

スフィンゴ脂質の代謝制御機構の解明と 先天性代謝異常症への応用

1. 研究の目的

スフィンゴ脂質は、スフィンゴイド長鎖塩基、脂肪酸、および極性頭部から構成される。スフィンゴ脂質は、極性頭部にリン酸が結合したスフィンゴミエリン (SM)、糖鎖が結合したスフィンゴ糖脂質 (GSL)、そして、水素が結合したセラミドに大きく分類されるが、脂肪酸と極性頭部の糖鎖構造に多くのバリエーションが有るために、生体には極めて多様なスフィンゴ脂質分子種が存在する。しかし、スフィンゴ脂質各分子種の生物学的機能については不明な点が多い。この原因として、(i) スフィンゴ脂質はゲノムに直接コードされておらず、かつ複雑な代謝系を有する故、特定のスフィンゴ脂質分子種を生体内で増減させてその影響を解析することが難しいこと、(ii) 特に GSL は糖鎖構造が複雑であるために各分子種を網羅的に測定する簡便な測定方法が存在しないことが挙げられる。本研究では、(i) の問題点に対して、ゲノム編集技術を用いてスフィンゴ脂質代謝を担う分子機構を明らかにし、(ii) の問題点に対して、高速液体クロマトグラフィー質量分析系 (LC-MS) を用いた GSL の網羅的分析方法を確立することにより、スフィンゴ脂質の新しい生物学的機能を解明する。

① 極長鎖脂肪酸を含有するスフィンゴ脂質の細胞生物学的意義の解明：脂肪酸の中でも炭素数24以上の長鎖脂肪酸は特に、極長鎖脂肪酸と呼ばれる。先天代謝異常症の一つである副腎白質ジストロフィー (X-ALD) 患者では、極長鎖脂肪酸の代謝に必須である ATP-Binding Cassette sub-family D1 (ABCD1) の機能が異常である為に、極長鎖脂肪酸が蓄積する。しかし、極長鎖脂肪酸の代謝異常と、X-ALD の主要な臨床所見である中枢神経系の脱髄や、副腎機能不全との因果関係は未だ不明である。申請者は、X-ALD患者由来の組織では、極長鎖脂肪酸の一定量がスフィンゴ脂質の脂肪酸として組み込まれる点に注目し、極長鎖脂肪酸を含有するスフィンゴ脂質が過剰に蓄積することによって、細胞機能にどのような影響を及ぼすか明らかにする。

② X-ALD 患者の早期発見を目的とする新生児マススクリーニング技術の開発：X-ALD の発症頻度は約2万人に1人であり、現時点では早期の造血幹細胞移植が唯一の治療法である。従ってX-ALDの早期診断が極めて重要であるが、現行の診断基準である血中あるいは皮膚由来の線維芽細胞中の極長鎖脂肪酸値を測定する方法は煩雑であるため、新生児マススクリーニングへの適用は困難である。血中において SM は含有量の多いスフィンゴ脂質の一つであり、かつイオン化が容易なホスホリルコリンを有している為に、LC-MS による高感度分析が期待できる。そこで申請者は、自身が開発したスフィンゴ脂質分析系 (*Lipids* (2017)) を応用し、新生児マススクリーニングに適用可能な、極長鎖脂肪酸を含有する SM 分子種の簡便な測定系を開発する

③ GSL の網羅的分析方法の確立：申請者は現在までに LC-MS を用いて各種スフィンゴ脂質分子種の網羅的分析方法を開発した (*Lipids* (2017))。本研究では GSL の網羅的分析方法を確立することで、スフィンゴ脂質全体の網羅的定量解析系を完成させる。非常に多様な糖鎖構造を有する GSL は抗原として免疫機能に重要である一方、X-ALD の臨床所見については異常な免疫反応の関与が指摘されている。従って本課題は、X-ALD の病態発症と GSL 代謝異常の関連性を検証する為の基盤技術として重要である。

④ SM と GSL の産生振り分け機構の解明：SM と GSL の産生は、共通の基質であるセラミドに、ホスホリルコリンが結合するか、あるいはグルコースを起点とする糖鎖構造が結合するかによって振り分けられる。哺乳類では一般的に、GSLに比べてSMの存在量が多いこと、また、SMとGSLは細胞内の局在部位が異なることから、SMとGSLの両脂質をどの程度の割合で産生するかは、生体の恒常性維持に重要と思われる。申請者はSM と GSL の産生振り分けを担う二つの酵素 (SM合成酵素とセラミドグルコシルトランスフェラーゼ) に注目し、詳細な産生制御機構を解明する。

2. 研究の計画

本研究では以下4つの計画に従って行われた。

① 極長鎖脂肪酸あるいは極長鎖脂肪酸を含有するスフィンゴ脂質の産生への関与が示唆

- された各遺伝子とABCD1に関する多重ノックアウト細胞を用いて、極長鎖脂肪酸を含有するスフィンゴ脂質が脂質代謝系に及ぼす影響を、メタボローム解析により検証する。
- ② 当初予定したインフュージョン法 (1分/サンプルを想定) に比べ、新たに導入したPEEKカラムを用いる方法は測定時間を要する (20分/サンプル)。予備的検討では移動相条件を変更することで、十分な測定感度を保持しつつ、4分/サンプルまで測定時間を短縮できることを確認しており、今後、新生児マススクリーニングに適用可能な条件を詳細に確定する。次に、当初の予定に従い、正常人とX-ALD患者の濾紙血を複数用いて、疑陽性と偽陰性の発生頻度を調べ、カットオフ値を設定する。
 - ③ X-ALD や GSL 蓄積症であるライソゾーム病患者の、血漿及び皮膚線維芽細胞中の各種GSL 分子種を解析し、病態特異的 GSL 分子種を選定する。
 - ④ SMS の近傍に存在する候補分子として見出された、10種類の基質が未解明の輸送担体について欠損細胞を作製し、これらの細胞中の SM, GSL およびセラミドの各分子種をLC-MS を用いて分析する。これによって SMS の調節機構を解明し、ヒト培養細胞における SM と GSL の産生振り分け機構を解明する。

3. 研究の成果

- ① 極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の細胞生物学的意義の解明： Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) 作動薬であるBezafibrateによって極長鎖脂肪酸を含有するリン脂質を有意に増加させること、および、アシルCoA合成酵素の発現を顕著に上昇させることを見出した。ABCD1とアシルCoA合成酵素の二重欠損細胞を作出し、極長鎖脂肪酸量および極長鎖脂肪酸を含有するスフィンゴ脂質量が減少するか検証したところ、スフィンゴ脂質量には殆ど変化が生じないことが明らかになった。また、極長鎖脂肪酸CoAを有機合成することに成功し、これを用いて酵素学的解析をすることが可能になった。
- ② X-ALD 患者の早期発見を目的とする新生児マススクリーニング技術の開発： 96 well plate を用いて濾紙血から脂質を抽出する方法を検討した。
- ③ GSLの網羅的分析方法の確立： X-ALD患者由来の皮膚線維芽細胞におけるスフィンゴ脂質(GSLおよびスフィンゴミエリン)の分子種解析を行った結果、極長鎖脂肪酸を有するスフィンゴ脂質が蓄積していることが分かった。
- ④ SMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分け機構の解明：細胞内で効率良く SM を産生するためには、SM 合成の鍵タンパク質である SMS (SMS1, SMS2 の2つのアイソフォームからなる) の近傍にセラミドフロッパーゼが局在すること重要であると考えた。この仮説に基づいて、近位依存性ビオチン標識法でセラミドフロッパーゼの同定を目指した。近位依存性ビオチン標識法で同定したタンパク質の中から、フロッパーゼ活性領域を持つタンパク質を選択した。さらに、ドッキングソフト (AutoDock Vina) を用いてセラミドとのドッキングモデルを構築し、セラミドと結合する可能性の有無を調べ、セラミドフロッパーゼの候補タンパク質を絞り込んだ。

4. 研究の反省・考察

- ① 極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の細胞生物学的意義の解明：当初は、Bezafibrateによって発現が増加するアシルCoA合成酵素とABCD1の二重欠損細胞では、ABCD1単独欠損細胞に比べて、極長鎖脂肪酸CoA体が減少し、極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質も減少することを予想した。しかし、アシルCoA合成酵素とABCD1の二重欠損細胞では、極長鎖脂肪酸CoAと極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質ともに、ABCD1単独欠損細胞に比べて有意な変化が見られなかった。このことは、スフィンゴ脂質代謝系では極長鎖脂肪酸の代謝量はある程度一定であり、過剰な極長鎖脂肪酸の代謝は別の脂質代謝系を中心に行われると考えられた。
- ② X-ALD 患者の早期発見を目的とする新生児マススクリーニング技術の開発：今後、更に他検体を処理するためには、ロボットアームによる自動処理などの工程が必要になる。なお、本研究課題申請時以降、各国で行われているリゾホスファチジルコリンを

指標とするマススクリーニングに関する報告が発表されており、その有効性が示されている。したがって、本研究で提案しているスフィンゴミエリンを指標とする系の優位性を検証する必要がある。

- ③ GSL の網羅的分析方法の確立：病態特異的なGSL分子種を同定するために、これまでに測定したX-ALD患者由来皮膚線維芽細胞に加え、ライゾゾーム病患者の血漿および皮膚線維芽細胞の分子種解析を行う。その際には多量のリン脂質を除去するための酵素処理などを検討する。また、イオン化効率を考慮した、より正確な定量解析を行うために、内部標準として用いる各脂質の安定同位体の合成を検討する。
- ④ SMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分け機構の解明：CRISPR/Cas9ゲノム編集システムを用いて、候補遺伝子のノックアウト細胞を樹立した。LC-MS/MSを用いて、SM、GSL量を測定したが、コントロール細胞と比較して顕著な違いは見られなかった。今後は、候補遺伝子のアイソフォーム遺伝子まで幅を広げて、セラミドフロッパーゼの同定に取り組み必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等 (*corresponding author)

- ① Hama K*, Fujiwara Y, Hayama T, Ozawa T, Nozawa K, Matsuda K, Hashiguchi Y, and Yokoyama K. Very long-chain fatty acids are accumulated in triacylglycerol and nonesterified forms in colorectal cancer tissues. *Sci. Rep.* 11: 6163, **2021**
- ② Kawaguchi K, Mukai E, Watanabe S, Yamashita A, Morita M, So T, Imanaka T. Acyl-CoA thioesterase activity of peroxisomal ABC protein ABCD1 is required for the transport of very long-chain acyl-CoA into peroxisomes. *Sci. Rep.* 11: 2192, **2021**
- ③ Okino N, Li M, Qu Q, Nakagawa T, Hayashi Y, Matsumoto M, Ishibashi Y, and Ito M. Two bacterial glycosphingolipid synthases responsible for the synthesis of glucuronosylceramide and α -galactosylceramide. *J. Biol. Chem.* 295: 10709–10725, **2020**
- ④ Yamashita A*. Fatty acid remodeling of glycerophospholipids and formation of arachidonic acid-containing bioactive lipid mediators. *ADC Letter for Infectious Disease Control* 7:60–65, **2020**

(2) 口頭発表

- ① 濱弘太郎、藤原優子、横山和明「リピドミクスに基づくALDの脂質代謝異常の解析」第93回日本生化学会大会、オンライン開催、2020年9月
- ② 濱弘太郎 「ホルマリン固定したX-ALD患者脳剖検の脂質解析および血漿中リン脂質産生機構の探索」ペルオキシソーム病研究会、オンライン開催、2020年12月
- ③ 藤原優子、濱弘太郎、横山和明「キラルカラムを用いたスフィンゴ糖脂質のLC-MS一斉分析系によるマウス脳におけるセラミド部分の分子種別の定量解析」第62回 日本脂質生化学会、紙上開催、2020年
- ④ 藤原優子 「ALD患者剖検脳、ALD患者線維芽細胞、およびABCD1-KO マウス脳 におけるスフィンゴ糖脂質解析」ペルオキシソーム病研究会、オンライン開催、2020年12月
- ⑤ 林康広、土屋亮人、山本瑞生、佐々木洋子、谷川和也、濱弘太郎、井上純一郎、山下純 「脂質代謝酵素を標的とした新型コロナウイルス感染を抑制する薬剤の探索」第141回日本薬学会、オンライン開催、2021年3月

(3) 出版物

- ① 山下純、ビタミン・バイオフィクター総合事典 (担当:分担執筆、 範囲: イノシトール含有リン脂質) 朝倉書店 2021