

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18868

研究課題名(和文) スフィンゴミエリン合成酵素のオリゴマー形成領域の同定と機能解析

研究課題名(英文) Carboxyl-terminal tail-mediated homodimerizations of sphingomyelin synthases are responsible for efficient export from the endoplasmic reticulum

研究代表者

林 康広 (Hayashi, Yasuhiro)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：70582857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：私達は、免疫沈降法とBlue-Native PAGEを用いて、スフィンゴミエリン合成酵素(SMS)がホモダイマーを形成することを見出した。C末端を欠損したSMS1, SMS2はホモダイマー量が減少したが、SMS1のN末欠損体はホモダイマー形成に影響がなかったことから、SMSオリゴマー形成にはC末端を介した相互作用が重要であることが分かった。興味深いことに、SMSのC末欠損体の細胞内局在を調べると、ゴルジ体の局在が減少し、小胞体の局在が増加した。以上より、SMSのC末端を介したホモオリゴマー形成は、SMSのゴルジ体への効率の良い輸送に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sphingomyelin synthase (SMS) is the key enzyme for cross-talk between bioactive sphingolipids and glycerolipids. Here, we demonstrate that both SMS1 and SMS2 form homodimers. Homodimer formation was significantly decreased by C-terminal truncations, SMS1- C22 and SMS2- C30, indicating that the C-terminal tails of the SMSs are primarily responsible for homodimer formation. Interestingly, homodimer formation occurred in the endoplasmic reticulum (ER) membrane before trafficking to the Golgi apparatus. Reduced homodimerization caused by C-terminal truncations of SMSs significantly reduced ER-to-Golgi transport. Our findings suggest that the C-terminal tails of SMSs are involved in homodimer formation, which is required for efficient transport from the ER.

研究分野：脂質

キーワード：脂質

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性株の出現、肝炎ウイルスとの合併感染により、人類は HIV を完全には克服できていない。そこで、既存の薬剤がターゲットとする分子 (HIV 逆転写酵素、プロテアーゼ) とは異なる新しい作用機序を持つ抗 HIV 剤の開発が望まれている。全てのウイルスは生体膜脂質二重層を介して侵入・出芽し、宿主細胞の脂質組成はウイルス感染に密接に関わる因子であることから、脂質代謝酵素は新たな抗ウイルス剤のターゲットとして期待できる。

スフィンゴ脂質は、形質膜上でマイクロドメインを構成し、シグナル伝達の中継地点の役割を果たしている。スフィンゴミエリン(SM)は脂質二重層を形成するスフィンゴ脂質の大部分を占め、アミノ酸配列の異なる2つのアイソフォームの SM 合成酵素 1 (SMS1)、SM 合成酵素 2 (SMS2)で生合成される。申請者らは、SMS2 が HIV エンベロープを介する細胞間膜融合を促進することを明らかにした、(Hayashi et al., J. Biol. Chem., 2014)。アクチン重合を介する HIV 受容体・補助受容体の集合体が宿主細胞への膜融合に重要であることから、SMS2 発現細胞と HIV エンベロープ発現細胞の細胞間接点におけるアクチン重合を調べたところ、アクチン重合が増加していた。これは、SMS2 がアクチン繊維と相互作用することで重合を安定化しているのではないかと推測し、化学架橋剤を用いて SMS2 とアクチン繊維の相互作用を調べた。すると、SMS2 と架橋するアクチン繊維は見出せなかったが、興味深いことに、SMS2 がオリゴマーを形成することを偶然に見いだした。これまでに SM 合成酵素のオリゴマー形成および立体構造の報告はなく、SM 合成酵素の高次構造は全く分かっていない。そこで、本研究は SM 合成酵素のオリゴマー形成に重要なアミノ酸領域を解明し、オリゴマーの機能を明らかにすることで、SM 合成酵素のオリゴマーを標的とした創薬開発の基礎研究基盤を確立していくことにした。

2. 研究の目的

私達は、スフィンゴミエリン合成酵素 2 (SMS2) が HIV-1 エンベロープ蛋白質 (Env)を介した膜融合を促進することを明らかにした(1)。宿主細胞のアクチン重合に依存した HIV 受容体・補助受容体の集合が HIV-1 感染に重要であることから、SMS2 発現細胞と HIV-1 Env 発現細胞の膜融合におけるアクチン重合を調べると、その細胞間接点においてアクチン重合が増加していた。SMS2 がアクチン繊維と相互作用することで重合を促進しているのではないかと考え、化学架橋剤を用いて SMS2 と actin および actin-interacting proteins の相互作用を調べた。残念ながら SMS2 と架橋する actin および actin-interacting proteins は見出せな

かったが、興味深いことに、SMS2 の 2 量体と分子量が一致するバンドをウェスタンブロットティングにより検出した。これまでに、SMS1 および SMS2 のオリゴマーに関する研究報告はなく、その形成機構および機能は分かっていない。そこで、SMS のオリゴマー形成に重要な領域、および、その機能を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

SMS オリゴマー形成を免疫沈降、Blue-Native PAGE (BN-PAGE)、化学架橋剤、および蛍光タンパク質再構成法を用いて調べた。

4. 研究成果

SMS1 および SMS2 はホモダイマーを形成する

レトロウイルスの発現系を用いて、C 末端に V5-tag を付加した SMS1 および SMS2 を安定に発現する HEK293 細胞 (HEK293/SMS1-V5, HEK293/SMS2-V5) を作製した。これらの細胞に C 末端に Flag-tag を付加した SMS1 および SMS2 を発現させ、1% TritonX-100 で可溶化し、抗 Flag ビーズを用いて免疫共沈を行った。その結果、SMS1-Flag は SMS2-V5 よりも SMS1-V5 と、SMS2-Flag は SMS1-V5 よりも SMS2-V5 と親和性が高いことが分かった。これより、SMS はホモオリゴマーを形成することが示唆された。また、Blue-Native PAGE (BN-PAGE) より、大部分の SMS1 および SMS2 は細胞内においてホモダイマーを形成することが分かった。また、Brefeldin 処理で小胞体からゴルジ体輸送を阻害しても、SMS ホモオリゴマー形成に影響がなかったことから SMS は小胞体で複合体を形成することが分かった。

SMS1, SMS2 ホモダイマーにおける近傍領域の同定

SMS の各システイン残基をセリン残基に変異したアミノ酸置換変異体を作製した。COS7 細胞に各変異体を発現させ、化学架橋剤 bis-maleimido-hexane (BMH) で処理した後、ウェスタンブロットティングを行った。その結果、SMS1 は 50 番目のシステイン残基変異体 (C50S)、SMS2 は 343, 348 番目のシステイン残基変異体 (C343S, C348S) において架橋産物が減少したことから、これらのアミノ酸はホモダイマーを形成する際に近傍にあることが分かった。N, C 末端の配向性の同定、そして SMS1 single-Cys 変異体における biotin-maleimide 修飾で SMS1 の膜貫通領域を推定した結果から、SMS1 の Cys50 を含む N 末端領域、そして SMS2 の Cys343, 348 を含む C 末端領域は、ともにゴルジ体の細胞質側に配向していることが分かった。また、蛍光タンパク質再構成法を用いた実験より、SMS1 および SMS2 ホモダイマーの N, C 末端は互いに近傍にあることが明らかになった。以上の

結果より、SMS ホモダイマーにおいて N 末端領域どうし、N 末端領域と C 末端領域、そして C 末端領域どうしが、それぞれ近傍にあることが分かった。

SMS オリゴマー形成には C 末端が重要である

N, C 末端を欠損した SMS1 変異体 (SMS1- Δ N68, SMS1- Δ C22, SMS1- Δ N68C22) と C 末端を欠損した SMS2 変異体 (SMS1- Δ C22) を COS7 細胞に発現し、BN-PAGE を行った。C 末端を欠損した SMS1, SMS2 はホモダイマー量が減少したが、SMS1 の N 末欠損体はホモダイマー量に影響がなかった。また、免疫共沈の実験からも同様の結果が得られたことから、SMS のホモダイマー形成には C 末端を介した相互作用が重要であることが分かった。

SMS のホモダイマー形成は細胞内局在に重要である

タンパク質のオリゴマー形成は細胞内局在に重要であることが知られている。そこで、COS7 細胞に N, C 末端を欠損した SMS を発現させ、細胞内局在を共焦点顕微鏡を用いて調べた。すると、SMS の C 末欠損体ではゴルジ体の局在が減少し、小胞体のマーカートンパク質と共局在する割合が増加した。SMS1 の C 末欠損体は、その形態から organized smooth ER (OSER) を形成していることが考えられた。OSER は小胞体に局在するタンパク質に弱いダイマー形成能をもつ GFP を付加することで形成することから、OSER 形成は SMS1 の C 末欠損による小胞体局在の増加とダイマー形成能の低下に関係があるものと考えられた。SMS 欠損変異体は野生型と同程度の酵素活性を保持することから、SMS の C 末欠損体の細胞内局在の変化はタンパク質のミスフォールディングによるものではないことが分かった。また、小胞体に局在する MBOAT5 (LPCAT3) の C 末端に SMS1 および SMS2 の C 末端領域を付加したキメラタンパク質は小胞体に局在したままでゴルジ体への局在変化が見られないことから、SMS の C 末端領域には ER export モチーフを含まないことが明らかになった。蛍光タンパク質再構成法を用いた実験より、C 末欠損体では N/C 末端の相互作用のバランスが乱れることが分かり、SMS の C 末欠損体は細胞内において異常なホモダイマーを形成していることが示唆された。

本研究の結果より、SMS1 および SMS2 の C 末端を介した正常なホモダイマー形成は SMS のゴルジ体への効率の良い輸送に重要であ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 3 件)

1) Yasuhiro Hayashi, Yoko Nemoto-Sasaki,

Naoki Matsumoto, Takashi Tanikawa, Saori Oka, Yusuke Tanaka, Seisuke Arai, Ikuo Wada, Takayuki Sugiura, and Atsushi Yamashita

“Carboxyl-terminal Tail-mediated Homodimerizations of Sphingomyelin Synthases Are Responsible for Efficient Export from the Endoplasmic Reticulum”

J. Biol. Chem. 292, 1122-1141, 2017.

(査読有り)

2) Yasuhiro Hayashi and Makoto Ito
Klotho-Related Protein KLRP: Structure and Functions”

Vitam Horm.101, 1-16, 2016.

(査読有り)

3) Debananda Das, Kenji Maeda, Yasuhiro Hayashi, Navnath Gavande, Darshan, V., Desai, Simon, B. Chang, Arun, K., Ghosh, and Hiroaki Mitsuya “Insights into the Mechanism of Inhibition of CXCR4: Identification of Piperidinylethanamine Analogs as Anti-HIV-1 Inhibitors”

Antimicrob. Agents Chemother. 59, 1895-1904, 2015.

(査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

1) Yasuhiro Hayashi, Yoko Nemoto-Sasaki, Naoki Matsumoto, Takashi Tanikawa, Saori Oka, Yusuke Tanaka, Seisuke Arai, Ikuo Wada, Takayuki Sugiura, and Atsushi Yamashita

“Carboxyl-terminal tail-mediated homodimerizations of sphingomyelin synthases are responsible for efficient ER export”

48th Asia-Pacific Academic Consortium for Public Health Conference, Tokyo, Japan, September 16-19, 2016

東京都 板橋区 帝京大学

2) 林 康広、佐々木洋子、松本直樹、荒井齊祐、和田郁夫、杉浦隆之、山下純

“スフィンゴミエリン合成酵素の C 末端を介したホモオリゴマー形成はゴルジ体への輸送に参与する”

第 89 回 日本生化学会 2016 年 9 月 25 日-27 日、宮城県 仙台市 仙台国際センター

3) 林 康広、佐々木洋子、松本直樹、光武進、杉浦隆之、山下純

“スフィンゴミエリン合成酵素 2 は HIV-1 の膜融合を促進する”

第 17 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム 2016 年 9 月 3 日-4 日、東京都 板橋区 帝京大学

4) 林 康広、佐々木洋子、松本直樹、荒井齊祐、和田郁夫、杉浦隆之、山下純

“スフィンゴミエリン合成酵素のオリゴマ

一形成にはC末端が重要である”
第 11 回 スフィンゴセラピー研究会 2016
年 7 月 14 日-16 日、石川県 加賀市 癒しの
リゾート加賀の幸ホテルアローレ

5) 林 康広、佐々木洋子、松本直樹、荒井齊
祐、和田郁夫、杉浦隆之、山下純
“スフィンゴミエリン合成酵素の C 末端を
介したホモオリゴマー形成はゴルジ体への
輸送に重要である”
第 58 回 日本脂質生化学会 2016 年 6 月 9
日-10 日、秋田県 秋田市 にぎわい交流館
AU

6) 林 康広、佐々木洋子、松本直樹、荒井齊
祐、和田郁夫、杉浦隆之、山下純
“スフィンゴミエリン合成酵素オリゴマー
形成領域の解析”
第 88 回 日本生化学会 2015 年 12 月 1 日-4
日、兵庫県 神戸市 神戸ポートアイランド

7) Yasuhiro Hayashi, Yoko Nemoto-Sasaki,
Naoki Matsumoto, Takayuki Sugiura, and
Atsushi Yamashita
“Sphingomyelin synthase 2 is involved in
HIV-1 envelope-mediated membrane fusion”
第 63 回 日本ウイルス学会学術集会 2015
年 11 月 22 日-24 日、福岡県 福岡市 福岡
国際会議場

8) 林 康広、佐々木洋子、松本直樹、光武 進、
杉浦隆之、山下 純
“スフィンゴミエリン合成酵素 2 は HIV-1
の膜融合を促進する”
第 57 回 日本脂質生化学会 2015 年 5 月 28
日-29 日、東京都 千代田区 一橋大学一橋
講堂

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<https://www.e-campus.gr.jp>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
林 康広 (HAYASHI, Yasuhiro)
帝京大学・薬学部・助教
研究者番号：70582857