

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22370054

研究課題名(和文)細胞内セラミド輸送の制御機構

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of intracellular trafficking of ceramide

研究代表者

花田 賢太郎 (HANADA, KENTARO)

国立感染症研究所・細胞化学部・部長

研究者番号：30192701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：細胞内の脂質選別輸送に脂質転移蛋白質の関与が示されつつあるが、当該輸送系の制御の仕組みは未解明である。本研究では、小胞体で合成されたセラミドをゴルジ体へと輸送する蛋白質CERTのセリン315のリン酸化によって、CERTと小胞体膜蛋白質VAPとの相互作用が顕著に増強すること、及び、そのことがセラミドの小胞体-ゴルジ体間輸送を上昇させることを見出した。別の特定部位での脱リン酸化がCERTのゴルジ体会合活性及び膜間セラミド転移活性を高進することも別途明らかにしている。これらの結果から、CERT依存性セラミド輸送は、複数の蛋白質リン酸化・脱リン酸化系の関与によって制御されていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Lipid transfer proteins have been shown to mediate inter-organelle trafficking of various types of lipids in cells. However, mechanisms underlying the regulation of intracellular lipid trafficking remain poorly elucidated. In this research, we found i) phosphorylation at serine 315 of the CERT protein, which mediates transport of ceramide from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi apparatus, strongly enhances the interaction of CERT with the ER-membrane protein VAP, and ii) this phosphorylation up-regulates ER-to-Golgi transport of ceramide. We previously showed that de-phosphorylation at another specific site of CERT up-regulates both activities for inter-membrane transfer of ceramide and Golgi-association of CERT. These results revealed that CERT-mediated ceramide trafficking is regulated by multiple protein kinase/phosphatase systems.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：機能生物化学

キーワード：膜輸送 輸送タンパク質 脂質 セラミド スフィンゴミエリン リン酸化 小胞体 ゴルジ体

1. 研究開始当初の背景

脂質は、生物の基本ユニットである細胞において内外の環境間の境界壁を成す生体膜の主要分子基盤である。さらに、脂質は、重量当たりの酸化エネルギー備蓄が大きく栄養学的にも重要であり、環境からの情報を細胞内へ伝達する際の制御因子としても機能している。

膜脂質が生合成されるとき、異なる細胞内小器官(オルガネラ)の膜で起こる複数のステップを経るために、目的とする場所へ脂質分子自身も的確に移動している。しかし、特定のオルガネラ膜に存在する多種多様な脂質の中から特定の脂質を選びだして他のオルガネラ膜へと運んでいるメカニズムは、どの種類の脂質をとっていてもほとんどわからないままであった。

主要膜リン脂質の一種であるスフィンゴミエリンの生合成では、小胞体で合成されたセラミドが、ゴルジ体に移行してスフィンゴミエリンへと変換される。申請者は、スフィンゴミエリン生合成に異常を有するチャイニーズハムスター卵巣由来 CHO 細胞変異株を複数分離し(Hanada et al 1998 *J Biol Chem*)、その中にセラミド輸送欠損変異細胞 LY-A 株を見出し(Fukasawa et al 1999 *J Cell Biol*; Funakoshi et al 2000 *J Biol Chem*)、さらに、当該変異株の相補遺伝子をクローニングするという手段によって、セラミドの小胞体-ゴルジ体間選別輸送に特異的に関わる分子装置(CERT と命名)の同定に成功した(Hanada et al 2003 *Nature*)。そして、CERT には、セラミドを小胞体から特異的に引き抜き、ゴルジ体に運搬して放出する機能があることを示し、タンパク質の選別輸送形式である膜小胞輸送機構とは全く異なる「分子引き抜き転移」機構でセラミドの選別輸送は行われていることを主張するに至っている(Hanada et al 2003 *Nature*; Kumagai et al 2005 *J Biol Chem*; Kawano et al 2006 *J Biol Chem*; Kudo et al 2008 *PNAS*)。CERT が仲介する膜間セラミド輸送は、今や細胞内脂質輸送のモデル系として注目されているが、CERT 機能がどのように制御されているのかに関してはよくわかっていなかった。

CERT の N 末端領域には phosphatidylinositol-4-monophosphate (PI4P) を認識してゴルジ体へ会合する pleckstrin homology (PH) ドメインを、C 末端領域にはセラミドの膜間転移を触媒する START ドメインを持つ。さらに、それらの中間領域には、小胞体膜タンパク質 VAP と会合する FFAT モチーフを有する。我々は、PH ドメインのすぐ下流に多重リン酸化を受ける部分が存在して、この領域 (serine repeat motif; SRM と命名) が多重リン酸化されると CERT 機能が負に制御されること (Kumagai et al 2007 *J Biol Chem*)、さらに SRM のリン酸化にはカゼインキナーゼ 1 γ 2 が関与していることもすでに明らかにしていた (Tomishige et al 2009

Mol Biol Cell)。一方、SRM とは別の領域にあるセリン残基 S315 においても CERT はリン酸化を受けることが海外の研究グループによる大規模リン酸プロテオーム解析の結果として論文報告された (Olsen et al 2006 *Cell*)。しかし、FFAT モチーフのすぐ上流に位置する S315 のリン酸化が CERT 機能に与える影響は未解明であった。

2. 研究の目的

本研究では、CERT の機能がリン酸化によってどのように制御されるのかを明らかにすることを目的とした。特に、S315 のリン酸化が CERT 機能に与える影響を分子レベルで明らかにすることを具体的な達成目標とした。

3. 研究の方法

(1) CERT pS315 の検出: S315 にリン酸を受けた CERT (CERT pS315) の選択的検出は、抗 CERT pS315 抗体を用いたウエスタンブロット解析で行った。本抗体は、pS315 の周辺ペプチド配列を模したリン酸化合成ペプチドを抗原として作製した。

(2) CERT 変異体の作製: HA エピトープを付加したヒト野生型 CERT cDNA を鋳型にした PCR により、各種変異体を作製した。

(3) 共免疫沈降実験: FLAG エピトープを付加した FL-VAP-A と各種 HA-CERT を HeLa 細胞に同時に発現させ、調整した細胞抽出液を抗 FLAG 抗体または抗 HA 抗体を用いた免疫沈降反応に供した。沈降画分のウエスタンブロット解析により共沈降したパートナーを解析した。

(4) CERT の PI4P 結合活性およびセラミド転移活性: 大腸菌に発現させた CERT 組換え体を精製し、人工膜を用いた PI4P 結合活性およびセラミドの膜間転移活性を解析した。

(5) 小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送活性: CERT 欠損 CHO 細胞株・LY-A 株のセミインタクト細胞を用いて、精製した CERT タンパク質の小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送活性を解析した。

(6) CERT 欠失 HeLa 細胞の作製: ヒト CERT 遺伝子の PH ドメインをコードする第二エクソンを標的とした pTAL コンストラクトを構築し、HeLa 細胞にトランスフェクション後にスフィンゴミエリン結合毒素ライセニンに耐性となった細胞クローンを複数選択した後、CERT 遺伝子座三つ全てで欠失が起こったことをゲノム PCR 解析で確認できた 1 クローンを得た。なお、HeLa 細胞は疑似三倍体の核型を持つため、CERT 遺伝子をノックアウトするには三座に欠失を導入する必要がある。

4. 研究成果

(1) CERT S315 のリン酸化が VAP-A との結合に及ぼす影響: 各種 CERT 変異体と VAP-A とを HeLa 細胞に共発現させて共免疫沈降解析

したところ、CERT S315 のリン酸化疑似的変異体である CERT S315E および CERT 315D は対照の野生型 CERT WT に比べて VAP-A との結合能が顕著に増強していた。この増強は FFAT モチーフとの二重変異で消失した。また、野生型 CERT おいても、CERT 全体に対する pS315 型の割合と VAP-A との共免疫沈する CERT に対する pS315 型の割合を抗 CERT pS315 抗体を用いたウエスタンブロット解析したところ、後者で約 4 倍になっていることがわかった。

(2) CERT S315 のリン酸化が細胞内セラミド輸送に及ぼす影響：大腸菌で発現させて精製した各種 CERT 組換え体について、小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送活性をセミインタクト細胞を用いた再構成系で解析したところ、対照の CERT WT と比べて CERT S315E で高進が見られ、この高進は FFAT モチーフとの二重変異で消失した。一方、人工膜間のセラミド転移活性や PI4P 結合活性ではこれら CERT コンストラクトの間で大きな差はなかった。

(3) スフィンゴ脂質合成阻害による CERT S315 リン酸化の高進：スフィンゴ脂質の特異的阻害剤ミリオンで細胞を処理すると CERT S315 リン酸化が顕著に高進することを見出した。

(4) S315 と SRM の相互依存性：S315 とは別の特定部位である SRM の脱リン酸化が CERT のゴルジ体適合性及び膜間セラミド転移活性を高進することを我々は以前明らかにしている (Kumagai et al 2007 *J Biol Chem*)。そこで、CERT 機能に対するこれら二か所の相互依存性を S132A や S315A といったさまざまな変異体を用いて解析した。その結果、それぞれのリン酸化は他方のリン酸化や脱リン酸化が起こらずとも起こり得ること、S315 のリン酸化と SRM の脱リン酸化は CERT の小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送活性に対して相加的に寄与することを見出した。以上の結果から、CERT の S315 のリン酸化によって、小胞体膜タンパク質 VAP との相互作用が増強し、その結果として小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送が上昇すると結論した。また、CERT の機能制御には、複数のリン酸化・脱リン酸化系が関与していると示唆された。

(5) CERT 遺伝子欠失 HeLa 細胞の作製：我々が以前分離した CERT 欠損 CHO 細胞 LY-A 株ではスフィンゴミエリン合成が大きく損なわれていてもスフィンゴ糖脂質合成にはほとんど影響がないことから、CERT はセラミドをスフィンゴミエリン合成場を選択的に輸送すると提唱していたが、LY-A 細胞 CERT 遺伝子の変異はその PH ドメイン上のミスセンス変異であり、この変異 CERT タンパク質でもスフィンゴ糖脂質合成を支えるのに十分という可能性を厳密には排除できていなかった (Hanada et al 1998 *J Biol Chem*; Hanada et al 2003 *Nature*)。そこで、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞における CERT 遺伝子座に欠失

変異を導入した変化株をゲノム編集技術を用いて取得して解析したところ、CERT 遺伝子欠失 HeLa 細胞においてもスフィンゴミエリン合成は顕著に減少しながらもスフィンゴ糖脂質合成は正常に近いことが観察され、我々の従来の主張を裏付けることができた (Yamaji & Hanada 2014 *PLoS One*)。さらに、グルコシルセラミド合成酵素遺伝子も欠失させた二重変異 HeLa 細胞株も作成した。これら細胞は CERT に関する今後の研究に重要な細胞材料となると期待される。

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 13 件)

英文論文 (全て査読有)

1. Kumagai K, Kawano-Kawada M, and Hanada K (2014) Phosphoregulation of CERT at serine 315 in the interaction with VAMP-associated protein (VAP) for inter-organelle trafficking of ceramide in mammalian cells, *J Biol Chem*, 289, 10748-10760. Doi: 10.1074/jbc.M113.528380
2. Yamaji T, and Hanada K (2014) Establishment of HeLa cell mutants deficient in sphingolipid-related genes by using TALENs, *PLoS ONE*, 9, e88124. Doi: 10.1371/journal.pone.0088124.
3. Hanada K (2014) Co-evolution of sphingomyelin and the ceramide transport protein CERT, *Biochim Biophys Acta*, 1841, 704-719. 10.1016/j.bbali.2013.06.006.
4. Abe M, Makino A, Hullin-Matsuda F, Kamijo K, Ohno-Iwashita Y, Hanada K, Mizuno H, Miyawaki A, and Kobayashi T (2012) A role for sphingomyelin-rich lipid domains in the accumulation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to the cleavage furrow during cytokinesis, *Mol Cell Biol*, 32, 1396-1407. Doi: 10.1128/MCB.06113-11.
5. Sugiki T, Takeuchi K, Yamaji T, Takano T, Tokunaga Y, Kumagai K, Hanada K, Takahashi H, and Shimada I (2012) Structural basis for the Golgi association by the pleckstrin homology domain of the ceramide trafficking protein (CERT), *J Biol Chem*, 287, 33706-33718. Doi: 10.1074/jbc.M112.367730.
6. Hullin-Matsuda F, Tomishige N, Sakai S, Ishitsuka R, Ishii K, Makino A, Greimel P, Abe M, Laviad EL, Lagarde M, Vidal H, Saito T, Osada H, Hanada K, Futerman AH, and Kobayashi T (2012) Limonoid compounds inhibit sphingomyelin biosynthesis by preventing CERT protein-dependent extraction of ceramides from the endoplasmic reticulum, *J Biol Chem*, 287, 24397-24411. Doi:

- 10.1074/jbc.M112.356733.
7. Kumagai K, Nishijima M, and Hanada K (2012) Reconstitution assay system for ceramide transport with semi-intact cells, *Methods Cell Biol*, 108, 117-129. Doi: 10.1016/B978-0-12-386487-1.00006-7.
 8. Elwell CA, Jiang S, Kim JH, Lee A, Wittmann T, Hanada K, Melancon P, and Engel JN (2011) *Chlamydia trachomatis* co-opts GBF1 and CERT to acquire host sphingomyelin for distinct roles during intracellular development, *PLoS Pathog*, 7, e1002198. Doi: 10.1371/journal.ppat.1002198.
 9. Yamaji T, Nishikawa K, and Hanada K (2010) Transmembrane BAX inhibitor motif containing (TMBIM) family proteins perturb a trans-Golgi network enzyme, Gb3 synthase, and reduces Gb3 biosynthesis, *J Biol Chem*, 285, 35505-35518. Doi: 10.1074/jbc.M110.154229.
 10. Sugiki T, Takahashi H, Nagasu M, Hanada K, Shimada I (2010) Real-time assay method of lipid extraction activity, *Anal Biochem*, 399, 162-167. 10.1016/j.ab.2009.12.031.
 11. Kudo N, Kumagai K, Matsubara R, Kobayashi S, Hanada K, Wakatsuki S, and Kato R (2010) Crystal structures of the CERT START domain with inhibitors provide insights into the mechanism of ceramide transfer, *J Mol Biol*, 396, 245-251. Doi: 10.1016/j.jmb.2009.12.029.
 12. Hanada K (2010) Intracellular trafficking of ceramide by ceramide transfer protein, *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 86, 426-437. 和文論文 (査読なし)
 13. 熊谷圭悟、花田賢太郎：効率的な細胞内セラミド輸送の仕組みとその制御、医学の歩み、248, 1125-1131 (2014) [学会発表] (計 2 7 件)
- 国際学会 (招待講演)
1. Hanada K: Introductory remarks for the session of membrane dynamics and Trafficking, Gordon Research Conference on Glycolipid and Sphingolipid Biology, January, 12-17, 2014, Ventura, CA, USA.
 2. Hanada K: Structural biology revealed the serendipity of development of HPA-12, a potent inhibitor of intracellular trafficking of ceramide, FASEB Science Research Conference: Lysophospholipid and other Related Mediators - From Bench to Clinic, August 4-9, Niseko, Japan.
 3. Hanada K: Molecular architecture of CERT for inter-organellar transport of ceramide at the ER-Golgi membrane contact sites, The 14th International Membrane Research Forum, March 15-17, 2013, Kyoto, Japan.
 4. Hanada K: A model of intracellular trafficking of the lipid ceramide, 2012 American Society of Photobiology, June. 23-27, 2012, Montreal, Canada.
 5. Hanada K: Co-evolution of SM and CERT: Diverse lipids may require co-evolution of enzymes and trafficking system, Riken Symposium, Evolution of Lipids, November 8-10, 2012, Saitama, Japan
 6. Hanada K: Intracellular trafficking of ceramide by the ceramide trafficking protein CERT, Commemorative Symposium on the 20th Anniversary of the Mizutani Foundation for Glycoscience, Glycoscience: Diversity and Integration, November 26-27, 2012, Tokyo, Japan.
 7. Hanada K: Introductory remarks for the session of sphingolipid metabolism and Pathology, Gordon Research Conference on Glycolipid and Sphingolipid Biology, April, 21-27, 2012, Ruca, Italy
 8. Hanada K: Intracellular trafficking of ceramide by the ceramide transfer protein CERT. The Annual Fall Scientific Conference of the Korean Society of Lipidology and Atherosclerosis, September 2-3, 2011, Seoul, Korea.
 9. Hanada K: CERT-dependent trafficking of ceramide, The 27th Naito Conference on Membrane Dynamics and Lipid Biology [I], June 29-July 2, 2010, Sapporo. 国際学会 (一般参加)
 10. Yamaji T, and Hanada K: TALEN-mediated disruption of several sphingolipid-related genes in a HeLa cell line, Gordon Research Conference on Glycolipid and Sphingolipid Biology, January, 12-17, 2014, Ventura, CA, USA.
 11. Yamaji T, and Hanada K: TALEN-Mediated Disruption of Sphingolipid-Related Genes in a HeLa Cell Line, 54th International Conference on the Bioscience of Lipids: Linking Transcription to Physiology in Lipidomics, 17-21 September 2013 Bari, Italy.
 12. Hanada K, Sugiki T, Takeuchi K, Tokunaga, Y, Terasawa, H, Kumagai K, Yamaji T, Takahashi, H, Shimada, I: Structural basis for the preferential recognition of phosphatidylinositol 4-monophosphate by the pleckstrin homology domain of the ceramide trafficking protein CERT, 2012 ASBMB Special Symposium, Frontiers in Lipid Biology, September 4-9, 2012, Banff, Canada.
 13. Yamaji T, Nishikawa T, and Hanada K: Globotriaosylceramide (Gb3) is reduced by the expression of hydrophobic polypeptides including TMBIM family: Isolation of Shiga toxin-resistant genes, The 27th Naito Conference on Membrane Dynamics and Lipid Biology [I], June 29-July 2, 2010, Sapporo.
 14. Kudo N, Kumagai K, Matsubara R, Kobayashi S, Wakatsuki S, Hanada K, and

Kato, R: Crystal structures of the CERT START domain in complex with lipid substrates and specific inhibitors provide insights into the molecular mechanisms of ceramide transfer, The 27th Naito Conference on Membrane Dynamics and Lipid Biology [I], June 29-July 2, 2010, Sapporo.

国内学会

15. 花田賢太郎: 細胞内セラミド輸送をつかさどる CERT の発見、第 6 回セラミド研究会学術集会、平成 25 年 11 月 7-8 日、札幌.
16. 山地俊之、花田賢太郎: 遺伝生化学的手法を用いたスフィンゴ糖脂質研究、第 86 回日本生化学会大会、平成 25 年 9 月 11-13 日、横浜.
17. 山地俊之、花田賢太郎: 人工ヌクレアーゼ TALEN を用いた種々のスフィンゴ脂質関連遺伝子の変異株作製、第 32 回日本糖質学会大会、平成 25 年 8 月 5-7 日、大阪.
18. 山地俊之、花田賢太郎: 人工ヌクレアーゼを利用したゲノム編集技術によるスフィンゴ脂質関連遺伝子破壊 HeLa 細胞変異株パネル作成の試み、第 8 回スフィンゴセラミド研究会、平成 25 年 7 月 12-13 日、加賀.
19. 山地俊之、花田賢太郎: 人工ヌクレアーゼを用いた種々のスフィンゴ脂質関連遺伝子の変異株作製、第 55 回日本脂質生化学会大会、平成 25 年 6 月 6-7 日、松島.
20. 花田賢太郎: 膜接触部位を介した宿主細胞セラミドのクラミジア菌寄生胞・封入体への輸送、第 86 回日本生化学会大会、平成 25 年 9 月 11-13 日、横浜.
21. 花田賢太郎: セラミド輸送タンパク質 CERT の分子解析、第 5 回セラミド研究会学術集会、平成 24 年 10 月 11-12 日、東京.
22. 熊谷圭悟、花田賢太郎: セラミド輸送タンパク質 CERT と VAP との相互作用制御、第 85 回日本生化学会大会、平成 24 年 12 月 14-16 日、福岡.
23. Kentaro Hanada, Toshihiko Sugiki, Koh Takeuchi, Yuji Tokunaga, Hiroaki Terasawa, Keigo Kumagai, Toshiyuki Yamaji, Hideo Takahashi, and Ichio Shimada: Structural basis for the recognition of phosphatidylinositol 4-monophosphate by the pleckstrin homology domain of the ceramide trafficking protein CERT, 第 85 回日本生化学会大会、平成 24 年 12 月 14-16 日、福岡.
24. 花田賢太郎: 哺乳動物細胞における膜脂質選別輸送、理化学研究所・基幹研究所・細胞システムコロキウムシリーズ III 膜から探る生命秩序、平成 25 年 1 月 25 日、埼玉.
25. 花田賢太郎: 日本におけるワクチン国家検定制度、バイオロジクスフォーラム第 9 回学術集会、平成 24 年 2 月 22 日、東京.
26. 花田賢太郎、チェリリン・エルウェル、

ジョアン・エンゲル: クラミジア菌の宿主細胞内増殖にセラミド輸送タンパク質 CERT は重要である. 第 54 回日本脂質生化学会大会、平成 24 年 6 月 7-8 日、福岡.

27. Françoise Hullin-Matsuda、富重斉生、牧野麻美、石塚玲子、石井久美子、Elad Lavee Laviad、Anthony Futerman、Michel Lagarde、Hubert Vidal、花田賢太郎、小林俊秀: 抗がん性リモノイドは CERT による小胞体からのセラミドの引き抜きを阻害することによりスフィンゴミエリン合成を阻害する、第 6 回スフィンゴセラミド研究会、平成 23 年 7 月 15-16 日、米子.

[その他]

ホームページ等 (ページ名と URL)

(1) 花田の研究テーマなど

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/from-biochem/3257-2013-02-25-06-28-53.html>

(2) TALEN 技術を用いてのスフィンゴ脂質関連遺伝子の欠損した HeLa 細胞変異株の樹立
<http://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/466-biochemistry/4431-biochem-2014-1.html>

(3) CERT のセリン 315 のリン酸化は、オルガネラ間のセラミド輸送に必要とされる CERT-VAP 間の相互作用を調節する
<http://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/466-biochemistry/4576-biochem-2014-2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花田 賢太郎 (HANADA, Kentaro)
国立感染症研究所・細胞化学部・部長
研究者番号: 30192701

(3) 連携研究者

熊谷 圭悟 (KUMAGAI, Keigo)
国立感染症研究所・細胞化学部・主任研究官
研究者番号: 40443105

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