

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770164

研究課題名(和文)複数回膜貫通タンパクTMBIMファミリーによる糖脂質生合成制御及び分子機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of glycosphingolipids biosynthesis by multi-spanning transmembrane protein family TMBIMs and their molecular machinery

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：本研究では、以前見いだした「TMBIMファミリーによるスフィンゴ糖脂質Gb3生合成の低下」という知見をもとに、このファミリーの1つFAIM2の新たな機能について検討した。その結果、(1)FAIM2がN末側細胞質領域でE3リガーゼのNEDD4ファミリータンパクと相互作用をすること、(2)TMBIMファミリーの膜貫通領域に共通するアスパラギン酸が2つのFAIM2の活性、すなわちFASを介したアポトーシスに対する抑制能及びGb3低下能、に必須であることを明らかにした。一方糖脂質解析の新たな道具として、遺伝子編集法の1つTALEN法を用いて、糖脂質生合成酵素等の遺伝子破壊株の樹立に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I examined new functions of FAIM2, a member of TMBIM family, based on my previous report that TMBIM family members reduced a glycosphingolipid, Gb3. Consequently, I found the following points: (1) FAIM2 interacted with NEDD4 E3 ligase family proteins through the N-terminal cytosolic domain of FAIM2; (2) an aspartate residue that is commonly observed in the multi-spanning membrane domains of TMBIM family was critical for two activities of FAIM2, the inhibitory activity to FAS-mediated apoptosis and Gb3-reducing activity. On the other hand, as a new tool to analyze glycolipid metabolism, I established a series of HeLa cell mutants deficient in sphingolipid-related genes including glucosylceramide synthase using TALENs.

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：スフィンゴ糖脂質 TMBIMファミリー FAIM2

1. 研究開始当初の背景

(1) スフィンゴ糖脂質は、脳神経などの高次機能や糖尿病、感染症などの疾患に深く関与する。機能解明と同時に重要なのが、その代謝制御機構の解明である。特にセラミドやラクトシルセラミド (LacCer) からは、様々な代謝産物が生じる上、それぞれの代謝が異なる細胞内小器官で起こる。そのため代謝酵素の量(mRNA)だけでなく、これら酵素の細胞内局在や糖脂質輸送を制御する因子の同定が、糖脂質の発現制御を理解する上で必要不可欠である。

(2) 以前、糖脂質 Gb3 を受容体とする志賀毒素の細胞死誘導を利用し、発現クローニング法 (cDNA 過剰発現) を用いて、糖脂質代謝・輸送関連遺伝子の同定を試みた。その結果、過剰発現で志賀毒素に耐性を示す新規の cDNA として、Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-associated protein 1 (GRINA) 遺伝子の C 末端側断片をコードする cDNA (GRINA-C と命名) の単離に成功した。この GRINA-C の過剰発現による志賀毒素に対する耐性は、Gb3 合成酵素を直接的、あるいは間接的に阻害し、その結果 Gb3 が低下することに起因する。

(3) GRINA-C の全長である GRINA は機能未知の複数回膜貫通タンパクで、Transmembrane BAX inhibitor motif containing (TMBIM) ファミリー (ヒトでは 6 つの遺伝子) に属する。このファミリーの他のタンパクはもともと抗アポトーシス因子として知られており、例えば FAIM2 は FAS によるアポトーシスを抑制する活性を有する。これらの全長タンパクを過剰発現させた場合、GRINA-C より活性は低いものの Gb3 の低下が見られた。このことより TMBIM ファミリーで糖脂質生合成に対する共通の活性を持っている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

以前見いだした「TMBIM ファミリーによる Gb3 生合成の低下」という上記の知見を踏まえ、TMBIM ファミリー、特に FAIM2 の糖脂質生合成への関与を軸に、TMBIM ファミリーの結合タンパクの同定、他の代謝への影響を探索、及びそのための技術開発を行うことにより、TMBIM ファミリーにおける分子機能を解明することである。

3. 研究の方法

(1) FAIM2 におけるモチーフ検索

TMBIM ファミリーは、相同性に乏しい N 末側の細胞質領域と、ファミリー間で保存されている C 末側の複数回膜貫通領域に分けられる。アミノ酸配列をモチーフ検索したところ、FAIM2 の細胞質領域に WW ドメインと結合する PPXY モチーフを有していた。そこでこの情報をもとに結合タンパクについて

検討した。

(2) TMBIM ファミリーで保存されているアミノ酸の FAIM2 における機能

ファミリー間で保存されている複数回膜貫通領域には、大腸菌から哺乳動物細胞まで保存されているアスパラギン酸残基がある。このアミノ酸の FAIM2 への影響を、アラニン置換により検討した。

(3) GRINA-C、FAIM2 と Gb3 合成酵素の細胞内での相互作用

以前免疫沈降法で GRINA-C と Gb3 合成酵素 (A4GalT) の結合を確認したが、実際細胞内で相互作用しているか不明であった。そこで BiFC 法 (bi-molecular fluorescent complementation 法) を用いて GRINA-C 及び FAIM2 と A4GalT との結合を検討した。

(4) 糖脂質解析のツールとしてのゲノム編集法 TALEN の導入

培養細胞による遺伝子の機能解析の場合、簡便である RNAi による遺伝子ノックダウンが主流であるが、糖鎖や脂質は二次代謝産物であるため、責任遺伝子の mRNA の減少ほど糖鎖や脂質が減少しない場合がある。そこでゲノム編集法 TALEN 法を導入し、糖脂質関連遺伝子のノックアウト培養細胞を作製した。

4. 研究成果

(1) FAIM2 と NEDD4 ファミリーとの結合

FAIM2 の N 末側細胞質領域には、ユビキチン E3 リガーゼ NEDD4 ファミリーの WW ドメインと結合しうる PPXY モチーフを有する。そこで FAIM2 過剰発現 HeLa 細胞に NEDD4 ファミリーの 1 つ NEDD4-2 を発現し、免疫沈降法を行った。その結果 NEDD4-2 が結合することを明らかにした。またこの結合は内在性 NEDD4-2 においても見られた。FAIM2 の PPXY モチーフのうちチロシンをアラニン置換した変異体は、NEDD4-2 との結合が失われことより、この結合は PPXY モチーフ依存性であることが確認された。ただしこの変異体、もしくは N 末側細胞質領域を欠いた FAIM2 (deltaN) を発現させても、野生型と同じように Gb3 の低下及び FAS によるアポトーシスの抑制が見られた。つまり FAIM2 の N 末側細胞質領域は、FAIM2 の活性そのものではなく、発現調節等別の機能があると推察される。今後さらに NEDD4 ファミリーとの関連について解明する必要がある。

(2) TMBIM ファミリーの膜貫通領域に共通するアスパラギン酸の FAIM2 における機能

TMBIM ファミリーは膜貫通領域で大腸菌から哺乳動物細胞まで保存されているアミノ酸が存在する。その中の 1 つのアミノ酸に注目し、FAIM2 の膜貫通領域のアスパラギン酸残基をアラニン置換したところ、Gb3 生合

成低下能及び FAS アポトーシス抑制能の両機能が大幅に失われることを明らかにした。このアミノ酸を含む領域は TMBIM ファミリー間で特に保存されている領域であり、このファミリーがどのような分子装置であるのかを探る上での突破口となると考えられる。

(3) GRINA-C、FAIM2 と Gb3 合成酵素との結合

GRINA-C、FAIM2 と Gb3 合成酵素 (A4GalT) との結合が実際細胞内で結合するかについて、BiFC 法 (bi-molecular fluorescent complementation 法) を用いて検討した。GRINA-C と FAIM2 の C 末端に Kusabira-GFP の一部を、A4GalT の N 末端 (細胞質側) に Kusabira-GFP のもう一部を融合させ、HeLa 細胞に発現した。蛍光シグナルを FACS で確認したところ、GRINA-C において A4GalT との結合がみられた。また FAIM2 においても、若干ではあるがシグナルが見られた。この蛍光強度の違いは以前免疫沈降法で示した傾向と同じであった。このことは GRINA-C あるいは FAIM2 と A4GalT が結合することを確認出来たのと同時に、GRINA-C 及び FAIM2 の C 末端が細胞質側に向いていることを示している。

(4) GRINA の splicing variant 解析

HeLa 細胞において、GRINA の splicing variant (全長) をクローニングし、それらを細胞に強制発現させたところ、その cDNA のうち 1 つは強い Gb3 低下能を有していた。この cDNA は NCBI の Data base (Aceview) に登録されているものであるが、発現させるとさらに splicing を起こして GRINA-C を発現することが明らかとなった。今後実際にこのような re-splicing があるかその有無を検討する必要がある。

(5) TALEN 法の導入

新たな糖脂質代謝の知見を得るためのツールとして、遺伝子編集法の一つ、TALEN 法の導入を行った。Open Resource となっている Golden Gate TALEN and TAL effector Kit を入手し、論文等を参考に TALEN 発現ベクターの改変等を行った。その結果、培養細胞において高効率な遺伝子編集の実現に成功した。これを使用することで、HeLa 細胞において糖脂質合成の鍵酵素であるグルコシルセラミド合成酵素 *UGCG* をはじめ、*CERT* gene、*B4GalT5* の遺伝子破壊株、さらには *UGCG* と *CERT* gene の二重破壊株の樹立に成功した (図 1 参照)。これらの細胞株は様々なスフィンゴ脂質発現株のいわば“細胞パネル”として、糖脂質研究に今後大きく貢献するものと考えられる。

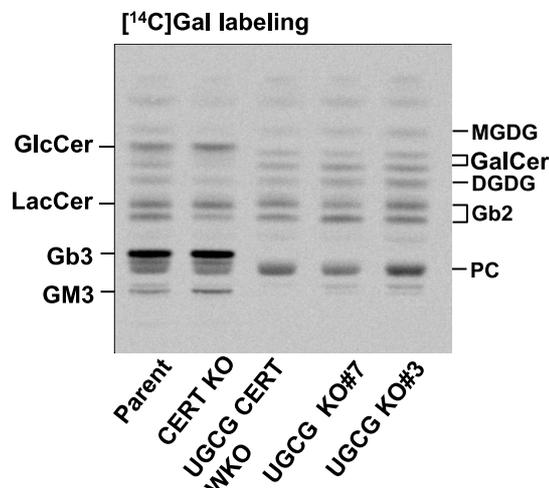


図1 UGCG欠損HeLa細胞の糖脂質組成解析

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 6 件)

Yamaji T, Hanada K. “Establishment of HeLa cell mutants deficient in sphingolipid-related genes using TALENs.” *PLoS One*, 9, e88124 (2014) 査読有

Kukimoto I, Maehama T, Sekizuka T, Ogasawara Y, Kondo K, Kusumoto-Matsuo R, Mori S, Ishii Y, Takeuchi T, Yamaji T, Takeuchi F, Hanada K, Kuroda M. “Genetic variation of human papillomavirus type 16 in individual clinical specimens revealed by deep sequencing.” *PLoS One*, 8, e80583 (2013) 査読有

Sabit I, Hashimoto N, Matsumoto Y, Yamaji T, Furukawa K, Furukawa K. “Binding of a sialic acid-recognizing lectin Siglec-9 modulates adhesion dynamics of cancer cells via calpain-mediated protein degradation.” *J Biol Chem*, 288, 35417-27 (2013) 査読有

Sugiki T, Takeuchi K, Yamaji T, Takano T, Tokunaga Y, Kumagai K, Hanada K, Takahashi H, Shimada I. “Structural basis for the Golgi association by the pleckstrin homology domain of the ceramide trafficking protein (CERT).” *J Biol Chem*, 287, 33706-18 (2012) 査読有

Miyazaki K, Sakuma K, Kawamura YI, Izawa M, Ohmori K, Mitsuki M, Yamaji T, Hashimoto Y, Suzuki A, Saito Y, Dohi T, Kannagi R. “Colonic epithelial cells express specific ligands for mucosal macrophage immunosuppressive receptors siglec-7 and -9.” *J Immunol*, 188, 4690-700 (2012) 査読有

Yamaji T, Yamaguchi Y, Mitsuki M, Takashima S., Waguri S., Hashimoto Y., Nara K. “3D Modeling of a Natural Killer

Receptor, Siglec-7: Critical Amino Acids for Glycan-Binding and Cell Death-Inducing Activity” 『*Modeling and Simulation in Engineering*』, *INTECH* ISBN: 978-953-307- 959-2, 103-116 (2012) 査読有

[学会発表](計 13 件)

Yamaji T, Hanada K. “TALEN-Mediated Disruption of Sphingolipid-Related Genes in a HeLa Cell Line.” Gordon Research Conference on Glycolipid and Sphingolipid Biology, January 12-17, 2014, Ventura, USA

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、2013 年 9 月 11-13 日、横浜

Yilihamujiang S, Hashimoto N, Matsumoto Y, Hashimoto Y, Yamaji T, Furukawa K, Furukawa K. “Biding of Siglec-9 to the counter-receptors on cancer cells regulates adhesion dynamics via protease-mediated degradation of focal adhesion kinase (FAK).” 第86回日本生化学会大会、2013年9月11-13日、横浜

Yamaji Y, Hanada K. “TALEN- Mediated Disruption of Sphingolipid-Related Genes in a HeLa Cell Line.” 54th International Conference on the Bioscience of Lipids, September 17-21 2013, Bari, Italy

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 3 2 回日本糖質学会年会、2013 年 8 月 5-7 日、大阪

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 回スフィンゴセラピー研究会、2013 年 7 月 12-13 日、金沢

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、2013 年 6 月 6-7 日、松島

花田賢太郎、杉木俊彦、竹内恒、山地俊之、高野等覚、徳永祐二、熊谷圭吾、高橋栄夫、嶋田一夫 “セラミド輸送タンパク質 CERTのプレクストリン相同ドメインによるホスファチジルイノシトール4-リン酸認識の構造基盤” 第85回日本生化学会大会、2012年12月14-16日、福岡

南部今日子、橋本登、伊藤静香、山地俊之、橋本康弘、古川圭子、古川鋼一 “podocalyxin 上の O-glycan は癌の免疫逃避を促進する” 第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14-16 日、福岡

櫻井祐介、山地俊之、花田賢太郎、樺山一哉 “糖脂質再構成細胞における膜流動性と成長因子受容体の関連” 第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14-16 日、福岡

Nara K, Mitsuki M, Yamaji T, Enomoto A,

Kanno M, Yamaguchi Y, Yamada Y, Waguri S, Hashimoto Y. “Siglec-7 induces non-apoptotic cell death of U937” The 31th Naito Conference on Glycan expression and Regulation [II], September 13-16, 2011, Sapporo

山地俊之、西川喜代孝、花田賢太郎 “TMBIM ファミリーの糖脂質合成への影響とその制御機構” 第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 21-24 日、京都

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を介する細胞死の分子機構の解明” 第84回日本生化学会大会、2011年9月21-24日、京都

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：5 0 3 3 2 3 0 9