

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590285

研究課題名(和文)小腸上皮細胞におけるセラミド骨格の多様性と生物機能

研究課題名(英文)Biological role of ceramide structure of glycosphingolipids in the small intestinal epithelial cells

研究代表者

松田 純子(Matsuda, Junko)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：60363149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：小腸上皮細胞には、スフィンゴシン塩基のC4位と脂肪酸のC2位に水酸基が付加したフィトセラミド構造を持つスフィンゴ糖脂質(GSL)が豊富に存在する。本研究では、フィトセラミド構造の生物機能を解明するために、小腸上皮細胞に発現する新規の脂肪酸C2水酸化酵素の同定を目指した。野生型マウスの小腸では、既知の脂肪酸C2水酸化酵素FA2Hの発現が認められず、FA2H欠損マウスの小腸には、水酸化脂肪酸(hFA)を含むGSLが野性型マウスと同様に検出されたことから、小腸上皮細胞にはセラミド骨格の脂肪酸を水酸化する未知の脂肪酸水酸化酵素が存在していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Glycosphingolipids (GSLs) are components of eukaryotic cell membranes. Thousands of different GSLs have been reported due to the structural diversity of their head-group sugar chain and backbone sphingosine base and fatty acid. In the mammalian small intestinal epithelial cells, phytoglycosphingolipids with an additional hydroxyl group at sphinganine C-4 and fatty acid C-2 (t18:0/ hFA) expressed abundantly. In this study, we tried to identify the second enzyme that can produce 2-hydroxy fatty acid in the small intestinal epithelial cells. In the wild-type mice, the mRNA level of only known fatty acid C-2-hydroxylase (Fa2h) was almost undetectable in the small intestine. In the FA2H deficient mice, 2-hydroxy fatty acid containing GSLs were detected in the equal level of wild-type mice. These findings indicate that the second enzyme that can produce 2-hydroxy fatty acid should exist in the small intestinal epithelial cells.

研究分野：脂質生物学

キーワード：スフィンゴ糖脂質 セラミド骨格 構造多様性 小腸上皮細胞 脂肪酸水酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ糖脂質 (GSL) は生体膜の outerleaflet に存在する脂質成分の一つで、近年、細胞内外のシグナル伝達にかかわる生体膜上の超分子構造「ミクロドメイン」を構成する成分として注目を集めている。GSL は親水性の糖鎖部分と疎水性のセラミド骨格から構成され、組織、細胞、発達段階別に数千種類に及ぶ構造多様性がある。糖鎖部分の多様性は、糖転移酵素の発現制御によりもたらされ、種々の糖転移酵素遺伝子のノックアウトマウスの解析によってその生物機能が明らかになりつつある。一方、セラミド骨格はスフィンゴシン塩基と脂肪酸から構成され、現在までに、スフィンゴシン塩基 Δ4 位の不飽和化には Dihydroceramide Δ4-desaturase (DES1) が (Ternes P et al, J Biol Chem, 2002)、スフィンゴシン塩基 C4 位の水酸化には Dihydroceramide: sphinganine C4-hydroxylase (DES2) が (Omae F et al, Biochem J, 2004)、脂肪酸 C2 位の水酸化には Fatty acid 2-hydroxylase (FA2H) が (Alderson NL et al, J Biol Chem, 2004) 関与し、主として、4 種類のセラミド骨格の多様性 (d18:1/FA, d18:1/hFA, t18:0/FA, t18:0/hFA) が組織特異性を持ってもたらされることが示されている。脂肪酸の C2 位に水酸基を持つ d18:1/hFA 構造は哺乳動物では中枢および末梢神経系の髄鞘に豊富に存在する。最近、FA2H ノックアウトマウス (*Fa2h*^{-/-}) (Zoller I et al, J Neurosci, 2008, Potter KA et al, Glia, 2011) と、ヒトの FA2H 欠損症 (Edvardson S et al, Am J Hum Genet, 2008) が、共に脱髄を伴う神経変性疾患を発症することが報告された。これらの結果は、d18:1/hFA 構造が髄鞘の形態、機能に必須であることを示しており、セラミド骨格の重要性が注目されている。

哺乳動物の小腸上皮細胞は GSL に富み、そのセラミド骨格は、他の組織では極めて微量成分である、スフィンゴシン塩基の C4 位と脂肪酸の C2 位に一か所ずつ水酸基が付加した、フィトセラミドと呼ばれるユニークな構造 (t18:0/hFA) を持つ。マウスの小腸では、フィトセラミド構造 (t18:0/hFA) を持つ GSL が 90%以上を占めることから (Suzuki A et al, J Biochem, 1981)、セラミド骨格の水酸化は小腸上皮細胞において重要な生物機能を担っていると考えられる。

2. 研究の目的

ヒト、マウスをはじめ多くの哺乳動物の小腸上皮細胞におけるフィトセラミド構造 (t18:0/hFA) の生物機能を解明するために、小腸上皮細胞に発現している新規の脂肪酸 C2 水酸化酵素を同定し、そのノックアウトマウスを作製して、その生物機能を解明する。得られた成果により、活発な消化吸収機能を担う小腸上皮細胞膜の極性形成や膜輸送システムにおける膜脂質の役割を明らかにでき、

医学的にも未知の疾患の発見や治療法開発が期待できる。

3. 研究の方法

マイクロアレイ法による遺伝子発現解析により、小腸上皮細胞に発現する新規脂肪酸 C2 水酸化酵素の探索を行う。マウスの小腸に特異的に高発現している遺伝子をピックアップし、タンパク質配列のデータベースを用いてモチーフ・ドメイン検索を行い、候補遺伝子を絞り込む。各候補遺伝子をクローニングし、新規の脂肪酸 C2 水酸化酵素遺伝子を同定する。次いで、新規脂肪酸 C2 水酸化酵素遺伝子のノックアウトマウスを作成し、表現型解析を行う。さらに、*Des2* ノックアウト (*Des2*^{-/-}) マウスとの交配実験により、フィトセラミド構造 (d18:1/hFA) を欠損したダブルノックアウトマウスを作製し、表現型解析を行う。各ノックアウトマウスから小腸上皮細胞の培養細胞を樹立し、共焦点顕微鏡を用いた FRAP 解析などにより、膜の流動性や、膜タンパク質の動態解析を行う。上述の研究により、活発な消化吸収機能を担う小腸上皮細胞膜の極性維持や膜輸送システムにおける膜脂質の役割を明らかにし、生体膜の機能発現の基本原則の理解に展開する。

4. 研究成果

1) 野性型マウス消化管における GSL の構造解析と *Des1*、*Des2*、*Fa2h* の発現解析

薄層クロマトグラフィー - 質量分析 (TLC-MS) の結果、食道や胃では d18:1/FA を持つものが大部分であったが、小腸、虫垂、大腸では、t18:0/hFA を持つものが大部分で、物質吸収に関わる部位ほど水酸基の数が多くなる傾向を見出した。

リアルタイム RT-PCR による脳、腎臓、消化管における *Des1*、*Des2*、*Fa2h* の mRNA の発現解析の結果、*Des1* は食道、胃に強く発現し、*Des2* は小腸、大腸に強く発現していた。*Fa2h* は脳、腎臓、食道、胃、大腸に強く発現しているのに対し、小腸には全く発現が認められなかった。この結果は、TLC-MS による各部位の GSL の構造解析の結果と相関していた。一方、*Fa2h* は胃、虫垂、大腸に強く発現しているのに対し、興味深いことに小腸には予想外に全く発現が認められず、小腸の GSL の脂肪酸部分の大部分が hFA とする TLC-MS の結果と一致しなかった。

野性型マウスと *Des2*^{-/-} マウスの mRNA 発現解析の結果、*Des1* は発現の差を認めなかったが、*Des2* は *Des2*^{-/-} マウスで有意に減少していた。*Fa2h* は、食道と虫垂、大腸で *Des2*^{-/-} マウスで有意に発現が上昇していた。

2) *Des2*^{-/-} マウスおよび *Fa2h*^{-/-} マウス消化管における GSL の構造解析

Des2^{-/-} マウスおよび *Fa2h*^{-/-} マウス消化管

における GSL の構造を TLC-MS により解析した。hFA セラミドの場合、特徴的なピークが表れることを利用した。その結果、*Des2*^{-/-}マウスの小腸、大腸ではフィトセラミド (t18:0/hFA) 由来の t18:0-Hex (hexose) や t18:0-Hex-Hex のピークが検出されず、代わりにジヒドロセラミド (d18:0/hFA) 由来の d18:0-Hex や d18:0-Hex-Hex のピークが検出された。よって、*Des2*^{-/-}マウスでは、フィトセラミドがいずれの部位でも欠損しており、DES2 はマウスにおいて唯一の dihydroceramide:sphinganine C4-hydroxylase であることが明らかになった。

Fa2h^{-/-}マウスの食道と胃では、d18:1-Hex のピークが検出されず、hFA セラミドが欠損していると考えられた。一方、興味深いことに小腸、虫垂、大腸では、t18:0/hFA、d18:0/hFA および d18:1/hFA が野性型マウスと同様に検出された。この結果と、*Fa2h* の RNA およびタンパク質の発現が小腸において検出されなかった結果を考え合わせると、マウス消化管における hFA-GSL の合成は食道、胃では FA2H が、小腸、虫垂、大腸では未知の脂肪酸水酸化酵素が関与していることが明らかになった。

3) *Des2*^{-/-}マウスおよび *Fa2h*^{-/-}マウス消化管の表現型解析

Des2^{-/-}マウスは、メンデルの法則に従って出生してくるが、2週間前後で死亡する早期死亡群と寿命が1年以上の軽症群の大きく異なる2つの表現型が観察された。組織病理学的解析の結果、小腸上皮細胞の形態変化、頂端膜に存在する微絨毛の低形成、頂端膜に存在すべき膜タンパク質の局在変化を認めた。免疫組織染色では、小腸上皮細胞の頂端膜の主要な GSL である GA1 と輸送体タンパク質の局在に変化を認めた。*Des2*^{-/-}マウスでは、小腸上皮細胞の形態変化や、が、表現型の不均一性が問題点として残った。マウスの遺伝的背景の違い、遺伝子破壊に用いた挿入遺伝子のエピジェネティックな影響、他の GSL 代謝経路による代償機構などを考慮した更なる表現型解析の必要がある。*Des2*^{-/-}マウスで *Fa2h* の RNA 発現が有意に上昇していたことはフィトセラミドの欠損を補う代償機構かもしれない。これらの結果から、フィトセラミドが小腸上皮細胞の形態や機能の維持に必要であることが示唆された。

Fa2h^{-/-}マウスの一般染色による光学顕微鏡レベルの組織病理学的解析では、消化管組織の形態に大きな変化は見出されなかった。しかし、総脂質の TLC 分析の結果、7ヶ月齢の *Fa2h*^{-/-}マウスにおいてトリアシルグリセロールや遊離脂肪酸の有意な減少が見出された。これらの結果は食道および胃における hFA-GSL の欠損、あるいは大腸における FA2H の欠損が脂肪の消化吸収や代謝に必要なことを示唆しており、より詳細な解析

が必要である。

4) 新規脂肪酸 C2 水酸化酵素の探索

我々は、食道および胃の一部は扁平上皮細胞から構成されるのに対し、小腸、大腸は一層の円柱状吸収上皮細胞から構成されていることから、未知の酵素は吸収上皮細胞に特異的に発現し、*Fa2h*^{-/-}マウスの脳組織には hFA セラミドが欠損していることから、この遺伝子は脳組織には発現していないと推定した。

そこで、マイクロアレイ法により、マウスの小腸組織と脳組織との間の遺伝子発現解析を行い、発現レベル、発現差等により小腸に特異的に高発現している遺伝子を選別した。次いで、タンパク質配列のデータベース (UniProtKB, MOTIF, PROSITE, PRINTS, ProDom, Pfam など) を用いて、現在までに知られている脂肪酸水酸化酵素の特徴、小胞体膜結合性である、チトクローム b5 ファミリー、鉄結合ドメイン ([FY]-[LIVMK]-{}-{}-[Q]-H-P-[GA]-G) を持つ、ヒスチジンに富んだ領域であるヒスチジンボックス (HXXXH, HXXXXH, HXX HH, HXXXXH 等) を有する、などの共通点を持つモチーフ・ドメイン検索を行い、候補遺伝子を絞り込んだ。各候補遺伝子をクローニングし、CHO-K1 細胞に発現させ、TLC による脂肪酸水酸化酵素活性測定を行った。まず、脂肪酸水酸化酵素に共通のモチーフ配列を持ち、小腸での発現が高く、小胞体に局在する Protein X の発現ベクターを CHO-K1 細胞に導入して安定発現株を得たが、残念ながら現時点では脂肪酸水酸化酵素活性を確認できていない。まず、検出感度が低かった可能性を考え、より感度の高い GC/MS を用いた脂肪酸水酸化酵素活性のアッセイ系 (Alderson NL et al, J Lipid Res, 2005) の確立を行っている。

今回候補遺伝子とした Protein X はタンパク質配列のデータベースを用いたモチーフ・ドメイン検索により脂肪酸水酸化酵素に共通のモチーフ配列を持ち、脳での発現が低いのに対して小腸での発現が高く、小胞体に局在することから、候補遺伝子として有望と考えたが、脂肪酸水酸化酵素活性を見出せなかった。一方、新規脂肪酸水酸化酵素遺伝子は既知の脂肪酸水酸化酵素に存在するモチーフ配列を持っていない可能性もある。

今後は、小腸上皮細胞に発現する新規の脂肪酸 C2 水酸化酵素の同定のためのアッセイ系の改良することが必須である。また、小腸上皮細胞とオリゴデンドログリアの培養細胞間のマイクロアレイ遺伝子発現解析の結果を用いて、小腸上皮細胞に特異的に高発現している遺伝子群を網羅的に探索する計画も立てている。

新規の脂肪酸 C2 水酸化酵素の同定後は、その基質特異性、細胞内局在、発現分布などの特性決定を行い、次いでノックアウトマウスを作製して、小腸上皮細胞および尿管上皮細胞の形態変化、機能変化を解析する。

我々の研究室では、スフィンゴシンの C4 位の水酸基 (t18:0) を欠損している、*Des2*^{-/-}マウスの解析を世界に先駆けて行っており、*Des2*^{-/-}マウスとの交配実験により、セラミド骨格の 2 か所の水酸基を共に欠損したダブルノックアウトマウスを作製し表現型解析を行う。ダブルノックアウトマウスではフィットセラミド構造 (t18:0/hFA) を完全に欠損するため、*Des2*^{-/-}マウスに不均一に見いだされた表現型が均一に観察され、小腸上皮細胞膜におけるセラミドの構造多様性の生物機能を解明できると予想される。

本研究により、消化管においてもセラミド骨格の構造が重要であることが示された。スフィンゴ糖脂質の研究は糖鎖の多様性とその機能解明に重点がおかれてきたが、今後は脂質部位であるセラミドの構造の重要性にも注目が集まると考えられる。新規脂肪酸水酸化酵素の同定と *Des2*^{-/-}マウスの表現型から小腸上皮細胞の極性形成や輸送体タンパク質の発現制御における膜脂質の生物機能を解明できると考えている。

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 5 件)

1) Yoneshige A, Muto M, Watanabe T, Hojo H, Matsuda J. (2015) The effects of chemically synthesized saposin C on glucosylceramide- β -glucosidase. *Clin Biochem.* 48:1177-1180. (査読有)

2) Murakami I, Mitsutake S, Kobayashi N, Matsuda J, Suzuki A, Shigyo T, Igarashi Y. (2013) Improved high-fat diet-induced glucose intolerance by an oral administration of phytosphingosine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77:194-197. (査読有)

3) Hojo H, Tanaka H, Hagiwara M, Asahina Y, Ueki A, Katayama H, Nakahara Y, Yoneshige A, Matsuda J, Ito Y, Nakahara Y. (2012) Chemoenzymatic synthesis of hydrophobic glycoprotein: synthesis of saposin C carrying complex-type carbohydrate. *J. Org. Chem.*, 77:9437-9446. (査読有)

4) Hisaki H, Matsuda J, Tadano-Aritomi K, Uchida S, Okinaga H, Miyagawa M, Tamamori-Adachi M, Iizuka M, Okazaki T. (2012) Primary polydipsia, but not accumulated ceramide, causes lethal renal damage in saposin D-deficient mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 303: F1049-1059. (査読有)

5) Toyofuku T, Nojima S, Ishikawa T, Takamatsu H, Tsujimura T, Uemura A, Matsuda J, Seki T, Kumanogoh A. (2012) Endosomal sorting by

Semaphorin 4A in retinal pigment epithelium supports photoreceptor survival. *Genes Dev.* 26:816-829. (査読有)

[学会発表](計 12 件)

1) 松田純子 : スフィンゴ脂質の構造多様性が担う生物機能 . 東北薬科大学 分子生体膜研究所セミナー (招待講演) 2015 年 12 月 14 日 仙台 (東北薬科大学).

2) 松田純子, 小野公嗣, 鈴木衣子, 鈴木明身 : フィトスフィンゴ脂質欠損マウス中枢神経系の病態解析 .BMB2015 (第 87 回日本生化学会大会と第 38 回日本分子生物学会年会の合同大会) 2015 年 12 月 1-4 日 神戸 (神戸国際会議場).

3) 松田純子 : スフィンゴ糖脂質の機能と疾患 - 遺伝子改変マウスから見えてきた生物機能 - . 倉敷ファブリー病セミナー (招待講演) 2015 年 11 月 26 日 倉敷 (倉敷スウィートタウン).

4) 松田純子 : スフィンゴ脂質代謝異常症の基礎と臨床 . 第 5 回 岡山ライソゾーム病セミナー (特別講演) 2015 年 11 月 12 日 岡山 (岡山コンベンションセンター).

5) 松田純子, 小野公嗣, 渡辺 昂, 鈴木明身 : スフィンゴ糖脂質セラミド骨格の構造多様性が担う生物機能の解明 . 第 20 回日本ライソゾーム病研究会 2015 年 10 月 2-3 日 東京 (慈恵医科大学).

6) Matsuda J, Ono K, Watanabe T, Yoneshige A, Muto M, Suzuki A. : Central nervous system pathology in the phytosphingolipid-deficient mouse. 25th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry. August 23-27, 2015, Cairns, Australia (Cairns Convention Center).

7) 松田純子 : スフィンゴ糖脂質の機能と疾患 - 遺伝子改変マウスから見えてきたこと - 第 9 回香川先天代謝異常症研究会 (招待講演) 2014 年 11 月 7 日 高松 (JR ホテルクレメントホテル高松).

8) 渡辺昂, 米重あづさ, 小池礼華, 武藤真長, Hama,H., 鈴木明身, 松田純子 : スフィンゴ糖脂質セラミド骨格の構造多様性と生物機能に関する研究 . 第 54 回 日本脂質生化学会 2012 年 6 月 7-8 日 福岡 (九州大学医学部百年講堂).

9) Yoneshige A, Mutou M, Watanabe T, Tano C, Hojo H, Matsuda J. The effects of chemically synthesized saposin C on glucosylceramide- β -glucosidase. The 26th International Carbohydrate Symposium (ICS2012), P611, July, 22-27, 2012,

Madrid, Spain (Melia Castilla Hotel).

10) Matsuda J, Watanabe T, Yoneshige A, Koike A, Mutou M, Suzuki A. Role of hydroxylation at sphinganine C-4 of glycosphingolipids in the mouse. The 26th International Carbohydrate Symposium (ICS2012), P583, July, 22-27, 2012, Madrid, Spain (Melia Castilla Hotel).

11) Yoneshige A, Hojo H, Mutou M, Matsuda J. The activity of chemically synthesized saposin C on glucosylceramide- β -glucosidase 第4回国際ライソゾーム病フォーラム 第17回日本ライソゾーム病研究会2012年10月4-6日 東京(慈恵医科大学).

12) 米重あづさ、北條裕信、武藤真長、松田純子: 化学合成サポシンCのグルコシルセラミド β グルコシダーゼ活性への影響. 第85回日本生化学会大会2012年12月14-16日 福岡(福岡国際会議場).

〔図書〕(計7件)

1) 松田純子: 糖鎖蓄積症. 糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック. - 創薬・医療から食品開発まで - (株)エヌ・ティ・エス 2015年8月12日発行 p.215-220. (査読有)

2) 松田純子: シアリドーシス 神経症候群. 日本臨牀. 2014年6月20日発行別冊 p.792-795. (査読有)

3) 松田純子: シアリドーシス. 先天代謝異常ハンドブック. 中山書店. 2013年3月発行. p.212-213. (査読有)

4) 松田純子: シアリドーシス. 先天代謝異常症候群 第2版(下) - 病因・病態研究、診断・治療の進歩 -. 日本臨牀. 2012年12月20日発行別冊 p.580-583. (査読有)

5) 松田純子、米重あづさ: サポシンC 欠損症. 先天代謝異常症候群 第2版(下) - 病因・病態研究、診断・治療の進歩 -. 日本臨牀. 2012年12月20日発行別冊 p.518-522. (査読有)

6) 松田純子、米重あづさ: サポシンB 欠損症. 先天代謝異常症候群 第2版(下) - 病因・病態研究、診断・治療の進歩 -. 日本臨牀. 2012年12月20日発行別冊 p.513-517. (査読有)

7) 松田純子、米重あづさ: サポシンA 欠損症. 先天代謝異常症候群 第2版(下) - 病因・病態研究、診断・治療の進歩 -. 日本臨牀. 2012年12月20日発行別冊 p.508-512. (査読有)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/med/study/info.php?id=211>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 純子 (MATSUDA JUNKO)

川崎医科大学・病態代謝学・教授

研究者番号: 60363149

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし