

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20770114

研究課題名(和文) 遺伝生化学的手法を用いたスフィンゴ糖脂質代謝・輸送関連因子の探索と解析

研究課題名(英文) A genetic biochemical search and analysis for factors involved in glycosphingolipid metabolism and traffic

研究代表者

山地 俊之(YAMAJI TOSHIYUKI)

国立感染症研究所細胞化学部・主任研究官

研究者番号：50332309

研究成果の概要(和文)：スフィンゴ脂質の代謝・細胞内輸送機構に影響を与える新規因子を探索するため、志賀毒素耐性を指標に遺伝生化学的スクリーニングを行ったところ、過剰発現により志賀毒素の受容体である糖脂質 Gb3 を低下させる因子として、複数回膜貫通タンパク TMBIM ファミリーに属する GRINA の C 末側断片(GRINA-C)を同定した。GRINA-C 及び他の TMBIM ファミリー分子である FAIM2 の過剰発現により、Gb3 合成酵素の量及び細胞内分布に影響を与えたことから、糖脂質代謝に関して糖転移酵素に対する新たな制御機構の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed genetic biochemical screenings with shiga toxin to look for new factors that affect glycosphingolipid (GSL) metabolism and its intracellular traffic. As a molecule to reduce Gb3, the shiga toxin receptor, we isolated the COOH-terminus region of GRINA, a member of TMBIM family, which was named GRINA-C. Overexpression of GRINA-C and FAIM2, another TMBIM family member, affected the amount of Gb3 synthase and its intracellular localization, suggesting a new type of regulation of glycosyltransferases in GSL metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	0	1,300,000
2009年度	1,100,000	0	1,100,000
2010年度	900,000	0	900,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：糖鎖生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：スフィンゴ糖脂質、志賀毒素、糖転移酵素、トランスゴルジネットワーク

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 培養細胞を用いた研究によりスフィンゴ脂質の生理的重要性は以前より指摘されていたが、近年のノックアウトマウス解析により脳神経や免疫等の高次機能にもスフィンゴ脂質が深く関与していることが実証されつつある。また、感染症やアルツハイマー病、糖尿病などの疾患との関連性が多数報告

されていることから、スフィンゴ脂質の恒常性の維持が個体にとって非常に重要であることを示している。しかしスフィンゴ脂質各分子種がどのような機構で上記に挙げた生理作用を示すのか、その原因については不明な点が多く、これら作用点を解析するためには細胞生物学的見地からのスフィンゴ脂質の代謝・輸送機構の解明が不可欠である。

(2) 糖脂質結合性毒素の一つ志賀毒素は細胞表面の糖脂質 Gb3 に結合し、複合体として小胞体まで逆輸送された後、リボソームを不活化することで細胞死を引き起こす。この特長を生かし、毒素耐性細胞株を単離するという遺伝生化学的手法により、スフィンゴ脂質の代謝・輸送機構の解明に貢献できると考えた。これまで CHO 細胞を用いた化学変異剤による突然変異株の作製とその解析は、脂質代謝の分野において大きな貢献をしてきている。しかしながら、この方法の問題点として原因遺伝子にたどり着くまでの時間や労力の多大さが挙げられ、この欠点を補う他のスクリーニング法を考慮する必要があった。

## 2. 研究の目的

本研究では遺伝子トラップによる挿入変異法と cDNA ライブラリーの過剰発現による発現クローニング法を用いて、志賀毒素耐性株単離のスクリーニングを行い、生体膜の機能的脂質として重要な役割を果たしているスフィンゴ糖脂質の代謝・細胞内輸送に関与する遺伝子群を効率的に単離、解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子トラップ法による志賀毒素耐性株の単離

遺伝子トラップ法として石田博士 (NAIST) のグループで開発された UPA Trap 法を使用する。志賀毒素感受性細胞株 CHO-Gb3-mCAT を親株とし、UPA-Trap のレトロウイルスを感染させることによって、挿入変異細胞ライブラリーを作製した。これに志賀毒素 (同志社大の西川教授より恵与) を添加することにより、志賀毒素に耐性を示す細胞株を単離した。

### (2) 発現クローニング法による志賀毒素耐性株の単離

レトロウイルスにより HeLa cDNA ライブラリーを志賀毒素感受性細胞株 HeLa-mCAT に導入し、上記と同様志賀毒素に耐性を示す細胞株を単離した。

### (3) 責任遺伝子の同定

(1)、(2)において単離された志賀毒素耐性株より mRNA を抽出し、RT-PCR あるいは RACE 法により責任遺伝子候補を同定した。その後単離・同定された cDNA を再び導入することにより、その遺伝子が志賀毒素耐性を示す責任遺伝子であるか確認した。

### (4) 志賀毒素に耐性を示す因子の解析

(1)、(2)により単離された志賀毒素耐性株・遺伝子を用い、その原因として受容体 Gb3 を含

む糖脂質の変化をパルスラベル実験と FACS 解析により検討した。また Gb3 合成酵素の転写量、タンパク発現量、細胞内局在を RT-PCR、ウエスタンブロット法、パルスラベル実験、免疫細胞染色法により検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 遺伝子トラップ法による志賀毒素耐性株の単離と責任遺伝子の同定

遺伝子トラップ法を用いて、少なくとも 4 種類の志賀毒素耐性株が単離された。そのうち 1 つは志賀毒素受容体 Gb3 の生合成に必須な因子 UDP-Galactose transporter の遺伝子破壊株であった。他の耐性株に関しては責任因子が未同定であるが、どのクローンも受容体 Gb3 が低下したものであった。

### (2) 発現クローニング法による志賀毒素耐性株の単離と責任遺伝子の同定

発現クローニング法により、過剰発現で志賀毒素に耐性を示す遺伝子として、2 種類の cDNA を単離した (図 1)。1 つは糖脂質 GM3 の合成酵素 (GM3S) 全長であり、もう 1 つは機能未知の複数回膜貫通タンパク GRINA の C 末端側のみをコードする欠損変異体 (GRINA-C) であった。両 cDNA とも過剰発現により Gb3 の低下が見られた。

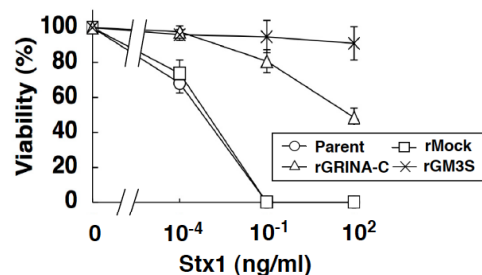


図 1. 過剰発現で志賀毒素に耐性を示す 2 つの cDNA

### (3) TMBIM ファミリーの過剰発現による Gb3 の低下

GRINA は transmembrane BAX Inhibitor motif containing (TMBIM) ファミリーの 1 つである。このファミリーはヒトの場合、6 つの遺伝子が存在する。まず上記の GRINA-C による Gb3 低下作用が内在性の全長 TMBIM ファミリーに対するドミナントネガティブ効果である可能性を考え、GRINA-C 発現株に TMBIM ファミリー全長をそれぞれ過剰発現させ、phenotype が戻るか検討した。しかし Gb3 の低下は回復せず、むしろ FAIM2 をはじめとするいくつかの TMBIM ファミリーの全長においても、GRINA-C よりは劣るものの Gb3 の低下能が見られた。

(4) GM3 合成酵素及び GRINA-C 過剰発現株の糖脂質分析

GM3 合成酵素過剰発現の場合、Gb3 合成酵素と同じ基質であるラクトシルセラミド (LacCer) を使用することで Gb3 の生合成を競合的に阻害していた。もう一方の耐性遺伝子 GRINA-C に関しては、Gb3 の低下と共に LacCer の増加が見られたことより、LacCer から Gb3 へのステップが阻害されていると考えられた (図 2)。GRINA-C 発現株に Gb3 合成酵素を過剰発現させたところ、糖脂質は親株と同様の組成に回復し、その結果志賀毒素に対して感受性となった。

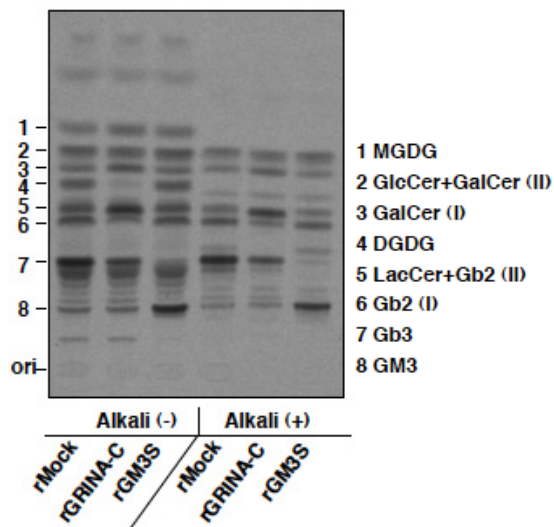


図 2. GM3 合成酵素及び GRINA-C 過剰発現株の糖脂質分析

(5) GRINA-C 過剰発現による内在性 Gb3 合成酵素の mRNA 量の変化

GRINA-C 発現株と対照株で Gb3 合成酵素の mRNA を比較したところ、両者に大きな違いは認められなかったことより、Gb3 の発現量低下の原因は Gb3 合成酵素の転写以降であることが示唆された。

(6) GRINA-C 及び FAIM2 の過剰発現による Gb3 合成酵素のタンパク発現量低下及びリソソーム分解系の関与

内在性の Gb3 合成酵素を検出できる抗体がないため、代替りの方法として、Gb3 合成酵素を GRINA-C、FAIM2、及びネガティブコントロールとともに過剰発現し、Gb3 合成酵素の mRNA 量がそれぞれ同程度であることを確認した後、同酵素のタンパク量をウェスタンブロット法で調べた。すると GRINA-C 及び FAIM2 を過剰発現している場合、Gb3 合成酵素の有意な低下がみられた。この低下はプロテアソーム阻害剤では影響を受けな

かったが、リソソームのタンパク分解酵素阻害剤において回復が見られたことより、Gb3 合成酵素の低下の原因はリソソームによる分解促進である可能性が示唆された (図 3)。それを確かめるためにパルスラベル実験を行ったところ、GRINA-C 過剰発現株において、Gb3 合成酵素の生合成は影響を受けていないものの、その後の分解が促進されており、その分解はリソソーム酵素阻害剤において抑制された。

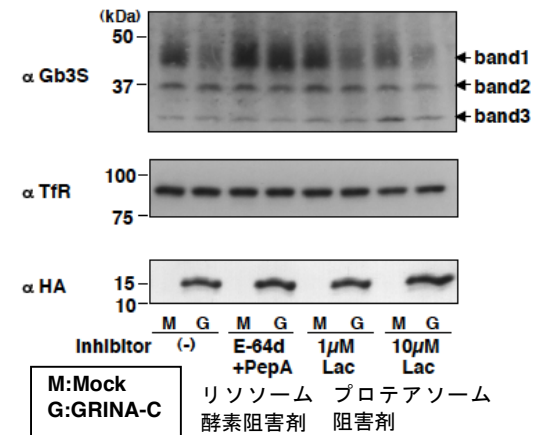


図 3. GRINA-C による Gb3 合成酵素の低下とリソソームタンパク分解酵素阻害剤による回復

(7) GRINA-C と Gb3 合成酵素の結合

GRINA-C が Gb3 合成酵素と結合するか調べるため、免疫沈降法により検討したところ、両分子の共沈が見られた。これはネガティブコントロールの分子では見られなかったことより、GRINA-C は特異的に Gb3 合成酵素と結合することが示唆された。

(8) GRINA-C と FAIM2 の細胞内局在、及び Gb3 合成酵素の細胞内局在の変化

免疫細胞染色により GRINA-C と FAIM2 の細胞内局在を調べたところ、GRINA-C は小胞体と一部ゴルジ体に、FAIM2 は分散したトランスゴルジネットワーク (TGN) に局在していた。Gb3 合成酵素はコントロール細胞の場合、ゴルジ体に沿って局在しているが、GRINA-C や FAIM2 の過剰発現によってその局在は TGN46 (TGN マーカー) と共に、ゴルジ体から一部離れて Dot 状に分散していた (図 4)。このことより GRINA-C や FAIM2 の過剰発現は TGN の輸送等に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

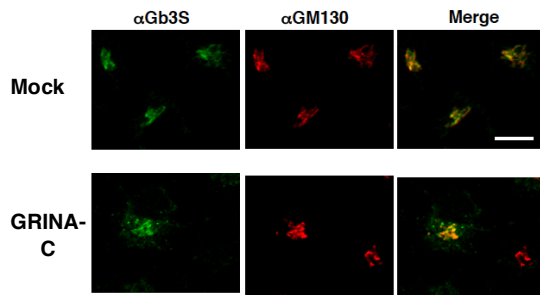


図4. GRINA-Cの過剰発現によるGb3合成酵素の細胞内局在の変化

(9) 得られた成果の国内外における位置づけ及び今後の展望

糖鎖の制御に関しては、多くの場合糖転移酵素の転写制御が中心であるが、本研究により見いだされたGRINA-C及びTMBIMファミリーによるGb3の低下は、Gb3合成酵素の転写後制御機構の存在を示唆するものであり、糖転移酵素が細胞内の環境に直接影響されることを示す重要な知見となった。今後、TMBIMファミリー分子が生理的条件下でGb3合成酵素を制御されるのか、またその結果変化した糖脂質組成が、生理的にどのような影響を及ぼすのかを解明する必要がある。またTMBIMファミリーのmolecular machineryを考える上で、本研究がヒントを与えることを期待している。

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4件)

- ① Yamaji, T., Nishikawa, K., and Hanada, K. “Transmembrane BAX inhibitor motif containing (TMBIM) family proteins perturb a trans-Golgi network enzyme, Gb3 synthase, and reduce Gb3 biosynthesis.” *J. Biol. Chem.*, 285, 35505-35518 (2010) 査読有
- ② Mitsuki, M.\*, Nara, K.\*, Yamaji, T.\*, Enomoto A., Kanno, M., Yamaguchi, Y., Yamada, A., Waguri, S., and Hashimoto, Y. (\*equal contribution) “Siglec-7 mediates non-apoptotic cell death independently of its immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs in monocytic cell line U937.” *Glycobiology*, 20, 395-402 (2010) 査読有
- ③ Hanada, K., Kumagai, K., Tomishige, N., and Yamaji, T. “CERT-mediated trafficking of ceramide.” *Biochim. Biophys. Acta*, 1791, 684-691 (2009) 査読有
- ④ Yamaji, T., Kumagai, K., Tomishige, N., and Hanada, K. “Two sphingolipid transfer proteins,

CERT and FAPP2: Their roles in sphingolipid metabolism.” *IUBMB Life*, 60, 511-518 (2008) 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 奈良清光、三ツ木元章、榎本綾子、菅野真由美、山口芳樹、二川了次、城谷圭朗、山地俊之、山田茜、和栗聡 “糖鎖受容体 Siglec-7 を解する細胞死の分子機構の解明” 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、平成22年12月10日、神戸
- ② Yamaji, T., Nishikawa, K., and Hanada, K. “Globotriaosylceramide (Gb3) is reduced by the expression of hydrophobic polypeptides including TMBIM family: Isolation of Shiga toxin-resistant genes” The 28<sup>th</sup> Naito Conference on Glycan Expression and Regulation [I]、平成22年7月29日、湘南
- ③ Yamaji, T., Nishikawa, K., and Hanada, K. “Globotriaosylceramide (Gb3) is reduced by the expression of hydrophobic polypeptides including TMBIM family: Isolation of Shiga toxin-resistant genes” The 27<sup>th</sup> Naito Conference on Membrane Dynamics and Lipid Biology [I]、平成22年7月1日、札幌
- ④ 奈良清光、菅野真由美、三ツ木元章、山地俊之、山口芳樹、和栗聡、橋本康弘 “Siglec-7を介したU937細胞の細胞死に必要な細胞外領域の同定” 日本生化学会東北支部 第76回例会・シンポジウム、平成22年5月8日、福島
- ⑤ 山地俊之、西川喜代孝、花田賢太郎 “志賀毒素耐性遺伝子の単離” 第82回日本生化学会大会、平成21年10月24日、神戸
- ⑥ 山地俊之、西川喜代孝、花田賢太郎 “志賀毒素耐性遺伝子の単離” 第29回日本糖質学会年会、平成21年9月11日、高山
- ⑦ Ito, S., Ito, N., Tsuchida, A., Tokuda, N., Yagi, H., Kato, K., Mitsuki, M., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Crocker, P.R., and Furukawa K. “Binding specificity of siglec-7 prepared from various animal cell lines” 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、平成20年12月10日、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山地 俊之 (YAMAJI TOSHIYUKI )  
国立感染症研究所細胞化学部・主任研究官  
研究者番号：50332309