

リン脂質アシル鎖のリモデリングによる生体膜ホメオスタシス維持機構の解析

福田 良一

(東京大学大学院 農学生命科学研究科)

研究の目的

生体膜の主要構成成分であるリン脂質には多様な分子種が存在し、その組成は環境に応答して変動する。リン脂質のアシル鎖を置換するリモデリングは、リン脂質分子種の多様性の獲得、組成の変動に寄与していると考えられている。また、適正でないアシル鎖や酸化されたアシル鎖は、リモデリングにより置換されると考えられている。この様に、リン脂質アシル鎖のリモデリングは生体膜の構造と機能に重要な役割を果たすと予想される。しかしながら、その分子機構については、近年になり様々な生物種で *membrane bound O-acyltransferase (MBOAT)* ファミリーに属するアシルトランスフェラーゼがリン脂質の *sn-2* 位のアシル鎖の導入に関わることが報告されてきたが (1)、全貌は未解明である。

我々は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、生育に必須の主要リン脂質ホスファチジルコリン (PC) のアシル鎖のリモデリングの機構を明らかにするため、短鎖アシル鎖を持つ PC を培地から PC 合成欠損株に取り込ませ、質量分析装置を用いてその代謝を追跡することによりリモデリングを評価する系を構築し、解析を行ってきた(2,3)。本研究では、この系を応用することにより、同じく生育に必須なリン脂質であるホスファチジルエタノールアミン (PE) のアシル鎖のリモデリングの分子機構を解明することを目的とした。また、新たなリン脂質アナログを用い、これまで解析が困難であった *sn-1* 位のアシル鎖のリモデリングの機構を明らかにすべく、解析を行った。

方法

S. cerevisiae W3031A 株 (*MATa his3 leu2 trp1 ade2 ura3*) より、TKY12Ga 株 (*MATa his3 leu2 trp1 ade2 ura3 psd1Δ::kanMX4 psd2Δ::LEU2 P_{GALI}-ECT1::HIS3*) および PCY12G 株 (*MATa his3 leu2 trp1 ade2 ura3 pem1::HIS3 pem2::hph P_{GALI}-CCT1::nat1*) を作製した。

リン脂質の抽出は、Brigh and Dyer 法により行った。リン脂質の質量分析には、主にエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法によるイオン源と三連四重極型の質量分析部を持つ ESI-MS/MS、API3000 triple quadrupole instrument (Applied Biosystem) を用いた。リン脂質は 0.1% ギ酸アンモニウムを含むアセトニトリル-メタノール-水 (4:4:1) に溶解し、10 μ l/min の流速で直接イオン源に注入した。イオンスプレーの電圧は、ポジティブスキャンの場合には 5.0 kV に、ネガティブスキャンの場合には -3.8 kV に設定した。MS/MS による測定には衝突ガスとして窒素ガスを使用し、衝突エネルギーは 25~60Vdc にした。測定は、100~200 スキャンを積算した。

結果

短鎖アシル鎖を持つ PE のリモデリング

S. cerevisiae において、ホスファチジルセリン (PS) の脱炭酸による PE 合成に関わる *PSD1* および *PSD2* を破壊し、Kennedy 経路での PE 合成過程で CDP-エタノールアミン合成に関わる *ECT1* を *GALI* プロモーター下に置いた TKY12Ga 株は、グルコースを炭素源とした培地では PE 合成が抑制され生育できないが、培地に炭素鎖長 10 の短鎖アシル鎖を持つ diC10PE を添加することで生育が支持された (4)。

そこで、親水性頭部を重水素標識した diC10PE を合成し、TKY12Ga 株に取り込ませ、その代謝を ESI-MS/MS により解析した。その結果、標識 diC10PE は炭素鎖長 16 または 18 の正常な長さのアシル鎖を持つ PE に変換されていた (5)。また、一方のアシル鎖のみが正常なアシル鎖に置換されたリモデリング中間体と考えられる分子種も検出された。これらの結果から、diC10PE は正常な長さのアシル鎖を持つ PE へリモデリングされ、膜の構成成分として利用されていることが示唆された (図 1)。

次に、diC10PE のリモデリングの機構を明らかにするため、TKY12Ga 株において種々のアシルトランスフェラーゼ遺伝子を破壊し、diC10PE のリモデリングについて解析を行った。その結果、MBOAT ファミリーアシルトランスフェラーゼをコードする *ALE1* およびリゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼをコードする *SLC1* の破壊株が、diC10PE を含む培地での生育に欠損を示した。これらの破壊株における安定同位体標識 diC10PE のリモデリングを調べたところ、両方のアシル鎖が正常なアシル鎖に置換されたリモデリング産物およびリモデリング中間体の量が減少していた。さらにこれらの遺伝子破壊株中のリモデリング中間体の構造を解析したところ、特に *sn-2* 位のアシル鎖が置換された分子種の量が減少が見られた。また、酵母細胞抽出液を用いた *in vitro* での diC10PE のリモデリング解析系においても、*ALE1* および *SLC1* の破壊株ではリモデリング活性の低下が見られた。以上の結果から、diC10PE の *sn-2* 位のアシル鎖のリモデリングに Ale1p と Slc1p が関与することが示唆された。

PC の *sn-1* 位のアシル鎖のリモデリング

リン脂質の *sn-1* 位のアシル鎖リモデリングの解明が遅れている原因として、2-アシルリゾリン脂質は 1-アシルリゾリン脂質より不安定であり、ホスホリパーゼ A1 活性により生じた 2-アシルリゾリン脂質の *sn-2* 位のアシル鎖が *sn-1* 位に分子内転移するため、

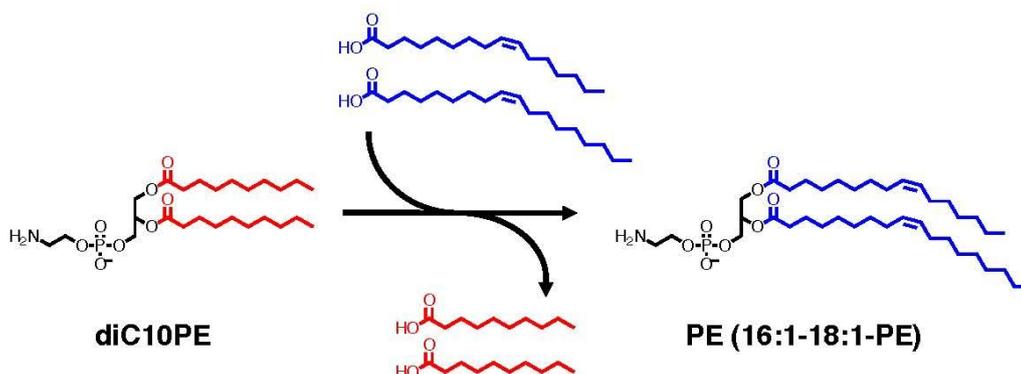


図 1. 短鎖アシル鎖を持つホスファチジルエタノールアミンのリモデリング

解析が困難であることが挙げられる。そこで、PCの *sn*-1 位のアシル鎖のリモデリングを解析するための基質として、*sn*-2 位のエステル結合をより安定なエーテル結合に変えた3種のPCアナログ、1-palmitoyl-2-hexadecyl-PC (PHPC)、1-myristoyl-2-hexadecyl-PC (MHPC)、1-hydroxyl-2-hexadecyl-PC (2-alkyl-lysoPC, ALPC) を合成した。

S. cerevisiae において、PEのメチル化によるPC合成に関わる *PEM1* および *PEM2* を破壊し、Kennedy経路でのPC合成においてCDP-コリン合成に関わる *CCT1* を *GALI* プロモーター支配下に置いた株 PCY12G 株は、グルコースを炭素源とした培地ではPC合成が抑制され生育できないが、ALPCを添加することで生育が支持された。ALPCの代謝をESI-MS/MSにより解析したところ、*sn*-1 位に炭素鎖長16または18のアシル鎖を持つ分子種に変換されていた。さらにALPCを酵母細胞抽出液と反応させたところ、*sn*-1 位にアシル鎖を持つと考えられる分子種が検出された。これらの結果から、酵母細胞内には、ALPCの *sn*-1 位に対するアシル転移活性が存在すること、取り込まれたALPCは *sn*-1 位にアシル鎖が導入され、PCの代わりに利用されていることが示唆された。

結論

本研究の結果により、酵母細胞内にはPEのアシル鎖の長さを適正に維持する機構があることが明らかとなった。さらに *Ale1p* と *Slc1p* がPEの *sn*-2 位のアシル鎖のリモデリングに関わることが示唆された。また、本研究で合成したPCアナログは *sn*-1 位にアシル鎖を導入され利用されていたことから、この系はこれまで困難であった *sn*-1 位のリモデリングに関わる酵素の同定と解析に貢献すると期待される。*S. cerevisiae* は、発酵生産過程で低温ストレスや酸化ストレスなどに曝されるが、これらのストレス下では膜の流動性の変化やリン脂質アシル鎖の酸化といった生体膜への負荷が発生する。リン脂質アシル鎖のリモデリングの解明により、これら生体膜ストレスに対する応答の理解が進むことが期待される。

文献

1. Shindou, H., Hishikawa, D., Harayama, T., Yuki, K., and Shimizu, T. (2009) *J. Lipid Res.* **50**(Suppl): S46-51
2. Yon, J. O., Nakamura, H., Ohta, A., and Takagi, M. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1394**: 23-32
3. Tanaka, K., Fukuda, R., Ono, Y., Eguchi, H., Nagasawa, S., Nakatani, Y., Watanabe, H., Nakanishi, H., Taguchi, R., and Ohta, A. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* **1781**: 391-399
4. Deng, L., Kakihara, T., Fukuda, R., and Ohta, A. (2007) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 2313-2315
5. Deng, L., Fukuda, R., Kakihara, T., Narita, K., and Ohta, A. (2010) *Biochim. Biophys. Acta* **1801**: 635-645