

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 24日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580099

研究課題名（和文）：細胞膜リン脂質に見られる脂肪酸種の不均衡分布機構の解明

研究課題名（英文）：Studies on imbalance localization of phospholipids in the cellular membrane

研究代表者：玉置 尚徳 (TAMAKI HISANORI)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：20212045

研究成果の概要（和文）：本研究においては、細胞膜リン脂質に含まれる二重結合の不均衡な分布と我々が見出したアシル転移酵素との接点を解明した。酵母において見出した2種類のアシル転移酵素 Lpt1 と Slc1 の高発現株より酵素を精製あるいは部分精製し基質特異性を調べた。また、それぞれの遺伝子破壊株をより抽出した脂質を LC-MS/MS を用いて解析した。その結果、両酵素は極性基の選択性は異なるもののリゾリン脂質に優先的に2重結合を導入することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we clarify the relation between imbalance localization of double-bond in the phospholipids and newly found lyso-phospholipid acyltransferases. Two acyltransferases Lpt1 and Slc1 were purified (or partially purified) and substrate specificities were examined. Also total lipids were extracted from lpt1 or slc1 gene disrupted strain and subjected to LC-MS/MS analysis. From these experiments, Two enzymes mainly catalyze introduction of acyl-residue containing double-bond, although substrate preference were different.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物

キーワード：アシル転移酵素、脂質の不均衡分布、酵母、細胞膜リン脂質

1. 研究開始当初の背景

細胞膜は半透性の脂質2重層からなり、これによって細胞質と外環境を隔てている。細胞

膜の主な構成成分であるリン脂質には著しい構成脂肪酸の偏りが知られている。グリセロリン脂質では、一般にグリセロール骨格1位(*sn-1*位)には飽和脂肪酸が多く、*sn-2*位に

は不飽和脂肪酸が多い。また、グリセロリン脂質の *sn-3* 位にある極性基 (コリン、エタノールアミン、イノシトール、セリンなど) の種類によって *sn-2* 位の脂肪酸組成は著しく異なる。このような脂肪酸種の不均衡な分布は、リン脂質の *de novo* 合成経路では説明できないことから、脂質のリモデリングによって形成されると考えられている。脂質のリモデリングとは、*de novo* 合成系によって生成されたグリセロリン脂質が、*sn-2* 位の脂肪酸の切断を受けリゾリン脂質となった後、新たな脂肪酸の導入を受けるというシステムである。前者を触媒するのがホスホリパーゼなどのエステル分解酵素であり、後者を触媒するのがアシル転移酵素と考えられている。しかしながら、これらの酵素とリモデリングの関連はほとんど解明されておらず、特にリゾリン脂質を受容体基質とするアシル転移酵素に関しては全く同定されていなかった。

研究代表者は、もともと血小板活性化因子 (PAF) 合成酵素の同定をめざして研究を進めてきた。PAF は、ホスファチジルコリン (PC) の構造類似体であるが、*sn-2* 位にアセチル基を持つ点が異なっている。PAF 合成酵素は、*sn-2* 位にアセチル基を転移する酵素である。研究代表者らは、出芽酵母全遺伝子のうち致死でない約 5,000 の遺伝子を 1 つずつ破壊した遺伝子破壊株のセットについて PAF 合成酵素活性を測定し、1 株だけ活性を持たない株を見出し LPT1 と命名した。LPT1 は、membrane bound Oacyltransferase (MBOAT) スーパーファミリーのモチーフを持ち、酵母からヒトにいたるまでホモログが見出されたが、これまでに研究されていない新規な酵素であることが分かった。LPT1 の基質特異性解析を行ったところ、本酵素はアセチル転移反応の他に様々な鎖長のアシル基をリゾリン脂質に転移する活性を持つことが明らかとなり特に長鎖で不飽和結合を含むものに対して高い特異性を示すことが明らかとなった。これまでに酵母においてアシル転移酵素としては、リゾホスファチジン酸 (LPA) アシル転移酵素として SLC1 が同定

されていた。酵母において LPT1 と SLC1 の 2 重遺伝子欠損株を作成したところ、致死性を示したことから、LPT1 は、SLC1 と共に PA 合成の中心的役割を担っていることが示された。これらの研究成果は、論文に発表済みである (J. Biol. Chem. 282, 34288-34298 (2007))。酵母の LPT1 に関しては、申請者らの論文発表とほぼ同時に、アメリカ、カナダ、スイスの研究グループより同一遺伝子に関する論文が相次いで発表され、世界的な関心の高さとともに競争の激化が予想された。

2. 研究の目的

本申請研究は、生物の細胞膜に広く認められる細胞膜構成リン脂質の不均衡分布が生じる機構とその意味について、研究代表者らが見出した新規なリゾリン脂質アシル転移酵素 LPT1 の生化学的、細胞生物学的解析を通して明らかにしようとするものである。具体的には、まず (1) 酵母について LPT1 の遺伝子欠損株、高発現株について、細胞膜リン脂質の定性的かつ定量的解析を液体クロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (LC/MS-MS) により行う。(2) 酵母においてアシル転移酵素と共に脂質リモデリングに関与するホスホリパーゼの同定を行い、その遺伝子欠損株・高発現株をアシル転移酵素 LPT1 の遺伝子欠損や高発現と組み合わせた株の構築を行い、人為的に脂質リモデリングの平衡を偏らせた場合の細胞膜構成リン脂質の変動への影響を調べる。(3) 脂質リモデリングに関与する酵素の遺伝子欠損株ならびに高発現株について詳細な表現型の解析を行い、細胞膜構成リン脂質の変化との関連を調べる。

3. 研究の方法

本研究は、生物に普遍的に認められる細胞膜構成リン脂質の不均衡分布が生じる機構の解明と不均衡分布の生物学的な意義の解明を目的としており、研究代表者と大学院生 2

名ならびに連携研究者の有機的な連携により行われた。研究代表者は、単細胞モデル生物である酵母について新規リゾリン脂質アシル転移酵素と細胞膜構成リン脂質の不均衡分布の関連を調べるとともに研究全般を総括した。連携研究者、宮下（京都大学・農学研究科）は、酵母のリゾリン脂質アシル転移酵素欠損ならびに高発現株などにおける細胞膜構成リン脂質の LC-MS、LC-MS/MS による解析を担当した。

アシル転移酵素 LPT1 と細胞膜リン脂質の不均衡分布の関連解明（研究代表者と大学院生 2 名および連携研究者にて行う）

研究代表者が、PAF 合成酵素として同定した LPT1 は、アセチル基以外にも長鎖アシル基を様々なリゾリン脂質に転移すること、さらに不飽和脂肪酸を好んで転移することが明らかとなっていた (Tamaki et. al, J. Biol. Chem. 282, 34288(2007)。そこで、本酵素の基質特異性と、細胞膜構成リン脂質における脂肪酸種の不均衡分布 (*sn*-2 位における不飽和脂肪酸過多) との関連を調べた。具体的には、酵母 LPT1 遺伝子破壊株および LPT1 高発現株を構築し、それぞれの培養菌体より Bligh & Dyer 法 (Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911, 1959) により脂質の抽出を行い、順相シリカカラムによる LC-MS ならびに LC-MS/MS による分析を行い、細胞膜構成リン脂質の構成脂肪酸の違いを調べた。LC-MS および LC-MS/MS は、京都大学農学研究科に既設の装置を用いる。脂質の解析には抽出後に効率よく脂質を濃縮するため、真空制御ユニットを備えたロータリーエバポレーターを用いた。

リン脂質リモデリング酵素の発現制御と細胞膜リン脂質の不均衡分布の関連解明（研究代表者と大学院生 2 名および連携研究者にて行う）

細胞膜リン脂質の不均衡分布は、ホスホリパーゼとアシル転移酵素の共役したリン脂

質のリモデリングによって生じると考えられている。そこで、両酵素が実際どのように共役することで細胞膜リン脂質の不均衡分布が生じるかを調べた。具体的には、アシル転移酵素のカウンターパートであるホスホリパーゼについて酵母における酵素及びその遺伝子の同定を行った。申請者が酵母ゲノムデータベース上に見出した複数のホスホリパーゼホモログ遺伝子をクローニングし、高発現株の構築を行うと共に遺伝子破壊株の構築も合わせて進めた。得られた高発現株、遺伝子破壊株についてホスホリパーゼ活性の測定ならびに脂質の LC/MS 解析を行うことでホスホリパーゼ遺伝子の同定を行った。また、得られたホスホリパーゼの欠損株・高発現株について、アシル転移酵素の欠損・高発現と組み合わせることにより人為的にリン脂質リモデリングの活性を偏らせた「細胞膜構成リン脂質リモデリング改変酵母」の構築を行い、細胞膜リン脂質の LC/MS 解析を行うことでリモデリング酵素と細胞膜リン脂質の不均衡分布の関係を明らかにすることを目的とした。

アシル転移酵素 Lpt1 の膜トポロジー解析

Lpt1 に蛍光タンパク質である GFP を融合させ蛍光顕微鏡で観察すると Lpt1-GFP に起因する蛍光は小胞体膜に観察されることから Lpt1-GFP は小胞体膜に局在する膜タンパク質であることが分かっていた。そこで、Lpt1 のハイドロパシープロット解析を行い膜貫通領域の推定を行った。その結果を基に Lpt1 の親水性領域に酵母のインベルターゼである Suc2 の糖鎖付加配列を導入したキメラ酵素 13 種類を構築した。このキメラ酵素を用いて Lpt1 が小胞体膜でどのような配位をしているかを解析した。すなわち、Suc2 の糖鎖付加配列が小胞体内腔に配位すると糖鎖が付加されるが、細胞質側に配位すると糖鎖付加が起こらないことを利用して解析する方法である。糖鎖の付加は、Lpt1 を糖鎖切断酵素である Endo-H で処理することで判別した。キメラ酵素を Endo-H 処理したものとしな

ものを SDS-PAGE の後、タグとして付加している HA エピトープに対する抗体を用いたウェスタンブロット解析によりサイズの変化を調べ、糖鎖付加の有無を判断した。

4. 研究成果

研究計画に基づいて酵母アシル転移酵素 LPT1 と細胞膜リン脂質の不均衡分布の関連を解析した。酵母にはアシル転移酵素として LPT1 の他に SLC1 が知られており、2 つの酵素はホスファチジン酸合成において協調して働いていると考えられたことから、新たに分裂酵母において LPT1, SLC1 それぞれの遺伝子破壊株、高発現株の構築を行った。SLC1 遺伝子破壊株に LPT1 高発現プラスミドを形質転換した株より調製したミクロソーム画分を用いて酵素活性をしらべたところ、不飽和結合をもつアシル基に高い特異性を示し、リゾリン脂質ではリゾホスファチジルコリン (LPC)、リゾホスファチジルグリセロール (LPG)、リゾホスファチジルエタノールアミン (LPE)、リゾホスファチジルイノシトール (LPI)、リゾホスファチジルセリン (LPS) に対して高い活性を示すとともに弱いながらもリゾホスファチジン酸 (LPA) も基質として利用することが示された。

さらに、LPT1 遺伝子破壊株に SLC1 高発現プラスミドを導入した株を構築し酵素の基質特異性をしらべたところ、Slc1 は LPA に高い特異性を示したが、それ以外の基質についての活性は確認できなかった。そこで、大腸菌を用いた SLC1 の高発現系の構築を行った。その結果、分裂酵母を宿主とする場合よりも高い活性を得ることができた。さらに、C-末端に His-tag を付加した組み換え酵素の生成に成功し、ニッケルカラムを用いて酵素の精製を行い詳細な性質の解明を行った。その結果、Slc1 は、LPA を良い基質としたが LPI、LPS、LPC でも弱い活性が認められた。

分裂酵母において構築したアシル転移酵素 LPT1 および SLC1 の遺伝子破壊株、高発現株を培養し、Bligh & Dyer 法により脂質抽出した。これらの脂質を MS/MS を用いた解析により比

較した。その結果、破壊株においては、リゾリン脂質の蓄積が認められた。また、出芽酵母のリゾリン脂質アシル転移酵素である LPT1 に関して細胞膜におけるトポロジー解析を行った。Lpt1 の親水性領域に酵母のインベルターゼである Suc2 の糖鎖付加配列を導入したキメラ酵素 13 種類を構築し、SUC2 配列への糖鎖付加の有無により小胞体膜上での配位を解析した。その結果、Lpt1 の N-末端、7 番目と 11 番目の親水性ループが小胞体内腔に配位していることが明らかとなった。また、活性中心として保存されているヒスチジン残基は、9 番目の親水性ループに存在することから、本酵素の触媒作用は細胞質側で行われていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Development of a heat-processing method for koji to enhance its antioxidant activity. Okutsu, K., Yoshizaki, Y., Takamine, K., Tamaki, H., Ito, K., and Sameshima, Y. (2012) *J. Biosci. Bioeng.*, 113 (3), 349-354 査読有
2. The formation of beta-damascenone in sweet potato shochu, Yoshizaki, Y., Takamine, K., Shimada, S., Uchihori, K., Okutsu, K., Tamaki, H., Ito, K., and Sameshima Y. (2011) *J. Inst. Brew.* 117, 217-223 査読有
3. Role of a PA14 domain in determining substrate specificity of a glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase from *Kluyveromyces marxianus*. Yoshida, E., Hidaka, M., Fushinobu, S., Koyanagi, T., Minami, H., Tamaki, H., Kitaoka, M., Katayama, T., and Kumagai, H. (2010) *Biochem. J.*, 431(1), 39-49 査読有

[学会発表] (計 24 件)

1. 福田竜也、分裂酵母リゾリン脂質アシル転移酵素 Slc1 の機能解析、第 44 回酵母遺伝学フォーラム 9/6/2011、(福岡、九大医学部百年講堂)
2. 玉置尚徳、酵母アシルトランスフェラーゼの機能解析、第 52 回日本脂質生化学会、6/15/2010、(群馬、伊香保温泉)

3. 玉置尚徳、酵母新規アシル転移酵素の機能解析、第82回日本生化学会大会、10/24/2009、(神戸、ポートピアホテル)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉置 尚徳 (TAMAKI HISANORI)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：20212045

(2) 連携研究者

宮下 正弘 (MIYASHITA MASAHIRO)

京都大学大学院・農学研究科・助教

研究者番号：80324664