



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	スフィンガジエンの代謝およびスフィンガジエン産生酵素FADS3の同定と酵素学的解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	城島, 啓佑
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第15784号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92033
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Keisuke_Jojima_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学） 氏名 城島 啓佑

学位論文題名

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

スフィンゴ脂質は真核生物に普遍的に存在する多機能脂質である。スフィンゴ脂質は神経機能、皮膚バリア形成、免疫機能、糖代謝の調節、精子形成など多彩な生理機能をもつ。そのため、スフィンゴ脂質の恒常性の破綻はニューロパチーや魚鱗癬など様々な疾患を引き起こす。スフィンゴ脂質は疎水骨格であるセラミドと極性基から構成される。極性基はホスホコリンまたは糖／糖鎖であり、それぞれをもつものをスフィンゴミエリン (SM)、スフィンゴ糖脂質と呼び、これらは複合スフィンゴ脂質と総称される。セラミド (CER) は長鎖塩基と脂肪酸がアミド結合した構造をもつ。長鎖塩基は 1 位と 3 位に水酸基、2 位にアミノ基という共通した構造をもつ。哺乳類には 5 種類の長鎖塩基が存在し、その中でジヒドロスフィンゴシン (DHS) は共通構造以外の官能基をもたない最も単純な構造である。DHS を基本構造として 4 位にトランス二重結合をもつものをスフィンゴシン (SPH)、水酸基をもつものをフィトスフィンゴシンと呼ぶ。SPH は哺乳類で最も主要な長鎖塩基であり、広範な組織に分布する一方でフィトスフィンゴシンは表皮、腎臓、小腸などに限局する。6-ヒドロキシスフィンゴシンは SPH 構造に対して 6 位に水酸基をもち、表皮や口腔粘膜のみに存在する。本研究の主題である 4,14-スフィンガジエン (SPD) は 4 位にトランス二重結合、14 位にシス二重結合をもち、哺乳類の長鎖塩基で唯一シス二重結合をもつことが特徴的である。SPD の定量法はこれまで存在せず、このことが SPD 研究のボトルネックであった。我々は液体クロマトグラフィー連結タンデム質量分析 (LC-MS/MS) を用いて SPD の高精度、高感度な定量法を確立し、この分析法を用いて SPD が広範な組織に分布し、特に腎臓と脳に豊富であることを明らかにした。SPD は長鎖塩基で唯一シス二重結合による湾曲した構造を有することから、他の長鎖塩基とは異なる生理的役割を担い、特徴的な代謝を受けることが予想されたが、それらはほとんど明らかになっていなかった。また、SPD は半世紀以上に発見されたものの、SPD に特徴的な 14 位のシス二重結合を導入する酵素は不明である。そこで本研究では、SPD のシス二重結合を導入する不飽和化酵素の同定とその酵素学的な解析および SPD の代謝機構の解明を目指した。

SPD のシス二重結合を導入する酵素の候補として脂肪酸不飽和化酵素 (FADS) ファミリーに着目した。FADS ファミリーにはヒトでは 8 つのメンバーが属し、アシル CoA のシス不飽和化や DHS 含有セラミドのトランス不飽和化／水酸化を担うことが知られている。これら FADS の SPD 合成活性への関与を調べるために FADS1-8 をそれぞれ HEK 293T 細胞に過剰発現させ、重水素標識 SPH (d_7 -SPH) でラベルし、産生された重水素標識 SPD 含有 CER (d_7 -SPD-CER) を LC-MS/MS によって定量した。その結果、FADS3 を過剰発現させた細胞のみ、ベクター導入細胞と比較して 20 倍程度多く d_7 -SPD-CER が産生した。次に、ヒト慢性骨髄性白血病由来一倍体細胞株である HAP1 細胞の *FADS3* 遺伝子を CRISPR-Cas9 システムによって欠損させ、 d_7 -SPH でラベルしたところ d_7 -SPD-CER はほとんど産生されなかった。このことから、FADS3 が SPD のシス二重結合導入を担う酵素であることが明らかとなった。

FADS3 の基質として SPH 含有セラミド (SPH-CER) または遊離の SPH が考えられたが、どちらを基質とするかは不明であった。このことを調べるために *in vitro* における FADS3 の活性測定を行った。FADS3 を過剰発現させた HEK 293T 細胞から総細胞抽出液を調製し、C6:0 の脂肪酸をもつ SPH-CER (C6-SPH-CER) または d_7 -SPH と反応させ、産生される C6-SPD-CER および d_7 -SPD を LC-MS/MS で測定した。その結果、ベクター導入細胞と比較して

FADS3 過剰発現細胞由来の総細胞抽出液と反応させた場合、約 3,000 倍の C6-SPD-CER が産生された一方、*d*₇-SPD はほとんど産生されなかった。このことから、FADS3 の基質は遊離の SPH ではなく、SPH-CER であることが明らかとなった。また、*in vitro* だけでなく細胞を用いたアッセイによっても FADS3 が 14 位のシス二重結合導入活性をもつことを示した。

長鎖塩基の種類によって複合スフィンゴ脂質への代謝の流れが異なることが知られているが、SPD の複合スフィンゴ脂質への代謝のされやすさは不明であった。このことを調べるため、*d*₇-SPH または *d*₇-SPD を細胞に取り込ませ、各 *d*₇-長鎖塩基を含有する CER, SM, モノヘキソシルセラミド (HexCER, グルコースまたはガラクトースが 1 分子結合した CER) の量を LC-MS/MS によって定量し、産生のタイムコースを比較した。その結果、*d*₇-SPH あるいは *d*₇-SPD を含有する CER の産生量とキネティクスに大きな差は見られなかった。HexCER の産生量はいずれの時間においても、*d*₇-SPH 含有 HexCER の方が *d*₇-SPD 含有 HexCER よりも多く、一方で SM に関してはいずれの時間でも *d*₇-SPD 含有 SM の方が *d*₇-SPH 含有 SM より多く産生されていた。以上の結果から、SPD が SPH と比較して HexCER に代謝されやすく、SM に代謝されやすいことが示唆された。さらに、*in vivo* における SPD の複合スフィンゴ脂質への代謝の流れを調べるため、マウスの脳と腎臓から脂質を抽出し、SPH または SPD を含有する CER, SM および HexCER 量を LC-MS/MS で調べた。その結果、SPD-CER 量の SPH-CER 量に対する比率は脳では 19.3%、腎臓では 46.6%であった。脳では SPH 含有 HexCER (ほとんどがガラクトシル CER) が豊富に存在するが、SPD 含有 HexCER の量は少なく、SPH 含有 HexCER の 3.2%であった。一方、SPH 含有 SM 量に対する SPD 含有 SM 量は 7.2%であった。このことは SPD-CER が HexCER よりも SM に代謝されやすいという上記の結果と一致した。以上の結果から、SPD の代謝はスフィンゴ糖脂質よりも SM への流れが優勢であることが明らかとなった。

長鎖塩基は分解経路においてアシル CoA に変換される。例えば、SPH はリン酸化、C2-C3 間開裂によるアルデヒド産生、アルデヒドから脂肪酸への酸化、CoA 付加、C2 飽和化の 5 ステップの反応を受け、2 炭素短くなった飽和アシル CoA へ変換される。一方、SPD は分解経路によってどのようなアシル CoA に代謝されるのかは不明であった。そこで、細胞内における *d*₇-SPD またはその比較のために *d*₇-SPH を細胞に取り込ませ、代謝された *d*₇-脂肪酸の量とそのタイムコースを調べた。その結果、産生された *d*₇-脂肪酸の総量とキネティクスに関しては両者に大きな差は見られなかった。このことから、SPD と SPH の分解のされやすさは同程度であることが示唆された。*d*₇-SPH (C18:1) から産生された脂肪酸分子種の量はラベル後 1 時間では C16:0 が最も多く、その後、不飽和化や伸長を受けた C18:0, C18:1 が主要となった。一方、*d*₇-SPD (C18:2) からは飽和脂肪酸が産生されず、ラベル後 10 時間は C16:1 の量が最大で、その後は伸長された C18:1 が最も多く産生された。このことは、*d*₇-SPD の最初の代謝産物は C16:1 であり、SPD の 2 つの二重結合 (C14 シスまたは C4 トランス) の一方が飽和化され、*cis*-12-C16:1 または *trans*-2-C16:1 に変換されたことを意味していた。*d*₇-SPD 由来の *d*₇-C16:1 脂肪酸の LC における保持時間 (4.3 分) は *trans*-2-C16:1 脂肪酸 (5.6 分) とは大きく異なり、*cis*-9-C16:1 脂肪酸 (4.4 分) に近かった。このことから、SPD の代謝物は *cis*-12-C16:1 脂肪酸であることが明らかとなった。

本研究は SPD の生合成酵素 FADS3 の同定と SPD 代謝の全容を明らかにし、SPD や FADS3 が担うスフィンゴ脂質の多様性創出機構の分子的基盤の解明に寄与した。今後、本研究を基に *Fads3* KO マウスの解析を行うことで、長い間不明であった SPD の生理・病態的役割の解明につながることを期待される。