

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 4 月 1 日現在

機関番号：83903
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20570145
 研究課題名（和文）：スフィンゴミエリン合成酵素の機能分担に関する研究
 研究課題名（英文）：Functional compensation and independency of two sphingomyelin synthases
 研究代表者
 渡辺 研（WATANABE KEN）
 独立行政法人国立長寿医療研究センター・運動器疾患研究部・室長
 研究者番号：10342966

研究成果の概要（和文）：スフィンゴミエリン合成酵素 SMS1 と SMS2 は構造上保存されたタンパク質であるが、その細胞内局在など異なる挙動を示す事が知られている。本研究では、両酵素のノックアウトマウスの表現型の知見から、生体または細胞において、スフィンゴミエリン合成という生化学的活性においてはそれぞれ補完的役割を担っているものの、生物学的には異なる役割を演じていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Two sphingomyelin synthase, SMS1 and SMS2, are structurally homologous proteins but exhibit different cellular localization. In this study, mice deficient either for Sms1 or Sms2 gene were generated. Through the phenotypic analyses of Sms1KO and Sms2KO mice, the enzymes partially compensate in sphingomyelin biosynthesis but play different roles in biological aspects and physiology.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：酵素、脂質、動物

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質は、細胞膜の重要な構成成分であり、脂質マイクロドメインと呼ばれるコレステロールに富む領域の形成に重要である。細胞膜は漠然とした均一の構造をとっているだけでなく、それぞれの部分が特殊化され、ある程度独立した機能コンパートメントとして分離・成立していることにより、外的シグナルの特異的かつ効率的シグナル伝達ならびに細胞応答が導かれる。脂質マイクロドメインは、脂質ラフトとも呼ばれ、増殖因子

受容体や細胞接着因子、細胞内シグナル伝達因子が局在し、細胞の増殖・分化・遊走・生存といった様々な場面で細胞外から細胞内へのシグナル伝達の中継ステーションとして機能している。さらに、シグナルだけでなく、コレステロールに富むこのドメインは、細胞内外へのコレステロール代謝（取り込みと放出）にも機能していることが示唆されている。このような膜マイクロドメイン形成に関わる主なスフィンゴ脂質は、セラミド(Cer)にホスホコリンが結合したスフィンゴミエリン(SM)

と、糖鎖が結合した糖脂質である。SM と Cer は、SM 分解酵素 (SMPD) と SM 合成酵素 (SMS) でバランスが取られていると考えられている。Cer は、アポトーシスとの関わりが強く示唆されており、これらの酵素による細胞膜での SM/Cer の変換がアポトーシス調節シグナルの一端を担っていることが報告されている。Cer は、脂質シグナルとしてよく知られているジアシルグリセロール (DAG) と構造上似ているが、それ自体がセカンドメッセンジャーというよりはむしろ、Cer 量の増加は、細胞膜上の SM/Cer の存在比の変化により、マイクロドメインの構造・性質の変化を導き、シグナル伝達調節に関わっていると考えられている。また、TNF やストレスが原因となるインシュリン抵抗性に Cer 量の増加が関与していることが報告されていることや、ごく最近、アルツハイマー病の原因でもある Aβ ペプチドが、この SM/Cer のバランスを変えているという報告もされている。このように、SM/Cer 変換が、アポトーシス制御に限らず、細胞レベルのシグナル調節から、生活習慣病や老年病などヒト疾患の病理・病態とも深く関与していることが次々と明らかになっている。SMase は現在、酸性 SMase (aSMase)、中性 SMase1 と 2 (nSMase1, nSMase2) の三種類が知られている。aSMase は、主にリソソームやエンドソームに存在し、ヒト遺伝性神経変性疾患であり、SM の異常蓄積が顕著なニーマンピック病の原因遺伝子であることが知られている。さらに aSMase 遺伝子 (Smpd1) のノックアウトマウスでも同様に SM の蓄積と神経疾患が観察されている。

一方で、nSMase 遺伝子 (Smpd2 と Smpd3) のノックアウトマウスでは、組織機能不全や形態異常があるものの、顕著な SM の蓄積は見られなかった。細胞膜のシグナル伝達と関与すると考えられている nSMase は、全体的な SM/Cer を調節するのではなく、局所、とりわけマイクロドメインでの SM/Cer のバランスに寄与していることが示唆されている。このように、SMase をはじめ、糖脂質合成経路を含むスフィンゴ脂質代謝に関わる分子 (遺伝子) 群については同定ならびに分子あるいは個体レベルでの解析が進んでいる。しかしながら、SM 合成酵素は活性こそ同定されていたが、分子 (遺伝子) そのものについては永らく不明であった。最近になり、SM 合成酵素として、SMS1 ならびに SMS2 が同定され、われわれのグループを中心として、それぞれコッ

クアウトマウスの作製が行われた。

2. 研究の目的

この 2 つの SM 合成酵素の機能分担について、Sms1 ならびに Sms2 ノックアウトマウスを用いて検討し、表現型の解析を通して、それぞれの生体ならびに細胞での機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) マウス

Sms1 ノックアウトマウスは、129 系と B6 の混合背景のものを兄妹交配により繁殖したものをを用いた、Sms2 ノックアウトマウスは、B6 系統に 8 代戻し交配し、B6 背景化したものをを用いた。p53 ノックアウトマウスは B6 背景のものをを用いた。また、それぞれのマウス系統における遺伝子型の解析は PCR 法により行った。本研究課題における動物実験は、国立長寿医療研究センター実験動物倫理委員会の審査を受け、承認を得ている。

(2) 胎児線維芽細胞の調製

胎生 11.5 日の胎児を親マウス子宮より摘出し、常法により、線維芽細胞を調製した。胎児の遺伝子型の決定は、それぞれの胎盤の一部を用いて行い、また、細胞化した後にも DNA を調製し、PCR により判定した。

(3) 細胞膜スフィンゴミエリンの検出

胎児由来線維芽細胞の細胞膜のスフィンゴミエリンの検出は、理研小林先生より提供を受けた Venus-lysenin を用いた。

(4) 精巣でのアポトーシス検出

雄マウスより摘出した精巣をグルタルアルデヒド-PBS で固定し、TUNEL 染色によりアポトーシス指標である DNA の断片化を検出した。

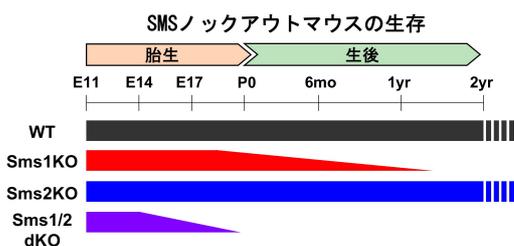
(5) 遺伝子発現解析

野生型ならびにノックアウトマウスの精巣から RNA を抽出し、Invitrogen 社 VILO キットを用いて cDNA を合成した。定量的 PCR は、ABI7300 機を使用し、GE 社の PowerSYBR キットを用いて行った。

4. 研究成果

これまでに、培養細胞で Sms1 もしくは Sms2 をノックダウンさせて発現を抑制させると細

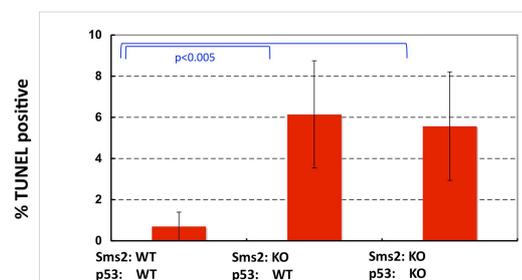
胞の SM 含量が低下するという報告がされている。また、SMS1、SMS2 ともに生化学的な SM 合成活性は検出されている。さらに、Sms1 ノックアウトマウス、Sms2 ノックアウトマウス、Sms1/Sms2 ダブルノックアウトマウスの生存を検討すると、Sms1 ノックアウトマウスが生後徐々に数が減るにも関わらず、Sms2 ノックアウトマウスでは 2 年超まで野生型より短い寿命の傾向は見られなかった。ただし、ダブルノックアウトマウスは胎生致死となること



から、Sms2 も発生中期～後期において Sms1 欠損を補完している可能性がある。しかし、当方で行ったノックアウトマウスの組織を用いた解析では、Sms1 ノックアウトマウスの組織では SM 含量が低下している組織が多いのに比べ、Sms2 ノックアウトマウス由来の組織では顕著な SM 含量の低下は見られなかった。そこでノックアウトマウスより胎児線維芽細胞を調製し、細胞膜 SM について検討を行ったところ、Sms2 由来線維芽細胞、野生型線維芽細胞では細胞表面の SM は検出されたが、Sms1 ノックアウトマウスならびに Sms1/Sms2 ダブルノックアウトマウス由来線維芽細胞ではシグナルが消失していた。これは、細胞内 SM 含量と一致している結果であり、SMS2 は細胞レベルでの SM 量に大きく貢献していない可能性が考えられた。

最近、Sms2 が精巣ならびに精巣上で高発現しているとの報告がなされた。また、Sms1 ノックアウトマウスでは精子形成異常が顕著であるにもかかわらず、SM 含量は大きく低下していない事から、精巣での SM 合成に SMS2 が寄与している事が考えられたが、Sms2 ノックアウトマウスの繁殖は野生型と変化が無く、精巣、精巣上部、成熟精子のいずれにおいても形態に差異は認められなかった。一方、Sms1 ノックアウトマウス雄における精巣の萎縮、精子形成異常（無精子）について検討を行ったところ、精細胞系列にアポトーシスの亢進が観察された。遺伝子発現解析の結果、精子形成過程がパキテン期で停止しており、減数分裂が進行していない状況である事が明らか

となった。Sms1 ノックアウトマウス精巣では、Sms2 の代償的発現増加は見られなかったが、Cer を基質とする糖脂質合成系酵素 (GCS, CGT) の遺伝子の発現が亢進していた。このことは、SM/Cer バランスが Cer 寄りの傾向を、糖脂質系へと利用する事で細胞膜の恒常性を破綻させる過剰な Cer 蓄積を一部抑制しているように思われる。また、Sms1 ノックアウトマウス精巣では p53 関連遺伝子の発現上昇が観察されたことから、このアポトーシス亢進の原因となっていることが考えられたため、Sms1/p53 のダブルノックアウトマウスを作成し、精巣の表現型を解析した。ダブルノックアウトマウスでは、Sms1 単独のノックアウトマウスと同様の表現型で、Sms1 欠損による組織異常は p53 経路を介していない可能性が



考えられた。これらのことより、Sms1 ノックアウトマウスにおける精子形成異常は、p53 に依存しないアポトーシスの亢進がみられ、Cer の増加が糖脂質系への転換で一部抑制されているように考えられるものの、Cer (SM/Cer バランスの破綻) がアポトーシスの引き金となっている可能性が考えられた。

Sms1 ノックアウトマウスでは、インスリン分泌能が低下しており、これは、膵β細胞でのミトコンドリア機能異常により細胞内活性酸素種が増加していることが明らかとなっている (Yano et al. 2011)。この SMS1 欠損による細胞内活性酸素種の増加は他の細胞でも観察され、Sms1 ノックアウトマウスにおける脂肪萎縮にも関わっていると考えられる。活性酸素種の制御に関しては、Atm ノックアウトマウスや SOD1 ノックアウトマウス、Nrf2 ノックアウトマウスなどで、精子形成過程の異常が観察されている事から、Sms1 ノックアウトマウスでの精子形成不全にも活性酸素種の増加が関係している可能性がある。ただ、これらの活性酸素種関連遺伝子のノックアウトマウスより重篤な表現型であり、その表現型はむしろ SM 分解酵素遺伝子 Smpd3 のノックアウトマウスに近い事から、ミトコンドリア-

活性酸素種以外の、よりスフィンゴ脂質代謝に直結した制御が精子形成過程と関係している可能性も考えられた。

Sms2 ノックアウトマウスは誕生から成熟に至るまで形態的・代謝的異常は観察されなかった。しかし、高脂肪食による肥満誘導では、野生型に比べて Sms2 ノックアウトマウスは体重増加が顕著に抑制されており、また脂肪組織の増大も抑制されていた (Mitsutake et al. 2011)。Sms2 ノックアウトでは細胞への脂質の取り込みに異常が見られ、このことが脂肪細胞の膨張を抑えていると考えられる。この Sms1 ノックアウトと Sms2 ノックアウトマウスの二つの知見は、脂肪組織の増加が抑制されている点は共通しているものの、明らかに現象ならびにそれから示唆されるメカニズムが異なることを示している。本研究からも SMS1 は細胞の SM/Cer バランスに大きな影響をもたらす、構成的な酵素と考えられ、一方で、SMS2 は細胞膜の局所的、とりわけマイクロドメインレベルでのスフィンゴ脂質の維持・制御に関わっていると考えられた。このように、進化的にも一つの遺伝子から重複したと思われる SMS1 と SMS2 は、局在だけでなく、その局在に関わる機能的な役割をそれぞれ担っていることが明らかとなった。

5. 主な論文発表等

[雑誌論文] (計 3 件)

Watanabe K & Ikeda K. Osteocytes in normal physiology and osteoporosis. *Clin. Rev. Bone Miner. Metab.* 査読有、8, 224-232 2010.

Yano M, Watanabe K, Yamamoto T, Ikeda K, Senokuchi T, Lu M, Kadomatsu T, Tsukano H, Ikawa M, Okabe M, Yamaoka S, Okazaki T, Umehara H, Gotoh T, Song WJ, Node K, Taguchi R, Yamagata K, & Oike Y. Mitochondrial Dysfunction and Increased Reactive Oxygen Species Impair Insulin Secretion in Sphingomyelin Synthase 1 Null Mice. *J. Biol. Chem.* 査読有、286, 3992-4002, 2011.

Mitsutake S, Zama K, Yokota H, Yoshida T, Tanaka M, Mitsui M, Ikawa M, Okabe M, Tanaka Y, Yamashita T, Takemoto H, Okazaki T, Watanabe K & Igarashi Y. Dynamic modification of sphingomyelin in lipid

microdomains controls development of obesity, fatty liver, and type 2 diabetes. *J. Biol. Chem.* 査読有、286, 2011, *in press.*

[学会発表] (計 1 件)

渡辺 研 マウスにおけるスフィンゴミエリン合成酵素遺伝子 Sms1/Sms2 の機能 第 5 回 スフィンゴテラピー研究会 2010 年 7 月 米子

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 研 (WATANABE KEN)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・運動器疾患研究部・室長

研究者番号：10342966