

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19870017

研究課題名（和文） スフィンゴ脂質シグナリングのトポロジーと作用メカニズムの解析

研究課題名（英文） Topological analysis of sphingolipid signaling

研究代表者

谷 元洋 (TANI MOTOHIRO)

九州大学・大学院理学研究院・特任准教授

研究者番号：20452740

研究成果の概要：

生体膜脂質二重層の外層に主に存在するスフィンゴ脂質は、細胞内外のシグナル伝達に重要な役割をはたしている事が知られている。本研究ではスフィンゴ脂質シグナリングの解明に向けて、(1)スフィンゴミエリン合成酵素の翻訳後修飾による局在制御機構の解析、(2)出芽酵母のスフィンゴ脂質代謝異常高感受性変異株の探索とその表現型の解析を行った。(1)最近、遺伝子クローニングが行われたスフィンゴミエリン合成酵素には、ゴルジ体に局在する合成酵素1と大部分が形質膜に局在する合成酵素2の2種類が存在することが既に知られている。本研究では翻訳後修飾に注目し、合成酵素2のみが特異的にC末端部においてパルミトイル化と呼ばれる脂質修飾を受けていることを発見した。パルミトイル化が欠損した合成酵素2は、形質膜に局在することができずゴルジ体に局在することから、パルミトイル化はスフィンゴミエリン合成酵素の形質膜局在に関与することが示唆された。(2)出芽酵母遺伝子ノックアウトライブラリー約4800株全てを対象として大規模スクリーニングを行い、スフィンゴ脂質合成酵素阻害剤による生育障害に対して高感受性を示す遺伝子欠損株を合計18株単離した。これらの株の表現型解析を詳細に行った結果、細胞内シグナル伝達及び小胞輸送に関わるホスホイノチドリン酸の量的変動が水酸化脂肪酸を持った複合スフィンゴ脂質の欠損と相互作用することで、酵母が致死となることを明らかにした。このことより特定の構造を持つ複数のリン脂質の代謝異常が相互作用することで、生命の維持に重大な影響を及ぼすことが明らかとなった。また、液胞のH⁺-ATPaseの欠損により、セラミドが誘導する生育障害に対して高感受性とな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	1,360,000	0	1,360,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,710,000	405,000	3,115,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、機能生物化学

キーワード：スフィンゴ脂質、スフィンゴミエリン、スフィンゴミエリン合成酵素、トポロジー、セラミド、出芽酵母、翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

生体膜脂質二重層の外層に主に存在するスフィンゴミエリンやスフィンゴ糖脂質は、細胞内外のシグナル伝達に重要な役割を果たしていることが知られている。近年、スフィンゴ脂質は二つの観点から注目を集めている。一つ目は、スフィンゴ脂質は形質膜上のラフトと呼ばれるマイクロドメインの構成分子として機能し、細胞内外のシグナル伝達の中継地点の役割を果たしているということ、二つ目は、スフィンゴ脂質の基本骨格を成すセラミドやその代謝産物であるスフィンゴシン、スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) が、細胞分化、増殖、アポトーシス及び細胞運動を制御する脂質メディエーターとして機能する点である。近年、これらスフィンゴ脂質代謝産物の生成に関わる酵素の多くがクローニングされ、分子レベルでの解析が可能となってきた。しかしながら、これらのスフィンゴ脂質シグナリング分子が細胞のどこで、どのようなターゲットに作用するのか、すなわち「スフィンゴ脂質シグナリングのトポロジーと作用メカニズム」に関しては、未だ多くの未解決問題が存在している。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、シグナル伝達系への関与が指摘されてきた中性セラミダーゼ、中性スフィンゴミエリナーゼ 2 の細胞内局在、膜トポロジー、翻訳後修飾による局在制御に着目し、これらの酵素が細胞のどこでスフィンゴ脂質代謝に関与するのかについて、研究を行ってきた。その結果、中性セラミダーゼが形質膜表層を含む細胞外領域においてスフィンゴ脂質代謝に関与することを明らかにする共に、中性スフィンゴミエリナーゼ 2 が形質膜の細胞質側において細胞内のセラミド生成に関わることを示した。またこれらの酵素の局在制御には *o*-型糖鎖修飾、あるいはパルミトイル化が重要であることを見出した。これらの発見は、スフィンゴ脂質シグナリング生成機構と作用機序を考えて行く上で重要な知見である。本研究では、このようなスフィンゴ脂質シグナリングのトポロジーと作用メカニズムに関して以下の 2 つの異なる観点からアプローチを行った。

(1) スフィンゴミエリン合成酵素の翻訳後修飾による局在、機能制御機構の解析

スフィンゴミエリンの生合成は、主にゴルジ体のルーメン側において行われることが知られている。最近、二つの細胞内局在の異なるスフィンゴミエリン合成酵素がクローニングされた。スフィンゴミエリン合成酵素

1 は、ゴルジ体に局在する一方、合成酵素 2 は大部分が形質膜に局在する。しかしながら、これらの局在を制御する機構や、局在の違いという観点から二つの酵素の機能の差異を調べた報告は殆どない。そこで本研究では、これらの二種の酵素の局在を制御する分子機構を明らかにすることを試みた。

(2) 出芽酵母を用いたセラミドシグナリング関連遺伝子の探索とその機能解析

様々な細胞外刺激によって生成されたセラミドが細胞死シグナルの細胞内メディエーターとして重要であることは、10 年以上前から指摘されてきた事象である。セラミドは、プロテインホスファターゼ 1, 2A、プロテインキナーゼ C-、カテプシン D 等の細胞内ターゲット分子を活性化して細胞死のシグナルを伝達することが動物細胞を用いた実験で報告されている。しかしながらセラミドがこれらの分子に直接的に作用するのか、セラミドに特異的に結合するタンパク質がまた別に存在するのか、あるいは細胞死はセラミド産生による膜の物性的変化が引き起こす現象なのか、という疑問に対して明確な回答は未だ得られていない。そこで本研究では、酵母分子生物学的手法を用いてセラミド細胞死シグナルに関与する遺伝子群をスクリーニングし、セラミドの詳細な作用メカニズムを解明することを試みた。

3. 研究の方法

(1) スフィンゴミエリン合成酵素の翻訳後修飾による局在、機能制御機構の解析

細胞内で異なる局在を示す二つのスフィンゴミエリン合成酵素の局在制御機構、機能の違いについて解析を行った。局在制御に関しては、翻訳後修飾に着目し、HEK293 細胞や Hela 細胞などの動物細胞に両酵素を過剰発現させ、脂質修飾などの有無について調べた。また翻訳後修飾が欠損した点変異体を作製し、細胞に過剰発現させ細胞内局在の変化を蛍光顕微鏡及び共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(2) 出芽酵母を用いたセラミドシグナリング関連遺伝子の探索とその機能解析

分子生物学のアプローチが容易な出芽酵母を用いてセラミドシグナリング関連遺伝子の探索とその機能解析を試みた。具体的には細胞中のセラミド蓄積によって誘導される生育阻害を指標として、約 4800 個の遺伝子が破壊された欠損ライブラリー (Yeast knock out library) を用いてセラミド代謝異常に高感受性を示す株をスクリーニングした。酵母においては、イノシトールホスホ

リルセラミド合成酵素の阻害剤 (Aureobasidin A) を用いることで、セラミドへのイノシトールリン酸の付加が阻害され内在性のセラミドが蓄積、さらに複合スフィンゴ脂質が減少することで、生育阻害が起こることが報告されている。今回、低濃度の Aureobasidin A が引き起こすセラミド代謝異常に対して高感受性を示す遺伝子欠損株をライブラリーより網羅的にスクリーニングすることを試みた。

4. 研究成果

(1) スフィンゴミエリン合成酵素の翻訳後修飾による局在、機能制御機構の解析

最近、遺伝子クローニングが行われたスフィンゴミエリン合成酵素には、ゴルジ体に局在する合成酵素 1 と大部分が形質膜に局在する合成酵素 2 の 2 種類が存在することが既に知られている。本研究では、タンパク質が受ける翻訳後修飾に注目し、合成酵素 2 のみが特異的にパルミトイル化と呼ばれる脂質修飾を受けていることを発見した。さらにパルミトイル化が、合成酵素 2 のみにおいて存在する C 末端のシステイン残基のクラスターにおいて起こっていることを明らかにした。パルミトイル化が欠損した合成酵素 2 は、形質膜に局在することができずゴルジ体に局在することから、パルミトイル化はスフィンゴミエリン合成酵素の形質膜局在に関与することが示唆された。スフィンゴミエリン合成酵素は、生体膜脂質のスフィンゴミエリンの合成だけでなく、シグナリング分子として機能するセラミドの量の調節にも関与しており、本酵素の局在制御機構の解明は、スフィンゴ脂質の代謝調節機構と生理機能を明らかにする上で重要な知見である。

(2) 出芽酵母を用いたセラミドシグナリング関連遺伝子の探索とその機能解析

出芽酵母においてセラミドをイノシトールホスホリルセラミド (IPC) に変換する酵素 (Aur1p) は生育に必須であり、その特異的阻害剤である Aureobasidin A は、強力な生育阻害を引き起こすことが知られている。この生育阻害の原因は、(1) 複合スフィンゴ脂質 (IPC, MIPC, M(IP)₂C) の減少、または (2) 中間代謝産物であるセラミドの細胞内蓄積であると考えられている。本研究では、Aureobasidin A が引き起こすセラミド代謝異常に対して高感受性を示す遺伝子欠損株の網羅的なスクリーニングを行った。その結果、セラミド代謝異常高感受性株を計 18 株同定した。これらの株の表現型解析を通して細胞内シグナル伝達及び小胞輸送に関わるホスホイノチドリン酸の量的変動が水酸化脂

肪酸を持った複合スフィンゴ脂質の欠損と相互作用することで、酵母が致死となることを明らかにした。このことより限定された特定の構造を持つ複数のリン脂質の代謝異常が相互作用することで、生命の維持に重大な影響を及ぼすことが明らかとなった。また、液胞の pH の調節に関わる H⁺-ATPase の欠損により、セラミドが誘導する生育阻害が大きく変化することを明らかにし、これまで詳細な分子メカニズムが不明であったセラミドシグナリングにおいて新たな見解を得た。

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. Tani M, and Kuge O. Sphingomyelin synthase 2 is palmitoylated at the COOH-terminal tail, which is involved in its localization in plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 381: 328-332; 2009. 査読有り
2. Inoue T, Okino N, Kakuta Y, Hijikata A, Okano H, M. Goda H, Tani M, Sueyoshi N, Kambayashi K, Matsumura H, Kai Y, and Ito M. Mechanistic insights into the hydrolysis and synthesis of ceramide by neutral ceramidase. *J Biol Chem.* 284: 9566-9577; 2009. 査読有り
3. Hayashi Y, Okino N, Kakuta Y, Shikanai T, Tani M, Narimatsu H, and Ito M. Klotho-related protein is a novel cytosolic neutral β glycosylceramidase. *J Biol Chem.* 2007 ;282: 30889-30900. 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

1. トポロジーに着目したスフィンゴミエリン代謝マシーナリー
谷 元洋, Yusuf A Hannun, 五十嵐 靖之, 伊東 信
第 80 回日本生化学会大会, 横浜,
2007 年 12 月 12 日
2. Sphingomyelin synthase 2 is palmitoylated at the COOH-terminal tail, which is involved in its localization in plasma membranes.
Tani M, and Kuge O.
5th International Charleston Ceramide Conference, Charleston, USA,
2009 年 3 月 11 ~ 14 日

3. セラミド代謝異常に高感受性を示す酵母
変異株の単離と表現型解析
谷 元洋、久下 理
第 81 回日本生化学会大会、横浜、2008 年
12 月 10 日

4. 生体膜スフィンゴ脂質の代謝制御機構と
生理機能
谷 元洋
SSP 公開シンポジウム「時空間階層生命科
学」、福岡、2008 年 12 月 15 日

5. Sphingolipid metabolism and signaling
in mammalian cells and yeast.
The 2nd CNSI UCLA/G-COE Kyushu
University Joint Symposium,
福岡、2008 年 9 月 11 日
Tani M.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

谷 元洋 (TANI MOTOHIRO)
九州大学・大学院理学研究院・特任准教授
研究者番号：20452740