

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790066

研究課題名(和文)セラミドキナーゼによるコレステロールの細胞内輸送制御機構の解明

研究課題名(英文) Study on a regulation system of intracellular cholesterol transport by ceramide kinase

研究代表者

中村 浩之(Nakamura, Hiroyuki)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20447311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：セラミドキナーゼはセラミドをリン酸化してセラミド-1-リン酸を産生する酵素であり、細胞増殖やアラキドン酸代謝の調節などに重要であることが我々のグループを含めて報告されている。本研究ではセラミドキナーゼの新たな生理機能を解明するために、細胞内コレステロール輸送に焦点を当てて研究を行った。その結果、セラミドキナーゼは後期エンドソームから小胞体へのコレステロールの輸送を負に制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Ceramide kinase produces the bioactive lipid ceramide-1-phosphate and appears as a key enzyme for regulating cell growth and arachidonic acid metabolism. In this study, to elucidate a novel physiological function, we focused on the transport of intracellular cholesterol. We showed that ceramide kinase is a negative regulator of the cholesterol transport from late endosomes to endoplasmic reticulum.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：セラミドキナーゼ セラミド-1-リン酸 細胞内コレステロール輸送

1. 研究開始当初の背景

セラミドキナーゼはセラミドをリン酸化してセラミド-1-リン酸を産生する酵素であり、細胞増殖やアラキドン酸代謝の調節などに重要であることが我々のグループを含めて報告されている。さらに私達は、セラミドキナーゼがコレステロールの細胞内輸送を調節する可能性を見出していたが、その詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究ではセラミドキナーゼの新たな生理機能の詳細を明らかにするために、細胞内コレステロール輸送に焦点を当てて研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞内遊離コレステロール局在の観察

グラスボトムディッシュで培養した細胞を4% パラホルムアルデヒドで10分間処理することにより固定した。0.5% サポニンで10分間透過処理を行った後、100 µg/mL filipin で30分間処理することにより細胞内遊離コレステロールを染色した。細胞内局在の観察は共焦点レーザー顕微鏡あるいはデコンボリューション顕微鏡にて行った。

(2) コレステロールの再エステル化反応の測定

6well plate で培養した細胞を、5 µCi [³H] オレイン酸、5 µg/mL LDL、10% リポタンパク質欠損ウシ血清、を含む培地にて4時間培養した。細胞をwash後、Bligh&Dyer法にて脂質抽出を行った。得られた有機層の溶媒を窒素ガスにより揮発させた後、20 µL の有機溶媒 (クロロホルム:メタノール=1:1) により再懸濁した。TLCプレート (Silica Gel 60 TLC plate) に全量をスポットし、展開した (ヘキサン:ジエチルエーテル:酢酸=40:10:1)。展開後、ヨウ素に曝すことにより脂質スポットを検出し、コレステロールエステルのスポットをマイクロスパーテルで掻き取り、その放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

4. 研究成果

(1) 細胞内遊離コレステロールの観察

COS-7細胞 (アフリカミドリザル腎臓由来細胞) に緑色蛍光タンパク質 GFP を融合させたセラミドキナーゼ (CerK-GFP) を一過性発現させて24時間後にフィリピン染色を行い、遊離コレステロールの細胞内局在を顕微鏡にて観察した。その結果、CerK-GFPが発現している細胞において、遊離コレステロールがドット状に局在し、蓄積している様子が観察された。また、CerK-GFPを遺伝子導入後、セラミドキナーゼ阻害剤であるNVP-231を処理すると、遊離コレステロールが細胞内に蓄積している様子は観察されなかった。さらに、

外因的にセラミド-1-リン酸を細胞に添加して24時間培養すると、遊離コレステロールが細胞内に蓄積している様子が観察された。一方、セラミドキナーゼをノックダウンした細胞においては遊離コレステロールの細胞内蓄積は観察されなかった。これらの結果から、細胞内のセラミド-1-リン酸レベルが上昇することにより、細胞内遊離コレステロールが局所的に蓄積する可能性が示唆された。

次に、セラミド-1-リン酸による遊離コレステロールの蓄積が細胞外からエンドサイトーシスにより取り込まれたLDLに由来するかどうかを検討した。COS-7細胞にCerK-GFPの遺伝子を導入後、或いはセラミド-1-リン酸添加後、LDLを含まない血清を用いて培養し、フィリピン染色を行った。その結果、LDLを含まない血清で培養した細胞においてはセラミド-1-リン酸による遊離コレステロールの蓄積は観察されなかった。さらに、緑色蛍光基BODIPYが付加されたLDL (BODIPY-LDL) を細胞に添加し、その細胞内局在を経時的に観察した。その結果、セラミド-1-リン酸を処理した細胞においては、BODIPY-LDLが細胞内に局所的に蓄積している様子が観察された。これらの結果から、細胞内のセラミド-1-リン酸レベルが上昇することにより、LDLに由来する遊離コレステロールが局所的に蓄積する可能性が示唆された。

(2) 細胞内コレステロールの蓄積部位の同定

セラミド-1-リン酸による細胞内遊離コレステロールの蓄積がどこで生じているのかを確認するために、フィリピンと細胞内小器官マーカーとの二重染色を行った。その結果、セラミド-1-リン酸処理により観察される遊離コレステロールのドット状の蓄積は、後期エンドソーム/リソソームのマーカーであるLAMP1との共局在を示した。さらに、セラミド-1-リン酸処理により蓄積したBODIPY-LDLもLAMP1との共局在を示した。これらの結果から、細胞内のセラミド-1-リン酸レベルが上昇することにより、LDLに由来する遊離コレステロールが後期エンドソーム/リソソームに蓄積することが示唆された。

(3) 遊離コレステロールの小胞体への輸送におけるセラミドキナーゼの影響

細胞外からエンドサイトーシスにより取り込まれたLDLはエンドソームにて加水分解を受けて遊離コレステロールが産生される。遊離コレステロールはその後、後期エンドソームを経由して小胞体へと輸送され、再エステル化される。これまでの結果から、セラミド-1-リン酸の細胞内レベルが上昇した細胞においては、遊離コレステロールが小胞体に輸送されていない可能性が考えられる。そこで、放射標識されたオレイン酸で細胞をラベルし、脂質抽出を行った後、薄層クロマトグラフィーで分離したコレステロールエステ

ルの放射活性を測定した。その結果、セラミドキナーゼの過剰発現により、放射標識されたコレステロールエステルの量が減少した。次に、脂質合成転写因子である SREBP1 に着目して解析を行った。SREBP1 は定常状態では小胞体に局在するが、小胞体の遊離コレステロールが減少すると核内へと移行する。そこで、SREBP1 の細胞内局在を免疫染色法にて観察した。その結果、セラミドキナーゼが過剰発現している細胞では SREBP1 が核内へ移行していた。これらの結果から、セラミドキナーゼは後期エンドソームから小胞体へのコレステロールの輸送を負に制御している可能性が示唆された。また、セラミドキナーゼ発現細胞にセラミドキナーゼ阻害剤を処理すると、コレステロールの輸送が正常に戻った。さらに、外因的にセラミド-1-リン酸を細胞に添加すると、後期エンドソームから小胞体へのコレステロールの輸送が抑制された。これらの結果から、セラミド-1-リン酸が後期エンドソームから小胞体へのコレステロールの輸送を負に制御していることが明らかとなった。

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 8 件)

Nakamura H, Murayama T. The role of sphingolipids in arachidonic acid metabolism. *Journal of Pharmacological Sciences*, 査読有, 124, 307-312, 2014.

DOI: 10.1254/jphs.13R18CP.

Nakamura H, Moriyama Y, Makiyama T, Emori S, Yamashita H, Yamazaki R, Murayama T. Lactosylceramide interacts with and activates cytosolic phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry*, 査読有, 288, 23264-23272, 2013.

DOI: 10.1074/jbc.M113.491431.

Nakamura H. Modulation of arachidonic acid metabolism in niemann-pick disease type C cells. *Current Psychopharmacology*, 査読有, 2, 58-65, 2013.

DOI: 10.2174/2211556011302010058.

Nakamura H, Yasufuku K, Makiyama T, Matsumoto I, Fujino H, Murayama T. Arachidonic acid metabolism via cytotoloc phospholipase A2 induces cytotoxicity in niemann-pick disease type C cells. *Journal of Cellular Physiology*, 査読有, 227, 2847-2855, 2012.

DOI: 10.1002/jcp.23025.

Makiyama T, Nakamura H, Nishida A, Murayama T. C2-Di-ethyl-ceramide-1-

phosphate as an inhibitor of group IVA cytosolic phospholipase A2. *European Journal of Pharmacology*, 査読有, 697, 144-151, 2012.

DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.09.041.

Kawashima T, Yamazaki R, Matsuzawa Y, Yamaura E, Takabatake M, Otake S, Ikawa Y, Nakamura H, Fujino H, Murayama T. Contrary effects of sphingosine-1-phosphate on expression of α -smooth muscle actin in transforming growth factor β 1-stimulated lung fibroblasts. *European Journal of Pharmacology*, 査読有, 696, 120-129, 2012.

DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.09.038.

Toyomura K, Saito T, Emori S, Matsumoto I, Kato E, Kaneko S, Okuma Y, Nakamura H, Murayama T. Effects of Hsp90 inhibitors, geldanamycin and its analog, on ceramide metabolism and cytotoxicity in PC12 cells. *Journal of Toxicological Sciences*, 査読有, 37, 1049-1057, 2012.

DOI: 10.2131/jts.37.1049

Hamada Y, Kato E, Nakamura H, Fujino H, Matsumoto K, Tashima K, Horie S, Murayama T. Decrease of guanylyl cyclase β 1 subunit and nitric oxide (NO)-induced relaxation in mouse rectum with colitis and its reproduction on long-term NO treatment. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 査読有, 385, 81-94, 2012.

DOI: 10.1007/s00210-011-0681-3.

[学会発表](計 13 件)

中村 浩之, 森山 友太, 牧山 智彦, 江森 俊介, 山下 尚大, 山崎 璃沙, 村山 俊彦: ラクトシルセラミドによる細胞質型ホスホリパーゼ A2 活性化機構の解明, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 27-30 日, 熊本

山崎 璃沙, 松澤 康雄, 川島 辰男, 柳原 まどか, 中村 浩之, 藤野 裕道, 村山 俊彦: 肺線維化への免疫抑制剤の影響, 第 87 回日本薬理学会年会, 2014 年 3 月 19-21 日, 仙台

鰐川 雅裕, 中村 浩之, 藤野 裕道, 村山 俊彦: 細胞内コレステロール輸送に関するスフィンゴミエリンの関与, 第 57 回日本薬学会関東支部年会, 2013 年 10 月 26 日, 東京

牧山 智彦, 中村 浩之, 村山 俊彦: スフィンゴ脂質によるマスト細胞脱顆粒反応調節機構の解明, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2013, 2013 年 8 月 31 日, 熊本

山崎 璃沙, 松澤 康雄, 川島 辰男, 柳

原 まどか, 中村 浩之, 藤野 裕道, 村山 俊彦, TGF- β 1 による肺線維化への免疫抑制剤への影響, 第 128 回日本薬理学会関東支部会, 2013 年 7 月 14 日, 東京

藤野 裕道, 吉田 憲司, 中村 浩之, Regan JW, 村山 俊彦: ヒト結腸癌細胞 HCA-7 細胞において EP4 受容体は Gi タンパク質/上皮成長因子受容体を介してシクロオキシゲナーゼ-2 発現を亢進する, 第 12 回生命科学研究会, 2013 年 6 月 28-29 日, 青森

山崎 璃沙, 川島 辰男, 松澤 康雄, 大竹 翔, 高島 護, 中村 浩之, 藤野 裕道, 村山 俊彦: ヒト肺線維芽細胞における S1P1 を介した線維化抑制メカニズム, 薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 27-30 日, 横浜

牧山 智彦, 本田 拓也, 中村 浩之, 西田 篤司, 山口 直人, 村山 俊彦: 細胞障害性を示さない Golgi マーカーとしての新規セラミド誘導體, 第 86 回日本薬理学会年会, 2013 年 3 月 21-23 日, 福岡

藁谷 未沙, 中村 浩之, 山下 尚大, 村山 俊彦: セラミド-1-リン酸産生機構におけるコレステロールの関与, 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 14-16 日, 福岡

江森 俊介, 中村 浩之, 藤野 裕道, 村山 俊彦: 細胞内コレステロール輸送におけるセラミドキナーゼの関与, 第 11 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム, 2012 年 9 月 15-16 日, 福岡

豊村 香織, 佐々木 弘恒, 中村 浩之, 岡本 彩, 山口 直人, 村山 俊彦: セラミド代謝酵素の活性制御機構の解明, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2012, 2012 年 9 月 1 日, 神戸

牧山 智彦, 中村 浩之, 西田 篤司, 村山 俊彦: 細胞障害性を示さない Golgi マーカーとしての新規セラミド誘導體の探索, 第 126 回日本薬理学会関東支部会, 2012 年 7 月 14 日, 東京

中村 浩之, 藤野 裕道, 村山 俊彦: ニーマンピック病 C 型におけるセラミド代謝と細胞内コレステロール輸送との関わり, 第 11 回生命科学研究会, 2012 年 6 月 30 日-7 月 1 日, 秋田

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: セラミド誘導體およびこれを用いたゴルジ体標識化蛍光プローブ

発明者: 西田 篤司, 中村 浩之, 牧山 智彦, 村山 俊彦

権利者: 国立大学法人 千葉大学

種類: 特許

番号: 14/238,932

出願年月日: 2014 年 2 月 14 日

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/hinka/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 浩之 (NAKAMURA, Hiroyuki)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号: 20447311