

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460060

研究課題名(和文)セラミドキナーゼ結合蛋白質の網羅的探索を基盤とした中枢神経系機能調節機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of regulatory mechanisms of central nervous system functions by ceramide kinase

研究代表者

中村 浩之(Nakamura, Hiroyuki)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：20447311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：セラミドキナーゼはセラミドを基質としてセラミド-1-リン酸を産生する酵素である。本研究では中枢神経系機能におけるセラミドキナーゼの役割を解析することを目的として研究を行った。その結果、1) セラミドキナーゼはフィロポディアの形成を調節すること、2) PC12細胞においてNGFはセラミド-1-リン酸の産生を促進すること、3) セラミドキナーゼは神経伝達物質の放出を調節す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. In this study, we determined the role of ceramide kinase on functions of central nervous system. We showed that 1) ceramide kinase regulates the formation of filopodia, 2) NGF induces the formation of ceramide-1-phosphate in PC12 cells, 3) ceramide kinase regulates the release of neurotransmitter.

研究分野：薬理学、脂質生化学

キーワード：セラミドキナーゼ セラミド-1-リン酸 神経突起 神経伝達物質 PC12細胞

1. 研究開始当初の背景

セラミドキナーゼはセラミドを基質としてセラミド-1-リン酸を産生する酵素である。セラミドキナーゼは生体内で特に小脳プルキンエ細胞に高く発現しているため、中枢神経系機能において重要な役割を担っている可能性があるが、その詳細は明らかにされていない。

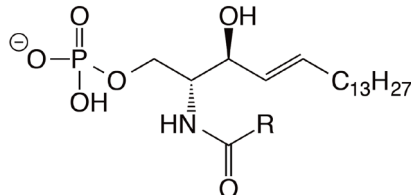


図1 セラミド-1-リン酸の構造

2. 研究の目的

中枢神経系機能におけるセラミドキナーゼの役割を解析することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) セラミドキナーゼに結合する蛋白質の同定

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を融合したセラミドキナーゼを大腸菌に発現させるためのプラスミドベクター、及びビオチン化したセラミドキナーゼを培養細胞に発現させるためのプラスミドベクターを作製した。その後、まず大腸菌に GST 融合セラミドキナーゼを発現させ、グルタチオンビーズを用いてセラミドキナーゼを精製した。この精製蛋白質を細胞溶解液とインキュベートし、グルタチオンビーズを用いて GST 融合セラミドキナーゼをプルダウンした。サンプルを SDS-PAGE により分離し、トリプシン消化後に質量分析装置を用いてセラミドキナーゼに結合する蛋白質を同定した。

(2) セラミド-1-リン酸産生量の測定

緑色蛍光基 NBD を付加したセラミドを細胞に取り込ませ、総脂質を抽出後、薄層クロマトグラフィーでセラミド代謝物を分離し、NBD の蛍光を検出することで NBD-セラミド-1-リン酸の産生量を測定した。

(3) 神経伝達物質放出量の測定

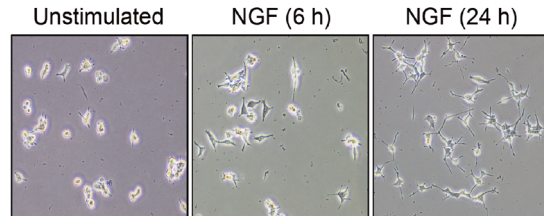
3H で放射標識されたノルアドレリンを細胞に取り込ませ、カルシウムイオノフォア A23187 の刺激により細胞外に放出されたノルアドレリンの量を液体シンチレーションカウンターで測定した。

4. 研究成果

同定された蛋白質のうち、中枢神経系機能の調節に重要な蛋白質 A または蛋白質 B を培養細胞に一過性発現させたところ、フィロポディアの形成が観察され、それはセラミド

キナーゼを阻害することで抑制された。従って、セラミドキナーゼは蛋白質 A や蛋白質 B と協調してフィロポディアの形成を調節する可能性が示唆された。

次に、PC12 細胞 (ラット副腎髄質由来褐色細胞腫) を用いて解析を行った。PC12 細胞は神経成長因子 NGF で処理すると突起を形成することから、神経細胞のモデルとして幅広く用いられている。



この細胞に NGF を処理したところ突起伸長が観察され、これはセラミドキナーゼの阻害剤 (NVP-231) の処理により抑制された (図2)。従って、セラミドキナーゼにより産生されるセラミド-1-リン酸が NGF 刺激による突起伸長を調節する可能性が示唆された。

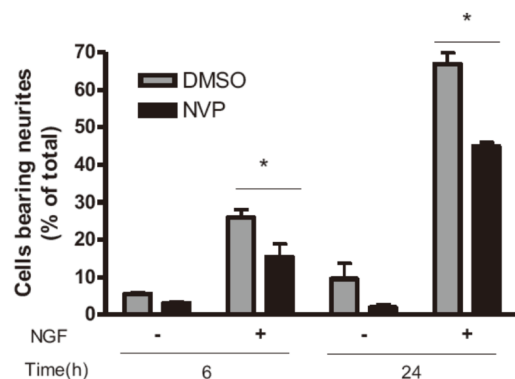


図2

そこで、セラミドキナーゼに対する shRNA 発現ベクターをレトロウイルスにより遺伝子導入し、セラミドキナーゼを安定的にノックダウンする PC12 細胞を樹立した。本細胞はセラミド-1-リン酸の産生が約70%抑制されていた。本細胞を用いて NGF 刺激による突起伸長作用を対照細胞と比較したところ、セラミドキナーゼのノックダウンは突起伸長作用に影響しなかった。

次に、神経伝達物質の放出におけるセラミドキナーゼの関与を解析した。その結果、セラミドキナーゼのノックダウンは A23187 によるノルアドレナリンの放出を有意に抑制した。一方、セラミドキナーゼの過剰発現により、A23187 によるノルアドレナリンの放出は有意に促進された。これらの結果から、セラミドキナーゼは神経伝達物質の放出に重要

な役割を担っていることが明らかになった (図3)。

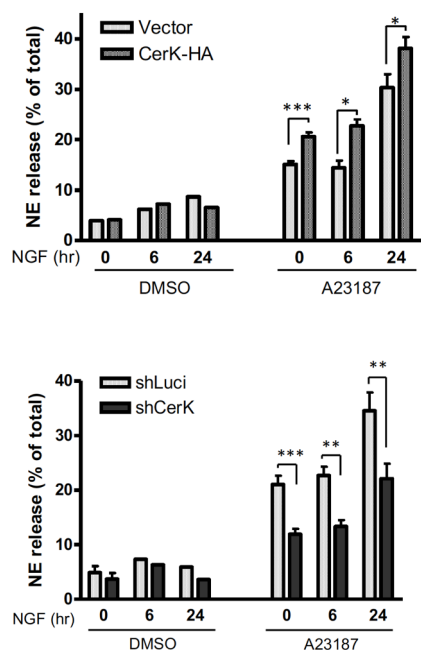


図3

続いて、PC12細胞においてNGF刺激がセラミド-1-リン酸の産生に与える影響を解析した。その結果、NGF刺激はセラミド-1-リン酸の生成を促進し、これはNVP-231の処理で抑制された (図4)。

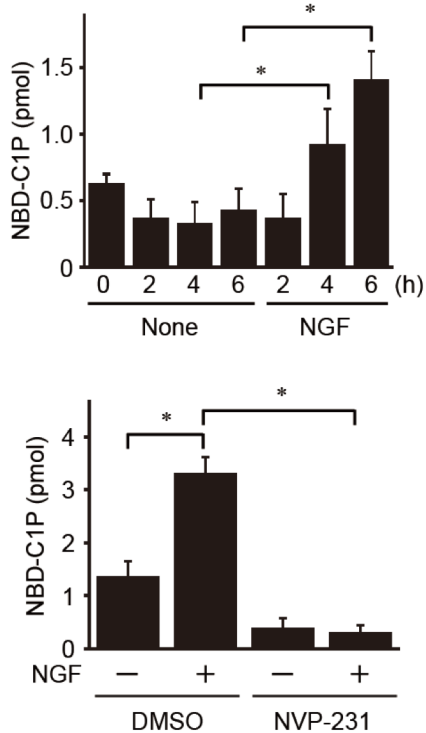


図4

また、NGFはセラミドキナーゼの発現量を上昇させる可能性が示唆された (図5)。従って、PC12細胞においてNGFはセラミドキナーゼに由来するセラミド-1-リン酸の生成を促進することが明らかになった。

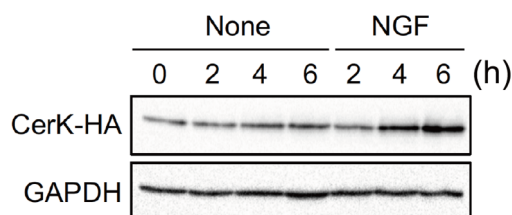


図5

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12件)

① Nakamura H, Moriyama Y, Watanabe K, Tomizawa S, Yamazaki R, Takahashi H, Murayama T (2017) Lactosylceramide-induced phosphorylation signaling to group IVA phospholipase A2 via reactive oxygen species in tumor necrosis factor- α -treated cells. **J Cell Biochem**, in press. 査読有
DOI: 10.1096/fj.201601357R.

② Yamazaki R, Kasuya Y, Fujita T, Umezawa H, Yanagihara M, Nakamura H, Yoshino I, Tatsumi K, Murayama T (2017) Anti-fibrotic effects of cyclosporine A on TGF- β 1-treated lung fibroblasts and lungs from bleomycin-treated mice: Role of hypoxia-inducible factor-1 α . **FASEB J**, in press. 査読有
DOI: 10.1002/jcb.26091.

③ Matsuzaki W, Takahashi H, Nakamura H, Murayama T (2016) Effects of glycerophospholipids on ceramide kinase activity: Cardiolipin-affected cellular formation of ceramide-1-phosphate. **Biol Pharm Bull**, 39, 1708-1717. 査読有
URL: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27725450

④ Hashimoto N, Matsumoto I, Takahashi H, Ashikawa H, Nakamura H, Murayama T (2016) Cholesterol-dependent increases in glucosylceramide synthase activity in Niemann-Pick disease type C model cells: Abnormal trafficking of endogenously formed ceramide metabolites by inhibition of the enzyme. **Neuropharmacology**, 110, 458-469. 査読有
DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.08.011.

⑤ Yui K, Imataka G, Nakamura H, Ohara N, Naito Y (2015) Eicosanoids derived from arachidonic acid and their family prostaglandins

and cyclooxygenase in psychiatric disorders. **Curr Neuropharmacol**, 13, 776-785. 査読有
URL: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26521945

⑥ Fujino H, Seira N, Kurata N, Araki Y, Nakamura H, Regan JW, Murayama T (2015) Prostaglandin E2-stimulated prostanoid EP4 receptors induce prolonged de novo prostaglandin E2 synthesis through biphasic phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases mediated by activation of protein kinase A in HCA-7 human colon cancer cells. **Eur J Pharmacol**, 768, 149-159. 査読有
DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.10.044.

⑦ Yamane S, Nomura R, Yanagihara M, Nakamura H, Fujino H, Matsumoto K, Horie S, Murayama T (2015) L-cysteine/d,L-homocysteine-regulated ileum motility via system L and B⁰⁺ transporter: Modification by inhibitors of hydrogen sulfide synthesis and dietary treatments. **Eur J Pharmacol**, 764, 471-479. 査読有
DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.07.042.

⑧ Nakamura H, Wakita S, Yasufuku K, Makiyama T, Waraya M, Hashimoto H, Murayama T (2015) Sphingomyelin regulates the activity of secretory phospholipase A₂ in the plasma membrane. **J Cell Biochem**, 116, 1898-1907. 査読有
DOI: 10.1002/jcb.25145.

⑨ Makiyama T, Nakamura H, Nagasaka N, Yamashita H, Honda T, Yamaguchi N, Nishida A, Murayama T (2015) Trafficking of acetyl-C16-ceramide-NBD with long-term stability and no cytotoxicity into the Golgi. **Traffic**, 16, 476-492. 査読有
DOI: 10.1111/tra.12265.

⑩ Yamane S, Kanno T, Nakamura H, Fujino H, Murayama T (2014) Hydrogen sulfide-mediated regulation of contractility in the mouse ileum with electrical stimulation: Roles of l-cysteine, cystathionine β-synthase, and K⁺ channels. **Eur J Pharmacol**, 740, 112-120. 査読有
DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.06.054.

⑪ Hosoya T, Matsumoto K, Tashima K, Nakamura H, Fujino H, Murayama T, Horie S (2014) TRPM8 has a key role in experimental colitis-induced visceral hyperalgesia in mice. **Neurogastroenterol Motil**. 26, 1112-1121. 査読有
DOI: 10.1111/nmo.12368.

⑫ Sasaki H, Toyomura K, Matsuzaki W, Okamoto A, Yamaguchi N, Nakamura H, Murayama T (2014) Regulation of alkaline

ceramidase activity by the c-Src-mediated pathway. **Arch Biochem Biophys**, 15, 550-551. 査読有
DOI: 10.1016/j.abb.2014.03.012.

〔学会発表〕(計 32 件)

① 山崎璃沙, 粕谷善俊, 藤田哲雄, 梅澤弘毅, 柳原まどか, 中村浩之, 吉野一郎, 巽浩一郎, 村山俊彦, 肺線維症におけるシクロスポリン A の抗線維化作用機構の検討, 日本薬学会第 137 年会 (仙台, 2017 年 24-27 日)

② 富澤智史, 中村浩之, 村山俊彦, セラミドキナーゼによる細胞骨格制御機構の解明, 日本薬学会第 137 年会 (仙台, 2017 年 24-27 日)

③ 高橋宏昌, 中村浩之, 村山俊彦, リン酸化シグナルによるセラミドキナーゼ活性制御機構の解析, 日本薬学会第 137 年会 (仙台, 2017 年 24-27 日)

④ 橋本直宏, 松本生, 高橋宏昌, 芦川仁美, 中村浩之, 村山俊彦, ニーマン・ピック病 C 型のコレステロール蓄積とスフィンゴ糖脂質との関連性の解明 (長崎, 2017 年 3 月 15-17 日)

⑤ 西野将平, 山下尚大, 中村浩之, 村山俊彦, セラミド-1-リン酸はスフィンゴシンキナーゼ 1 の活性を直接的に制御する, 第 90 回日本薬理学会年会 (長崎, 2017 年 3 月 15-17 日)

⑥ 中村浩之, 江森俊介, 橋本直宏, 松本生, 村山俊彦, セラミドキナーゼは細胞内コレステロールの小胞体への輸送を負に制御する, 第 90 回日本薬理学会年会 (長崎, 2017 年 3 月 15-17 日)

⑦ Nakamura H, Emori S, Hashimoto N, Matsumoto I, Murayama T, Ceramide kinase is a negative regulator of intracellular cholesterol transport to the endoplasmic reticulum, 57th International Conference on the Bioscience of Lipids (Chamonix Mont Blanc, France, September 4-8, 2016)

⑧ Yamazaki R, Nakamura H, Moriyama Y, Watanabe K, Tomizawa S, Murayama T, Role of phosphorylation signaling on activation of group IVA phospholipase A2 by lactosylceramide, 57th International Conference on the Bioscience of Lipids (Chamonix Mont Blanc, France, September 4-8, 2016)

⑨ 富澤智史, 中村浩之, 村山俊彦, セラミドキナーゼによるアクチン細胞骨格制御機構の解明, 第 134 回日本薬理学会関東部会 (那須, 2016 年 7 月 9 日)

⑩ Nakamura H, Makiyama T, Nagasaka H, Yamashita H, Honda T, Yamaguchi N, Nishida A,

Murayama T, Trafficking of acetyl-C16-ceramide-NBD with long term stability and no cytotoxicity into the Golgi complex, The 2016 annual meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB) (San Diego, U.S.A., April 2-6, 2016)

⑪ Yamazaki R, Fujita T, Yanagihara M, Nakamura H, Fujino H, Kasuya Y, Murayama T, Cyclosporin A has anti-fibrotic effects in human lung fibroblasts and in bleomycin-induced lung fibrosis model mouse, The 2016 annual meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB) (San Diego, U.S.A., April 2-6, 2016)

⑫ 中村浩之, 牧山智彦, 長坂伸夫, 山下尚大, 本田拓也, 山口直人, 西田篤司, 村山俊彦, 長時間安定的にゴルジ体を標識する新規蛍光標識セラミド誘導体, 日本薬学会第 136 年会 (横浜, 2016 年 3 月 26-29 日)

⑬ 山崎璃沙, 藤田哲雄, 柳原まどか, 中村浩之, 藤野裕道, 村山俊彦, シクロスポリン A はヒト肺線維芽細胞および肺線維症モデルマウスにおいて線維化抑制作用を示す, 日本薬学会第 136 年会 (横浜, 2016 年 3 月 26-29 日)

⑭ 藤野裕道, 清良尚史, 倉田直希, 荒木祐美, 中村浩之, John W. REGAN, 村山俊彦, ヒト結腸癌 HCA-7 細胞を用いたヒト EP4 プロスタノイド受容体による持続的な新規プロスタグランジン E2 産生機構の解明, 日本薬学会第 136 年会 (横浜, 2016 年 3 月 26-29 日)

⑮ 渡部央, 王亜賓, 橋本直宏, 中村浩之, 村山俊彦, 西田篤司, O-アシル蛍光性セラミド誘導体の合成と細胞膜透過性, 日本薬学会第 136 年会 (横浜, 2016 年 3 月 26-29 日)

⑯ 王亜賓, 楊井理信, 橋本直宏, 中村浩之, 村山俊彦, 西田篤司, 新規赤色蛍光標識セラミドプローブの合成研究, 日本薬学会第 136 年会 (横浜, 2016 年 3 月 26-29 日)

⑰ 中村浩之, 脇田樹男, 安福加菜, 牧山智彦, 藁谷未沙, 橋本直宏, 村山俊彦, スフィンゴミエリンはプラズマ膜において分泌型ホスホリパーゼ A2 の活性を調節する, 第 89 会日本薬理学会年会 (横浜, 2016 年 3 月 9-11 日)

⑱ 渡邊一祥, 高島護, 中村浩之, 村山俊彦, TGF- β 1 による肺線維化; ラクトシルセラミドによる Smad2/3 に対する核局在化制御, 第 89 会日本薬理学会年会 (横浜, 2016 年 3 月 9-11 日)

⑲ 山崎璃沙, 中村浩之, 森山友太, 渡邊一祥, 富澤智史, 村山俊彦, ラクトシルセラミドに

よるリン酸化シグナルを介した細胞質型ホスホリパーゼ A2 α 制御機構の解明, 第 89 会日本薬理学会年会 (横浜, 2016 年 3 月 9-11 日)

⑳ 成岡詩織, 中村浩之, 西野将平, 山下尚大, 村山俊彦, セラミド-1-リン酸による EphA2 の動態制御機構の解明, 第 89 会日本薬理学会年会 (横浜, 2016 年 3 月 9-11 日)

㉑ 高橋宏昌, 松寄渉, 中村浩之, 村山俊彦, カルジオリピンによるセラミドキナーゼ活性制御機構の解明, 第 14 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム 2015 (千葉, 2015 年 9 月 12-13 日)

㉒ 橋本直宏, 松本生, 高橋宏昌, 中村浩之, 村山俊彦, ニーマン・ピック病 C 型のコレステロール蓄積とスフィンゴ糖脂質との関連性の解明, 第 14 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム 2015 (千葉, 2015 年 9 月 12-13 日)

㉓ 成岡詩織, 中村浩之, 西野将平, 山下尚大, 村山俊彦, セラミド-1-リン酸による EphA2 の動態制御機構の解明, 第 14 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム 2015 (千葉, 2015 年 9 月 12-13 日)

㉔ 橋本直宏, 中村浩之, 脇田樹男, 安福加菜, 牧山智彦, 藁谷未沙, 村山俊彦, スフィンゴミエリンによる分泌型ホスホリパーゼ A2 活性制御機構の解明, 第 132 回日本薬理学会関東部会 (埼玉, 2015 年 7 月 4 日)

㉕ 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 14 回生命科学研究会 (三浦, 2015 年 6 月 26-27 日)

㉖ 中村浩之, 森山友太, 牧山智彦, 山下尚大, 山崎璃沙, 渡邊一祥, 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 α 活性化機構の解明, 日本薬学会第 135 年会 (神戸, 2015 年 3 月 25-28 日)

㉗ 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の影響, 日本薬学会第 135 年会 (神戸, 2015 年 3 月 25-28 日)

㉘ 松寄渉, 中村浩之, 村山俊彦, カルジオリピンはセラミドキナーゼと結合し活性化させる, 第 88 回日本薬理学会年会 (名古屋, 2015 年 3 月 18-20 日)

㉙ 山下尚大, 中村浩之, 藁谷未沙, 成岡詩織, 村山俊彦, リン酸化シグナルによる CerK 活性制御機構の解明, 第 13 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム 2014 (富山, 2014 年 6 月 20-21 日)

③⑩ 中村浩之, 森山友太, 藤野裕道, 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 α 活性化機構の解明, 第13回生命科学研究会 (札幌, 2014年6月20-21日)

③⑪ Nakamura H, Moriyama Y, Makiyama T, Emori S, Yamashita H, Yamazaki R, Murayama T, Lactosylceramide interacts with and activates cytosolic phospholipase A2, 54th International Conference on the Bioscience of Lipids 2014 (Aberdeen, Scotland, June 23-27, 2014)

③⑫ Yamazaki R, Kawashima T, Matsuzawa Y, Otake S, Yamaura E, 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, 54th International Conference on the Bioscience of Lipids 2014 (Aberdeen, Scotland, June 23-27, 2014)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 抗線維症剤およびリン酸化 Smad 核内移行阻害剤

発明者: 中村浩之, 村山俊彦

権利者: 千葉大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-134880

出願年月日: 2016年7月7日

国内外の別: 国内

名称: ニーマン・ピック病C型を予防または治療するための医薬組成物

発明者: 中村浩之, 村山俊彦

権利者: 千葉大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-199969

出願年月日: 2015年10月8日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計2件)

名称: セラミド誘導体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: 千葉大学

種類: 特許

番号: 特許第 6120222 号

取得年月日: 2017年4月7日

国内外の別: 国内

名称: Ceramide derivative and golgi apparatus-labeling fluorescent probe using same.

発明者: 西田篤司, 中村浩之, 牧山智彦, 村山俊彦

権利者: 千葉大学

種類: 特許

番号: US 9,207,232

取得年月日: 2015年12月8日

国内外の別: 国外 (米国)

[その他]

ホームページ等

[http://www.p.chiba-](http://www.p.chiba-u.jp/lab/hinka/)

[u.jp/lab/hinka/index.html](http://www.p.chiba-u.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・准教授

研究者番号: 20447311