

## 論文内容の要旨

論文題目 Functional analysis of sphingolipid fatty acid 2-hydroxylase in *Arabidopsis thaliana*  
(シロイヌナズナのスフィンゴ脂質脂肪酸 2-ヒドロキシラーゼの機能解析)

氏名 長野 稔

### [序論]

スフィンゴ脂質は真核生物に広く存在する脂質であり、膜の構成成分やシグナル伝達因子として様々な細胞内反応に関与する。スフィンゴ脂質はセラミドを基本骨格とし、さらにセラミドは長鎖塩基と脂肪酸から構成される。スフィンゴ脂質の構造上の大きな特徴の 1 つとして C2 位にヒドロキシル基を持つ脂肪酸 (2-ヒドロキシ脂肪酸) を有することが挙げられる (図 1)。この脂肪酸の 2-ヒドロキシル化には fatty acid 2-hydroxylase (FAH) が関与することが哺乳類及び出芽酵母で明らかになっている。

修士課程における出芽酵母を用いた解析から、出芽酵母の FAH (ScFAH1) がシロイヌナズナの Bax inhibitor-1 (AtBI-1) と相互作用することが明らかになった。AtBI-1 は小胞体 (ER) 膜に局在する 7 回膜貫通タンパク質で、酸化ストレス耐性に関与することがこれまでに明らかになっている。しかしながら、そのメカニズムについては未解明であった。

そこで私は修士論文において、AtBI-1 がシトクロム *b<sub>5</sub>* (AtCb5) と植物細胞内で相互作用することを見出した。さらに、AtBI-1 の機能には、自身の分子内に Cb5 様ドメインを有する ScFAH1 との相互作用が必要であることを、出芽酵母を用いた解析から明らかにした。以上の結果から、AtBI-1 はスフィンゴ脂質脂肪酸の 2-ヒドロキシル化を介して機能することが示唆された。

これらを踏まえて博士課程では、植物細胞内における AtBI-1 のスフィンゴ脂質脂肪酸の 2-ヒドロキシル化への関与を解明することを目的とした。そのために第 1 章ではまず、これまでほとんど報告のないシロイヌナズナの FAH ホモログの同定と機能解析を行った。第 2 章では、AtBI-1

と 2-ヒドロキシ脂肪酸との関係、及び 2-ヒドロキシ脂肪酸と酸化ストレス耐性との関係を明らかにした。さらに第 3 章では、代謝産物分析から 2-ヒドロキシ脂肪酸の関わる機能について迫った。

## 【結果と考察】

### 1. シロイヌナズナの FAH ホモログの同定と機能解析

スフィンゴ脂質脂肪酸の 2-ヒドロキシル化には、分子内に Cb5 様ドメインを有する FAH が関与することがこれまでに出芽酵母と哺乳類で報告されている。出芽酵母や哺乳類の FAH は 1 つであるのに対し、シロイヌナズナには 2 つ (AtFAH1, AtFAH2) 存在した。ScFAH1 や哺乳類の FAH (FA2H) と同様に、AtFAH1 と AtFAH2 は膜局在性ヒドロキシラーゼ特有の HXXHH モチーフを有し、予想膜貫通ドメインも複数回存在した (図 2)。さらに、ER 膜に局在することも明らかになった。しかしながら、ScFAH1 や FA2H に共通して存在する Cb5 様ドメインは AtFAH1 と AtFAH2 には存在しなかった (図 2)。その代わりに、AtCb5 と ER で相互作用することを Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)法を用いて明らかにした (図 3)。さらに、出芽酵母 *fah1* 欠損株を用いた相補試験から、AtFAH1 と AtFAH2 ともに脂肪酸 2-ヒドロキシラーゼであり、且つその十分な活性には AtCb5 が必要であることを明らかにした (図 4)。

次に、シロイヌナズナにおける AtFAH1 と AtFAH2 の機能を解明するために、AtFAH1 と AtFAH2 の形質転換体を作製した。これらを用いた脂肪酸分析から、シロイヌナズナにおいて主に AtFAH1 は炭素数 20 以上の脂肪酸 (超長鎖脂肪酸) の 2-ヒドロキシル化に関与するのに対し、AtFAH2 はパルミチン酸の 2-ヒドロキシル化に関与することが明らかになった (図 5)。以上の解析から、シロイヌナズナには AtCb5 との相互作用が必要な、機能の異なる 2 つの FAH が存在することを見出した。

### 2. AtBI-1 が 2-ヒドロキシ脂肪酸合成に与える影響と、2-ヒドロキシ脂肪酸の酸化ストレス耐性への関与

修士論文と博士論文第 1 章の結果から、シロイヌナズナにおいて AtBI-1 は AtCb5 を介して AtFAH と相互作用し、2-ヒドロキシ脂肪酸合成に影響を与えることで酸化ストレスに耐性を付与する可能性が示唆された。この仮説を検証するため、まず AtBI-1 が 2-ヒドロキシ脂肪酸に与える影響に着いて解析した。AtBI-1 形質転換体を用いた脂肪酸分析を行ったところ、AtBI-1 過剰発現系統で 2-ヒドロキシ超長鎖脂肪酸量が増加しており、AtBI-1 が 2-ヒドロキシ超長鎖脂肪酸合成を正に制御している可能性が示唆された (図 6)。しかしながら、AtBI-1 欠損変異体、及び AtBI-1 ノックダウン系統では 2-ヒドロキシ脂肪酸量に変化がなかった。AtBI-1 がストレス応答性因子であることから、酸化ストレス条件下における脂肪酸量の変化を調べたところ、2-ヒドロキシ超長鎖脂肪酸量は酸化ストレスに応じて増加し、さらに AtBI-1 はその迅速な合成に関与することが明らかになった。以上の結果から、AtBI-1 は超長鎖脂肪酸の 2-ヒドロキシル化に関与する AtFAH1 と密接に関係する可能性が示唆された。

次に、2-ヒドロキシ脂肪酸が酸化ストレス耐性に関与するかについて *AtFAH1* ノックダウン系統 (AtFAH1-KD) と *AtFAH2* 欠損変異体 (*atfah2*) を用いてストレス耐性試験を行った。その

結果、AtFAH1 と AtFAH2 とともに酸化ストレス耐性に関与することが明らかとなり、2-ヒドロキシ脂肪酸が酸化ストレス耐性を付与する機能を持つことが示唆された (図 7)。

### 3. AtFAH 変異体の代謝物解析

2-ヒドロキシ脂肪酸のシロイヌナズナにおける生理学的意義をさらに解明するため、キャピラリー電気泳動質量分析装置 (CE-MS) を用いて、AtFAH1-KD と *atfah2* の代謝産物分析を行った。その結果、AtFAH1-KD において、還元型グルタチオンの減少、GABA の増加、及び還元型アスコルビン酸の減少といった酸化ストレス応答性代謝物に違いが見られた。この結果は、第 2 章における、AtBI-1 が AtFAH1 を介して酸化ストレス耐性に関与するという結果を支持する。一方、*atfah2* では、クエン酸を代表とする TCA 回路の代謝物の多くが減少していた。この結果から *atfah2* において好気呼吸に異常がある可能性を考え、暗所での二酸化炭素放出量を測定したところ有意に増加しており、呼吸の亢進が示唆された。また、*atfah2* は老化が促進する表現型も見られたことから、AtFAH2 が合成に関与する 2-ヒドロキシパルミチン酸と呼吸との関連性がさらに強固なものとなった。

#### 【まとめ】

本研究により、シロイヌナズナには主に超長鎖脂肪酸の 2-ヒドロキシル化に関与する AtFAH1 と、パルミチン酸の 2-ヒドロキシル化に関与する AtFAH2 が存在し、ともに AtCb5 との相互作用が活性に重要であることが示された。一方で、AtBI-1 が酸化ストレス応答時に 2-ヒドロキシ超長鎖脂肪酸合成を促進することを明らかにした。AtFAH1 が酸化ストレス耐性に関与していたことから、AtBI-1 は AtCb5 を介して AtFAH1 と相互作用することで 2-ヒドロキシ超長鎖脂肪酸合成を促進し、酸化ストレス耐性を付与する可能性が強固なものとなった。一方で、AtFAH2 は酸化ストレス耐性に関与するだけでなく、呼吸や老化にも関係している可能性が示唆された。従って、2-ヒドロキシ脂肪酸は多様な細胞内反応に関与するのみならず、その脂肪酸の長さに応じて機能が異なることが明らかになった。今後は、AtFAH1 による酸化ストレス耐性のメカニズム、及び、AtFAH2 と呼吸、老化との関係性をより詳細に解析することで、シロイヌナズナにおける 2-ヒドロキシ脂肪酸の重要性に迫ることができると期待している。

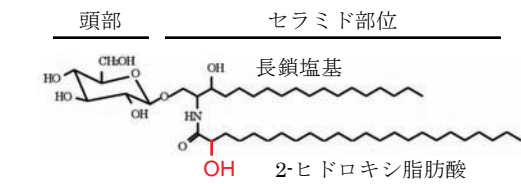


図1. スフィンゴ脂質の構造

スフィンゴ脂質は頭部とセラミド部位に分けられ、さらにセラミド部位は長鎖塩基と2-ヒドロキシ脂肪酸から構成される。

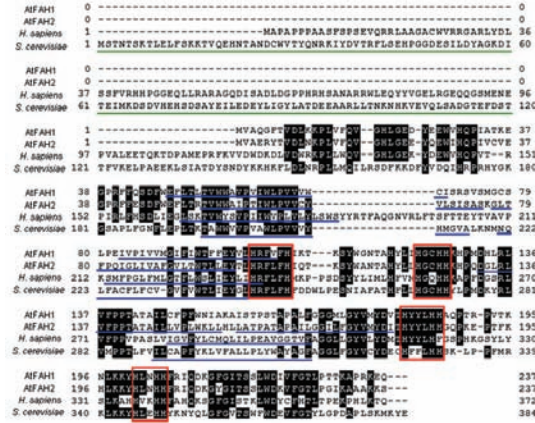


図2. FAHのアミノ酸比較

AtFAH1、AtFAH2、ヒトのFA2H、及び出芽酵母のFAH1のアミノ酸配列を比較した。緑線はCb5様ドメイン、青線は予想膜貫通ドメイン、赤囲みはHXXXHHモチーフを示す。

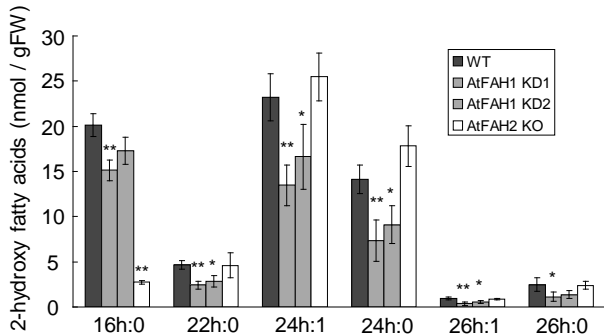


図5. AtFAH変異体の2-ヒドロキシ脂肪酸分析

シロイヌナズナ野生型 (Col-0; WT)、AtFAH1-KD、及び *atfah2* から全脂質を抽出し、2-ヒドロキシ脂肪酸メチルエステルをGC-MSで分析した。\*:  $p < 0.05$ 、\*\*:  $p < 0.01$

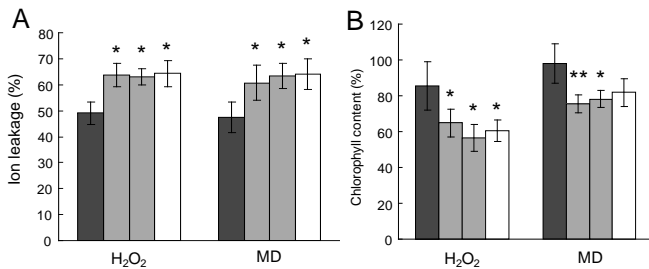


図7. AtFAH変異体を用いた酸化ストレス耐性試験

シロイヌナズナWT、AtFAH1-KD、及び *atfah2* に対して、100 mMのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と60 μMのMDで24時間処理した際の、イオンの漏出量 (A) とクロロフィル含有量 (B) を調べた。\*:  $p < 0.05$ 、\*\*:  $p < 0.01$

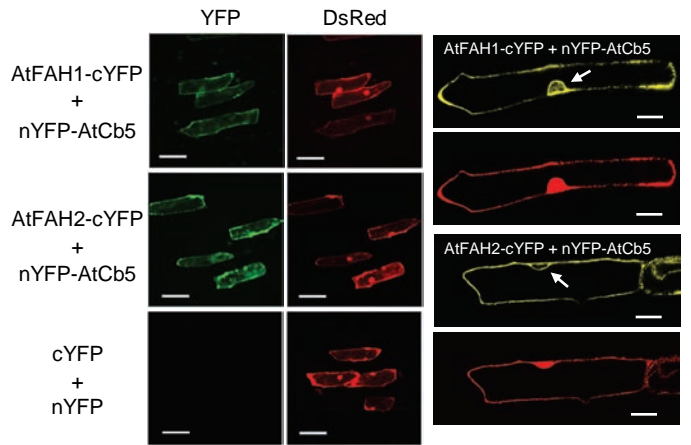


図3. BiFC法を用いたAtFAH1及びAtFAH2とAtCb5の植物細胞内相互作用解析

パーティクルガンを用いてタマネギの表皮細胞にプラスミドを導入し、蛍光顕微鏡、及び共焦点レーザー顕微鏡で観察した。35S-DsRedは発現マーカーとして用いた。矢印は核膜を示す。左図のスケールバーは200 μm、右図のスケールバーは50 μmを示す。

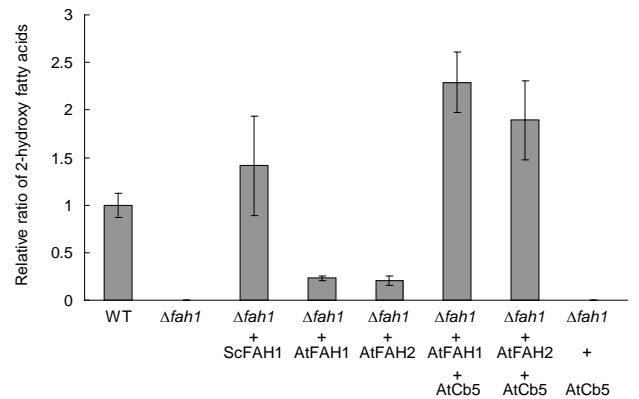


図4. 出芽酵母 *fah1* 欠損株を用いたAtFAHの相補試験

出芽酵母 *fah1* 欠損株に、AtFAH1、AtFAH2、ScFAH1、AtFAH1とAtCb5、AtFAH2とAtCb5、及びAtCb5を導入し、全脂質を抽出した後、2-ヒドロキシ脂肪酸メチルエステルをGC-MSで分析した。

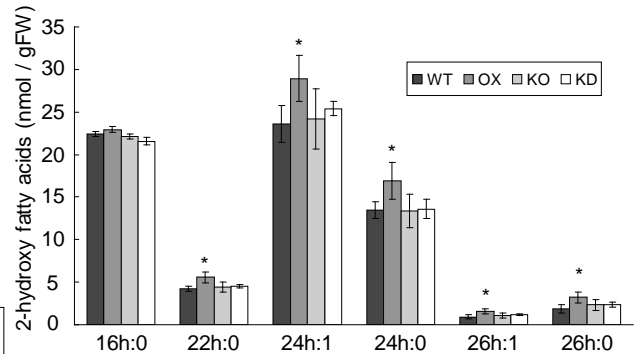


図6. AtBI-1形質転換体を用いた2-ヒドロキシ脂肪酸分析

シロイヌナズナWT、AtBI-1-OX、AtBI-1-KO、及びAtBI-1-KDから全脂質を抽出し、2-ヒドロキシ脂肪酸メチルエステルをGC-MSで分析した。\*:  $p < 0.05$