

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770198

研究課題名(和文)細胞内エネルギーセンサーAMPKによる糖脂質合成制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the regulating mechanism of glycolipid synthesis by intracellular energy sensor AMPK

研究代表者

石橋 洋平(Ishibashi, Yohei)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90572868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：グルコース1分子とセラミドから構成される糖脂質グルコシルセラミド(GlcCer)の合成量の制御機構は不明である。本研究では、細胞内エネルギーセンサーであるAMP-activated protein kinase (AMPK)によるGlcCer量制御機構の解明を目指した。その結果、AMPKはGlcCer量を負に制御することが判明した。その詳細を検証した結果、AMPK活性化によりGlcCerの前駆物質であるUDP-グルコースが減少すること、その分解酵素がAMPKによるリン酸化修飾を受けることを見出した。GlcCerの過剰蓄積を原因とする病気に対する、新しい薬剤ターゲットとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The amount of cellular glucosylceramide (GlcCer) needs to be regulated in an appropriate level because the abnormal accumulation of GlcCer causes several diseases such as Gaucher's disease and Parkinson's disease. However, insights into how cells regulate GlcCer level are yet to be clarified. AMP-activated protein kinase (AMPK), which is a crucial cellular energy sensor, regulates glucose and lipid metabolism to maintain ATP level. In this study, we investigated whether AMPK affect GlcCer metabolism, and found that GlcCer synthesis was negatively regulated by AMPK-dependent mechanism. Our findings suggest that reduction of GlcCer by AMPK activation may become a new treatment option for diseases caused by the accumulation of GlcCer.

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：脂質生物学

キーワード：スフィンゴ糖脂質 グルコシルセラミド AMPK 糖ヌクレオチド エネルギー代謝 酵素 脂質

## 1. 研究開始当初の背景

UDP-グルコース (UDP-Glc) とセラミドから合成される糖脂質グルコシルセラミド (GlcCer) の過剰蓄積はゴーシェ病、パーキンソン病、レビー小体型認知症、インスリン抵抗性、嚢胞性腎疾患など様々な病態を引き起こす (Brady et al, 1965; Natoli et al, 2010; Fuller et al, 2010; Mazzulli et al, 2011)。一方、GlcCer 合成酵素遺伝子欠損マウスや線虫、ショウジョウバエを用いた実験より、GlcCer は生命にとって必要不可欠な存在であることが示されている (Yamashita et al, 1999; Kohyama et al, 2004; Nomura et al, 2011)。GlcCer を基本骨格として合成される各種スフィンゴ糖脂質は、コレステロール等と共に生体膜上で「脂質ラフト」と呼称されるナノスケールの動的クラスターを形成し、各種シグナル伝達に参与するタンパク群を適時に会合・集積させることにより、作業の効率化、高精度化に貢献していると考えられている (Simons and Ikonen, 1997)。GlcCer 量の過剰変動は、脂質ラフト構造の破綻、そしてシグナル伝達の混乱を引き起こすものと考えられる。GlcCer 量の多寡が生体に及ぼす影響を考慮すると、細胞内の GlcCer 合成量を適切に制御する機構の存在が強く示唆されるが、その詳細は不明である。現在までに、GlcCer 合成酵素の酵素活性を制御するような翻訳後修飾や、結合タンパクは見出されていない。足がかりとなるような情報が皆無であり、解明が遅れているのが現状である。

## 2. 研究の目的

申請者がこれまで行った研究で、細胞内エネルギーセンサー AMPK が GlcCer 合成量を調節する可能性を見出しているが、その分子機構は不明な点が多い。AMPK による GlcCer 量調節機構の詳細と、その生理的意義を追及し、スフィンゴ糖脂質および生体膜研究の進展に寄与することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

マウス線維芽細胞に AMPK 活性化剤を添加した後、細胞より脂質を抽出し LC-ESI-MS/MS を用いた MRM 解析により GlcCer の量を測定した。また、BSA-蛍光標識セラミド複合体を細胞内に取り込ませることによって、AICAR および AMPK 阻害剤 Compound C 添加時の細胞内の GlcCer 合成活性を測定した。AMPK の活性化は、リン酸化 AMPK およびリン酸化 Acetyl-CoA carboxylase (ACC) の抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した。また、AMPK  $\alpha 1$  サブユニットに対する siRNA および AMPK の阻害剤である Compound C を使用し、AMPK の依存性を評価した。糖ヌクレオチドの定量および UDP-Glc 分解酵素活性は、イオンペア逆相 HPLC により行った。

## 4. 研究成果

2 型糖尿病薬である Metformin、AMP のアナロ

グである AICAR、2-DG など、AMP 活性化タンパクキナーゼ (AMPK) を活性化する化合物を細胞に添加した条件群では、コントロールに比べて GlcCer 量、および GlcCer を前駆物質として合成されるラクツシルセラミド (LacCer) などのスフィンゴ糖脂質の量が有意に減少することが判明した。また、AMPK 活性化時に観察された GlcCer 合成量の低下は、AMPK の阻害剤である Compound C や AMPK の siRNA によるノックダウンによってコントロールレベルにまで回復した。これらの結果より、AMPK は GlcCer 合成量を負に制御する因子であることが明らかになった。AMPK はヘテロ 3 量体のセリン/スレオニンキナーゼである。このキナーゼは細胞内のエネルギー環境に応じて活性が制御されるユニークな酵素である (Hardie et al, 2012)。ATP の減少と、それに伴う ADP および AMP 比率の増加により AMPK は活性化され、ATP 増産体制をとるように指示を出し、解糖系や脂肪酸酸化を亢進させる。一方でグリコーゲンや脂肪酸、ステロール合成などを抑制することで ATP の消費を抑制する。これまでに糖と脂質代謝に深く関与する事は良く知られていたが、さらに糖脂質代謝も制御することが新たに判明した。では、AMPK はどのようにして GlcCer 合成量を低下させるのであろうか。細胞透過性の蛍光セラミドを利用して、細胞内における GlcCer 合成酵素活性を測定した結果 (Gupta et al, 2010)、AMPK 活性化により酵素活性が著しく低下することが分かった。この活性低下の原因を探るべく、まず AMPK 活性化時における GlcCer 合成酵素のリン酸化レベル、mRNA およびタンパクレベルの発現量を調査した。過去の研究結果と同様、GlcCer 合成酵素はリン酸化されておらず、また発現量にも影響はなかった。GlcCer はセラミドとグルコースの活性化体である UDP-Glc を前駆体として合成される。細胞内アッセイでは外部より蛍光セラミドを添加しているため、AMPK 活性化時にみられる GlcCer 合成酵素活性の低下の原因として、細胞内のセラミド量の変動を考慮する必要はない。UDP-Glc の量的変動が GlcCer 合成酵素活性に影響をおよぼしているのではないか。この可能性を検証するために、AMPK を活性化させた細胞より UDP-Glc を含む糖ヌクレオチドを抽出し、逆相イオンペアクロマトグラフィーにより各種ヌクレオチドを分離・定量した (Nakajima et al, 2009)。AMPK が活性化された細胞では、予想した通り UDP-Glc の量が有意に低下していた。この結果より、AMPK による GlcCer 合成酵素活性の低下は、UDP-Glc 量の低下が主要因であると結論した。次に、細胞内 UDP-Glc 量に影響を与え、AMPK の基質となるようなタンパクを探索した。その結果、UDP-Glc に作用して UMP とグルコース 1 リン酸 (Glc-1P) に分解する (Yagi et al, 2003)、UDP-Glc 加水分解酵素 Nudt14 が AMPK によってリン酸化されることを見出した。そこで次に、AMPK によってリン

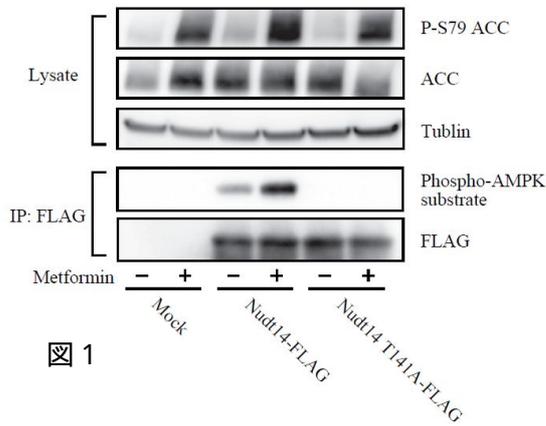
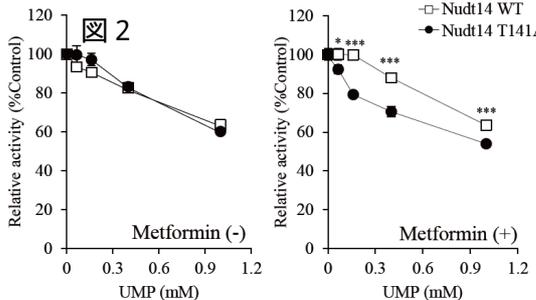
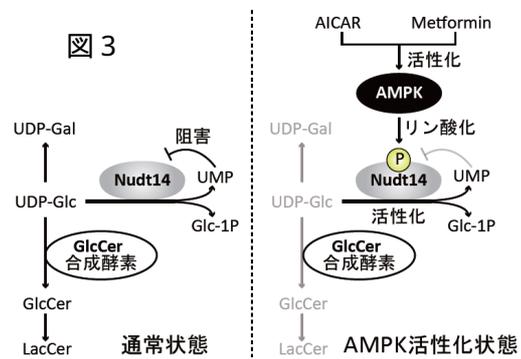


図 1

酸化修飾されると予想されたセリン・スレオニンをアラニンに置換した Nudt14 の変異体を作製し、リン酸化部位の同定を試みた。その結果、Nudt14 の 141 番目のスレオニン (T141) が AMPK によってリン酸化されることを明らかにした (図 1)。このリン酸化が Nudt14 の活性に及ぼす影響を検証するため、HPLC による UMP と UDP-Glc の分離定量法を開発し、*in vitro* で Nudt14 の活性測定を行った。AMPK によってリン酸化された Nudt14 は有意に活性が上昇したが、T141A 変異体では AMPK 活性化の有無による活性への影響はみられなかった。何故、リン酸化によって活性が上昇するのか。Nudt14 は生成物である UMP によりフィードバック阻害を受ける。通常状態では、UMP によるブレーキが効いており、UDP-Glc の分解が進みすぎないように適切に活性が調整されていると考えられる。Nudt14 が AMPK によってリン酸化されると、UMP による阻害効果が弱まり、結果として Nudt14 が



活性化されることを発見した (図 2)。本研究結果より、AMPK が Nudt14 をリン酸化・活性化し、細胞内 UDP-Glc が減少することで、GlcCer 合成量低下が引き起こされる、という新しいメカニズムが見いだされた (図 3)。しかしながら、Nudt14 の発現量を siRNA によるノックダウンによって抑制しても、AMPK 活性化による UDP-Glc 量の低下、GlcCer 合成酵素活性の低下、GlcCer 合成量低下の回復は認められなかった。また、この細胞では NUDt14 の発現量が低下しているにも関わらず、UDP-Glc 分解活性に変化は認められなかった。これらの結果は、哺乳類細胞には NUDT14 以外の UDP-Glc 分解酵素が備わっていることを示している。現時点では、UDP-Glc 分解酵素として同定されているのは Nudt14 の



みである。siRNA による Nudt14 の発現量低下を補うべく、未知の UDP-Glc 分解酵素の活性または発現量が増加するため、見かけ上 UDP-Glc 分解活性は低下していなかったものと考えられる。AMPK による UDP-Glc レベルの低下、およびそれに伴う GlcCer 合成量低下のメカニズムの完全解明には、未知の UDP-Glc 分解酵素の同定が必要不可欠であり、今後の研究課題である。

未だ謎は残されているが、この研究によって、細胞内 GlcCer 合成量制御機構の一端が初めて明らかになったことは事実である。今回新たに発見された経路を利用することで、GlcCer 過剰蓄積を原因とする病気への応用が期待される。代表的なリソソーム病であるゴーシェ病は、GlcCer 分解酵素の欠損によって GlcCer がリソソームに過剰蓄積することで発症する。興味深いことに、ゴーシェ病患者由来の線維芽細胞に AMPK 活性化剤として Metformin を添加した結果、GlcCer 合成量が有意に減少するという結果が得られた。Metformin は現在、2 型糖尿病の第一選択薬として年間延べ 1 億人以上の患者に処方されている (WHO, 2010)。この事実が示すように、非常に高い安全性とリーズナブルな薬価を誇る魅力的な化合物である。ゴーシェ病をはじめとしたリソソーム病のモデルマウスを使用し、Metformin 投与による過剰蓄積脂質の減少と諸症状の緩和といった良好な結果を得ることが出来れば、臨床への応用も可能ではないかと期待している。現在、AMPK 活性化剤の有効性を確かめるべく、リソソーム病を専門とする研究者との共同研究を開始している。予備実験の段階ではあるが、良好な結果を得ており、今後も共同研究を継続する予定である。

### 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 1 件)

Yohei Ishibashi, Ayako Kohyama-Koganeya, Yoshio Hirabayashi

“New insights on glucosylated lipids: metabolism and functions.”

Biochim. Biophys. Acta 1831, 1475-1465

(2013) 査 読 あ り  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaliip.2013.06.001>

〔学会発表〕(計4件)

石橋 洋平、平林 義雄 “細胞内エネルギーセンサーAMPK によるグルコシルセラミド合成量制御機構” 第56回 日本脂質生化学会 2014年6月6、7日 大阪

Yohei Ishibashi, Yoshio Hirabayashi, “AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE SUPPRESSES THE BIOSYNTHESIS OF GLUCOSYLCERAMIDE BY REDUCING INTRACELLULAR UDP-GLUCOSE.” Poster presentation at ISN satellite symposium. Cancun, Mexico, 17-19 April, 2013.

Yohei Ishibashi, Yoshio Hirabayashi, “AMP-activated protein kinase negatively regulates Glucosylceramide synthesis.” Oral presentation at the International Conference on the Bioscience of Lipids and Canadian Lipoprotein Conference (Frontiers in Lipid Biology). Banff, Canada, 4-9 September, 2012.

石橋 洋平、平林 義雄 “細胞内エネルギーセンサーAMPK はグルコシルセラミド合成を抑制する” 第54回 日本脂質生化学会 2012年6月7、8日 福岡

〔図書〕(計1件)

Yohei Ishibashi, Yoshio Hirabayashi “UDP-glucose:ceramide glucosyltransferase (UGCG).” Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes (2012)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 洋平 (ISHIBASHI YOHEI)

独立行政法人理化学研究所・神経膜機能研究

チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：90572868