



|                     |                                                                                                         |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 脂肪酸 $\alpha$ 酸化と奇数鎖脂肪酸産生の分子機構の解明 [論文内容及び審査の要旨]                                                          |
| Author(s)           | 毛利, 圭佑                                                                                                  |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                   |
| Degree Name         | 博士(生命科学)                                                                                                |
| Dissertation Number | 甲第15787号                                                                                                |
| Issue Date          | 2024-03-25                                                                                              |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/92056">https://hdl.handle.net/2115/92056</a>                       |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                         |
| File Information    | Keisuke_Mori_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（生命科学） 氏名 毛利 圭佑

## 学位論文題名

### 脂肪酸 $\alpha$ 酸化と奇数鎖脂肪酸産生の分子機構の解明

生体内の多くの脂質は非水酸化脂肪酸から構成される。一方、2-水酸化 (2-OH) 脂肪酸も量は少ないものの、動物をはじめとして細菌・真菌・植物といった多くの生物種に存在する。2-OH 脂肪酸は $\beta$ 酸化によって分解を受けることができないだけでなく、主要な脂質分子種であるグリセロ脂質へも取り込まれない。そのため、2-OH 脂肪酸が広く代謝されるためには $\alpha$ 酸化と呼ばれる反応によって1炭素数を減らし、水酸基を除去される必要がある。 $\alpha$ 酸化の基質は2-OH 脂肪酸だけでなく、3-メチル脂肪酸も含まれ、それぞれ $\alpha$ 酸化を受けて一炭素短い非水酸化脂肪酸および2-メチル脂肪酸へと変換される。当研究室ではこれまでに酵母の $\alpha$ 酸化酵素として Mpo1 を、哺乳類における $\alpha$ 酸化酵素として2-ヒドロキシアシル CoA リアーゼ HACL2 をそれぞれ同定した。しかし、酵母 Mpo1 は既知のドメイン・モチーフをもたないため、その触媒基や触媒機構は不明であった。また、哺乳類の2-ヒドロキシアシル CoA リアーゼには HACL1 と HACL2 の2つのアイソザイムが存在するが、2-OH 脂肪酸と3-メチル脂肪酸の $\alpha$ 酸化に対するそれぞれのアイソザイムの寄与は不明であった。さらに、生体での奇数鎖脂肪酸産生における $\alpha$ 酸化の寄与も不明であった。そこで、本研究ではこれらの解明を目的に研究を行った。

Mpo1 の触媒基と触媒機構を明らかにするため、活性に重要なアミノ酸残基を探索した。細菌、真菌、原虫、および植物の Mpo1 ホモログ 18 種のアミノ酸配列を比較した結果、6 つアミノ酸残基 (Tyr15, His19, His28, His115, Glu119, Pro123) が高度に保存されていた。これらのアミノ酸残基をアラニンに置換した Mpo1 点変異体の $\alpha$ 酸化活性を測定した結果、ヒスチジン残基をアラニンに置換した3つの Mpo1 点変異体 (H19A, H28, H115A) では野生型 Mpo1 タンパク質と比較して顕著な活性の低下が認められた。次に、Mpo1 が触媒する $\alpha$ 酸化反応において酸化剤として用いられる分子の同定を試みた。当研究室の以前の研究から、Mpo1 の活性には $\text{Fe}^{2+}$ が補因子として必要であることが明らかとなっている。Mpo1 と同様に $\text{Fe}^{2+}$ を補因子として必要とするシトクロム P450 やカテコールジオキシゲナーゼなどは $\text{Fe}^{2+}$ に結合した酸素分子を酸化剤として用いることから、Mpo1 が同様に酸素分子を利用している可能性を検証した。Mpo1 を過剰発現させた酵母の膜画分を $\text{Fe}^{2+}$ 存在下で基質とともに、脱気条件下あるいは空気存在下で反応させた結果、Mpo1 は脱気条件下と比較して、空気存在下で高い活性を示した。このことから、Mpo1 が酸素分子を酸化剤として利用していることが明らかとなった。Mpo1 によって触媒される反応はラジカル的な反応であるのか、求核的に進行する反応であるのか不明であった。そこで次にラジカルスカベンジャーであるブチルヒドロキシルエー存在下で Mpo1 の活性を評価した。その結果、Mpo1 の活性は高濃度のブチルヒドロキシルエー存在下でも阻害されなかった。このことから、Mpo1 によって触媒される反応がラジカルを介さず求核的に進行することが明らかとなった。本研究では、以上の結果を基に、Mpo1 の触媒する脂肪酸 $\alpha$ 酸化の反応機構モデルを提唱した。

哺乳類の $\alpha$ 酸化に関わる HACL1 および HACL2 の2-OH 脂肪酸および3-メチル脂肪酸の $\alpha$ 酸化に対する寄与を明らかにするため、Hac11 または Hac12 を単独欠損あるいは二重欠損させた CHO-K1 細胞を用いて解析を行った。その結果、2-OH 脂肪酸および3-メチル脂肪酸の $\alpha$ 酸化において HACL1 および HACL2 は重複的に活性を示す

が、2-OH 脂肪酸の  $\alpha$  酸化においては主に HACL2 が、3-メチル脂肪酸の  $\alpha$  酸化においては HACL1 が主に寄与することが明らかとなった。続いて、生体組織における 2-OH 脂肪酸の  $\alpha$  酸化および奇数鎖脂肪酸産生における HACL2 の寄与を解明するために、*Hacl2* KO マウスを作製し、17 組織中の脂質組成を解析した。その結果、*Hacl2* KO マウスでは偶数鎖の脂肪酸から構成されるスフィンゴ脂質量に明らかな変化は認められなかった一方、奇数鎖の脂肪酸を含むスフィンゴ脂質量は多くの組織において減少し、2-OH 脂肪酸を含むスフィンゴ脂質量はほとんどの組織において増加した。2-OH 脂肪酸が豊富に存在する脳および胃に着目すると、脳のヘキサシルセラミドおよび胃のセミラドでは奇数鎖の脂肪酸から構成される脂質量が野生型マウスに比べて 20–50% まで減少し、偶数鎖の 2-OH 脂肪酸から構成される脂質量は 16–48% 増加した。

以上、本研究では、酵母  $\alpha$  酸化酵素 Mpo1 の活性に His19, His28, H115 が重要であること、Mpo1 が酸素分子を酸化剤として用いて求核的に反応を触媒することを明らかにし、Mpo1 によって触媒される  $\alpha$  酸化の反応機構モデルを提唱した。また、哺乳類  $\alpha$  酸化に関わる 2-ヒドロキシアシル CoA リアーゼ HACL1 および HACL2 に関して、2-OH 脂肪酸に対する  $\alpha$  酸化においては主に HACL2 が寄与するのに対し、3-メチル脂肪酸に対する  $\alpha$  酸化においては主に HACL1 が寄与することを明らかにした。さらに、*Hacl2* KO マウスでは広い組織において奇数鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質量が減少し、2-OH 脂肪酸含有スフィンゴ脂質が増加することを明らかにし、*Hacl2* を介した 2-OH 脂肪酸の  $\alpha$  酸化が生体における奇数鎖脂肪酸産生に関わっていることを明らかにした。