



Title	脂肪酸 α 酸化と奇数鎖脂肪酸産生の分子機構の解明
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15787
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92302
Type	doctoral thesis
File Information	Keisuke_Mori.pdf



博士学位論文

脂肪酸 α 酸化と奇数鎖脂肪酸産生の分子機構の解明

毛利 圭佑

北海道大学大学院生命科学院
生命科学専攻 生命医薬科学コース
生化学研究室

令和 6 年 3 月

目次

略語	6
脚注	7
1. 序論	8
1.1 スフィンゴ脂質	8
1.2 2-OH 脂肪酸	10
1.3 2-OH 脂肪酸産生経路.....	10
1.4 脂肪酸 α 酸化と奇数鎖脂肪酸産生	11
1.5 2-OH 脂肪酸の α 酸化経路.....	11
1.6 3-メチル脂肪酸の α 酸化経路.....	12
1.7 Mpo1.....	13
1.8 HACL1/HACL2	14
2. 研究背景と目的.....	15
3. 結果	16
3.1 酵母 α 酸化酵素 Mpo1 の生化学的解析	16
3.1.1 Mpo1 の 3 つのヒスチジン残基が活性に重要である	16
3.1.2 Pxp1 は酵母における 2-OH 脂肪酸の α 酸化に関与しない	22
3.1.3 Mpo1 は極長鎖の 2-OH 脂肪酸に対して活性を示す	23
3.1.4 Mpo1 による α 酸化反応では酸素分子が酸化剤として用いられる	24

3.1.5	Mpo1 速度論解析.....	26
3.1.6	Mpo1 は適切な小胞体ストレス応答に重要である	26
3.2	哺乳類 α 酸化酵素 HACL2 の奇数鎖脂肪酸産生における役割の解明.....	28
3.2.1	直鎖の 2-OH 脂肪酸の α 酸化においては HACL2 の寄与が大きい	28
3.2.2	3-メチル分岐鎖脂肪酸の α 酸化においては HACL1 の寄与が大きい	30
3.2.3	2-OH 脂肪酸及び 2-OH 脂肪酸含有スフィンゴ脂質の組織分布.....	32
3.2.4	<i>Hac12</i> KO マウスにおける 2-OH および奇数鎖脂質量の変化	34
4.	考察	45
4.1	酵母 α 酸化酵素 Mpo1 の生化学的解析	45
4.1.1	Mpo1 によって触媒される α 酸化の分子機構	45
4.1.2	Mpo1 による 2-OH 脂肪酸代謝と生理的意義	48
4.2	哺乳類 α 酸化酵素 HACL2 の奇数鎖脂肪酸産生における役割の解明.....	49
4.2.1	HACL1 がペルオキシソームに, HACL2 が小胞体に局在する意義	49
4.2.2	哺乳類における 3-メチル脂肪酸の毒性回避機構	49
4.2.3	哺乳類における奇数鎖脂肪酸産生経路	50
4.2.4	脳における奇数鎖 HexCER 組成決定の分子機構	50
4.3	酵母および哺乳類における脂肪酸 α 酸化反応の意義	51
4.3.1	脂肪酸 α 酸化反応は基質の過剰な蓄積を防ぐ	51
4.3.2	哺乳類と酵母で脂肪酸 α 酸化経路が異なる意義	51

4.4	総括および今後の展望	52
5.	材料と方法	53
5.1	酵母株と培地	53
5.2	プラスミド	53
5.3	細胞培養	54
5.4	マウス	54
5.5	[³ H]PHS ラベル実験	54
5.6	プロテオリポソームの調製	55
5.7	<i>In vitro</i> 脂肪酸 α 酸化アッセイ	55
5.8	細胞からの脂質の抽出	56
5.9	培地からの脂肪酸の抽出・誘導体化	56
5.10	酵母からの脂質の抽出	57
5.11	マウス組織からの脂質の抽出・誘導体化	57
5.12	LC-MS/MS による脂質の解析	58
5.13	イムノブロットイング	58
5.14	定量的 RT-PCR	59
5.15	透過型電子顕微鏡観察	59
5.16	GFP 観察	60
6.	表	61

7. 参考文献	66
---------------	----

略語

2-OH	2-hydroxy (2-ヒドロキシ)
ACS	acyl-CoA synthetase (アシル CoA 合成酵素)
ALDH	aldehyde dehydrogenase (アルデヒド脱水素酵素)
AMPP	<i>N</i> -(4-aminomethylphenyl) pyridium (<i>N</i> -(4-アミノメチルフェニル)ピリジウム)
BAT	brown adipose tissue (褐色脂肪組織)
CER	ceramide (セラミド)
DHS	dihydrosphingosine (ジヒドロスフィンゴシン)
DKO	double knockout (二重欠損)
FFA	free fatty acid (遊離脂肪酸)
HACL	2-hydroxyacyl-CoA lyase (2-ヒドロキシアシル CoA リアーゼ)
HexCER	monohexosylceramide (モノヘキソシルセラミド)
IPC	inositol phosphorylceramide (イノシトールホスホリルセラミド)
KO	knockout (欠損)
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry (液体クロマトグラフィー連結タンデム質量分析器)
MIPC	mannosylinositol phosphorylceramide (マンノシルイノシトールホスホリルセラミド)
M(IP) ₂ C	mannosyldiinositol phosphorylceramide (マンノシルジイノシトールホスホリルセラミド)
PC	phosphatidylcholine (ホスファチジルコリン)
PE	phosphatidylethanolamine (ホスファチジルエタノールアミン)
PHS	phytosphingosine (フィトスフィンゴシン)
PHYH	phytanoyl-CoA 2-hydroxylase (フィタノイル CoA 2-水酸化酵素)
PI	phosphatidylinositol (ホスファチジルイノシトール)
PS	phosphatidylserine (ホスファチジルセリン)
SC 培地	synthetic complete 培地 (完全合成培地)
SM	sphingomyelin (スフィンゴミエリン)
SPH	sphingosine (スフィンゴシン)
TPP	thiamine pyrophosphate (チアミンピロリン酸)
WAT	white adipose tissue (白色脂肪組織)
WT	wildtype (野生型)

脚注

本研究では、ヒトの遺伝子はすべて大文字のイタリックで表記し、マウスの遺伝子は頭文字のみ大文字のイタリックで表記した。酵母の遺伝子については野生型遺伝子をすべて大文字のイタリックで表記し、潜性変異を有する遺伝子をすべて小文字でのイタリックで表記した。

ヒトのタンパク質は全て大文字で表記し、マウス・酵母のタンパク質を頭文字のみ大文字で表記した。

(例) ヒト:タンパク質 *HACL1*, 遺伝子 *HACL1*

マウス:タンパク質 *Hacl1*, 遺伝子 *Hacl1*

酵母:タンパク質 *Mpo1*, 野生型遺伝子 *MPO1*, 潜性変異を有する遺伝子 *mpo1*

脂肪酸の構造はC(炭素鎖長):(不飽和度)で表記した。

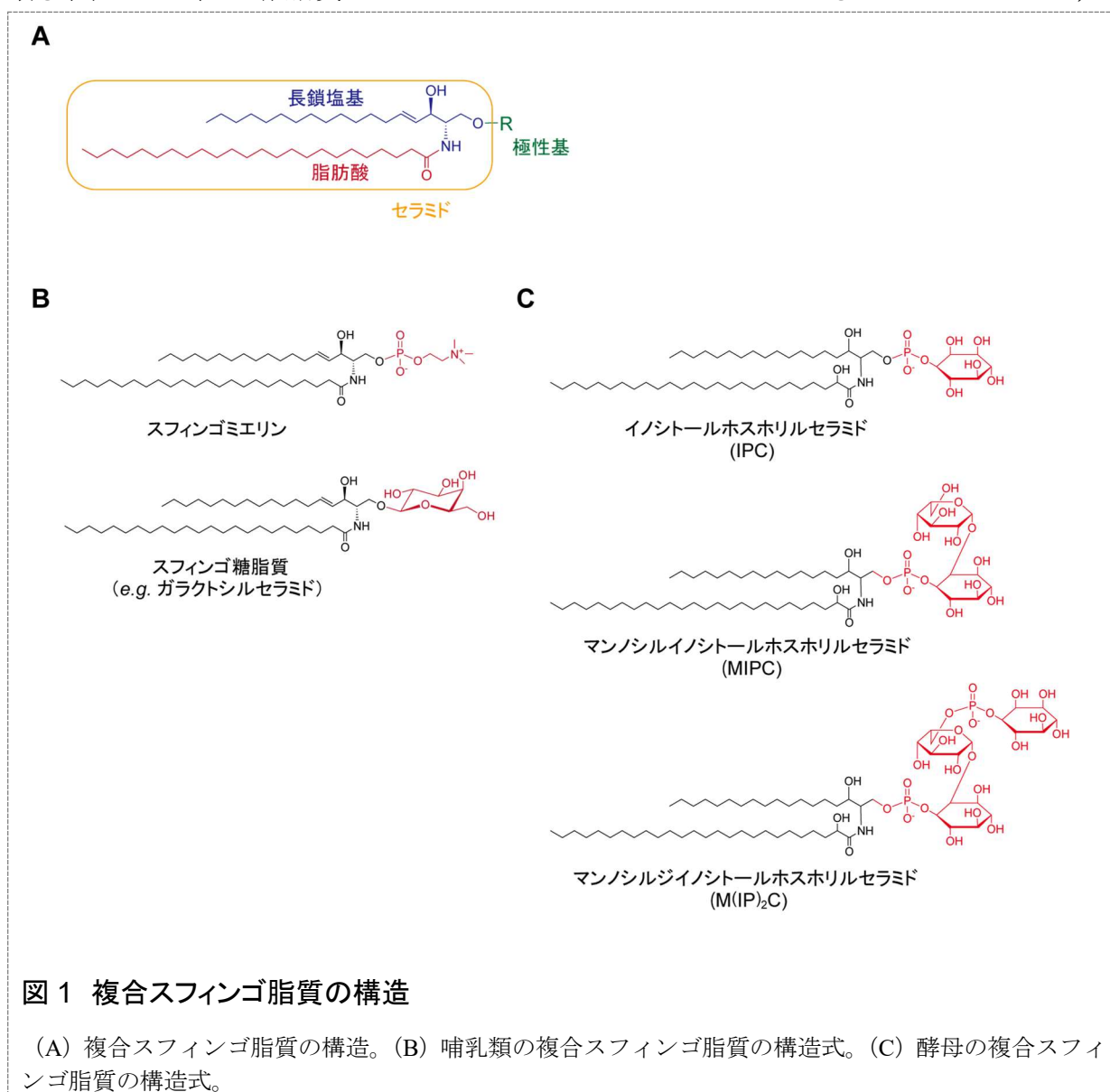
(例) 炭素鎖長 16 の一価不飽和脂肪酸 *C16:1*

1. 序論

1.1 スフィンゴ脂質

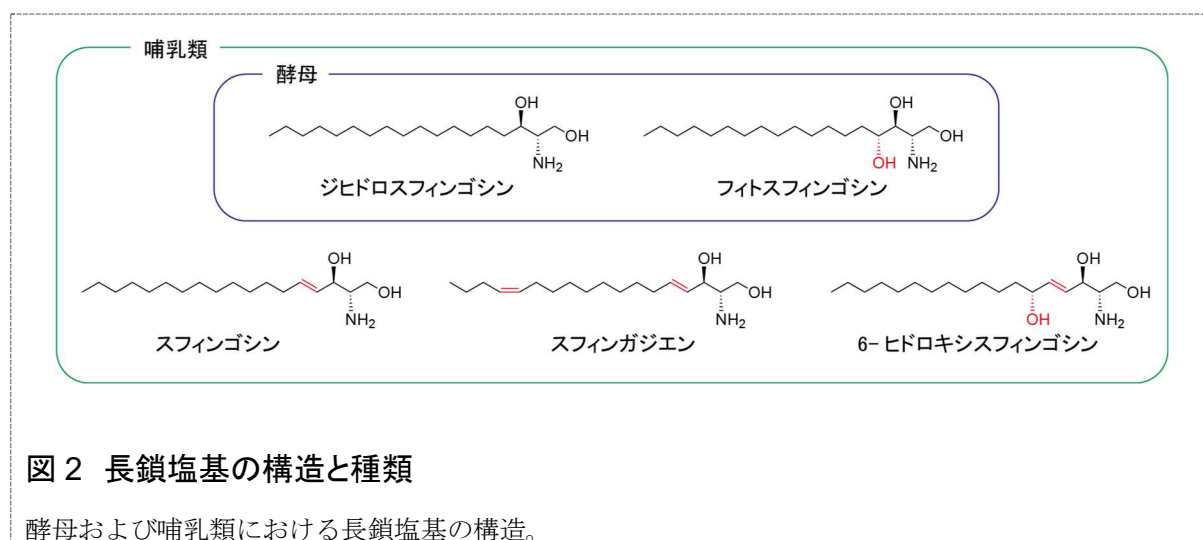
スフィンゴ脂質は長鎖塩基を有する脂質の総称であり、免疫機能や神経機能、皮膚バリア機能など様々な生理機能をもつ¹⁻³。複合スフィンゴ脂質は真核生物の生体膜を構成する主要な脂質の1つであり、疎水性骨格であるセラミド(CER)に極性基が結合した両親媒性の構造を有する(図 1A)。CER は長鎖塩基と脂肪酸がアミド結合した構造をもち、長鎖塩基および脂肪酸の炭素鎖長、不飽和度、水酸基の数および位置の異なる多様なクラス・分子種が存在する。

哺乳類における複合スフィンゴ脂質の極性基はホスホコリンまたは糖鎖であり、それらをもつ複合スフィンゴ脂質をそれぞれスフィンゴミエリン(SM)、スフィンゴ糖脂質と呼ぶ(図 1B)。最も単純なスフィンゴ糖脂質はグルコースあるいはガラクトースを1つもつグルコシル CER,



ガラクトシル CER であり、これらをまとめてモノヘキソシル CER (HexCER) と呼ぶ。酵母における複合スフィンゴ脂質は主にイノシトールホスホリルセラミド (IPC), マンノシルイノシトールホスホリルセラミド (MIPC) およびマンノシルジイノシトールホスホリルセラミド (M(IP)₂C) の 3 種類である (図 1C)。

長鎖塩基には生物種や組織によって異なる多くの分子種が存在し、共通して 1 位と 3 位に水酸基を、2 位にアミノ基をもつ。酵母にはジヒドロスフィンゴシン (DHS) とフィトスフィンゴシン (PHS) の二種類のみが存在するのに対し、哺乳類には DHS, PHS のほか、スフィンゴシン (SPH), スフィンガジエン, 6-ヒドロキシスフィンゴシンが存在する (図 2)。最も単純な構造の長鎖塩基は DHS であり, PHS は 4 位に水酸基を有する。哺乳類で最も主要な長鎖塩基はスフィンゴシンであり, 4 位と 5 位の間にトランス二重結合をもつ。スフィンガジエンおよび 6-ヒドロキシスフィンゴシンはスフィンゴシン同様, 4 位と 5 位の間にトランス二重結合をもつほか, スフィンガジエンは 14 位と 15 位の間にシス二重結合を, 6-ヒドロキシスフィンゴシンは 6 位に水酸基を有する。PHS は哺乳類では表皮・小腸・腎臓などの上皮組織に存在し^{4,6}, 乾癬やアトピー性皮膚炎患者の表皮では PHS 含有 CER 量の減少が報告されている⁷。また, 酵母におけるスフィンゴ脂質はほとんどが PHS から構成される^{8,9}。



脂肪酸は炭素鎖長により分類され, 炭素数 11 から 20 のものを長鎖脂肪酸, 炭素数 21 以上のものを極長鎖脂肪酸と呼ぶ¹⁰。一般に細胞内の脂肪酸プールの大部分は長鎖脂肪酸であるが, 複合スフィンゴ脂質を構成する脂肪酸には特徴的に極長鎖脂肪酸が多く含まれる¹¹。生体における脂肪酸のほとんどは偶数鎖であるが, 脳などの特定の組織のスフィンゴ脂質中には比較的多くの奇数鎖脂肪酸が存在する¹²。複合スフィンゴ脂質中には水酸基をもった脂肪酸も存在し, 代表的な水酸化脂肪酸として 2-ヒドロキシ (2-OH; 別名 α -ヒドロキシ) 脂肪酸が知られている¹³。

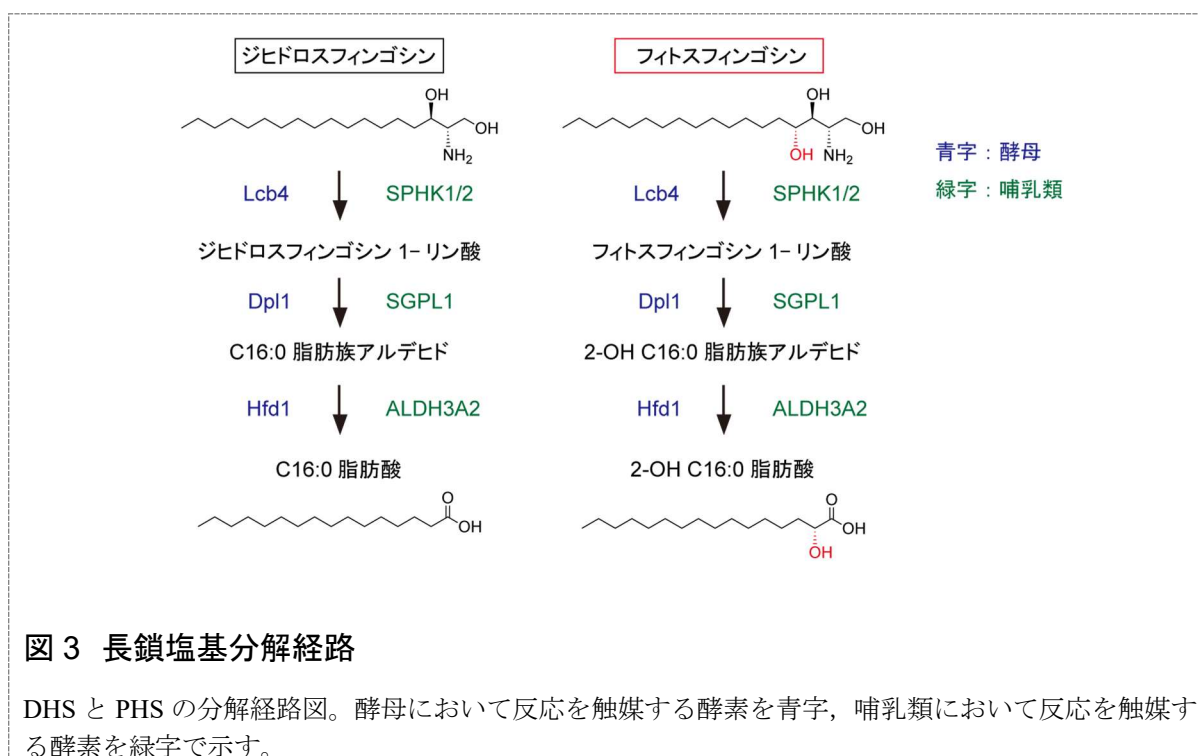
1.2 2-OH 脂肪酸

生体内の脂肪酸のほとんどは非水酸化脂肪酸であるが、2-OH 脂肪酸も一般的に量は少ないものの、細菌・真菌・植物・動物に広く存在する¹³⁻¹⁶。真核生物の生体膜は主にグリセリン脂質、スフィンゴ脂質、ステロールから構成されるが、ほとんどの 2-OH 脂肪酸はこれらの脂質のうち、スフィンゴ脂質中にのみ存在する¹³。2-OH 脂肪酸は哺乳類において脳、腸管、腎臓、生殖組織などの複合スフィンゴ脂質中に存在することが報告されており、ヒトであれば肝臓のグルコシルセラミドの 20 %、腎臓のグルコシルセラミドの 48 %を占めるなど特定の組織において比較的多く存在する^{13,17,18}。さらに、特に脳においては、2-OH 脂肪酸はミエリンのガラクトシル CER 中に多く存在し、2-OH 脂肪酸含有ガラクトシル CER はミエリンの形成と維持に重要であることが知られている¹⁹⁻²¹。酵母の複合スフィンゴ脂質はほとんどが 2-OH 脂肪酸から構成され、炭素数 26 の 2-OH 脂肪酸から構成されるスフィンゴ脂質が全体の 70-95 %を占める²²⁻²⁴。

1.3 2-OH 脂肪酸産生経路

2-OH 脂肪酸は 2 通りの経路によって産生される。1 つは脂肪酸 2-水酸化酵素による酸化反応である²⁵。哺乳類の脂肪酸 2-水酸化酵素としては FA2H が知られており、その遺伝子変異は脱髄を伴う遺伝性痙性対麻痺 (SPG35)を引き起こす²⁶。また、*Fa2h* の遺伝子ノックアウト(KO)マウスは遅発性のミエリン変性、神経障害および学習・記憶障害を示す^{19,21}。FA2H は幅広い鎖長の脂肪酸に対して活性を示し、*Fa2h* KO マウスの脳では C18 から C24 までの 2-OH 脂肪酸を含有するスフィンゴ脂質が消失する。酵母では FA2H のホモログである *Scs7* が CER 中の極長鎖脂肪酸鎖の 2-水酸化を担う²²。

もう 1 つの経路は、長鎖塩基の分解経路である^{27,28}。最も単純な長鎖塩基である DHS は長鎖塩基キナーゼ(哺乳類, SPHK1 および SPHK2; 酵母, Lcb4 および Lcb5)によるリン酸化^{29,30}、長鎖塩基 1-リン酸リアーゼ(哺乳類, SGPL1; 酵母, Dpl1)による 2 位と 3 位の間の開裂^{31,32}、脂肪酸族アルデヒド脱水素酵素(哺乳類, ALDH3A2; 酵母, Hfd1)による酸化をうけて C16:0 脂肪酸へと代謝される²⁸(図 3)。一方, PHS は DHS と同様にリン酸化・開裂・酸化の 3 反応を受けるが、4 位に水酸基を有するため、2-OH 脂肪酸に代謝される^{3,27,28}(図 3)。



1.4 脂肪酸 α 酸化と奇数鎖脂肪酸産生

脂肪酸のほとんどは非水酸化／非分岐型であり，分解過程ではアシル CoA へと変換後， β 酸化，つまり β 位 (3 位) の酸化を伴う分解を受け，二炭素短くなる。一方， α 位 (2 位) に水酸基，あるいは 3 位にメチル基をもつ脂肪酸は β 酸化を受けることができず， α 酸化と呼ばれる特殊な酸化過程を経て，1 炭素短い脂肪酸へと変換される³³⁻³⁵。 α 酸化は 1993 年に Poulos らによって発見された反応で，2-OH 脂肪酸は 1 炭素短い非水酸化脂肪酸へ，3-メチル脂肪酸は 2-メチル脂肪酸へと変換されることで， β 酸化による分解が可能となる³⁶。生体を構成する脂肪酸は大部分が偶数鎖であるため，2-OH 脂肪酸は α 酸化により 1 炭素の短縮を受けて主に奇数鎖の脂肪酸へと変換される。奇数鎖脂肪酸の産生経路としては，2-OH 脂肪酸の α 酸化以外に，プロピオニル CoA がプロピオニル ACP に変換された後，脂肪酸合成酵素によって脂肪酸へと変換される経路が存在する³⁷。しかし，奇数鎖脂肪酸産生へのそれぞれの経路の寄与は不明である。

1.5 2-OH 脂肪酸の α 酸化経路

α 酸化反応は哺乳類と酵母で異なった機構で行われる (図 4)。哺乳類では 2-OH 脂肪酸の α 酸化はアシル CoA 合成酵素 (ACS) による CoA 付加，2-OH アシル CoA リアーゼ (HACL) による C1 位と C2 位間の開裂，アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) による酸化の 3 反応で行われる (図 4)^{34,35}。これらの反応を経て，2-OH アシル CoA は 1 炭素短い脂肪酸へ

代謝される³³。これまで知られていた HACL はペルオキシソームに局在する HACL1 のみであったが、当研究室の北村らは新規 HACL として HACL1 と高い配列相同性を示す小胞体膜局在酵素 HACL2 を同定した^{27,38}。また、酵母における α 酸化経路の詳細は一切不明であったが、当研究室の近藤らは酵母における小胞体局在 α 酸化酵素 Mpo1 を同定し、Mpo1 が 2-OH 脂肪酸から 1 炭素短く、水酸基をもたない脂肪酸への変換を 1 反応で触媒することを明らかにした²⁸。

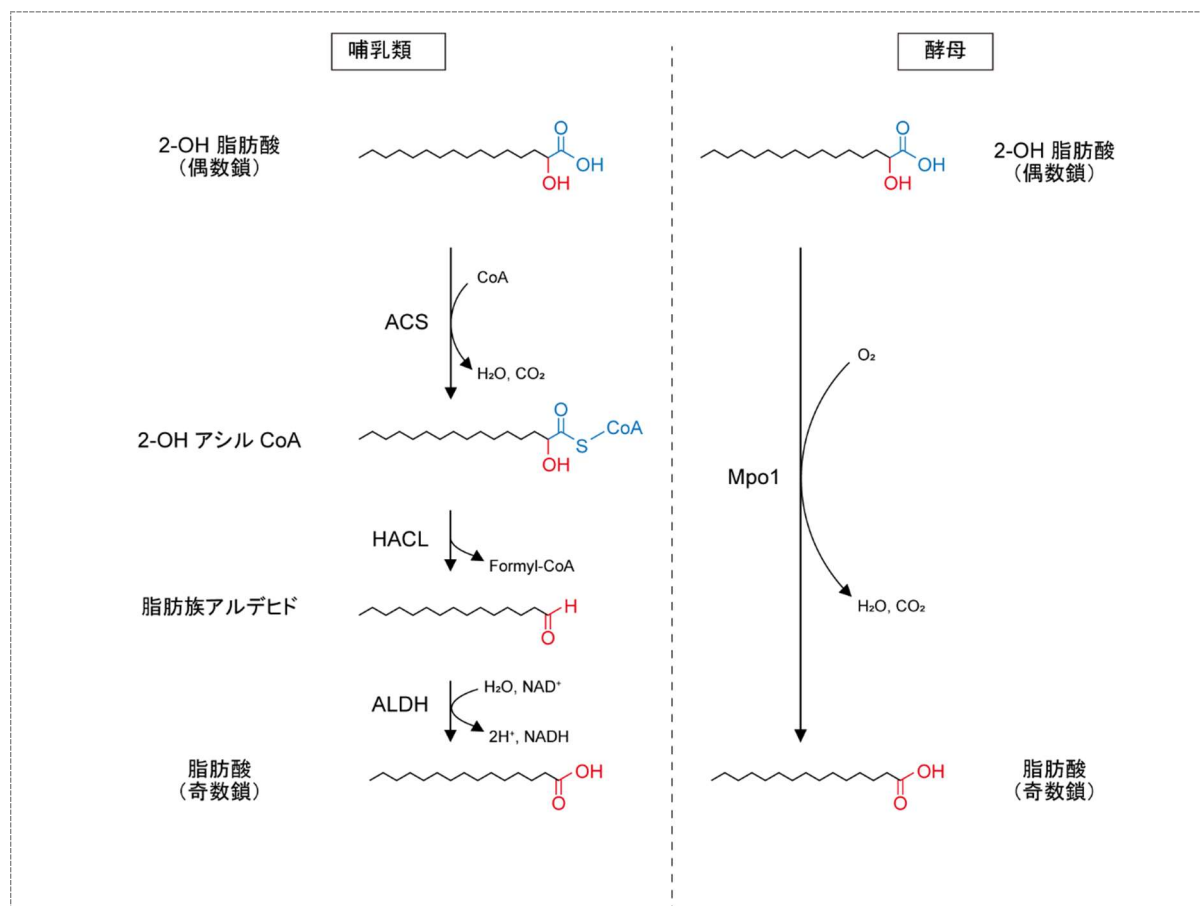


図 4 哺乳類および酵母における 2-OH 脂肪酸 α 酸化経路

(左)哺乳類における 2-OH 脂肪酸 α 酸化経路。2-OH 偶数鎖脂肪酸は 3 反応(アシル CoA 合成酵素による CoA 付加, 2-OH アシル CoA リアーゼによる C1 位と C2 位の間の開裂, アルデヒドデヒドロゲナーゼによる酸化)によって、1 炭素短い奇数鎖脂肪酸へと代謝される。(右)酵母における 2-OH 脂肪酸 α 酸化経路。2-OH 偶数鎖脂肪酸は Mpo1 によって一反応で、1 炭素短い奇数鎖脂肪酸へと代謝される。

1.6 3-メチル脂肪酸の α 酸化経路

ヒトでは α 酸化の基質となる 3-メチル脂肪酸としてフィタン酸がよく知られている³⁴。植物のクロロフィル中に含まれるフィトール基は、反芻動物による消化の際に腸内細菌によってフィタン酸へと変換される^{39,40}。ヒトは反芻動物由来の食品を食事から摂取することでフィタン酸を吸収し、 α 酸化によって代謝する。フィタン酸の α 酸化は 2-OH 脂肪酸の α 酸化にフィタノ

イル CoA-2-ヒドロキシラーゼ (PHYH) による 2-水酸化を加えた 4 反応 (CoA 付加, 2 位水酸化, C1 位と C2 位間の開裂, 酸化) で行われる (図 5)^{34,35,41}。2 反応目の水酸化に関わる *PHYH* 遺伝子の変異は運動失調, 皮膚魚鱗癬, 難聴, 網膜色素変性症, 白内障, 夜盲症などを主症状とするレフサム病を引き起こす⁴²。上述の 4 反応によってフィタン酸は 1 炭素短く, 2 位にメチル基を持った分岐鎖脂肪酸であるプリスタン酸へ変換され, その後, β 酸化によって分解される。

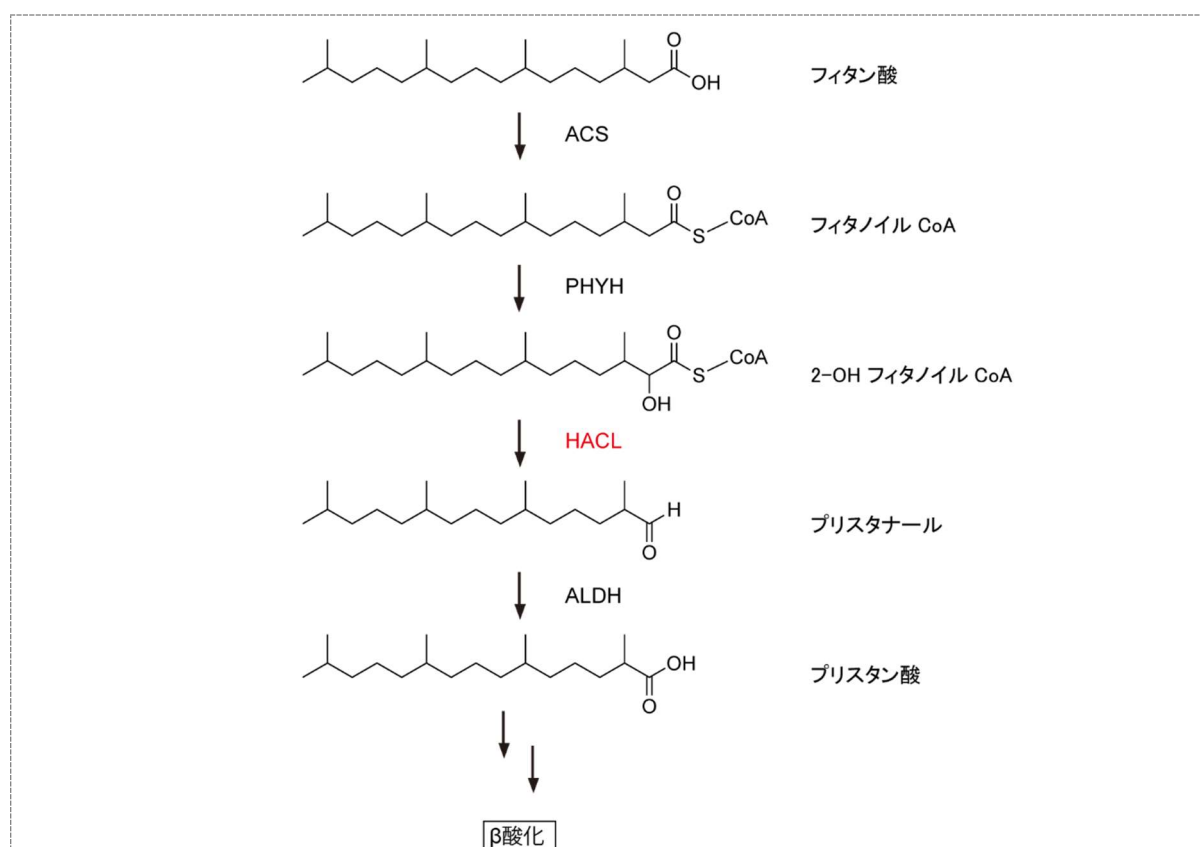


図 5 フィタン酸の α 酸化経路

フィタン酸の分解経路図。フィタン酸は ACS によってフィタノイル CoA へと変換された後, PHYH により 2 位水酸化を受ける。産生された 2-OH フィタノイル CoA は HACL によって C1 位と C2 位の間で開裂を受けてプリスタナールとなり, ALDH により酸化されてプリスタン酸へと変換されて β 酸化により分解される。

1.7 Mpo1

MPO1 は PHS の分解経路において産生される 2-OH C16:0 脂肪酸の α 酸化に必須な酵母遺伝子として当研究室の近藤らにより同定された²⁸。*Mpo1* は 174 アミノ酸残基からなる 2 回膜貫通タンパク質であり, 細菌・真菌・原虫・植物といった生物種で存在が確認される。哺乳類では 2-OH 脂肪酸の α 酸化が CoA 付加, 開裂, 酸化の 3 反応で行われるのに対し, *Mpo1* は Fe^{2+} 依存的に 1 反応で α 酸化反応を触媒する⁴³。しかし, *Mpo1* には既知のドメイ

ン・モチーフが存在しないため、Mpo1 の酵素学的性質に関しては未だ不明な点が多く存在する。例えば、Mpo1 の触媒する α 酸化反応には補因子として Fe^{2+} が必要だが、 Fe^{2+} 結合に関わる領域やアミノ酸残基は不明であり、Mpo1 の触媒する α 酸化反応において酸化剤として用いられる分子についても明らかとなっていない。また、酵母の Mpo1 が 2-OH 極長鎖脂肪酸に対して活性を示すかは明らかとなっていない。

1.8 HACL1/HACL2

HACL1 は 1999 年、Foulon らによって α 酸化に特徴的な C1 位と C2 位の開裂反応を触媒する酵素としてはじめて同定された³⁸。HACL1 はホモテトラマーを形成し、チアミンピロリン酸 (TPP) および Mg^{2+} 依存的に反応を触媒する開裂酵素であり、C 末端の PTS1 様のペルオキシソーム移行シグナルを介して、PEX5 依存的にペルオキシソームへ輸送される。*Hacl1* KO マウスは通常の生育条件下では明らかな表現型を示さないが、フィトールの摂取により、肝臓および血清においてフィタン酸が蓄積し、体重減少、腹部白色脂肪組織の欠如、肝臓の肥大、肝臓中のグリコーゲンおよびトリグリセリドの減少が引き起こされる⁴⁴。

哺乳類において α 酸化は長年ペルオキシソームで起こるとされていたが、前述のとおり、当研究室の北村らにより HACL1 との配列相同性から小胞体膜に局在する新規 α 酸化酵素 HACL2 が同定され、小胞体における α 酸化経路の存在が示された²⁷。*Hacl1* KO 細胞および *Hacl2* KO 細胞では PHS の分解経路で産生される長鎖の 2-OH 脂肪酸の α 酸化に変化は認められないが、*Hacl1 Hacl2* 二重 KO (DKO) 細胞では α 酸化活性が顕著に低下する。このことから、*Hacl1* および *Hacl2* は長鎖の 2-OH 脂肪酸の α 酸化において重複的に働くことが明らかとなっている。しかしながら、HACL2 がミエリンなどに多く存在する極長鎖の 2-OH 脂肪酸や、フィタン酸に代表される 3-メチル脂肪酸の α 酸化に関与するかは明らかとなっておらず、HACL1 と HACL2 の役割の違いは不明である。また、 α 酸化は奇数鎖脂肪酸産生経路の一つと考えられるが、各組織における奇数鎖脂肪酸の割合とその産生における 2-OH 脂肪酸の α 酸化の寄与も不明である。

2. 研究背景と目的

これまでに、当研究室の近藤、北村らの先行研究によって、酵母および哺乳類における PHS の分解経路が解明され^{27,28}、この経路中の α 酸化に関わる酵素として酵母 Mpo1 および哺乳類 HACL2 が同定された。しかしながら、Mpo1 には既知のドメイン・モチーフが存在しないため、Mpo1 の触媒する α 酸化反応の詳細な分子機構は未だ不明である。また、哺乳類 HACL2 が長鎖の 2-OH 脂肪酸の α 酸化に関わることは明らかとなっているが、極長鎖の 2-OH 脂肪酸や 3-メチル脂肪酸の α 酸化にも関わるかは不明であり、それぞれの基質に対する HACL1 と HACL2 の寄与の違いは明らかとなっていない。さらに、生体において 2-OH 脂肪酸の α 酸化は奇数鎖脂肪酸産生経路の 1 つと考えられるが、奇数鎖脂肪酸産生に対する α 酸化の寄与も不明であった。

そこで、本研究の前半では酵母を用いた変異体の解析および生化学的解析により、Mpo1 の酵素活性に関わるアミノ酸残基や、Mpo1 が触媒する反応において酸化剤として用いられる分子、極長鎖の 2-OH 脂肪酸に対する活性などの Mpo1 の酵素学的性質の解明を目指した。本研究の後半では HACL1 もしくは HACL2 を強制発現させた酵母株および *Hacl1* および *Hacl2* KO あるいは DKO 細胞、*Hacl2* KO マウスを用いた解析により、HACL1 と HACL2 の 2-OH 脂肪酸および 3-メチル脂肪酸の α 酸化に対する寄与の違い、生体における奇数鎖脂肪酸産生における HACL2 を介した脂肪酸 α 酸化の寄与の解明を試みた。

3. 結果

3.1 酵母 α 酸化酵素 Mpo1 の生化学的解析

3.1.1 Mpo1 の 3 つのヒスチジン残基が活性に重要である

Mpo1 の触媒基と触媒機構を明らかにするため、まずはじめに、細菌、真菌、原虫および植物の Mpo1 ファミリーメンバー 18 種のアミノ酸配列の比較を行った。その結果、6 つのアミノ酸残基 (Tyr15, His19, His28, His115, Glu119, Pro123) が保存されていた (図 6A)。次に、これらのアミノ酸残基の酵素活性における重要性を明らかにするために、それぞれのアミノ酸残基のアラニン置換体 (Y15A, H19A, H28A, H115A, E119A, P123A) を作製した。各 Mpo1 変異体を *mpo1* Δ 株に発現させたところ、Y15A 変異体の発現量はやや低かったが、残りの変異体は野生型 (WT) とほぼ同レベルで検出された (図 6B)。Mpo1 変異体の活性を評価するため、[11,12-³H]PHS を用いたラベル実験を行った。PHS は酵母において 2 通りの経路により代謝される (図 6C)。すなわち、スフィンゴ脂質 (緑色) へ組み込まれるか、分解されて 2-OH 脂肪酸となり、 α 酸化を経て水酸基が除去され、グリセロ脂質 (青色) に組み込まれるかである。ベクターを導入した *mpo1* Δ 株を [11,12-³H]PHS でラベルすると、以前の報告と一致して²⁸, PHS は複合スフィンゴ脂質 (IPC, MIPC および M(IP)₂C) へは代謝されたが、グリセロリン脂質 (ホスファチジルエタノールアミン [PE], ホスファチジルコリン [PC], ホスファチジルセリン [PS], ホスファチジルイノシトール [PI]) へは代謝されず、WT の *MPO1* を *mpo1* Δ 株に導入すると PHS からグリセロリン脂質への代謝が回復した (図 6D)。同様に、Y15A, E119A, P123A 変異体発現株では PHS からグリセロリン脂質への代謝が回復した。一方、H19A, H28A, H115A 変異体発現株では、PHS からグリセロリン脂質への代謝は回復しなかった。以上の結果から、3 つのヒスチジン残基 His19, His28, His115 が Mpo1 の活性に重要であることが示された。多くの Fe²⁺ イオン結合タンパク質において、ヒスチジン残基は Fe²⁺ イオンとの結合に関わることが報告されていることから⁴⁵⁻⁴⁸, His19, His28, His115 が Fe²⁺ の結合に関与している可能性が示唆された。

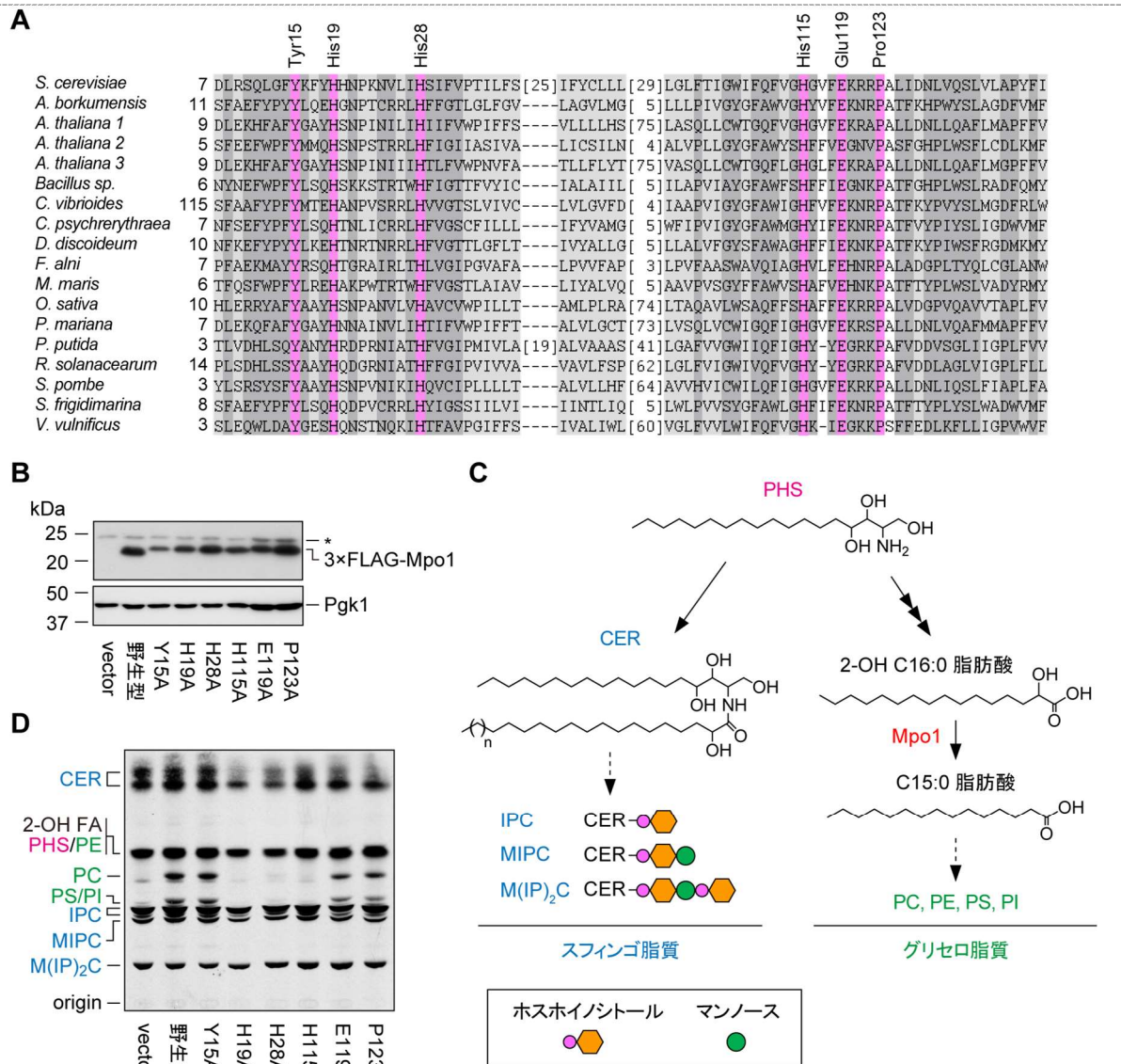


図 6 His19, His28, His115 残基は Mpo1 の機能に重要である

(A) 本実験で使用している酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Mpo1 を含む 18 種の Mpo1 ファミリーメンバーのアミノ酸配列のアライメントを BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて作成した。全てのメンバー間で保存されているアミノ酸残基をピンクでハイライトし、*S. cerevisiae* におけるアミノ酸配列番号をアライメントの上に示した。ダークグレーおよびライトグレーのハイライトで示されたアミノ酸はそれぞれメンバー間での高い相同性および弱い相同性を示すものを意味する。(B および D) pAKNF316 (ベクター), pNK46 (3×FLAG-MPO1), pMT12 (3×FLAG-MPO1 Y15A), pMT13 (3×FLAG-MPO1 H19A), pMT14 (3×FLAG-MPO1 H28A), pMT15 (3×FLAG-MPO1 H115A), pMT16 (3×FLAG-MPO1 E119A), もしくは pMT17 (3×FLAG-MPO1 P123A) プラスミドを導入した 4378 株 (*mpo1Δ*) を SC-URA 培地で対数増殖期まで培養した。(B) 酵母の総ライセートを SDS-PAGE により分離後、抗 FLAG 抗体もしくは抗 Pgk1 抗体 (ローディングコントロール) を用いてイムノブロットングを行った。アスタリスクは非特異的バンドを示す。(C) PHS 代謝経路。PHS は CER を経て、複合スフィンゴ脂質 (IPC, MIPC, M(IP)₂C) へと代謝される。あるいは、分解経路において C18 PHS は 2-OH C16:0 脂肪酸へと代謝された後、Mpo1 による α 酸化を受けて C15:0 脂肪酸へと変換されてグリセロ脂質 (PC, PE, PS, PI) へ組み込まれる。(D) 各酵母株を 0.016 μ Ci [³H]PHS で 30°C で 3 時間ラベルした。脂質を抽出後、順相 TLC で分離し、オートラジオグラフィーにより検出した。

酵母には C18 の PHS が最も多く存在し、ついで C20 PHS が存在している^{49,50}。これらは Mpo1 を介した分解経路によってそれぞれ、C15:0 脂肪酸と C17:0 脂肪酸へ代謝される。生じた C15:0 脂肪酸の一部は伸長されて C17:0 脂肪酸となる。さらに、C15:0 脂肪酸と C17:0 脂肪酸の一部は不飽和化によって、C15:1 脂肪酸、C17:1 脂肪酸へ変換される。これらの奇数鎖長鎖脂肪酸はアシル CoA へ変換後、グリセロリン脂質へ取り込まれる²⁸。各 Mpo1 変異体の活性を定量的に評価するため、*mpo1Δ* 株に各変異体を発現させた酵母株から脂質を抽出し、最も量の多いグリセロリン脂質である PC の量を液体クロマトグラフィー連結タンデム質量分析法(LC-MS/MS)によって測定した(図 7A, B)。Mpo1 の生成物(およびその代謝産物)である奇数鎖の長鎖脂肪酸を含む PC 分子種のうち、主要な 5 種の PC 分子種(C16:1/C15:0, C16:1/C17:1, C18:1/C15:0, C18:1/C15:1, C16:1/C17:0)を測定することで Mpo1 変異体の活性を評価した。ベクターを導入した *mpo1Δ* 株に比べ、WT の Mpo1 発現株ではこれらの奇数鎖脂肪酸含有 PC の量はいずれの分子種においても大きく増加していた(図 7A)。H19A もしくは H115 発現株の奇数鎖脂肪酸含有 PC の量はベクター導入株と同程度であった。一方、H28A 発現株の奇数鎖脂肪酸含有 PC の量は WT の Mpo1 発現株に比べて少なかったものの、ベクター導入株や H19A, H115A 発現株よりは多く存在していた。Y15A, E119A, P123A 変異体発現株の奇数鎖脂肪酸含有 PC の量は WT の Mpo1 発現株と同程度であった。

次に、培地中に 10 μ M の 2-OH C16:0 脂肪酸を添加し、Mpo1 の基質量が多く、より高い活性が必要とされる条件で各 Mpo1 変異体の活性を調べた(図 7B)。WT の Mpo1 発現株では、2-OH C16:0 脂肪酸の添加により、奇数鎖脂肪酸含有 PC の量が非添加時に比べていずれの分子種においても大きく増加し、総量として 11 倍増加した(図 7A, B)。ベクターを導入した *mpo1Δ* 株では、2-OH C16:0 脂肪酸の添加によってわずかではあるが有意に奇数鎖脂肪酸含有 PC が増加した(0.15 % vs 0.20 %)。H19A, H28A, H115A 変異体発現株中では 2-OH C16:0 脂肪酸添加時の奇数鎖脂肪酸含有 PC の量はベクター導入株とほぼ同程度であった。また、Y15A 変異体発現株でも奇数鎖脂肪酸含有 PC の量は WT の Mpo1 発現株に比べて顕著に低く、E119A 変異体でも若干減少していた。これらの結果は、Y15A および E119A でもわずかではあるが活性が低下しており、基質が低濃度の場合(生理的な条件下)では影響がないものの、基質が多い場合(2-OH C16:0 脂肪酸添加時)では影響が現れることを示唆している。以上より、Mpo1 の活性には、His19, His115, His28 が重要であり、そのほかに Tyr15 および Glu119 も活性に関与していることが明らかになった。

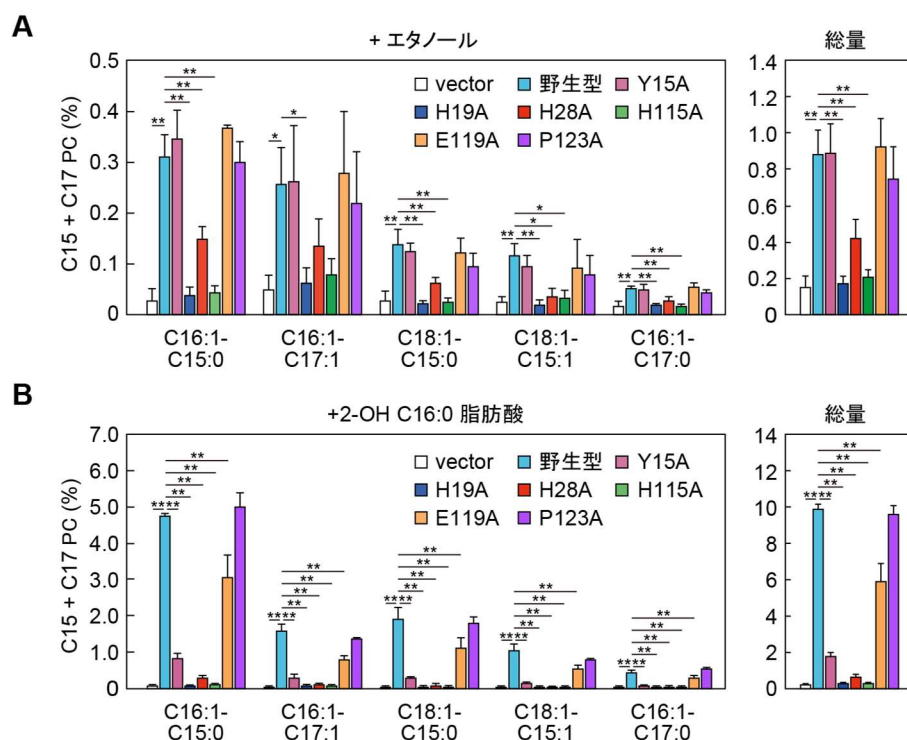
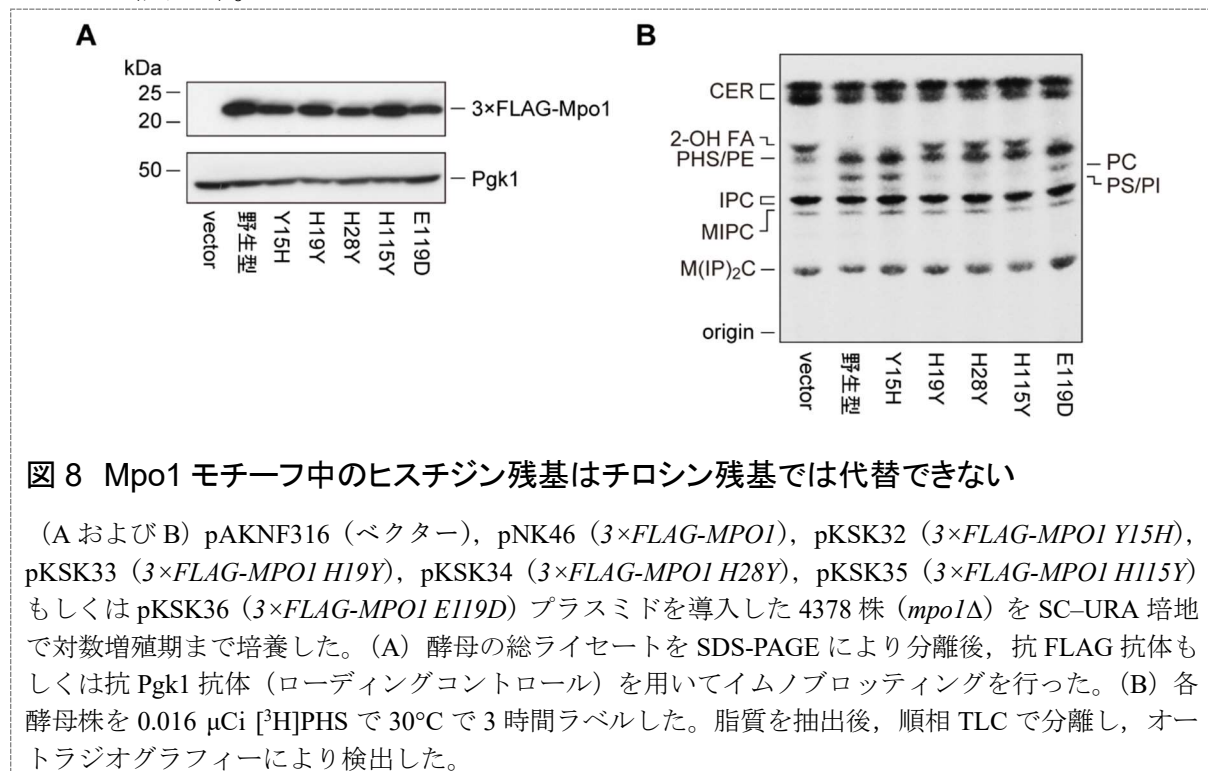


図7 His19, His28 および His115 は Mpo1 の機能に重要である

(A および B) pAKNF316 (ベクター), pNK46 (3×FLAG-MPO1), pMT12 (3×FLAG-MPO1 Y15A), pMT13 (3×FLAG-MPO1 H19A), pMT14 (3×FLAG-MPO1 H28A), pMT15 (3×FLAG-MPO1 H115A), pMT16 (3×FLAG-MPO1 E119A) もしくは pMT17 (3×FLAG-MPO1 P123A) プラスミドを導入した 4378 株 (*mpo1Δ*) を SC-URA 培地で 0.1 %エタノール (A) もしくは 10 μM 2-OH C16:0 脂肪酸 (B) とともに 30°C で 3 時間インキュベートした。脂質を抽出後、PC の量を LC-MS/MS によって解析した。値は PC の量全体に対する奇数鎖脂肪酸含有 PC の割合の平均 + 標準偏差を表す (n=3)。pNK46 プラスミド (WT 3×FLAG-MPO1) を導入した酵母株と他のプラスミドを導入した酵母株間の統計学的有意性を Dunnett's test により解析した (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)。

Mpo1 活性に重要な Tyr15, His19, His28, His115, Glu119 を含むアミノ酸配列 (YXXXXH...H...HXXXXE, 以降, Mpo1 モチーフと呼ぶ) は Fe^{2+} と配位結合を形成することが知られている 2 価鉄オキシタンパク質クラス I (モチーフ 1: H...HXXXXE,モチーフ 2: HXXXXH...HXXXXD)^{51,52} と類似していた。Mpo1 モチーフが 2 価鉄オキシタンパク質クラス I のモチーフと同様の機序で機能していると予測し、その機能的関連を明らかにするため、Mpo1 の Tyr15 と Glu119 をそれぞれ 2 価鉄オキシタンパク質クラス I の対応する His 残基および Asp 残基に置換した変異体を作製した。作製した Y15H および E119D 変異体を *mpo1Δ* 株に発現させ、[11,12-³H]PHS ラベル実験により活性を調べた。これら 2 つの変異体の活性および発現は WT の Mpo1 と同程度であった(図 8A, B)。また、Mpo1 モチーフのヒスチジン残基をチロシン残基に置換した変異体も作製した(H19Y, H28Y, H115Y)。これらの変異体はいずれもアラニン残基に置換した株(H19A, H28A, H115A)と同様、活性を示さ

なかった(図 8B)。



mpo1Δ 株に Mpo1 変異体を発現させても PHS/2-OH 脂肪酸代謝の不全が回復しなかった原因として細胞内局在の異常および酵素活性の低下が起こっている可能性が考えられたため、検証した。N 末端に GFP が融合した各変異体を酵母に発現させて細胞内局在を調べたところ、いずれの Mpo1 変異体も WT の Mpo1 と同様に nuclear 小胞体および cortical 小胞体から構成される酵母小胞体に特徴的な二重リング構造を示した(図 9)。このことから、いずれの変異も細胞内局在には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

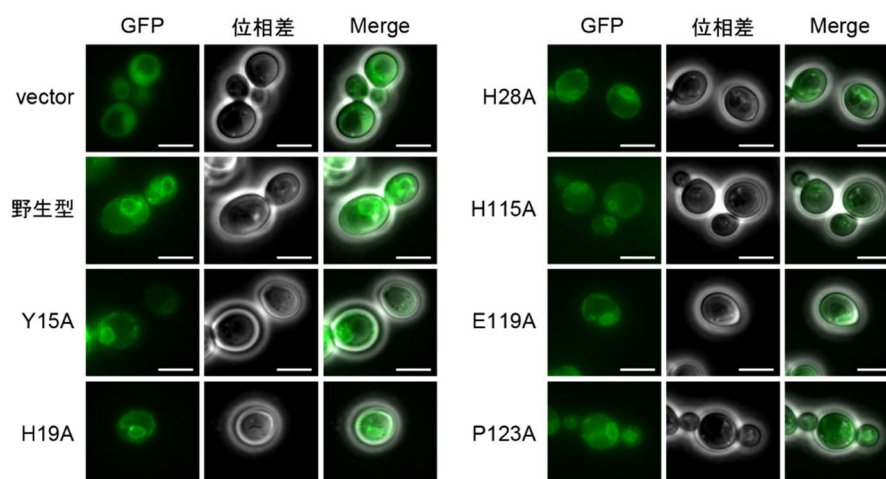


図 9 Mpo1 変異体は小胞体に局在する

pUG36 (ベクター), pNK4 (*EGFP-MPO1*), pKSK17 (*EGFP-MPO1 Y15A*), KSK18 (*EGFP-MPO1 H19A*), KSK19 (*EGFP-MPO1 H28A*), pKSK20 (*EGFP-MPO1 H115A*), pKSK21 (*EGFP-MPO1 E119A*) もしくは pKSK22 (*EGFP-MPO1 P123A*) プラスミドを導入した 4378 株 (*mpo1Δ*) を SC-URA 培地で対数増殖期まで培養した。*EGFP-MPO1* の発現は各酵母株を SC-URA-MET 培地で 30°C で 3 時間インキュベートすることで誘導した。各酵母株は蛍光顕微鏡 (DM5000B) により観察した。スケールバー, 5 μm

次に *in vitro* 活性測定により, Mpo1 変異体の酵素活性を調べた。それぞれの Mpo1 変異体発現株から調製した膜画分を, Fe^{2+} および 2-OH C16:0 脂肪酸とともにインキュベートして産生された C15:0 脂肪酸の量を LC-MS/MS で測定することで, α 酸化活性を評価した (図 10A)。WT の Mpo1 発現株における α 酸化活性はベクターを導入した *mpo1Δ* 株の約 5.5 倍であった。一方, Y15A, H19A, H28A, H115A 変異体発現株の α 酸化活性はベクター導入株とほぼ同程度であった。また, E119A 変異体では WT に比べてわずかではあるが, 活性が低下しており, P123A 変異体は統計学的な有意差はないものの活性の低下傾向が認められた。

WT の Mpo1 は 2-OH C16:0 脂肪酸だけでなく, 2-OH C14:0 脂肪酸に対しても活性を示し, C13:0 脂肪酸を産生した (図 10B)。異なる鉄イオン濃度における 2-OH C14:0 脂肪酸に対する α 酸化活性を調べたところ, Mpo1 の α 酸化活性は 20 μM の Fe^{2+} 濃度でプラトーに達した (図 10B)。Mpo1 の Fe^{2+} に対する K_D 値は 9.7 μM であり, 生体における鉄イオン濃度である約 5 μM ⁵³ と近い値であった。一方で, Y15A, H19A, H28A および H115A 変異体は活性が著しく低下しており, Fe^{2+} 濃度を 1 mM まで増加させても活性は認められなかった (図 10C)。

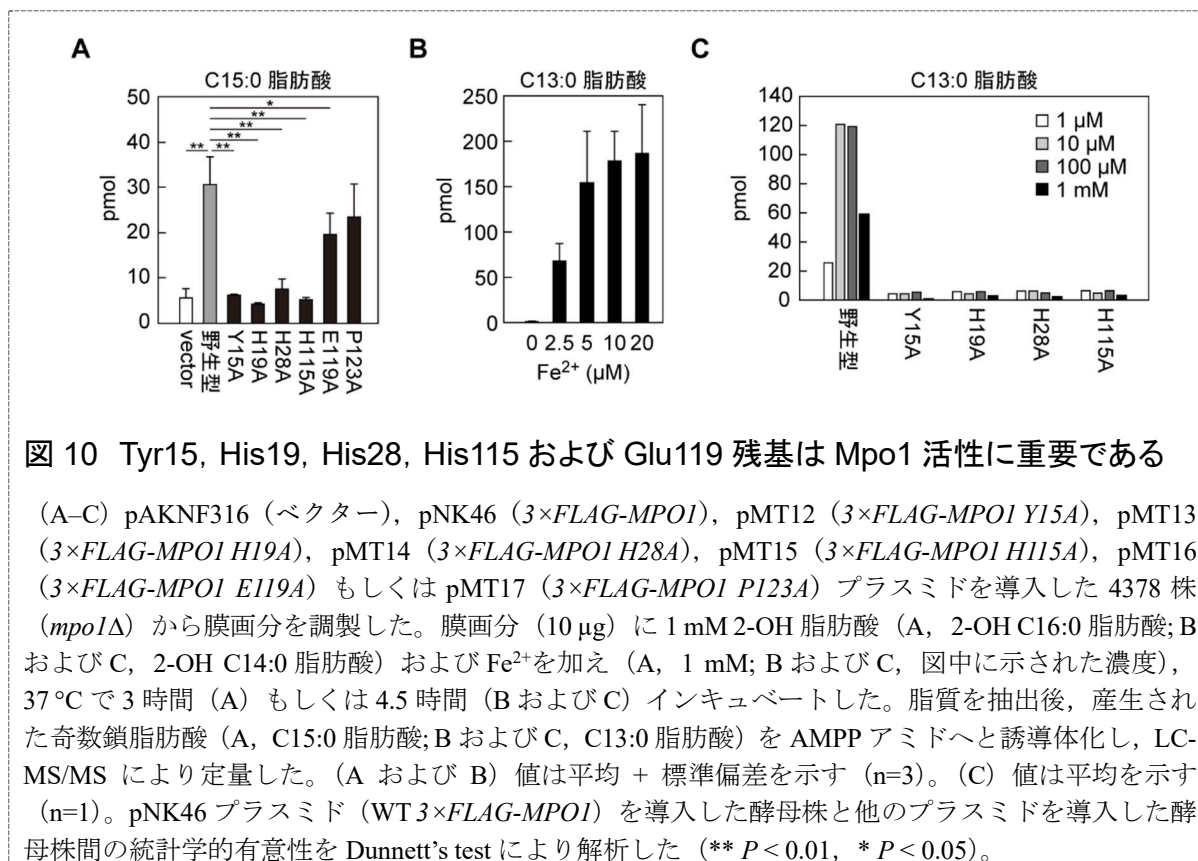


図 10 Tyr15, His19, His28, His115 および Glu119 残基は Mpo1 活性に重要である

(A–C) pAKNF316 (ベクター), pNK46 (3×FLAG-MPO1), pMT12 (3×FLAG-MPO1 Y15A), pMT13 (3×FLAG-MPO1 H19A), pMT14 (3×FLAG-MPO1 H28A), pMT15 (3×FLAG-MPO1 H115A), pMT16 (3×FLAG-MPO1 E119A) もしくは pMT17 (3×FLAG-MPO1 P123A) プラスミドを導入した 4378 株 (*mpo1Δ*) から膜画分を調製した。膜画分 (10 μg) に 1 mM 2-OH 脂肪酸 (A, 2-OH C16:0 脂肪酸; B および C, 2-OH C14:0 脂肪酸) および Fe²⁺を加え (A, 1 mM; B および C, 図中に示された濃度), 37 °C で 3 時間 (A) もしくは 4.5 時間 (B および C) インキュベートした。脂質を抽出後、産生された奇数鎖脂肪酸 (A, C15:0 脂肪酸; B および C, C13:0 脂肪酸) を AMPP アミドへと誘導体化し、LC-MS/MS により定量した。(A および B) 値は平均 + 標準偏差を示す (n=3)。(C) 値は平均を示す (n=1)。pNK46 プラスミド (WT 3×FLAG-MPO1) を導入した酵母株と他のプラスミドを導入した酵母株間の統計学的有意性を Dunnett's test により解析した (** P < 0.01, * P < 0.05)。

3.1.2 Pxp1 は酵母における 2-OH 脂肪酸の α 酸化に関与しない

mpo1Δ 株 (および *mpo1Δ* 株にベクターを導入した株) に 2-OH C16:0 脂肪酸を添加すると奇数鎖脂肪酸含有 PC の量はわずかではあるが有意に増加する⁴³。このことは Mpo1 によらないマイナーな別の α 酸化経路が酵母に存在することを示唆している。哺乳類には Mpo1 ホモログが存在せず, 2-OH アシル CoA リアーゼ HACL1 および HACL2 が 2-OH C16:0 脂肪酸の α 酸化過程における律速段階 (開裂反応) を触媒する。酵母には HACL1 および HACL2 と相同性の高い機能未知のタンパク質 Pxp1 が存在する。*mpo1Δ* 株中で認められる弱い α 酸化活性が Pxp1 によるものである可能性を調べるために, *pxp1Δ* 株および *mpo1Δ pxp1Δ* 二重変異株を用いてエタノールもしくは 2-OH C16:0 脂肪酸を添加した条件下での奇数鎖脂肪酸含有 PC の量を測定した。2-OH C16:0 脂肪酸添加による奇数鎖脂肪酸含有 PC の量の増加は WT 株と *pxp1Δ* 株間, *mpo1Δ* 株と *mpo1Δ pxp1Δ* 株間で同程度であった (図 11)。このことから, 動物の α 酸化酵素 HACL1 および HACL2 のホモログである Pxp1 は酵母における 2-OH 脂肪酸の α 酸化経路に関与しないことが明らかとなった。

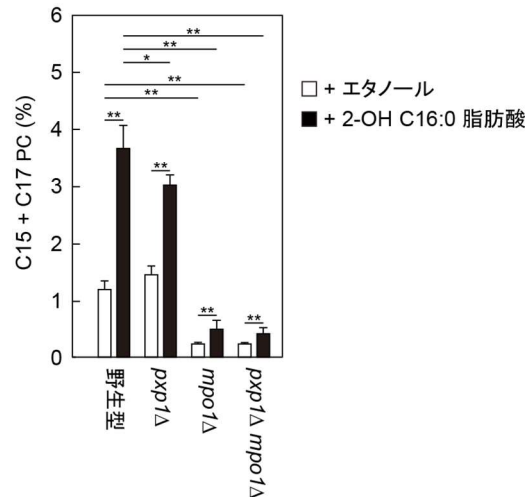


図 11 Pxp1 は 2-OH 脂肪酸の α 酸化に関与しない

酵母株 BY4741 (WT), 4378 (*mpo1Δ*), 261 (*pxp1Δ*), KSKY4 (*pxp1Δ mpo1Δ*) を SC 培地で対数増殖期まで培養した。各酵母株を 0.1 %エタノールもしくは 10 μ M 2-OH C16:0 脂肪酸存在下で 30 °C で 3 時間インキュベートした。脂質を抽出後、奇数鎖 PC を LC-MS/MS によって解析した。値は PC の量全体に対する C15 および C17 の脂肪酸を含む PC の量の割合の平均 + 標準偏差を表す (n=3)。統計学的有意性は Tukey's test により解析した (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)。

3.1.3 Mpo1 は極長鎖の 2-OH 脂肪酸に対して活性を示す

酵母において 2-OH 脂肪酸は 2 通りの経路によって産生される。1 つは PHS の分解経路であり²⁸, もう 1 つの経路は Scs7 による CER 構成脂肪酸の C2 位の酸化である²²。PHS の分解経路で産生される 2-OH 脂肪酸はほとんどが長鎖(主に C16 と C18)であり, Mpo1 によって 1 炭素短い非水酸化脂肪酸へ変換された後に主にグリセロリン脂質に取り込まれる。一方, スフィンゴ脂質中の 2-OH 極長鎖脂肪酸の代謝経路は不明であった。そこで, スフィンゴ脂質中の 2-OH C26:0 脂肪酸がイノシトールホスホスフィンゴ脂質ホスホリパーゼ C およびセラミダーゼによって遊離後, Mpo1 によって C25:0 脂肪酸に変換される可能性を検証した。その結果, WT 株および *mpo1Δ* 中での 2-OH C26:0 脂肪酸含有 CER の量は同程度であったが, 2-OH C25:0 脂肪酸含有 CER 量は WT 株に比べ, *mpo1Δ* 株で大きく(約 38 倍)低下していた(図 12A, B)。このことから, WT 株において 2-OH C25:0 脂肪酸含有 CER は, 2-OH C26:0 脂肪酸が Mpo1 による α 酸化を受けて C25:0 脂肪酸へと変換された後, CoA 付加, 長鎖塩基との結合(CER への変換), Scs7 による C2 位の水酸化を経て産生されたと予測される(図 12C)。

次に, *in vitro* において 2-OH 極長鎖脂肪酸を基質とした活性測定を行うため, 2-OH C24:0 脂肪酸を含むリポソーム存在下で小麦胚芽抽出物を用いて mRNA から Mpo1 を翻訳後, 精製することでプロテオリポソームを作製した。この際, 同時にコントロールとして味覚受

容体の 1 種である T1R1 を含むプロテオリポソームを作製し、使用した。その結果, Mpo1 を含むプロテオリポソームにおいて 2-OH C24:0 脂肪酸に対する α 酸化活性が認められた (図 12D)。これらの結果より, Mpo1 が PHS の代謝産物である長鎖の 2-OH 脂肪酸のみならず, Scs7 を介した経路により産生される極長鎖の 2-OH 脂肪酸の α 酸化にも関わっていることが明らかとなった。

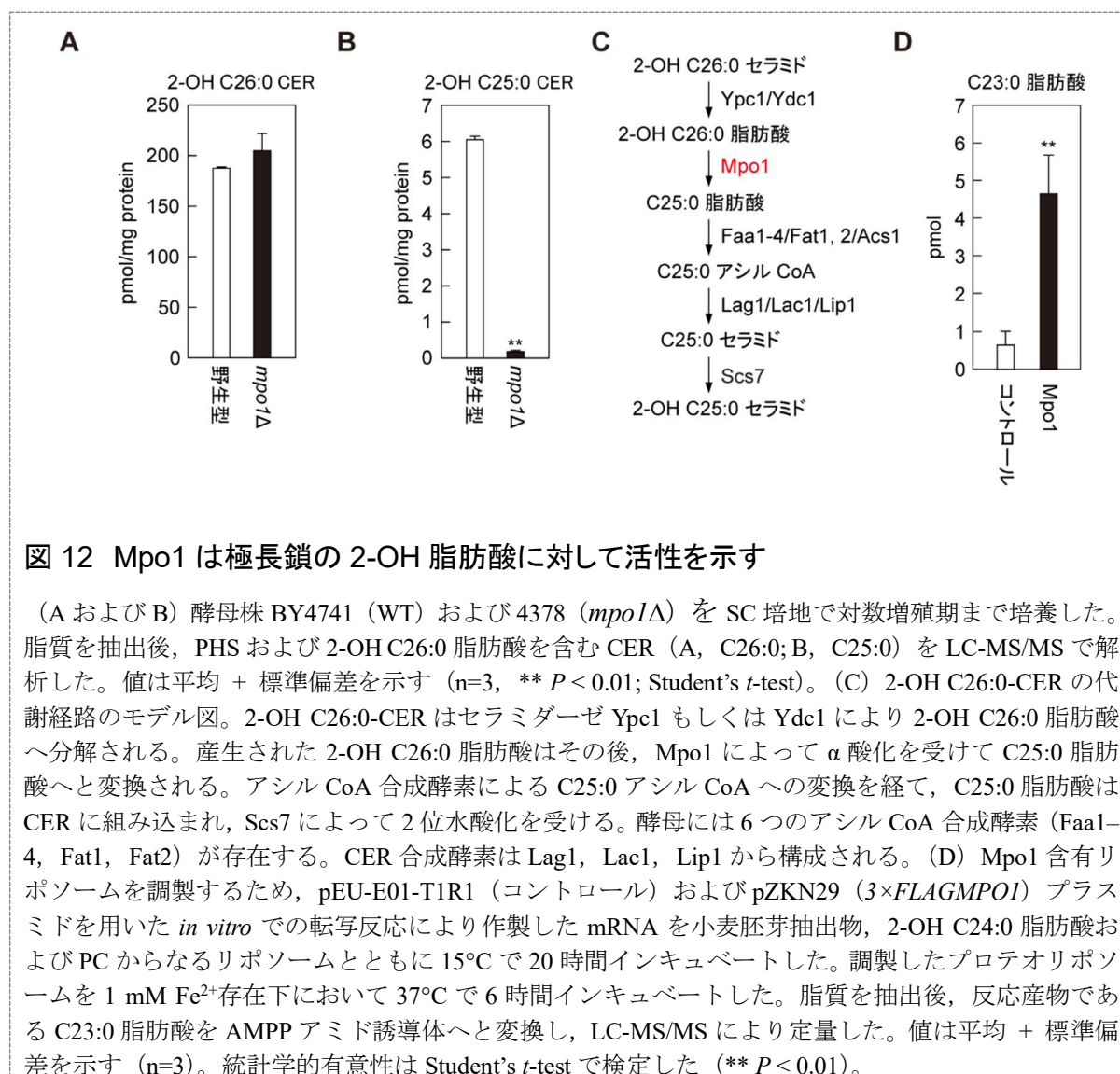


図 12 Mpo1 は極長鎖の 2-OH 脂肪酸に対して活性を示す

(A および B) 酵母株 BY4741 (WT) および 4378 (*mpo1Δ*) を SC 培地で対数増殖期まで培養した。脂質を抽出後, PHS および 2-OH C26:0 脂肪酸を含む CER (A, C26:0; B, C25:0) を LC-MS/MS で解析した。値は平均 + 標準偏差を示す (n=3, ** $P < 0.01$; Student's *t*-test)。 (C) 2-OH C26:0-CER の代謝経路のモデル図。2-OH C26:0-CER はセラミダーゼ Ypc1 もしくは Ydc1 により 2-OH C26:0 脂肪酸へ分解される。産生された 2-OH C26:0 脂肪酸はその後, Mpo1 によって α 酸化を受けて C25:0 脂肪酸へと変換される。アシル CoA 合成酵素による C25:0 アシル CoA への変換を経て, C25:0 脂肪酸は CER に組み込まれ, Scs7 によって 2 位水酸化を受ける。酵母には 6 つのアシル CoA 合成酵素 (Faa1-4, Fat1, Fat2) が存在する。CER 合成酵素は Lag1, Lac1, Lip1 から構成される。 (D) Mpo1 含有リポソームを調製するため, pEU-E01-T1R1 (コントロール) および pZKN29 (3×FLAGMPO1) プラスミドを用いた *in vitro* の転写反応により作製した mRNA を小麦胚芽抽出物, 2-OH C24:0 脂肪酸および PC からなるリポソームとともに 15°C で 20 時間インキュベートした。調製したプロテオリポソームを 1 mM Fe^{2+} 存在下において 37°C で 6 時間インキュベートした。脂質を抽出後, 反応産物である C23:0 脂肪酸を AMPP アミド誘導体へと変換し, LC-MS/MS により定量した。値は平均 + 標準偏差を示す (n=3)。統計学的有意性は Student's *t*-test で検定した (** $P < 0.01$)。

3.1.4 Mpo1 による α 酸化反応では酸素分子が酸化剤として用いられる

モノオキシゲナーゼであるシトクロム P450 やジオキシゲナーゼであるカテコールジオキシゲナーゼ, プロリル 4-ヒドロキシラーゼは酸化剤として鉄イオンに結合した酸素分子を用いる⁵⁴⁻⁵⁶。そのため, Mpo1 も同様に α 酸化反応において酸素分子を酸化剤として用いていると予測した。この可能性を検証するため, Mpo1 を過剰発現させた酵母の膜画分を Fe^{2+} 存在下で 2-OH 脂肪酸とともに脱気条件下で 1 時間, 37°C でインキュベーションした。反応後,

サンプルを 2 つにわけ、1 つは空気を注入し、更に 1 時間インキュベーションした。その結果、空気注入後の Mpo1 の脂肪酸 α 酸化活性は脱気条件の約 3.5 倍高く、Mpo1 が酸素分子を酸化剤として用いていることが示された(図 13A)。

鉄-酸素分子複合体には鉄(II)-O₂、鉄(III)スーパーペルオキシドおよび鉄(IV)ペルオキシドの 3 つの共鳴構造が存在し、それぞれ求電子剤、ラジカルおよび求核剤として働く⁵⁷。脂肪酸 α 酸化反応では鉄-酸素分子複合体は、カルボニル炭素および水酸基をもつ 2 位の炭素と反応するため、ラジカル的もしくは求核的に作用すると予想される。そのため、Mpo1 によって触媒される脂肪酸 α 酸化反応での鉄-酸素分子複合体は、ラジカルもしくは求核剤として働くことが予想される。複合体がいずれの形で働いているのかを明らかにするため、ラジカルスカベンジャーであるブチルヒドロキシルエノン存在下で α 酸化アッセイを行った。ブチルヒドロキシルエノンは高濃度(1 mM)であっても Mpo1 活性を阻害しなかった(図 13B)。また、他のラジカルスカベンジャー(L-システイン、N-アセチル-L-システイン、マンニトール)

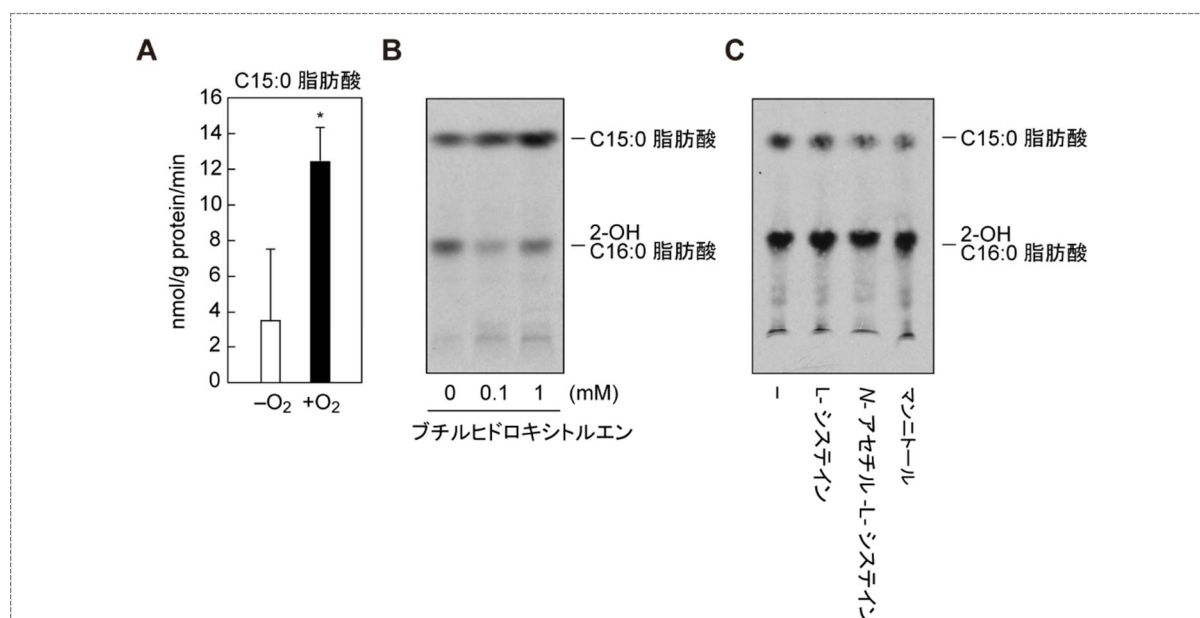


図 13 Mpo1 は活性に酸素分子を必要とする

(A) pNK46 (3×FLAG-MPO1) プラスミドを導入した 4378 株 (*mpo1Δ*) から膜画分を調製した。調製した膜画分を 1 mM Fe²⁺存在下で 10 μM 2-OH C16:0 脂肪酸とともに 37 °C で 1 時間、脱気条件下においてインキュベートした (-O₂)。反応後、サンプルの半量には空気を注入し、37 °C で 1 時間インキュベートした (+O₂)。脂質を抽出後、反応産物である C15:0 脂肪酸を AMPP アミド誘導体に変換し、LC-MS/MS によって定量した。+O₂ のサンプルの値は空気注入前の脱気条件下で産生された C15:0 脂肪酸の値を差し引いた値を示す。値は平均 + 標準偏差を示す (n=3)。統計学的有意性は Student's *t*-test で検定した (**P* < 0.05)。(B および C) 3×FLAG-Mpo1 を含むプロテオリポソーム (150 ng) を 8 nCi [9,10-³H]2-OH C16:0 脂肪酸とともに 1 mM FeCl₂ およびラジカルスカベンジャー (B, ブチルヒドロキシルエノン; C, 1 mM L-システイン, 1 mM N-アセチルシステインまたは 1 mM マンニトール) 存在下で 37 °C で 6 時間インキュベートした。脂質を抽出後、順相 TLC で分離し、オートラジオグラフィにより検出した。

のいずれも Mpo1 活性にはほとんど影響を与えなかった(図 13C)。これらのことから, Mpo1 によって触媒される α 酸化反応では鉄(III)スーパーペルオキシドではなく, 求核剤として働く鉄(IV)ペルオキシドの形成によって反応が進行する可能性が高いことが示された。

3.1.5 Mpo1 速度論解析

次に, Mpo1 の酵素学的特性を明らかにするため, Mpo1 の基質である 2-OH C14:0 脂肪酸に対する速度論的解析を行った(図 14)。その結果, Lineweaver-Burk プロットは直線的になり, Mpo1 は基質に対する協同性を示さなかった。プロットから得られた K_m 値は 15.9 μM であり, $V_{\max}$ 値は 4.6 $\text{mmol g}^{-1}\text{min}^{-1}$ であった。

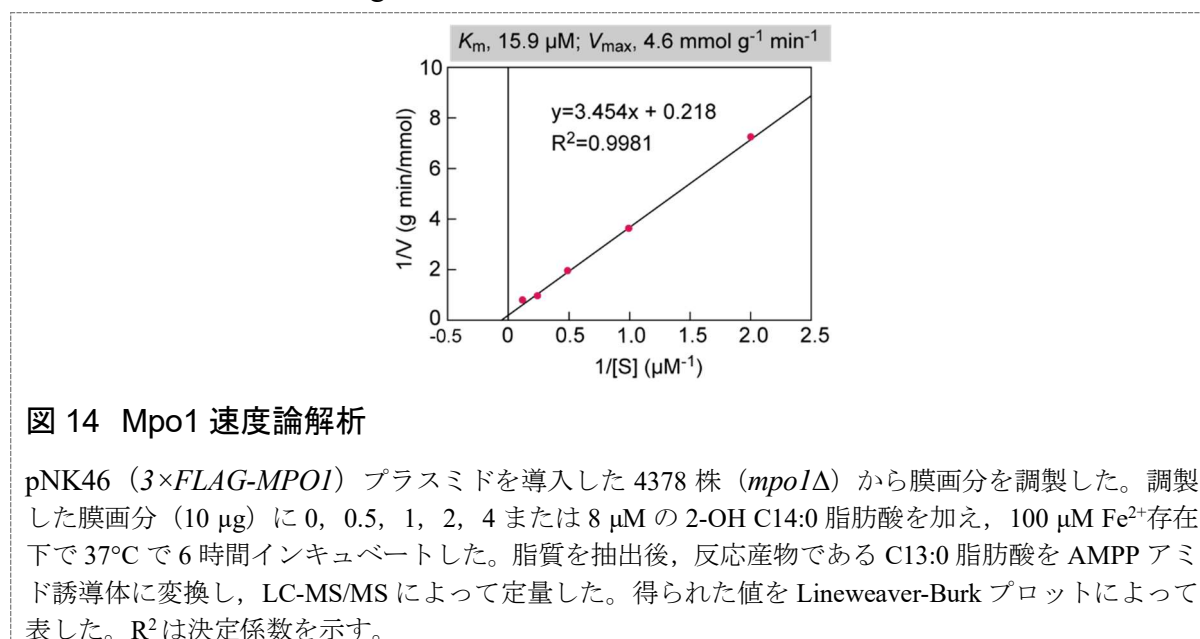


図 14 Mpo1 速度論解析

pNK46 ($3\times\text{FLAG-MPOI}$) プラスミドを導入した 4378 株 (*mpo1Δ*) から膜画分を調製した。調製した膜画分 (10 μg) に 0, 0.5, 1, 2, 4 または 8 μM の 2-OH C14:0 脂肪酸を加え, 100 μM Fe^{2+} 存在下で 37°C で 6 時間インキュベートした。脂質を抽出後, 反応産物である C13:0 脂肪酸を AMPP アミド誘導体に変換し, LC-MS/MS によって定量した。得られた値を Lineweaver-Burk プロットによって表した。 R^2 は決定係数を示す。

3.1.6 Mpo1 は適切な小胞体ストレス応答に重要である

PHS は酵母において小胞体ストレス時に増加し, 小胞体ストレスに対する適切な応答反応に必要である⁵⁸。そこで, *MPOI* の欠損によって生じる PHS 分解経路の遮断が小胞体ストレス応答に影響を与えるか検証した。YPD プレート(通常の培養条件)では *mpo1Δ* 株は WT の酵母株と同程度の生育を示した(図 15A)。一方, タンパク質への *N*-結合型糖鎖付加の阻害剤であるツニカマイシンをプレートに添加することで小胞体ストレスを誘導したところ, *mpo1Δ* 株の生育は WT よりもわずかに遅くなった(図 15A)。このことから, Mpo1 依存的な PHS 代謝経路は適切な小胞体ストレス応答に重要であることが示唆された。続いて, 定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を用いて, 小胞体ストレスマーカーである *KAR2* の発現量を測定した(図 15B)。その結果, 統計学的に有意な差は認められなかったものの, *KAR2* の発現量はツニカマイシンあるいは PHS どちらを添加した場合でも増加傾向が認められた。ツニカマイシンと PHS をともに添加した群では *KAR2* の発現量は有意に増加した。し

かしながら、いずれの条件下でも WT と *mpo1Δ* の間で *KAR2* の発現量に差は認められなかった。これは *mpo1Δ* と WT 株とのツニカマイシン感受性の差はわずかであり、*KAR2* の発現量に有意な差をもたらすには不十分であったためと考えられる。次に、通常培養時と小胞体ストレス誘導時における WT 株と *mpo1Δ* での PHS 量を LC-MS/MS を用いて測定した(図 15C, D)。DHS 量はほとんど変わらなかったのに対し、PHS 量は WT 株および *mpo1Δ* どちらにおいてもツニカマイシンの添加により増加した。一方、WT 株と *mpo1Δ* で PHS 量に差は認められなかった。

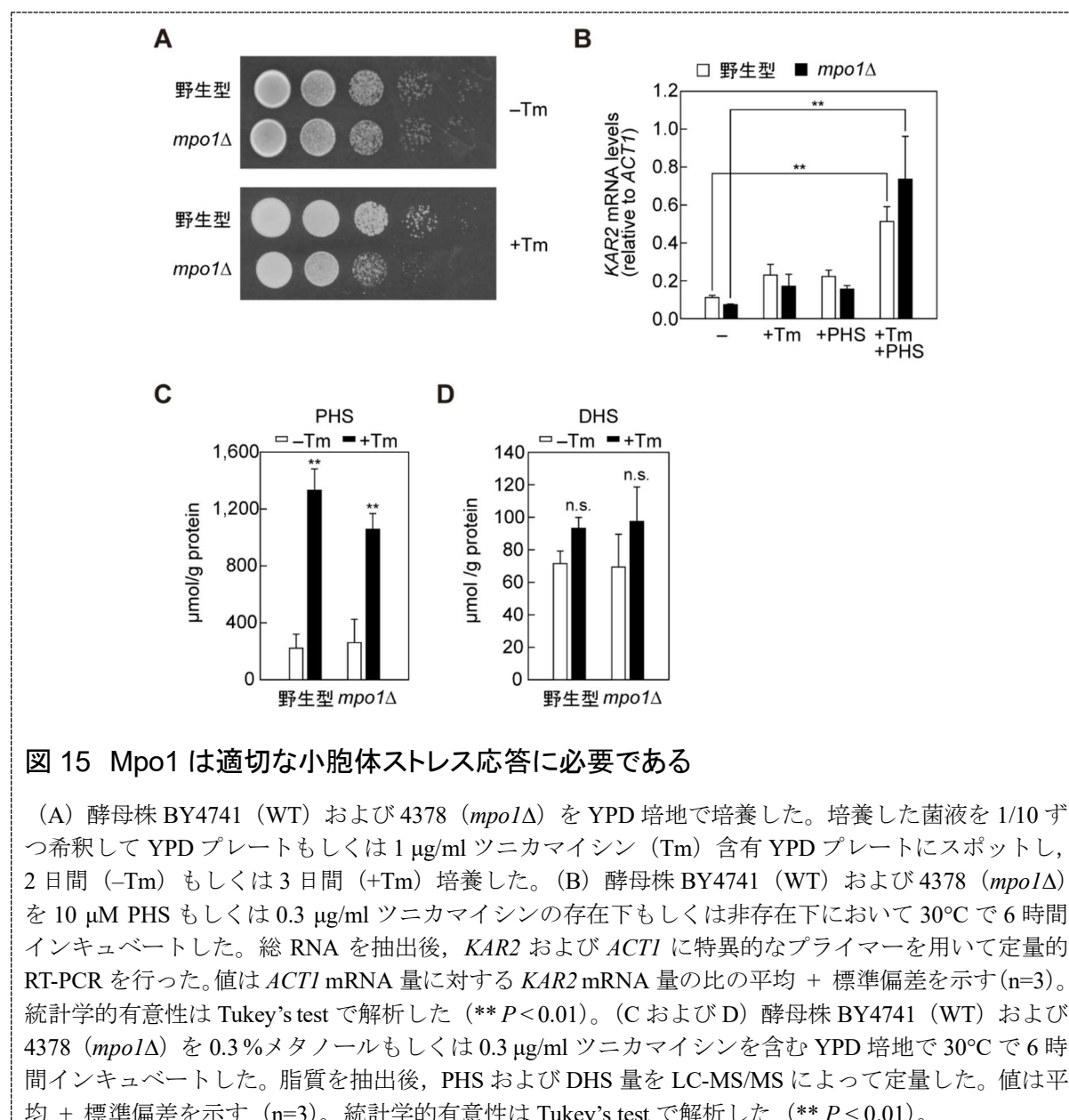


図 15 Mpo1 は適切な小胞体ストレス応答に必要である

(A) 酵母株 BY4741 (WT) および 4378 (*mpo1Δ*) を YPD 培地で培養した。培養した菌液を 1/10 ずつ希釈して YPD プレートもしくは 1 μg/ml ツニカマイシン (Tm) 含有 YPD プレートにスポットし、2 日間 (-Tm) もしくは 3 日間 (+Tm) 培養した。(B) 酵母株 BY4741 (WT) および 4378 (*mpo1Δ*) を 10 μM PHS もしくは 0.3 μg/ml ツニカマイシンの存在下もしくは非存在下において 30°C で 6 時間インキュベートした。総 RNA を抽出後、*KAR2* および *ACT1* に特異的なプライマーを用いて定量的 RT-PCR を行った。値は *ACT1* mRNA 量に対する *KAR2* mRNA 量の比の平均 + 標準偏差を示す (n=3)。統計学的有意性は Tukey's test で解析した (** $P < 0.01$)。(C および D) 酵母株 BY4741 (WT) および 4378 (*mpo1Δ*) を 0.3% メタノールもしくは 0.3 μg/ml ツニカマイシンを含む YPD 培地で 30°C で 6 時間インキュベートした。脂質を抽出後、PHS および DHS 量を LC-MS/MS によって定量した。値は平均 + 標準偏差を示す (n=3)。統計学的有意性は Tukey's test で解析した (** $P < 0.01$)。

3.2 哺乳類 α 酸化酵素 HACL2 の奇数鎖脂肪酸産生における役割の解明

3.2.1 直鎖の 2-OH 脂肪酸の α 酸化においては HACL2 の寄与が大きい

哺乳類における α 酸化において鍵となる酵素は 2-OH アシル CoA リアーゼ HACL1 および HACL2 である。これまでに、CHO-K1 細胞を用いて作成したこれらの KO/DKO 細胞における α 酸化活性の変化により、HACL1 および HACL2 が直鎖の 2-OH 脂肪酸の α 酸化に関わることが明らかとなっているが²⁷、長鎖および極長鎖の直鎖 2-OH 脂肪酸の α 酸化における HACL1 および HACL2 のそれぞれの寄与の程度は不明であった。そこで、このことを明らかにするために、まず、酵母における異所発現系を用いたアッセイを行った。上述のように、*mpo1* Δ 株では α 酸化活性がほぼ完全に消失するため (図 6D)、遺伝子導入により目的のタンパク質の α 酸化活性の測定が可能である。以前の報告で *mpo1* Δ 株に HACL1 もしくは HACL2 を発現させることで、*mpo1* の欠損によって不全となった PHS の代謝が回復することが明らかとなっている²⁷。そこで、本研究では 3 $\times$ FLAG タグを付加した HACL1 もしくは HACL2 を発現させた *mpo1* Δ 株を用いて、長鎖および極長鎖 2-OH 脂肪酸の α 酸化における HACL1 と HACL2 の寄与の違いを調べた。まず、3 $\times$ FLAG-HACL1 および HACL2 のタンパク質の発現量をイムノブロットニングによって確認したところ、HACL1 と HACL2 の両方の発現が観察されたが、HACL1 に比べて HACL2 の発現量は低かった (図 16A)。上述の通り、長鎖 2-OH 脂肪酸である 2-OH C16:0 脂肪酸は α 酸化されて C15:0 脂肪酸となった後、そのまま、あるいは脂肪酸伸長または不飽和化後、主にグリセロリン脂質に取り込まれる^{28,43}。そのため、グリセロリン脂質のうち、酵母中で最も量の多い PC について、C15 あるいは 17 の奇数鎖の脂肪酸を含む PC (奇数鎖 PC) の量を調べることで HACL1 と HACL2 の長鎖の 2-OH 脂肪酸に対する活性を評価した。培地に 2-OH C16:0 脂肪酸を加えていない場合の奇数鎖 PC の量は、HACL1 あるいは HACL2 発現株でベクター導入株よりも多く、それぞれ HACL1 で 4.0 倍、HACL2 で 6.4 倍であった (図 16B)。一方、HACL1 もしくは HACL2 の発現によって偶数鎖の脂肪酸 (炭素数 16 および 18) を含む PC の量に変化は認められなかった。2-OH C16:0 脂肪酸を培地中に添加すると、ベクターを導入した *mpo1* Δ 株では奇数鎖 PC の量は非添加時と比べてほとんど変化しなかった。一方、HACL1 あるいは HACL2 発現株では、2-OH C16:0 脂肪酸添加によって奇数鎖 PC の量が増加し、加えていない場合と比べて奇数鎖 PC の量は HACL1 発現株で 2.0 倍、HACL2 発現株で 3.9 倍であった。2-OH C16:0 脂肪酸添加時の HACL2 発現株における奇数鎖 PC の量は HACL1 発現株の 3.1 倍であった。以上の結果から、長鎖の 2-OH 脂肪酸の α 酸化において HACL1 および HACL2 はともに活性を示す一方、HACL2 の活性がより高いことが明らかとなった。

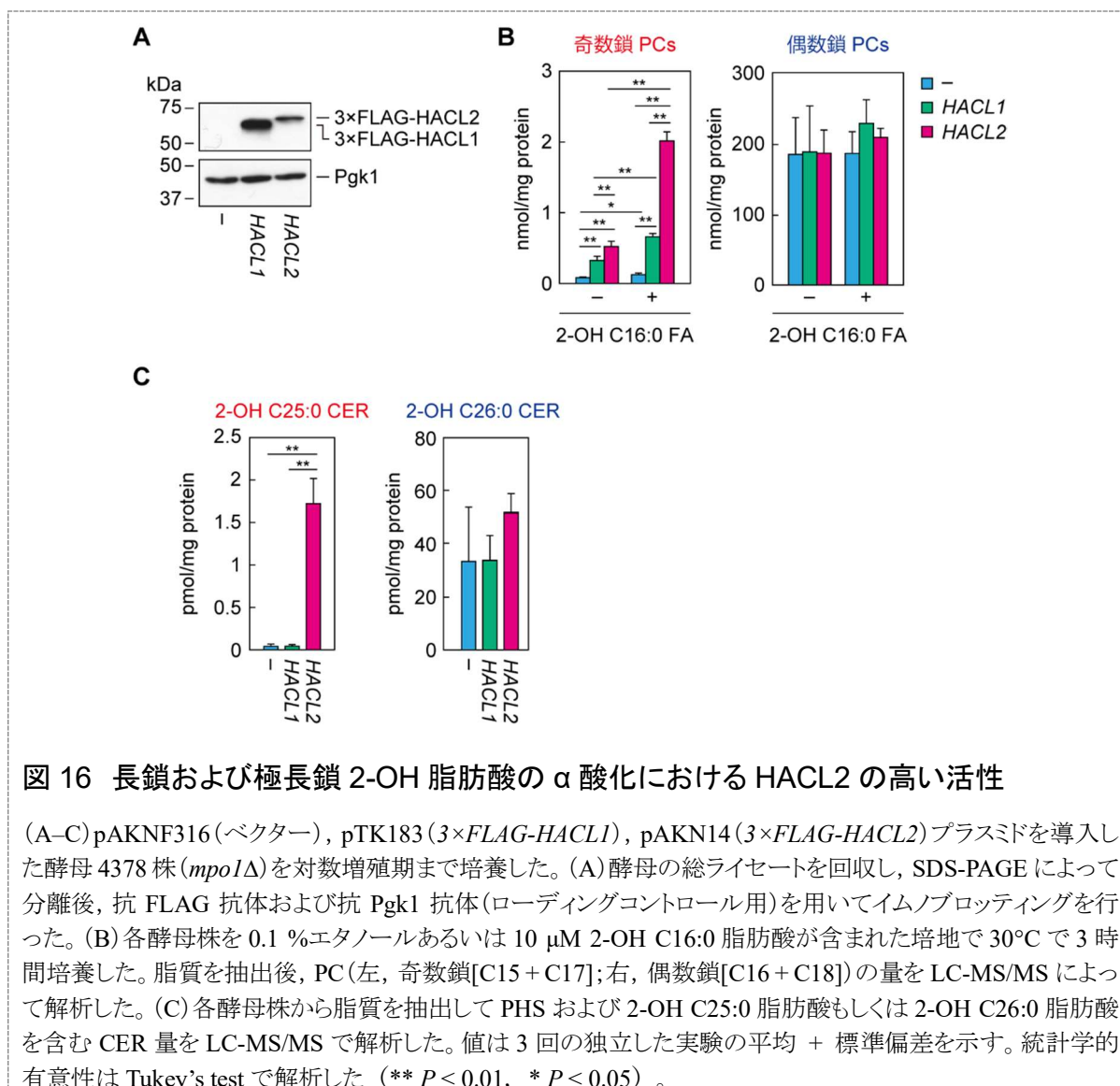


図 16 長鎖および極長鎖 2-OH 脂肪酸の α 酸化における HACL2 の高い活性

(A–C) pAKNF316 (ベクター), pTK183 (3×FLAG-HACL1), pAKN14 (3×FLAG-HACL2) プラスミドを導入した酵母 4378 株 (*mpo1Δ*) を対数増殖期まで培養した。(A) 酵母の総ライセートを回収し、SDS-PAGE によって分離後、抗 FLAG 抗体および抗 Pgk1 抗体 (ローディングコントロール用) を用いてイムノブロッティングを行った。(B) 各酵母株を 0.1 % エタノールあるいは 10 μ M 2-OH C16:0 脂肪酸が含まれた培地で 30°C で 3 時間培養した。脂質を抽出後、PC (左、奇数鎖 [C15 + C17]; 右、偶数鎖 [C16 + C18]) の量を LC-MS/MS によって解析した。(C) 各酵母株から脂質を抽出して PHS および 2-OH C25:0 脂肪酸もしくは 2-OH C26:0 脂肪酸を含む CER 量を LC-MS/MS で解析した。値は 3 回の独立した実験の平均 + 標準偏差を示す。統計学的有意性は Tukey's test で解析した (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)。

次に、HACL1 および HACL2 の極長鎖 2-OH 脂肪酸の α 酸化における関与を調べた。上述の通り、酵母において 2-OH C26:0 CER は α 酸化依存的な代謝経路によって 2-OH C25:0 CER へと代謝される (図 12C)。HACL1 もしくは HACL2 発現株中での 2-OH C25:0 CER 量を調べたところ、ベクター導入株と HACL1 発現株の間に 2-OH C25:0 CER 量の差は認められなかった (図 16C)。一方、HACL2 の発現によって 2-OH C25:0 CER 量は大きく増加し、ベクター導入株の 42 倍であった。偶数鎖の 2-OH C26 脂肪酸含有 CER 量はベクター導入株、HACL1 発現株、HACL2 発現株の間に差はなかった。以上のことから、HACL2 が極長鎖の 2-OH 脂肪酸の α 酸化に寄与することが明らかとなった。

続いて、内在性の HACL1 と HACL2 の 2-OH 極長鎖脂肪酸の α 酸化への関与を調べるため、哺乳類細胞を用いて検証を行った。これまでに、CHO-K1 細胞の *Hacl1* KO および *Hacl2* KO 細胞では長鎖の 2-OH 脂肪酸に対する α 酸化活性に変化は認められない一方、

Hacl1 Hacl2 DKO 細胞では α 酸化活性が著しく低下することが明らかとなっている²⁷。これらの細胞を 2-OH C24:0 脂肪酸を含むもしくは含まない培地中で 72 時間培養した後、細胞から脂質を抽出し、LC-MS/MS によって CER 組成を解析した。その結果、2-OH C24:0 脂肪酸非添加時には、 α 酸化の基質である 2-OH C24:0 から構成される CER 量に細胞株間で有意な差は認められなかった(図 17A)。一方、2-OH C24:0 脂肪酸の添加によって、2-OH C24:0 CER 量はすべての細胞で増加したが、増加量は WT 細胞および *Hacl1* KO 細胞と比べて、*Hacl2* KO 細胞で高く、*Hacl1 Hacl2* DKO 細胞ではさらに高かった。2-OH C24:0 脂肪酸存在下での 2-OH C24:0 CER 量は、WT 細胞に比べて *Hacl2* KO 細胞で 9.2 倍、*Hacl1 Hacl2* DKO 細胞で 17.8 倍であった。

次に、2-OH C24:0 脂肪酸の α 酸化産物である非水酸化 C23:0 脂肪酸から構成される CER 量を調べた。C23:0 CER の量は 2-OH C24:0 脂肪酸非添加時では細胞株間で差は認められなかった(図 17B)。一方、2-OH C24:0 脂肪酸の添加によって、C23:0 CER 量は WT 細胞および *Hacl1* KO 細胞中で非添加時と比較して 3–4 倍、*Hacl2* KO 細胞中で 1.9 倍増加した。逆に、*Hacl1 Hacl2* DKO 細胞中では非添加時の 20 %まで減少した。以上の結果より、2-OH 極長鎖脂肪酸の α 酸化に対して HACL1 および HACL2 は重複的に働く一方、HACL2 の寄与が大きいことが明らかとなった。

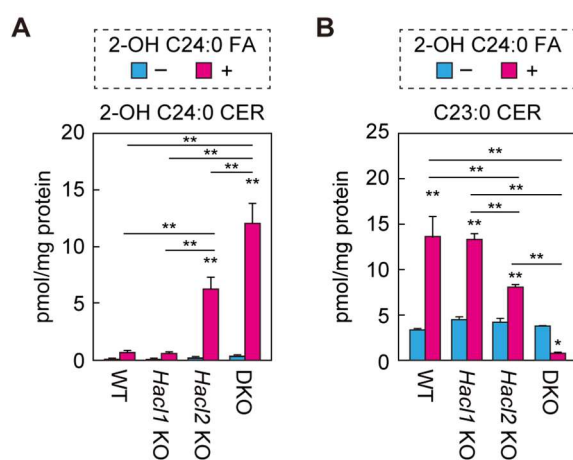


図 17 HACL2 の極長鎖 2-OH 脂肪酸の α 酸化に対する高い寄与

(A–C) CHO-K1 (WT), *Hacl1* KO, *Hacl2* KO, *Hacl1 Hacl2* DKO 細胞を 0.04 % DMSO もしくは 4 μ M 2-OH C24:0 脂肪酸とともに 72 時間インキュベートした。細胞から脂質を回収し、2-OH C24:0 CER (A), C23:0 CER, (B) を LC-MS/MS によって定量した。値は 3 回の独立した実験の平均 + 標準偏差を示す。統計学的有意性は Tukey's test で解析した (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)。

3.2.2 3-メチル分岐鎖脂肪酸の α 酸化においては HACL1 の寄与が大きい

これまでに *Hacl1* KO マウス由来初代培養線維芽細胞を用いた解析により、3-メチル分岐鎖脂肪酸であるフィタン酸の α 酸化に HACL1 が関与することが明らかとなっている⁴⁴。一

方, 3-メチル分岐鎖脂肪酸の α 酸化における HACL2 の関与については不明であった。このことを明らかにするために、フィタン酸を含むもしくは含まない培地中で WT, *Hacl1* KO, *Hacl2* KO, *Hacl1 Hacl2* DKO CHO-K1 細胞を 24 時間培養した後、細胞および培地から脂質を抽出して、アルカリ処理後、フィタン酸およびその代謝産物量を定量した。上述のように、フィタン酸は分解経路において 2-OH フィタノイル CoA へと変換された後、HACL1 および HACL2 を介した代謝経路によってプリスタン酸へと代謝される(図 4)。培地中にフィタン酸を添加した場合、フィタン酸, 2-OH フィタン酸およびプリスタン酸はいずれの細胞においても細胞中よりも培地中で多く検出され(図 18A-F), 特に 2-OH フィタン酸に関しては細胞中に比べて培地中に約 15-20 倍の量が検出された(図 18B, E)。このことは、細胞内においてフィタン酸の代謝によって産生された 2-OH フィタン酸の多くは産生後、細胞外に放出されることを示している。フィタン酸の量は細胞内、細胞外共に細胞間で差は認められなかった(図 18A, D)。2-OH フィタン酸の量は WT と *Hacl2* KO 細胞で同程度であったが、*Hacl1* KO 細胞では増加し、*Hacl1 Hacl2* DKO 細胞ではさらに増加した(図 18B, E)。培地中での 2-OH フィタン酸の量は *Hacl1* KO 細胞では WT の 21 倍、*Hacl1 Hacl2* DKO 細胞では 35 倍であった(図 18B)。 α 酸化産物であるプリスタン酸もフィタン酸と 2-OH フィタン酸と同様に、細胞中よりも培地中に多く検出された(図 18C, F)。このことは、2-OH フィタン酸同様、プリスタン酸も産生後に多くが細胞外に放出されていることを示している。プリスタン酸の量は *Hacl1* KO 細胞では減少し、*Hacl1 Hacl2* DKO 細胞ではさらに減少した。培地中でのプリスタン酸の量は *Hacl1* KO 細胞では WT の 48 %, *Hacl1 Hacl2* DKO 細胞では 23 %であった(図 18C)。これらの結果から、3-メチル分岐鎖脂肪酸の α 酸化に関して HACL1 および HACL2 は重複的に働いているが、HACL1 の寄与が大きいことが明らかとなった。

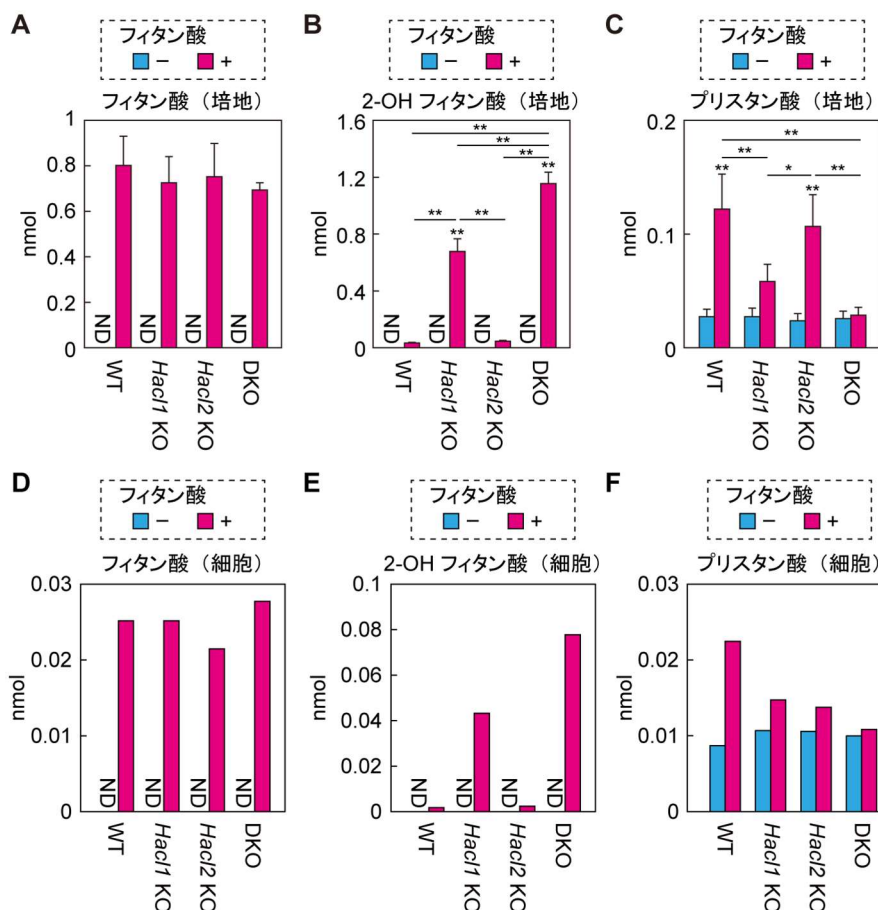


図 18 HACL1 の分岐鎖脂肪酸の α 酸化に対する高い寄与

(A-F) CHO-K1 (WT), *Hacl1* KO, *Hacl2* KO, *Hacl1 Hacl2* DKO 細胞を 0.04 %エタノールもしくは 4 μ M フィタン酸存在下で 24 時間インキュベートした。培地(A-C)および細胞(D-F)から脂質を抽出し、アルカリ処理を行った後、フィタン酸(A および D), 2-OH フィタン酸(B および E), プリスタン酸(C および F)を LC-MS/MS によって定量した。(A-C)値は 3 回の独立した実験の平均 + 標準偏差を示す。統計学的有意性は Tukey's test で解析した (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)。

3.2.3 2-OH 脂肪酸及び 2-OH 脂肪酸含有スフィンゴ脂質の組織分布

HACL2 の主要な基質である直鎖の 2-OH 脂肪酸はこれまで、脳、肺、小腸、大腸、腎臓、生殖組織、表皮などの一部の限られた組織での存在しか報告されておらず¹³、哺乳類組織における分布の全体像は不明であった。そこで次に、マウスの 17 組織(脳、心臓、肺、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、胃、小腸、大腸、白色脂肪組織[WAT]、褐色脂肪組織[BAT]、顎下腺、気管支、子宮、骨格筋、表皮)における 2-OH 遊離脂肪酸(FFA)量を LC-MS/MS によって調べた。2-OH FFA は胃に最も多く存在しており、次いで表皮、肺の順序であった(図 19)。胃では 2-OH FFA の全体の FFA (2-OH 脂肪酸+非水酸化脂肪酸)に占める割合は 2.7 %であった。炭素鎖長別では胃では C24:0、次いで C26:0 の 2-OH FFA が多く存在しており、表

皮および肺では C16:0 の 2-OH FFA が多く存在していた。その他の組織では、2-OH FFA は少量のみ検出されたか、ほとんど検出されなかった。

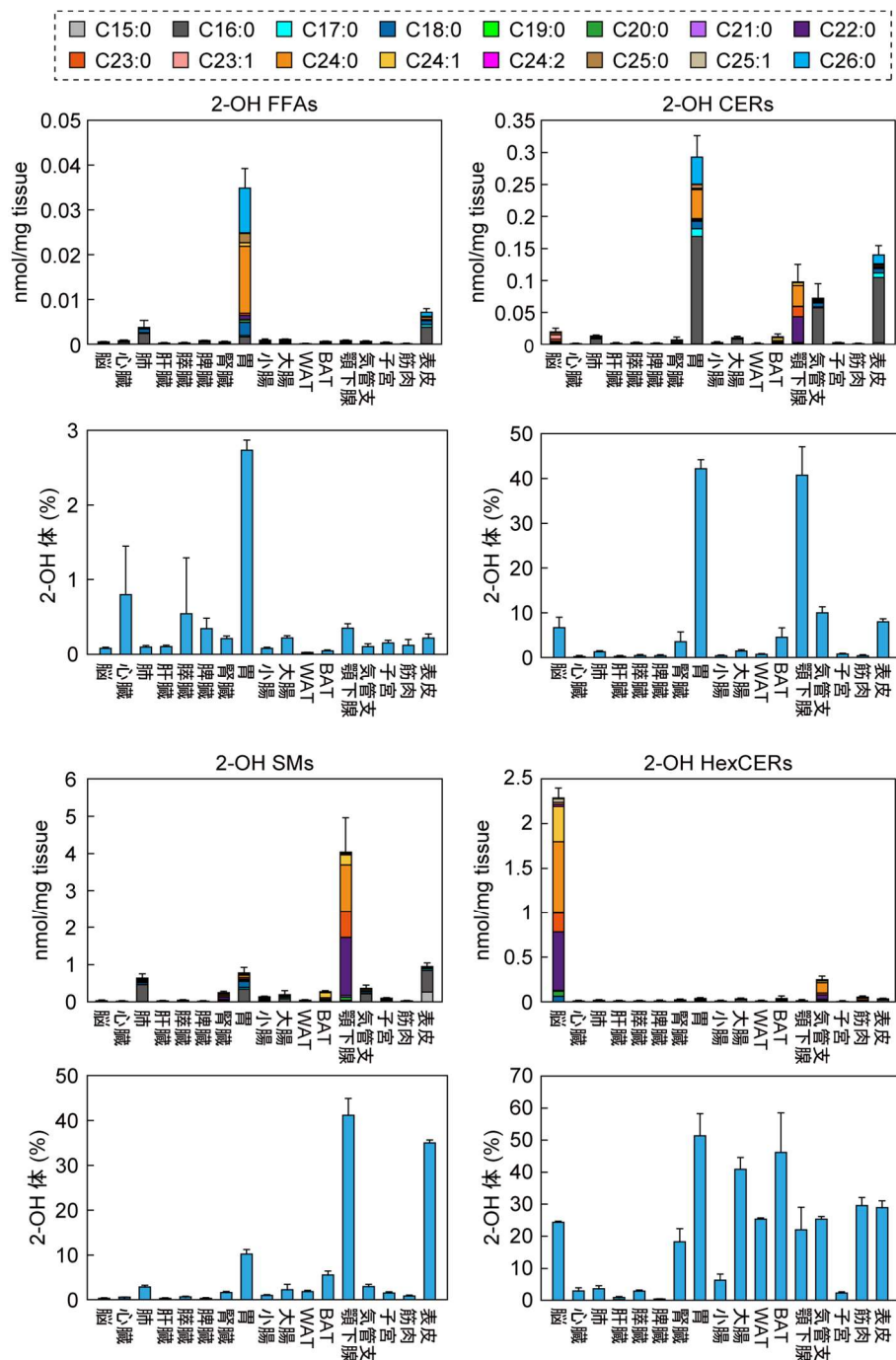


図 19 2-OH FFA および 2-OH 脂肪酸含有スフィンゴ脂質の組織分布

2ヶ月齢の C57BL/6 マウスの 17 組織(脳, 心臓, 肺, 肝臓, 膵臓, 脾臓, 腎臓, 胃, 小腸, 大腸, WAT, BAT, 顎下腺, 気管支, 子宮, 骨格筋, 表皮)から脂質を抽出し, 非水酸化脂肪酸/2-OH 脂肪酸と非水酸化脂肪酸/2-OH 脂肪酸を含む CER, SM, HexCER の量を LC-MS/MS を用いて測定した。値は 3 回の独立した実験の平均 + 標準偏差を示す。

2-OH 脂肪酸は遊離の状態よりも、スフィンゴ脂質中に多く存在する¹³。そこで、次にマウスの 17 組織における 2-OH 脂肪酸含有スフィンゴ脂質(CER, SM, HexCER)の量を調べた。2-OH 脂肪酸含有 CER(2-OH CER)は胃で最も多く存在し、表皮、顎下腺、気管支と続いた(図 19)。一方、その他の組織には少量しか存在しなかった。全 CER(非水酸化 CER+2-OH CER)に対する 2-OH CER の割合は胃および顎下腺では約 40 %, 表皮、気管支では約 10 %であった。鎖長別の割合としては胃、表皮、気管支では C16:0, 顎下腺では C22:0 および C24:0 の脂肪酸をもつ 2-OH CER が多く存在した。

SM はほとんどの組織において最も量の多いスフィンゴ脂質であり、表皮を除く組織において CER よりも数十倍多く存在する。2-OH 脂肪酸を含有する SM は顎下腺で最も多く、次いで表皮、胃、肺であった(図 19)。2-OH SM の全 SM(非水酸化 SM と 2-OH SM の合計)中の割合は顎下腺で 41.1 %, 表皮で 35.0 %, 胃で 10.1 %であった。顎下腺では C22:0 脂肪酸、次いで C24:0 脂肪酸を含有する 2-OH SM が多く存在していた(図 19)。

HexCER にはグルコシル CER とガラクトシル CER が含まれるが、これらは通常の LC-MS/MS では区別して測定することができない。ほとんどの組織において HexCER はグルコシル CER であり、量は SM より少ない。一方、上述の通り、脳(ミエリン)にはガラクトシル CER が多量に含まれる⁵⁹。2-OH グルコシル CER と 2-OH ガラクトシル CER を含む 2-OH HexCER 量を測定した結果、2-OH HexCER は脳において他の組織よりも圧倒的に多く存在し、他の組織においては 2-OH HexCER は少量しか検出されなかった(図 19)。脳において HexCER 全体に対する 2-OH 体の割合は 24.2 %であり、HexCER の脂肪酸組成は多い順に C24:0, C22:0, C24:1, C23:0 であった。

3.2.4 *Hacl2* KO マウスにおける 2-OH および奇数鎖脂質量の変化

様々な組織で 2-OH 脂肪酸含有スフィンゴ脂質が検出されたが(図 19), これらの組織において HACL2 が *in vivo* でどの程度 2-OH 脂肪酸の α 酸化に寄与しているのかは不明である。このことを明らかにするため、本研究では CRISPR-Cas9 システムを用いて、*Hacl2* KO マウスを作製した。*Hacl2* の活性に必須と予想される TPP 結合ドメインは第 10 エキソンから第 12 エキソンにおいてコードされる。そこで、*Hacl2* の第 7 エキソンを標的としたガイド RNA を用いて KO マウスの作成を行った結果、第 7 エキソンに 1 塩基対の欠失を有する *Hacl2* KO マウスを得た(図 20A)。*Hacl2* KO マウスは正常に生育して生殖可能であり、見た目上、明らかな形態的・行動的異常を示さなかった。体重も WT マウスと差は認められなかった(図 20B)。

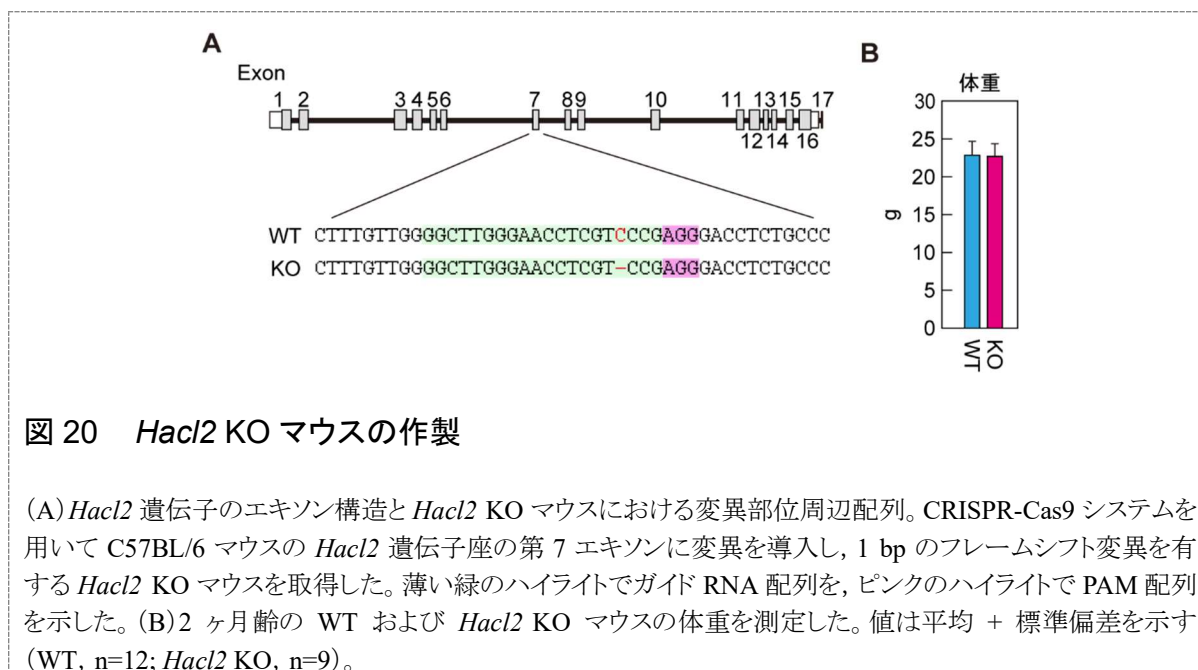
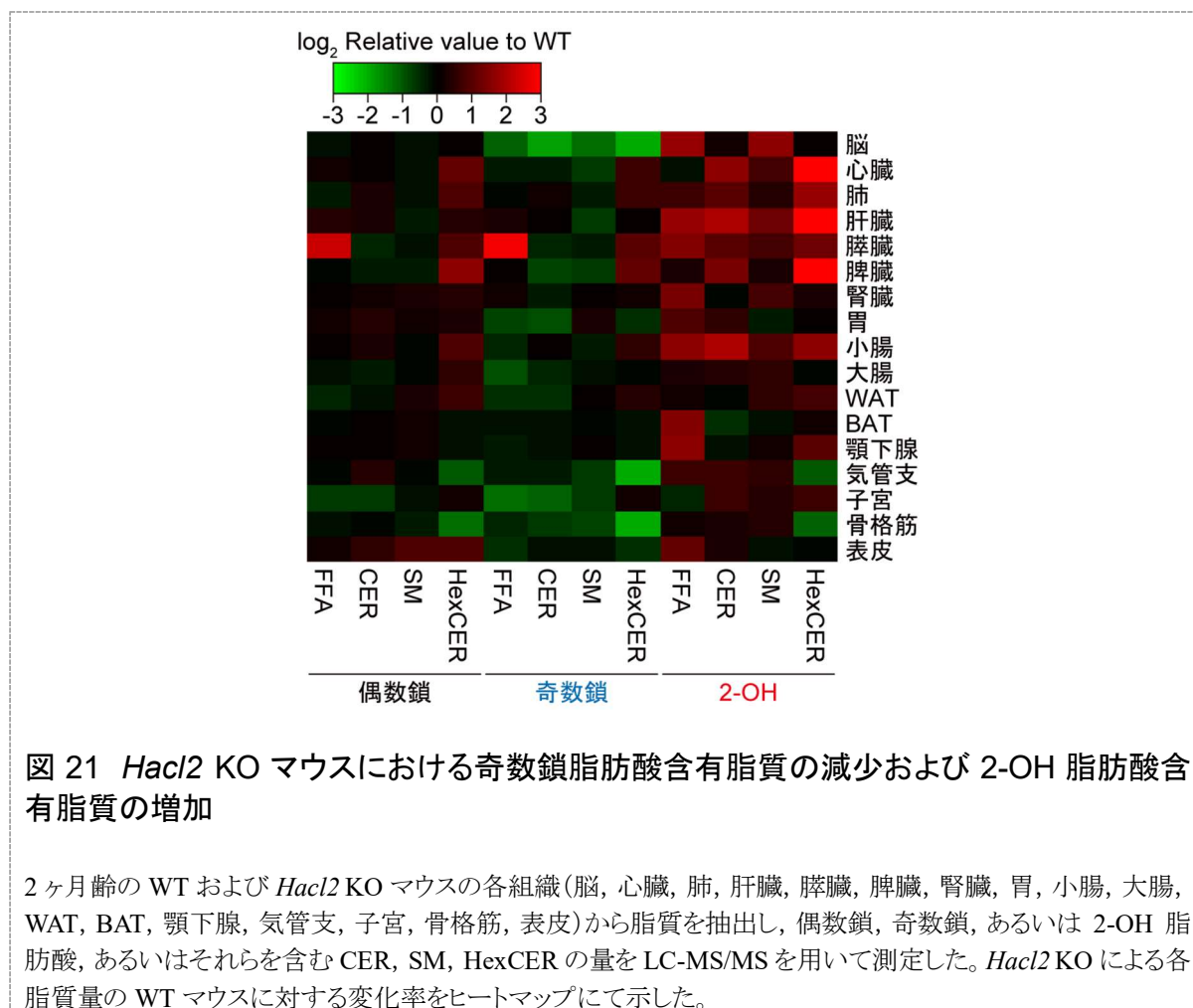


図 20 *Hacl2* KO マウスの作製

(A) *Hacl2* 遺伝子のエクソン構造と *Hacl2* KO マウスにおける変異部位周辺配列。CRISPR-Cas9 システムを用いて C57BL/6 マウスの *Hacl2* 遺伝子座の第 7 エクソンに変異を導入し、1 bp のフレームシフト変異を有する *Hacl2* KO マウスを取得した。薄い緑のハイライトでガイド RNA 配列を、ピンクのハイライトで PAM 配列を示した。(B) 2 ヶ月齢の WT および *Hacl2* KO マウスの体重を測定した。値は平均 + 標準偏差を示す (WT, n=12; *Hacl2* KO, n=9)。

様々な組織での 2-OH 脂肪酸代謝における *Hacl2* の関与を明らかにするため、*Hacl2* KO マウスの 17 組織から脂質を抽出して、FFA, CER, SM, HexCER 量を調べ、WT マウスと比較した。その結果、*Hacl2* の KO によって 2-OH FFA および 2-OH 脂肪酸を含む CER/SM/HexCER の量は増加、奇数鎖を含有する脂質は減少、偶数鎖を含有する脂質は変化なし、わずかに増加する傾向が認められた(図 21–25)。



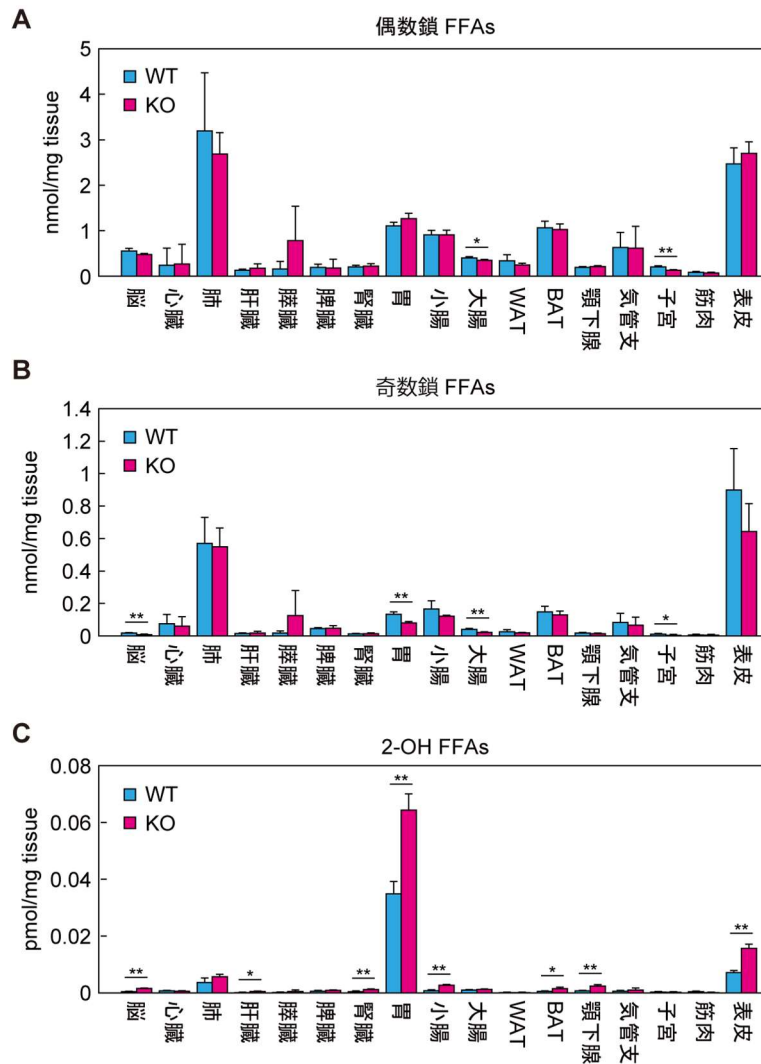


図 22 *Hacl2* KO による各組織での FFA 量の変化

2 ヶ月齢の WT および *Hacl2* KO マウスの各組織(脳, 心臓, 肺, 肝臓, 膵臓, 脾臓, 腎臓, 胃, 小腸, 大腸, WAT, BAT, 顎下腺, 気管支, 子宮, 骨格筋, 表皮)から脂質を抽出し, 遊離の偶数鎖脂肪酸(A) 奇数鎖脂肪酸(B), 2-OH 脂肪酸(C)の量を LC-MS/MS を用いて測定した。値は 3 回の独立した実験の平均 + 標準偏差を示す。統計学的有意性は Student's *t*-test で解析した (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)。

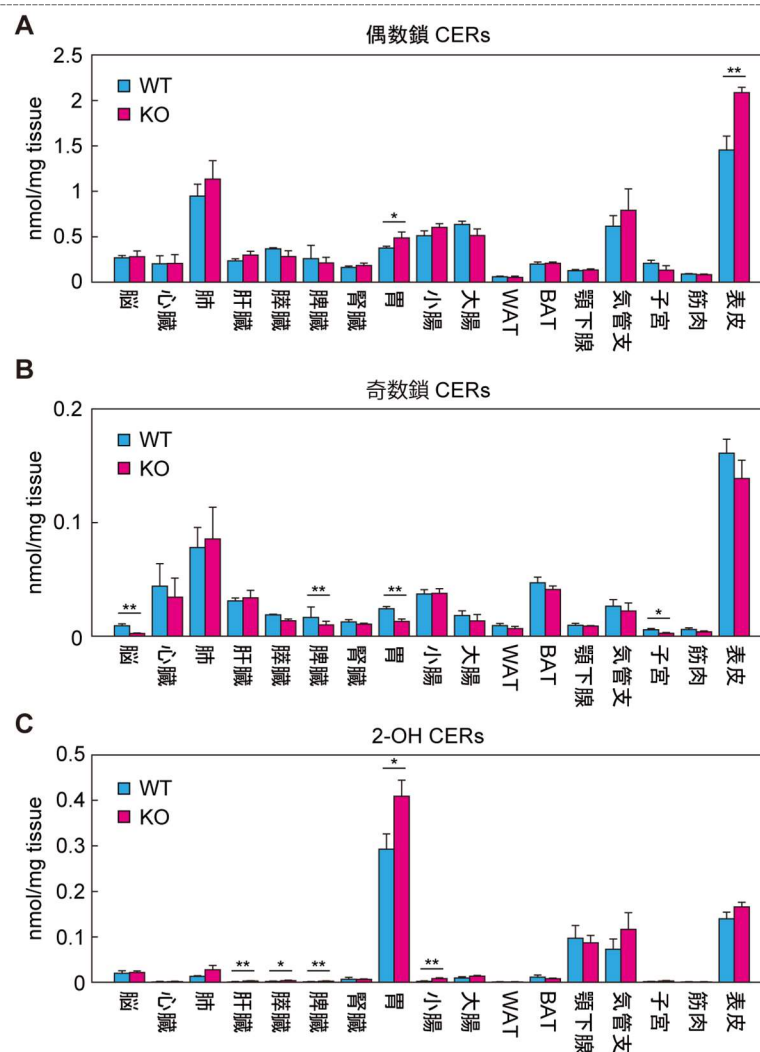


図 23 *Hacl2* KO による各組織での CER 量の変化

2 ヶ月齢の WT および *Hacl2* KO マウスの各組織(脳, 心臓, 肺, 肝臓, 膵臓, 脾臓, 腎臓, 胃, 小腸, 大腸, WAT, BAT, 顎下腺, 気管支, 子宮, 骨格筋, 表皮)から脂質を抽出し, 偶数鎖 CER (A), 奇数鎖 CER (B), 2-OH CER (C)の量を LC-MS/MS を用いて測定した。値は 3 回の独立した実験の平均 + 標準偏差を示す。統計学的有意性は Student's *t*-test で解析した (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

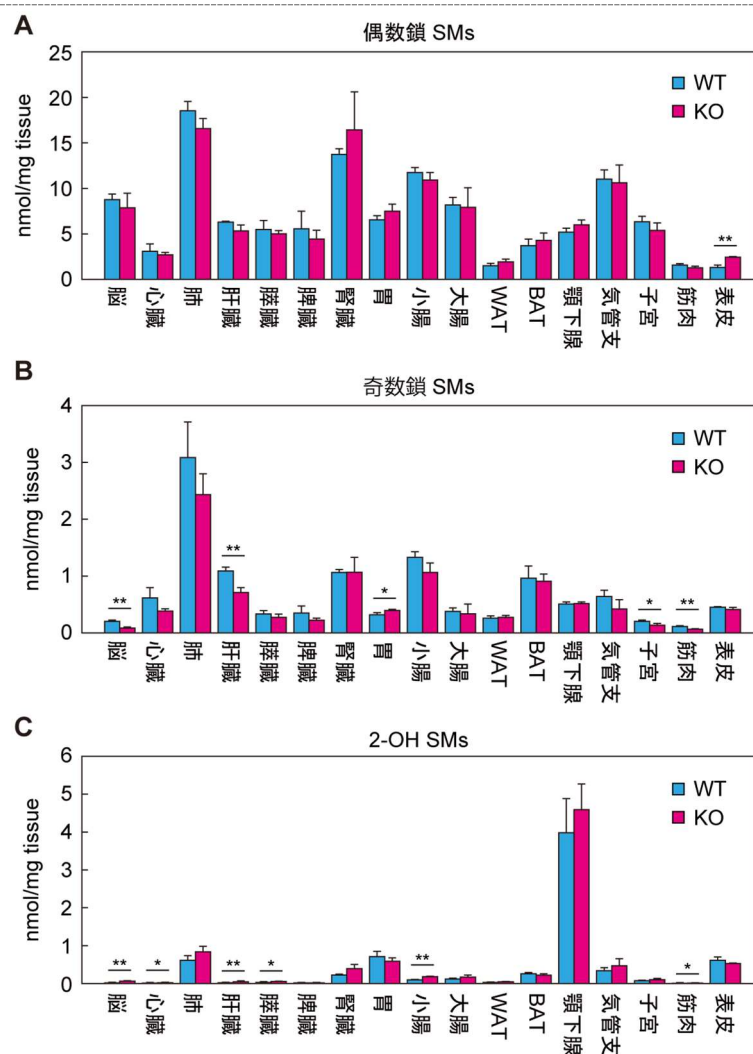


図 24 *Hac12* KO による各組織での SM 量の変化

2 ヶ月齢の WT および *Hac12* KO マウスの各組織(脳, 心臓, 肺, 肝臓, 膵臓, 脾臓, 腎臓, 胃, 小腸, 大腸, WAT, BAT, 顎下腺, 気管支, 子宮, 骨格筋, 表皮)から脂質を抽出し, 偶数鎖 SM(A), 奇数鎖 SM(B), 2-OH SM(C)の量を LC-MS/MS を用いて測定した。値は 3 回の独立した実験の平均 + 標準偏差を示す。統計学的有意性は Student's *t*-test で解析した (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)。

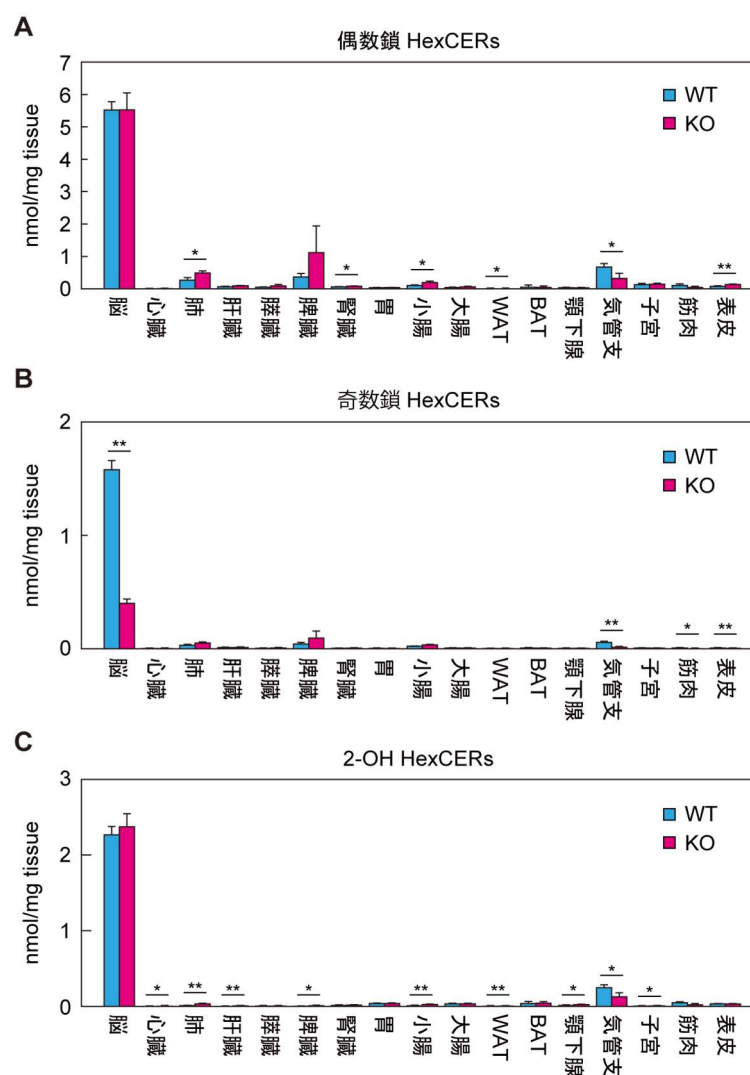


図 25 *Hac12* KO による各組織での HexCer 量の変化

2 ヶ月齢の WT および *Hac12* KO マウスの各組織(脳, 心臓, 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 胃, 小腸, 大腸, WAT, BAT, 顎下腺, 気管支, 子宮, 骨格筋, 表皮)から脂質を抽出し, 偶数鎖 HexCER(A), 奇数鎖 HexCER(B), 2-OH HexCER(C) 量を LC-MS/MS を用いて測定した。値は 3 回の独立した実験の平均 + 標準偏差を示す。統計学的有意性は Student's *t*-test で解析した (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)。

上述の通り、WT マウスの脳には多くの HexCER が存在し、そのうち約 1/4 が 2-OH 脂肪酸から構成されていた(図 19)。鎖長としては偶数鎖の非水酸化 HexCER では C24:1 が最も多かったのに対し、偶数鎖の 2-OH HexCER では C24:0 が最も多く、C22:0, C24:1 と続いた(図 26A)。偶数鎖の非水酸化 HexCER の総量は WT と *Hacl2* KO マウス間で差は認められなかったが、偶数鎖の 2-OH HexCER の総量は *Hacl2* KO で WT マウスに比べてわずかに多かった。奇数鎖非水酸化 HexCER としては WT マウスにおいて C23:1 が最も多い分子種であり、C25:1, C23:0 と続いた。奇数鎖の 2-OH HexCER としては C23:0 が最も多く、次いで C25:1, C25:0 が多かった。*Hacl2* KO マウスの脳では、奇数鎖 HexCER 量が大きく低下し、非水酸化の奇数鎖 HexCER が WT マウスの 25.4 %, 2-OH の奇数鎖 HexCER が WT マウスの 28.8 %であった。奇数鎖 HexCER の減少に伴い、*Hacl2* KO マウスの脳では、非水酸化 HexCER の総量は WT マウスに比べ 16.6 %減少した(図 26B)。一方で、2-OH HexCER の総量に変化は認められなかった。以上の結果から、脳における奇数鎖の HexCER の多くが 2-OH 脂肪酸の α 酸化によって産生されること、この α 酸化に *Hacl2* が関与すること、 α 酸化が脳における HexCER 量の維持に重要であることが明らかとなった。

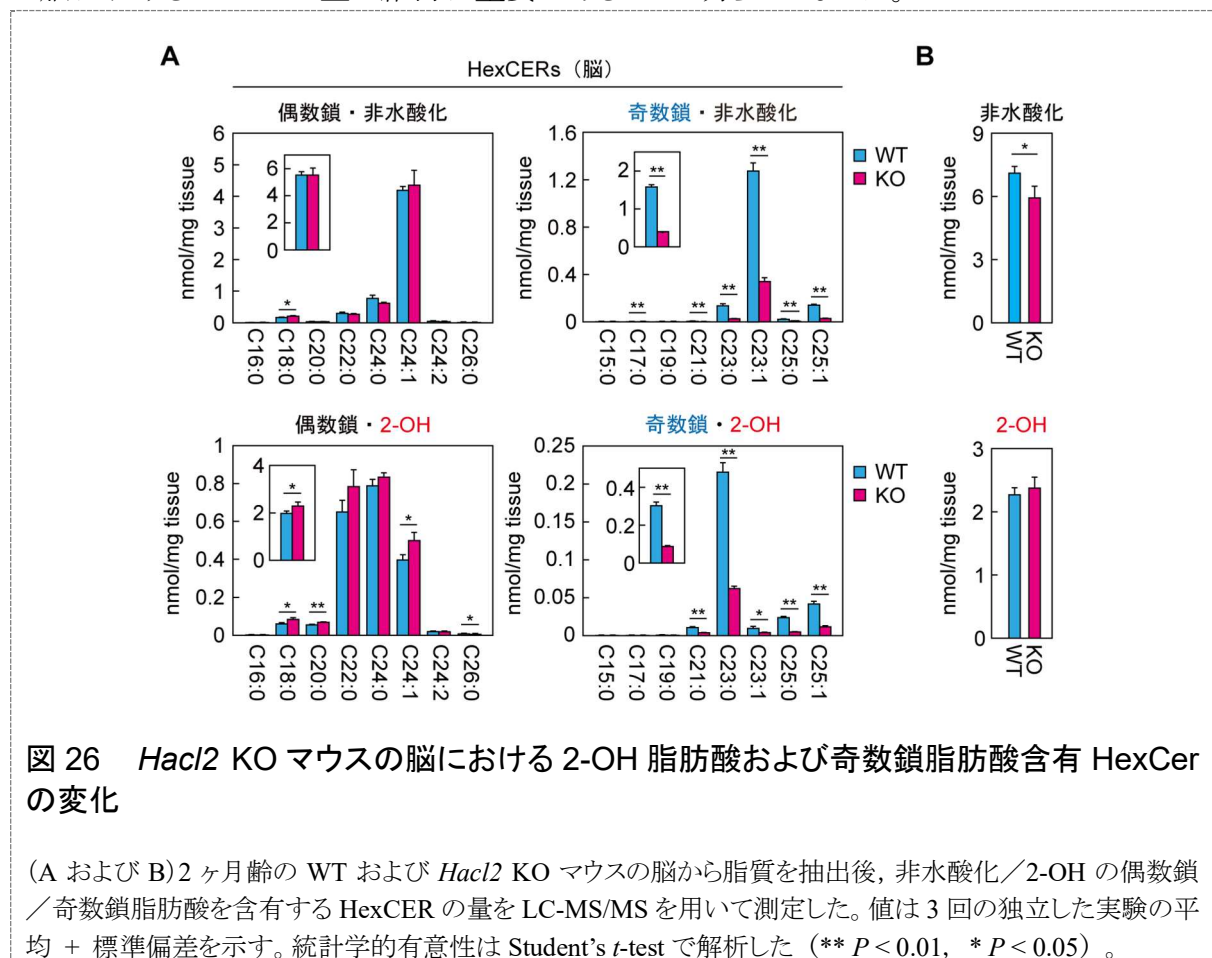
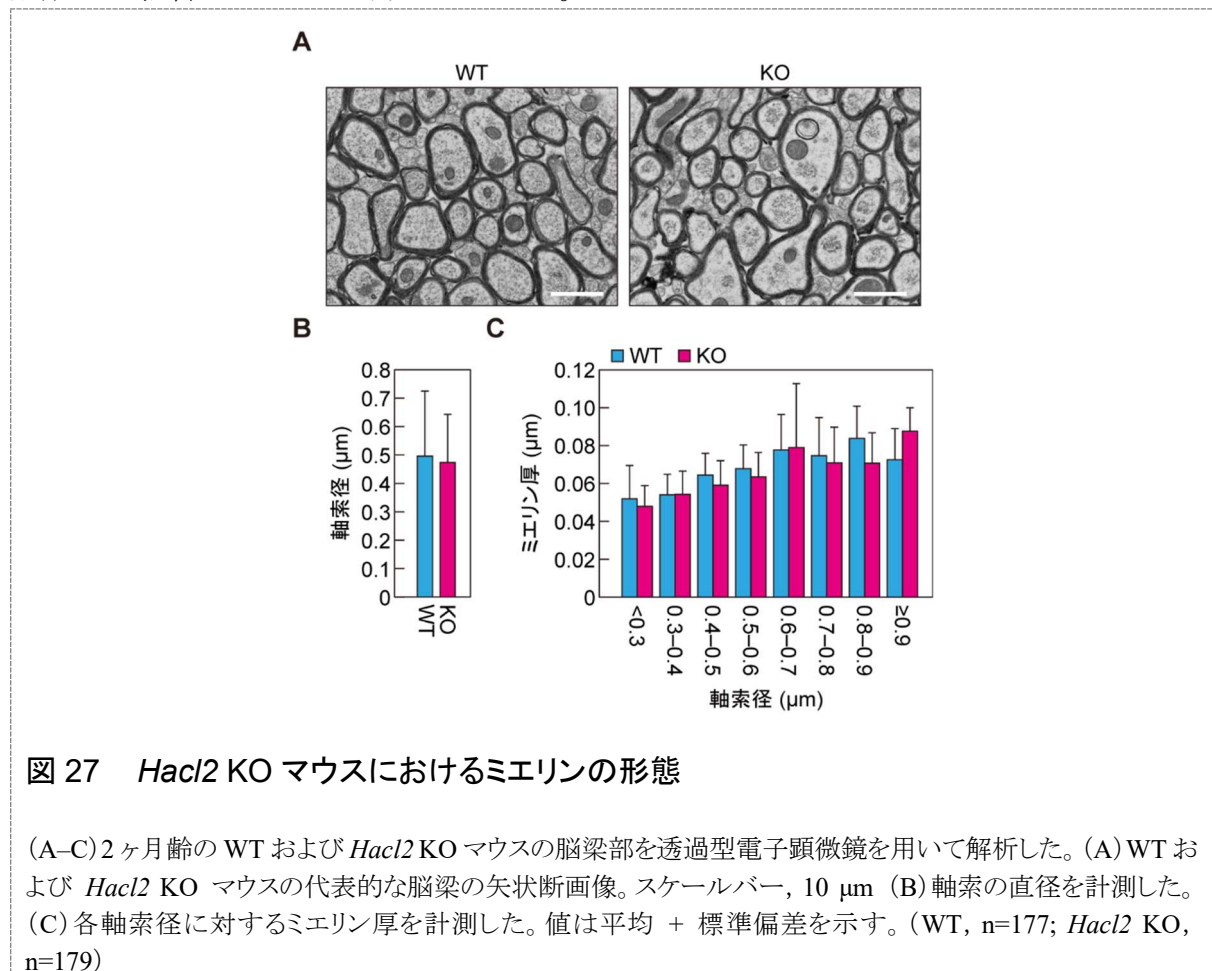


図 26 *Hacl2* KO マウスの脳における 2-OH 脂肪酸および奇数鎖脂肪酸含有 HexCer の変化

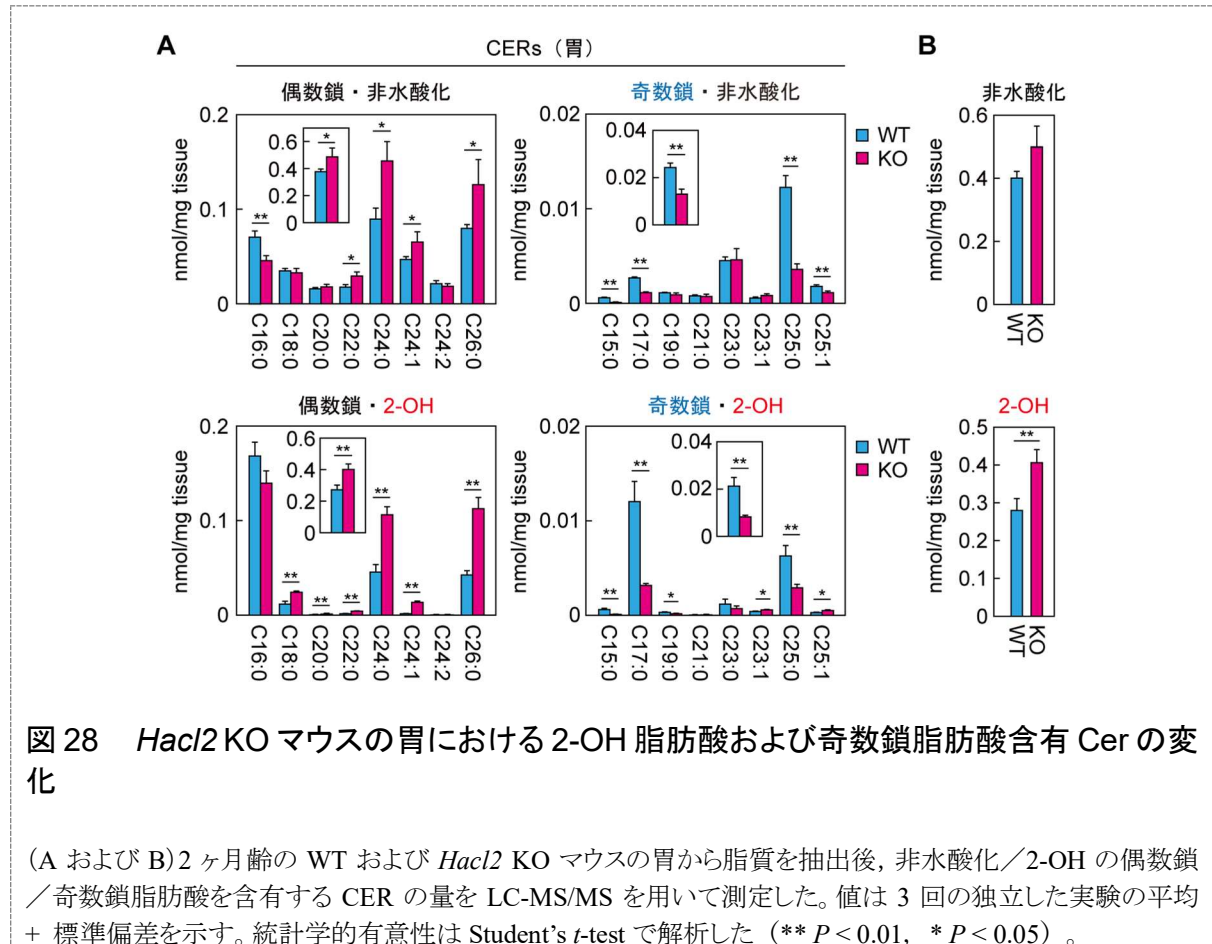
(A および B) 2 ヶ月齢の WT および *Hacl2* KO マウスの脳から脂質を抽出後、非水酸化/2-OH の偶数鎖/奇数鎖脂肪酸を含有する HexCER の量を LC-MS/MS を用いて測定した。値は 3 回の独立した実験の平均 + 標準偏差を示す。統計学的有意性は Student's *t*-test で解析した (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)。

上述の通り、脳における HexCER のほとんどはミエリンに存在するガラクトシル CER である。2-OH ガラクトシル CER はミエリンの形成と維持に重要であり、2-OH 脂肪酸産生酵素である脂肪酸 2-水酸化酵素 *FA2H* の変異は遺伝性痙性対麻痺 (SPG35) を引き起こす²⁶。*Hacl2* KO マウスの脳において 2-OH HexCER の α 酸化が損なわれ、非水酸化の HexCER の総量が低下していたことから (図 26B), ミエリン形成への *Hacl2* KO の影響を調べた。WT マウス, *Hacl2* KO マウスの脳梁の切片を作製し, 電子顕微鏡を用いて形態観察を行った。その結果, WT と *Hacl2* KO マウス間でミエリンの形態, 軸索径およびミエリン厚に差は認められなかった (図 27A–C)。このことから, 少なくとも形態レベルでは *Hacl2* KO によるミエリン形成への影響はないことが明らかとなった。



マウスの組織の中では胃に最も多くの 2-OH CER が存在していた (図 19)。胃における偶数鎖の非水酸化 CER としては C24:0 が最も多く, C26:0, C16:0, C24:1 と続いた (図 28A)。2-OH CER として最も多い分子種は C16:0 であり, 次いで C24:0 および C26:0 が多かった。*Hacl2* KO マウスでは, 偶数鎖の非水酸化 CER および 2-OH CER はともに増加しており, それぞれ WT マウスの 129.4 % および 147.7 % であった。特に C24:0 および C26:0 から構成される非水酸化および 2-OH CER の量が顕著に増加していた。一方, WT マウス中の奇数鎖

CER としては非水酸化 CER で C25:0, 2-OH CER で C17:0 の分子種が最も多く存在した。*Hacl2* KO マウスの胃では, 奇数鎖 CER 量が低下し, 非水酸化の CER が WT マウスの 53.5 %, 2-OH の奇数鎖 CER が WT マウスの 38.8 %であった。総量としては, 非水酸化 CER 量が 129.4 %, 2-OH CER 量が 145.0 %であった(図 28B)。以上の結果から, 胃における奇数鎖の CER の多くが *Hacl2* によって触媒される α 酸化を介して産生されることが明らかとなった。



顎下腺には, マウスの組織の中で最も多くの 2-OH SM が存在しており, SM 全体の 41.2 % が 2-OH 体であった(図 19)。しかし, 前述の脳・胃と異なり, *Hacl2* KO によって非水酸化・2-OH あるいは奇数鎖・偶数鎖に関わらず WT マウスと *Hacl2* KO マウス間の SM 量に差は認められなかった(図 29A, B)。このことから顎下腺では奇数鎖の SM 産生に, *Hacl2* を介した経路以外が主に寄与していることが明らかとなった。以上のことから, 一部の組織, 特に脳と胃において *HACL2* が関与する 2-OH 脂肪酸の α 酸化によって奇数鎖脂肪酸が産生されていることが明らかとなった。

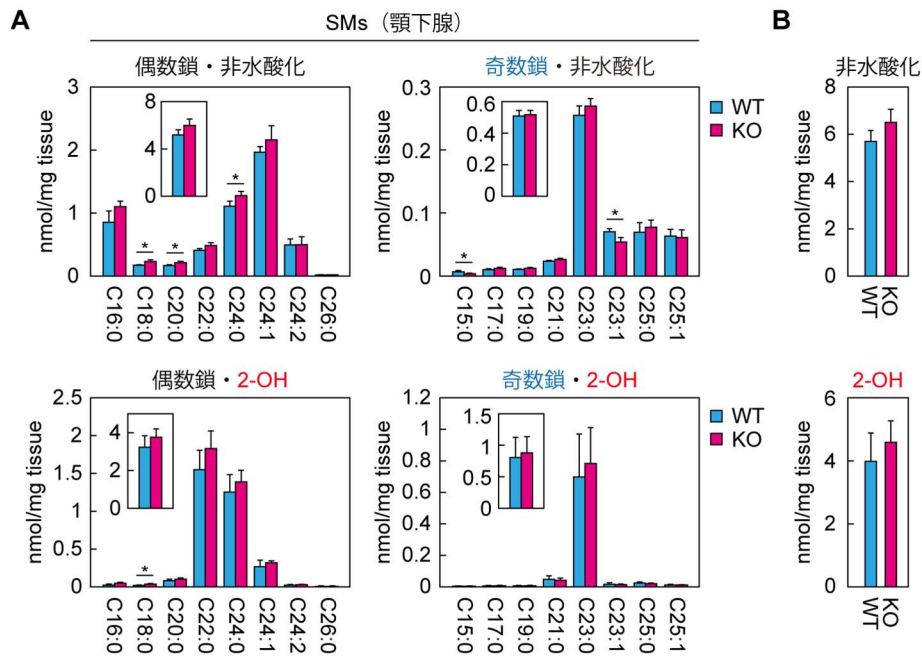


図 29 *Hacl2* KO マウスの顎下腺における 2-OH 脂肪酸および奇数鎖脂肪酸含有 SM の変化

(A および B) 2 ヶ月齢の WT および *Hacl2* KO マウスの顎下腺から脂質を抽出後、非水酸化／2-OH の偶数鎖／奇数鎖脂肪酸を含有する SM の量を LC-MS/MS を用いて測定した。値は 3 回の独立した実験の平均 + 標準偏差を示す。統計学的有意性は Student's *t*-test で解析した (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)。

4. 考察

当研究室の近藤、北村らの先行研究により、小胞体膜に局在する新規 α 酸化酵素として哺乳類 HACL2 および酵母 Mpo1 が同定された^{27,28}。これらはいずれも PHS 代謝経路において産生される 2-OH C16:0 脂肪酸の α 酸化反応を触媒する。これまでに、哺乳類 HACL2 は HACL1 同様、 Mg^{2+} および TPP 依存的に 2-OH アシル CoA を基質として 1 炭素短い脂肪族アルデヒドを産生すること、酵母 Mpo1 は 2-OH 脂肪酸を基質として Fe^{2+} 依存的に 1 炭素短い脂肪酸を産生することが明らかとなっていた^{27,43}。しかしながら、当研究室で同定した新規 α 酸化酵素の酵素学的性質や生理的意義については以下に示すように不明な点が多く残されていた。Mpo1 は Fe^{2+} 依存的に α 酸化反応を触媒するが、既知のドメインを持たず、 Fe^{2+} 結合に関わる領域やアミノ酸残基は不明であった。また、酸化剤として用いられる分子についても明らかとなっていなかった。Mpo1 が PHS の代謝産物である 2-OH C16:0 脂肪酸に対して活性を示すことは明らかとなっていたが、より鎖長の長い極長鎖の 2-OH 脂肪酸の α 酸化に関与するかは不明であった。HACL1 および HACL2 はいずれも長鎖の 2-OH アシル CoA に活性を示すが、それぞれの役割の違いや、生体での奇数鎖脂肪酸産生における寄与は不明であった。本研究では上記の未解明の点に答え、小胞体膜に局在する酵母新規 α 酸化酵素 Mpo1 の酵素学的性質や基質特異性、哺乳類 HACL1 および HACL2 の役割の違いおよびマウスでの奇数鎖脂肪酸産生への HACL2 の寄与を明らかにした。

4.1 酵母 α 酸化酵素 Mpo1 の生化学的解析

4.1.1 Mpo1 によって触媒される α 酸化の分子機構

本研究では、Mpo1 の活性に 3 つのヒスチジン残基 (His19, His28, His115) が必須であることを明らかにした (図 6-10)。2 価鉄オキソタンパク質クラス I では、ヒスチジンを含む 2 つのモチーフ (モチーフ 1, H...HXXXE, モチーフ 2, HXXXH...HXXXXD) がいずれも Fe^{2+} と配位結合を形成する^{51,52}。本研究では Mpo1 活性に重要なアミノ酸配列 YXXXH...H...HXXXE (Mpo1 モチーフ) を明らかにした。このアミノ酸配列中で、チロシン残基及びグルタミン酸残基はそれぞれヒスチジン残基およびアスパラギン酸残基に代替可能であった (図 8)。これはチロシン残基がヒスチジン残基同様に、 Fe^{2+} と配位結合を形成でき、グルタミン酸およびアスパラギン酸はいずれも酸性アミノ酸であるという共通点に起因すると考えられる。一方で、Mpo1 モチーフのヒスチジン残基をチロシン残基に置換した変異体 (H19Y, H28Y, H115Y) はいずれも活性を示さなかった。これは配位結合を形成する位置もしくは向きがチロシン残基とヒスチジン残基で異なるため、機能を代替できなかったと考えられる。

Mpo1 モチーフ中のアミノ酸配列 H...HXXXE は 2 価鉄オキソタンパク質クラス I のモチ

ーフ 1 と一致し, YXXXH と HXXXE の組み合わせはモチーフ 2 に類似している。これらの残基のうち, Mpo1 活性に重要な残基である His19, His28 および His115 残基は Fe^{2+} との結合の形成に関与していると推測される。WT の Mpo1 の Fe^{2+} に対する K_D 値は約 $10\ \mu\text{M}$ であった(図 10B)。一方, これらの His 変異体に $1\ \text{mM}$ の Fe^{2+} を加えても活性が検出されなかったことから(図 10C), これらの変異体の Fe^{2+} に対する K_D 値は $1\ \text{mM}$ を大きく超えていると予測される。

In vivo での $[^3\text{H}]\text{PHS}$ ラベル実験および 2-OH 脂肪酸を培地に添加しない条件下での奇数鎖 PC の量の測定実験において, H19A, H28A, H115A 変異体の活性低下が観察された(図 6D および図 7A)。Y15A 変異体と E119A 変異体の活性低下はそれらの実験では観察されなかったが, 2-OH C16:0 脂肪酸の添加条件下および *in vitro* での活性測定において活性低下が観察された(図 7B および図 10)。最初の 2 つの *in vivo* の実験は生体の至適な条件下且つ少量の内在性の基質しか存在しない条件での酵素反応なので, 弱い活性低下では変異の効果が検出されづらい。一方, 後半の基質量が多い *in vivo* の条件, あるいは必ずしも酵素にとって至適な環境とはなっていない *in vitro* の条件下では, 感度よく活性の低下を検出できたのであろう。本研究の結果は Tyr15 と Glu119 も Mpo1 の酵素活性になんらかの役割を果たすことを示している。Tyr15 と Glu119 は Fe^{2+} の結合に関わると予測される His19 と His115 とそれぞれ 4 残基ずつ離れている。この距離はちょうどアルファヘリックスの 1 ピッチ分に相当する。そのため, Tyr15 と Glu119 も Fe^{2+} との結合面周辺に位置し, Fe^{2+} 結合に直接あるいは間接的に関与している可能性がある。

タンパク質の構造予測プログラムである AlphaFold2 による Mpo1 の構造予測^{60,61} では 3 つのヒスチジン残基(His19, His28, H115)は近接した領域に位置し, Tyr15 および Glu119 はその近傍に存在していた(図 30)。また, これらのアミノ酸残基はいずれも側鎖を 3 つのヒスチジン残基の中心方向へ配向していた。予測されたこれらアミノ酸残基の位置および向きは, 本研究で得られた予測(3 つのヒスチジン残基が Mpo1 と Fe^{2+} の結合において重要な役割を果たしており, Tyr15 と Glu119 も Fe^{2+} 結合に直接あるいは間接的に関与している)に合致しており, 本研究から推測されたこれら残基の役割を支持していると考えられる。

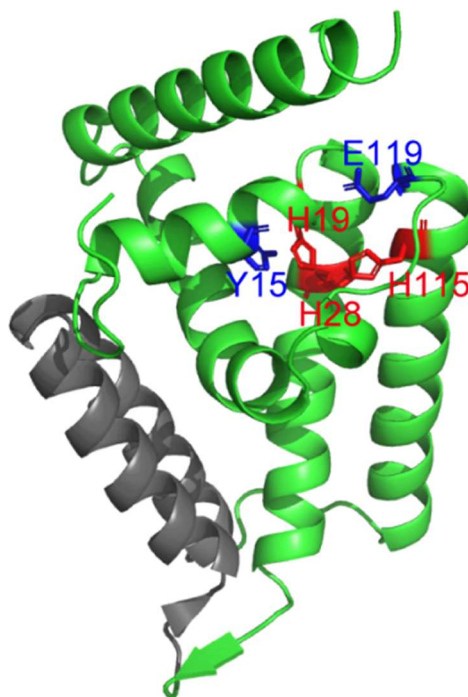


図 30 Mpo1 タンパク質の構造予測

AlphaFold2 による Mpo1 タンパク質の構造予測。His19, His28 および His115 を赤色で, Tyr15 および Glu119 を青色で, 2 つの膜貫通領域を灰色で示した。

また, 本研究では Mpo1 の補因子である Fe^{2+} が酸素分子に結合して働くことを明らかにした(図 13A)。Mpo1 により触媒される脂肪酸 α 酸化反応において酸素分子は酸化剤として用いられる。ラジカルスカベンジャーの添加では Mpo1 によって触媒される脂肪酸 α 酸化反応は阻害されなかったことから, 反応では鉄イオン(IV) ペルオキシドが求核剤として働くことが示された(図 13B, C)。これらの結果に基づき, Mpo1 によって触媒される α 酸化の反応は以下に示すような反応ステップで進行すると考えられる(図 31)。(1) 鉄イオン(IV) ペルオキシドの形成, (2) 2-OH 脂肪酸(n) の C1 位のカルボニル炭素への酸素分子による攻撃, (3) C1 位の-OH 基および C2 位の-OH 基の水素原子からの H_2O の形成, (4) CO_2 および C15:0 脂肪酸アルデヒドの形成, (5) 酸素と鉄イオン(IV) ペルオキシド間の二重結合による C1 位のカルボニル炭素への求核攻撃, (6) 反応産物である奇数鎖脂肪酸(n-1) の形成。これらの反応を経て 2-OH 脂肪酸(n) および O_2 から脂肪酸(n-1), H_2O および CO_2 が産生される。オキシゲナーゼとは 1 つもしくは 2 つの酸素原子を基質への組み込む酵素である(それぞれモノオキシゲナーゼ, ジオキシゲナーゼ)。Mpo1 は 2 つの酸素原子を基質である 2-OH FA (n) に組み込み, 反応産物としてそれぞれ酸素原子を 1 つずつもつ FA (n-1) および CO_2 を産生するため, ジオキシゲナーゼである。本研究により, Mpo1 は 2-OH 脂肪酸を基質とする, 新しいタイプのジオキシゲナーゼであることが示された。

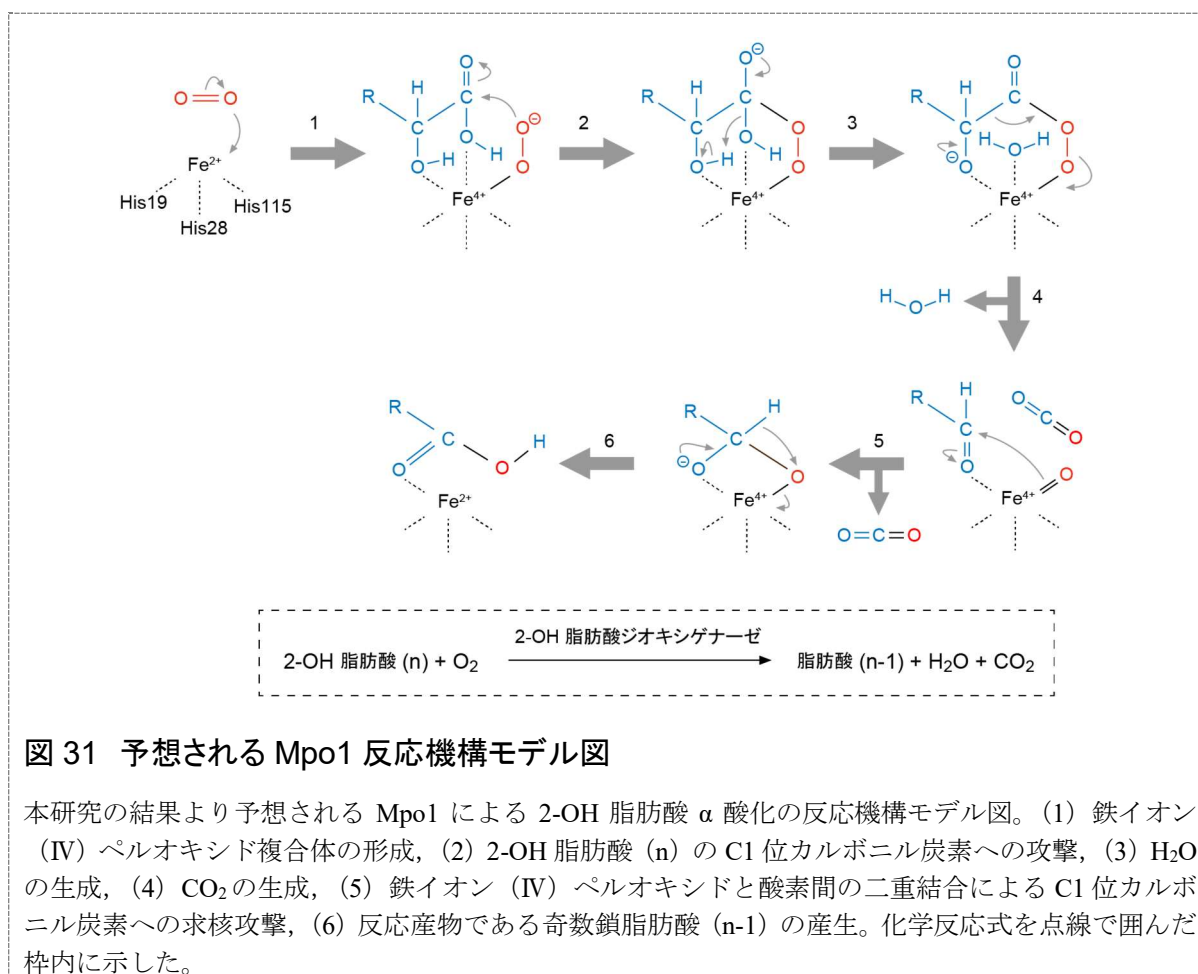


図 31 予想される Mpo1 反応機構モデル図

本研究の結果より予想される Mpo1 による 2-OH 脂肪酸 α 酸化の反応機構モデル図。(1) 鉄イオン (IV) ペルオキシド複合体の形成, (2) 2-OH 脂肪酸 (n) の C1 位カルボニル炭素への攻撃, (3) H_2O の生成, (4) CO_2 の生成, (5) 鉄イオン (IV) ペルオキシドと酸素間の二重結合による C1 位カルボニル炭素への求核攻撃, (6) 反応産物である奇数鎖脂肪酸 (n-1) の産生。化学反応式を点線で囲んだ枠内に示した。

4.1.2 Mpo1 による 2-OH 脂肪酸代謝と生理的意義

本研究では Mpo1 が PHS 分解経路における 2-OH C16:0 脂肪酸代謝に関わるだけでなく²⁸, 極長鎖の 2-OH 脂肪酸の代謝にも関与することを見出した(図 12A–C)。in vitro の活性測定においても Mpo1 は長鎖の 2-OH C16:0 脂肪酸(図 10A), 2-OH C14:0 脂肪酸(図 10B)だけでなく, 極長鎖の 2-OH C24:0 脂肪酸にも活性を示した(図 12D)。このことから, Mpo1 は幅広い鎖長の 2-OH 脂肪酸に対して活性をもつことが明らかとなった。

また, 本研究では *mpo1Δ* 株では小胞体ストレス感受性が亢進することを明らかとした(図 15A)。PHS と小胞体ストレスとの関連⁵⁸ から, この小胞体ストレス感受性の亢進は当初は PHS の蓄積によるものと考えられた。しかしながら, *mpo1Δ* 株において PHS の蓄積は認められなかった。酵母における唯一の極長鎖アシル CoA 合成酵素 *Fat1* を欠失した株では小胞体ストレスが惹起される⁶²。この株では, 極長鎖脂肪酸の代謝が遮断されるが, 酵母における極長鎖脂肪酸はほとんどが 2 位水酸化を受けているため, *fat1Δ* 株では 2-OH 極長鎖脂肪酸が蓄積することが予想される。*mpo1Δ* 株でも 2-OH 脂肪酸の分解経路が遮断されるため, *fat1Δ* 株同様に 2-OH 極長鎖脂肪酸が蓄積することが予想される。また, Mpo1 は小胞体

膜局在タンパク質であり、この 2-OH 極長鎖脂肪酸の蓄積は小胞体で生じると考えられる。*mpo1Δ* 株では WT と比べて PHS 量に差は認められなかったが、これらの共通点および Mpo1 の局在から、2-OH 極長鎖脂肪酸の蓄積が小胞体ストレスを引き起こしている可能性がある。

4.2 哺乳類 α 酸化酵素 HACL2 の奇数鎖脂肪酸産生における役割の解明

4.2.1 HACL1 がペルオキシソームに、HACL2 が小胞体に局在する意義

以前の報告で、小胞体に局在する HACL2 が 2-OH 長鎖脂肪酸の α 酸化においてペルオキシソームに局在する HACL1 よりも高い寄与を示すことが明らかにされた²⁷。しかし、他の α 酸化の基質として知られる 3-メチル分岐鎖脂肪酸や、極長鎖の 2-OH 脂肪酸の α 酸化に対する HACL1 と HACL2 の寄与は不明であった。本研究では HACL1 が主に 3-メチル分岐鎖脂肪酸の α 酸化に、HACL2 が 2-OH 極長鎖脂肪酸の α 酸化にそれぞれ主に寄与することを明らかにした(図 16-18)。3-メチル分岐鎖脂肪酸はそのままでは β 酸化による分解を受けられないため、細胞における過剰な蓄積を防ぐためには積極的に細胞から排出あるいは分解される必要があると考えられる。3-メチル分岐鎖脂肪酸が β 酸化によって分解されるためには、 α 酸化経路(CoA 付加, 2-水酸化と引き続く HACL による開裂, アルデヒドの酸化)によって1炭素短い2-メチル分岐鎖脂肪酸に代謝される必要がある。この α 酸化過程における 2-水酸化反応はペルオキシソーム局在の 2-水酸化酵素 PHYH によって触媒される³⁴。また、アルデヒド酸化酵素として働くと考えられるアルデヒドデヒドロゲナーゼ ALDH3A2 のスプライシングアイソフォームの1つはペルオキシソームに局在する^{63,64}。このように 3-メチル分岐鎖脂肪酸の α 酸化はすべてペルオキシソームで行われると推定される。また、3-メチル分岐鎖脂肪酸の α 酸化産物である 2-メチル分岐鎖脂肪酸の β 酸化もペルオキシソームで行われる⁶⁵⁻⁶⁷。したがって、HACL1 がペルオキシソームに局在することは、3-メチル分岐鎖脂肪酸の α 酸化と β 酸化の一連の反応が連続的に行われる上で効率的である。一方で、直鎖の 2-OH 脂肪酸は α 酸化を受けて1炭素短く、水酸基をもたない奇数鎖の脂肪酸となった後、多くは小胞体におけるスフィンゴ脂質や他の脂質の生合成に利用される。2-OH 脂肪酸の α 酸化を主に小胞体局在の HACL2 が担うことは、同じ場所で引き続いて脂質合成に利用するのに効率的であると考えられる。極長鎖脂肪酸の β 酸化はペルオキシソームで起こるため⁶⁸、もし 2-OH 極長鎖脂肪酸の α 酸化がペルオキシソーム局在の HACL1 によって行われた場合は、脂質合成ではなく、 β 酸化による分解が優勢になると予測される。

4.2.2 哺乳類における 3-メチル脂肪酸の毒性回避機構

Hacl1 KO マウスは、通常の飼育条件では明らかな表現型を示さない一方、食餌中へのフィトールの添加により、体重減少、肝臓の肥大とまだら模様、白色脂肪組織の消失、肝臓お

よび血清中のフィタン酸の蓄積を示した⁴⁴。フィタン酸は哺乳類細胞には通常存在しないような複数の分岐をもった構造を有しているため、その過剰な蓄積は細胞毒性を生じることが予想される。実際、3-メチル分岐鎖脂肪酸は直鎖脂肪酸よりも低い濃度において細胞傷害性を示すことが報告されている⁶⁹。本研究において培養細胞にフィタン酸を添加した際、フィタン酸とその代謝物のいずれも細胞に比べ、培地中に多く検出された(図 18)。このことは哺乳類細胞が複数の分岐をもつ脂肪酸を積極的に細胞外に排出していることを示している。哺乳類細胞は分岐鎖脂肪酸の毒性を回避するため、積極的に細胞外に排出し、排除できなかった分を主に HACL1 が α 酸化経路によって分解しているのであろう。

4.2.3 哺乳類における奇数鎖脂肪酸産生経路

生体に存在する脂肪酸は大部分が偶数鎖であるが、スフィンゴ脂質中には 5–25 %と比較的高い割合で奇数鎖が存在する(図 19)。奇数鎖脂肪酸はプロピオニル ACP を前駆体とした脂肪酸合成酵素による脂肪酸産生、あるいは 2-OH 脂肪酸の α 酸化に由来すると考えられるが、どちらの経路にどの程度由来しているかについては不明であった^{70,71}。本研究では脳および胃においては HACL2 による α 酸化が奇数鎖脂肪酸産生に大きく寄与していることを明らかにした(図 26 および図 28)。一方、顎下腺を含むその他の組織においては HACL2 の寄与は小さい、あるいはほとんどなかった(図 21–25 および図 29)。これらの組織において奇数鎖脂肪酸はプロピオニル ACP からの脂肪酸産生あるいは HACL1 を介した α 酸化によって産生されると考えられる。

4.2.4 脳における奇数鎖 HexCER 組成決定の分子機構

マウスの脳において HexCER 中の 2-OH 脂肪酸の大部分が C22:0, C24:0, C24:1 分子種であった(図 26)。これらはそれぞれ α 酸化を受けて C21:0, C23:0, C23:1 脂肪酸となった後、そのまま CER 合成に利用されるか、脂肪酸伸長酵素 ELOVL1 による伸長や脂肪酸 2 位水酸化酵素 FA2H による水酸化を受けてから CER 合成に利用される。奇数鎖の非水酸化 HexCER は C23:1 が主であり、奇数鎖の 2-OH HexCER は C23:0 が主であった。この結果は、FA2H には脂肪酸の不飽和度に依存した基質特異性が存在し、飽和脂肪酸に特異性が高いことを示唆している。また、脳において 2-OH C22:0 CER が豊富に存在するにも関わらず、その α 酸化産物である C21:0 脂肪酸を含む CER はほとんど存在しなかった。このことについては、脳において C21:0 脂肪酸がミエリンに多く存在する CER 合成酵素 CERS2 の基質特異性(C22–C24 に高い活性を示す)³ のため CER に組み込まれにくい、脂肪酸伸長酵素の高い活性によって速やかに伸長を受けて C23:0 まで伸長されることが推測された。

4.3 酵母および哺乳類における脂肪酸 α 酸化反応の意義

4.3.1 脂肪酸 α 酸化反応は基質の過剰な蓄積を防ぐ

2-OH 脂肪酸はグリセロリン脂質には代謝されず、 β 酸化も受けられないため、代謝を受けるためには α 酸化を経て非水酸化の奇数鎖脂肪酸へと変換される必要がある。生体分子は一般的に合成と分解のバランスによって恒常性が保たれている。そのため、生体分子の代謝異常の多くは特定の細胞機能の低下を引き起こし、更には疾患へとつながる。このことは 2-OH 脂肪酸の代謝にも当てはまると予想される。事実、本研究では *mpo1 Δ* 株でツニカマイシン感受性が高くなることを明らかとした(図 15A)。この結果は小胞体における 2-OH 極長鎖脂肪酸の蓄積に起因することが予想される。哺乳類においても 2-OH 脂肪酸の α 酸化異常が何らかの細胞機能異常あるいは疾患につながる可能性がある。

α 酸化のもう一つの基質である 3-メチル脂肪酸についても同様に、膜脂質合成には利用されず、 β 酸化も受けられないが、3-メチル脂肪酸の α 酸化産物である 2-メチル脂肪酸は β 酸化による分解を受けることができる。また、前述のように 3-メチル分岐鎖脂肪酸は直鎖脂肪酸よりも低い濃度において細胞傷害性を示すことが報告されており⁶⁹、細胞は 3-メチル脂肪酸を積極的に細胞外へ排出する機構を有していると考えられる。3-メチル脂肪酸に対する α 酸化の重要性についても 2-OH 脂肪酸同様に、細胞外へ排出しきれなかった 3-メチル脂肪酸を β 酸化による分解が可能な化合物に変換し、その蓄積を防ぐことにあると予想される。

4.3.2 哺乳類と酵母で脂肪酸 α 酸化経路が異なる意義

哺乳類における 2-OH 脂肪酸の α 酸化は 3 反応によって行われる(図 4)。哺乳類において 2-OH 脂肪酸(n)はまず ACS によって 2-OH アシル CoA(n)に変換される。この反応は ATP をエネルギーとして必要とする。続いて、2-OH アシル CoA リアーゼ HACL1 および HACL2 によって 2-OH アシル CoA(n)の C1 位と C2 位間が開裂されて脂肪酸アルデヒド(n-1)が産生される。産生された脂肪酸アルデヒド(n-1)は脂肪酸アルデヒドデヒドロゲナーゼにより、脂肪酸(n-1)へと酸化される。一方、酵母では 2-OH 脂肪酸(n)は Mpo1 単独で脂肪酸(n-1)まで 1 反応で変換される。哺乳類での 3 反応に対して、酵母での 1 反応の触媒様式には少なくとも 2 つの利点がある。1 つ目の利点として、酵母 α 酸化反応はエネルギーを必要としない。もう 1 つの利点は中間体として脂肪酸アルデヒドを産生しないことである。アルデヒドは一般的に高い反応性をもつため、特定の生体分子に結合して毒性を示す可能性がある。実際、哺乳類における主要な脂肪酸アルデヒド脱水素酵素である *ALDH3A2* 遺伝子の変異は、魚鱗癬や末梢神経障害などの症状を示すシェーグレン・ラルソン症候群を引き起こす⁷²。一方で、哺乳類における 3 反応から構成される α 酸化様式では 2-OH 脂肪酸は他の代謝経路と同様の反応中間体(2-OH アシル CoA)を介するため、合成と分解のどちらの経

路にも代謝され得るという利点をもつ。また、酵母における 2 位水酸化酵素である *Scs7* はセラミドの脂肪酸部分の C2 位を水酸化するのに対し²²、哺乳類における 2 位水酸化酵素である FA2H は遊離の脂肪酸を基質とする²⁵。そのため、哺乳類において 2-OH 脂肪酸から 1 反応で α 酸化が行われる場合、産生された 2-OH 脂肪酸はそのまま α 酸化を受けて非水酸化脂肪酸へ代謝され得る。哺乳類の α 酸化において不可逆である開裂反応の基質が 2-OH アシル CoA であることは、合成した 2-OH 脂肪酸が即時的に分解されることを防ぐ利点があると考えられる。

4.4 総括および今後の展望

本研究では *Mpo1* の活性に重要なアミノ酸残基、基質特異性を明らかにし、*Mpo1* が 2-OH 脂肪酸を基質とする新しいタイプのジオキシゲナーゼであることを示した。酵母 *Mpo1* は既知のドメイン・モチーフを一切もたない膜貫通タンパク質である。*Mpo1* ホモログは細菌・真菌・植物・原虫に認められるが、*Mpo1* ファミリーメンバーの中には膜貫通領域をもたないものも多く存在し、そのような *Mpo1* ファミリーメンバーは可溶性タンパク質であることが予想される。同時に、そのような *Mpo1* ファミリーメンバーの基質は脂質 (2-OH 脂肪酸) ではなく、2 位に水酸基をもった親水性の化合物である可能性が考えられる。これまで、*Mpo1* ファミリーメンバーの中では酵母 *Mpo1* しか解析されておらず、本研究において得られた知見は酵母 *Mpo1* だけでなく *Mpo1* ファミリー全体の酵素学的性質、役割の解明の大きな手がかりとなり得ると考えられる。

また、本研究では、哺乳類 α 酸化に関わる酵素である *HACL1* が分岐鎖脂肪酸の α 酸化に、*HACL2* が 2-OH 脂肪酸の α 酸化に主要に寄与していること、*HACL2* が脳や胃を含む特定の組織において奇数鎖脂肪酸の産生に主要に関与していること、脳において *HACL2* による α 酸化が HexCER 量の維持に重要であることを明らかにした。*HACL1* および *HACL2* は機能的に重複性を有していることから (図 16-18)、*Hacl2* KO マウスでは α 酸化経路が完全には遮断されていない。今後、*Hacl1 Hacl2* DKO マウスを作製し、 α 酸化経路の奇数鎖脂肪酸産生における寄与と生理的意義を明らかにする必要がある。

5. 材料と方法

5.1 酵母株と培地

出芽酵母 (*S.cerevisiae*) 株として BY4741 (*MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*), 4378 (BY4741, *mpo1 Δ ::KanMX4*), 261 (BY4741, *pxp1 Δ ::KanMX4*) を使用した。KSKY4 (BY4741, *pxp1 Δ ::KanMX4*, *mpo1 Δ ::natNT2*) は *mpo1 Δ ::natNT2* フラグメントを用いた相同組み換えにより作製した。

酵母は YPD 培地 (1 % yeast extract, 2 % peptone および 2 % D-グルコース), Synthetic complete (SC) 培地 (0.67 % yeast nitrogen base, 2 % D-グルコース, 0.5 % カザミノ酸, 20 mg/l アデニン, 20 mg/l ウラシル, 20 mg/l トリプトファン), ウラシルを含まない SC 培地 (SC-URA) 中で 30 °C で震盪培養した。*MET25* プロモーター下の遺伝子発現は培地からメチオニンを抜くことで誘導した。この際、ウラシルおよびメチオニンを含まない SC 培地 (SC-URA-MET, 0.67 % yeast nitrogen base, 2 % D-グルコースにメチオニンを除くアミノ酸および 20 mg/l アデニンを添加) を用いた。

5.2 プラスミド

pAKNF316 は酵母において *GAPDH* プロモーターの制御下で N 末端に 3×FLAG タグを融合したタンパク質を発現させる低コピーベクター (*CEN*) である。pAKNF316 に WT の *MPO1* もしくは *MPO1* 変異体の DNA 配列をクローニングすることで、pNK46 (3×FLAG-*MPO1*), pMT12 (3×FLAG-*MPO1 Y15A*), pMT13 (3×FLAG-*MPO1 H19A*), pMT14 (3×FLAG-*MPO1 H28A*), pMT15 (3×FLAG-*MPO1 H115A*), pMT16 (3×FLAG-*MPO1 E119A*), pMT17 (3×FLAG-*MPO1 P123A*), pKSK32 (3×FLAG-*MPO1 Y15H*), pKSK33 (3×FLAG-*MPO1 H19Y*), pKSK34 (3×FLAG-*MPO1 H28Y*), pKSK35 (3×FLAG-*MPO1 H115Y*), pKSK36 (3×FLAG-*MPO1 E119D*) を作製した。pAKNF316 に *HACL1* または *HACL2* をクローニングすることでそれぞれ pTK183 (3×FLAG-*HACL1*) または pZKN14 (3×FLAG-*HACL2*) を作製した。

pUG36 は酵母において *MET25* プロモーターの制御下で N 末端に EGFP タグを融合したタンパク質を発現させる低コピーベクター (*CEN*) である。pUG36 に WT の *MPO1* もしくは *MPO1* 変異体の DNA 配列をクローニングすることで、pNK47 (*GFP-MPO1*), pKSK17 (*GFP-MPO1 Y15A*), pKSK18 (*GFP-MPO1 H19A*), pKSK19 (*GFP-MPO1 H28A*), pKSK20 (*GFP-MPO1 H115A*), pKSK21 (*GFP-MPO1 E119A*), pKSK22 (*GFP-MPO1 P123A*) を作製した。

pEU-E01-MCS (CellFree Sciences, 愛媛) は SP6 プロモーター配列下流にマルチクローニングサイトを有するベクターである。pEU-E01-MCS に 3×FLAG-*MPO1* をクローニングすることで pZKN29 を作製し, *in vitro* における 3×FLAG-*Mpo1* mRNA 合成に用いた。

pX330 は哺乳類において *chicken β -actin* プロモーター制御下において N 末端に 3×FLAG

タグを融合した Cas9 を U6 プロモーター制御下でガイド RNA を発現させるベクターである。pX330 に マウス *Hac12* を KO させるためのガイド RNA 配列 (5'-CACCGGCTTGGGAACCTCGTCCCG-3') をクローニングすることで pKSK14 を作製した。

5.3 細胞培養

チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株 CHO-K1 細胞およびその遺伝子改変細胞²⁷ は 10 % 非働化済み胎児ウシ血清 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 100 units/ml ペニシリン, 100 µg/ml ストレプトマイシン (Merck, Darmstadt, Germany) を含む Ham's F-12 培地 (Merck) で 37 °C, 0.5 % CO₂ 下において培養した。

5.4 マウス

C57BL/6 系統マウスは三共ラボサービス株式会社から購入した。*Hac12* KO マウスは pKSK14 を C57BL/6 マウスの受精卵前核にマイクロインジェクションし, C57BL/6 マウス系統マウスと交配することにより作製した。マウスは北海道大学薬学部の特設病原体フリー施設内で室温 23±1 °C, 湿度 50±5 %, 12 時間の明暗サイクル, 食餌・水が自由に摂取できる環境下において飼育した。

5.5 [³H]PHS ラベル実験

[11,12-³H]PHS は以下のように作製した。酵母 BY4741 株を 100 ml の YPD 培地で OD₆₀₀ = 0.25 となるよう希釈して 2 時間培養した後, 培地に 1 mCi [9, 10-³H]パルミチン酸 (60 Ci/mmol; American Radiolabeled Chemical, St. Louis, USA) を添加した。30 °C で 5 時間培養後, 5.3 ml のトリクロロ酢酸を加えて遠心分離 (2,000 × g, 4 °C, 3 分) して上清を除き, 5 % トリクロロ酢酸および水によって洗浄した。ペレットを 10 ml 12 N 塩酸/水/メタノール (638:705:6150, vol/vol) に懸濁して 80 °C で 21 時間インキュベートすることでスフィンゴ脂質を加水分解して長鎖塩基を遊離させた。遠心分離 (2,000 × g, 室温, 3 分) 後, 上清を回収して 8.2 ml クロロホルムおよび 6.4 ml 水を加えて激しく攪拌した。遠心分離 (9,000 × g, 室温, 1 分) 後, 有機層を回収し, 乾燥させた。乾燥させた脂質は順相 TLC にスポットしてクロロホルム/メタノール/4.2 N アンモニア (9:7:2, vol/vol) およびブタノール/酢酸/水 (3:1:1, vol/vol) で分離した。TLC 上から PHS をかきとって 400 µl, 300 µl, 200 µl のエタノールで 3 回抽出した。遠心分離 (9,100 × g, 室温, 1 分) 後, 上清を回収することでシリカゲルを除去した。放射活性は液体シンチレーションカウンター (LSC-3600, Aloka, 東京) によって測定した。

各プラスミドを導入した 4378 (*mpo1Δ*) 株を 0.016 µCi [11,12-³H]PHS もしくは 0.1 % エタノールを添加した YPD 培地中で 30 °C において 3 時間インキュベーションした。その後, 2 OD₆₀₀ 分を回収し, 1 ml エタノール/水/ジエチルエーテル/ピリジン/15 N アンモニア

(15:15:5:1:0.018, vol/vol) 中で 60 °C において 15 分インキュベートすることで脂質を抽出した。遠心分離(2,000 × g, 室温, 2 分)後, 上清を回収し, 500 µl クロロホルム/メタノール(1:2, vol/vol)を加えて乾燥させた。脂質を順相 TLC にスポットし, 展開溶媒としてクロロホルム/メタノール/4.2 N アンモニア(9:7:2, vol/vol)を用いて分離した。その後, 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 を 2-メチルナフタレン/1-ブタノール(1:3.3, vol/vol)溶液に溶解することで作製)を噴霧し, -80 °C で X 線フィルムに数日感光させた後, 現像した。

5.6 プロテオリポソームの調製

3×FLAG-Mpo1 含有プロテオリポソームおよび T1R1 含有プロテオリポソーム(コントロール)はリポソーム存在下で 3×*FLAG-MPO1* mRNA もしくは *T1R1* mRNA と, ProteoLiposome Expression kit (CellFree Sciences)を用いて翻訳し, 精製した⁷³。

リポソームは以下のように調製した。脂質溶液(200 µl クロロホルムに 2 mg PC[1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine; Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA]および 20 µg 2-OH C24:0 脂肪酸[Cayman Chemical, Ann Arbor, USA]を溶解して作製)をガラスチューブで乾燥させた。乾燥させた脂質は 80 µl SUB-AMIX SGC (CellFree Sciences)に懸濁させ, 室温で 1 時間インキュベーションした後, 激しく攪拌して 5 分間超音波処理を行った。3×*FLAG-MPO1* mRNA および *T1R1* mRNA は ProteoLiposome Expression kit (CellFree Sciences)のマニュアルに従い, SP6 RNA ポリメラーゼを用いてそれぞれ pZKN29 プラスミドもしくは pEU-E01-T1R1 プラスミドから転写した。調製した mRNA は翻訳溶液(5 µl リポソーム, 6.25 µl WEPRO7240, 1 µl 20mg/ml クレアチンキナーゼ, 3.75 µl transcription mixture, 6.15 µl 1×SUB-AMIX SGC, 3.75 µl H₂O)と混合し, 175 µl 1×SUB-AMIX SGC の入った 96-well プレートの底に静かに注入し, 15°C で 20 時間インキュベートすることでプロテオリポソームを調製した。得られたプロテオリポソームは遠心分離(20,000 × g, 4 °C, 10 分)により回収し, 1 ml の PBS で 3 回洗浄した後, 100 µl の Buffer A (50 mM HEPES/NaOH[pH 7.4], 150 mM NaCl, 10 %グリセロール)に懸濁した。

5.7 *In vitro* 脂肪酸 α 酸化アッセイ

pAKNF316 (ベクター), pNK46 (3×*FLAG-MPO1*), pMT12 (3×*FLAG-MPO1 Y15A*), pMT13 (3×*FLAG-MPO1 H19A*), pMT14 (3×*FLAG-MPO1 H28A*), pMT15 (3×*FLAG-MPO1 H115A*), pMT16 (3×*FLAG-MPO1 E119A*), pMT17 (3×*FLAG-MPO1 P123A*)を導入した 4378 酵母株 10 OD₆₀₀ 分を 250 µl の Buffer B (50 mM HEPES/NaOH[pH7.4], 150 mM NaCl, 10 %グリセロール, 1 mM ジチオスレイトール[富士フィルム和光純薬, 大阪], 1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド[富士フィルム和光純薬], 1×プロテアーゼインヒビターカクテル

[Roche Diagnostics, Indianapolis, USA]) に懸濁させた。懸濁した菌液をジルコニアビーズの入ったチューブに移し、Micro Smash MS-100 (Tomy Seiko, 東京) を用いて 4 °C で 4 分間激しく攪拌することにより破碎し、遠心分離 (2,300 × g, 4 °C, 1 分) して上清を回収した。ペレットに 250 µl の Buffer B を加えてこの操作を 2 度繰り返した。回収した上清を合わせ、さらに遠心分離 (100,000 × g, 4 °C, 30 分) した。上清を除き、ペレットを 250 µl の Buffer B に懸濁することで膜画分を調製した。

膜画分は基質である 2-OH 脂肪酸とともに、FeCl₂ の存在下において 37 °C でインキュベーションした。プロテオリポソームは 200 µM FeCl₂ の存在下において 37 °C でインキュベーションした。反応後、3.75 倍量のクロロホルム／メタノール (1:2, vol/vol) を加え、続けて 1.25 倍量のクロロホルムおよび水と混ぜ合わせることで脂質を抽出した。遠心分離 (9,000 × g, 室温, 1 分) 後、有機層を回収し、乾燥させた。反応産物の脂肪酸は AMP+ mass spectrometry kit (Cayman Chemical) を用いて *N*-(4-アミノメチルフェニル)ピリジウム (AMPP) アミドに誘導体化し、後述のように LC-MS/MS によって定量した。

定量結果から得られたプロットをもとに、下記の式に従って K_D 値を求めた。 V は反応速度を、 V_{max} は最大反応速度を、 S は基質濃度を示す。

$$\frac{1}{V} = \frac{K_D}{V_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

5.8 細胞からの脂質の抽出

2.5×10^5 個の細胞を 0.04 % DMSO もしくは 4 µM 2-OH C24:0 脂肪酸 (Cayman Chemical) を含む培地中で 72 時間インキュベートした。細胞を 300 µl 溶解液 (62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2 % ドデシル硫酸ナトリウム [SDS], 10 % グリセロール, 5 % 2-メルカプトエタノール) で溶解させ、10 秒間の超音波処理を二回行った後、150 µl を分取して 562.5 µl クロロホルム／メタノール / 12 N ギ酸 (100:200:1, vol/vol) を加えて激しく攪拌した。更に 187.5 µl のクロロホルムおよび 187.5 µl の水を加えて激しく攪拌した後、遠心分離 (9,000 × g, 室温, 1 分) して有機層を回収した。脂質は乾燥させた後、100 µl のメタノールに溶解させた。

5.9 培地からの脂肪酸の抽出・誘導体化

2.5×10^5 個の細胞を 0.4 % エタノール もしくは 4 µM フィタン酸を含む培地 2 ml 中で 24 時間インキュベートした後、培養上清を回収した。培養上清 200 µl を分取し、750 µl のクロロホルム／メタノール (1:2, vol/vol) を加えて激しく攪拌した。更に 29.4 µl の 4 N 水酸化カリウム水溶液を加えて激しく攪拌し、37 °C で 1 時間インキュベートした。117.6 µl の 1 N HCl を加えて中和した後、250 µl のクロロホルムおよび 250 µl の水を加えて激しく攪拌し、遠心分離 (9,000 × g, 室温, 1 分) により分離した有機層を回収した。回収した有機層を乾燥させた後、

AMP+ MaxSpec Kit を用いて製作者のメソッドに従って脂肪酸を AMPP アミドに誘導体化して 1 ml のアセトニトリルに溶解させた。

5.10 酵母からの脂質の抽出

3.6×10^7 個の酵母細胞を 0.1% エタノールあるいは 10 μ M 2-OH C16:0 脂肪酸 (Wako Pure Chemical Industries, 大阪) が含まれた培地 10 ml 中で 30 °C で 3 時間培養した。 1.2×10^8 個の酵母細胞を遠心分離 (2,000 $\times$ g, 室温, 3 分) によって回収し, 1 ml エタノール/水/ジエチルエーテル/15 N アンモニア (15:15:1:0.018, vol/vol) に懸濁して 60 °C で 15 分インキュベートした。この際, PC の定量のために 1 nmol C12:0/C12:0 PC (1,2-dilauryl-glycero-3-phosphocholine, Avanti Polar Lipids) を内部標準として加えた。遠心分離 (2,000 $\times$ g, 室温, 3 分) 後, 上清を回収し, 6.3 ml クロロホルム/メタノール (1:2, vol/vol) を加えて激しく攪拌した。更に 2.25 ml のクロロホルムおよび 2.25 ml の水を加えて激しく攪拌した後, 遠心分離 (9,000 $\times$ g, 室温, 1 分) を行い, 有機層を回収して乾燥させた。脂質は 50 μ l のクロロホルム/メタノール (1:2, vol/vol) に溶解させ, 順相 TLC (Merck) を用いて 1-ブタノール/酢酸/水 (3:1:1, vol/vol) で展開して分離した。PC を含む画分をかきとってクロロホルム/メタノール (1:2, vol/vol) にて抽出して乾燥させ, 100 μ l のメタノールに溶解させた。

5.11 マウス組織からの脂質の抽出・誘導体化

マウス組織中の脂質を定量するため, 2 ヶ月齢の WT のマウス (C57BL/6) および *Hac12* KO マウスから組織を摘出し (気管支, 約 2 mg; 他, 10–20 mg), 450 μ l のクロロホルム/メタノール/12 N ギ酸 (100:200:1, vol/vol) を加えた。この際, 内部標準として 100 pmol Cer/Sph Mixture II, 50 pmol *N*-パルミトイル (d₉) *D*-erythro-スフィンゴシン, 50 pmol *N*-(2'-[*R*]-ヒドロキシパルミトイル[d₉]) *D*-erythro-スフィンゴシンおよび 100 pmol d₃₁ C16:0-COOH (Avanti Polar Lipids) を加えた。Micro Smash MS-100 (Tomy Seiko, 東京) を用いてジルコニアビーズを含むチューブ中で 4 °C で 1 分間激しく攪拌することにより脂質を抽出して回収した後, ペレットに 450 μ l のクロロホルム/メタノール/12 N ギ酸 (100:200:1, vol/vol) を加えて上清を回収した。ペレットは再度 Micro Smash MS-100 を用いてジルコニアビーズを含むチューブ中で 4 °C で 1 分間激しく攪拌し, 450 μ l のクロロホルム/メタノール/12 N ギ酸 (100:200:1, vol/vol) を加えて上清を回収した。回収したサンプルは一つにまとめ, 遠心分離 (20,000 $\times$ g, 室温, 1 分) 後, 上清を回収した。270 μ l のクロロホルムおよび 486 μ l の水を加えて激しく浸透して遠心分離 (20,000 $\times$ g, 室温, 1 分) 後, 有機層を回収して乾燥させてクロロホルム/メタノール (1:2, vol/vol) に溶解させた。

CER, SM, HexCER 測定のため, 組織 1 mg 分 (気管支に関しては組織 0.1 mg 分) の脂質を分取し, 乾燥させた後, 375 μ l のクロロホルム/メタノール (1:2, vol/vol) を加えて激しく

攪拌した。更に 109.7 μ l の 442 mN 水酸化ナトリウム水溶液を加えて激しく攪拌し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。18.9 μ l の 4 N ギ酸を加えて中和した後、125 μ l のクロロホルムおよび 125 μ l の水を加えて激しく攪拌し、遠心分離 (9,000 $\times$ g, 室温, 1 分) により分離した有機層を回収した。回収した有機層を乾燥させた後、クロロホルム/メタノール (1:2, vol/vol) で脳, 脾臓, 腎臓は組織 133 μ g/ml となるように, その他の組織は組織 667 μ g/ml となるよう希釈した。

FFA の測定のため, 組織 1 mg 分 (気管支に関しては 0.1 mg 分) の脂質を分取し, 乾燥させた後, AMP+ MaxSpec Kit を用いて製作者のメソッドに従って脂肪酸を AMPP アミドに誘導体化して 1 ml のアセトニトリルに溶解させた。

5.12 LC-MS/MS による脂質の解析

脂質は逆相カラム (Acquity UPLC CSH C18 column; 粒径, 1.7 μ m; カラムサイズ, 2.1 $\times$ 100 mm [Waters, Milford, MA]) を用いて 55 $^{\circ}$ C において ultra-performance 液体クロマトグラフィーで分離し, エレクトロスプレーイオン化三連四重極質量分析計 (Xevo TQ-S; Waters) により検出した。PC はネガティブイオンモードにて検出し, 長鎖塩基, CER, SM, HexCER, AMPP アミドに誘導体化した脂肪酸はポジティブイオンモードで検出した。検出に用いた PC, 長鎖塩基, AMPP アミドに誘導体化した脂肪酸, CER, SM, HexCER の親イオンおよび娘イオンの質量電荷比は表に示した (表 1-6)。

脂質は流速 0.3 ml/min で移動相 A (アセトニトリル/水 [3:2, vol/vol] + 5 mM ギ酸アンモニウム) および移動相 B (アセトニトリル/イソプロパノール [1:9, vol/vol] + 5 mM ギ酸アンモニウム) を用いた binary gradient system によって分離した。PC, CER, SM および HexCER の分離に用いた溶出グラジエントステップは以下の通りである。0 分 40 % B; 0-18 分, 100 % B へのリニアグラジエント; 18-23 分, 100 % B; 23-23.1 分, 40 % B へのリニアグラジエント; 23.1-25 分, 40 % B。AMPP アミドに誘導体化した脂肪酸の分離に用いた溶出グラジエントステップは以下の通りである。0 分 10 % B; 0-6 分, 40 % B へのリニアグラジエント; 6-15 分, 70 % B へのリニアグラジエント; 15-18 分, 100 % B へのリニアグラジエント; 18-23 分, 100 % B; 23-23.1 分, 10 % B へのリニアグラジエント, 23.1-25 分, 10 % B。

CHO-K1 細胞中の CER および培養上清中の脂肪酸は外部標準との比を用いて定量し, 酵母細胞中の PC およびマウス組織中の脂肪酸, CER, SM, HexCER は内部標準との比を用いて定量した。

5.13 イムノブロッティング

2 OD₆₀₀ 分の酵母細胞を 100 μ l の 0.2 N NaOH, 0.5 % 2-メルカプトエタノールに懸濁し, 氷上で 15 分間インキュベートした後, サンプルを 1 ml の冷アセトンで処理し, -20 $^{\circ}$ C で 30

分間インキュベートした。遠心分離(15,000 × g, 5 分間, 4 °C)後, 得られたペレットを 100 μl の 2 × SDS サンプルバッファー(125 mM Tris/HCl[pH 6.8], 4 % SDS, 20 %グリセロール, 5 % 2-メルカプトエタノール, 微量のブROMフェノールブルー)に懸濁した。

タンパク質を SDS-PAGE で分離し, Immobilon PVDF メンブレン(Merck)に 2 mA/cm² の定電流で 1 時間転写した。得られたメンブレンをブロッキング溶液(TBS-T[20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.05 % Tween 20], 5 %スキムミルク)に浸して室温で 1 時間インキュベートした。次いで, 一次抗体を含むブロッキング溶液に浸して室温で 1 時間インキュベートした。TBS-T で 3 回洗浄した後, 二次抗体を含むブロッキング溶液に浸して室温で 1 時間インキュベートし, TBS-T で 3 回洗浄した。一次抗体としては rabbit anti-FLAG 抗体(1:2000 希釈)²⁷ および rabbit anti-Pgk1 抗体を用いた。rabbit anti-Pgk1 抗体はペプチド配列(CDANTKTVTDKEGIPAG)を KLH に結合させたものを抗原に用いて作製したものを用いた。二次抗体としては horseradish peroxidase (HRP) 結合 anti-rabbit IgG(ab')₂ fragment (7,500 倍希釈, GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK)を用いた。検出はケミルミ試薬(100 mM Tris-HCl[pH 8.5], 0.2 mM p-クマル酸, 2.5 mM ルミノール, 0.02 % 過酸化水素)に 1 分間浸し, X 線フィルムに感光させることで行った。

5.14 定量的 RT-PCR

2 OD₆₀₀ 分の酵母を 0.2 ml 100 mM Tris-HCl(pH 9.4), 40 mM 2-メルカプトエタノールに懸濁し, 室温で 10 分間静置した。遠心分離(2,300 × g, 室温, 1 分)後, 上清を除き, 細胞を 0.4 ml 50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 1.2 M ソルビトールに懸濁し, 20 μg の Zymolyase 100T(生化学工業, 東京)とともに 30 °C で 30 分間インキュベートした。遠心分離(2,300 × g, 室温, 1 分)後, 上清を除き, NucleoSpin RNA kit(タカラバイオ, 滋賀)を用いて RNA を抽出した。定量的 RT-PCR は One-Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II(タカラバイオ)を用いて CFX96 Touch real-time PCR detection system(Bio-Rad, Hercules, USA)により行った。反応は 45 °C 5 分, 95 °C 10 秒の後, 95 °C 5 秒, 60 °C 30 秒を 40 サイクル繰り返した。

5.15 透過型電子顕微鏡観察

6 ヶ月齢の WT のマウス(C57BL/6)および *Hac12* KO マウスから摘出した脳梁部分を含む脳の矢状断ブロック(3×3×1 mm)を 2 %パラホルムアルデヒド, 2 %グルタルアルデヒド, 2 %四酸化オスミウム, 2.5 %スクロースを含む 0.1 M カコジル酸バッファー(pH 7.4)中で 4 °C で 3 時間インキュベートした。固定したサンプルはエタノールで脱水し, プロピレンオキシドを浸透させて Quetol-812 resin(Nisshin EM, 東京)に埋め込んだ。サンプルはマイクローム(Ultracut UCT;Leica, Vienna, Austria)を用いて 70 nm の薄さにせん断し, 銅グリッド上に載せて 2 %酢酸ウラニルおよび Lead staining solution(Merck)により染色した。切片はデジタル

カメラ (EM-14830RUBY2; JEOL, 東京) を装着した透過型電子顕微鏡 (JEM-1400Plus; JEOL) を用いて観察した。

5.16 GFP 観察

MET25 プロモーターの制御下にある, *EGFP* と融合させた *MPO1* をコードするプラスミドをもつ酵母株を 30 °C で 3 時間, ウラシルおよびメチオニンを欠く培地中で培養することで *EGFP-Mpo1* の発現を誘導した。酵母細胞は DM5000B 蛍光顕微鏡 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて観察した。

6. 表

表 1 MS/MS 解析に用いた PC の質量電荷比

PC	親イオン (Q1)	m/z (Q1)	m/z (Q3)
C16:1_C15:0	[M + HCOO] ⁻	762.5	253.1
			241.1
C16:1_C17:1	[M + HCOO] ⁻	788.5	253.1
			267.1
C18:1_C15:0	[M + HCOO] ⁻	790.5	241.1
			281.1
C18:1_C15:1	[M + HCOO] ⁻	788.5	239.1
			281.1
C16:1_C17:0	[M + HCOO] ⁻	790.5	253.1
			269.1
C16:1_C16:1	[M + HCOO] ⁻	774.5	253.1
C16:1_C16:0	[M + HCOO] ⁻	776.5	255.1
			253.1
C16:1_C18:1	[M + HCOO] ⁻	802.5	253.1
			281.1
C16:1_C18:0	[M + HCOO] ⁻	804.5	253.1
			283.1
C16:0_C18:1	[M + HCOO] ⁻	804.5	255.1
			281.1
C18:1_C18:0	[M + HCOO] ⁻	832.5	281.1
			283.1
C18:1_C18:1	[M + HCOO] ⁻	830.5	283.1

表 2 MS/MS 解析に用いた長鎖塩基の質量電荷比

長鎖塩基	親イオン (Q1)	m/z (Q1)	m/z (Q3)
PHS	[M + H] ⁺	300.3	282.3
		318.3	
DHS	[M + H] ⁺	284.3	266.3
		302.3	

表 3 MS/MS 解析に用いた脂肪酸 AMPP アミドの質量電荷比

脂肪酸 AMPP アミド	親イオン (Q1)	m/z (Q1)	m/z (Q3)
フィタン酸	$[M + AMPP]^+$	479.4	239.3
2-OH フィタン酸	$[M + AMPP]^+$	495.4	213.1
プリスタン酸	$[M + AMPP]^+$	465.4	239.3
C15:0	$[M + AMPP]^+$	409.4	239.3
C16:0	$[M + AMPP]^+$	423.4	239.3
C17:0	$[M + AMPP]^+$	437.4	239.3
C18:0	$[M + AMPP]^+$	451.4	239.3
C19:0	$[M + AMPP]^+$	465.4	239.3
C20:0	$[M + AMPP]^+$	479.4	239.3
C21:0	$[M + AMPP]^+$	493.4	239.3
C22:0	$[M + AMPP]^+$	507.4	239.3
C23:0	$[M + AMPP]^+$	521.4	239.3
C24:0	$[M + AMPP]^+$	535.4	239.3
C25:0	$[M + AMPP]^+$	549.4	239.3
C26:0	$[M + AMPP]^+$	563.4	239.3
C23:1	$[M + AMPP]^+$	519.4	239.3
C24:1	$[M + AMPP]^+$	533.4	239.3
C24:2	$[M + AMPP]^+$	531.4	239.3
C25:1	$[M + AMPP]^+$	547.4	239.3
C26:1	$[M + AMPP]^+$	561.4	239.3
2-OH C15:0	$[M + AMPP]^+$	425.4	213.1
2-OH C16:0	$[M + AMPP]^+$	439.4	213.1
2-OH C17:0	$[M + AMPP]^+$	453.4	213.1
2-OH C18:0	$[M + AMPP]^+$	467.4	213.1
2-OH C19:0	$[M + AMPP]^+$	481.4	213.1
2-OH C20:0	$[M + AMPP]^+$	495.4	213.1
2-OH C21:0	$[M + AMPP]^+$	509.4	213.1
2-OH C22:0	$[M + AMPP]^+$	523.4	213.1
2-OH C23:0	$[M + AMPP]^+$	537.4	213.1
2-OH C24:0	$[M + AMPP]^+$	551.4	213.1
2-OH C25:0	$[M + AMPP]^+$	565.4	213.1
2-OH C26:0	$[M + AMPP]^+$	579.4	213.1
2-OH C23:1	$[M + AMPP]^+$	535.4	213.1
2-OH C24:1	$[M + AMPP]^+$	549.4	213.1
2-OH C24:2	$[M + AMPP]^+$	547.4	213.1
2-OH C25:1	$[M + AMPP]^+$	563.4	213.1

表 4 MS/MS 解析に用いた CER の質量電荷比

CER	親イオン (Q1)	m/z (Q1)	m/z (Q3)
2-OH C25:0/PHS	$[M + H - H_2O]^+$	680.3	300.2
	$[M + H]^+$	698.3	
2-OH C26:0/ PHS	$[M + H - H_2O]^+$	694.3	300.2
	$[M + H]^+$	712.3	
C15:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	506.6	264.3
C16:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	520.6	264.3
C17:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	534.6	264.3
C18:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	548.6	264.3
C19:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	562.6	264.3
C20:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	576.6	264.3
C21:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	590.6	264.3
C22:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	604.6	264.3
C23:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	618.7	264.3
C24:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	632.7	264.3
C25:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	646.7	264.3
C26:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	660.7	264.3
C23:1/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	616.7	264.3
C24:1/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	630.7	264.3
C24:2/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	628.7	264.3
C25:1/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	644.7	264.3
2-OH C15:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	522.6	264.3
2-OH C16:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	536.6	264.3
2-OH C17:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	550.6	264.3
2-OH C18:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	564.6	264.3
2-OH C19:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	578.6	264.3
2-OH C20:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	592.6	264.3
2-OH C21:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	606.6	264.3
2-OH C22:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	620.6	264.3
2-OH C23:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	634.7	264.3
2-OH C24:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	648.7	264.3
2-OH C25:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	662.7	264.3
2-OH C26:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	676.7	264.3
2-OH C23:1/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	632.7	264.3
2-OH C24:1/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	646.7	264.3
2-OH C24:2/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	644.7	264.3
2-OH C25:1/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	660.7	264.3
d ₉ C16:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	529.6	264.3
d ₉ 2-OH C16:0/SPH	$[M + H - H_2O]^+$	545.6	264.3

表 5 MS/MS 解析に用いた SM の質量電荷比

SM	親イオン (Q1)	m/z (Q1)	m/z (Q3)
C12:0/SPH	$[M + H]^+$	647.6	184.1
C15:0/SPH	$[M + H]^+$	689.7	184.1
C16:0/SPH	$[M + H]^+$	703.7	184.1
C17:0/SPH	$[M + H]^+$	717.7	184.1
C18:0/SPH	$[M + H]^+$	731.7	184.1
C19:0/SPH	$[M + H]^+$	745.7	184.1
C20:0/SPH	$[M + H]^+$	759.7	184.1
C21:0/SPH	$[M + H]^+$	773.7	184.1
C22:0/SPH	$[M + H]^+$	787.8	184.1
C23:0/SPH	$[M + H]^+$	801.8	184.1
C24:0/SPH	$[M + H]^+$	815.8	184.1
C25:0/SPH	$[M + H]^+$	829.8	184.1
C26:0/SPH	$[M + H]^+$	843.8	184.1
C23:1/SPH	$[M + H]^+$	799.8	184.1
C24:1/SPH	$[M + H]^+$	813.8	184.1
C24:2/SPH	$[M + H]^+$	811.8	184.1
C25:1/SPH	$[M + H]^+$	827.8	184.1
2-OH C15:0/SPH	$[M + H]^+$	705.7	184.1
2-OH C16:0/SPH	$[M + H]^+$	719.7	184.1
2-OH C17:0/SPH	$[M + H]^+$	733.7	184.1
2-OH C18:0/SPH	$[M + H]^+$	747.7	184.1
2-OH C19:0/SPH	$[M + H]^+$	761.7	184.1
2-OH C20:0/SPH	$[M + H]^+$	775.7	184.1
2-OH C21:0/SPH	$[M + H]^+$	789.7	184.1
2-OH C22:0/SPH	$[M + H]^+$	803.7	184.1
2-OH C23:0/SPH	$[M + H]^+$	817.8	184.1
2-OH C24:0/SPH	$[M + H]^+$	831.8	184.1
2-OH C25:0/SPH	$[M + H]^+$	845.8	184.1
2-OH C26:0/SPH	$[M + H]^+$	859.8	184.1
2-OH C23:1/SPH	$[M + H]^+$	815.8	184.1
2-OH C24:1/SPH	$[M + H]^+$	829.8	184.1
2-OH C24:2/SPH	$[M + H]^+$	827.8	184.1
2-OH C25:1/SPH	$[M + H]^+$	843.8	184.1

表 6 MS/MS 解析に用いた HexCER の質量電荷比

HexCER	親イオン (Q1)	m/z (Q1)	m/z (Q3)
C12:0/SPH	$[M + H]^+$	644.4	264.3
C15:0/SPH	$[M + H]^+$	686.5	264.3
C16:0/SPH	$[M + H]^+$	700.5	264.3
C17:0/SPH	$[M + H]^+$	714.5	264.3
C18:0/SPH	$[M + H]^+$	728.5	264.3
C19:0/SPH	$[M + H]^+$	742.6	264.3
C20:0/SPH	$[M + H]^+$	756.6	264.3
C21:0/SPH	$[M + H]^+$	770.6	264.3
C22:0/SPH	$[M + H]^+$	784.6	264.3
C23:0/SPH	$[M + H]^+$	798.6	264.3
C24:0/SPH	$[M + H]^+$	812.6	264.3
C25:0/SPH	$[M + H]^+$	826.7	264.3
C26:0/SPH	$[M + H]^+$	840.7	264.3
C23:1/SPH	$[M + H]^+$	796.7	264.3
C24:1/SPH	$[M + H]^+$	810.7	264.3
C24:2/SPH	$[M + H]^+$	808.7	264.3
C25:1/SPH	$[M + H]^+$	824.7	264.3
2-OH C15:0/SPH	$[M + H]^+$	702.5	264.3
2-OH C16:0/SPH	$[M + H]^+$	716.5	264.3
2-OH C17:0/SPH	$[M + H]^+$	730.5	264.3
2-OH C18:0/SPH	$[M + H]^+$	744.5	264.3
2-OH C19:0/SPH	$[M + H]^+$	758.6	264.3
2-OH C20:0/SPH	$[M + H]^+$	772.6	264.3
2-OH C21:0/SPH	$[M + H]^+$	786.6	264.3
2-OH C22:0/SPH	$[M + H]^+$	800.6	264.3
2-OH C23:0/SPH	$[M + H]^+$	814.6	264.3
2-OH C24:0/SPH	$[M + H]^+$	828.6	264.3
2-OH C25:0/SPH	$[M + H]^+$	842.7	264.3
2-OH C26:0/SPH	$[M + H]^+$	856.7	264.3
2-OH C23:1/SPH	$[M + H]^+$	812.7	264.3
2-OH C24:1/SPH	$[M + H]^+$	826.7	264.3
2-OH C24:2/SPH	$[M + H]^+$	824.7	264.3
2-OH C25:1/SPH	$[M + H]^+$	840.7	264.3

7. 参考文献

- 1) Hussain G., *et al.* (2019) Role of cholesterol and sphingolipids in brain development and neurological diseases. *Lipids Health Dis.*, **18**, 14610
- 2) Bryan A. M. and Del Poeta M. (2018) Sphingosine-1-phosphate receptors and innate immunity. *Cell. Microbiol.*, **20**, e12836
- 3) Kihara A. (2016) Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Prog. Lipid Res.*, **63**, 50–69
- 4) Iwamori M., *et al.* (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
- 5) Nishimura K. (1987) Phytosphingosine is a characteristic component of the glycolipids in the vertebrate intestine. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.*, **86**, 149–154
- 6) Wartewig S. and Neubert R. H. H. (2007) Properties of ceramides and their impact on the stratum corneum structure: A review: Part 1: Ceramides. in *Skin Pharmacology and Physiology*, pp. 220–229, **20**, 220–229
- 7) Blaess M. and Deigner H. P. (2019) Derailed ceramide metabolism in atopic dermatitis (AD): A causal starting point for a personalized (basic) therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 3967
- 8) Megyeri M., *et al.* (2016) Making sense of the yeast sphingolipid pathway. *J. Mol. Biol.*, **428**, 4765–4775
- 9) Pruett S. T., *et al.* (2008) Biodiversity of sphingoid bases (“sphingosines”) and related amino alcohols. *J. Lipid Res.*, **49**, 1621–1639
- 10) Kihara A. (2012) Very long-chain fatty acids: Elongation, physiology and related disorders. *J. Biochem.*, **152**, 387–395
- 11) Tanno H., *et al.* (2021) Production of branched-chain very-long-chain fatty acids by fatty acid elongases and their tissue distribution in mammals. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, **1866**, 158842
- 12) Svennerholm L. and Stållberg-Stenhagen S. (1968) Changes in the fatty acid composition of cerebroside and sulfatide of human nervous tissue with age. *J. Lipid Res.*, **9**, 215–225
- 13) Hama H. (2010) Fatty acid 2-Hydroxylation in mammalian sphingolipid biology. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, **1801**, 405–414
- 14) Ring M. W., *et al.* (2009) Biosynthesis of 2-hydroxy and iso-even fatty acids is connected to sphingolipid formation in myxobacteria. *ChemBioChem.*, **10**, 2003–2010

- 15) Tanji M., *et al.* (2004) Content and chemical compositions of cerebrosides in lactose-assimilating yeasts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 2205–2208
- 16) Maurino V. G., and Engqvist M. K. M. (2015) 2-Hydroxy acids in plant metabolism. *Arab. B.*, **13**, e0182
- 17) Nilsson O. and Svennerholm L. (1982) Characterization and quantitative determination of gangliosides and neutral glycosphingolipids in human liver. *J. Lipid Res.*, **23**, 327–334
- 18) Mårtensson E. (1966) Neutral glycolipids of human kidney isolation, identification, and fatty acid composition. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.*, **116**, 296–308
- 19) Zöller I., *et al.* (2008) Absence of 2-hydroxylated sphingolipids is compatible with normal neural development but causes late-onset axon and myelin sheath degeneration. *J. Neurosci.*, **28**, 9741–9754
- 20) Dick K. J., *et al.* (2010) Mutation of FA2H underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35). *Hum. Mutat.*, **31**, :E1251-60
- 21) Potter K. A., *et al.* (2011) Central nervous system dysfunction in a mouse model of Fa2H deficiency. *Glia.*, **59**, 1009–1021
- 22) Haak D., *et al.* (1997) Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* ceramides requires Sur2p and Scs7p. *J. Biol. Chem.*, **272**, 29704–29710
- 23) Dickson R. C. (2008) New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast. in *Journal of Lipid Research*, pp. 909–921, **49**, 909–921
- 24) Ejlsing C. S., *et al.* (2009) Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 2136–2141
- 25) Eckhardt M. (2023) Fatty acid 2-hydroxylase and 2-hydroxylated sphingolipids: Metabolism and function in health and diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 4908
- 26) Rattay T. W., *et al.* (2019) FAHN/SPG35: A narrow phenotypic spectrum across disease classifications. *Brain.*, **142**, 1561–1572
- 27) Kitamura T., *et al.* (2017) Phytosphingosine degradation pathway includes fatty acid α -oxidation reactions in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **114**, E2616–E2623
- 28) Kondo N., *et al.* (2014) Identification of the phytosphingosine metabolic pathway leading to odd-numbered fatty acids. *Nat. Commun.*, **5**, 5338
- 29) Olivera A., *et al.* (1998) Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 12576–12583

- 30) Kihara A., *et al.* (2006) Mouse sphingosine kinase isoforms SPHK1a and SPHK1b differ in enzymatic traits including stability, localization, modification, and oligomerization. *J. Biol. Chem.*, **281**, 4532–4539
- 31) Kariya Y., *et al.* (2005) Products by the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P) lyase pathway but not S1P stimulate mitogenesis. *Genes to Cells.*, **10**, 605–615
- 32) Kihara A., *et al.* (2007) Metabolism and biological functions of two phosphorylated sphingolipids, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate. *Prog. Lipid Res.*, **46**, 126–144
- 33) Foulon V., *et al.* (2005) Breakdown of 2-hydroxylated straight chain fatty acids via peroxisomal 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase: A revised pathway for the α -oxidation of straight chain fatty acids. *J. Biol. Chem.*, **280**, 9802–9812
- 34) Jansen G. A. and Wanders R. J. A. (2006) Alpha-oxidation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, **1763**, 1403–1412
- 35) Casteels M., *et al.* (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. in *Biochemical Society Transactions*, pp. 876–880, **35**, 876–880
- 36) Poulos A., *et al.* (1993) Formic acid is a product of the α -oxidation of fatty acids by human skin fibroblasts: Deficiency of formic acid production in peroxisome-deficient fibroblasts. *Biochem. J.*, **292**, 457–461
- 37) Tove S. B. (1959) Production of odd-numbered carbon fatty acids from propionate by mice. *Nature*, **184**, 1647–1648
- 38) Foulon V., *et al.* (1999) Purification, molecular cloning, and expression of 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase, a peroxisomal thiamine pyrophosphate-dependent enzyme that catalyzes the carbon-carbon bond cleavage during α -oxidation of 3-methyl-branched fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 10039–10044
- 39) Hellgren L. I. (2010) Phytanic acid - An overlooked bioactive fatty acid in dairy fat? *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1190**, 42–49
- 40) Wanders R. J. A., *et al.* (2011) Phytanic acid metabolism in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, **1811**, 498–507
- 41) Roca-Saavedra P., *et al.* (2017) Phytanic acid consumption and human health, risks, benefits and future trends: A review. *Food Chem.*, **221**, 237–247
- 42) Jansen G. A., *et al.* (2004) Molecular basis of refsum disease: Sequence variations in phytanoyl-CoA hydroxylase (PHYH) and the PTS2 receptor (PEX7). *Hum. Mutat.*, **23**,

- 43) Seki N., *et al.* (2019) Yeast Mpo1 is a novel dioxygenase that catalyzes the α -oxidation of a 2-hydroxy fatty acid in an Fe^{2+} -dependent manner. *Mol. Cell. Biol.*, **39**, e00428-18
- 44) Mezzar S., *et al.* (2017) Phytol-induced pathology in 2-hydroxyacyl-CoA lyase (HACL1) deficient mice. Evidence for a second non-HACL1-related lyase. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, **1862**, 972–990
- 45) Miranda F. F., *et al.* (2005) The active site residue tyrosine 325 influences iron binding and coupling efficiency in human phenylalanine hydroxylase. *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 1320–1328
- 46) Shanklin J., *et al.* (1994) Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry*, **33**, 12787–12794
- 47) Zhu G., *et al.* (2015) The crystal structure of an integral membrane fatty acid α -hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, **290**, 29820–29833
- 48) VOELTER W., *et al.* (1975) The initial binding of Cu(II) to some amino acids and dipeptides: A ^{13}C nuclear-magnetic-resonance study. *Eur. J. Biochem.*, **58**, 159–166
- 49) Dickson R. C., *et al.* (1997) Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 30196–30200
- 50) Kihara A., *et al.* (2008) Membrane topology and essential amino acid residues of Phs1, a 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase involved in very long-chain fatty acid elongation. *J. Biol. Chem.*, **283**, 11199–11209
- 51) Sheriff S., *et al.* (1987) Structure of myohemerythrin in the azidomet state at 1.7/1.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **197**, 273–296
- 52) Fox B. G., *et al.* (1994) Resonance raman evidence for an Fe–O–Fe center in stearoyl-ACP desaturase. Primary sequence identity with other diiron-oxo proteins. *Biochemistry*, **33**, 12776–12786
- 53) Hider R. C. and Kong X. (2013) Iron speciation in the cytosol: An overview. *Dalt. Trans.*, **42**, 3220–3229
- 54) Yamahara R., *et al.* (2002) (Catecholato)iron(III) complexes: Structural and functional models for the catechol-bound iron(III) form of catechol dioxygenases. *J. Inorg. Biochem.*, **88**, 284–294
- 55) Siddiq A., *et al.* (2007) Hypoxia inducible factor prolyl 4-hydroxylase enzymes: Center stage in the battle against hypoxia, metabolic compromise and oxidative stress. *Neurochem. Res.*, **32**, 931–946

- 56) Nebert D. W., *et al.* (2013) Human cytochromes P450 in health and disease. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **368**, 20120431
- 57) Truffa Bachì P. and Cohen G. N. (1973) *Amino acid metabolism*, Roberts and Company Publishers, 10.1146/annurev.bi.42.070173.000553
- 58) Piña F., *et al.* (2018) Sphingolipids activate the endoplasmic reticulum stress surveillance pathway. *J. Cell Biol.*, **217**, 495–505
- 59) Imgrund S., *et al.* (2009) Adult ceramide synthase 2 (CERS2)-deficient mice exhibit myelin sheath defects, cerebellar degeneration, and hepatocarcinomas. *J. Biol. Chem.*, **284**, 33549–33560
- 60) Jumper J., *et al.* (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, **596**, 583–589
- 61) Tunyasuvunakool K., *et al.*, (2021) Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature*, **596**, 590–596
- 62) Micoogullari Y., *et al.* (2020) Dysregulation of very-long-chain fatty acid metabolism causes membrane saturation and induction of the unfolded protein response. *Mol. Biol. Cell*, **31**, 7–17
- 63) Steinberg S. J., *et al.* (1999) Human very-long-chain acyl-CoA synthetase: Cloning, topography, and relevance to branched-chain fatty acid metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **257**, 615–621
- 64) Ashibe B., *et al.* (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
- 65) Jansen G. A., *et al.* (1999) Phytanoyl-CoA hydroxylase from rat liver: Protein purification and cDNA cloning with implications for the subcellular localization of phytanic acid α -oxidation. *J. Lipid Res.*, **40**, 2244–2254
- 66) Singh H., *et al.* (1990) A comparative study of straight chain and branched chain fatty acid oxidation in skin fibroblasts from patients with peroxisomal disorders. *J. Lipid Res.*, **31**, 217–225
- 67) Verhoeven N. M., *et al.* (1998) Phytanic acid and pristanic acid are oxidized by sequential peroxisomal and mitochondrial reactions in cultured fibroblasts. *J. Lipid Res.*, **39**, 66–74
- 68) Wanders R. J. A., *et al.* (2020) Fatty acid oxidation in peroxisomes: Enzymology, metabolic crosstalk with other organelles and peroxisomal disorders. in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 55–70, **1299**, 55–70

- 69) Schönfeld P., *et al.* (2006) A study of the cytotoxicity of branched-chain phytanic acid with mitochondria and rat brain astrocytes. *Exp. Gerontol.*, **41**, 688–696
- 70) Jenkins B. J., *et al.* (2017) Odd chain fatty acids; New insights of the relationship between the gut microbiota, dietary intake, Biosynthesis and Glucose Intolerance. *Sci. Rep.*, **7**, 44845
- 71) De Oliveira Otto M. C., *et al.* (2018) Genome-wide association meta-analysis of circulating odd-numbered chain saturated fatty acids: Results from the CHARGE Consortium. *PLoS One*, **13**, e0196951
- 72) Xu Y. C., *et al.* (2020) Sjogren-Larsson syndrome associated hypermelanosis. *J. Cosmet. Dermatol.*, **19**, 789–798
- 73) Ohno Y., *et al.* (2017) PNPLA1 is a transacylase essential for the generation of the skin barrier lipid ω -O-acylceramide. *Nat. Commun.*, **8**, 14610

8. 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。木原章雄教授には論理的思考法、プレゼンテーション技術、文章執筆技術等、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。

本研究の遂行にあたり、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 永沼達郎助教に深く御礼申し上げます。永沼達郎助教には本論文の執筆において並々ならぬ御指導・御助力を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 大野祐介助教に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、友人に心より感謝いたします。