒドロキシパルミチン酸はα酸化を経て炭素数 15 の奇数鎖脂肪酸であるペンタデカン酸へと代謝されるが，このα酸化の詳細も不明である。ペンンタデカン酸は CoA 付加されて脂質合成に利用される。図中で赤く示した部分は未解明な代謝経路である。

1-3. 長鎖塩基分解経路

長鎖塩基は脂肪酸へと分解され，種々な脂質へと代謝される（図 4）(16，68)。この長鎖塩基

分解経路はスフィンゴ脂質をグリセロ脂質へと変換する唯一の代謝経路である。この分解経路では長鎖塩基はまずスフィンゴシン／長鎖塩基キナーゼ（哺乳類，SPHK1/2；酵母，Lcb4）によって長鎖塩基 1-リン酸となり(69，70)，長鎖塩基 1-リン酸リアーゼ（哺乳類，SPL；酵母，Dpl1）によってホスホエタノールアミンと炭素数 16 の長鎖アルデヒドへ分解される(71，72)。続いてこれらの長鎖アルデヒドは長鎖アルデヒド脱水素酵素（哺乳類, ALDH3A2；酵母, Hfd1）によって脂肪酸へと酸化される。哺乳類の主要な長鎖塩基である SPH の分解で生じるアルデヒドはヘキサデセナールである。ヘキサデセナールを含む α，β不飽和アルデヒドは一般的に飽和のアルデヒドよりも細胞毒性が高いため(73，74)，ヘキサデセナールの除去は長鎖塩基分解経路において重要である。ヘキサデセナールはヘキサデセン酸となった後，アシル CoA 合成酵素（ACS）によって CoA 付加を受け，トランスエノイル CoA レダクターゼ（TER）によってパルミトイル CoA に還元される(68，75)。これら一連の代謝は小胞体で行われる。PHS の分解で生じるアルデヒドは 2-ヒドロキシヘキサデカナールである(63)。2-ヒドロキシヘキサデカナールの代謝については未解明であるが，他の長鎖塩基の場合と同様に ALDH3A2 及び Hfd1 が 2-ヒドロキシパルミチン酸へと酸化するものと推測される。その後，2-ヒドロキシパルミチン酸は α 酸化を受け，炭素数 15 の奇数鎖脂肪酸であるペンタデカン酸へと代謝されるがその詳細は不明である(63)。

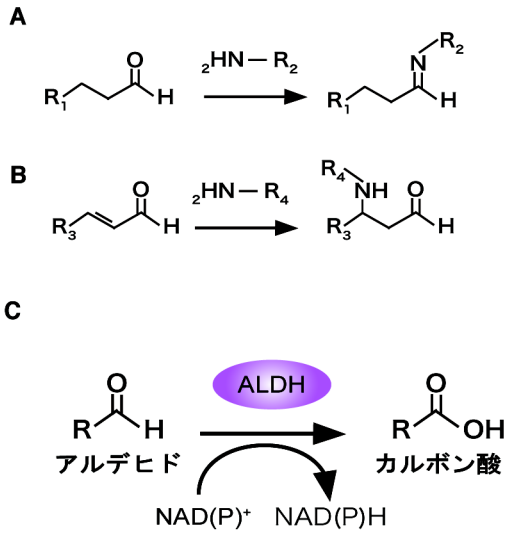
S1P リアーゼの KO マウスは多臓器不全により生後 1 ヶ月以内に死亡する(76)。また，*ALDH3A2* は後述する Sjögren-Larsson 症候群（SLS）の原因遺伝子であり，*TER* は遺伝性精神遅滞の原因遺伝子である(77，78)。これらのことから，長鎖塩基分解経路の重要性がうかがえる。

1-4. 長鎖アルデヒド脱水素酵素

1-4-1. アルデヒド脱水素酵素

アルデヒドは食物，薬物，環境汚染物質などを介して外界から体内に吸収されるだけでなく，脂質，アミノ酸，神経伝達物質などの生体分子の代謝によっても生じる。このため，生体内には多様なアルデヒドが存在している(79， 80)。アルデヒドは反応性が高い分子であるため，その蓄積はしばしば細胞毒性を示す（図 5A，B）(79)。アルデヒドの除去において重要な役割をもつのはアルデヒド脱水素酵素（ALDH）であり，アルデヒドをより反応性の低いカルボン酸へと変換する。ALDH は補因子として NAD^+（または $NADP^+$）を必要とし，それらの補因子は反応によって NADH（または NADPH）へ還元される（図 5C）(80)。ヒトゲノムには 19 種類の *ALDH* 遺伝子が存在しており(79)，いくつかの *ALDH* 遺伝子の変異は先天性疾患を引き起こす（図 5D）(81，82)。

長鎖アルデヒドとは炭素数 11-20 のアルデヒドを指し，主に脂質に由来する。また，長鎖ア



D

原因遺伝子	疾患名
ALDH1A3	小眼球症
ALDH3A2	シェーグレン･ラルソン症候群
ALDH4A1	2型高プロリン血症
ALDH5A1	γ–ヒドロキシ酪酸尿症
ALDH6A1	メチルマロン酸尿症
ALDH7A1	ピリドキシン依存性てんかん
ALDH18A1	皮膚弛緩症

図 5 アルデヒドの反応性と ALDH

（A） アルデヒドの 1 級アミンに対する Schiff 反応を示す。アルデヒドは反応性が高く生体内分子の求核的官能基と結合する。特にタンパク質中の Lys 側鎖などの 1 級アミンと非酵素的に反応して Schiff 塩基を形成する。（B） α, β不飽和アルデヒドによる Michael 付加。α, β不飽和アルデヒドのα, βに二重結合は 1 級アミンなどの求核的官能基と反応しうる。アルデヒド基の反応性も相まって重合能力が強いため，高い細胞毒性を示すと考えられている。（C） ALDH はアルデヒドをカルボン酸へ酸化する反応を触媒する。この際必要な補因子は $NAD(P)^+$であり，アルデヒド 1 分子の酸化に対し，$NAD(P)^+$1 分子が還元されて NADH(P)が生じる。（D）*ALDH* 遺伝子の変異によって生じる先天性疾患と原因遺伝子を示す。

ルデヒド酸化活性をもつ ALDH を長鎖アルデヒド脱水素酵素と呼び，ALDH3A2 がよく知られている(77，83)。α酸化では長鎖アルデヒドとしてプリスタナールやペンタデカナールが生成する（図 4，6）(56，59)。ω 酸化は炭素数 20 以上の脂肪酸の ω末端を 2 段階の酸化反応を経てカルボキシ化してジカルボン酸にする代謝経路である(84)。この代謝経路では ω 水酸化脂肪酸（1-1-4 参照）がアルコール酸化酵素によってω 水酸基が酸化されて ωオキソ脂肪酸が生成する。ω 酸化は極長鎖脂肪酸の分解や生理活性エイコサノイドの不活性化に重要であると考えられており，代謝中間体として生じる長鎖アルデヒドとしてロイコトリエン B_4 に由来するω-oxo-LTB_4 が知られている（図 6）(84)。長鎖塩基の分解経路（1-4 参照）では長鎖アルデヒドとしてヘキサデセナール，ヘキサデカナール，2-ヒドロキシヘキサデカナールが生成する（図 5，6）(63，68)。マウスやヒトの皮脂腺には長鎖アルコールと脂肪酸がエステル結合したワックスエステルが存在する(85)。ワックスエステルの構成成分である長鎖アルコールはアルコール酸化酵素によってヘキサデカナールなどの長鎖アルデヒドとなる（図 6）(85)。脳や白血球にはエーテルリン

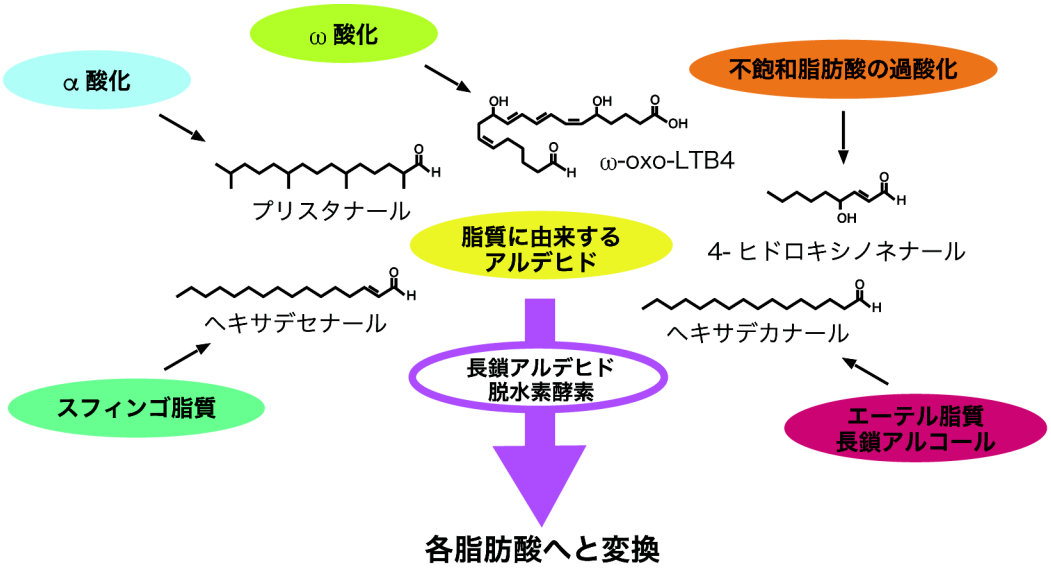


図 6 長鎖アルデヒド脱水素酵素は脂質に由来する様々なアルデヒドを酸化する

生体内で脂質由来のアルデヒドの構造を示す。図中にはフィタン酸がα酸化されて生じるプリスタナール，ロイコトリエン B_4 （ LTB_4 ） のω酸化に由来するω-oxo-LTB_4，スフィンゴシンの分解に由来するヘキサデセナール，長鎖アルコール及びエーテルリン脂質中の分解に由来するヘキサデカナール，不飽和脂肪酸の過酸化に由来する 4-ヒドロキシ 2-ノネナール （4-HNE）を示す。

脂質と呼ばれているグリセロール骨格の *sn*-1 位にエーテル結合をもつグリセロリン脂質のサブタイプが存在している。エーテルリン脂質中のエーテル結合を開裂する酵素，1-アルキルグリセロールモノオキシゲナーゼ及びリゾプラズマローゲナーゼによって *sn*-1 位アルキル鎖はヘキサデカナールなどの長鎖アルデヒドに変換される（図 6）(86-88)。また，不飽和脂肪酸は活性酸素種による非酵素的反応によって過酸化で様々なアルデヒドに変化する。活性酸素種による過酸化に由来するアルデヒドとしては4-ヒドロキシ 2-ノネナールが知られている(図6)(73, 89)。4-ヒドロキシ 2-ノネナールは炭素数 9 のアルデヒドであるが，長鎖アルデヒド脱水素酵素によって処理される(79)。4-ヒドロキシ 2-ノネナールはα，β不飽和カルボニル構造を持っており細胞毒性が強い考えられている。

1-4-2. ALDH3 サブファミリー

ALDH ファミリーにはアミノ酸配列の相同性の高さからいくつかのサブファミリーに分けられる。このうち，ALDH3 サブファミリーはマウスで 5 種類（Aldh3a1，Aldh3a2，Aldh3b1，Aldh3b2，Aldh3b3），ヒトで 4 種類（ALDH3A1，ALDH3A2，ALDH3B1，ALDH3B2）が存在する。ただし，ヒト *ALDH3B2* は偽遺伝子であり，転写はされるが，翻訳はされないか，も

しくは翻訳されたとしてもアルデヒド脱水素酵素活性を有していないと考えられている(90)。また，*Aldh3b3* はげっ歯類固有であり，ヒトには存在しない(80)。Aldh3a1 は角膜で高発現している可溶性タンパク質であり，紫外光暴露による酸化ストレス（脂質過酸化）で生じた毒性の高い4-ヒドロキシ2-ノネナールを除去することによって角膜及び水晶体を保護している(91, 92)。*Aldh3a1* KO マウスでは紫外光暴露によって野生型マウスに比べて白内障の発症頻度が上昇する(92-94)。また，芳香族アルデヒドに対する活性も高く，ユビキノンの生合成経路において，4-ヒドロキシベンズアルデヒドを 4-ヒドロキシ安息香酸に酸化する反応に関与することが示唆されている(95)。Aldh3a2 は広範な組織で発現しており，*in vitro* では炭素数 6 から 24 までの直鎖アルデヒドに対して幅広く活性を示す。特に，炭素数 16，18 の長鎖アルデヒドに対して最も高い活性を示す(96)。これらの長鎖アルデヒドに対する活性は Aldh3a2 以外には知られていない。Aldh3a2 は食事由来のプリスタナールなど分枝鎖アルデヒド，ロイコトリエン B_4，S1P など脂質代謝産物に由来するアルデヒドの除去にも働く（図 6）(97)。Aldh3a2 には 2 種類のスプライシングアイソフォームが知られており，主要なアイソフォームが小胞体膜，PTS1 をもつマイナーアイソフォームがペルオキシソーム膜に局在する(98) 。どちらも 1 回膜貫通タンパク質であるが，C 末端の局在シグナルが異なる。Aldh3a2 の酵母ホモログである Hfd1 は長鎖塩基分解経路においてヘキサデカナール，2-ヒドロキシヘキサデカナールの酸化と，ユビキノン生合成過程において 4-ヒドロキシベンズアルデヒドの酸化に関与している(95)。

Aldh3b1 は肺，精巣，白血球で高く発現している(99-101)。特に骨髄マクロファージで高く発現しており，all-*trans* レチナールからの all-*trans* レチノイン酸産生に寄与する(102)。Aldh3b1 の基質特異性は *in vitro* の活性測定によって炭素数 9 以下の基質について調べられており，特に炭素数 8 のオクタナールに対して高い活性をもつことが報告されている(99，100)。Aldh3b1 の細胞内局在は細胞質と細胞膜と示唆されているが，未だ明確ではない(100)。Aldh3b2 と Aldh3b3 は解析されておらず，機能も未知である。ヒト及びマウス Aldh3b ファミリーの C 末端配列はすべて CTLL であり，プレニル化モチーフ（1-5 にて後述）と一致するが，プレニル化修飾の有無については調べられていない。

1-4-3. Sjögren-Larsson 症候群

Sjögren-Larsson 症候群（SLS）は *ALDH3A2* を原因遺伝子とする常染色体劣性の先天性疾患であり，痙性対麻痺，精神遅滞，網膜変性，魚鱗癬を主症状とする(103，104)。これらの病態には ALDH3A2 活性の低下によって代謝されずに蓄積した長鎖アルデヒドの毒性発露が関わると考えられている。しかし，病態に関わる主要なアルデヒド分子種及び発症の分子メカニズムは不明である。また，有効な治療法は確立されていない。

SLS における魚鱗癬は，皮膚の潮紅や紅斑，皮疹を伴うことが多く，その病理所見から魚鱗

癬の中でも先天性魚鱗癬様紅皮症に分類されることが多い(77)。また，SLS ではアシルセラミドの減少などの脂質組成の変化が報告されている(97)。神経症状は幼少期に精神や運動機能の発達の遅れとしてあらわれる(77)。痙性対麻痺は下肢で強くあらわれ，歩行障害を伴うことが多い(103)。重傷例では上肢にもあらわれる。精神遅滞に関しては，多くの症例で IQ が 50 未満である。病理所見としては CT 解析によって脳白質の密度の低下，MRI 解析では大脳全体で無髄神経繊維が観察されている(103，105)。眼においては，患者の 8 割以上で異常が観察されており，ほとんどの症例で視力の低下がみられる(84，104)。また，強い光を受けた際に不快や痛みを生じる羞明という症状を伴うことも多い。羞明は他の網膜変性疾患でもしばしば見られる。また，*ALDH3A2* には加齢黄斑変性に関連する SNP がみつかっている(106)。病理所見では，眼底検査において閃輝性沈着物が観察される(107)。このような眼における臨床及び病理所見は *CYP4V2* の変異により発症する Bietti crystallin ジストロフィーと類似する(108)。

1-4-4. *Aldh3a2* KO マウス

当研究室の永沼，金武によって *Aldh3a2* KO マウスの解析が行われた。*Aldh3a2* KO マウスではヒトでみられるような顕著な病態は観察されなかったが，いくつかの弱い表現型が見出された(109)。*Aldh3a2* KO マウスは麻痺様の症状を示さなかったが，後肢の運動機能低下や作業記憶低下などを示した。また，光に対する不安行動を示した。このような光に対する反応は SLS 患者においてもみられる羞明に相当すると考えられた(77)。脳脊髄，眼組織の形態的な変化は確認されなかった。皮膚においても魚鱗癬様症状は観察されなかったが，表皮基底層における細胞間隙の拡大，角質層除去後の皮膚バリア回復の遅延，ケラチノサイトにおける酸化ストレスと細胞増殖の亢進が見られた。このようなヒトとマウスにおける症状／表現型の程度の違いの一因として，Aldh3a2 以外の長鎖アルデヒド脱水素酵素の寄与が考えられた。実際，小腸や肺など一部組織では長鎖アルデヒド脱水素酵素活性が残存しており，皮膚に至ってはほとんど活性が低下していなかった(109)。しかし，Aldh3a2 以外の長鎖アルデヒド脱水素酵素の存在についてはこれまで報告されていない。

1-5. プレニル化及びパルミトイル化

プレニル化はタンパク質の C 末端付近のシステイン残基にプレニル基がチオエーテル結合した翻訳後修飾であり，プレニル基の鎖長の違いから 2 種類に分別される(110，111)。炭素数 20 のゲラニルゲラニル化はゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ I または II によって触媒され，炭素数 15 のファルネシル化はファルネシルトランスフェラーゼによって触媒される。ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ I 及びファルネシルトランスフェラーゼはタンパク質 C 末端の CaaX（C=システイン ： 以下 Cys，a=非極性アミノ酸，X=任意のアミノ酸）モチーフを認識し，

X がロイシン，イソロイシン，フェニルアラニンの場合はゲラニルゲラニル化，それ以外のアミノ酸の場合にはファルネシル化される。ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ II は末端が -CaC, -CC などのときに二カ所をゲラニルゲラニル化する。プレニル化されたタンパク質の aaX 部分は小胞体膜上で CaaX プレニルプロテアーゼ Rce1 または Zmpste24 によって切断される(112, 113)。その後，露出した Cys のカルボキシ基がイソプレニルシステインメチル基転移酵素 Icmt によってメチル化される(114)。多くのタンパク質ではプレニル化 Cys 残基近傍の別の Cys 残基がパルミトイル化される(115，116)。プレニル化及びその後の一連の翻訳後修飾は修飾タンパク質を強固に膜へ結合させる役割があると考えられている。プレニル化タンパク質として, Ras, Rho，Rab といった低分子 GTPase や三量体 G タンパク質α，γサブユニット，ラミンなどが知られている(117)。

パルミトイル化はタンパク質中の Cys 残基にパルミトイル基がチオエステル結合した翻訳後修飾であり，プロテインアシルトランスフェラーゼによって触媒される(115)。パルミトイル化にははっきりとしたコンセンサス配列が存在しないが，他の脂質修飾サイトの近傍や膜貫通領域直下で起こることが多い。パルミトイル化されたタンパク質は疎水性が上昇し，細胞内局在，構造，活性，安定性などが変化する。

1-6. 脂肪滴

脂肪滴はエネルギー供給のためのトリグリセリドを貯蔵する細胞内小器官である。脂肪滴は主に PC で構成される単層の膜で覆われており，内部はトリグリセリド，コレステロールエステルなどの中性脂肪によって構成されている(118)。脂肪滴はどのような細胞種にも存在するが，脂肪組織では非常に発達している。脂肪滴に関して生成過程や，局在タンパク質がどのようなメカニズムで脂肪滴に輸送されているのかなど，不明な点が多い。脂肪滴は脂質の貯蔵場所であるため，不飽和脂肪酸も多く含まれていると考えられる。不飽和脂肪酸は活性酸素種によって過酸化された後，アルデヒドへと変換し得る。そのため，脂肪滴にもアルデヒドのストレスを対処するためにアルデヒド脱水素酵素が存在すると考えられるが，これまで知られていない。

2. フィトスフィンゴシン分解経路と新規α酸化経路の解明

2-1. 研究背景・目的

スフィンゴ脂質は真核細胞の膜を構成する上で重要な脂質分子群であるほか，皮膚バリア，免疫系での機能，神経のミエリン形成／維持，精子形成，血管安定化などの多彩な機能を有する(119)。スフィンゴ脂質は極性基のみならず，骨格部分の長鎖塩基，脂肪酸の鎖長，水酸基，不飽和度の違いによる多様性に富み(16)，このような構造多様性がスフィンゴ脂質に様々な機能を付与していると考えられる。

ヒトのスフィンゴ脂質に含まれる長鎖塩基には少なくとも 4 種類（DHS，SPH，PHS，6-ヒドロキシスフィンゴシン）がある。長鎖塩基は細胞内で生合成されるだけでなく，細胞外からも取り込まれる(20)。長鎖塩基はセラミド合成に再利用されるか，分解によってアシル CoA へと代謝される。

当研究室の先行研究によって DHS，SPH については分解経路の全容が明らかとなっている。いずれの長鎖塩基もスフィンゴシンキナーゼによって長鎖塩基 1-リン酸となり，S1P リアーゼによって 2, 3 位間の C-C 結合が開裂し，長鎖アルデヒドへと変換される。長鎖アルデヒドはさらに長鎖アルデヒド脱水素酵素 ALDH3A2 によって脂肪酸へと酸化される(68)。この長鎖塩基分解経路はスフィンゴ脂質の恒常性を維持するために重要であり，その破綻は種々の生体機能異常，疾患を引き起こす。PHS も DHS／SPH と同様にリン酸化後，開裂される。生じた 2-ヒドロキシヘキサデカナールは ALDH3A2 によって酸化されて 2-ヒドロキシパルミチン酸が生じると推測された。当研究室では最近，PHS が酵母だけでなく，哺乳類においてもα酸化を介して炭層数 15 の奇数鎖脂肪酸（ペンタデカン酸）へと代謝され，グリセロ脂質に取り込まれることを明らかにした(63，120)。しかし，哺乳類α酸化の詳細な経路，酵素は不明なまま残されていた。哺乳類α酸化にはペルオキシソームに局在する 2-ヒドロキシアシル CoA リアーゼ HACL1 が関与すると考えられていた(59)が，*Pex5* KO（ペルオキシソーム不全）細胞でもα酸化が遮断されない(60)など，HACL1 及びペルオキシソームを介さないα酸化経路の存在が示唆されていた。

PHS はヒトでは消化器や皮膚といった限られた組織にしか存在しないが，出芽酵母では主要な長鎖塩基である(26)。また，植物にも PHS 誘導体を構成成分としたスフィンゴ脂質が多く存在する（図 1C）(30)。これらは近年，セラミド含有化粧品，健康食品としての利用が増えているが，生体内での代謝はほとんど不明である。また，これらは食物としても摂取されるため，ヒト体内での代謝は栄養学的な観点からも重要である。

本研究では未解明な部分が多かった PHS の分解経路の全容解明を試みた。また，PHS の分解で生じる 2-ヒドロキシパルミチン酸の 2 位水酸基除去に関わる新規α酸化酵素についても探索を行い，哺乳類α酸化経路の解明を目指した。

2-2. 結果

2-2-1. ALDH3A2 は 2-ヒドロキシヘキサデカナールを酸化する

PHS の分解において他の長鎖塩基の場合と同様に ALDH3A2 が関与するかを調べた。CHO-K1 細胞（野生型）を[^{3}H]DHS でラベルすると，スフィンゴ脂質（グルコシルセラミド，スフィンゴミエリン）及びグリセロ脂質（PC，PE，PS，PI）へと代謝された（図 7A）。一方，*Aldh3a2* 欠損細胞である FAA-K1A 細胞中では，[^{3}H]DHS からスフィンゴ脂質への代謝は正常であったが，グリセロ脂質（PC，PE，PS，PI）への代謝は抑制されていた。アルカリ処理によってグリセロ脂質のエステル結合を加水分解し，脂肪酸を遊離させると，FAA-K1A 細胞では脂肪酸への変換量が野生型に比べて減少していた。一方で，FAA-K1A 細胞では野生型では検出されなかったエーテルリン脂質（PlsE，PlsC）への代謝が観察された。エーテルリン脂質は *sn*-1 位にエーテル結合をもっており，アルカリ耐性である。そのため，アルカリ処理では *sn*-2 位のエステル結合のみが加水分解されてリゾ体（Alk-GPE，Alk-GPC）が検出される。このような *Aldh3a2* の欠損による DHS の代謝変化は当研究室での過去の報告と一致している(68)。

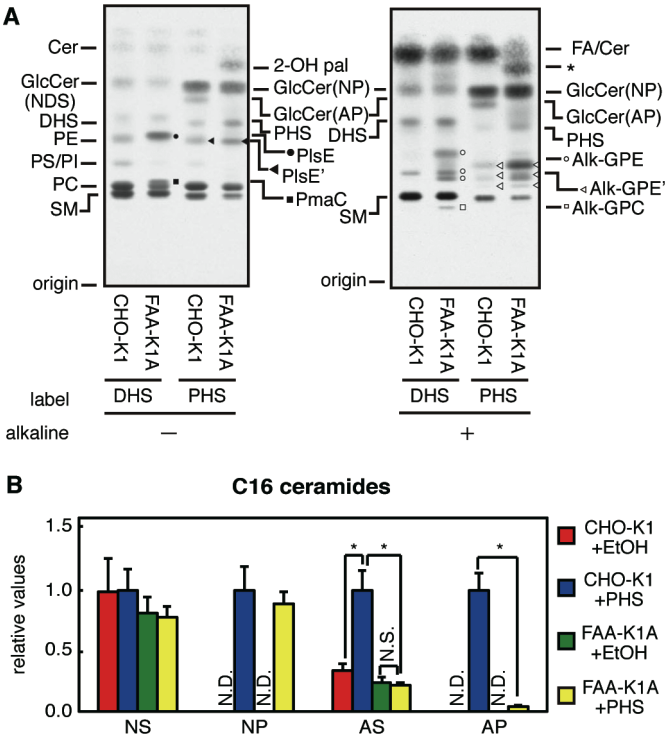
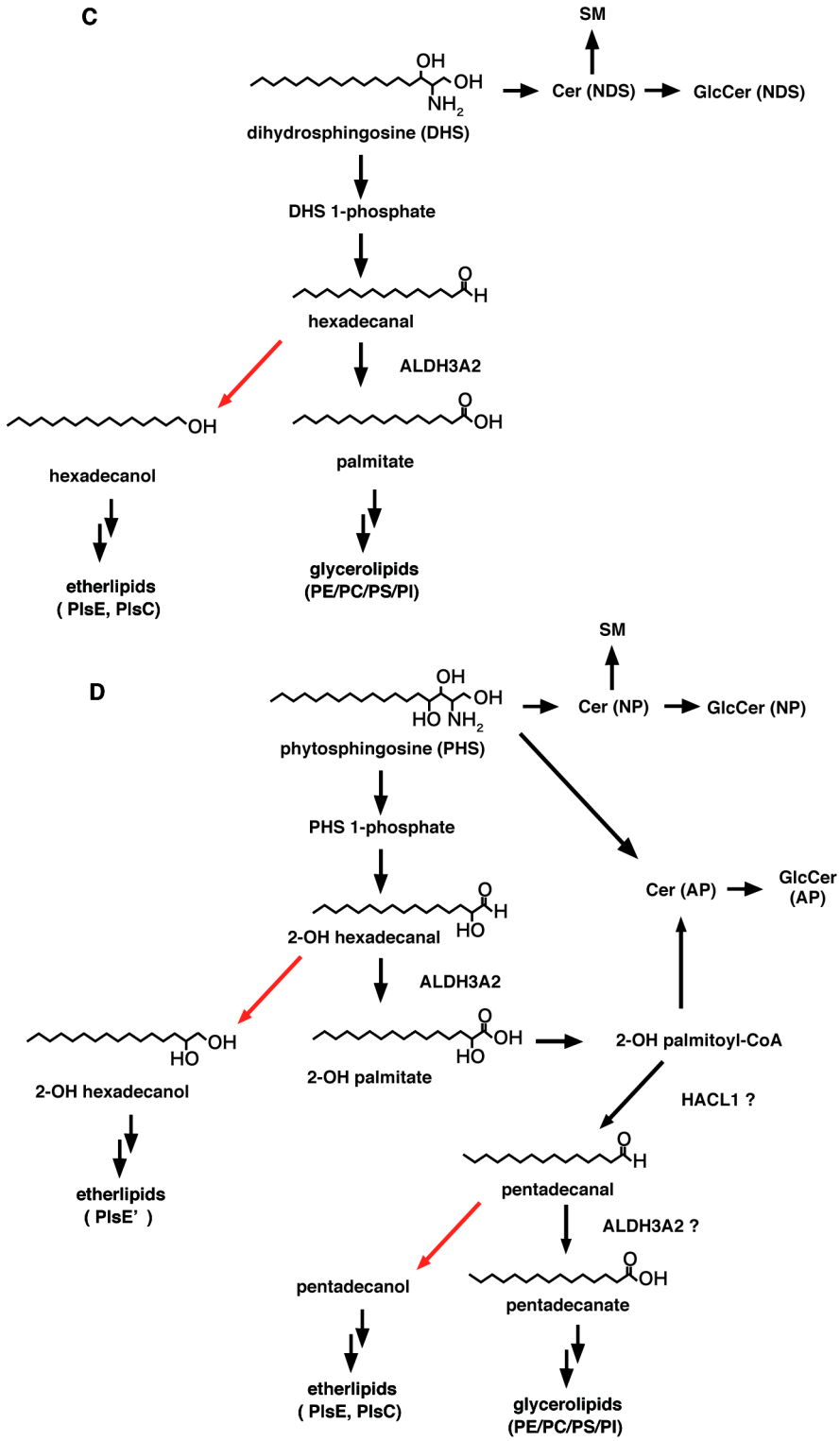


図 7 ALDH3A2 は 2-ヒドロキシヘキサデカナールを酸化する

（A）CHO-K1 細胞および Aldh3a2 欠損した FAA-K1A 細胞に 0.2 μCi [^{3}H]DHS もしくは[^{3}H]PHS を 4 時間 37℃で標識した。脂質を抽出後, アルカリ処理もしくは未処理を行い, 順層 HPTLC（1-ブタノール/酢酸/水，3/1/1，v/v）で展開し，オートラジオグラフィーで検出した。（B） CHO-K1 細胞および FAA-K1A 細胞に 0.8 μM　PHS 存在下（PHS），または非存在下（EtOH）で 37℃, 24 時間培養後，脂質を抽出した。そして脂質中のセラミド量を LC-MS/MS で測定した。脂質量



はタンパク質量で補正し，データは CHO-K1+PHS のサンプルの平均値（n=3）を 1 としたときの相対値の平均±SD で示した。優位差は Tukey 検定＊p<0.05 で示した。（C-D）はそれぞれ CHO-K1 細胞における DHS または PHS の代謝経路（一部は予測される経路）を示す。赤矢印は *Aldh3a2* の欠損によって生じる代償的な代謝経路を示す。Cer，セラミド；GlcCer，グルコシルセラミド; DHS，ジヒドロスフィンゴシン；PE，ホスファチジルエタノールアミン；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；PC，ホスファチジルコリン；SM，スフィンゴミエリン；PHS，フィトスフィンゴシン；PlsE，プラズメニルエタノールアミン；PlsE'，2-ヒドロキシプラズマニルエタノールアミン；PlsC，プラズマニルコリン；FA，脂肪酸；Alk-GPE，アルケニルグリセロホスホエタノールアミン；Alk-GPE'，2-ヒドロキシアルカニルグリセロホスホエタノールアミン；Alk-GPC，アルカニルグリセロホスホコリン；2-OH pal，2-ヒドロキシパルミチン酸。

[^{3}H]PHS を取り込ませた場合においても FAA-K1A 細胞では，DHS と同様に，グリセロ脂質への代謝が抑制され，代わりにエーテルリン脂質（PlsE'）へと代謝されていた。PlsE'と PlsE の移動度が異なるのは，PlsE'では *sn*-1 位のアシル基に 2 位水酸基を含むためであると考えられる（図 7C，D）。アルカリ処理を行ったところ，FAA-K1A 細胞では加水分解で生じた脂肪酸量が CHO-K1 細胞と比べて顕著に減少していた。また，CHO-K1 細胞ではグルコシル α ヒドロキシフィトセラミド（AP 型）が検出された。これは PHS 代謝で生じた 2-ヒドロキシパルミチン酸の一部がセラミドのアシル鎖として取り込まれて α ヒドロキシフィトセラミド（AP 型）となった後，グルコシル化を受けて生じたと考えられる。一方，グルコシル α ヒドロキシフィトセラミドは FAA-K1A 細胞では検出されなかった。この結果は ALDH3A2 が PHS から 2-ヒドロキシパルミチン酸への代謝に関わっていることを示している（図 7D）。また，LC-MS/MS（liquid chromatography-tandem mass spectrometry）を用いた解析においても，CHO-K1 型では PHS 添加時に NP 型セラミドの増加と共に，炭素数 16 の A 型セラミド（AS，AP）が増加していた（図 7B）。一方，FAA-K1A 細胞では A 型セラミドの増加はみられなかった。これらの結果は，他の長鎖塩基の場合と同様に ALDH3A2 が PHS 分解経路においても長鎖アルデヒド（2-ヒドロキシヘキサデカナール）を脂肪酸（2-ヒドロキシパルミチン酸）に酸化していることを示している。また，本実験から PHS は長鎖塩基としてセラミドに取り込まれるだけでなく，分解経路で生じた 2-ヒドロキシパルミチン酸の一部がセラミドのアシル鎖として取り込まれることが明らかとなった。

2-2-2. 2-ヒドロキシパルミチン酸の α 酸化に関わる新規因子 HACL2 の同定

次に 2-ヒドロキシパルミチン酸からペンタデカン酸への代謝に関与する遺伝子の同定を試みた。当研究室では酵母において 2-ヒドロキシパルミチン酸からペンタデカン酸への代謝に関与する遺伝子として *MPO1* を同定した(63)。しかし，哺乳類には Mpo1 のホモログは存在しない。そこで，その代わりと働く遺伝子として 2-ヒドロキシアシル CoA リアーゼ HACL1 と ILVBL（本研究では機能を考慮して HACL2 と改名）に着目した。HACL1 は既に *in vitro* で 2-ヒドロキシアシル CoA リアーゼ活性が確認されており(36，59)，HACL2 は機能未知ではあったが，

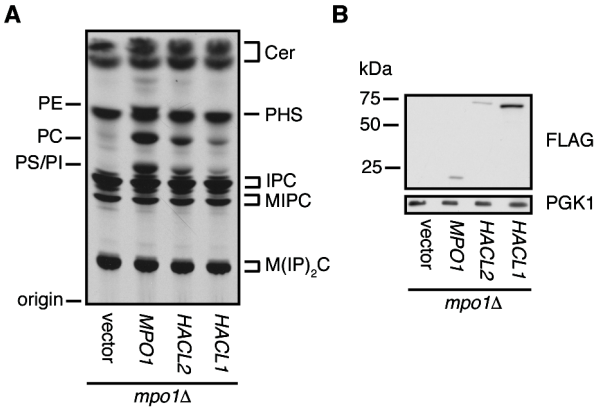


図 8 新規 α 酸化因子として HACL2 を見出した

（A）酵母 *mpo1*Δ 株に pAKNF316（vector），pAKNF316-MPO1，pAKNF316-HACL2 および pAKNF316-HACL1 をトランスフォームし，0.1 μCi [^{3}H]PHS で 30℃，3 時間標識した。脂質を抽出した後，順層 HPTLC（クロロホルム/メタノール/ 4.2 N アンモニア，9/7/2，v/v）で展開し，オートラジオグラフィーで検出した。Cer，セラミド；PE，ホスファチジルエタノールアミン；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；PC，ホスファチジルコリン；PHS，フィトスフィンゴシン；IPC，イノシトールホスホリルセラミド；MIPC，マンノシルイノシトールホスホリルセラミド；$M(IP)_2C$，マンノシルジホスホリルイノシトールセラミド。（B）は（A）の実験で用いた株の細胞抽出液より抗 FLAG 抗体またはローディングコントロール用に抗 Pgk1 抗体を用いてイムノブロッティングを行った。

HACL1 とのアミノ酸配列上の相同性から同様の活性をもつ可能性があったために着目した。これらの PHS 代謝への関与を調べるために，酵母 *MPO1* 欠損株（*mpo1*Δ）を用いた。*mpo1*Δ 株は PHS をペンタデカン酸及びその代謝産物であるグリセロ脂質（PC，PE，PS，PI）へと代謝できない。*mpo1*Δ 株に N 末端に 3xFLAG タグを付加した HACL1（3xFLAG-HACL1）または HACL2（3xFLAG-HACL2）を発現させたところ，PHS からグリセロ脂質（PC，PS，PI）への代謝が回復した（図 8A）。酵母における HACL2 の異所性の発現量は HACL1 のものに比べて低かったが（図 8B），HACL2 による代謝回復は HACL1 よりも大きかった。このことは HACL2 の方が HACL1 よりも PHS 代謝における寄与が大きいことを示唆していた。

次に哺乳類細胞を用いて，HACL2 が 2-ヒドロキシパルミチン酸の α 酸化に関与するかを解析した。この目的のため，CHO-K1 細胞を基にして *Hacl1* 欠損細胞（*Hacl1* KO），*Hacl2* 欠損細胞（*Hacl2* KO）及び *Hacl1/2* 二重欠損細胞（*Hacl1/2* DKO；double KO）を CRISPR/CAS9 法を用いて作製した（図 9）。これらの遺伝子欠損細胞はすべて CHO-K1 細胞の 2 つの対立遺伝子双方にフレームシフト変異を有しており，変異導入領域はすべて酵素活性に重要と考えられる領域よりも N 末端側に存在する。これらの細胞を[^{3}H]PHS でラベルすると，コントロールに

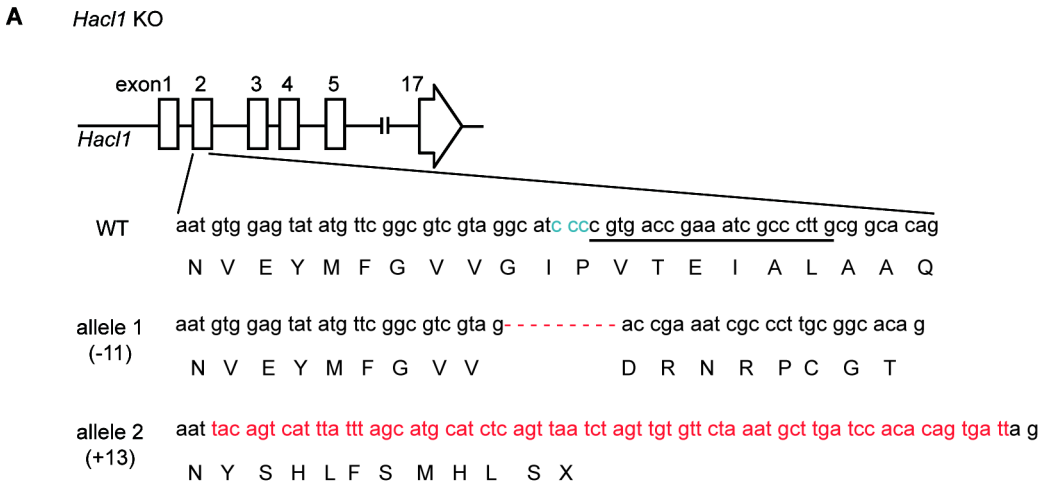


図 9 *Hacl1* 及び *Hacl2* の遺伝子欠損の設計と変異体のジェノタイプ

（A-C）青字は PAM 配列，下線はガイド RNA の標的配列を示す。赤字は変異が挿入または

置換，欠損された配列を示す。また，CHO-K1 細胞の *Hacl1* および *Hacl2* の対立遺伝子はどちらも 2 個である。（A）は *Hacl1* KO，（B）は *Hacl2* KO，（C）は *Hacl1/2* DKO の設計及びジェノタイプである。

比べて *Hacl2* KO 細胞及び *Hacl1/2* DKO 細胞において AP 型グルコシルセラミドの増加が観察された（図 10B）。また，*Hacl1/2* DKO 細胞では PC へ変換された量が著しく減少していた。これらの代謝変化は PHS 特異的であり，DHS 代謝ではこれらの細胞間で差は見られなかった（図 10A）。AP 型グルコシルセラミドはラベルに用いた PHS と PHS の分解によって生成した 2-ヒドロキシパルミチン酸が結合して AP 型セラミドとなり，さらにグルコースが付加されて AP 型グルコシルセラミドとなったと考えられる（図 7D）。オフターゲット効果の可能性を排除するため，*Hacl1/2* DKO 細胞にヒトの *HACL1* もしくは *HACL2* の入れ戻し実験を行った（図 10D）。*HACL1* または *HACL2* を入れ戻した場合では，[^{3}H]PHS ラベル実験における PC 変換量の減少がキャンセルされた（図 10C）。これらの結果から，HACL1 及び HACL2 の機能は重複的ではあるが, CHO-K1 細胞における PHS 分解経路においては HACL2 の寄与の方が大きいことを示唆している。

定量的 PCR を行った結果, CHO-K1 細胞において *Hacl1* の mRNA 発現量は *Hacl2* に比べて 10 倍程度高いことが明らかとなった（図 10E）。この結果から，*Hacl2* の mRNA 発現量は *Hacl1* と比べて低いにも関わらず，*Hacl2* は PHS 分解経路における寄与が大きいことが明らかになった。これらの細胞に 2-ヒドロキシパルミチン酸を取り込ませ，奇数鎖 PC への変換量を LC-MS/MS によって解析した。その結果，2-ヒドロキシパルミチン酸の添加はコントロール細胞，*Hacl1* KO 細胞，*Hacl2* KO 細胞中での奇数鎖 PC の増加を引き起こしたが，DKO 細胞ではそのような増加はほぼ観察されなかった（図 11A，C）。一方，これらの細胞間で偶数鎖 PC 量に変化はなかった（図 11B，D）。

2-2-3. HACL2 は 2-ヒドロキシアシル CoA リアーゼである

HACL2 の基質，生成物を明らかにするため，3xFLAG-HACL1 及び HACL2-3xFLAG をアフィニティー精製して *in vitro* での活性測定を行った。HACL1 は基質としてアシル CoA 体を用いることが知られている(36)。HACL2 に関しても基質がアシル CoA なのか，あるいは脂肪酸であるのかを明らかにするために，精製した HACL2 に 2-ヒドロキシステアリン酸（C18 FA）あるいは 2-ヒドロキシステアロイル CoA（C18-CoA）を加え，酵素反応を行った。その結果，HACL2 は HACL 1 と同様に C18-CoA に対して活性を示し，生成物として長鎖アルデヒドが検出された（図 12A）。HACL1 は補酵素としてチアミン 2-リン酸（TPP）を利用する(36)。HACL2 も HACL1 と同様に TPP 存在下でのみ活性を示した（図 12B）。以上のことから，HACL2 は

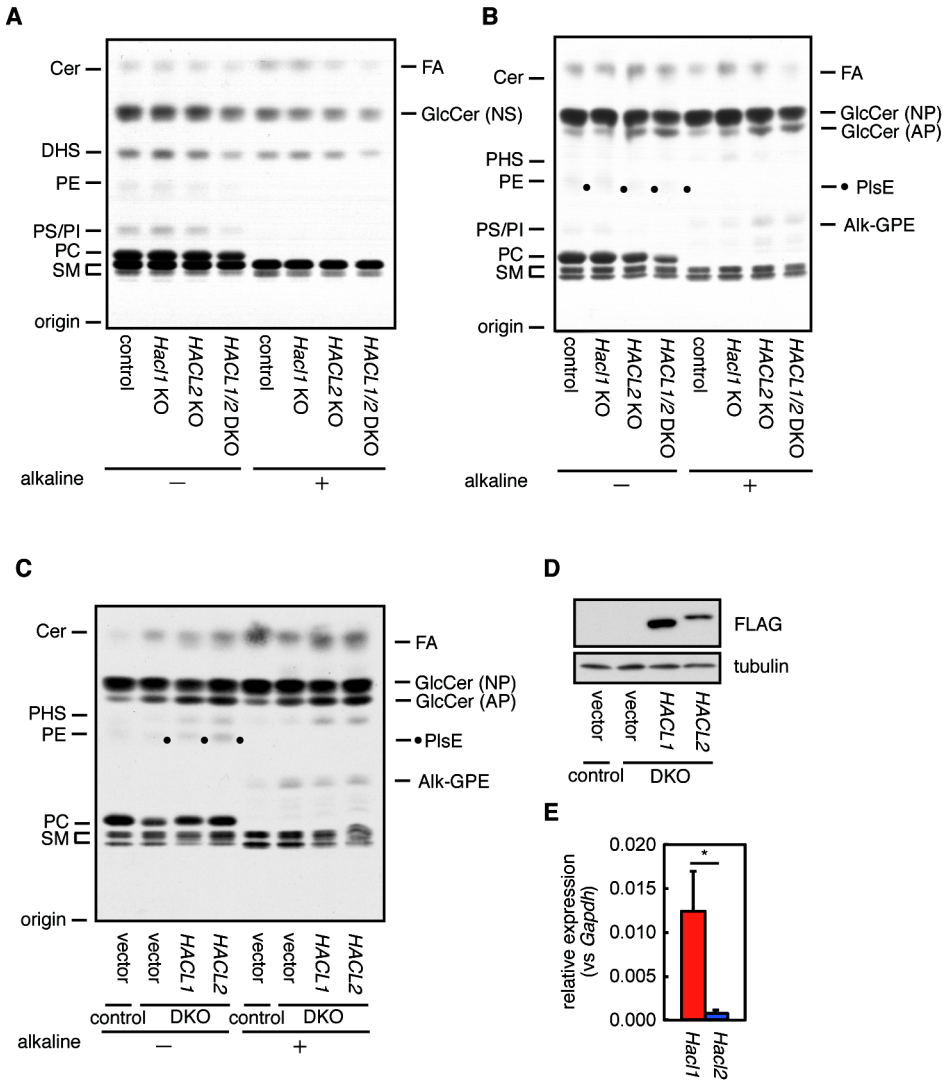


図 10 HACL2 は PHS 代謝に関与する

（A-C） *Hacl1*, *Hacl2* およびそれらの二重欠損 CHO-K1 細胞（それぞれ *Hacl1* KO, *Hacl2* KO, *Hacl1/2* DKO）を 0.2 μCi （A）[^{3}H]DHS または（B）[^{3}H]PHS で 37℃, 4 時間標識した。（C） *Hacl1/2* 二重欠損細胞に pCE-puro 3xFLAG（vector）, pCE-puro 3xFLAG-HACL1 または pCE-puro HACL2-3xFLAG を導入し, 0.2 μCi [^{3}H]PHS で 37℃, 4 時間標識した。（A-C） 脂質を抽出後, アルカリ処理もしくは未処理を行い, 順層 HPTLC （1-ブタノール/酢酸/水, 3/1/1, v/v）で展開し, オートラジオグラフィーで検出した。Cer, セラミド；GlcCer, グルコシルセラミド; DHS, ジヒドロスフィンゴシン；PE, ホスファチジルエタノールアミン；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；PC, ホスファチジルコリン；SM, スフィンゴミエリン；PHS, フィトスフィンゴシン, PlsE, 2-ヒドロキシプラズマニルエタノールアミン； FA, 脂肪酸；Alk-GPE,アルカニルグリセロホスホエタノールアミン。（D） は（C）の実験で用いた細胞の抽出液より抗 FLAG 抗体またはローディングコントロール用に抗 tubulin 抗

体を用いてイムノブロッティングを行った。(E) CHO-K1 細胞の cDNA を用いて定量的 PCR を行い，Hacl1 および Hacl2 の発現量を測定した。データは平均値（n=3） ±SD で示した。優位差は t 検定＊p<0.05 で示した。

TPP 依存的に 2-ヒドロキシアシル CoA（n）を長鎖アルデヒド（n-1）へと代謝する 2-ヒドロキシパルミトイル CoA リアーゼであることが明らかとなった。

2-2-4. HACL2 は小胞体に局在する

HACL2 の細胞内局在について間接蛍光抗体法による解析を行った。HACL1 はペルオキシソームに局在することが報告されている(59)。その報告と一致して，3xFLAG-HACL1 はペルオキシソームに特徴的な点状の分布を示した（図 13A)。一方，HACL2-3xFLAG は細胞中に広がった網目様局在を示し，小胞体マーカーであるカルネキシンと染色像が重なった。これらのことから HACL2 が小胞体局在であることが明らかとなった。HACL2（ILVBL）はもともとアセト乳酸合成酵素（大腸菌; ilvB，植物や酵母; ILV2）との相同性より命名され，ILV2 はミトコンドリア局在である。しかし，HACL2 はミトコンドリアマーカーである Grp75 とは共局在しなかった。

超遠心機による膜分画を行ったところ，HACL1 が可溶性画分に検出されたのに対して，HACL2 は膜画分に検出された（図 13B)。HACL1 は配列上膜貫通領域を持たないのに対し，HACL2 は N 末端付近に 1 回の膜貫通領域をもつと予測された。そこで，HACL2 の膜トポロジーを決定するために C 末端に EGFP タグを付加した HACL2 を発現した細胞から回収した膜画分に対して proteinase K 処理を行った。HACL2-EGFP は処理によって分解をうけ，EGFP 由来の分解産物（cleaved EGFP）を生じさせた（図 13C)。proteinase K 処理による膜トポロジー解析のコントロールとして膜トポロジーが既知のカルネキシンを用いた。カルネキシンは N 末端の大きな親水性領域が小胞体内腔に存在する I 型膜タンパク質であり，分子量約 90 kDa である（図 13C)。このため， proteinase K 処理をするとカルネキシンのサイトゾルに露出した C 末端領域のみ分解されて 60 kDa 程度の内腔領域が検出された（図 13C)。この結果は proteinase K が膜内腔に存在するカルネキシン N 末端領域にアクセスできないために生じる。さらに Triton X-100 で可溶化ののちに proteinase K 処理を行うと内腔領域もさらに分解をうけて 60 kDa の分解産物は消失した。この結果は可溶化によって膜のトポロジーが消失し，単層のミセルとなるために，proteinase K が本来膜内に存在するカルネキシン N 末端領域にアクセスできるために生じる。この結果より，HACL2 は触媒領域を含む大きな C 末端親水性領域がサイトゾルに配向した I 型膜タンパク質であることが示唆された。

HACL1 及び *HACL2* の組織発現分布を，ヒト cDNA を用いた定量的 PCR で評価した。その

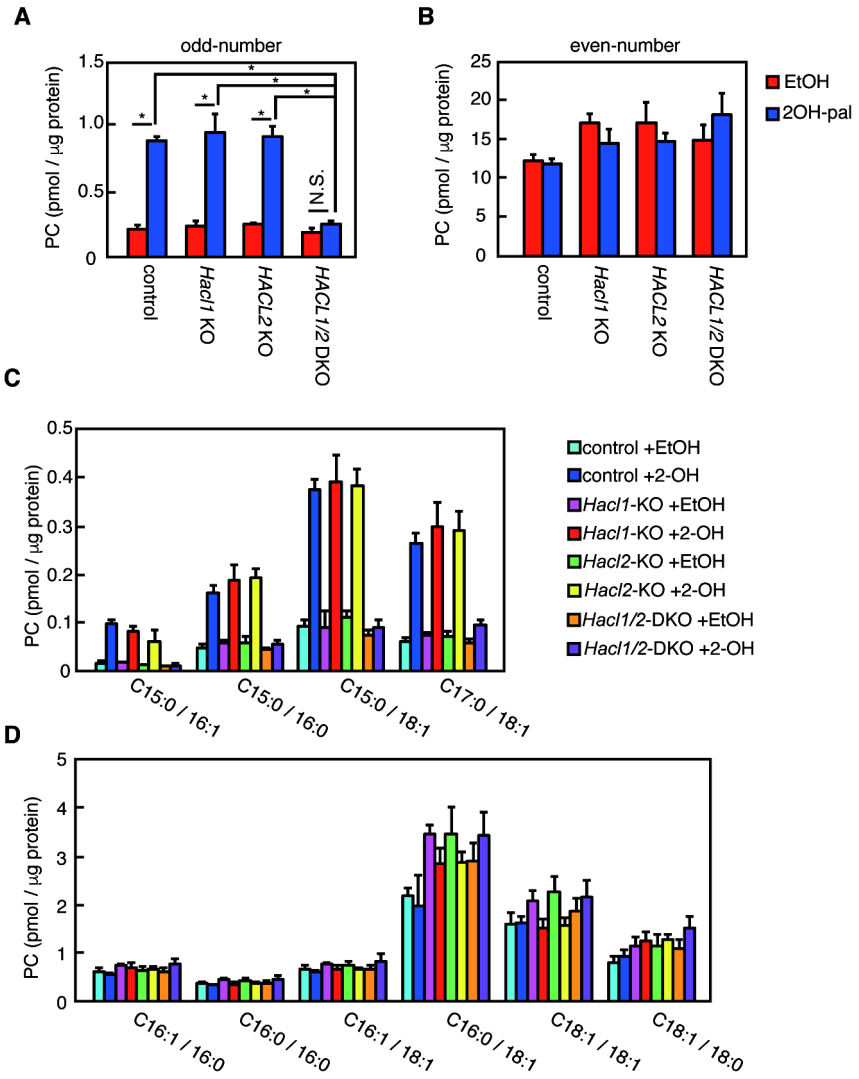


図 11 HACL2 は哺乳類 α 酸化に関与する

（A-D）*Hacl1* KO 細胞，*Hacl2* KO 細胞及び *Hacl1/2* 二重 KO（DKO）細胞を 5 μM 2-ヒドロキシパルミチン酸（2-OH pal）存在下もしくは非存在下（EtOH）で 37℃，24 時間培養した。脂質を抽出し，LC-MS/MS を用いて PC 分子種について解析した。総奇数鎖 PC 量を（A）に，総偶数鎖 PC 量を（B），奇数鎖 PC の各分子種を（C），偶数鎖 PC の各分子種を（D）で示した。脂質量はタンパク質量で補正し，データは平均値（n=3）±SD で示した。優位差は Tukey 検定 ＊p<0.05 で示した。

結果，骨格筋及び心臓を除く広範な組織において *HACL1* 及び *HACL2* は発現していた（図 14）。これらの組織のうち，膵臓，大腸，腎臓，心臓，脾臓，胸腺，卵巣，前立腺，分化したケラチノサイトにおいて *Hacl2* の方が *Hacl1* よりも高く発現していた。

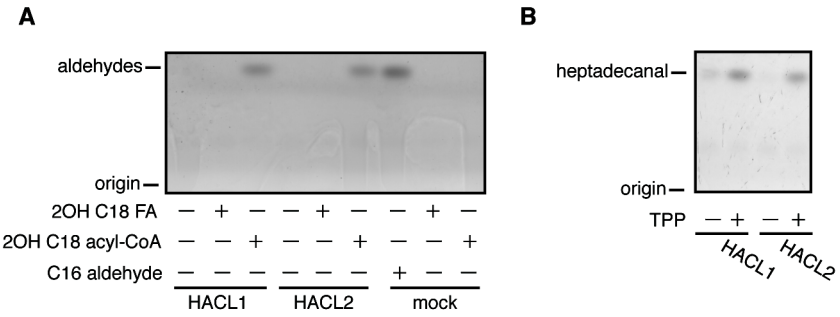


図 12 HACL2 は新規の 2-ヒドロキシアシル CoA リアーゼである

（A-B） HEK 293T 細胞に pCE-puro 3xFLAG-HACL1 または pCE-puro HACL2-3xFLAG を導入し，回収した細胞抽出液より，抗 FLAG 抗体ビーズを用いてアフィニティー精製を行った。アフィニティー精製したタンパク質（1 μg）で活性測定を行い，脂質を抽出した後，順層 HPTLC（ヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸，65/35/1，v/v）で展開し，シッフ試薬で検出した。（A）精製タンパク質に 0.8 mM $MgCl_2$，20 μM チアミン 2 リン酸を加えて，基質として 2-ヒドロキシステアリン酸（2-OH C18 FA，100 μM）もしくは 2-ヒドロキシステアロイル CoA（2-OH C18 acyl-CoA，100 μM）を加えて 37℃，4 時間インキュベートした。mock として，酵素を含まない条件で，2OH C18 FA，2OH C18 acyl-CoA または C16 aldehyde を加えて 37℃，4 時間インキュベートした。（B）精製したタンパク質に 0.8 mM $MgCl_2$, 2-ヒドロキシステアリン酸（2-OH C18 FA，100 μM）を加えて 20 μM チアミン 2 リン酸（TPP）を加えた場合と加えない場合で 37℃，4 時間インキュベートした。

2-2-5. HACL の開裂で生じたペンタデカナールは ALDH3A2 が酸化する

続いて HACL 活性によって生じた長鎖アルデヒドの代謝を調べた。CHO-K1 細胞と FAA-K1A 細胞では，パルミチン酸の代謝に違いはなかった。しかし，[^{3}H]2-ヒドロキシパルミチン酸ラベルにおいては[^{3}H]PHS ラベルと同様に，CHO-K1 細胞に比べて FAA-K1A 細胞でグリセロ脂質（PC，PE）への代謝が大きく損なわれており，PC への変換量の減少，エーテル脂質（PlsE，PlsC）への異常代謝が観察された（図 15A）。アルカリ処理によっても，主に C15 と考えられる直鎖の脂肪酸への変換が大きく抑制されていることが確認された。FAA-K1A 細胞では直鎖脂肪酸の代わりに 2-ヒドロキシパルミチン酸が多くアルカリ加水分解を受けていた。FAA-K1A 細胞で見られたこれらの代謝異常はヒト ALDH3A2 を入れ戻した細胞株（FAA-A2B）では回復していた。

LC-MS/MS を用いた 2-ヒドロキシパルミチン酸の奇数鎖 PC への変換量を解析したところ，CHO-K1 細胞では奇数鎖 PC が増加するのに対して，FAA-K1A 細胞では増加しなかった（図 15B，D）。一方で，FAA-K1A 細胞にヒト ALDH3A2 を入れ戻した FAA-A2B 細胞では奇数鎖 PC が増加しており，代謝の回復がみられた。これらの細胞間で偶数鎖 PC の量には変化はなか

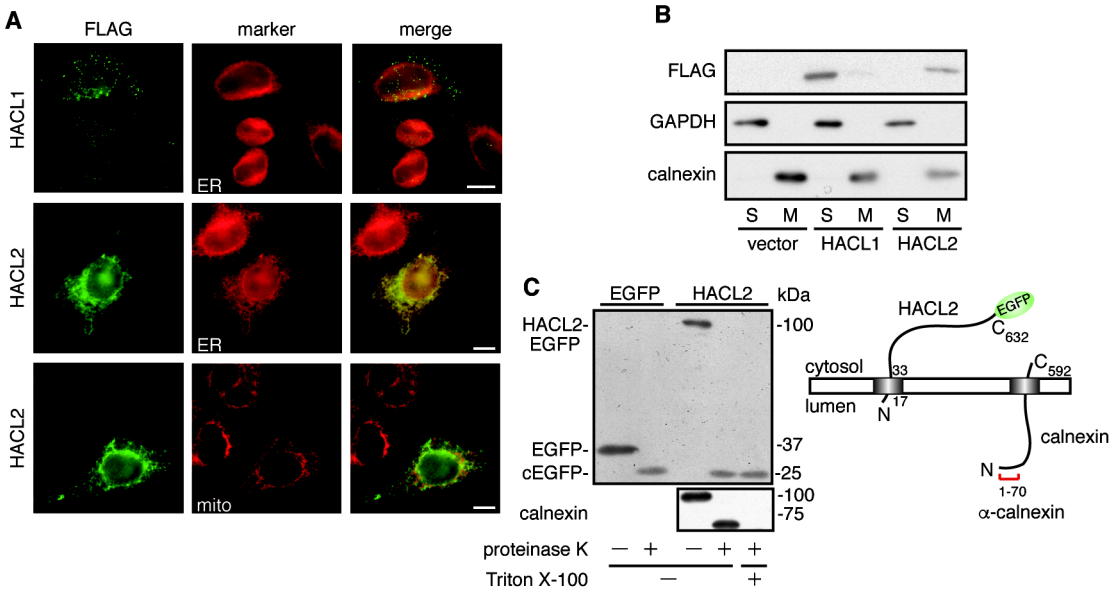


図 13 HACL2 は小胞体に局在する

（A-B） HeLa 細胞に pCE-puro 3xFLAG-HACL1 または pCE-puro HACL2- 3xFLAG を導入した。（A）抗 FLAG 抗体，抗 calnexin （ER マーカー）抗体，抗 Grp75 （ミトコンドリアマーカー）抗体を用いた間接蛍光抗体法で細胞を染色し，蛍光顕微鏡 DM5000B （Leica）で観察した。スケールバーは 25 μm を示す。（B）回収した細胞抽出液を遠心（100,000 g，30 分，4℃）し，可溶性画分（S）と膜画分（M）に分画した。各画分は抗 FLAG 抗体または可溶性画分コントロール用に抗 GAPDH 抗体，膜画分コントロール用に抗 calnexin 抗体を用いてイムノブロッティングを行った。（C）HEK 293T 細胞に pEGFP-N1 または pHACL2-EGFP を導入し，細胞抽出液を回収した。HACL2-EGFP 発現抽出液は遠心（100,000 g，30 分，4℃）し，膜画分を調製した。膜画分に対して 0.5 mg/ml proteinase K 処理（± 1% TritonX-100）または未処理を氷上で 1 時間行った。処理後の抽出液で抗 EGFP 抗体または抗 calnexin 抗体を用いたイムノブロッティングを行った。HACL2 の予測膜トポロジーモデルと既知の calnexin の膜トポロジーを示す。HACL2 は N 末端に膜貫通領域をもち，N 末端が内腔側に存在する。触媒ドメインを含む大きな親水性領域はサイトゾル側に存在する。カルネキシンでは N 末端側の大きな親水性領域は内腔側に存在する。

った（図 15C，E）。これらの結果は 2-ヒドロキシパルミチン酸から C15 脂肪酸への代謝過程においても ALDH3A2 が関与していることを示している。

2-3. 考察

本研究では長鎖塩基の 1 種である PHS が哺乳類においてどのように分解されるのかを明らか

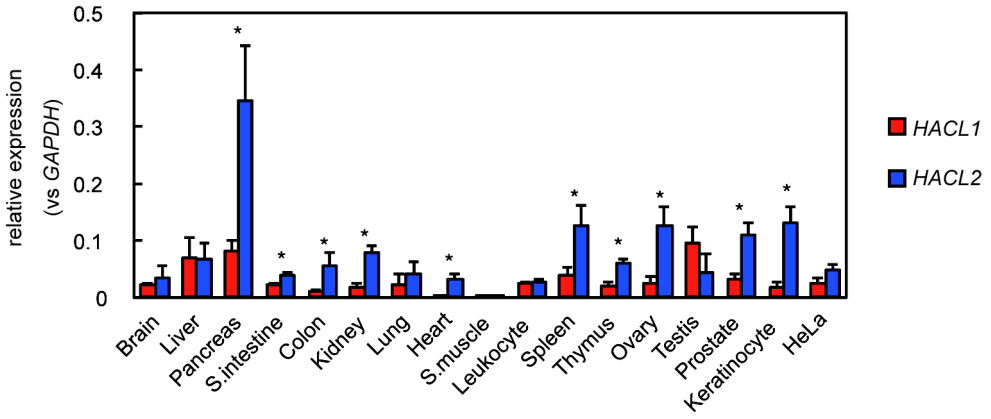


図 14 *HACL2* は広範な組織発現分布を示す

ヒトの組織 cDNA を用いて *HACL1* と *HACL2* の発現量を定量的 PCR で解析した。発現量は *GAPDH* との相対量の平均値（n=3）±SD で示した。（* p <0.05; t 検定）S. intestine, small intestine; S. muscle, skeltal muscle。Keratinocyte の cDNA は分化 7 日目のものを使用した。

にした（図 16）。長鎖塩基の分解経路は生体内のスフィンゴ脂質量の恒常性を維持する上で重要である。当研究室ではこれまでに哺乳類において広範な組織に存在する長鎖塩基（SPH 及び DHS）の分解経路について明らかにしている(68)。しかし，4 位水酸基をもつ PHS については分解過程で 4 位水酸基がどのように除去されるのかが未だ明らかではなかった。PHS はヒトでは消化器，表皮，腎臓などの特定の組織に多いほか，植物，酵母では PHS または PHS 誘導体が主要成分であるため，本研究における分解経路の解明は PHS（またはその誘導体）を食事から摂取した際の栄養学的観点からも重要である。さらに，近年 PHS 及び PHS 誘導体を含むスフィンゴ脂質が健康食品として利用されることが増えており，それらの作用の分子機構を明らかにする上でも重要である。本研究では PHS が 2-ヒドロキシパルミチン酸となった後，CoA 付加，開裂，酸化といった 3 段階からなる α 酸化によって炭素数 15 のペンタデカン酸になることを明らかにした。また，2-ヒドロキシパルミチン酸は α酸化されるだけでなく，一部はスフィンゴ脂質のアシル鎖に取り込まれることも見出した。これまで，哺乳類 α酸化としてはペルオキシソームでの HACL1 による経路が知られていたが，本研究では新たに小胞体での経路が存在することを示したため，脂肪酸酸化の新たな経路を解明したことになる。さらに，この経路で働く 2-ヒドロキシアシル CoA リアーゼ HACL2（ILVBL）の同定にも成功した。

2-3-1. α 酸化

酸化がペルオキシソームに固有の代謝経路であるかは近年まで十分に議論されていなかった。α酸化に関わる酵素群である PHYH, HACL1 がペルオキシソームタンパク質であったことから，

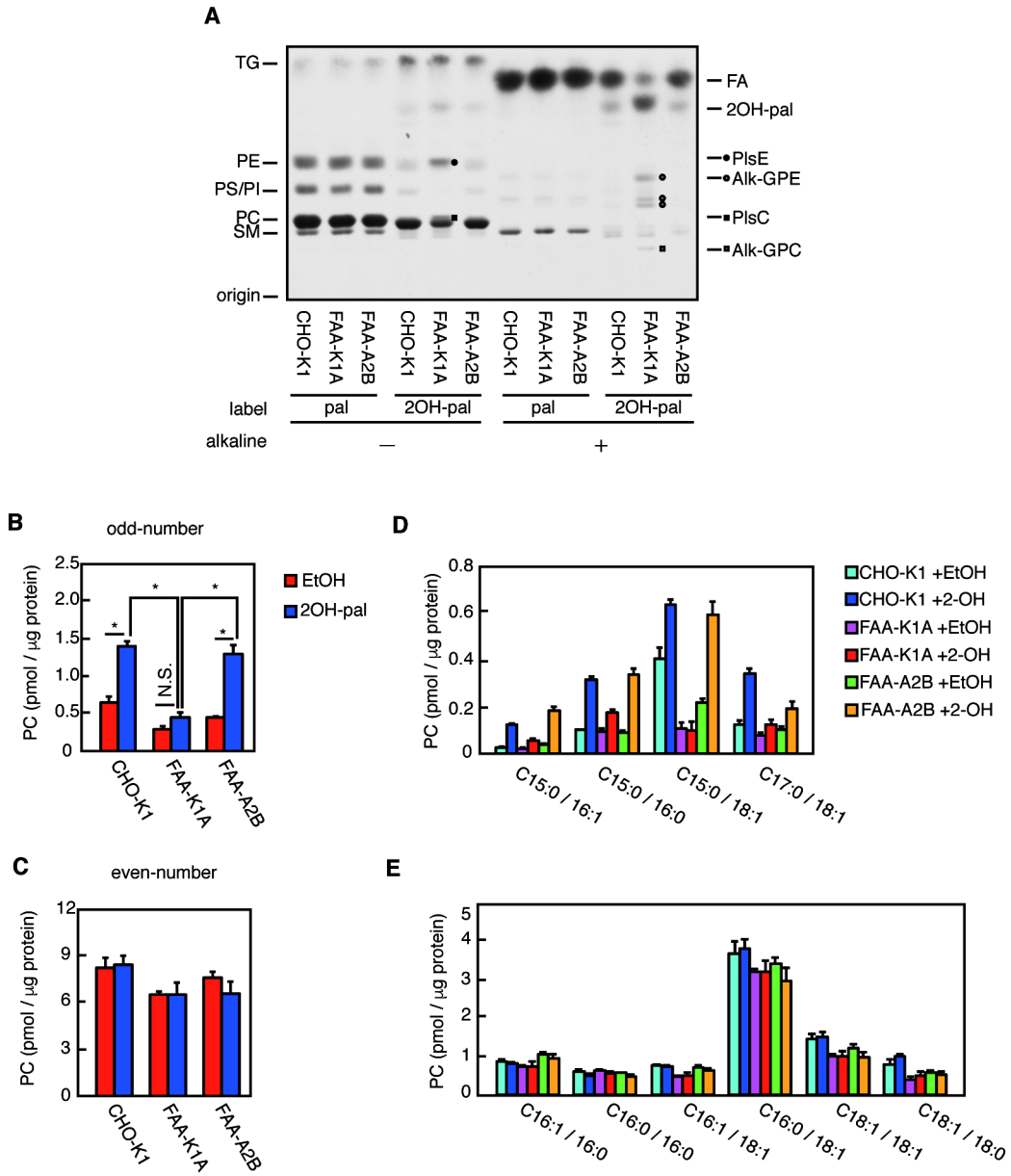


図 15 ALDH3A2 はペンタデカナールをペンタデカン酸に酸化する

（A）CHO-K1 細胞および FAA-K1A 細胞を 0.2 μCi [^{3}H]パルミチン酸もしくは[^{3}H] 2-ヒドロキシパルミチン酸を 4 時間 37℃で標識した。脂質を抽出後，アルカリ処理（もしくは未処理）を行い，順層 HPTLC （1-ブタノール/酢酸/水，3/1/1，v/v）で展開し，オートラジオグラフィーで検出した。PE，ホスファチジルエタノールアミン；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；PC，ホスファチジルコリン；SM，スフィンゴミエリン；PHS，フィトスフィンゴシン；PlsE，プラズメニルエタノールアミン; PlsC，プラズマニルコリン；FA，脂肪酸；2-OH pal，２−ヒドロキシパルミチン酸；Alk-GPE，アルケニルグリセロホスホエタノールアミン；Alk-GPC，アルカニルグリセロホスホコリン; TG，トリグリセリド。（B-D）これらの細胞株に 5 μM 2-ヒドロキシパルミチン酸存在下もしくは非存在下で 37℃，24 時間培養した。

脂質を抽出し，LC-MS/MS を用いて PC 分子種について解析した。総奇数鎖 PC 量を（B）に，総偶数鎖 PC 量を（C），奇数鎖 PC の各分子種を（D），偶数鎖 PC の各分子種を（E）で示した。脂質量はタンパク質量で補正し，データは平均値（n=3）±SD で示した。優位差は Tukey 検定 ＊p<0.05 で示した。

α酸化はペルオキシソームで行われると考えられてきたのみである(36，57)。また，これらの酵素が同定される以前には細胞分画によって単離したミトコンドリアなどにもα酸化活性があるという報告があった(121，122)が，詳細は不明である。HACL1 は *in vitro* での活性測定によって，2-ヒドロキシアシル CoA リアーゼ活性があるとされていた(36， 59)が，細胞，動物レベルでの解析によって生体内でも実際に HACL1 がα酸化に関与することを示した報告はなかった。HACL1 には C 末端にペルオキシソーム移行シグナルが存在し，HACL1 のペルオキシソームへの輸送には PEX5 が関与する。そのため，*PEX5* の欠損によって HACL1 の正常な輸送が損なわれ，HACL1 は機能を失うと予測される。しかし，*Pex5* KO マウスの線維芽細胞を用いた実験では，α酸化は野生型に比べて 1/2 程度に減少するだけであった(60)。この結果より，HACL1 はα酸化に部分的に関与するものの，HACL1 やペルオキソームに依存しないα酸化経路が存在することが示唆された。酵母においては，ペルオキシソーム不全（ペルオキシソームへのタンパク質輸送が遮断される）株 *pex1*Δ, *pex2*Δ, ペルオキシソームへの脂肪酸輸送体欠損株 *pxa1*Δ, *pxa2*Δにおいて，2-ヒドロキシパルミチン酸の代謝が遮断されないことを当研究室では既に報告している(63)。また，哺乳類 HACL1 の酵母ホモログ *PXP1* の欠損株においても 2-ヒドロキシパルミチン酸代謝に変化は見られなかった(63)。これらのことから，酵母ではペルオキシーム非依存的なα酸化が主要であることが示唆された。実際，当研究室では小胞体に局在する新規因子 Mpo1 が酵母におけるα酸化で働くことを見出している(68)。哺乳類には Mpo1 のホモログが存在しない。また，*HACL1* KO 細胞中で，2-ヒドロキシパルミチン酸のペンタデカン酸への変換は遮断されなかった（図 10B)。この結果より，2-ヒドロキシパルミチン酸のペンタデカン酸への代謝には HACL1 以外の酵素が存在していると考えた。本研究では，哺乳類における未解明のα酸化経路に関わる新規ヒト遺伝子として *HACL2* を同定した。HACL2 は小胞体局在であり（図 13A)，哺乳類α酸化も酵母と同様に小胞体で行われていることを示した。当研究室の関，小原は酵母 Mpo1 の基質が 2-ヒドロキシ脂肪酸（n)，生成物が脂肪酸（n-1）であることを明らかにしているが， HACL1 及び HACL2 の基質は 2-ヒドロキシアシル CoA（n)，生成物は長鎖アルデヒド（n-1）であり，生物間でα酸化反応は異なっている（図 12A)。Mpo1 ホモログは菌界のみならず植物界においても保存されており，植物においても Mpo1 ホモログを介したα酸化経路が存在し，哺乳類における経路とは異なっていると考えられる。

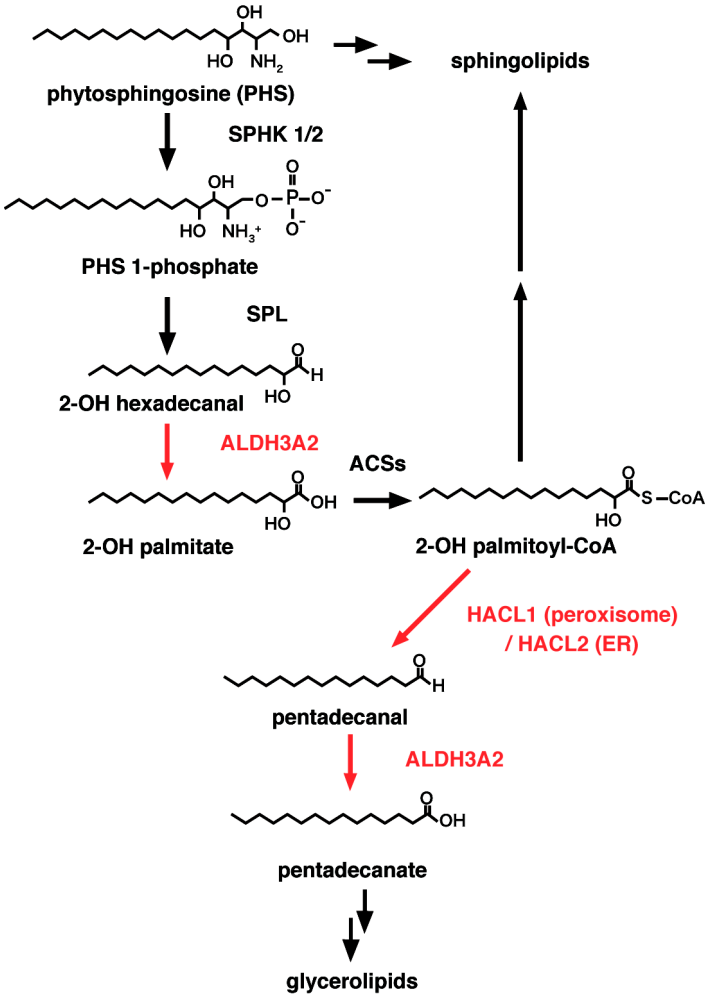


図 16 哺乳類 PHS の代謝経路の全容

哺乳類 PHS の代謝経路を示す。赤く示した箇所が本研究で明らかとなった部分である。PHS はスフィンゴ脂質の長鎖塩基鎖に取り込まれるだけでなく，分解経路へも流れる。分解の初段階はスフィンゴシンキナーゼ（SPHK1/2）によって PHS1P へとリン酸化される。PHS1P は S1P リアーゼ（S1P）によって開裂し 2-ヒドロキシヘキサデカナールが生成される。生じたアルデヒドは脂肪族アルデヒド脱水素酵素（ALDH3A2）によって 2-ヒドロキシパルミチン酸となる。続いてアシル CoA 合成酵素（ACS）によって 2-ヒドロキシパルミトイル CoA となる。このアシル CoA はスフィンゴ脂質のアシル鎖に A 型セラミドとして取り込まれるか，α酸化を受ける。α酸化において，2-ヒドロキシパルミトイル CoA はペルオキシソームの HACL1 もしくは小胞体の HACL2 によって開裂し，炭素数 15 のペンタデカナールとなる。ペンタデカナールは ALDH3A2 によってペンタデカン酸となり，グリセロ脂質に代謝される。

2-3-2. α 酸化が 2 経路存在する意義

哺乳類において 2-ヒドロキシパルミチン酸の代謝経路として HACL1 が関与するペルオキシ

ソーム経路と HACL2 が関与する小胞体経路の 2 つが存在する生理的意義は不明である。CHO-K1 細胞においては，両者を欠損させても通常の生育条件下では生存できることが示された。しかし，α 酸化の遮断が他の細胞種や個体の場合には何らかの異常を引き起こす可能性がある。フィタン酸の α酸化において，2 位水酸化を触媒する PHYH の遺伝子変異は先天性疾患である Refsum 病を引き起こすとなることが知られている(57)。PHYH によって生じる 2-ヒドロキシフィタン酸は CoA 付加の後に HACL1 によって 1 炭素減じ，プリスタナールに変換される(123)。この反応はフィタン酸分解に重要と考えられており，*HACL1* の変異はヒトにおいて Refsum 病様の疾患を引き起こす可能性がある。しかし，実際にはこれまで *HACL1* 変異をもつ患者は見つかっておらず, このことは 2-ヒドロキシ脂肪酸の分解に HACL1 だけでなく HACL2 も重複的に機能する可能性を示唆している。

本研究では PHS の代謝において，HACL2 の方が HACL1 よりも寄与が大きいことが示された。これは *Hacl1* 単独欠損では変化のなかった PHS 代謝が，*Hacl2* の欠損では変化したためである（図 10B)。この寄与の差は両者の細胞内局在が異なることに起因すると考えられる。間接蛍光抗体法での HACL2 の局在は小胞体であった（図 13A)。SPL や ALDH3A2 といった他の長鎖塩基分解経路の酵素の局在も小胞体であり(68), ペルオキシソーム局在の HACL1 と比べて, HACL2 はこれらの酵素と効率良く生成物/基質の受け渡しができると考えられる。

本研究において HACL2 の基質は HACL1 と同様に脂肪酸ではなくアシル CoA 体であることを *in vitro* 活性測定によって示した（図 12A)。2-ヒドロキシ脂肪酸の CoA 付加はアシル CoA 合成酵素（ACS）によるものだと考えられる。これまでヒトの ACS として 26 種類が知られている(124)が，これら ACS のうち，どの ACS が 2-ヒドロキシ脂肪酸に対して活性があるかは不明であり，今後の解析が必要である。

2-ヒドロキシアシル CoA の開裂で生じた長鎖アルデヒドについて，その生成が小胞体かペルオキシソームかで，酸化する長鎖アルデヒド脱水素酵素が異なる可能性が考えられる。ALDH3A2 の主要なスプライシングバリアントは小胞体局在であるが，ペルオキシソームに局在するバリアントも存在する。このことから，同じ長鎖アルデヒドであっても，生じたオルガネラで酸化に関与するバリアントが異なる可能性が考えられる(98)。

2-3-3. HACL2（ILVBL）について

HACL2（*ILVBL*）は脊椎動物ゲノムに広く保存されている遺伝子であるが，これまでその機能は不明であった。一次構造予測では TPP 結合ドメインと N 末端に膜貫通領域を有していることが推測されていた。*ILVBL* という遺伝子名は大腸菌のアセト乳酸合成酵素（遺伝子名:*ilvB*）と相同性がある（-like）ものという意味である(125)。アセト乳酸合成酵素はイソロイシン，ロイシン，バリンの分枝鎖脂肪酸の合成に関わる酵素であり，ilv という名はこの 3 アミノ酸の頭

文字からきている。相同性という観点から HACL2 は哺乳類におけるアセト乳酸合成酵素の可能性が示唆されていたが，実験的に証明はされていなかった。ヒト HACL2 と大腸菌アセト乳酸合成酵素の配列同一性は 26%であり，この数値はヒト HACL1 と大腸菌アセト乳酸合成酵素との配列同一性 28%と大差ない。また，大腸菌にはオキサリル CoA 脱炭酸酵素（遺伝子名: *oxc*）が存在し（ヒト HACL2 との配列同一性 27%），これら酵素間の類似性の数値は主に TTP 結合ドメインの類似性に由来している。このように HACL2 は他に類似性を有するタンパク質と比べて，特に大腸菌アセト乳酸合成酵素と類似性が高いというわけではない。また，脊椎動物は進化の過程で分枝鎖アミノ酸の生合成経路を欠失している。本研究で得られた知見から，HACL2 は実際には 2-ヒドロキシアシル CoA リアーゼであることが証明された。2-ヒドロキシ脂肪酸は自然界に広く存在するために，その分解機構として脊椎動物中で HACL2 が保存されていることは合理的であると考えられる。

2-3-4. ALDH3A2 とα酸化

長鎖塩基を分解する過程で生じる長鎖アルデヒドは哺乳類では ALDH3A2 によって脂肪酸へと代謝される。本研究では PHS の場合，直鎖の脂肪酸に代謝されるまでに 2 回 ALDH3A2 が関与することを示した。1 回目は 2-ヒドロキシヘキサデカナール（PHS 1-リン酸の SPL による開裂産物）の酸化においてであり，2 回目はペンタデカナール（2-ヒドロキシパルミトイル CoA の HACL1/2 による開裂産物）の酸化においてである。これまでにも，α酸化で生じるアルデヒドが ALDH3A2 によって代謝されると推測されていたが，本研究によって実験的には初めて証明された。*ALDH3A2* を原因遺伝子とする SLS の発症子メカニズムは不明であるが，PHS や 2-ヒドロキシ脂肪酸は脳や皮膚に多く存在しており，α酸化に由来する長鎖アルデヒドが本疾患発症に寄与している可能性がある。

2-3-5. α酸化の今後の課題

本研究によって哺乳類α酸化には 2 つの経路が存在することが明らかとなった。また，*Hacl1/2* の二重欠損細胞，*Aldh3a2* の欠損細胞を用いた解析より，これらの遺伝子がα酸化に関わることを細胞レベルで証明した。これらの解析より，これまで断片的な解析情報しかなく，不明瞭な点が多かったα酸化の全容を解明することに成功した。一方で，多くの課題も残っている。前述のように，α酸化が 2 経路存在する意義，この経路において 2-ヒドロキシ脂肪酸を基質とする ACS の同定は未解明である。また，α酸化において重要な *HACL1* 及び *HACL2* の組織発現がどちらも広範な組織に分布している生理的意義も不明である。この組織発現の結果はどのような組織でも普遍的にα酸化が行われていることを示唆している。α酸化は，食餌由来のフィタン酸を小腸や肝臓，2-ヒドロキシ脂肪酸を脳や皮膚，PHS を皮膚や小腸で代謝するために必

要であると考えられるが，それ以外の組織においてどのような脂肪酸をα酸化で処理しているのかは不明である。α酸化産物である奇数鎖脂肪酸は脳や皮膚に多いという報告はあるが(61, 62)，他の組織ではよく分かっていない。細胞外から取り込まれた 2-ヒドロキシ脂肪酸などの利用にこれらα酸化が働いているのかもしれない。あるいは，フィタン酸はイソプレン骨格をもつ分子であり，生体内にはイソプレノイドは数多く存在することから，これらの代謝に関与している可能性もある。例えば，レチノイン酸や炭素数がフィタン酸と同じ 20 のゲラニルゲラノイン酸が生体内には存在し，これらは 3-メチル脂肪酸である。ゲラニルゲラノイン酸は脂質修飾に用いられるゲラニルゲラニオールの酸化によって生じる。その他，ファルネソールやドリコールもカルボン酸に酸化されるとすれば, 3-メチル脂肪酸となり, α酸化される可能性がある。今後，イソプレノイドの分解にα酸化が関与する可能性を解析する必要がある。

2-4.材料と方法

2-4-1. プラスミドの作製

本研究では哺乳類細胞発現用ベクターとして，pCE-puro 3xFLAG-1，pCE-puro 3xFLAG-4，pEGFP-N1（Clontec，TAKARA Bio），pEGFP-C1（Clontec，TAKARA Bio）を使用しており，タンパク質にそれぞれ N 末端 3xFLAG，C 末端 3xFLAG，C 末端 EGFP，N 末端 EGFP タグを付加する設計となっている。pCE-puro シリーズはピューロマイシン耐性遺伝子を含んでいる。酵母発現用ベクターとして pAKNF316 を使用しており, これはタンパク質の N 末端に 3xFLAG タグを付加する設計となっており，*URA3* マーカーを含む。

酵母 *MPO1* 及びヒトの *HACL1, HACL2* 遺伝子は表 I に示すプライマー及びテンプレートを使用して PCR で増幅した。 増幅した DNA 断片をまず pGEM®-T Easy（Promega）ベクターに組み込み，pGEM-MPO1，pGEM-HACL1，pGEM-HACL2n，pGEM-HACL2c を作製した。pGEM-MPO1 は *Bam*HI と *Not*I で処理して，その DNA 断片を pAKNF316 の *Bam*HI-*Not*I サイトへ組み込み，pAKNF316-MPO1 を作製した。pGEM-HACL1 は *Bam*HI と *Not*I で処理して, その DNA 断片を pCE-puro 3xFLAG-1 または pAKNF316 の *Bam*HI-*Not*I サイトへ組み込み，pCE-puro 3xFLAG-HACL1 及び pAKNF316-HACL1 を作製した。pGEM-HACL2n は *Eco*RI で処理して KOD polymerase で blunt 化後，BamHI で処理した DNA 断片を pCE-puro 3xFLAG-1, または pAKNF316 の *Bam*HI/*Sma*I サイトへ組み込み, pCE-puro 3xFLAG-HACL2 及び pAKNF316-HACL2 を作製した。pGEM-HACL2c は *Bam*HI で処理して，その DNA 断片を pCE-puro 3xFLAG-4 の *Bam*HI サイトへ組み込むことで，pCE-puro HACL2-3xFLAG を作製した。また， pGEM-HACL2c は *Bam*HI で処理して，pEGFP-N1 の *Bam*HI サイトへ組み込んだ。

哺乳類用 CRISPR/CAS9 法に用いたプラスミドは Multiplex CRISPR/CAS9 Assembly

System Kit（Addgene）を改変したものを用いている。キットに含まれる pX330A-1 及び pX330S-2 の標的配列挿入サイトを *Bbs*I から *Bae*I に置換したプラスミドである pX330A-B1 と pX330S-B2 を作製した。これらに表 II に示すオリゴ DNA を挿入させて, pX330A-HACL1cr1, pX330A-HACL1cr2，pX330S-HACL2cr1，pX330S-HACL2cr2 を作製した。続いて pX330A-HACL1cr2 の *Bsa*I サイトに pX330S-HACL2cr2 を *Bsa*I で切断した標的配列断片を挿入して pX330A-HACL1/2 を作製した。さらに，これらプラスミドの *Not*I サイトに puromycin 耐性遺伝子を挿入することで，pX330A-puro，pX330A-puro-HACL1cr1，pX330A-puro-HACL1cr2，pX330S-puro-HACL2cr1，pX330A-puro-HACL1/2 を作成した。

2-4-2. 酵母株と培地

酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）BY4741 株（*MATa his3*Δ*1 leu2*Δ*0 met15*Δ*0 ura3*Δ*0* ）及び *mpo1*Δ::*KanMX4* 変異株（strain 4378）は Open Biosystems より入手した(126) (127)。これらの株は YPD 培地（1% yeast extract，2% bactopeptone，2% D-グルコース）またはウラシル欠失完全合成培地（0.67% yeast nitrogen base without amino acid，2% D-グルコース，0.5% カザミノ酸，20 mg/l アデニン，20 mg/l トリプトファン）で培養した。

2-4-3. 細胞培養及びトランスフェクション

ヒト胎性腎由来細胞株 HEK 293T 細胞及びヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLa 細胞はそれぞれ 4 mg/ml または 1 mg/ml D-グルコースを含む Dulbecco's modified Eagle's medium（Sigma）で培養した。チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株である CHO-K1 細胞及び CHO-K1 細胞由来 *Aldh3a2* 欠損細胞である FAA-K1A 細胞(68，128)は Ham's F-12 medium（Sigma）で培養した。使用した培地にはすべて 10% 非働化済み胎生ウシ血清，100 units/ml ペニシリン，100 μg/ml ストレプトマイシンを含んでいる。HEK 293T 細胞は 3%コラーゲンでコートされたディッシュで培養した FAA-K1A 細胞は Raphael A. Zoellar 博士より拝領した。これらの細胞は 37℃, 0.5% CO_2 下で培養した。細胞へのトランスフェクションは Lipofectamine Plus™ Reagent（Life Technologies）を添付文書に従い行った。

2-4-4. 動物細胞への[^{3}H]標識脂質ラベルアッセイ

細胞はあらかじめ血清を含まない培地で 37℃，30 分プレインキュベートして，0.2 μCi [^{3}H]DHS，[^{3}H]PHS，[^{3}H]パルミチン酸，または[^{3}H]3-ヒドロキシパルミチン酸を加えて 37℃，4 時間培養した。培養後，1 ml PBS で細胞を洗浄した。そして細胞を 200 μl PBS で回収し，750 μl クロロホルム/メタノール/水（100/200/1，v/v），250 μl クロロホルム，250 μl 1% KCl 水溶液を加えて懸濁した。懸濁液は遠心（2300 g，1 分，室温）し，有機溶媒層を回収した。回

収したサンプル中のエーテルリン脂質を検出するために，回収サンプル 220 µl に対して 132 µl 0.5 M NaOH（水/メタノール（12.5 / 87.5，v/v））を加え 37℃で 30 分インキュベートした。この処理はアルカリ条件下でエステル結合が加水分解されることを利用して，一般的なジアシル型グリセロ脂質とエーテル型グリセロ脂質（PlsC，PlsE）を区別する方法である。この処理により，グリセロ脂質中のアシル基は加水分解によって脱離し，脂肪酸として検出される。エーテル型グリセロ脂質では *sn*-2 位のアシル基のみが脱離し，*sn*-1 位のエーテル結合を保持した 1-アルカニル GPC 及び 1-アルケニル GPE が検出される。また，この処理でスフィンゴ脂質は分解しない。その後，66 µl 1 M HCl で中和し，135 µl メタノール，450 µl 水を加えて懸濁した。懸濁液を遠心して有機溶媒層を分離，回収し，溶媒を揮発させることで脂質を抽出した。

抽出した脂質は TLC on Silica Gel 60 high performance TLC（Merck）を用いて，1-ブタノール/酢酸/水（3 / 1 / 1，v/v）で展開することで分離した。展開した TLC プレートに蛍光試薬 2.8 mg/ml 2，5-ジフェニルオキサゾン（2-メチルナフタレン/1-ブタノール（1 / 3.3，v/v））を噴霧し，-80℃で X 線フィルム（Kodak）に数日間感光させた。

2-4-5. LC-MS/MS を用いた細胞内セラミド及び PC の解析

1000 µl または 500 µl の PBS で細胞を回収し，1000 g，3 分，室温で遠心し，上清を除いた。そこに 750 µl クロロホルム:メタノール=1:2（v/v），250 µl クロロホルム，500 µl 水を加えて懸濁した。その懸濁液は 1500 g，3 分，室温で遠心し，上層（水層）と下層（有機層）に分離，下層を回収した。回収した有機層は，加熱により揮発させて脂質を抽出した。抽出した脂質は 100 µl メタノールまたはクロロホルム:メタノール=2:1（v/v）に溶解して LC-MS/MS 用試料とした。

測定する際の LC 条件は，100 mm の逆相カラム（ACQUITY UPCL CSH C18 column, length 100 mm; Waters）で流速 0.4 ml/min，45℃，25 分の条件で行った。移動相は A 液（アセトニトリル/水，3:2，10 mM 蟻酸アンモニウム）及び B 液（アセトニトリル/2-プロパノール，9/1，10 mM 蟻酸アンモニウム）を表 III に示す比率で混合させた溶媒を用いた。

LC で分離した脂質は ESI 法でイオン化し，三連四重極型の質量分析装置 Xevo TQ-S（Waters）を用いた。検出には分子種ごとに固有の親イオン，娘イオンの質量電荷比を指定する MRM 解析を用いた。MRM 解析で使用したセラミド，PC の質量電荷比の設定はそれぞれ表 IV，V に示す。データの解析ソフトは MassLynx を使用した。

2-4-6. イムノブロッティング

細胞ライセートは必要に応じてタンパク質濃度を揃えて，等量の 2xSDS サンプルバッファー（125 mM Tris-HCl (pH 6.8)，4% ドデシル硫酸ナトリウム （SDS），20% グリセロール，10%

メルカプトエタノール，少量のブロモフェノールブルー）を加えて調製した。調製したサンプルは SDS-PAGE（Laemmli 法）によってタンパク質を分子量で分離し，その後 Immobilon™ polyvinyliden difluoride membrane（Millipore）に転写した。続いてメンブレンはブロッキング液（5% スキムミルク/ TBS-T ; 20 mM Tris-HCl（pH 7.5）, 137 mM NaCl, 0.05% Tween20）で室温 1 時間または 4℃オーバーナイトでインキュベートした。1 次抗体は抗 FLAG 抗体 M2（1/1000 希釈，Stratagene）または抗 FLAG ポリクローナル抗体，抗 GAPDH 抗体 （1/1000 希釈，Ambion），抗α-tubulin 抗体 （1/1000 希釈，DM1A; Sigma），抗 calnexin 抗体 （1/1000 希釈, PM060; MBL）, 抗 GFP 抗体（1/1000 希釈 No. 598; MBL）, 抗 Pgk1 抗体（Life technologies）をそれぞれブロッキング液に希釈したものを使用して室温 1 時間または 4℃オーバーナイトでインキュベートした。メンブレンを TBS-T で洗浄した後, Peroxidase-conjugated anti-mouse IgG F(ab')$_2$ fragment もしくは Peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG F(ab')$_2$ fragment（ともに 1/7500 希釈，GE Healthcare Bio-Science）をブロッキング液に希釈したものを使用して室温 1 時間インキュベートした。TBS-T で洗浄した後，Western Blotting Substrate（Pierce）を用いて X 線フィルムに感光，検出した。

2-4-7. RNA の調製と cDNA 化及び定量的 PCR

HeLa 細胞，CHO-K1 細胞及びヒトケラチノサイトの RNA は NucleoSpin RNA II（Nippon Genetics）を添付の説明書の通りに使用して回収した。cDNA は回収した RNA と PrimeScript II RTase（TaKaRa bio）を添付の説明書の通りに使用して作製した。その他のヒト cDNA は human MTC Multiple Tissue cDNA Panel I and II（Takara Bio）を使用した。定量的 PCR は cDNA を鋳型として，One-Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II（Takara Bio）と CFX96 Touch real-time PCR detection system（Bio-Rad）と表 VI のプライマーを用いて行った。ヒト及び CHO-K1 細胞の HACL1，HACL2 の発現量は GAPDH の発現量との相対値として補正した。用いた各プライマー間の増幅効率に差がないことは確認している。反応はまず 95℃，3 分の後，95℃，10 秒，55℃，30 秒，72℃，30 秒を 39 サイクル繰り返す条件で行った。

2-4-8. *Hacl1* 及び *Hacl2* のノックアウト細胞の作製

CHO-K1 細胞に pX330A-puro-Hacl1cr1，pX330S-puro-Hacl2cr1，または pX330A-puro-Hacl1/2 をトランスフェクションし，それぞれ *Hacl1* KO，*Hacl2* KO，*Hacl1/2* DKO 細胞を作製した。これらの細胞はトランスフェクションの 24 時間後に，10 μg/ml puromycin 存在下で 48 時間選択的に培養後，シングルコロニーをクローニングすることで作製した。これらの遺伝子欠損細胞は 2 つの対立遺伝子の両方にフレームシフト変異をもっていることを確認した。また，元のベクターである pX330A-puro をトランスフェクションして同様の操作を行ってクロー

ニングした細胞をコントロールとして本研究では使用した。

2-4-9. タンパク質の精製と *in vitro* 活性測定

HEK 293T 細胞に 3xFLAG-HACL1 または HACL2-3xFLAG を発現させて, 抗 FLAG M2 アフィニティーアガロースゲル（Sigma）を用いて精製した。 HEK 293T 細胞に pCE-puro 3xFLAG-HACL1 または pCE-puro HACL2-3xFLAG をトランスフェクションした 24 時間後, 細胞を バッファーA[50 mM HEPES-NaOH（pH 7.4），150 mM NaCl，10% グリセロール，1mM ジチオトレイトール（DTT）]に 1x プロテアーゼインヒビターカクテル（PIC，Roche），1 mM フッ化フェニルメチルスルヒドリル（PMSF）を加えたもので回収し，超音波破砕を行った。これよってできた総細胞抽出液は 100，000 g，30 分，4℃で超遠心し，可溶性画分と膜画分に分離した。3xFLAG-HACL1 の精製には可溶性画分を用いて，HACL2-3xFLAG の精製には膜画分を使用した。膜画分はバッファーA に 1xPIC，1 mM PMSF，1.2% Triton X-100 を加えたもので懸濁し，超音波破砕を行った。その後 4℃で 30 分可溶化し，再び 100, 000 g for 30 分 4℃で超遠心して可溶化画分を得た。これらの画分に抗 FLAG M2 アフィニティーアガロースゲルを加えて 4℃で一晩ローテーションさせた。ビーズは 3 回，0.1% TritonX-100 を加えたバッファーA で洗浄し，沈降した FLAG タンパク質は 100 μg/ml 3xFLAG ペプチド，0.1% TritonX-100 を加えたバッファーA で溶出した。

2-ヒドロキシアシル CoA リアーゼの活性測定には炭素数 18 の 2-ヒドロキシステアリン酸（Matreya）または 2-ヒドロキシステアロイル CoA（Avanti）を基質として用いた。0.1% Triton X-100 を加えたバッファーA に精製タンパク質（1 μg），0.8 mM $MgCl_2$，100 μM 基質，20 μM チアミン 2-リン酸（TPP）を加えて 37℃ で 4 時間インキュベートした。反応は 375 μl のクロロホルム/メタノール（1/2，v/v）を加えて停止させた。そして 125 μl のクロロホルムと 125 μl の水を加えて，10, 400 g で 1 分，室温で遠心，二層分配した。下層の有機層を回収し，乾燥後，20 μl クロロホルム/メタノール（2/1，v/v）で懸濁，脂質を抽出した。抽出した脂質は high performance thin-layer chromatography（HPTLC）（hexane/diethyl ether/AcOH=65/35/1, v/v）で展開し，アルデヒド基の呈色試薬である Schiff 試薬で，生成物を検出した。

2-4-10. 間接蛍光抗体法

細胞が接着したカバーガラスを PBS で洗浄し，3.7%ホルムアルデヒド/ PBS を加えて 10 分間 37℃でインキュベートし，固定した。PBS で洗浄後，0.1% Triton X-100/PBS を加え 5 分間室温でインキュベートし，膜透過処理を行った。膜透過処理後，ブロッキング液（10 mg/ml BSA/PBS）を加えて 30 分間室温でインキュベートし，ブロッキングを行った。続いて 1 次抗

体として抗 FLAG 抗体（1/1000 希釈，研究室で作製，ポリクローナル），抗 Grp75 30A5 抗体（1/200 希釈，SPA-825; Nventa Biopharmaceuticals）または抗 calnexin 抗体（1/500 希釈，4F10; MBL）をブロッキング液に希釈して用いて室温で 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後，Alexa 594- conjugated goat anti-mouse IgG antibody 及び Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody（1/400 希釈，Thermo Fisher Scientific）をブロッキング液に希釈して用いて遮光で室温 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄した後，Prolong Gold Anti-fade Reagent（Thermo Fisher Scientific）でスライドグラスにマウントし，顕微鏡観察を行った。

2-4-11. 細胞分画

細胞分画には，トランスフェクションして 48 時間の HeLa 細胞を使用した。細胞はバッファーA に 1xPIC，1 mM PMSF を加えたもので回収し，超音波破砕することで総ライセートを得た。総ライセートは超遠心（100, 000 g，30 分，4℃）し，上清は可溶性画分として回収し，ペレットはバッファーA に 1xPIC，1 mM PMSF を加えたものに懸濁後，超音波破砕することで膜画分として回収し，イムノブロッティングでタンパク質を検出した。

2-4-12. proteinase K 処理

HEK 293T 細胞に pEGFP-N1 または pHACL2-EGFP をトランスフェクションし，その 24 時間後にバッファーA を加えてホモジェネートした。300 g，4℃，3 分遠心して未破砕細胞を除き，上清を得た。HACL2-EGFP を含むライセートは超遠心（100, 000 g，30 分，4℃）し，得られたペレットはバッファーA に懸濁して膜画分とした。EGFP を含む総細胞抽出液及び HACL2-EGFP を含む膜画分に 0.5 mg/ml proteinase K 処理もしくは未処理，0.5 mg/ml proteinase K ＋1% Triton X-100 可溶化処理を 4℃，1 時間行った。反応は 1 mM PMSF を加えることで停止させ, 10% トリクロロ酢酸で 4℃, 20 分の処理でタンパク質を沈殿, 回収した。沈殿したタンパク質はアセトンで洗浄し，SDS サンプルバッファーに溶解後，イムノブロットに使用した。

3. 長鎖アルデヒド脱水素酵素の解析

3-1. 研究背景と研究目的

アルデヒドは食物，薬物，環境汚染物質などを介して外界から体内に吸収されるだけでなく，脂質，アミノ酸，神経伝達物質などの生体分子の代謝によっても生じる。このため，生体内には多様なアルデヒドが存在している(79，80)。アルデヒドは反応性が高い分子であるため，その蓄積はしばしば細胞毒性を示す（図 5A，B）(79)。アルデヒドの除去において重要な役割をもつのはアルデヒド脱水素酵素（ALDH）であり，アルデヒドをより反応性の低いカルボン酸へと変換する。ヒトゲノムには 19 種類の *ALDH* 遺伝子が存在しており(79)，いくつかの *ALDH* 遺伝子の変異は先天性疾患を引き起こす（図 5D）(81，82)。

長鎖アルデヒドとは炭素数 11-20 のアルデヒドを指し，主に脂質に由来する。また，長鎖アルデヒド酸化活性をもつ ALDH を長鎖アルデヒド脱水素酵素と呼び，ALDH3A2 がよく知られている(77，83)。ヒトの *ALDH3A2* の変異は先天性の神経皮膚疾患である Sjögren-Larsson 症候群（SLS）を引き起こすが，SLS 発症に至る分子メカニズムは不明である。我々は既に長鎖塩基の分解過程で生じた長鎖アルデヒドを酸化する長鎖アルデヒド脱水素酵素として ALDH3A2 を同定していた(68)。*Aldh3a2* が欠損した CHO-K1 細胞変異株である FAA-K1A 細胞では長鎖塩基分解経路が抑制されており，野生株に比べて長鎖塩基のグリセロ脂質への代謝量は減少する(68)。しかし，抑制されているものの，完全には遮断されていないことから，この結果は一部の長鎖塩基は正常にグリセロ脂質へと代謝されているとも見なすことができる。また，我々のグループが解析している *Aldh3a2* KO マウスでは，肝臓以外の多くの組織で長鎖アルデヒド脱水素酵素活性が残存していた(109)。特に肺，表皮では野生型マウスと同程度に高い活性を示した。これらの結果は少なくともマウスには Aldh3a2 以外にも長鎖アルデヒド脱水素酵素が存在することを示していた。*Aldh3a2* KO マウスの表現型はヒトの病態に比べると弱く，マウスでの未知の長鎖アルデヒド脱水素酵素による Aldh3a2 との機能の重複性が原因であると考えられた。そこで本研究では Aldh3a2 と相同性の高い Aldh3 ファミリーについて，長鎖アルデヒドに対する活性について解析した。また，長鎖アルデヒドに対して活性を示した Aldh3b1，Aldh3b2，Aldh3b3 の 3 種のサブタイプについてはこれまで十分な解析がなされていなかったため，組織発現分布，細胞内局在及び脂質修飾について解析した。

3-2. 結果

3-2-1. Aldh3b タンパク質は *in vitro* において長鎖アルデヒドに対して活性を示す

in vitro における Aldh3 タンパク質の長鎖アルデヒド代謝活性を調べるため，HEK 293T 細胞に過剰発現させたマウスまたはヒトの 3xFLAG-Aldh3 タンパク質を抗 FLAG 抗体ビーズでアフィニティー精製した。長鎖アルデヒドとして炭素数 16 のヘキサデカナールとヘキサデセナー

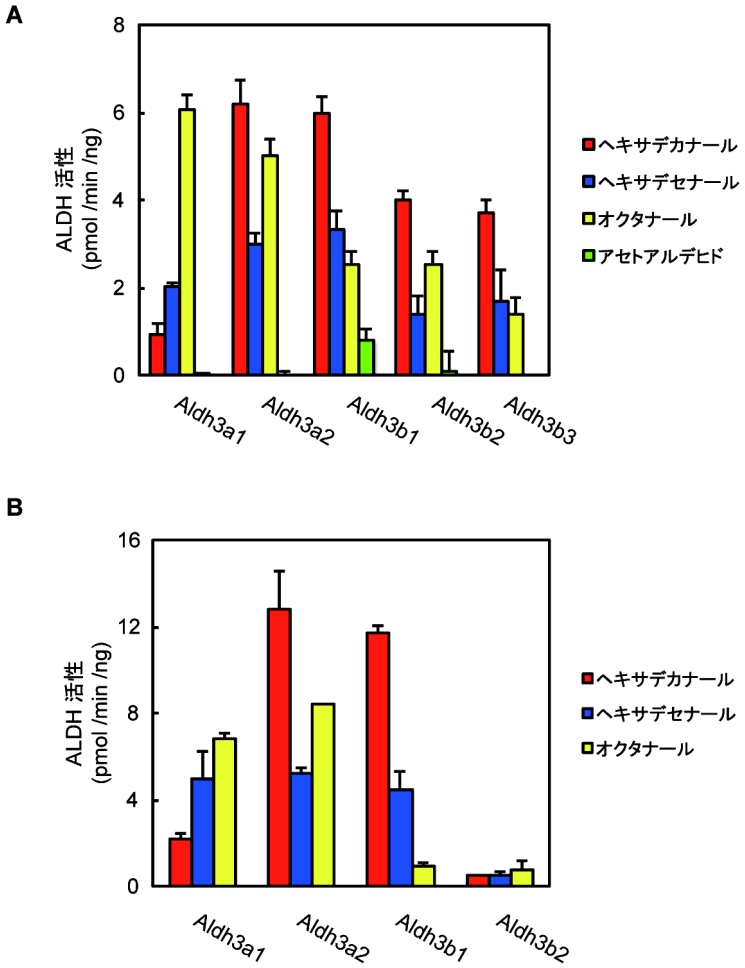


図 17 ALDH3B タンパク質は長鎖アルデヒドに対して活性を示す

（A，B） HEK 293T 細胞に 3xFLAG タグを付加したマウスまたはヒトの ALDH3 タンパク質を発現させ，回収した総抽出液を Triton X-100 で可溶化，抗 FLAG M2 ビーズを用いたアフィニティー精製を行った。 精製タンパク質 10-20 ng に，500 μM NAD^+，100 μM の基質 （ヘキサデカナール，ヘキサデセナール，オクタナールまたはアセトアルデヒド） を加えて 37℃で 15 分間インキュベートした。生成物の NADH の蛍光 （460 nm，励起 356 nm） はプレートリーダー M200（Tecan）で測定した。グラフの数値は 3 回の独立した実験から得られた平均±SD を示している。（A）はマウス Aldh3 タンパク質の活性測定の結果であり，精製には pCE-puro 3xFLAG-mAldh3a1，pCE- puro 3xFLAG-mAldh3a2，pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b1，pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b2, pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b3 をトランスフェクションした HEK 293T 細胞抽出液より精製した。（B）はヒト ALDH3 タンパク質の活性測定の結果であり，精製には pCE-puro 3xFLAG-hALDH3A1，pCE-puro 3xFLAG-hALDH3A2，pCE-puro 3xFLAG-hALDH3B1，pCE-puro 3xFLAG-hALDH3B2 をトランスフェクションした HEK 293T 細胞抽出液より精製した。

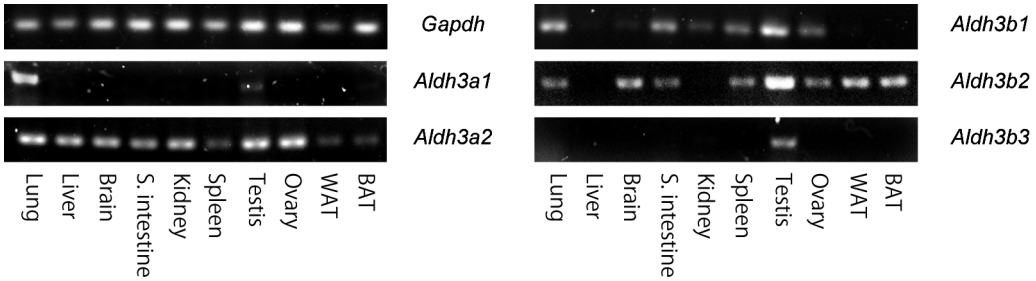


図 18 マウス *Aldh3b2*, *Aldh3b3* 遺伝子の組織発現分布

7 週齢の C57BL/6 雄マウスの各組織から総 RNA を回収した。RT-PCR で各組織における Aldh3a1，Aldh3a2，Aldh3b1，Aldh3b2，Aldh3b3 の mRNA 発現量及び，総 RNA 量のコントロールとして Gapdh の mRNA 量を確認した。S. intestine，small intestine; WAT，white adipose tissue; BAT，brown adipose tissue。

ル（トランス 2-ヘキサデセナール ; S1P の代謝産物），炭素数 8 のオクタナール，炭素数 2 のアセトアルデヒドに対する活性を調べた。ヘキサデカナールに対してはマウス Aldh3a2, Aldh3b1, Aldh3b2 及び Aldh3b3 が活性を示し，特に Aldh3a2，Aldh3b1 は比較的高い活性を示した（図 17A）。ヘキサデセナールに対しては Aldh3 ファミリーすべてが活性を示した。また，オクタナールに対する活性は，Aldh3a1，Aldh3a2 が高い活性を示し，Aldh3b1，Aldh3b2 及び Aldh3b3 の活性は比較的低かった。アセトアルデヒドに対してはいずれのタンパク質も高い活性を示さなかった。

精製したヒト 3xFLAG-ALDH3 タンパク質のヘキサデカナール，ヘキサデセナール，オクタナールに対する活性はマウスの結果とほぼ同じであった（図 17B）。しかし，ALDH3B2 では異なっており，ヒト ALDH3B2 は今回調べたどの基質に対してもほとんど活性を示さなかった。この結果はヒトの ALDH3B2 がマウス Aldh3b2 及びその他 ALDH3 タンパク質と比較して N 末端が 50 アミノ酸以上短く，偽遺伝子と考えられていることと合致する。

3-2-2. *Aldh3* ファミリーの組織発現分布

Aldh3b2 及び *Aldh3b3* の各組織での遺伝子発現はこれまで報告されていなかった。そこで C57BL/6 マウスの肝臓，小腸，脳，腎臓，肺，脾臓，精巣，卵巣，白色脂肪組織（white adipose tissue : WAT），褐色脂肪組織（brown adipose tissue : BAT）より総 RNA を回収し，RT-PCR によって *Aldh3a1*, *Aldh3a2*, *Aldh3b1*, *Aldh3b2, Aldh3b3* の mRNA 発現を調べた（図 18）。*Aldh3a1* は肺でのみ発現が見られ， *Aldh3a2* はすべての臓器で発現していた。*Aldh3b1* は肺，精巣で高い発現を示し，小腸，腎臓，脾臓，卵巣でも発現が認められた。*Aldh3b2* は肝臓，腎臓以外の多くの臓器で発現しており，特に脳，精巣，WAT，BAT で高い発現を示した。一方で，

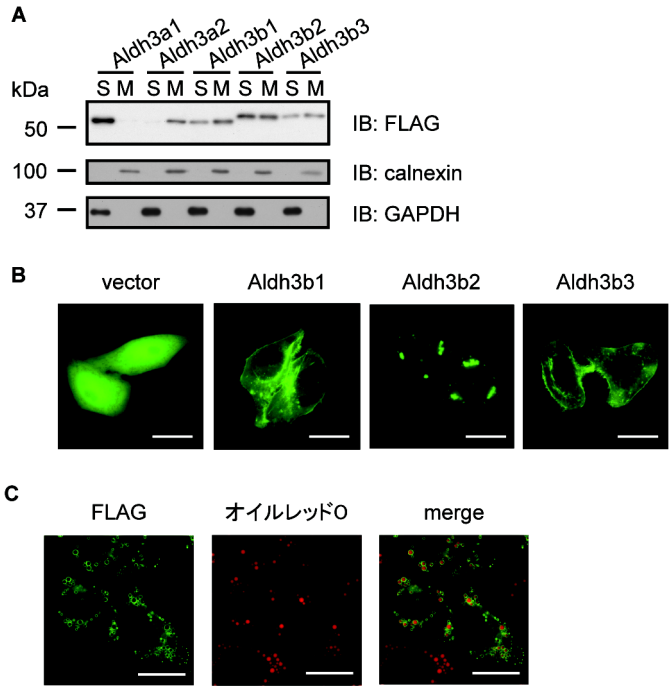


図 19 マウス Aldh3b1 及び Aldh3b3 は細胞膜，Aldh3b2 は脂肪滴に局在する

（A） HeLa 細胞に pCE-puro 3xFLAG-mAldh3a1，pCE-puro 3xFLAG-mAldh3a2，pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b1，pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b2，pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b3 をトランスフェクションし，回収した細胞抽出液は超遠心 （100,000 g，30 分， 4 ℃） で可溶性画分（S）と膜画分（M）に分画した。各画分中の Aldh3 タンパク質は抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロッティングに使用した。可溶性画分及び膜画分のコントロールとしてそれぞれ抗 GAPDH 抗体，抗 calnexin 抗体を用いた。IB：イムノブロッティング。（B）HeLa 細胞に pEGFP-C1（vector），pEGFP-mAldh3b1，pEGFP-mAldh3b2，pEGFP-mAldh3b3 をトランスフェクションし，48 時間後に蛍光顕微鏡 DM5000B（Leica）で観察した。（C）HeLa 細胞に pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b2 をトランスフェクションし，37℃で 24 時間培養後に 100 μM オレイン酸存在下でさらに 37℃で 24 時間培養した。細胞は 3.7%ホルムアルデヒドで固定し，オイルレッド *O* 染色，抗 FLAG 抗体を用いた間接蛍光抗体法を行い，蛍光顕微鏡 DM5000B（Leica）で観察した。スケールバーはすべて 25 μm を示している。

Aldh3b3 は精巣でのみ発現していた。

3-2-3. Aldh3b タンパク質の細胞内局在

Aldh3b タンパク質の細胞内局在を調べるため，N 末端に 3xFLAG タグを付加したマウス Aldh3 タンパク質を HeLa 細胞中で発現させ，総細胞抽出液を調製後，超遠心分離によって細胞分画を行った。Aldh3a1 は可溶性画分，Aldh3a2 は膜画分において検出され（図 19A），これ

らの結果は既存の報告と一致した(98，129)。 Aldh3b1，Aldh3b2，Aldh3b3 は可溶性画分，膜画分双方で検出されたが，Aldh3b1，Aldh3b3 は膜画分の方が多く，Aldh3b2 では双方の画分で同程度の量が検出された。

さらに詳しい細胞内局在を解析するため，N 末端に EGFP タグを付加したマウス Aldh3b1，Aldh3b2，Aldh3b3 を HeLa 細胞に発現させ，間接蛍光抗体法により細胞内局在を観察した（図 19B)。その結果，Aldh3b1，Aldh3b3 は細胞膜に，Aldh3b2 は細胞内の小胞状の構造に多く局在していた。Aldh3b2 が局在する小胞状構造は脂肪滴を染色するオイルレッド O の染色像を取り囲んでいたため（図 19C)，Aldh3b2 は脂肪滴膜に局在していることが示された。

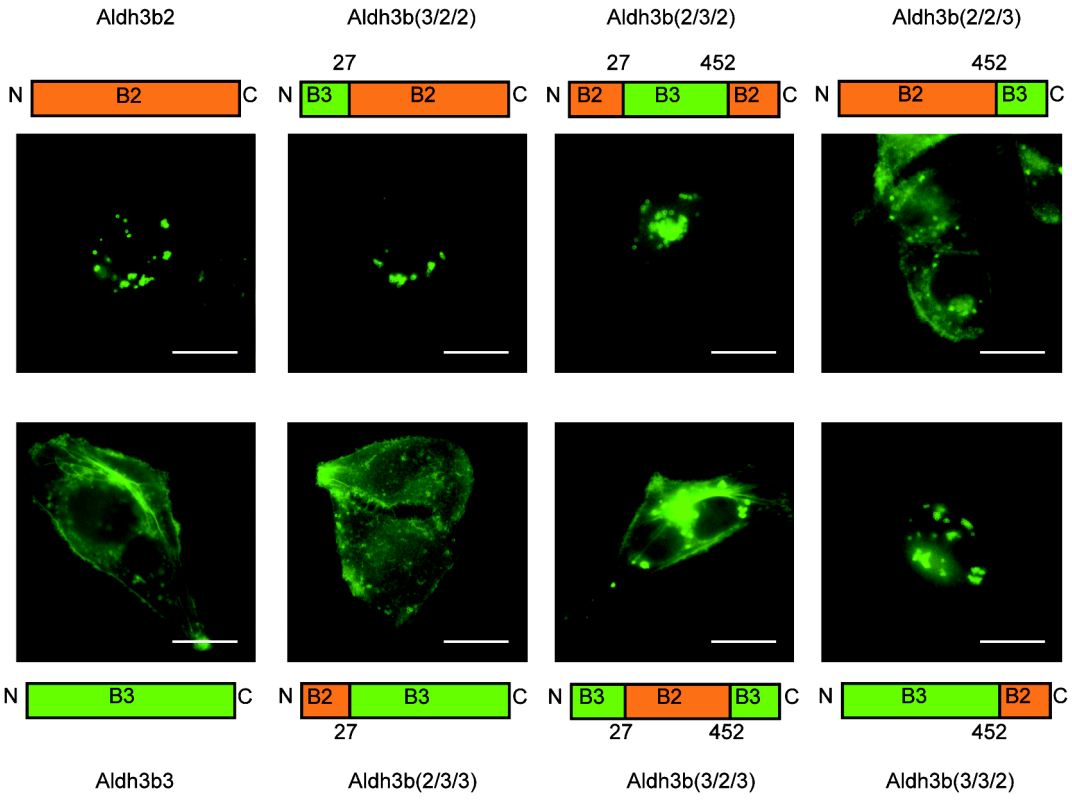


図 20　Aldh3b2 及び Aldh3b3 の C 末端配列はそれぞれの適切な細胞内局在に重要である

マウス Aldh3b2 及び Aldh3b3 を *Stu*I，*Hin*dIII サイトで互いに入れ替えたキメラ遺伝子を作製した。HeLa 細胞に EGFP-mAldh3b2（Aldh3b2)，EGFP-mAldh3b3（Aldh3b3)，pEGFP-Aldh3b（3/2/2)，pEGFP-Aldh3b（2/3/3)，pEGFP-Aldh3b（2/3/2)，pEGFP-Aldh3b（3/2/3)，pEGFP-Aldh3b（2/2/3)，または pEGFP-Aldh3b（3/3/2）をトランスフェクションし，37℃で 48 時間培養後に蛍光顕微鏡 DM5000B（Leica）で観察した。スケールバーは 25 μm を示している。キメラタンパク質は Aldh3b（x/x/x）と表記し，(x/x/x）という表記は配列の N 末端/中央部/C 末端が Aldh3b2 または Aldh3b3 のどちらに由来するかを表している。

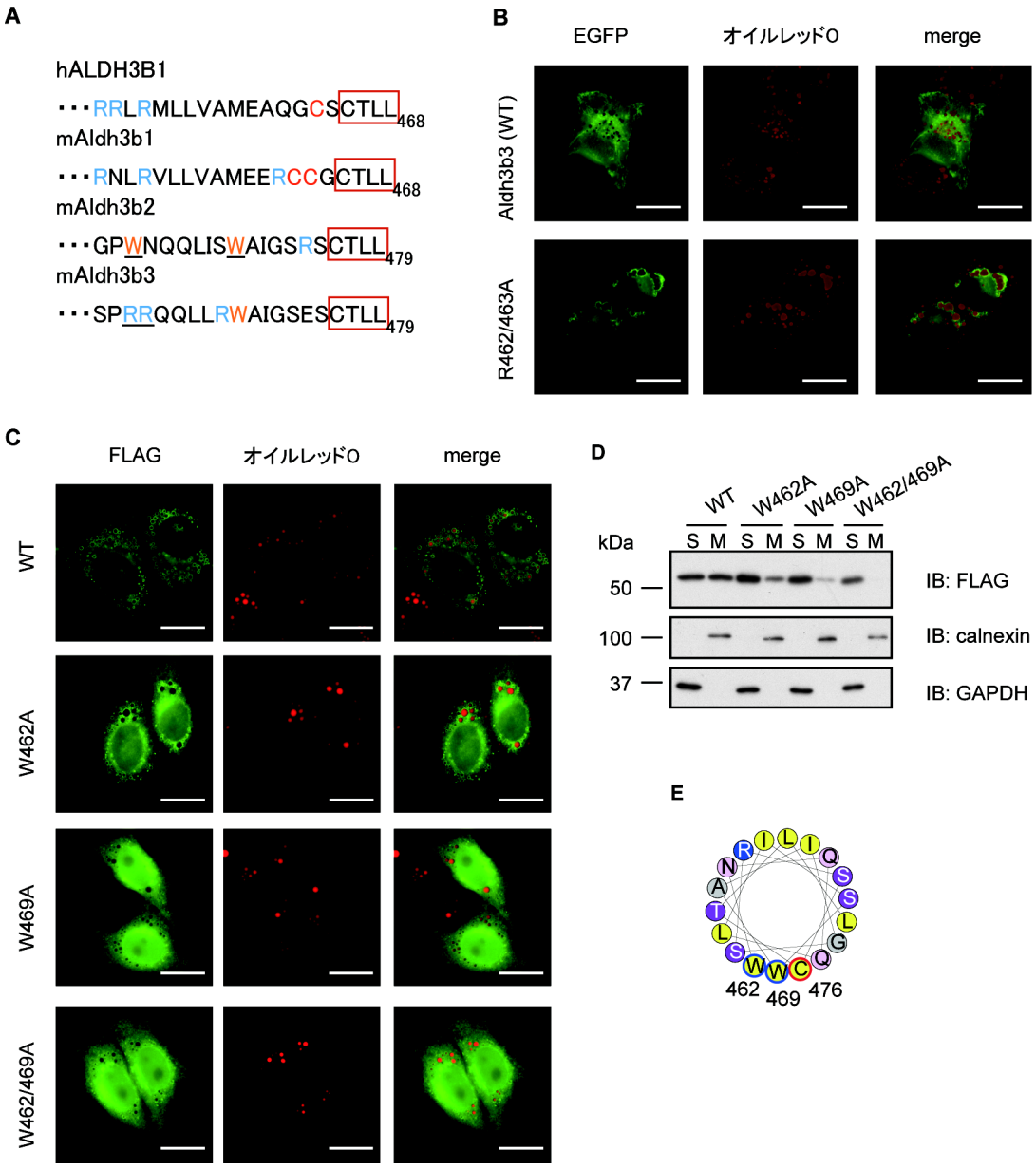


図 21 Aldh3b2 及び Aldh3b3 の細胞内局在にはそれぞれ C 末端領域の Trp 残基，Arg 残基が重要である

（A） ヒト ALDH3B1 及びマウス Aldh3b1，Aldh3b2，Aldh3b3 の C 末端 20 アミノ酸配列を示す。青字は塩基性残基，橙色は Trp 残基，赤字はパルミトイル化 Cys 残基，赤枠はプレニル化認識配列である CaaX モチーフを示している。下線が付いたアミノ酸をアラニンに置換した変異体を作製した。（B）HeLa 細胞に pEGFP-mAldh3b3（WT），pEGFP-mAldh3b3-R462/463A をトランスフェクションし，37℃で 24 時間培養後，100 μM オレイン酸を含む培地でさらに 24 時間 37℃で培養した。細胞は 3.7%ホルムアルデヒドで固定し，オイルレッド O 染色の後に，蛍光顕微鏡 DM5000B（Leica）で観察した。（C-D）HeLa 細胞に pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b2（WT），pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b2-W462A，pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b2-W469A，pCE-puro

3xFLAG-mAldh3b2-W462/469A をトランスフェクションした。37℃で 24 時間培養後に（C）では 100 μM オレイン酸存在下でさらに 24 時間 37℃で培養した。細胞は 3.7%ホルムアルデヒドで固定し，オイルレッド O 染色と抗 FLAG 抗体を用いた間接蛍光抗体法を行った。染色後は蛍光顕微鏡 DM5000B（Leica）で観察した。スケールバーはすべて 25 μm を示している。（D）ではトランスフェクションの 24 時間後に細胞抽出液を回収し，回収した細胞抽出液は超遠心（100,000 g，30 分，4 ℃）で可溶性画分（S）と膜画分（M）に分画した。回収した各画分中の Aldh3b2 の発現量は抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロッティングで確認した。可溶性画分及び膜画分のコントロールとして抗 GAPDH 抗体，抗 calnexin 抗体 を用いた。IB : イムノブロッティング。（E）Aldh3b2 の C 末端配列より，Heliquest software（http://heliquest.ipmc.cnrs.fr）を用いてヘリカルウィールプロットを作成した。

3-2-4. Aldh3b2，Aldh3b3 の C 末端配列はそれぞれの細胞内局在に必要である

続いて Aldh3b2, Aldh3b3 それぞれの細胞内局在に必要な領域を探るため, Aldh3b2 /Aldh3b3 キメラタンパク質を作製した。両者とも 479 アミノ酸で構成されており, 同一性が 86%と高く，類似した配列を有するため，共通の制限酵素で切断し，組み換えることでキメラタンパク質発現プラスミドを作製した。これらの変異体では，それぞれの N 末端 27 アミノ酸，または C 末端 452 番目以降の配列，あるいは両方の配列を他方と置き換わっている。発現させたキメラタンパク質は，Aldh3b（x/x/x）と表記し，（x/x/x）という表記は配列の N 末端/中央部/C 末端が Aldh3b2 または Aldh3b3 のどちらに由来するかを表している。例えば，Aldh3b（2/3/3）という表記であれば，N 末端部分が Aldh3b2，中央と C 末端部分が Aldh3b3 に由来する配列であることを表している。N 末端に EGFP タグを付加したこれらの変異体の HeLa 細胞における局在を観察した（図 20）。Aldh3b（3/2/2）及び Aldh3b（2/3/3）の局在は野生型と変化はなく，それぞれ脂肪滴と細胞膜に局在していた。このことから，N 末端配列は Aldh3b2 及び Aldh3b3 の細胞内局在に影響しないことが示唆された。C 末端のみを Aldh3b3 のものと置き換えた Aldh3b2 である Aldh3b（2/2/3）の一部は脂肪滴にも局在していたが，細胞膜にも局在していた。一方で Aldh3b（3/3/2）は脂肪滴局在を示した。互いの C 末端配列を入れ替えると局在も入れ替わったことから，C 末端配列が Aldh3b2，Aldh3b3 の細胞内局在に重要であることが示唆された。両末端を置き換えた Aldh3b（2/3/2）及び Aldh3b（3/2/3）変異体はそれぞれ脂肪滴，細胞膜と一部脂肪滴であった。これらの結果から，Aldh3b2 及び Aldh3b3 の細胞内局在には，中央部の配列も C 末端配列に比べると弱くではあるが寄与していることが示唆された。

Aldh3b2，Aldh3b3 の C 末端領域がそれぞれのタンパク質の細胞内局在に重要であることが示唆されたため，C 末端領域のどのアミノ酸残基が局在に重要であるのかを調べた。各マウス Aldh3b タンパク質の C 末端を比較すると，Aldh3b1 及び Aldh3b3 に比べ，Aldh3b2 では塩基

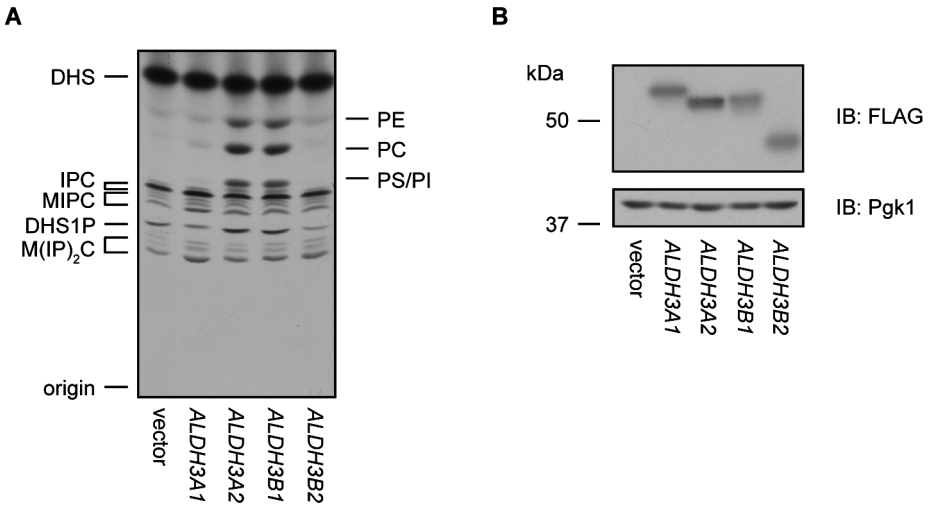


図 22 ヒト ALDH3B1 は酵母 *hfd1*Δの DHS からグリセロ脂質への代謝を回復させる

（A） 酵母 *hfd1*Δに pAKNF316 （vector），pAKNF316-hALDH3A1，pAKNF316-hALDH3A2, pAKNF316-hALDH3B1, pAKNF316-hALDH3B2 を保持させて, これらの細胞を 0.1 μCi [^{3}H]DHS, SC-ウラシル培地, 30℃で 2 時間培養した。抽出した脂質を順相 TLC （chloroform/methanol/4.2 N ammonia = 9/7/2，v/v）で展開し，オートラジオグラフィーで検出した。DHS:ジヒドロスフィンゴシン，IPC : イノシトールホスホリルセラミド，MIPC :マンノシルイノシトールホスホリルセラミド，DHS1P : ジヒドロスフィンゴシン 1-リン酸，$M(IP)_2C$: マンノシルジイノシトールホスホリルセラミド，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。 （B） （A）で使用した酵母株の細胞抽出液を調製し，各 ALDH3 タンパク質の発現量を抗 FLAG 抗体を用いて確認した。また，タンパク質量のローディングコントロールとして抗 Pgk1 抗体を用いた。IB : イムノブロッティング。

性残基が少ない（Aldh3b1 と Aldh3b3 には 3 残基，Aldh3b2 には 1 残基，図 21A）低分子量 G タンパク質 K-Ras や Cdc42 では C 末端の塩基性残基のクラスターが細胞膜局在化に寄与する(130)。そこで，これらの低分子 GTPase と同様に Aldh3b1，Aldh3b3 でも C 末端の塩基性残基が細胞膜局在に寄与している可能性を考え, Aldh3b3 の連続した 2 つのアルギニン残基（Arg462, Arg463）を Ala に置換した変異体（R462/463A）を作製した。N 末端に EGFP タグを付加した Aldh3b3-R462/463A 変異体では細胞膜局在がほとんど見られなくなり，代わりに脂肪滴膜に局在していた（図 21B）。この結果より，Aldh3b3 の細胞膜局在には C 末端領域に存在するアルギニン残基（Arg462，Arg463）が重要であることが明らかになった。Aldh3b3 の Arg462 残基は Aldh3b1 でも保存されているのに対し，Aldh3b2 では Trp である。これまでいくつかのタンパク質で Trp 残基を介した脂肪滴との結合が報告されていたため(131，132)，Aldh3b2 の C 末端

に存在する 2 つの Trp 残基を Ala に置換した変異体（W462A，W469A，W462/469A）の局在について，抗 FLAG 抗体を用いた間接蛍光抗体法で解析した（図 21C)。W462A 変異体は脂肪滴膜に局在していたものの，野生型に比べサイトゾルでの局在の割合が上昇していた。 W469A 及び W462/469A 変異体では脂肪滴膜の局在はさらに減少し，殆どがサイトゾルでの局在を示した。

次に各変異体を発現させた HeLa 細胞の総細胞抽出液を超遠心で可溶性画分と膜画分に分離した。膜画分量に検出された W462A 変異体の量は野生型に比べて減少しており，W469A 変異体ではさらに減少していた。W462/469A 変異体はほぼ全てが可溶性画分に存在していた（図 21D)。この細胞分画の結果は間接蛍光抗体法による細胞内局在の結果（図 21C）と一致している。これらの結果から，Aldh3b2 の脂肪滴への局在には C 末端領域に存在するトリプトファン残基（Trp462，Trp469）が重要であることが明らかになった。

3-2-5. ヒト ALDH3B1 は酵母長鎖アルデヒド脱水素酵素 Hfd1 の機能を相補する

Aldh3b サブファミリーのうち，*Aldh3b2* と *Aldh3b3* はげっ歯類以外では偽遺伝子であるか，もしくは存在しない(80，90)。ヒトに存在している ALDH3 ファミリーのうち，ALDH3A2 以外のどのサブタイプが S1P 分解経路に由来する長鎖アルデヒドを代謝できるか調べた。S1P 分解経路は真核生物で保存されているため，遺伝子操作の容易な酵母を解析に用いた。酵母 Hfd1 は長鎖塩基分解経路の中間代謝物として生じる長鎖アルデヒド（ヘキサデカナール，ヘキサデセナール）を酸化する。そのため，その遺伝子欠損株（*hfd1*Δ ）では長鎖塩基がグリセロ脂質へと代謝されない。*hfd1*Δ 株にヒト *ALDH3* ファミリー（*ALDH3A1*，*ALDH3A2*，*ALDH3B1*，*ALDH3B2*）を発現させて，[^{3}H]DHS でラベルし，DHS からグリセロ脂質への代謝が回復するかを調べた（図 22A)。ベクターを導入した *hfd1*Δ 株では[^{3}H]DHS がスフィンゴ脂質（IPC，MIPC，DHS1P，M(IP)$_2$C）に代謝されていたが，グリセロ脂質（PE，PC，PS，PI）へは代謝されなかった。一方，*ALDH3A2* または *ALDH3B1* を発現させると， [^{3}H]DHS はスフィンゴ脂質，グリセロ脂質双方に代謝されるようになった。*ALDH3A1* 及び *ALDH3B2* 発現株ではタンパク質発現量が *ALDH3A2* 及び *ALDH3B1* 発現株と同程度であったにも関わらず(図 22B)，[^{3}H]DHS はグリセロ脂質へ代謝されなかった。この結果より，ALDH3A2 だけでなく，ALDH3B1 も長鎖塩基に由来する長鎖アルデヒドを酸化する ALDH として機能することが示唆された。また，この結果は精製したタンパク質のヘキサデカナールに対する *in vitro* 活性測定の結果とも一致する（図 17B)。

3-2-6. ヒト ALDH3B1 はヘキサデセナールに対して高い親和性を示す

精製したヒト 3xFLAG-ALDH3B1 を用いて，ヘキサデカナール，ヘキサデセナール，オクタ

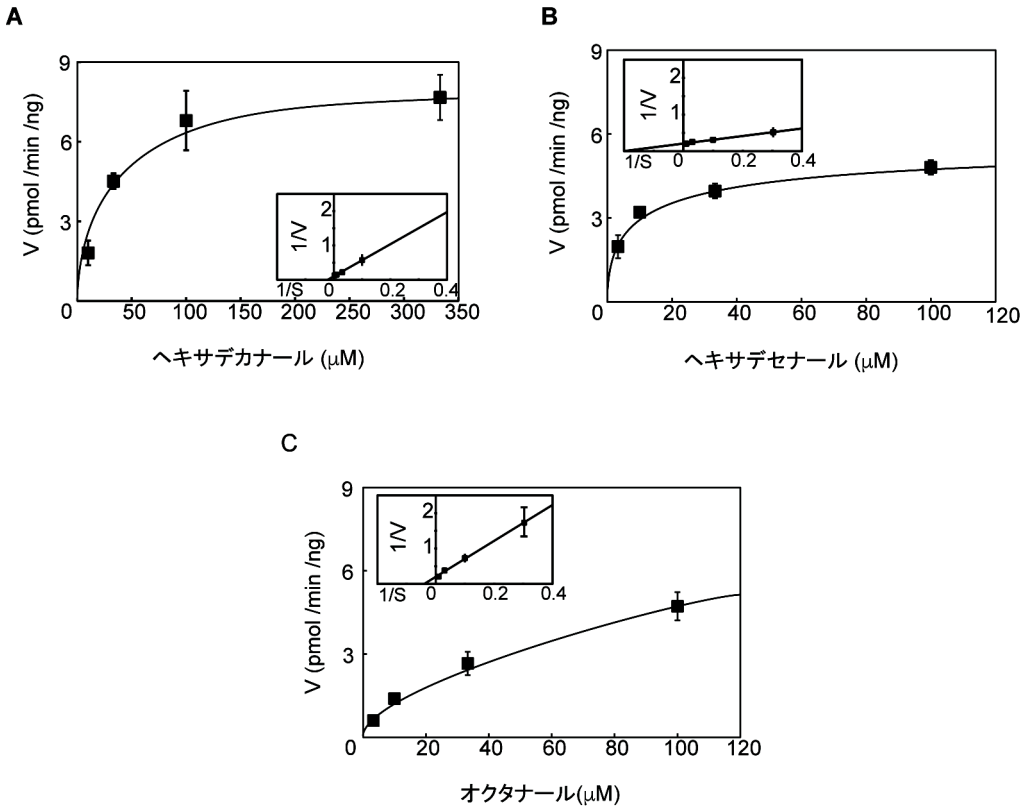


図 23　ALDH3B1 は長鎖アルデヒドに対して活性がある

（A-C） 精製した 3xFLAG-hALDH3B1（20 ng）に 500 μM NAD^+とヘキサデカナール（3.3, 10, 33, 100 μM） （A），ヘキサデセナール （3.3, 10, 33 μM） （B），オクタナール （3.3, 10, 33 μM） （C）を加え 37℃で 1.5 分間インキュベートした。生成した NADH の蛍光 （460 nm, 励起 356 nm） はプレートリーダーinfinite M200（Tecan）で測定した。得られた数値は Michaelis-Menten プロットと Lineweaver-Burk プロット （inset）で示した。 inset における横軸は基質濃度の逆数μM^{-1}であり，縦軸は反応速度の逆数 （min・ng/pmol）である。グラフの数値は 3 回の独立した実験から得られた平均±SD を示している。

ナール（図 23A-C）に対する生化学的パラメーターを算出した。V_{max} 値（pmol/min/ng），K_M 値（μM）はそれぞれヘキサデカナールに対して 9.7，45.6 であり，ヘキサデセナールに対して 4.8，4.9 であり，オクタナールに対しては 5.0，25.0 であった。このことから V_{max}値はどの基質に対してもほぼ同等の値であったが，ヘキサデセナールに対する K_M値が低いことからヘキサデセナールに高い親和性があることが示唆された。

3-2-7. ヒト ALDH3B1 の過剰発現は ALDH3A2 の機能を相補する

次に *Aldh3a2* 欠損 CHO-K1 細胞（FAA-K1A 細胞）中で，ヒト ALDH3B1 が ALDH3A2 の

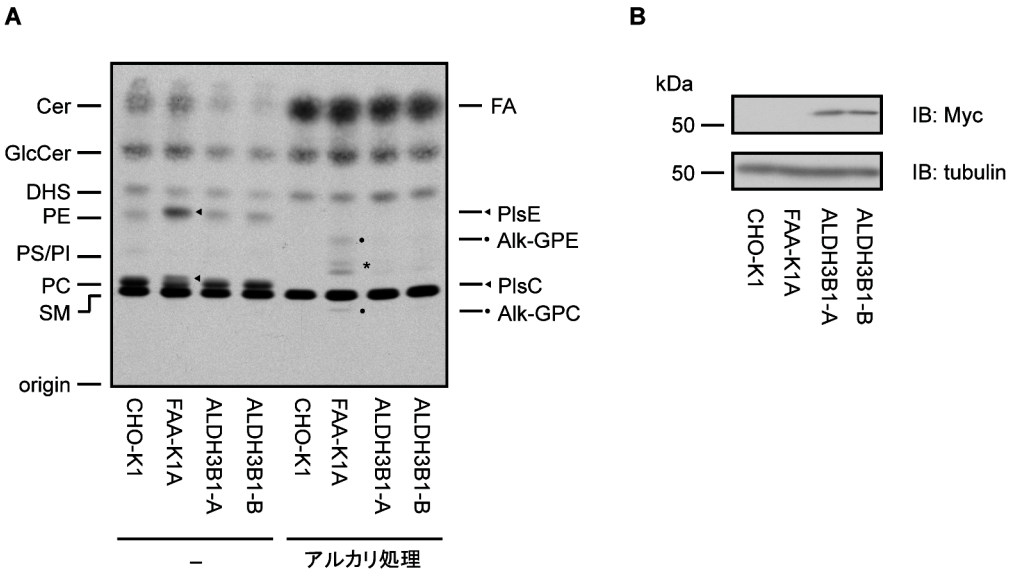


図 24 ALDH3B1 の過剰発現は ALDH3A2 の機能を相補する

（A） CHO-K1 細胞，FAA-K1A 細胞及び 2 種類のヒト ALDH3B1 安定発現細胞（FAA-ALDH3B1-A，FAA-ALDH3B1-B）は 0.125 μCi [4,5-3H]DHS を加えて 37℃で 4 時間培養し，脂質を抽出した。抽出した脂質のうち半量はアルカリ処理を行い，順相 TLC （1-ブタノール/酢酸/ 水=3/1/1，v/v） で分離し，オートラジオグラフィーで検出した。FA：脂肪酸，Cer：セラミド，GlcCer：グルコシルセラミド，DHS：ジヒドロスフィンゴシン，PE：ホスファチジルエタノールアミン，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，PC：ホスファチジルコリン, SM：スフィンゴミエリン, PlsE：プラズメニルエタノールアミン, PlsC：プラズマニルコリン， ＊は PlsE がアルカリ処理によって分解されて生じた未同定の産物である。（B）は（A）で使用した細胞株の抽出液を調製し，総タンパク質 15 μg 分を使用して，ALDH3B1 の発現量を抗 Myc 抗体を用いたイムノブロッティングで確認した。ローディングコントロールとして抗 tubulin 抗体を用いた。IB：イムノブロッティング。

機能を相補するかを調べるため，His_6-Myc-ALDH3B1 を安定的に発現する安定発現株（FAA-ALDH3B1-A 及び FAA-ALDH3B1-B）を作製した。これらの細胞株における His_6-Myc-ALDH3B1 の発現量が同程度であることをイムノブロッティングで評価した（図 24B）。CHO-K1 細胞では取り込まれた[^{3}H]DHS はスフィンゴ脂質（セラミド，グルコシルセラミド，スフィンゴミエリン），グリセロ脂質（PE，PS，PI，PC）の両方に代謝された（図 24A）。一方，FAA-K1A 細胞では[^{3}H]DHS はスフィンゴ脂質へ代謝されるのに対し，グリセロ脂質への変換は減少しており，その代わりにエーテルリン脂質（PlsE，PlsC）へと代謝された。2 つの安定発現株（FAA-ALDH3B1-A 及び FAA-ALDH3B1-A）では DHS のグリセロ脂質への変換量が CHO-K1 細胞と同程度にまで回復しており，エーテルリン脂質は検出されなかった。この結

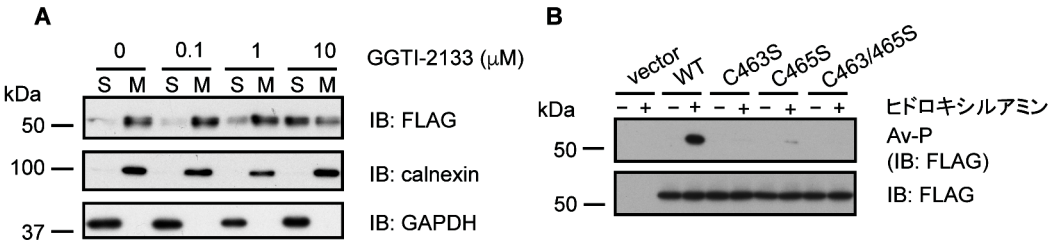


図 25 ヒト ALDH3B1 はプレニル化及びパルミトイル化を受ける

（A） pCE-puro 3xFLAG-hALDH3B1 を HeLa 細胞にトランスフェクションし，ゲラニルゲラニル化阻害剤 （GGTI-2133，0，0.1，1，10 μM） 存在下 37℃で 48 時間培養した。回収した細胞抽出液は超遠心 （100,000 g，30 分，4℃）で可溶性画分（S）と膜画分（M）に分画した。回収した各画分の ALDH3B1 は抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロッティングにより検出した。可溶性画分及び膜画分のコントロールとして抗 GAPDH 抗体 , 抗 calnexin 抗体 を用いた。（B） HEK 293T 細胞に pCE-puro 3xFLAG-hALDH3B1 （ WT ） 及び pCE-puro 3xFLAG-hALDH3B1-C463S， pCE-puro 3xFLAG-hALDH3B1-C465S， pCE-puro 3xFLAG-hALDH3B1-C463/465S）をトランスフェクションし，アシルビオチン置換法を用いてパルミトイル化を検出した （上段，AvP-IB）。ヒドロキシルアミン（-）ではタンパク質のパルミトイル基が脱離しないので，ネガティブコントロールである。総抽出液中の ALDH3B1 の発現量は抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロッティングで確認した （下段，IB）。AvP ： アビジン沈降画分，IB :イムノブロッティング。

果より，哺乳類細胞において過剰発現した ALDH3B1 は ALDH3A2 の機能を相補することが示された。

3-2-8. ALDH3B1 は 2 種類の脂質修飾を受ける

マウス Aldh3b1 が細胞膜に局在することを既に示したが（図 19B），ヒト ALDH3B1 の膜局在についても調べた。3xFLAG-ALDH3B1 を過剰発現させた HeLa 細胞の総細胞抽出液を可溶性画分と膜画分に分画したところ，ALDH3B1 のほとんどは膜画分に存在していた（図 25A）。ALDH3A2 には C 末端に 1 回膜貫通領域が存在しているが，ALDH3B1 には膜貫通領域と予想されるアミノ酸配列が存在しない。代わって ALDH3B1 の C 末端にはプレニル化モチーフである CaaX 配列が存在する。このため ALDH3B1 の Cys465 はプレニル化（末端が Leu なので特にゲラニルゲラニル化）されると予測された。また，さらに Cys465 の近傍に別の Cys 残基（Cys463）が存在するため，Cys463 はパルミトイル化される可能性があった（図 21A）。そこで, まずゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ I 阻害剤 GGTI-2133 によって ALDH3B1 の膜局在が変化するかを調べた。GGTI-2133 存在下では，濃度依存的に ALDH3B1 が膜画分から可溶

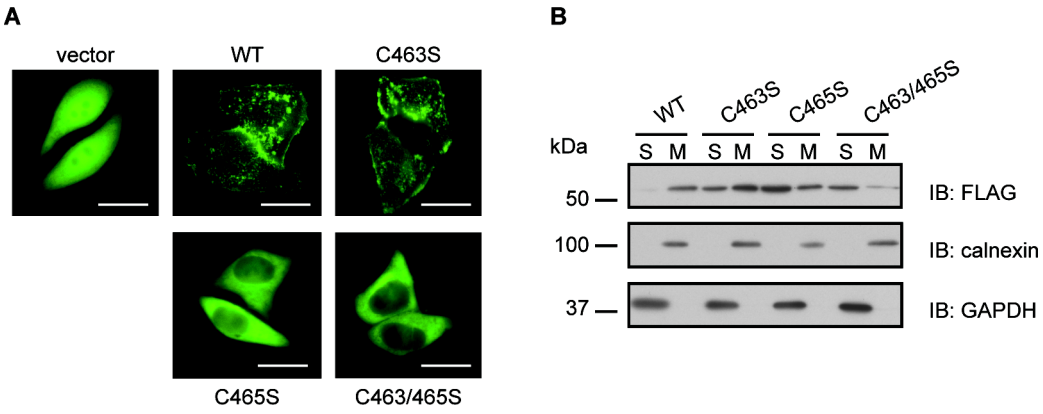


図 26 ALDH3B1 の脂質修飾は細胞内局在に重要である

（A）HeLa 細胞に pEGFP（vector）, pEGFP-hALDH3B1（WT）及び pEGFP-hALDH3B1-C463S, pEGFP-hALDH3B1-C465S, pEGFP-hALDH3B1-C463/465S をトランスフェクションし，37℃で 48 時間培養後に蛍光顕微鏡 DM5000B（Leica） で観察した。スケールバーは 25 μm を示す。（B） HeLa 細胞に pCE-puro 3xFLAG-hALDH3B1 （WT） 及び pCE-puro 3xFLAG-hALDH3B1-C463S, pCE-puro 3xFLAG-hALDH3B1-C465S, pCE-puro 3xFLAG-hALDH3B1-C463/465S をトランスフェクションし，37℃で 48 時間培養した。回収した細胞抽出液は超遠心（100,000 g, 30 分, 4℃）で可溶性画分（S）と膜画分（M）に分画した。回収した各画分に含まれる ALDH3B1 は抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロッティングにより検出した。 可溶性画分及び膜画分コントロールとして， 抗 GAPDH 抗体， 抗 calnexin 抗体を用いた。IB ：イムノブロッティング。

性画分へとシフトした（図 25A）。このことから ALDH3B1 はゲラニルゲラニル化によって膜に局在することが示唆された。

続いてパルミトイル化の可能性についてアシル-ビオチン置換法によって検討した。この方法ではタンパク質のパルミトイル基をビオチンに置換した後，アビジンで検出する(133)。野生型 ALDH3B1 はアビジンによってバンドが検出されたことから，パルミトイル化されていることが明らかになった（図 25B）。また，パルミトイル化部位が，予測された Cys463 残基であるかを明らかにするために，Cys463 を Ser 残基に置換した C463S 変異体を作製した。これに加えて, プレニル化 Cys 残基（C465S）及び二つの脂質修飾 Cys 残基を置換した変異体（C463/465S）も作製した。これら変異体のうち，C463S 及び C463/465S ではパルミトイル化が検出されなかった。このことから Cys463 残基がパルミトイル化されていることが明らかとなった。プレニル化変異体（C465S）ではパルミトイル化レベルが減少しており，Cys463 のパルミトイル化に先立って，Cys465 のプレニル化が必要であることが示唆された。

3-2-9. 脂質修飾は ALDH3B1 の細胞膜局在に重要である

脂質修飾がヒト ALDH3B1 の細胞内局在に影響を与えるかを調べるために，EGFP を融合した野生型及び脂質修飾変異体 ALDH3B1 を HeLa 細胞に発現させ，蛍光顕微鏡で観察した。EGFP はサイトゾル及び核に局在していた。野生型は主に細胞膜とサイトゾル内に点状に局在していた （図 26A)。パルミトイル化変異体（C463S）も野生型と同様の局在を示した。一方で，プレニル化変異体（C465S）及び二重脂質修飾変異体（C463/465S）はサイトゾルに局在していた。これらの結果より，プレニル化は ALDH3B1 の細胞膜局在に必要であることが明らかとなった。

超遠心による細胞分画によっても脂質修飾による膜局在への影響を調べた。野生型の ALDH3B1 は 90%以上が膜画分に存在していた。顕微鏡観察では野生型とパルミトイル化変異体（C463S）で局在の変化が示されなかったが，細胞分画法ではパルミトイル化変異体の膜画分中の割合が野生型と比較して低下していた（図 26B)。プレニル化変異体（C465S）は可溶性画分中で多く検出され，二重脂質修飾変異体（C463/465S）ではさらに高い割合のものが可溶性画分中に回収された。これらの結果より，パルミトイル化は ALDH3B1 がより強く膜に局在するために必要であることが明らかになった。

3-2-10. プレニル化は ALDH3B1 の長鎖アルデヒドに対する活性に必要である

脂質修飾がヒト ALDH3B1 の活性に及ぼす影響を調べた。3xFLAG-ALDH3B1，3xFLAG-ALDH3B1-C463S，3xFLAG-ALDH3B1-C465S，3xFLAG-ALDH3B1-C463/465S 変異体をアフィニティー精製し，*in vitro* で活性測定を行った（図 27A)。ヘキサデカナールに対する活性は野生型と C463S 変異体間で有意な差はなかったが，C465S 及び C463/465S の活性は野生型と比べて有意に低下していた。一方，オクタナールに対する活性は野生型と各変異体とで差はなかった。次に，3xFLAG-C463/465S 発現プラスミドを保持した *hfd1*Δ 酵母を作製し，[^{3}H]DHS の代謝を調べた。酵母株中の野生型及び C463/465S 変異体の発現量は同程度であった（図 27C)。野生型 ALDH3B1 発現株では[^{3}H]DHS がグリセロ脂質へと代謝されたのに対し，C463/465S 発現株ではほとんど代謝されなかった（図 27B)。これらの結果は，プレニル化が ALDH3B1 のヘキサデカナールに対する活性に必要であることを示唆している。

3-2-11. マウス Aldh3b1-3 タンパク質は脂質修飾される

ヒト ALDH3B1 がプレニル化，パルミトイル化されていることをうけて，次にマウス Aldh3b タンパク質についても脂質修飾の有無を調べた。マウス Aldh3b タンパク質の C 末端もすべて -Cys-Thr-Leu-Leu-COOH であり，ヒト Aldh3b1 と同様にプレニル化される可能性があった（図 21A)。また，パルミトイル化される Cys 残基が 1 箇所であったヒトと異なり，マウス Aldh3b1

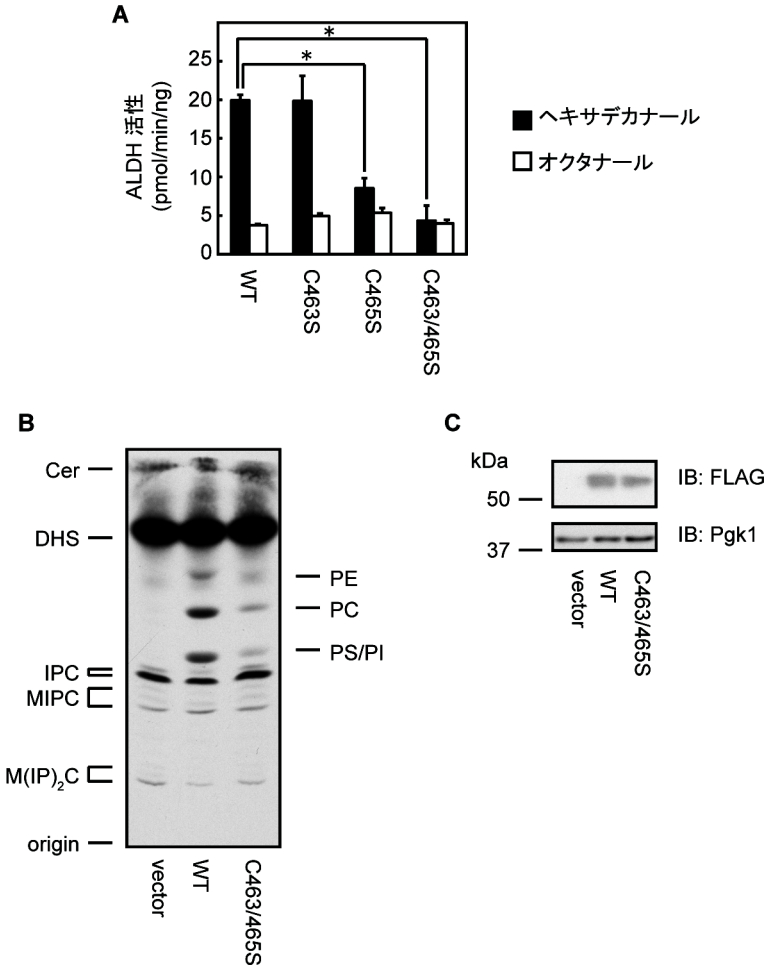


図 27 プレニル化は ALDH3B1 のヘキサデカナールに対する活性に重要である

（A） HEK 293T 細胞に pCE-puro 3xFLAG-hALDH3B1 （WT） 及び pCE-puro 3xFLAG-hALDH3B1-C463S， pCE-puro 3xFLAG-hALDH3B1-C465S， pCE-puro 3xFLAG-hALDH3B1-C463/465S をトランスフェクションし，抗 FLAG M2 ビーズを用いたアフィニティー精製を行った。精製したタンパク質 （10-20 ng） に 500 μM NAD^+，100 μM ヘキサデカナールまたはオクタナールを加えて 37℃で 15 分間インキュベートした。生成した NADH の蛍光（460 nm，励起 356 nm） はプレートリーダーinfinite M200（Tecan）で測定した。数値は 3 回の独立した実験の平均±SD を示している。(* p <0.05; Tukey 検定） （B） 酵母 *hfd1*Δに pAKNF316 （vector)，pAKNF316-hALDH3B1 （WT)，pAKNF316-hALDH3B1- C463/465S を保持させ，これらの細胞を 0.1 μCi [4,5-3H]DHS，SC-uracil 培地で 30℃，2 時間培養した。抽出した脂質を順相 TLC（chloroform/methanol/4.2 N ammonia （9/7/2, v/v)）で展開した。(DHS : ジヒドロスフィンゴシン，IPC：イノシトールホスホリルセラミド，MIPC：マンノシルイノシトールホスホリルセラミド，DHS1P：ジヒドロスフィンゴシン 1-リン酸，$M(IP)_2C$：マンノシルジイノシトールホスホリルセラミド，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）（C）は（B）で使用した酵母株の細胞抽出液を調製し，各抽出液中の ALDH3B1 の発現量を抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロッティングで確認した。 またローディングコントロールとして抗 Pgk1 抗体を用いた。 IB：イムノブロッティング。

には予測されるパルミトイル化部位が 2 カ所（Cys462，Cys463）存在した。まず，ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ I 阻害剤（GGTI-2133）存在下で膜局在が変化するかを調べた（図 28A）。3xFLAG タグを付加したマウス Aldh3b タンパク質を HeLa 細胞に発現させ，総細胞抽出液を可溶性画分と膜画分に分画した。阻害剤非存在下では，各 Aldh3b タンパク質の半分以上が膜画分に存在していた。一方，阻害剤を加えた場合では，どの Aldh3b タンパク質の膜画分量も減少し，多くが可溶性画分に回収された。このことから Aldh3b1，Aldh3b2，Aldh3b3 はすべてプレニル化されることが示唆された。次に，GGTI-2133 存在下で細胞を培養後，精製した Aldh3b タンパク質の長鎖アルデヒド脱水素酵素活性についても調べた（図 28B）。その結果，すべてのサブタイプの活性が阻害剤添加によって有意に低下した。この結果は，図 27A の脂質修飾変異体を用いた解析結果とも一致する。

続いてアシルビオチン置換法を用いて，マウス Aldh3b タンパク質のパルミトイル化の検出を行った。その結果，Aldh3b1 のみがパルミトイル化されていることが示された（図 28C）。また，マウス Aldh3b1 のパルミトイル化部位を同定するため，予測されたパルミトイル化 Cys 残基を Ser に置換した変異体（C462S，C463S，C462/463S）を作製した。 1 つの Cys 残基のみを置換した C462S，C463S 変異体はどちらもパルミトイル化されていたが，C462/463S 二重変異体はパルミトイル化修飾を受けていなかった（図 28D）。このことはマウス Aldh3b1 の Cys462，Cys463 残基の両方がパルミトイル化されていることを示している。

3-2-12. *Aldh3a2* 欠損細胞は長鎖塩基高感受性を示す

長鎖塩基に由来する長鎖アルデヒドの細胞毒性を評価するために，CHO-K1 細胞と FAA-K1A 細胞を用いて MTT アッセイを行った。長鎖塩基としては DHS，SPH，PHS を用いた（図 29A-C）。SPH 及び PHS を用いた場合では，濃度が高くなるにつれて CHO-K1 細胞の生存率は低下し，SPH では 0 μM に比べて 2.5 μM で生存率が 1/10 以下となり，PHS では 0 μM に比べて 5 μM で 60%程度に生存率は低下した。一方で DHS では 5 μM でも CHO-K1 細胞の生存率に大きな変化はなかった。しかし，FAA-K1A 細胞では CHO-K1 細胞に比べてどの長鎖塩基に対しても感受性が高かった。1 μM SPH 存在下では，CHO-K1 細胞の生存率は 50%程度であるのに対して，FAA-K1A 細胞では生存率が 1/10 以下に低下していた。また，より低い濃度（0.25，0.5 μM でも FAA-K1A 細胞は CHO-K1 細胞に比べて生存率が低下していた。 5 μM PHS 存在下では，

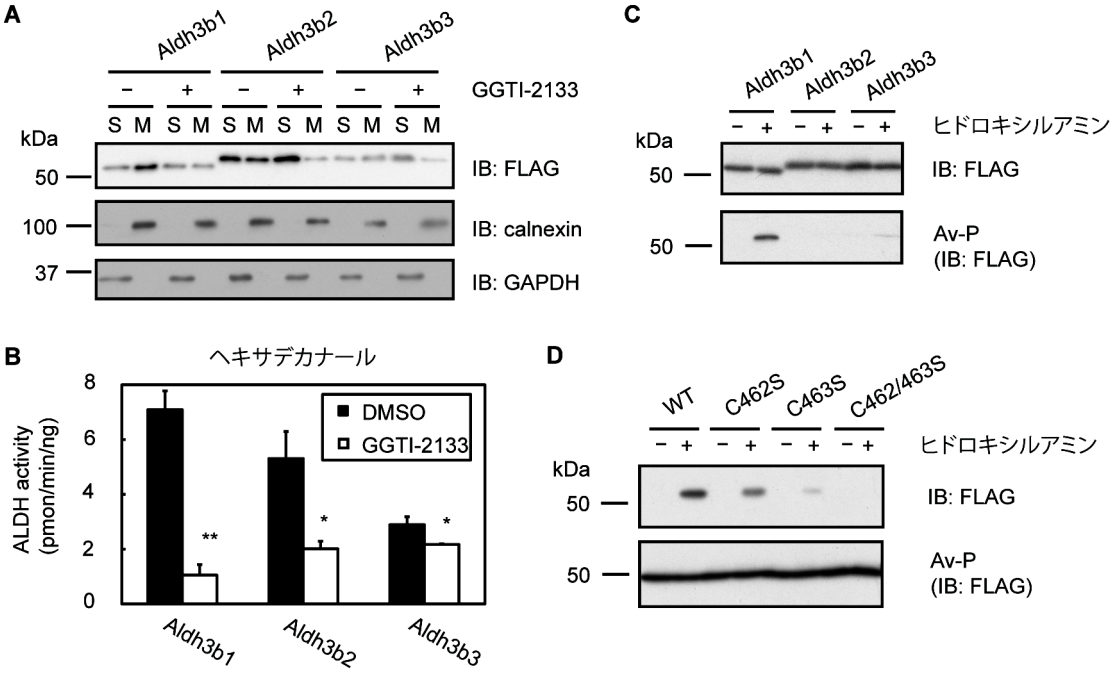


図 28 マウス Aldh3b タンパク質の脂質修飾解析

（A-C） HeLa 細胞に pCE-puro 3xFLAG-mAldh3a2，pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b1，pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b2 または pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b3 をトランスフェクションした。（D） HeLa 細胞に pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b1 （WT），pCE-puro 3xFLAG- mAldh3b1-C462S，pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b1-C463S，pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b1-C462/463S をトランスフェクションした。（A） 10 μM GGTI-2133 存在下または非存在下（DMSO）で 37℃，48 時間培養し，回収した細胞抽出液は超遠心 （100,000 g，30 分，4℃） で可溶性画分（S）と膜画分（M）に分画した。回収した各画分の Aldh3b タンパク質の発現量は抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロッティングで確認した。可溶性画分及び，膜画分のコントロールとして抗 GAPDH 抗体，抗 calnexin 抗体を使用した。（B） 10 μM GGTI-2133 存在下または非存在下で 37℃，48 時間培養し，M2 ビーズを用いてアフィニティー精製した。精製タンパク質 10 ng に 500 μM NAD^+，100 μM ヘキサデカナールを加えて 15 分，37℃インキュベートした。生成した NADH の蛍光（460 nm，励起 356 nm） はプレートリーダーinfinite M200（Tecan）で測定した。データは 3 回の独立した実験の平均±SD を示している。（* p <0.05，**p<0.01; t-検定） （C） HEK 293T 細胞に pCE-puro 3xFLAG-1 （ vector ）， pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b1 ， pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b2 または pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b3 をトランスフェクションした。(D)HEK 293T 細胞に pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b1，pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b1-C462S， pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b1- C463S または pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b1-C462/463S をトランスフェクションした。（C-D）37℃で 24 時間培養後，細胞抽出液を回収し，アシルビオチン置換法を

行ってパルミトイル化を検出した （下段，AvP-IB）。総抽出液中の Aldh3b タンパク質の発現量は抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロッティングで確認した （上段，IB）。AvP : アビジン沈降画分，IB : イムノブロッティング。

CHO-K1 細胞は生存率が 60%程度であるのに対して，FAA-K1A 細胞の生存率は 1/10 以下に低下していた。また，より低い濃度（1，2.5 μM）でも FAA-K1A 細胞は CHO-K1 細胞に比べて生存率が低下していた。5 μM DHS 存在下では CHO-K1 細胞の生存率に変化はなかったが，FAA-K1A 細胞の生存率は 40%まで低下した。これらの結果から，FAA-K1A 細胞は長鎖塩基に対して高感受性を示すことが明らかになった。*Aldh3a2* の欠損による長鎖塩基に対しての高感受性は，長鎖塩基に由来する長鎖アルデヒドの毒性によるものと考えられる。また，長鎖塩基の構造の違いによっても毒性の強さが異なり，CHO-K1 細胞及び FAA-K1A 細胞においては SPH，PHS，DHS の順で強い毒性を示した。続いて， 5 μM PHS 存在下で 24 時間培養後の CHO-K1 細胞，FAA-K1A 細胞，FAA-ALDH3A2-B 細胞の様子を観察した（図 29D）。FAA-ALDH3A2-B 細胞は FAA-K1A 細胞に 3xFLAG-ALDH3A2 を入れ戻した安定発現株である(109)。FAA-K1A 細胞では細胞内に白い空胞のような構造体が多く観察された。一方で，FAA-ALDH3A2-B 細胞は FAA-K1A 細胞に比べて空胞が少なく，ほとんど観察されなかった。この結果から，*Aldh3a2* の欠損は PHS 存在下での生存率低下だけでなく，細胞形態の異常も引き起こすことが明らかになった。

3-3. 考察

ヒトゲノムには 19 種類, マウスゲノムには 21 種類の *ALDH* 遺伝子が含まれている(79, 80)。このような多様性は外来または内在に由来する多種多様なアルデヒドの代謝に対応するためと考えられる。ALDH はアルデヒドの無毒化に重要な酵素であるが, ALDH すべての基質特異性，組織発現分布，細胞内局在などは完全には解析されていない。また，生体内に存在する多様なアルデヒドのうち, 脂質に由来する長鎖アルデヒドを酸化する ALDH は Aldh3a2 以外知られていなかった。特に Aldh3b サブファミリーは，ALDH3 ファミリーに属していながら，ほとんど解析が行われていなかった。本研究ではマウス Aldh3b2 と Aldh3b3 に ALDH 活性があることをはじめて明らかにした（図 17A）。また，ALDH3B1 が *in vitro* 及び酵母や哺乳類細胞で長鎖アルデヒドを代謝することができることを示した（図 17，22，23，24）。これまでの報告では ALDH3B1 が炭素数 6 から 9 までのアルデヒドに活性を示すことが報告されていたが，この報告では長鎖アルデヒドに対する活性は調べられていなかった(134)。今回得られた結果と合わせて考えると, ALDH3B1 は中鎖から長鎖の広範なアルデヒドに対して活性があると考えられる。*Aldh3b1* は肺で高発現しており，*Aldh3a2* KO マウスの肺におけるヘキサデカナールに対する

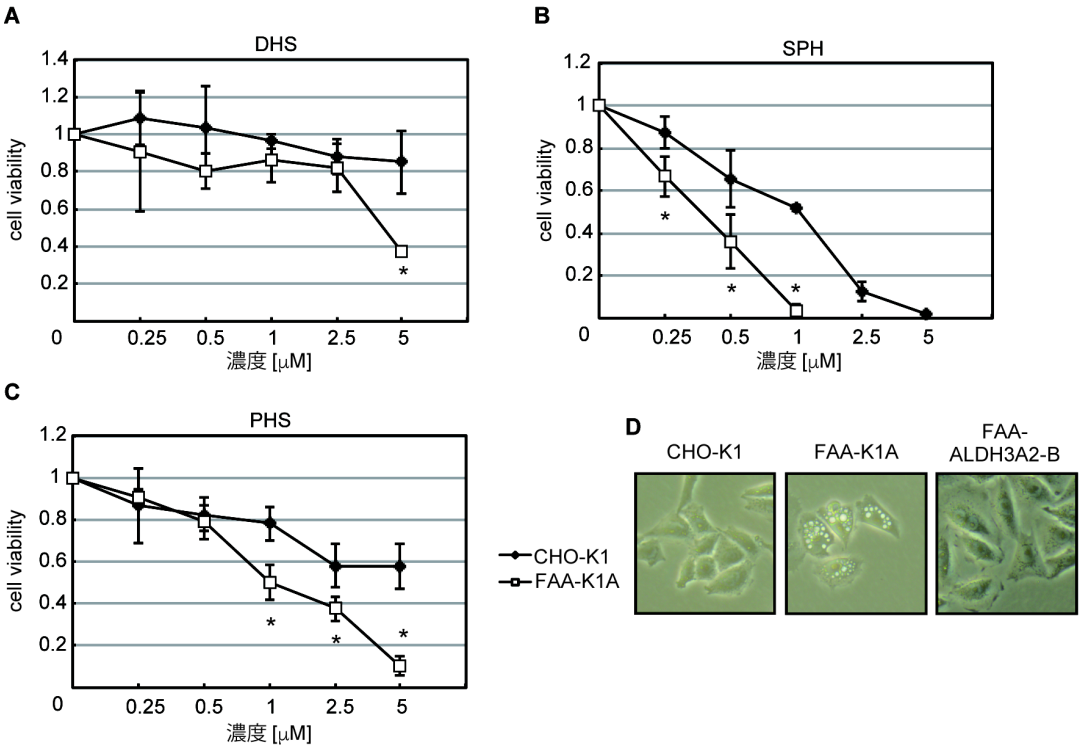


図 29 *ALDH3A2* の欠損は長鎖塩基に対して高感受性になる

（A-C） CHO-K1 細胞（黒色），FAA-K1A 細胞（白色）に（A）DHS，（B）SPH，（C）PHS をそれぞれ 0，0.25，0.5，1，2.5，5 μM 存在下で 37℃，24 時間培養後に MTT アッセイを行った。細胞を含まない培地をバックグラウンドとして差をとり，濃度 0 μM のときの数値を 1 とした際の相対値として各条件での生存率（cell viability）を算出した。また，独立した 3 回の実験の平均±SD を示している。（* $p<0.05$，t 検定） FAA-K1A 細胞の SPH 2.5 及び 5 μM の条件は検出できなかった。（D） CHO-K1 細胞，FAA-K1A 細胞およびその ALDH3A2 の入れ戻し安定発現株である FAA-ALDH3A2-B 細胞を 5 μM PHS を含む培地で 37℃，24 時間培養後，細胞を微分干渉顕微鏡 Axio Vert. A1（Zeiss）で観察した。

残存活性は高い(100，109)。これらのことから，肺における長鎖アルデヒドの酸化は主に Aldh3b1 が担っていると推察される。一方，*Aldh3a2* KO マウスの表皮においても，ヘキサデカナールに対する活性は大部分残存しているが，*Aldh3b1* の発現量は低い(100)。本研究によって, Aldh3b1 以外にも Aldh3b2 及び Aldh3b3 がヘキサデカナールに対して活性を示したことから，これらのサブタイプがマウス表皮で機能している可能性が考えられる。特に *Aldh3b2* については既に表皮で高く発現しているとが示されているため, *Aldh3a2* KO マウス表皮の残存活性は *Aldh3b2* の寄与が大きいと考えられる(109)。*Aldh3a2* KO マウスはヒト SLS 患者にみられる顕著な病理所見を示さず，SLS の動物モデルとしては十分でない。SLS の発症メカニズム及

び治療法確立のためには動物モデルが必須であるが，*Aldh3a2/b2* の二重欠損マウスを作製することで，SLS 動物モデルを確立できる可能性が示された。

3-3-1. Aldh3b1 の役割

ALDH3B1 の活性は既に長鎖アルデヒド脱水素酵素として知られていた ALDH3A2 の活性パターンと類似していた(96)。しかし，両者の細胞内局在は異なっており，ALDH3A2 が主に小胞体局在であるのに対して(98)，ALDH3B1 は主に細胞膜に局在していた。これらの ALDH はそれぞれ自身の局在するオルガネラの脂質由来アルデヒドの酸化に関わっている可能性がある。例えば，長鎖塩基 1-リン酸分解に由来するヘキサデカナール，ヘキサデセナールは小胞体局在の S1P リアーゼによって産出されるため, これらの酸化は主に ALDH3A2 が担うと考えられる。一方で, ALDH3B1 は細胞膜局在であるため, 長鎖塩基 1-リン酸分解によるヘキサデカナール，ヘキサデセナール酸化への寄与は小さいと考えられる。ALDH3B1 は酵母 *hfd1*Δ 株及び FAA-K1A 細胞の DHS からグリセロ脂質への代謝を回復させた。しかし，この効果は過剰発現された ALDH3B1 の一部分が細胞膜への輸送途中で小胞体膜上に一時的に存在することで得られた可能性がある。プレニル化後の-aaX 部分の切断及び C 末端メチル化は小胞体膜上で行われることから，ALDH3B1 が翻訳後修飾の過程で小胞体膜上に一時的に留まりうる。細胞膜にはビニルエーテル結合をもつプラズマローゲンや不飽和脂肪酸を含むグリセロリン脂質が存在している。不飽和脂肪酸及びプラズマローゲンは活性酸素種による非酵素的反応で長鎖アルデヒドへと変化しうる(74，135)。そのため，ALDH3B1 はこのようなアルデヒドの酸化を担っている可能性がある。実際，ALDH3B1 の過剰発現は，過酸化水素や 4-ヒドロキシ 2-ノネナール存在下での HEK-293T 細胞の生存率低下を解消することから，酸化ストレスに対する防御機能があると考えられている(100)。

3-3-2. Aldh3b2 及び Aldh3b3 の役割

マウス Aldh3b2 及び Aldh3b3 の機能については未だ報告されていないが，本研究において Aldh3b2，Aldh3b3 がオクタナール，ヘキサデカナール，ヘキサデセナールに対して活性を示すことが明らかとなったことから，Aldh3b1 と同様にこれらの ALDH も脂質に由来するアルデヒドの代謝に関与していると考えられる(136)。Aldh3b2，Aldh3b3 はそれぞれが局在する脂肪滴，細胞膜で生じたアルデヒドの酸化に関与すると考えられるが，生体内での実際の基質については今後の解析が必要である。

Aldh3b2 は哺乳類のゲノムに存在しているが，げっ歯類以外では機能を失った偽遺伝子であると考えられている(90)。ヒト ALDH3B2 のアルデヒド脱水素酵素活性はこれまで報告されていない。本研究においてもヒト ALDH3B2 は中鎖及び長鎖アルデヒドに対して活性を示さなか

った（図 17B）。RT-PCR の結果でマウス *Aldh3b2* は肝臓，腎臓以外の多くの組織で発現していた（図 18）。他の ALDH と比較して *Aldh3b2* は特に脂肪組織（WAT，BAT）での発現量が高く，脂肪組織は Aldh3b2 が局在する脂肪滴の発達が顕著である。そのため，脂肪組織において Aldh3b2 が重要な役割を持つと推測される。一方，*Aldh3b3* は精巣で発現していた。精巣は多価不飽和脂肪酸を多く含んでおり(137)，多価不飽和脂肪酸は活性酸素種によって酸化されてアルデヒドを生じやすい。そのため，*Aldh3b3* が精巣で発現していることは不飽和脂肪酸に由来するアルデヒドを除去するという点で重要である可能性がある。

3-3-3. Aldh3 ファミリーの細胞内局在

Aldh3 タンパク質は細胞内局在において多様性に富んだ集団である。Aldh3a1 はサイトゾル局在であり，他の Aldh3 タンパク質は膜局在である。Aldh3a2 は C 末端付近に 1 回膜貫通領域をもち，スプライシングアイソフォーム間で局在化シグナルが異なる。マウスのメジャーアイソフォームの C 末端 KDQL 配列は小胞体局在化シグナルであり，マイナーアイソフォームの C 末端 SKH 配列はペルオキシソーム局在化シグナルである(98)。本研究では Aldh3b1 と Aldh3b3 が細胞膜，Aldh2b2 が脂肪滴に局在することを明らかにした（図 19B）。脂肪滴及び細胞膜が共に脂質に富んでいることを踏まえると，Aldh3b タンパク質は脂質過酸化によって生じたアルデヒドを酸化する役割があると推察される。Aldh3 タンパク質間で，今回調べた基質に対する活性にはそれほど大差なかった。このことから，Aldh3 ファミリーが 5 種類存在する意義は，各々の ALDH が異なる局在をすることで，異なるオルガネラでアルデヒドを除去できるようにするためであると思われる。

Aldh3b2 と Aldh3b3 の配列同一性は 86%と高いにも関わらず，細胞内局在は異なっていた（図 19B）。Aldh3b2 と Aldh3b3 の配列の一部を互いに入れ替えたキメラタンパク質を用いた局在解析からそれぞれの C 末端配列が適切な局在に重要であることが示唆された（図 20）。しかし，キメラタンパク質の細胞内局在が完全に一方の細胞内局在を示すのではなく，中間的な局在も示したことから，Aldh3b2 の C 末端以外の領域も脂肪滴膜局在に関与している可能性がある。また，Aldh3b2 の C 末端領域のうち，脂肪滴局在には特に 462 と 469 番目の Trp 残基が重要であることが示された（図 21C，D）。469 番目の Trp は Aldh3b3 でも保存されており，細胞膜に局在できなくなった Aldh3b3-R462/463A 変異体が脂肪滴に局在する原因となっていると思われる。これまでに，タンパク質の Trp 残基と脂肪滴結合の関係性はいくつか報告されており(131, (132，138)，トリグリセリド分解に関わる CGI-58 では 4 残基ごとに並ぶ 3 つの Trp 残基が脂肪滴局在に重要であることが示されている(131)。また，Trp 残基はリン脂質（PC）膜とカチオン-π 相互作用で結合すると考えられている(139)。CGI-58 の構造は未だ解き明かされていないが，Trp リピート周辺が α ヘリックスを形成しているならば，4 残基の間隔はヘリックス 1 周分

にほぼ相当し，Trp リピートはほぼ直線で近接した配置をとると考えられる。Aldh3b2 の場合，2 つの Trp 残基（Trp462，Trp469）は 7 残基離れた位置に存在している（図 21A）。Trp469 のさらに 7 残基 C 末端側にはプレニル化 Cys が存在している。ALDH3A2 の X 線結晶構造解析より，Aldh3b2 の対応する領域はαヘリックス構造になっていると推測されている(145)。αヘリックス構造は 1 周約 3.6 残基で構成されるため，もし仮にこの領域がαヘリックス構造をとるならば，2 つの Trp 残基とプレニル化 Cys がヘリックス 2 周間隔で配置され，CGI-58 と同じようにこれらの残基が 1 直線に並ぶ（図 21E）。このラインが膜表面との接線となり，膜との結合を強化していることが推測される。しかし，これらの残基だけで十分に脂肪滴特異的に局在できるかは不明であり，脂肪滴膜局在化メカニズムについては今後更なる解析が必要である。

Aldh3b3 の細胞膜局在には 462, 463 番目の Arg 残基が重要であることが示された（図 21B）。プレニル化される低分子 GTPase の C 末端は一般的に塩基性残基に富んでいる。これらの塩基性残基は細胞膜の細胞質側に多く存在しているホスファチジルセリンやホスファチジルイノシトール 4, 5-ビスリン酸 （PIP_2）などの負電荷脂質と相互作用することで，低分子 GTPase の細胞膜局在に寄与していると考えられている。Cdc42 では C 末端の近接した Arg 残基（Arg186, Arg187）が PIP_2 との相互作用に重要であることが *in vitro* で示されている(140)。このことから，Aldh3b3 も 462，463 番目の Arg 残基の PIP_2 との相互作用を介して細胞膜に局在する可能性がある。

3-3-4. Aldh3b タンパク質における脂質修飾の役割

本研究では，Aldh3b タンパク質の脂質修飾についても明らかにした（図 25，28）。Aldh3b タンパク質は保存された C 末端 4 アミノ酸（CTLL）を有しており，これは典型的なプレニル化モチーフ （CaaX）である。マウス Aldh3b タンパク質はすべて膜局在するが，ゲラニルゲラニル化阻害剤で膜局在が阻害された（図 28A，B）。このことは，マウス Aldh3b1，Aldh3b2, Aldh3b3 すべてがゲラニルゲラニル化によって膜に繋留されていることを示唆している。また，その他多くのプレニル化修飾タンパク質と同様に，Aldh3b1 もプレニル化だけでなく，パルミトイル化を受けていた（図 28C）。プレニル化単独では膜への繋留に十分ではなく，むしろ一時的なものであり，パルミトイル化されることではじめて安定的に膜へされるといった報告がある(141，142)。野生型ヒト ALDH3B1 は細胞分画においてそのほとんどが膜画分より回収される一方，パルミトイル化変異体，プレニル化変異体 （C463S，C465S）では膜画分での存在量が減少し，可溶性画分で増加していた（図 26B）。そのため，ALDH3B1 にみられる 2 種類の脂質修飾は共に安定的な細胞膜との結合に必要であると考えられる。脂質修飾を受ける ALDH はこれまでに知られておらず, Aldh3b1, Aldh3b2, Aldh3b3 は新しいタイプの ALDH といえる。また，プレニル化タンパク質は低分子 GTPase（Rho，Ras，Rab），G タンパク質，ラミンなど

の限られたファミリーにほとんどが属しており，Aldh3b ファミリーはプレニル化タンパク質の観点からも新しいタイプのタンパク質といえる。

Ras をはじめとする低分子 GTPase の翻訳後修飾において，プレニル化はパルミトイル化に先立って行われる(143，144)。Rac1 や酵母 Ras のプレニル化変異体ではパルミトイル化レベルが大きく減少することが報告されている(143，144)。同様に，ヒト ALDH3B1 のプレニル化変異体 （C465S）においても，パルミトイル化部位は存在しているにも関わらず，パルミトイル化レベルは大きく減少した（図 25B)。このことから，タンパク質アシルトランスフェラーゼが ALDH3B1 を認識するには先行するプレニル化による膜への結合あるいは構造変化が必要であると考えられる。 マウス Aldh3b1 はヒトの 1 箇所とは異なり， 2 箇所のシステイン残基がパルミトイル化されていた。(図 28D)。マウス Aldh3b1 もヒトのものと同様にパルミトイル化に先行してプレニル化が行われると考えられる。マウス Aldh3b2 及び Aldh3b3 は配列上 C 末端領域にパルミトイル化されうるシステイン残基はみられず（図 21A)，実際パルミトイル化は検出されなかった(図 28C)。この結果より, Aldh3b サブファミリー中, パルミトイル化は Aldh3b1 に固有の翻訳後修飾であることが明らかになった。

ヒト ALDH3B1 のプレニル化阻害では膜局在のみならず，ヘキサデカナールに対する活性も低下していた（図 27A)。一方で，プレニル化変異体ではオクタナールに対する活性には変化がなかった。ゲラニルゲラニル化阻害剤を用いた Aldh3b2，Aldh3b3 の解析においても同様の結果であった（図 26B)。ヘキサデカナールはオクタナールより疎水性が高く，細胞内では膜に，*in vitro* アッセイでは非イオン性界面活性剤のミセルに存在するものと考えられる。そのため，プレニル化によって ALDH3B タンパク質が膜またはミセルへ局在することが疎水性の高い基質にアクセスするために重要であると考えられる。

一方で，脂質修飾による ALDH3B タンパク質 C 末端の構造変化が基質認識に関わる可能性もある。ALDH3A2 の構造解析より，長鎖アルデヒドを認識するために重要なαヘリックス領域が明らかとなった(145)。この領域は ALDH3B タンパク質においては C 末端領域に相当する部位である。タンパク質の両末端はフレキシブルであり，特定の構造を保持しない場合が多い。しかし，脂質修飾によってタンパク質の末端領域がαヘリックス構造に固定されることが，N 末端脂質修飾であるミリストイル化で見出されている(146)。ALDH3B タンパク質においても，プレニル化によって本来特定の構造をもたない C 末端がαヘリックス構造をとるようになり，ヘキサデカナールの認識に重要となる可能性がある。この考えでは，プレニル化の阻害や変異によって，長鎖アルデヒドの認識に重要な C 末端αヘリックスの構造が保持できなくなり，活性を失ったと解釈される。また，ALDH3A2 の構造解析の報告では，長鎖アルデヒドの認識に重要な領域に変異を導入して，長鎖アルデヒドに対する活性を失った場合でも，中鎖アルデヒドであるオクタナールに対する活性に変化はなかった(145)。この結果は本研究における

ALDH3B1 のゲラニルゲラニル化変異体でも，オクタナールに対する活性は低下しなかったことと合致する(図 27A)。このような結果は，ALDH3A2 及び ALDH3B タンパク質は長鎖アルデヒド認識領域を欠いたとしても，炭化水素鎖の短いオクタナールであれば，より内部の基質ポケットに収まることが可能であるため，活性を示したと考えられる。

3-3-5. アルデヒド脱水素酵素についての今後の課題

近年，*ALDH3B1* の遺伝子多型に妄想型統合失調症の病因の可能性があるものが見つかっている(147，148)。統合失調症との関連は *ALDH1A1*，*ALDH1A2* についても報告がある(149，150)。これらの *ALDH* 遺伝子多型がなぜ統合失調症と関連しているのかは未解明だが，何らかのアルデヒドの蓄積による毒性発露が発症に寄与している可能性がある。また，統合失調症だけでなく，アルデヒドの毒性は白内障，皮膚疾患，神経病，がん，脂肪肝，男性不妊といった様々な疾患を引き起こす原因とされている(73，79，89，151)。今後，これらの疾患の発症に至る分子メカニズムを理解するためには疾患を引き起こすアルデヒドの同定及び，機能未知である ALDH の解析が必要である。

ALDH3A2 は皮膚神経疾患である SLS の原因遺伝子であることが既に知られている(83)。SLS の発症メカニズムは未解明であるが，代謝されなかった長鎖アルデヒドが蓄積し，何らかの重要な機能を持つ生体分子と反応することで生体機能を障害すると考えられている。実際に，*Aldh3a2* 欠損 CHO-K1 細胞では長鎖塩基の培地中への添加によって野生株に比べて生育が抑制され（図 29A-C），細胞内の形態異常も観察された（図 29D）。ALDH3A2 は長鎖アルデヒド脱水素酵素であるから，このような *Aldh3a2* 欠損細胞の長鎖塩基に対する高感受性は長鎖塩基に由来する長鎖アルデヒドの毒性を示していると考えられる。長鎖塩基の毒性は SPH が最も高く，次に PHS，最も毒性が低かったのは DHS であった（図 29A-C）。SPH が最も強い細胞毒性を示したのは，SPH に由来する長鎖アルデヒドであるヘキサデセナールが α, β 不飽和カルボニル構造をもつためと考えられる。α, β 不飽和カルボニル化合物は一般的にその反応性から，細胞毒性が高い。PHS が DHS に比べて毒性が強かったのは， それぞれの長鎖塩基に由来する長鎖アルデヒド（PHS；2-ヒドロキシヘキサデカナール，DHS；ヘキサデカナール）に対する長鎖アルデヒド脱水素酵素の活性の違いによると考えられる。野生型 CHO-K1 細胞に[^{3}H]DHS ラベルを行った場合，DHS のエーテル型脂質（PlsE）への変換が検出されなかったのに対して，[^{3}H]PHS ラベルの場合では，野生型 CHO-K1 細胞であっても PHS のエーテル型脂質（PlsE’）への変換が検出された（図 7A）。この結果は，PHS 由来の 2-ヒドロキシヘキサデカナールを CHO-K1 細胞が十分に 2-ヒドロキシパルミチン酸へと酸化できず，一部が代償的にエーテル型脂質に代謝されたことを示している。[^{3}H]DHS ラベルではエーテル型脂質への変換は検出されなかったため，この結果は，2-ヒドロキシヘキサデカナールに対する長鎖アルデヒド脱水素酵素

の活性がヘキサデカナールに対する活性に比べてが弱いことを示唆している。そのために，ヘキサデカナールに比べて 2-ヒドロキシヘキサデカナールの方が CHO-K1 細胞内で蓄積しがちであり，DHS に比較して PHS の方が細胞毒性を示したと考えられる。しかし，長鎖アルデヒドの蓄積がどのような生理機能を障害するのかは依然不明であり，SLS 発症の分子メカニズムを解明するためにも今後の解析が必要である。

本研究において長鎖塩基に対する高感受性という *Aldh3a2* 欠損細胞の代謝異常以外の表現型が初めて見出された。この結果は，長鎖塩基に由来する長鎖アルデヒドの細胞毒性を初めて明らかにしたものであり，SLS 発症に長鎖塩基由来の長鎖アルデヒドが関与している可能性を示唆している。これまで長鎖アルデヒドが細胞内に蓄積した際の細胞応答や細胞死に至るメカニズムは不明であったが，*Aldh3a2* 欠損細胞に長鎖塩基を取り込ませる系を用いることで，これらが明らかになる可能性がある。現在，SLS モデルマウスが確立されておらず，SLS 発症に至る分子メカニズムは依然不明であるが，SLS 発症に至る分子メカニズムを解明する上での有用なツールとなることも期待される。

3-4. 材料と方法

3-4-1. プラスミドの作製

本研究で使用した細胞発現用ベクターのうち，pCE-puro 3xFLAG-1，pAKNF316 については 2-4-1 に示した。pCE-puro His_6-Myc-1 及び pEGFP-C1（Clontec，TAKARA Bio）はタンパク質の N 末端にそれぞれ 3xFLAG，His_6-Myc，EGFP タグを付加する設計となっている。pCE-puro His_6-Myc-1 はピューロマイシン耐性遺伝子を含んでいる。

マウス（m）及びヒト（h）の *Aldh3a1*，*Aldh3a2*，*Aldh3b1*，*Aldh3b2*，*Aldh3b3* 遺伝子は表 VII に示すプライマー及びテンプレートを使用して PCR で増幅した。増幅した DNA 断片をまず pGEM®-T Easy (Promega) ベクターに組み込み，pGEM-mAldh3a1, pGEM-mAldh3a2, pGEM-mAldh3b1，pGEM-mAldh3b2，pGEM-mAldh3b3，pGEM-hALDH3A1，pGEM-hALDH3A2，pGEM-hALDH3B1，pGEM-hALDH3B2 を作製した。pGEM-hALDH3A1 は *Bam*HI と *Xba*I で処理して，その DNA 断片を pCE-puro 3xFLAG-1 または pAKNF316 の *Bam*HI-*Xba*I サイトへ組み込み，pCE-puro 3xFLAG-hALDH3A1 を作製した。pGEM-hALDH3B2 は *Bam*HI で処理して，その DNA 断片を pCE-puro 3xFLAG-1 または pAKNF316 の *Bam*HI サイトへ組み込み，pCE-puro 3xFLAG-hALDH3B2，pAKNF316-hALDH3B2 を作製した。それ以外の pGEM シリーズは *Bam*HI と *Not*I で処理して，その DNA 断片を pCE-puro 3xFLAG-1 または pAKNF316 の *Bam*HI-*Not*I サイトへ組み込んで，pCE-puro 3xFLAG-mAldh3a1，pCE-puro 3xFLAG-mAldh3a2，pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b1，pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b2，pCE-puro 3xFLAG-mAldh3b3，

pCE-puro 3xFLAG-hALDH3A2，pCE-puro 3xFLAG-hALDH3B1，pAKNF316-hALDH3A2, pAKNF316-hALDH3B1，pAKNF316-hALDH3B2 を作製した。また pGEM-mAldh3b1, pGEM-hALDH3B1 はそれぞれ *Bam*HI と *Sal*I または *Bam*HI と *Eco*RI で処理して, pEGFP-C1 の *Bgl*II-*Sal*I または *Bgl*II-*Eco*RI サイトへ組み込んだ。

マウス *Aldh3b2* 及び *Aldh3b3* のキメラ遺伝子は pGEM-Aldh3b2 及び pGEM-Aldh3b3 を *Stu*I と *Spe*I，*Stu*I と *Hin*dIII，または *Hin*dIII と *Bam*HI で切断し，同じ制限酵素で処理した他方の断片と移し替えることで作製した。このようにして作製したキメラ遺伝子がクローニングされた pGEM ベクターは *Bam*HI と *Sal*I で処理して, pEGFP-C1 の *Bgl*II-*Sal*I 断片へ組み込み, pEGFP-Aldh3b（3/2/2），pEGFP-Aldh3b（2/3/3），pEGFP-Aldh3b（2/3/2），pEGFP- Aldh3b（3/2/3），pEGFP-Aldh3b（2/2/3），pEGFP-Aldh3b（3/3/2）を作製した。（x/x/x）という表記は配列の N 末端/中央部/C 末端が Aldh3b2 または Aldh3b3 のどちらに由来するかを表しており, 例えば, Aldh（2/3/3）という表記であれば, N 末端部分が Aldh3b2, 中央と C 末端部分が Aldh3b3 に由来する配列であることを表している。

マウス及びヒトの Aldh3b1，Aldh3b2，Aldh3b3 の変異体発現プラスミドは QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit（Stratagene）及び表 VIII に示すプライマーとプラスミドをテンプレートに使用して作製した。pGEM-hALDH3B1 変異体シリーズは *Bam*HI と *Eco*RI で処理し，pEGFP-C1 の *Bgl*II-*Eco*RI サイトへ組み込んだ。または *Bam*HI と *Not*I で処理して pCE-puro 3xFLAG-1 の *Bam*HI-*Not*I サイト，または pAKNF316 の *Bam*HI-*Not*I サイトへ組み込んだ。pGEM-mAldh3b1, pGEM-mAldh3b2, pGEM-mAldh3b3 変異体シリーズの *Bam*HI と *Sal*I で処理した DNA 断片は, pEGFP-C1 の *Bam*HI-*Sal*I サイトへ組み込んだ。または *Bam*HI と *Not*I で処理した DNA 断片を pEGFP-C1 の *Bgl*II-*Eco*RI サイトへ組み込んだ。

3-4-2. 酵母株及び細胞の培養

酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）BY4741 株（*MATa his3*Δ*1 leu2*Δ*0 met15*Δ*0 ura3*Δ*0* ）及び *hfd1*Δ::*KanMX4* 変異株（strain 6550）は Open Biosystems より入手した。培養方法は 2-4-2 に記した。動物細胞の培養及びトランスフェクションについては 2-4-3 に記した。

3-4-3. ALDH タンパク質の精製

HEK 293T 細胞にマウスまたはヒトの 3xFLAG-Aldh3a1，3xFLAG-Aldh3b2，3xFLAG-Aldh3b1，3xFLAG-Aldh3b2，3xFLAG-Aldh3b3，3xFLAG-ALDH3B1-C463S，3xFLAG-ALDH3B1-C465S, 3xFLAG-ALDH3B1-C463/465S をそれぞれ発現させ, 24 時間後に 1 ml 1% Triton X-100 を含むバッファーB（50 mM HEPES-NaOH（pH 7.4），150 mM NaCl，10% グリセロール，1x PIC，1 mM PMSF，1 mM DTT）で回収し，超音波破砕によって細胞溶解液

を得た。4℃で 30 分間インキュベートした後に超遠心（100, 000 g，30 分，4℃）し，上清を回収した。上清に 20 µl 抗 FLAG M2 アフィニティーアガロースゲル（ベッド量 10 µl，Sigma）を加えて 4℃，オーバーナイトでインキュベートした。抗体ビーズを 0.1% Triton X-100 を含むバッファーB で 3 回洗浄した後，100 µg/ml 3xFLAG ペプチド/0.1% Triton X-100 を含むバッファーB によってタンパク質を溶出した。

3-4-4. *in vitro* ALDH 活性測定

ALDH 活性測定は反応バッファー（50 mM Tris-HCl（pH 8.5），150 mM NaCl，10% グリセロール，500 µM NAD^+，0.1% Triton X-100）に基質として 100 µM アルデヒド（オクタナール（Wako），ヘキサデカナール(71)，ヘキサデセナール（Avanti Polar Lipid））と精製した ALDH3 タンパク質（10 ng または 20 ng）を加えて，15 分，37℃でインキュベートした。反応は生成した NADH の蛍光強度(励起光 ：356 nm, 放射光 ：460 nm)をプレートリーダーInfinite M200（Tecan）を用いることで測定し，評価した。生成した NADH 量は 5，10，25，50，100 µM の NADH 標品の蛍光強度より作製した検量線を用いて評価した。

3-4-5. RNA 精製と RT-PCR

7 週齢の C57BL/6 雄マウスより肝臓，小腸，脳，腎臓，肺，脾臓，精巣，WAT，BAT，及び雌マウスから卵巣を摘出し，PBS で洗浄した。摘出した組織から NucleoSpin RNA II（Nippon Genetics）を添付の説明書の通りに使用して総 RNA を回収した。回収した RNA，表 IX のプライマーと SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq（Invitrogen）を用いて RT-PCR を行い，各組織の *Aldh3a1*，*Aldh3a 2*，*Aldh3b1*，*Aldh3b2*，*Aldh3b*，及び *Gapdh*（ローディングコントロール）の発現を解析した。

3-4-6. 細胞分画

細胞分画には，トランスフェクションして 48 時間 GGTI-2133（Sigma）を含む培地，または含まない培地で培養した HeLa 細胞を使用した。細胞はバッファーA で回収し，超音波破砕することで細胞溶解液を得た。遠心（1, 000 g，3 分，4℃）して，未破砕細胞とデブリを除き，上清を超遠心（100, 000 g，30 分，4℃）した。超遠心後のサンプルのうち，上清は可溶性画分として回収し，ペレットはバッファーA を加えた後に超音波破砕することで膜画分として回収し，イムノブロッティングでタンパク質を検出した。

3-4-7. イムノブロッティング

イムノブロッティングについては 2-4-9 に記した。1 次抗体には抗 FLAG 抗体 M2（1/1000

希釈, Stratagene), 抗 Myc 抗体 9E10（1/300 希釈, Enzo Life Science), 抗 GAPDH 抗体（1/200, Ambion), 抗α-tubulin 抗体（1/1000 希釈, Sigma), 抗 calnexin 抗体（1/1000 希釈, MBL）を使用した。

3-4-8. オイルレッド O 染色と間接蛍光抗体法

オイルレッド O 染色を行う場合はトランスフェクションの 24 時間後に 100 μM オレイン酸を加えた培地でさらに 24 時間培養した HeLa 細胞を用いた。細胞が接着したカバーガラスは PBS で洗浄し，3.7%ホルムアルデヒド/ PBS を加えて 10 分間 37℃でインキュベートし，固定した。PBS で洗浄後，間接蛍光抗体法を行う場合は 0.1% Triton X-100/PBS を加え 5 分間室温でインキュベートし，膜透過処理を行った。オイルレッド O 染色は，60% イソプロパノール/水で 1 回洗浄した後，オイルレッド O 液（1.8 mg/ml オイルレッド O，イソプロパノール/水=3 / 2, v/v）で室温，20 分インキュベートした。再び 60% イソプロパノール/水で洗浄した後，PBS で十分洗浄した。間接蛍光抗体法を行わない場合はこの時点で Prolong Gold Anti-fade Reagent（Thermo Fisher Scientific）でスライドグラスにマウントした。間接蛍光抗体法を行う場合，ブロッキング液（10 mg/ml BSA/PBS）を加えて 30 分間室温でインキュベートし，ブロッキングを行った。続いて 1 次抗体として抗 FLAG 抗体 M2（1/500 希釈，Stratagene）をブロッキング液に希釈して用いて室温で 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後，Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG anti body (1/400 希釈) をブロッキング液に希釈して用いて遮光で室温 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄した後，Prolong Gold Anti-fade Reagent でスライドグラスにマウントし，蛍光顕微鏡（Leica）を用いて解析した。

3-4-9. His_6-Myc-ALDH3B1 安定発現 FAA-K1A 細胞株の作製

ヒト ALDH3B1 安定発現 FAA-K1A 細胞株を作製するため, pCE-puro His_6-Myc-*hALDH3B1* を FAA-K1A 細胞にトランスフェクトし，10 μg/ml ピューロマイシン存在下で 10 日間選択的に培養した。選択によって得た株のうち，His_6-Myc-ALDH3B1 を高発現していた 2 つの異なる株を FAA-ALDH3B1-A，FAA-ALDH3B1-B と命名して実験に用いた。

3-4-10. [^{3}H]DHS ラベルアッセイ

2-4-4 に記した手法で行った。

3-4-11. アシル-ビオチン置換法

3xFLAG タグを付加したタンパク質を発現させた HEK 293T 細胞を 1.7% Triton X-100 と 10 mM *N*-エチルマレイミドを含むバッファーA で回収，超音波破砕して細胞抽出液を得た。それ

ぞれの細胞抽出液は遠心（2, 000 g，5 分，4℃）で未破砕細胞を除き，さらにクロロホルム/メタノール沈殿によって夾雑物を除いたタンパク質ペレットを得た。クロロホルム/メタノール沈殿はサンプル量に対し 4 倍量のメタノール, 1 倍量のクロロホルム, 3 倍量の水を加えて攪拌し，遠心（12, 400 g，1 分，4℃）で水層（上層）と有機層（下層），タンパク質ペレット（中間層）に分けた。上層の水を除き，先ほど加えた水と等量のメタノール（元のライセートの 3 倍量）を加えて遠心（12, 400 g，2 分，4℃） し，液体を除き，ペレットを乾燥させた。

乾燥させたペレットは 50 mM *N*-エチルマレイミドを含む 30 µl の 4SB（50 mM Tris-HCl, pH 7.4，5 mM EDTA，4% SDS）に一度溶解し，10 mM *N*-エチルマレイミドと 0.2% Triton X-100 を含むバッファーA 120 µl を加えて 4℃オーバーナイトでインキュベートした。その後，クロロホルム/メタノール沈殿を行い，30 µl の 4SB に溶解し，0.2% Triton X-100 を含むバッファーA 70 µl を加えて再びクロロホルム/メタノール沈殿を行った。回収したペレットは 70 µl の 4SB に溶解させた。このうち 30 µl に 120 µl の+HA バッファー（1 M ヒドロキシルアミン塩酸（pH 7.4），10% Triton X-100，1 mM bitotin-HDHP ; Thermo Fisher Scientific）または-HA バッファー（20 mM Tris-HCl（pH 7.4），10% Triton X-100，1 mM bitotin-HDHP）を加え，室温で 1 時間インキュベートした。インキュベート後，クロロホルム/メタノール沈殿を行い，回収したペレットを 30 µl の 4SB に溶解した。続いて 70µl の 0.2% Triton X-100 を含むバッファーA を加えて再びクロロホルム/メタノール沈殿を行った。回収したペレットは 40 µl の 2SB（50 mM Tris-HCl，pH 7.4，5 mM EDTA，2% SDS）に溶解し，うち 5 µl は発現量コントロールとして SDS-PAGE 用サンプルとして使用した。また, 15 µl 分に対し 485 µl の 0.2% Triton X-100 を含むバッファーA と 20 µl アビジンビーズ（ベッド量 10 µl ，Life Technologies）を加え，4℃オーバーナイトでインキュベートした。その後，1 ml の 0.2% Triton X-100 を含むバッファーA でビーズを 3 回洗浄し, 40 µl の 2xSDS サンプルバッファーでタンパク質を溶出し，イムノブロッティングでタンパク質を検出した。

3-4-12. MTT アッセイ

MTT（3-(4, 5-di-methylthiazol 2-lyl) 2, 5-diphenyltereazolium bromide）アッセイは MTT 細胞数測定キット（ナカライテスク）を用いた。CHO-K1 細胞及び FAA-K1A 細胞，FAA-K1A 細胞に N 末 3xFLAG タグを付加したヒト *ALDH3A2* を発現させた FAA-ALDH3A2-B 細胞(68)を 96 well プレートに 2.0x10^4 cells / 培地 100 µl 加えて，37℃で 24 時間培養した。その後，各希釈系列に調製した長鎖塩基（SPH，PHS，DHS ; 0，0.25，0.5，1，2.5，5 µM）含有培地に置換し，37℃で 20 時間培養した。続いて，10 µl の MTT 溶液を加えてさらに 4 時間培養した。続いて 100 µl の可溶化液を加えてプレートリーダー（Tecan）で 570 nm の吸光度を測定した。各長鎖塩基濃度における細胞生存率は培地のみの吸光度をバックグラウンドとして差をとり，

長鎖塩基濃度が 0 μM のときの値を 1 とした相対値で示した。

4. 本研究の総括

脂質代謝は生体機能の維持に重要であり，その破綻によって種々の脂質代謝異常疾患を引き起こす。しかし，脂質分子は糖，アミノ酸，核酸といった生体内分子に比べて多様性に富んでいるため，その代謝も複雑であり，未解明な部分も多い。本稿の第 1 章ではフィトスフィンゴシン（PHS）の分解について，第 2 章では脂質に由来する長鎖アルデヒドの代謝酵素について，双方とも脂質の分解について論じた。

第 1 章で論じた PHS の分解経路の解析は，生体内で生成した PHS がどのように分解されるかだけでなく，食物などに由来する PHS が細胞内でどのように代謝，利用されるかといった栄養学的観点からも重要である。酵母や植物のスフィンゴ脂質には PHS 及び PHS 誘導体が多く含まれており，近年これらの生物より抽出したスフィンゴ脂質を機能性素材として用いた化粧品，健康食品が市場に出回っている。そのため，細胞内に取り込まれた PHS の代謝を明らかにすることは，PHS の効用や安全性を理解する上でも重要である。また，PHS の分解過程において重要なステップである水酸基の除去（α酸化）を担う酵素として機能未知であった HACL2（ILVBL）を同定した。α酸化はペルオキシソームで行われる経路がこれまで知られていた(59)が，本研究によって小胞体で行われる経路が明らかになった。

第 2 章で論じた長鎖アルデヒドの代謝酵素の解析では，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。アルデヒドは第 1 章で述べた PHS の分解経路をはじめとする脂質代謝の中間体だけではなく，不飽和脂肪酸が活性酸素種によって過酸化された際の産物としても生じる。脂質の過酸化は膜構造をもつオルガネラではどこでも生じうる。そのため，様々なオルガネラでアルデヒドは生じると考えられるが，それらがどのように処理されるかはよく分かっていない。本研究では Aldh3b1 及び Aldh3b3 が細胞膜，Aldh3b2 が脂肪滴に局在することを明らかにした。このことから，これらの酵素が細胞膜，脂肪滴での長鎖アルデヒドの除去を担っていると考えられる。また，Aldh3b タンパク質の膜局在と活性には C 末端のプレニル化／パルミトイル化が重要であることも明らかにした。長鎖アルデヒド脱水素酵素をコードしていることが既に知られていた *ALDH3A2* はヒトの Sjögren-Larsson 症候群（SLS）の原因遺伝子である。しかし先行研究ではマウス *Aldh3a2* 欠損マウスは SLS の病態のような顕著な表現型を示さず，多くの組織中で長鎖アルデヒド脱水素酵素の残存活性が示されていた(109)。本研究で長鎖アルデヒド脱水素酵素活性が示された Aldh3b2 及び Aldh3b3 はそれぞれヒトでは偽遺伝子または存在しない一方で，マウスではこれらの遺伝子が *Aldh3a2* を相補するため，*Aldh3a2* 変異におけるヒト-マウス間の表現型の違いとなったと考えられる。今後，これらの *Aldh3* 遺伝子の多重欠損マウスを作製することで，SLS モデルマウスが作製されることが期待される。

5. 表一覧

表 I ヒト *HACL1*, *HACL2* のクローニングに用いたプライマーと鋳型 DNA

遺伝子	プライマー	DNA 配列	鋳型 DNA
MPO1	*MPO1-1*	5'-GGATCCATGGGCGAAGGTTTGCTGGATTTAAG-3' (*Bam*HI)	酵母ゲノム
	MPO1-2	5'-TTATTGTCTTTGCATCCGCAAATTTC-3'	
HACL1	*HACL1 -1*	5'-GGATCCATGCCGGACAGTAACTTCGCAGAGC-3' (*Bam*HI)	ヒト肝臓 cDNA (Clontech)
	HACL1 -2	5'-TTACATATTAGAGCGGGTCAGCCAA -3'	
HACL2 (N 末タグ付加用)	*HACL2 -n1*	5'-GGATCCATGGAGACCCCCGCGGCCGCCGCCC -3' (BamHI)	ヒト肝臓 cDNA (Clontech)
	HACL2 –n2	5'-TGCGCACTATACAGCAATGGAGCCATCGCGG -3' (*Fsp*I)	
HACL2 (C 末タグ付加用)	*HACL2 –c1*	5'-GGATCCGCCACCATGGAGACCCCCGCGGCCGCCGCCC -3' (*Bam*HI)	ヒト肝臓 cDNA (Clontech)
	HACL2 –c2	5'-GGATCCACAGCAATGGAGCCATCGCGGAAGT -3' (*Bam*HI)	

表 II　CRISPR/CAS9 に用いた primer 配列

作成した細胞名	primer	DNA 配列
Hacl1 -KO	*cHacl1* -TS1	5'-CAAGGGCGATTTCGGTCACGGTTTT-3'
	cHacl2 -RS1	5'-CGTGACCGAAATCGCCCTTGCGGTG-3'
Hacl2 -KO	*cHacl2* -TS1	5'-TTGCCATGCCACTCAAGGCGGTTTT-3'
	cHacl1 -RS1	5'-CGCCTTGAGTGGCATGGCAACGGTG-3'
Hacl1/2 -DKO	*cHacl1* -TS2	5'-TGAAGACAAAGCGTACACCAGTTTT-3'
	cHacl1 -RS2	5'-TGGTGTACGCTTTGTCTTCACGGTG-3'
	cHacl2 -TS1	5'-TTGCCATGCCACTCAAGGCGGTTTT-3'
	cHacl1 -RS1	5'-CGCCTTGAGTGGCATGGCAACGGTG-3'

表 III LC の移動相の A 液と B 液の混合比

時間	0 分	18 分	23 分	23.1 分	25 分
A/B	60/40	0/100	0/100	60/40	60/40

表 IV MS/MS 解析に用いた Q1 と Q3 の質量電荷比（セラミド）

C16 ceramides	Precursor ions (Q1)		Product ion (Q3)
	$[M\text{-}H_2O+H]^+$	$[M+H]^+$	
NS	520.2	538.2	264.2
NP	538.4	556.4	300.2
AS	536.15	554.15	264.2
AP	554.14	572.15	300.2

表 V MS/MS 解析に用いた Q1 と Q３の質量電荷比 (PC)

PCs	Precursor ions (Q1) $[M+HCOOH\text{-}H]^-$	Product ion (Q3)	
C12:0/C12:0[a]	666.2	198.9	
C15:0/16:1	762.3	241.04	253.04
C15:0/16:0	764.3	241.04	255.04
C15:0/18:1	764.3	241.04	281.0
C17:0/18:1	818.3	269.04	281.0
C16:1/16:0	776.3	253.04	255.04
16:0/16:0	778.3	255.04	
16:1/18:1	802.3	253.04	281.0
16:0/18:1	804.3	255.04	281.0
18:1/18:1	830.3	281.0	
18:0/18:1	832.2	281.0	283.0

[a] 内部標準

表 VI 定量的 PCR に用いたプライマーの組み合わせ(h はヒト, c は CHO-K1 細胞由来を示す。)

遺伝子名	プライマー	DNA 配列
hGAPDH	*hGAPDH* -qPCR3	5'-CAACAGCGACACCCACTCCTCCACC -3'
	hGAPDH -qPCR4	5'-ATACCAGGAAATGAGCTTGACAAAG -3'
hHACL1	*hHACL1*-rtf2	5'-GCCAAATTCACATTATGAGCAAGTC -3'
	hHACL1-2	5'-TTACATATTAGAGCGGGTCAGCCAA -3'
hHACL2	*hILVBL*-rtf1	5'-GTTTGGGGACGGAGCTTTTGGCTAC -3'
	hILVBL-rtr1	5'-GATGTTGACCACAACCGGGTGGCCG -3'
cGapdh	*cGapdh* -rtf1	5'-CAAGTATGAGGACATCAAGAAGGTG -3'
	cGapdh –rtr1	5'-TTACTCCTTGGAGGCCATGTAGGCC -3'
cHacl1	*cHacl1*-rtf1	5'-TAAACAATAATGGAATCTACCAAGG -3'
	cHacl1-rtr1	5'-TCACATGTTAGAACGGGTGAGCCAG -3'
cHacl2	*cIlvbl*-rtf1	5'-CTACAGCCTCATCGAGTTTGACACA -3'
	cIlvbl-rtr1	5'- AAATCTGTCCTCCCGATCAGGATGT -3'

表 VII マウスとヒト ALDH3 ファミリーのクローニングに用いたプライマーと鋳型 DNA

遺伝子	プライマー	DNA 配列	鋳型 DNA
mAldh3a1	*mAldh3a1 -1*	5’-GGATCCATGAGCAATATCAGTAGCATCGTGA-3’ (*Bam*HI)	マウス骨格筋 cDNA (Clontech)
	mAldh3a1 -2	5’-CCCAGCCAAGATGCCCCGGCATTGA-3’	
mAldh3a2	*mAldh3a2 -1*	5’-GGATCCATGGAGCGCCAGGTCCTACGGCTTC-3’ (*Bam*HI)	マウス肝臓 cDNA (Clontech)
	mAldh3a2 -2	5’-TGTGATTGTCAAGGATCAGCTGTAA-3’	
mALDH3B1	*mAldh3b1 -1*	5’-GGATCCATGGACTCGTTTGAAGACAAGCTTC -3’ (*Bam*HI)	マウス脳 cDNA (Clontech)
	mAldh3b1 -2	5’-GTGCTGCAGCTGCACCCTGCTGTAA -3’	
mAldh3b2	*mAldh3b2 -1*	5’-GGATCCATGTCTGCTGCAGAGACAGGCTCGG-3’ (*Bam*HI)	マウス肺 cDNA (Clontech)
	mAldh3b2 -2	5’-CTCCCGGAGCTGCACCCTCCTGTGA-3’	
mAldh3b3	*mAldh3B3 -1*	5’-GGATCCATGTCCACCAAAGGCAAACACCCAC-3’ (*Bam*HI)	マウス脳 cDNA (Clontech)
	mAldh3b3 -2	5’-CTCTGAGAGCTGCACCCTTCTGTAA-3’	
mALDH3A1	*hALDH3A1 -1*	5′-TCTAGAATGAGCAAGATCAGCGAGGCCGTGA-3′ (XbaI)	ヒト EST clone ID 3610317 (Thermo Fisher Scientific)
	hALDH3A1 -2	5′-TCAGTGCTGGGTCATCTTGGCCGGG-3′	
hALDH3A2	*hALDH3A2 -1*	5’-GGATCCATGGAGCTCGAAGTCCGGCGGGTCC-3’ (*Bam*HI)	ヒト腎臓 cDNA (Clontech)
	hALDH3A2 -2	5’-TTCAGTAATATTCTGCCTTGACAAGC-3’	
hALDH3B1	*hALDH3B1 -1*	5′-GGATCCATGGACCCCCTTGGGGACACGCTG-3’ (*Bam*HI)	ヒト肺 cDNA (Clontech)
	hALDH3B1 -2	5′-TCAGAGCAGTGTGCAGCTGCAGCC-3′	
hALDH3B2	*hALDH3B2 -1*	5′-GGATCCATGAAGGATGAACCACGGTCCACG-3′ (*Bam*HI)	ヒト胎盤 cDNA (Clontech)
	hALDH3B2 -2	5′-GGATCCTCACAGGAGGGTGCAGCTCTGGGAG-3′ (*Bam*HI)	

表 VIII　QuikChange による変異体作製に用いたプライマーと鋳型 DNA

変異体	プライマー	DNA 配列	鋳型 DNA
W462A	W462A-1	5’-CCGCCTTATGGTCCCGCGAACCAACAACTGAT-3’	pGEM-mAldh3b2
	W462A-2	5’-ATCAGTTGTTGGTTCGCGGGACCATAAGGCGG-3’	
W469A	W469A-1	5’-CAACAACTGATAAGCGCGGCCATAGGCTCCCG-3’	
	W469A-2	5’-CGGGAGCCTATGGCCGCGCTTATCAGTTGTTG-3’	
W462/469A	W469A-1	5’-CAACAACTGATAAGCGCGGCCATAGGCTCCCG-3’	pGEM-mAldh3b2-W462A
	W469A-2	5’-CGGGAGCCTATGGCCGCGCTTATCAGTTGTTG-3’	
R462/463A	R462/463A-1	5’-CCGCCCTATAGTCCCGCAGCGCAGCAGCTGCTAAGA-3’	pGEM-mAldh3b3
	R462/463A-2	5’-TCTTAGCAGCTGCTGCGCTGCGGGACTATAGGGCGG-3’	
(h)C463S	(h)C463S-1	5′-CCATGGAGGCCCAAGGCTCCAGCTGCACACTGCTC-3′	pGEM-hALDH3B1
	(h)C463S-2	5′-GAGCAGTGTGCAGCTGGAGCCTTGGGCCTCCATGG-3′	
C465S	C465S-1	5′-GGAGGCCCAAGGCTGCAGCTCCACACTGCTCTG-3′	
	C465S-2	5′-CAG AGCAGTGTGGAGCTGCAGCCTTGGGCCTCC-3′	
C463/465S	C463/465S-1	5′-G GAGGCCCAAGGCTCCAGCTCCACACTGCTCTG-3′	
	C463/465S-2	5′-CAGAGCAGTG TGGAGCTGGAGCCTTGGGCCTCC-3′	
C462S	C462S-1	5’-CCATGGAGGAGAGGTCCTGCAGCTGCACCCTGCTG-3’	pGEM-mAldh3b1
	C462S-2	5’-CAGCAGGGTGCAGCTGCAGGACCTCTCCTCCATGG-3’	
(m) C463S	(m) C463S-1	5’-CCATGGAGGAGAGGTGCTCCAGCTGCACCCTGCTG-3’	
	(m) C463S-2	5’-CAGCAGGGTGCAGCTGGAGCACCTCTCCTCCATGG-3’	
C462/463S	C462/463S-1	5’-CCATGGAGGAGAGGTCCTCCAGCTGCACCCTGCTG-3’	
	C462/463S-2	5’-CAGCAGGGTGCAGCTGGAGGACCTCTCCTCCATGG-3’	

表 IX RT-PCR に用いたプライマーの組み合わせ

遺伝子名	プライマー	DNA 配列
Gapdh	Gapdh-rt1	5'-GAACGGGAAGCTCACTGGCATGGCC-3'
	Gapdh-rt2	5'- TGTCATACCAGGAAATGAGCTTGAC-3'
Aldh3a1	Aldh3a1-rt1	5'-CGGTGATGCCCATTGTGTGTGTTCG-3'
	Aldh3a1-rt2	5'-TTCTTCATTCCGCAGAGACCTCACC-3'
Aldh3a2	Aldh3a2-rt1	5'-TTCTCGTAACAATAAGCTCATCAAACG-3'
	Aldh3a2-rt2	5'-CAGCATCCCCAGCCTTCCTTTGTTG-3'
Aldh3b1	Aldh3b1-rt1	5'-GCTGTATGCCTTCTCCAAGAGAAGC-3'
	Aldh3b1-rt2	5'-GCAGCTGCAGCACCTCTCCTCCATGG-3'
Aldh3b2	Aldh3b2-rt1	5'-TGAGTTCATCAACCGGCGGGAGAAGC-3'
	Aldh3b2-rt2	5'-GTTGTTGGTTCCAGGGACCATAAGG -3'
Aldh3b3	Aldh3b3-rt1	5'-CTTTATGCCTATTCCAACAACGCAG-3'
	Aldh3b3-rt2	5'-GGGTGCAGCTCTCAGAGCCGATAGC-3'

6. 参考文献

1. Scheiffele, P., Rietveld, A., Wilk, T., and Simons, K. (1999) Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J Biol Chem* **274**, 2038-2044
2. Yu, R. K., Tsai, Y. T., Ariga, T., and Yanagisawa, M. (2011) Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides--an overview. *J Oleo Sci* **60**, 537-544
3. 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
4. Jennemann, R., Rabionet, M., Gorgas, K., Epstein, S., Dalpke, A., Rothermel, U., Bayerle, A., van der Hoeven, F., Imgrund, S., Kirsch, J., Nickel, W., Willecke, K., Riezman, H., Grone, H. J., and Sandhoff, R. (2012) Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Hum Mol Genet* **21**, 586-608
5. Goetzl, E. J., and An, S. (1999) A subfamily of G protein-coupled cellular receptors for lysophospholipids and lysosphingolipids. *Adv Exp Med Biol* **469**, 259-264
6. 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
7. Endo, K., Akiyama, T., Kobayashi, S., and Okada, M. (1996) Degenerative spermatocyte, a novel gene encoding a transmembrane protein required for the initiation of meiosis in *Drosophila* spermatogenesis. *Mol Gen Genet* **253**, 157-165
8. 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
9. Obeid, L. M., Linardic, C. M., Karolak, L. A., and Hannun, Y. A. (1993) Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259**, 1769-1771
10. Kacher, Y., and Futerman, A. H. (2006) Genetic diseases of sphingolipid metabolism: pathological mechanisms and therapeutic options. *FEBS Lett* **580**, 5510-5517
11. Kolter, T., and Sandhoff, K. (2006) Sphingolipid metabolism diseases. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 2057-2079

12. Stewart, M. E., and Downing, D. T. (1995) Free sphingosines of human skin include 6-hydroxysphingosine and unusually long-chain dihydrosphingosines. *J Invest Dermatol* **105**, 613-618

13. Wisse, P., de Geus, M. A., Cross, G., van den Nieuwendijk, A. M., van Rooden, E. J., van den Berg, R. J., Aerts, J. M., van der Marel, G. A., Codee, J. D., and Overkleeft, H. S. (2015) Synthesis of 6-hydroxysphingosine and alpha-hydroxy ceramide using a cross-metathesis strategy. *J Org Chem* **80**, 7258-7265

14. Hanada, K., Hara, T., Nishijima, M., Kuge, O., Dickson, R. C., and Nagiec, M. M. (1997) A mammalian homolog of the yeast *LCB1* encodes a component of serine palmitoyltransferase, the enzyme catalyzing the first step in sphingolipid synthesis. *J Biol Chem* **272**, 32108-32114

15. Kihara, A., and Igarashi, Y. (2004) FVT-1 is a mammalian 3-ketodihydrosphingosine reductase with an active site that faces the cytosolic side of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **279**, 49243-49250

16. Kihara, A. (2016) Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Prog Lipid Res* **63**, 50-69

17. Ternes, P., Franke, S., Zahringer, U., Sperling, P., and Heinz, E. (2002) Identification and characterization of a sphingolipid delta 4-desaturase family. *J Biol Chem* **277**, 25512-25518

18. Mizutani, Y., Kihara, A., and Igarashi, Y. (2004) Identification of the human sphingolipid C4-hydroxylase, hDES2, and its up-regulation during keratinocyte differentiation. *FEBS Lett* **563**, 93-97

19. Omae, F., Miyazaki, M., Enomoto, A., Suzuki, M., Suzuki, Y., and Suzuki, A. (2004) DES2 protein is responsible for phytoceramide biosynthesis in the mouse small intestine. *Biochem J* **379**, 687-695

20. Narita, T., Naganuma, T., Sase, Y., and Kihara, A. (2016) Long-chain bases of sphingolipids are transported into cells via the acyl-CoA synthetases. *Sci Rep* **6**, 25469

21. Pyne, S., and Pyne, N. (2000) Sphingosine 1-phosphate signalling via the endothelial differentiation gene family of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **88**, 115-131

22. Holland, W. L., Brozinick, J. T., Wang, L. P., Hawkins, E. D., Sargent, K. M., Liu, Y., Narra, K., Hoehn, K. L., Knotts, T. A., Siesky, A., Nelson, D. H., Karathanasis, S. K.,

Fontenot, G. K., Birnbaum, M. J., and Summers, S. A. (2007) Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* **5**, 167-179

23. Dickson, R. C., Sumanasekera, C., and Lester, R. L. (2006) Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Lipid Res* **45**, 447-465

24. Haak, D., Gable, K., Beeler, T., and Dunn, T. (1997) Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* ceramides requires Sur2p and Scs7p. *J Biol Chem* **272**, 29704-29710

25. Ohi, K., Ursini, G., Li, M., Shin, J. H., Ye, T., Chen, Q., Tao, R., Kleinman, J. E., Hyde, T. M., Hashimoto, R., and Weinberger, D. R. (2015) *DEGS2* polymorphism associated with cognition in schizophrenia is associated with gene expression in brain. *Transl Psychiatry* **5**, e550

26. Okabe, K., Keenan, R. W., and Schmidt, G. (1968) Phytosphingosine groups as quantitatively significant components of the sphingolipids of the mucosa of the small intestines of some mammalian species. *Biochem Biophys Res Commun* **31**, 137-143

27. Hashimoto, R., Ikeda, M., Ohi, K., Yasuda, Y., Yamamori, H., Fukumoto, M., Umeda-Yano, S., Dickinson, D., Aleksic, B., Iwase, M., Kazui, H., Ozaki, N., Weinberger, D. R., Iwata, N., and Takeda, M. (2013) Genome-wide association study of cognitive decline in schizophrenia. *Am J Psychiatry* **170**, 683-684

28. Ishikawa, J., Narita, H., Kondo, N., Hotta, M., Takagi, Y., Masukawa, Y., Kitahara, T., Takema, Y., Koyano, S., Yamazaki, S., and Hatamochi, A. (2010) Changes in the ceramide profile of atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol* **130**, 2511-2514

29. Sahle, F. F., Gebre-Mariam, T., Dobner, B., Wohlrab, J., and Neubert, R. H. (2015) Skin diseases associated with the depletion of stratum corneum lipids and stratum corneum lipid substitution therapy. *Skin Pharmacol Physiol* **28**, 42-55

30. Imai, H., Hattori, H., and Watanabe, M. (2012) An improved method for analysis of glucosylceramide species having cis-8 and trans-8 isomers of sphingoid bases by LC-MS/MS. *Lipids* **47**, 1221-1229

31. Pruett, S. T., Bushnev, A., Hagedorn, K., Adiga, M., Haynes, C. A., Sullards, M. C., Liotta, D. C., and Merrill, A. H., Jr. (2008) Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols. *J Lipid Res* **49**, 1621-1639

32. Hoshi, M., and Kishimoto, Y. (1973) Synthesis of cerebronic acid from lignoceric acid

by rat brain preparation. Some properties and distribution of the -hydroxylation system. *J Biol Chem* **248**, 4123-4130

33. t'Kindt, R., Jorge, L., Dumont, E., Couturon, P., David, F., Sandra, P., and Sandra, K. (2012) Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* **84**, 403-411

34. Tove, S. B. (1959) Production of odd-numbered carbon fatty acids from propionate by mice. *Nature* **184(Suppl 21)**, 1647-1648

35. Wendel, U., Baumgartner, R., van der Meer, S. B., and Spaapen, L. J. (1991) Accumulation of odd-numbered long-chain fatty acids in fetuses and neonates with inherited disorders of propionate metabolism. *Pediatr Res* **29**, 403-405

36. Casteels, M., Sniekers, M., Fraccascia, P., Mannaerts, G. P., and Van Veldhoven, P. P. (2007) The role of 2-hydroxyacyl-CoA lyase, a thiamin pyrophosphate-dependent enzyme, in the peroxisomal metabolism of 3-methyl-branched fatty acids and 2-hydroxy straight-chain fatty acids. *Biochem Soc Trans* **35**, 876-880

37. Mannaerts, G. P., Van Veldhoven, P. P., and Casteels, M. (2000) Peroxisomal lipid degradation via beta- and alpha-oxidation in mammals. *Cell Biochem Biophys* **32 Spring**, 73-87

38. Alderson, N. L., Rembiesa, B. M., Walla, M. D., Bielawska, A., Bielawski, J., and Hama, H. (2004) The human *FA2H* gene encodes a fatty acid 2-hydroxylase. *J Biol Chem* **279**, 48562-48568

39. Alderson, N. L., Maldonado, E. N., Kern, M. J., Bhat, N. R., and Hama, H. (2006) FA2H-dependent fatty acid 2-hydroxylation in postnatal mouse brain. *J Lipid Res* **47**, 2772-2780

40. Dick, K. J., Eckhardt, M., Paisan-Ruiz, C., Alshehhi, A. A., Proukakis, C., Sibtain, N. A., Maier, H., Sharifi, R., Patton, M. A., Bashir, W., Koul, R., Raeburn, S., Gieselmann, V., Houlden, H., and Crosby, A. H. (2010) Mutation of *FA2H* underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35). *Hum Mutat* **31**, E1251-1260

41. Ohno, Y., Nakamichi, S., Ohkuni, A., Kamiyama, N., Naoe, A., Tsujimura, H., Yokose, U., Sugiura, K., Ishikawa, J., Akiyama, M., and Kihara, A. (2015) Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22 in the production of acylceramide, the key lipid for skin permeability barrier formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**,

7707-7712

42. Sugiura, K., Takeichi, T., Tanahashi, K., Ito, Y., Kosho, T., Saida, K., Uhara, H., Okuyama, R., and Akiyama, M. (2013) Lamellar ichthyosis in a collodion baby caused by *CYP4F22* mutations in a non-consanguineous family outside the Mediterranean. *J Dermatol Sci* **72**, 193-195

43. Madison, K. C., Swartzendruber, D. C., Wertz, P. W., and Downing, D. T. (1990) Sphingolipid metabolism in organotypic mouse keratinocyte cultures. *J Invest Dermatol* **95**, 657-664

44. Jin, S. J., Hoppel, C. L., and Tserng, K. Y. (1992) Incomplete fatty acid oxidation. The production and epimerization of 3-hydroxy fatty acids. *J Biol Chem* **267**, 119-125

45. Kihara, A. (2012) Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *J Biochem* **152**, 387-395

46. Grall, A., Guaguere, E., Planchais, S., Grond, S., Bourrat, E., Hausser, I., Hitte, C., Le Gallo, M., Derbois, C., Kim, G. J., Lagoutte, L., Degorce-Rubiales, F., Radner, F. P., Thomas, A., Kury, S., Bensignor, E., Fontaine, J., Pin, D., Zimmermann, R., Zechner, R., Lathrop, M., Galibert, F., Andre, C., and Fischer, J. (2012) *PNPLA1* mutations cause autosomal recessive congenital ichthyosis in golden retriever dogs and humans. *Nat Genet* **44**, 140-147

47. Grond, S., Eichmann, T. O., Dubrac, S., Kolb, D., Schmuth, M., Fischer, J., Crumrine, D., Elias, P. M., Haemmerle, G., Zechner, R., Lass, A., and Radner, F. P. (2016) *PNPLA1* deficiency in mice and humans leads to a defect in the synthesis of omega-O-acylceramides. *J Invest Dermatol*

48. Wertz, P. W., and Downing, D. T. (1987) Covalently bound omega-hydroxyacylsphingosine in the stratum corneum. *Biochim Biophys Acta* **917**, 108-111

49. Jobard, F., Lefevre, C., Karaduman, A., Blanchet-Bardon, C., Emre, S., Weissenbach, J., Ozguc, M., Lathrop, M., Prud'homme, J. F., and Fischer, J. (2002) Lipoxygenase-3 (ALOXE3) and 12(R)-lipoxygenase (ALOX12B) are mutated in non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma (NCIE) linked to chromosome 17p13.1. *Hum Mol Genet* **11**, 107-113

50. Zheng, Y., Yin, H., Boeglin, W. E., Elias, P. M., Crumrine, D., Beier, D. R., and Brash, A. R. (2011) Lipoxygenases mediate the effect of essential fatty acid in skin barrier

formation: a proposed role in releasing omega-hydroxyceramide for construction of the corneocyte lipid envelope. *J Biol Chem* **286**, 24046-24056

51. Sharma, D., Gupta, B., Shastri, S., Pandita, A., and Pawar, S. (2015) Collodion Baby with *TGM1* gene mutation. *Int Med Case Rep J* **8**, 205-208
52. Feingold, K. R., and Elias, P. M. (2014) Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochim Biophys Acta* **1841**, 280-294
53. Suzuki, S., Enosawa, S., Kakefuda, T., Shinomiya, T., Amari, M., Naoe, S., Hoshino, Y., and Chiba, K. (1996) A novel immunosuppressant, FTY720, with a unique mechanism of action, induces long-term graft acceptance in rat and dog allotransplantation. *Transplantation* **61**, 200-205
54. Kihara, A., and Igarashi, Y. (2008) Production and release of sphingosine 1-phosphate and the phosphorylated form of the immunomodulator FTY720. *Biochim Biophys Acta* **1781**, 496-502
55. Herbert, M. A., and Clayton, P. T. (1994) Phytanic acid alpha-oxidase deficiency (Refsum disease) presenting in infancy. *J Inherit Metab Dis* **17**, 211-214
56. 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
57. Jansen, G. A., Waterham, H. R., and Wanders, R. J. (2004) Molecular basis of Refsum disease: sequence variations in phytanoyl-CoA hydroxylase (PHYH) and the PTS2 receptor (PEX7). *Hum Mutat* **23**, 209-218
58. Schofield, C. J., and McDonough, M. A. (2007) Structural and mechanistic studies on the peroxisomal oxygenase phytanoyl-CoA 2-hydroxylase (PhyH). *Biochem Soc Trans* **35**, 870-875
59. Foulon, V., Sniekers, M., Huysmans, E., Asselberghs, S., Mahieu, V., Mannaerts, G. P., Van Veldhoven, P. P., and Casteels, M. (2005) Breakdown of 2-hydroxylated straight chain fatty acids via peroxisomal 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase: a revised pathway for the alpha-oxidation of straight chain fatty acids. *J Biol Chem* **280**, 9802-9812
60. Fraccascia, P., Casteels, M., De Schryver, E., and Van Veldhoven, P. P. (2011) Role of thiamine pyrophosphate in oligomerisation, functioning and import of peroxisomal 2-hydroxyacyl-CoA lyase. *Biochim Biophys Acta* **1814**, 1226-1233

61. Svennerholm, L., and Stallberg-Stenhagen, S. (1968) Changes in the fatty acid composition of cerebrosides and sulfatides of human nervous tissue with age. *J Lipid Res* **9**, 215-225

62. Hinder, A., Schmelzer, C. E., Rawlings, A. V., and Neubert, R. H. (2011) Investigation of the molecular structure of the human stratum corneum ceramides [NP] and [EOS] by mass spectrometry. *Skin Pharmacol Physiol* **24**, 127-135

63. Kondo, N., Ohno, Y., Yamagata, M., Obara, T., Seki, N., Kitamura, T., Naganuma, T., and Kihara, A. (2014) Identification of the phytosphingosine metabolic pathway leading to odd-numbered fatty acids. *Nat Commun* **5**, 5338

64. Wanders, R. J. A., Waterham, H. R., and Leroy, B. P. (1993) Refsum Disease. in *GeneReviews(R)* (Pagon, R. A., Adam, M. P., Ardinger, H. H., Wallace, S. E., Amemiya, A., Bean, L. J. H., Bird, T. D., Fong, C. T., Mefford, H. C., Smith, R. J. H., and Stephens, K. eds.), Seattle (WA). pp

65. Finsterer, J., Regelsberger, G., and Voigtlander, T. (2008) Refsum disease due to the splice-site mutation c.135-2A>G before exon 3 of the *PHYH* gene, diagnosed eight years after detection of retinitis pigmentosa. *J Neurol Sci* **266**, 182-186

66. Jansen, G. A., Mihalik, S. J., Watkins, P. A., Moser, H. W., Jakobs, C., Heijmans, H. S., and Wanders, R. J. (1997) Phytanoyl-CoA hydroxylase is not only deficient in classical Refsum disease but also in rhizomelic chondrodysplasia punctata. *J Inherit Metab Dis* **20**, 444-446

67. Fujiki, Y. (2016) Peroxisome biogenesis and human peroxisome-deficiency disorders. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **92**, 463-477

68. Nakahara, K., Ohkuni, A., Kitamura, T., Abe, K., Naganuma, T., Ohno, Y., Zoeller, R. A., and Kihara, A. (2012) The Sjögren-Larsson syndrome gene encodes a hexadecenal dehydrogenase of the sphingosine 1-phosphate degradation pathway. *Mol Cell* **46**, 461-471

69. Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, S., and Spiegel, S. (1998) Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase. *J Biol Chem* **273**, 12576-12583

70. Kihara, A., Anada, Y., and Igarashi, Y. (2006) Mouse sphingosine kinase isoforms SPHK1a and SPHK1b differ in enzymatic traits including stability, localization, modification, and oligomerization. *J Biol Chem* **281**, 4532-4539

71. Kariya, Y., Kihara, A., Ikeda, M., Kikuchi, F., Nakamura, S., Hashimoto, S., Choi, C. H., Lee, Y. M., and Igarashi, Y. (2005) Products by the sphingosine

kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P) lyase pathway but not S1P stimulate mitogenesis. *Genes Cells* **10**, 605-615

72. 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
73. Yoritaka, A., Hattori, N., Uchida, K., Tanaka, M., Stadtman, E. R., and Mizuno, Y. (1996) Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2696-2701
74. Catala, A. (2009) Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids* **157**, 1-11
75. Wakashima, T., Abe, K., and Kihara, A. (2014) Dual functions of the trans-2-enoyl-CoA reductase TER in the sphingosine 1-phosphate metabolic pathway and in fatty acid elongation. *J Biol Chem* **289**, 24736-24748
76. 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
77. Rizzo, W. B. (2014) Fatty aldehyde and fatty alcohol metabolism: review and importance for epidermal structure and function. *Biochim Biophys Acta* **1841**, 377-389
78. 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
79. 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
80. Jackson, B., Brocker, C., Thompson, D. C., Black, W., Vasiliou, K., Nebert, D. W., and Vasiliou, V. (2011) Update on the aldehyde dehydrogenase gene (*ALDH*) superfamily. *Hum Genomics* **5**, 283-303
81. Geraghty, M. T., Vaughn, D., Nicholson, A. J., Lin, W. W., Jimenez-Sanchez, G., Obie, C., Flynn, M. P., Valle, D., and Hu, C. A. (1998) Mutations in the

Delta1-pyrroline 5-carboxylate dehydrogenase gene cause type II hyperprolinemia. *Hum Mol Genet* **7**, 1411-1415

82. Panza, E., Escamilla-Honrubia, J. M., Marco-Marin, C., Gougeard, N., De Michele, G., Morra, V. B., Liguori, R., Salviati, L., Donati, M. A., Cusano, R., Pippucci, T., Ravazzolo, R., Nemeth, A. H., Smithson, S., Davies, S., Hurst, J. A., Bordo, D., Rubio, V., and Seri, M. (2016) *ALDH18A1* gene mutations cause dominant spastic paraplegia SPG9: loss of function effect and plausibility of a dominant negative mechanism. *Brain* **139**, e3

83. Rizzo, W. B., and Carney, G. (2005) Sjögren-Larsson syndrome: diversity of mutations and polymorphisms in the fatty aldehyde dehydrogenase gene (*ALDH3A2*). *Hum Mutat* **26**, 1-10

84. Willemsen, M. A., Lutt, M. A., Steijlen, P. M., Cruysberg, J. R., van der Graaf, M., Nijhuis-van der Sanden, M. W., Pasman, J. W., Mayatepek, E., and Rotteveel, J. J. (2001) Clinical and biochemical effects of zileuton in patients with the Sjögren-Larsson syndrome. *Eur J Pediatr* **160**, 711-717

85. Rizzo, W. B. (2011) The role of fatty aldehyde dehydrogenase in epidermal structure and function. *Dermatoendocrinol* **3**, 91-99

86. Watschinger, K., Keller, M. A., Golderer, G., Hermann, M., Maglione, M., Sarg, B., Lindner, H. H., Hermetter, A., Werner-Felmayer, G., Konrat, R., Hulo, N., and Werner, E. R. (2010) Identification of the gene encoding alkylglycerol monooxygenase defines a third class of tetrahydrobiopterin-dependent enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13672-13677

87. Wu, L. C., Pfeiffer, D. R., Calhoon, E. A., Madiai, F., Marcucci, G., Liu, S., and Jurkowitz, M. S. (2011) Purification, identification, and cloning of lysoplasmalogenase, the enzyme that catalyzes hydrolysis of the vinyl ether bond of lysoplasmalogen. *J Biol Chem* **286**, 24916-24930

88. Rizzo, W. B., Heinz, E., Simon, M., and Craft, D. A. (2000) Microsomal fatty aldehyde dehydrogenase catalyzes the oxidation of aliphatic aldehyde derived from ether glycerolipid catabolism: implications for Sjögren-Larsson syndrome. *Biochim Biophys Acta* **1535**, 1-9

89. Shiraishi, K., and Naito, K. (2007) Effects of 4-hydroxy-2-nonenal, a marker of oxidative stress, on spermatogenesis and expression of p53 protein in male infertility. *J Urol* **178**, 1012-1017; discussion 1017

90. Holmes, R. S. (2010) Biochemical genetics of opossum aldehyde dehydrogenase 3: evidence for three *ALDH3A*-like genes and an *ALDH3B*-like gene. *Biochem Genet* **48**, 287-303

91. Pappa, A., Estey, T., Manzer, R., Brown, D., and Vasiliou, V. (2003) Human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1): biochemical characterization and immunohistochemical localization in the cornea. *Biochem J* **376**, 615-623

92. Estey, T., Cantore, M., Weston, P. A., Carpenter, J. F., Petrash, J. M., and Vasiliou, V. (2007) Mechanisms involved in the protection of UV-induced protein inactivation by the corneal crystallin ALDH3A1. *J Biol Chem* **282**, 4382-4392

93. Lassen, N., Bateman, J. B., Estey, T., Kuszak, J. R., Nees, D. W., Piatigorsky, J., Duester, G., Day, B. J., Huang, J., Hines, L. M., and Vasiliou, V. (2007) Multiple and additive functions of ALDH3A1 and ALDH1A1: cataract phenotype and ocular oxidative damage in *Aldh3a1*(-/-)/*Aldh1a1*(-/-) knock-out mice. *J Biol Chem* **282**, 25668-25676

94. Nees, D. W., Wawrousek, E. F., Robison, W. G., Jr., and Piatigorsky, J. (2002) Structurally normal corneas in aldehyde dehydrogenase 3a1-deficient mice. *Mol Cell Biol* **22**, 849-855

95. Payet, L. A., Leroux, M., Willison, J. C., Kihara, A., Pelosi, L., and Pierrel, F. (2016) Mechanistic Details of Early Steps in Coenzyme Q Biosynthesis Pathway in Yeast. *Cell Chem Biol* **23**, 1241-1250

96. 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

97. Nakajima, K., Sano, S., Uchida, Y., Akiyama, M., Morita, Y., and Shimizu, H. (2011) Altered lipid profiles in the stratum corneum of Sjögren-Larsson syndrome. *J Dermatol Sci* **63**, 64-66

98. Ashibe, B., Hirai, T., Higashi, K., Sekimizu, K., and Motojima, K. (2007) Dual subcellular localization in the endoplasmic reticulum and peroxisomes and a vital role in protecting against oxidative stress of fatty aldehyde dehydrogenase are achieved by alternative splicing. *J Biol Chem* **282**, 20763-20773

99. Marchitti, S. A., Orlicky, D. J., and Vasiliou, V. (2007) Expression and initial characterization of human ALDH3B1. *Biochem Biophys Res Commun* **356**, 792-798

100. Marchitti, S. A., Brocker, C., Orlicky, D. J., and Vasiliou, V. (2010) Molecular

characterization, expression analysis, and role of ALDH3B1 in the cellular protection against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **49**, 1432-1443

101. Marchitti, S. A., Orlicky, D. J., Brocker, C., and Vasiliou, V. (2010) Aldehyde dehydrogenase 3B1 (ALDH3B1): immunohistochemical tissue distribution and cellular-specific localization in normal and cancerous human tissues. *J Histochem Cytochem* **58**, 765-783
102. Niu, H., Hadwiger, G., Fujiwara, H., and Welch, J. S. (2016) Pathways of retinoid synthesis in mouse macrophages and bone marrow cells. *J Leukoc Biol* **99**, 797-810
103. Rizzo, W. B. (2007) Sjögren-Larsson syndrome: molecular genetics and biochemical pathogenesis of fatty aldehyde dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab* **90**, 1-9
104. Bhallil, S., Chraibi, F., Andalloussi, I. B., and Tahri, H. (2012) Optical coherence tomography aspect of crystalline macular dystrophy in Sjögren-Larsson syndrome. *Int Ophthalmol* **32**, 495-498
105. Willemsen, M. A., Van Der Graaf, M., Van Der Knaap, M. S., Heerschap, A., Van Domburg, P. H., Gabreels, F. J., and Rotteveel, J. J. (2004) MR imaging and proton MR spectroscopic studies in Sjögren-Larsson syndrome: characterization of the leukoencephalopathy. *AJNR Am J Neuroradiol* **25**, 649-657
106. Meyers, K. J., Mares, J. A., Igo, R. P., Jr., Truitt, B., Liu, Z., Millen, A. E., Klein, M., Johnson, E. J., Engelman, C. D., Karki, C. K., Blodi, B., Gehrs, K., Tinker, L., Wallace, R., Robinson, J., LeBlanc, E. S., Sarto, G., Bernstein, P. S., SanGiovanni, J. P., and Iyengar, S. K. (2014) Genetic evidence for role of carotenoids in age-related macular degeneration in the Carotenoids in Age-Related Eye Disease Study (CAREDS). *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**, 587-599
107. Aslam, S. A., and Sheth, H. G. (2007) Ocular features of Sjögren-Larsson syndrome. *Clin Exp Ophthalmol* **35**, 98-99
108. Fuerst, N. M., Serrano, L., Han, G., Morgan, J. I., Maguire, A. M., Leroy, B. P., Kim, B. J., and Aleman, T. S. (2016) Detailed functional and structural phenotype of Bietti crystalline dystrophy associated with mutations in *CYP4V2* complicated by choroidal neovascularization. *Ophthalmic Genet* **37**, 445-452
109. Naganuma, T., Takagi, S., Kanetake, T., Kitamura, T., Hattori, S., Miyakawa, T., Sassa, T., and Kihara, A. (2016) Disruption of the Sjögren-Larsson Syndrome Gene *Aldh3a2* in Mice Increases Keratinocyte Growth and Retards Skin Barrier Recovery. *J Biol Chem* **291**, 11676-11688

110. Zhang, F. L., and Casey, P. J. (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* **65**, 241-269

111. Berndt, N., and Sebti, S. M. (2011) Measurement of protein farnesylation and geranylgeranylation in vitro, in cultured cells and in biopsies, and the effects of prenyl transferase inhibitors. *Nat Protoc* **6**, 1775-1791

112. Ashby, M. N. (1998) CaaX converting enzymes. *Curr Opin Lipidol* **9**, 99-102

113. Bergo, M. O., Gavino, B., Ross, J., Schmidt, W. K., Hong, C., Kendall, L. V., Mohr, A., Meta, M., Genant, H., Jiang, Y., Wisner, E. R., Van Bruggen, N., Carano, R. A., Michaelis, S., Griffey, S. M., and Young, S. G. (2002) *Zmpste24* deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13049-13054

114. Bergo, M. O., Leung, G. K., Ambroziak, P., Otto, J. C., Casey, P. J., Gomes, A. Q., Seabra, M. C., and Young, S. G. (2001) Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase deficiency in mice. *J Biol Chem* **276**, 5841-5845

115. Ohno, Y., Kashio, A., Ogata, R., Ishitomi, A., Yamazaki, Y., and Kihara, A. (2012) Analysis of substrate specificity of human DHHC protein acyltransferases using a yeast expression system. *Mol Biol Cell* **23**, 4543-4551

116. Smotrys, J. E., and Linder, M. E. (2004) Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function. *Annu Rev Biochem* **73**, 559-587

117. Maltese, W. A. (1990) Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *FASEB J* **4**, 3319-3328

118. Penno, A., Hackenbroich, G., and Thiele, C. (2013) Phospholipids and lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* **1831**, 589-594

119. Kihara, A. (2014) Sphingosine 1-phosphate is a key metabolite linking sphingolipids to glycerophospholipids. *Biochim Biophys Acta* **1841**, 766-772

120. 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

121. Tsai, S. C., Avigan, J., and Steinberg, D. (1969) Studies on the alpha oxidation of phytanic acid by rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **244**, 2682-2692

122. Watkins, P. A., and Mihalik, S. J. (1990) Mitochondrial oxidation of phytanic acid in human and monkey liver: implication that Refsum's disease is not a peroxisomal disorder. *Biochem Biophys Res Commun* **167**, 580-586

123. Verhoeven, N. M., Wanders, R. J., Poll-The, B. T., Saudubray, J. M., and Jakobs, C. (1998) The metabolism of phytanic acid and pristanic acid in man: a review. *J Inherit Metab Dis* **21**, 697-728

124. 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

125. Joutel, A., Ducros, A., Alamowitch, S., Cruaud, C., Domenga, V., Marechal, E., Vahedi, K., Chabriat, H., Bousser, M. G., and Tournier-Lasserve, E. (1996) A human homolog of bacterial acetolactate synthase genes maps within the CADASIL critical region. *Genomics* **38**, 192-198

126. Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J. D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**, 115-132

127. Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H., Chu, A. M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S. W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S. H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J. H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Liebundguth, N., Lockhart, D. J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J. L., Riles, L., Roberts, C. J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Veronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T. R., Wysocki, R., Yen, G. S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M., and Davis, R. W. (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**, 901-906

128. James, P. F., and Zoeller, R. A. (1997) Isolation of animal cell mutants defective in long-chain fatty aldehyde dehydrogenase. Sensitivity to fatty aldehydes and Schiff's base modification of phospholipids: implications for Sjögren-Larsson syndrome. *J Biol Chem* **272**, 23532-23539

129. Estey, T., Piatigorsky, J., Lassen, N., and Vasiliou, V. (2007) ALDH3A1: a corneal crystallin with diverse functions. *Exp Eye Res* **84**, 3-12

130. Hancock, J. F., Paterson, H., and Marshall, C. J. (1990) A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the

plasma membrane. *Cell* **63**, 133-139

131. Gruber, A., Cornaciu, I., Lass, A., Schweiger, M., Poeschl, M., Eder, C., Kumari, M., Schoiswohl, G., Wolinski, H., Kohlwein, S. D., Zechner, R., Zimmermann, R., and Oberer, M. (2010) The N-terminal region of comparative gene identification-58 (CGI-58) is important for lipid droplet binding and activation of adipose triglyceride lipase. *J Biol Chem* **285**, 12289-12298

132. Koivuniemi, A., Vuorela, T., Kovanen, P. T., Vattulainen, I., and Hyvonen, M. T. (2012) Lipid exchange mechanism of the cholesteryl ester transfer protein clarified by atomistic and coarse-grained simulations. *PLoS Comput Biol* **8**, e1002299

133. Wan, J., Roth, A. F., Bailey, A. O., and Davis, N. G. (2007) Palmitoylated proteins: purification and identification. *Nat Protoc* **2**, 1573-1584

134. Kitamura, T., Naganuma, T., Abe, K., Nakahara, K., Ohno, Y., and Kihara, A. (2013) Substrate specificity, plasma membrane localization, and lipid modification of the aldehyde dehydrogenase ALDH3B1. *Biochim Biophys Acta* **1831**, 1395-1401

135. Wallner, S., and Schmitz, G. (2011) Plasmalogens the neglected regulatory and scavenging lipid species. *Chem Phys Lipids* **164**, 573-589

136. Kitamura, T., Takagi, S., Naganuma, T., and Kihara, A. (2015) Mouse aldehyde dehydrogenase ALDH3B2 is localized to lipid droplets via two C-terminal tryptophan residues and lipid modification. *Biochem J* **465**, 79-87

137. Tyagi, A. K., Tran, L. V., Malla, B. A., and Kumar, S. (2016) Polyunsaturated fatty acids in male ruminant reproduction: A review. *Asian-Australas J Anim Sci*

138. Bouvet, S., Golinelli-Cohen, M. P., Contremoulins, V., and Jackson, C. L. (2013) Targeting of the Arf-GEF GBF1 to lipid droplets and Golgi membranes. *J Cell Sci* **126**, 4794-4805

139. Yau, W. M., Wimley, W. C., Gawrisch, K., and White, S. H. (1998) The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry* **37**, 14713-14718

140. Johnson, J. L., Erickson, J. W., and Cerione, R. A. (2012) C-terminal di-arginine motif of Cdc42 protein is essential for binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-containing membranes and inducing cellular transformation. *J Biol Chem* **287**, 5764-5774

141. Shahinian, S., and Silvius, J. R. (1995) Doubly-lipid-modified protein sequence motifs exhibit long-lived anchorage to lipid bilayer membranes. *Biochemistry* **34**, 3813-3822

142. Goodwin, J. S., Drake, K. R., Rogers, C., Wright, L., Lippincott-Schwartz, J., Philips, M. R., and Kenworthy, A. K. (2005) Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicular pathway. *J Cell Biol* **170**, 261-272

143. Mitchell, D. A., Farh, L., Marshall, T. K., and Deschenes, R. J. (1994) A polybasic domain allows nonprenylated Ras proteins to function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**, 21540-21546

144. Navarro-Lerida, I., Sanchez-Perales, S., Calvo, M., Rentero, C., Zheng, Y., Enrich, C., and Del Pozo, M. A. (2012) A palmitoylation switch mechanism regulates Rac1 function and membrane organization. *EMBO J* **31**, 534-551

145. Keller, M. A., Zander, U., Fuchs, J. E., Kreutz, C., Watschinger, K., Mueller, T., Golderer, G., Liedl, K. R., Ralser, M., Krautler, B., Werner, E. R., and Marquez, J. A. (2014) A gatekeeper helix determines the substrate specificity of Sjögren-Larsson Syndrome enzyme fatty aldehyde dehydrogenase. *Nat Commun* **5**, 4439

146. Colombo, S., Longhi, R., Alcaro, S., Ortuso, F., Sprocati, T., Flora, A., and Borgese, N. (2005) N-myristoylation determines dual targeting of mammalian NADH-cytochrome b5 reductase to ER and mitochondrial outer membranes by a mechanism of kinetic partitioning. *J Cell Biol* **168**, 735-745

147. Sun, X., Jia, Y., Zhang, X., Xu, Q., Shen, Y., and Li, Y. (2005) Multi-locus association study of schizophrenia susceptibility genes with a posterior probability method. *Sci China C Life Sci* **48**, 263-269

148. Wang, Y., Hu, Y., Fang, Y., Zhang, K., Yang, H., Ma, J., Xu, Q., and Shen, Y. (2009) Evidence of epistasis between the catechol-O-methyltransferase and aldehyde dehydrogenase 3B1 genes in paranoid schizophrenia. *Biol Psychiatry* **65**, 1048-1054

149. Galter, D., Buervenich, S., Carmine, A., Anvret, M., and Olson, L. (2003) ALDH1 mRNA: presence in human dopamine neurons and decreases in substantia nigra in Parkinson's disease and in the ventral tegmental area in schizophrenia. *Neurobiol Dis* **14**, 637-647

150. Wan, C., Shi, Y., Zhao, X., Tang, W., Zhang, M., Ji, B., Zhu, H., Xu, Y., Li, H., Feng, G., and He, L. (2009) Positive association between *ALDH1A2* and schizophrenia in the Chinese population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **33**, 1491-1495

151. Brooks, P. J., and Theruvathu, J. A. (2005) DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol* **35**, 187-193

謝辞

本研究の遂行にあたり，終始懇篤なる御指導，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　木原章雄教授に深く御礼申し上げます。木原章雄教授には，充実した環境にて自由に研究させて頂いたのみならず，実験手法，論理的思考，プレゼンテーション技術，並びに論文執筆等，研究活動全般にわたり懇切丁寧に御指導賜りましたことを心より御礼申し上げます。

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大学院薬学研究院　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　大野祐介助教に心より感謝申し上げます。特に，佐々貴之准教授には本論文の審査もして頂き，併せて深く御礼申し上げます。

本論文を審査して頂き，有益な御教示，御助言を賜りました北海道大学大学院薬学研究院　神経科学研究室　鈴木利治教授，同研究室　多留偉功准教授に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり，日々，議論を通じて多くの有益な知識，教示を頂きました生化学研究室の皆様に深く感謝致します。特に，永沼達郎氏，安部健介氏，宮本正宗氏，関直哉氏とは日々活発な御助言，御討論を頂いたことを心より感謝申し上げます。

最後に，これまであらゆる面において私を支え，励まして下さいました家族，友人に心より感謝致します。