

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780304

研究課題名 (和文) スフィンゴ脂質による脂肪細胞機能調節機構の解明

研究課題名 (英文) Study on a regulation system of cellular functions in adiposities by sphingolipids.

研究代表者

光武 進 (MITSUTAKE SUSUMU)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・特任准教授

研究者番号：10344475

研究成果の概要 (和文)：

スフィンゴ脂質は、近年細胞膜マイクロドメインの形成を介して細胞外シグナル伝達の調節因子として様々な細胞機能の調節に深く関与する事が明らかになってきた。私は、細胞膜上の主要なスフィンゴ脂質であるスフィンゴミエリンの合成酵素の一つ SMS2 を欠損したマウスで内蔵脂肪量が有意に低下する事を見だし、そのメカニズムの一つとして caveolin や CD36 等の分子との直接的なインタラクションを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Sphingolipids has been demonstrated to be a lipid mediator in a variety of cellular events as a component of lipid microdomain. In this study, we found that the deficiency of SMS2, one of the sphingomyelin synthase, reduced the visceral fat of the mice. We further demonstrated that the physical interaction among SMS2, caveolin, and CD36 was important for the storage of neutral lipids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：脂質生化学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：セラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ脂質、糖尿病

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドローム該当者は、国内で 940 万人にのぼり、その治療／予防法の開発は社会的急務といえる。メタボリックシンドロームでは、腹腔内脂肪細胞に中性脂質が過剰に蓄積し、それによって脂肪細胞が分泌するサイトカインの恒常性が崩れ、糖尿病、高脂血症、高血圧を引き起こし、これらが相乗的に動

脈硬化症のリスクを高めると考えられる。申請者は、これまでスフィンゴ脂質合成／代謝酵素に関する研究を行ってきた。スフィンゴ脂質は細胞膜を構成する脂質の一群で、近年、細胞膜マイクロドメインの形成を介して細胞外シグナル伝達の調節因子となる事や、その一種であるセラミド (Cer) が脂質セカンドメッセンジャーとして細胞周期の停止やアポトーシ

スの誘導といった細胞機能の調節に深く関与する事が明らかになってきた。我々は、近年、ノックアウトマウスの解析を通して、スフィンゴ脂質関連酵素の機能解析を行っている。その中で、本テーマに関する以下の重要な現象を見いだした。それは、細胞膜上の主要なスフィンゴ脂質であるスフィンゴミエリン (SM) の合成酵素 (SMS) ノックアウトマウスでは内蔵脂肪量が有意に低下する事である。この事は Cer を中心としたスフィンゴ脂質の代謝経路が、メタボリックシンドロームの発症に重要な役割を果たしている事を示唆している。しかしながらこれまでスフィンゴ脂質代謝とメタボリックシンドロームの関係を詳細に研究した例は非常に少なかった。

2. 研究の目的

メタボリックシンドロームは複合的な要因で引き起こされる為に、単一の細胞系での実験のみでは検証が難しく、ノックアウトマウスを使った *in vivo* の実験系と細胞レベルの実験の両方を行い総合的に研究をすすめる事ではじめて正確な研究が行えると考えられる。私は、スフィンゴミエリン合成を中心としたスフィンゴ脂質合成/代謝が、メタボリックシンドロームの発症にどの様に関わっているかを動物個体レベルから細胞レベルまで解析し、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は2年間に渡って行われた。そこで1年目にはノックアウトマウスを用いて、SMS2 がどの様にして、肥満や糖尿病の発症を抑えるか、また、脂肪細胞や肝細胞の機能制御に関与するかを動物レベルで徹底的に検証した。2年目には、1年目に動物レベルで

得られた知見を基に、細胞レベルで SMS2 がメタボリックシンドロームの発症に与えるメカニズムを分子レベルまで解析した。具体的な手法は以下に記す。

<1年目> SMS2 ノックアウトマウスの高脂肪食負荷による内蔵脂肪糖の変化の解析

SMS2 ノックアウトマウスの高脂肪食負荷時の内蔵脂肪重量の変化、血漿生化学検査、脂肪組織及び肝臓等における各種遺伝子発現変動を経時的に調査する。これにより SMS2 ノックアウトマウスで観察された現象が、どのような原因で起こっているのかを動物レベルで明らかにする事を試みた。

<2年目> SMS2 の脂肪細胞機能調節メカニズムの細胞レベルでの解析

SMS1,2 ノックアウトマウス由来繊維芽細胞を単離し、不死化して SMS を全く持たない細胞株を作製した。また、その細胞に SMS1, SMS2 を再導入した細胞を作製し、これらのモデル細胞を用いて1年目に観察された現象を細胞レベルで検証した。特に脂質マイクロドメインに存在するレセプターの機能に注目した解析を行った。

4. 研究成果

1年目は、当該研究のスタートの年とあるので、まず個体レベルでの解析を中心に行った。細胞膜に存在するスフィンゴミエリンの合成酵素の一つである、SMS2 のノックアウトマウスを用いて、生後4週~15週に渡って、60%高脂肪食を投与し、その体重変動等の基礎的な data をとった。その結果、興味深い事に、SMS ノックアウトマウスでは、高脂肪食負荷にも関わらず体重増加が、通常食投与時のレベルまで抑えられていた。さらに、これらのマウスを解剖し、体脂肪等を詳細に調べた結果、肝臓への中性脂質蓄積において、顕著な差がみられた。肝臓は、食事由来脂質の取り込みの他に、自らも脂肪酸の合成を行う事が知られているが、SMS2 のノックアウト

マウスでは、脂肪酸の合成に関わる遺伝子群は活性化されておらず、脂肪酸の取り込みに関与するスカベンジャーレセプターの一つ CD36 の発現に大きな差がみられた。CD36 は、細胞膜上のスフィンゴミエリンに富んだ領域「脂質マイクロドメイン」に存在する事が知られている。

本年度は、本研究課題最終年度であり、細胞レベルの実験でこれらのメカニズムに迫る事が期待された。その結果、COS7 細胞を用いた細胞レベルの実験で以下の 3 つの興味深い事実を見いだした。それは、①SMS2 が細胞膜脂質マイクロドメインに存在する事、②SMS2 と CD36 が直接結合する事、③SMS2 は細胞膜上でスフィンゴミエリン合成能を持つ事、である。これらの結果は、SMS2 が細胞膜上で脂質マイクロドメインのメンテナンス分子として働き、マイクロドメイン上に存在する様々な蛋白質分子の機能制御に関わっている可能性を強く示唆する。本研究で得られた成果は、これまで知られていなかった、マイクロドメインの細胞膜上での構造/機能調節の存在を示しており、大変画期的な知見を含んでいると考えられる。

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 7 件)

1. Ohno Y., Suto S., Yamanaka M., Mizutani Y., Mitsutake S., Igarashi Y., Sassa T., Kihara A.,
ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis.
Proc Natl Acad Sci U S A (2010) **107**(43): 18439-18444. 査読有
2. Mitsutake S., Suzuki C., Akiyama M., Tsuji K., Yanagi T., Shimizu H., Igarashi Y.,
ABCA12 dysfunction causes a disorder in glucosylceramide accumulation during keratinocyte differentiation.
J Dermatol Sci (2010) **60**(2): 128-129. 査読有
3. Mitsutake S., Kumada H., Soga M., Hurue Y., Asanuma F., Nagira M., Deguchi M., Date T., Yokose U., Inagaki Y., Sugiura M., Kohama T., Igarashi Y.,
Ceramide kinase is not essential but might act as an Ca²⁺-sensor for mast cell activation.
Prostaglandins Other Lipid Mediat (2010) **93**(3-4): 109-112. 査読有
4. Tsuji K., Satoh S., Mitsutake S., Murakami I., Park J. J., Li Q., Chang Y. T., Chung S. K., Igarashi Y.,
Evaluation of synthetic sphingolipid analogs as ligands for peroxisome proliferator-activated receptors.
Bioorg Med Chem Lett (2009) **19**(6): 1643-1646. 査読有
5. 沖野望, 谷元洋, 光武進, 吉村征活, 合田初美, 伊東信,
構造から読み解く中性セラミダーゼの触媒機構.
細胞 (2009) **41**(5): 182-185. 査読無
6. 水谷有紀子, 光武進, 五十嵐靖之,
セラミド合成酵素とセラミドリン酸化酵素.
細胞 (2009) **5**(41): 174-177. 査読無
7. Mizutani Y., Mitsutake S., Tsuji K., Kihara A., Igarashi Y.,

Ceramide biosynthesis in keratinocyte
and its role in skin function.
Biochimie (2009) **91**(6): 784-790. 査
読有

[学会発表] (計 3 件)

1. 光武進、横田はづき、座間宏太、山下
匡、岡崎俊朗、渡辺研、五十嵐靖之「ス
フィンゴミエリン合成酵素 2 は、食餌誘
導性脂肪肝形成に關与する」第 83 回日
本生化学会大会 口頭発表 3P-0122
(2010) 12 月 7 日-10 日神戸国際会議場
(神戸)
2. 光武進、五十嵐靖之「セラミドキナー
ゼによるマスト細胞活性調節」第 3 回セ
ラミド研究会学術集会 (2010) 11 月 12
日東京大学 (東京)
3. 光武進、横田はづき、座間宏太、山下
匡、岡崎俊朗、渡辺研、五十嵐靖之「中
性脂質蓄積/代謝に置けるスフィンゴ
ミエリン合成酵素 2 の役割り」
Involvement of sphingomyelin
synthase 2 in neutral lipid metabolism.
第 82 回日本生化学会大会ポスター発表
2P-064 (2009) 10 月 21 日-24 日、神戸
国際会議場 (神戸)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：スフィンゴミエリン合成酵素 SMS2 の生
理機能を応用したメタボリックシンドローム
改善、又は改善薬のスクリーニング方法
発明者：光武進、座間宏太、五十嵐靖之
権利者：国立大学法人北海道大学
種類：特許
番号：特願 2009-219751

出願年月日：平成 21 年 9 月 24 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://biomem.pharm.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

光武 進 (Mitsutake Susumu)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院

・特任准教授

研究者番号：10344475

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし