

平成 21年 5月 7日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590309

研究課題名（和文） スフィンゴシンキナーゼの細胞質・核間シャトル機構の解析

研究課題名（英文） Studies on the mechanism of nucleo/cytoplasmic shuttling of sphingosine kinase

研究代表者

中村 俊一（NAKAMURA SHUNICHI）

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40155833

研究成果の概要：SK2のアミノ酸配列にこれまでに報告の無い核排出シグナルを有し、以前に報告した核移行シグナルと共に両者のバランスによってSK2が細胞質/核間シャトルが調節されていることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1080,000	4,680,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：シグナル伝達、酵素、脂質、生体分子、生理活性

## 1. 研究開始当初の背景

報告者らのグループはSKが核・細胞質間をシャトルする蛋白質であることを証明した。更に報告者らはSK2が核内に蓄積するとDNAの合成が強力に抑制されることを報告し、SK2の細胞質と核間の移行機序の解明が懸案の課題となっていた。

## 2. 研究の目的

細胞質・核間シャトルを行う蛋白質は核内移行能と核排出能とのバランスによりシャトルが調節されることが知られる。そこで、SK2の核排出シグナル（NES）を同定し、更に蛋白質リン酸化を介したSK2の細胞質・核間シャトル調節機構を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

SK2の遺伝子配列を基にNESを推定し、分子生物学的手法を用いて推定NES部位に対する変異体を作成し、これらの変異体をほ乳類細胞に発現させ、その分子挙動よりNESを同定する。更にNES近傍のアミノ酸配列により、リン酸化による制御の可能性を検討する。

## 4. 研究成果

## (1) SPHK2の核排出シグナル（NES）の同定

SPHK2中間部に、ロイシン豊富なNES候補配列を見出した（図1）。

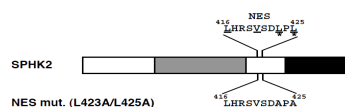


図1 NESの同定

この配列内の423番目と425番目のロイシンをアラニンに変異させた変異体 (SPHK2L423A/L425A) ではHEK293細胞での核排出が強く抑制されていた (図2)。また、この変異体は野生型SPHK2とほぼ同じ酵素活性を有していた。これにより同部位がNESであることが判明した。

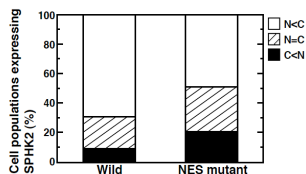


図2 NESによる核移行の調節

(2) SPHK2のNES配列内のセリン残基のリン酸化はPKDによって仲介される。SPHK2のセリン421はPKDによるリン酸化のコンセンサス配列と一致していた (図3)。In vitroでNESペプチドはPKDによって効率的にリン酸化された。

Consensus sequence for PKD phosphorylation

SPHK2-NES	LHRSVSDLPL
Syntide 2	LARTLSVAGL
RIN1 (346-355)	LLRSM SAAFC
HDAC5 (493-502)	LSR TQSSPLP
KIDINS220 (914-923)	ITR QMSFDLT
HSP27 (10-19)	LLR G P S W D P F
PKD minimal motif	L R X X S X X X X

図3 PKDによるNESのリン酸化部位

(3) PKDはSPHK2を生理的条件下でリン酸化する。免疫細胞染色でも内在性PKDをノックダウンした細胞では、PMA刺激によるSPHK2のリン酸化と核からの排出が抑制された (図4)。またsiRNA抵抗のPKDを発現させると、PKDノックダウンによるSPHK2の核からの排出の阻止が回復した。HEK293細胞では、PKD発現をノックダウンすることによって、核に分布したHA-SPHK2の増加が見られ、ウェスタンブロッティングにおいてもSPHK2のリン酸化の減少が認められた。これら結果は、PKDがSPHK2を生理的条件下でリン酸化する酵素であることが示された。

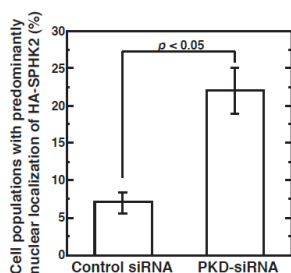


図4 PKDによるSK2のリン酸化と核移行の調節

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 6 件)

- ① Kajimoto, T., Okada, T., Yu, F., Goparaju, S. K., Jahangeer, S., & Nakamura, S. Involvement of sphingosine-1-phosphate in glutamate secretion in hippocampal neurons. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3429-3440 (2007), 査読有り
- ② Kono, Y., Nishiuma, T., Nishimura, Y., Kotani, Y., Okada, T., Nakamura, S., & Yokoyama M. Sphingosine kinase 1 regulates differentiation of human and mouse lung fibroblasts mediated by TGF{beta}1. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 37, 395-404 (2007), 査読有り
- ③ Ding, G., Sonoda, H., Yu, H., Kajimoto, T., Goparaju, S. K., Jahangeer, S., Okada, T., & Nakamura, S. Protein kinase D-mediated phosphorylation and nuclear export of sphingosine kinase 2. *J. Biol. Chem.* 282, 27493-27502 (2007), 査読有り
- ④ Sonoda, H., Okada, T., Jahangeer, S., and Nakamura, S. Requirement of phospholipase D for ilimaquinone-induced Golgi membrane fragmentation. *J. Biol. Chem.* 282, 34085-34092 (2007), 査読有り
- ⑤ Nishiuma, T., Nishimura, Y., Okada, T., Kuramoto, E., Kotani, Y., Jahangeer, S., & Nakamura, S. Inhalation of sphingosine kinase inhibitor attenuates airway inflammation in asthmatic mouse model. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 294, L1085-1095 (2008), 査読有り
- ⑥ Okada, T., Kajimoto, T., Jahangeer, S., & Nakamura, S. Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate signalling in central nervous system. *Cell. Signal.* 21, 7-13 (2009), 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

- ① 中村俊一、スフィンゴシン1リン酸による新たな神経機能調節、第2回 第2回スフィンゴセラピー (STC) 研究会、鳥取 (2007)
- ② 中村俊一、梶本武利、岡田太郎、于歆、Goparaju Sravan, Jahangeer Saleem、Involvement of sphingosine-1-phosphate in

glutamate secretion in hippocampal neurons、第49回日本脂質生化学会、札幌(2007)

- ③ Shun-ichi Nakamura、Involvement of sphingosine-1-phosphate in glutamate secretion in hippocampal neurons、Gordon Research Conferences, Waterville Valley Resort (2007)
- ④ Shun-ichi Nakamura、A novel function of sphingosine 1-phosphate in hippocampal neurons Biochemical and genetic basis of neurological diseases and novel therapeutic approaches in Warsaw (2007)
- ⑤ 中村俊一、岡田太郎、スフィンゴシンキナーゼ2によるエキソソーム放出の調節、第3回スフィンゴセラピー(STC)研究会 鳥取(2008)
- ⑥ 中村俊一、スフィンゴ脂質による神経伝達物質放出機構の解析、平成20年度 特定領域研究「統合脳」5 領域 夏のワークショップ、北海道(2008)
- ⑦ 中村俊一、スフィンゴシン1リン酸による神経伝達物質放出機構の解析、特定領域研究「統合脳」冬の公開シンポジウム、東京(2008)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] 特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 俊一 (NAKAMURA SHUNICHI)  
神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号 40155833

### (2) 研究分担者

岡田 太郎 (OKADA TAROU)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号 80304088

### (3) 連携研究者

該当無し