

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：35303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14465

研究課題名(和文)膜脂質による細胞極性の動作原理の解明

研究課題名(英文)Operating principle of cell polarity via membrane lipid

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：小腸上皮細胞は代表的な極性細胞である。その細胞膜を構成するスフィンゴ糖脂質はセラミド骨格のスフィンゴシン塩基のC4位に水酸基が付加したフィトセラミド構造で構成されている。本研究では、フィトセラミド欠損マウスであるDihydroceramide:sphinganine C4-hydroxylase (Des2) ノックアウトマウス(Des2-KO)の表現型を左右するmodifier遺伝子の同定を試みた。マウスゲノムをトリオでエクソーム解析し、常染色体劣性遺伝形式の候補遺伝子を絞り込んだ。今後はmodifier遺伝子を特定し、系統化した重症型Des2-KOを用いて詳細な病態解析に取り組む。

研究成果の概要(英文)：Small intestinal epithelial cells are representative of polar cells. Glycosphingolipids (GSLs) constituting their cell membrane are composed by a unique ceramide structure called phytoceramide, which have a hydroxyl group at C4 position of sphingosine base. To elucidate the physiological role of phytoceramide structure in cell polarity, we have made dihydroceramide: sphinganine C4 - hydroxylase (DES2) knockout (Des 2-KO) mice which lost the phytoceramide structure of GSLs. In this study, we tried to identify the modifier gene that affects the phenotypic severity of Des2-KO mice. The mouse exome analysis was carried out and several candidate genes which present autosomal recessive inheritance were found. Future identification of the modifier gene will reveal the physiological function of phytoceramide structure in cell polarity.

研究分野：脂質生化学

キーワード：スフィンゴ脂質 セラミド骨格 構造多様性 細胞極性 小腸上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

生物は、生命現象の様々な局面で、細胞極性を利用している。小腸上皮細胞は、代表的な極性細胞で、豊富な微絨毛を持つ頂端膜と側底膜という異なる膜ドメインから構成されている。これらの細胞極性の分子機構を理解するためには、それぞれの膜ドメインを構成する膜タンパク質、膜脂質の非対称性とその機能を明らかにする必要がある。

スフィンゴ糖脂質 (GSL) は、生体膜の outer leaflet に存在する膜脂質の一つである。最近、上皮細胞の極性形成において、GSL が重要であるとする報告がなされた (Jennemann R, et al. J Biol Chem. 2012, Ikenouchi J, et al. J Cell Sci. 2013.)。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、それぞれに組織、細胞、発達段階別に数千種類に及ぶ構造多様性がある。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ており、哺乳動物の小腸組織には、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 位に水酸基が1つ付加した「フィトセラミド」と呼ばれるユニークなセラミド構造を持つ GSL が豊富に存在する (Suzuki A, et al. J Biochem. 1981)。小腸は、小腸上皮細胞という吸収上皮細胞から構成される組織であり、フィトセラミド構造は、小腸上皮細胞の極性形成に重要であると推測されているが、いまだ証明はされていない。

2. 研究の目的

本研究では、代表的な極性細胞である小腸上皮細胞に特徴的に存在するフィトセラミド構造に着目し、膜脂質による細胞極性の動作原理を明らかにすることを目的とする。具体的には、豊富な微絨毛を持ち、活発な消化吸収機能を担う頂端膜の形成と維持への、フィトセラミド構造の関与を明らかにする。得られた成果によって、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、膜脂質による細胞極性の新たな動作原理を提唱できる。

3. 研究の方法

1) *Des2*-KO マウスの病態解析

我々が独自に作成した、フィトセラミドの合成にかかわる酵素 Dihydroceramide: sphinganine C4- hydroxylase (*DES2*) のノックアウトマウス (*Des2*-KO) の小腸の表現型解析を行う。

2) 均一に致死型の表現型を呈する *Des2*-KO マウス系統の樹立:*Des2*-KO マウスの表現型の重症度を決定する modifier 遺伝子の同定

Des2-KO マウスの約 25% には、2 週間前後で死亡する致死性の表現型が認められるが、その出現はランダムである。*Des2*-KO マウス

を用いて、フィトセラミド構造の生物機能を解析するためには、均一な表現型を呈する *Des2*-KO マウス系統の樹立が不可欠である。そこで、F2 世代の雄・雌の交配を複数組作り、致死型の仔が出生した家系を選別して、兄妹の近親交配を繰り返し行い、致死型 *Des2*-KO マウスの純系を得ることを試みる。

致死型の表現型は、近交系である C57BL/6J への戻し交配では失われる。一方、特定のペアからは世代を超えて重症型マウスが生まれる。これらの事実から、*Des2*-KO マウスの表現型を左右するのは、餌や飼育環境ではなく、未知の modifier 遺伝子であると想定される。そこで、マウス家系図から常染色体劣性遺伝と推定し、軽症型の *Des2*-KO 親マウスの交配から重症型の *Des2*-KO が生まれた家系の父、母、仔マウスのゲノムをトリオでエクソーム解析することにより modifier 遺伝子の同定を試みる。

4. 研究成果

1) *Des2*-KO マウスの病態解析

Des2-KO マウスはメンデルの法則に従って出生するが、2 週間前後で死亡する致死型と、寿命が1年以上の軽症型の大きく異なる2つの表現型が存在した。組織病理学的解析では、致死型では小腸に明らかな形態変化を認めるのに対し、軽症型ではその変化が非常に軽微であった。致死型の小腸上皮細胞においては、頂端膜に存在する微絨毛の低形成、小腸上皮細胞の頂端膜の主要な GSL である GAI の局在変化、頂端膜に存在すべき輸送体タンパク質 (SGLT1、PEPT1) の局在変化を認めた。また、授乳期の小腸上皮細胞において脂質の吸収異常が推定された。

これらの結果は、外界とのバリア形成や活発な消化吸収機能を担っている小腸上皮細胞において、フィトセラミド構造が必須であることを示唆する。

2) 均一に致死型の表現型を呈する *Des2*-KO マウス系統の樹立:*Des2*-KO マウスの表現型の重症度を決定する modifier 遺伝子の同定

特定のペアからは世代を超えて重症型マウスが生まれるという観察所見から、*Des2*-KO マウスの表現型を左右する modifier 遺伝子の存在を想定し、エクソーム解析によりその同定を試みた。複数の候補遺伝子が上がったが、研究期間内に modifier 遺伝子の特定には至らなかった。

一方、近親交配により、重症型および軽症型 *Des2*-KO マウス家系が系統化に近づいている。今後は、これらのマウスを用いて、重症型と軽症型の *Des2*-KO マウス間の遺伝子発現、タンパク質発現解析、メタボローム解析を予定している。また、軽症型マウスの小腸へ各種の負荷をかけ、形態変化、機能変化を検討することも予定している。

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4件)

1) 松田純子:スフィンゴ脂質活性化タンパク質□サポシン□の生理機能と疾患 生化学 89-6号 pp. 808-819 (2017) (査読無)

2) Ono S, Matsuda J, Saito A, Yamamoto Y, Fujimoto W, Shimizu H, Dateki S, Ouchi K: A case of sitosterolemia due to compound heterozygous mutations in ABCG5: clinical features and treatment outcomes obtained with colestimide and ezetimibe. Clin Pediatr Endocrinol. 26: 17-23 (2017) (査読有)

3) Yamamoto T, Matsuda J, Dateki S, Ouchi K, Fujimoto W. Numerous intertriginous xanthomas in infant: A diagnostic clue for sitosterolemia. J Dermatol. 43:1340-1344 (2016) (査読有)

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

[学会発表](計16件)

1) 稲村直子、鬼頭ももこ、浅井清文、竹林浩秀、細川昌則、松田純子、榎戸 靖: Krabbe病(グロボイド細胞白質ジストロフィー)モデルマウスでみられるオリゴデンドロサイトの分化ならびにミエリン化の異常. 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 第90回日本生化学会大会 2017年12月6日-9日.

2) 郷慎司、松田純子、井ノ口仁一: O-GlcNAc修飾を介したスフィンゴ糖脂質代謝制御機構. 第36回日本糖質学会 2017年7月21日 旭川.

3) 松田純子: 遺伝性脱髄疾患 Krabbe病モデルマウスを用いた神経病態解析とその治療応用. 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 共同研究セミナー 2017年7月14日 愛知.

4) 稲村直子、鬼頭ももこ、浅井清文、竹林浩秀、細川昌則、松田純子、榎戸 靖: Krabbe病(グロボイド細胞白質ジストロフィー)モデルマウスでみられるオリゴデンドロサイトの分化ならびにミエリン化の異常. 第81回日本生化学会中部支部例会 名古屋 2017年5月20日.

5) 小野佐保子、松田純子、尾内一信、田中紀子、脇研児、二宮伸介: 関節可動域制限と鳩胸を契機に診断されたガラクトシアリドシスの1例. 第6回岡山ライソゾームセミナー 2016年12月15日 岡山.

6) 松田純子: スフィンゴ糖脂質の機能と疾患 ~ Rare disease から Common disease へ ~ 日本小児科学会岡山地方会, 平成28年12月4日 岡山 (招待講演).

7) 小野佐保子、松田純子、河野美奈、赤池洋人、荻田聡子、升野光雄、尾内一信: Septo-Optic Dysplasia の2症例. 日本小児内分泌学会学術集会, 平成28年11月16日 東京都.

8) 松田純子: スフィンゴ脂質代謝異常の基礎と臨床 ~ Rare disease から Common disease へ ~ . 第51回 神経学セミナー 2016年7月8日 東京都 (順天堂大学) (招待講演).

9) 松田純子: スフィンゴ糖脂質の機能と疾患 第1回 稀少疾患セミナー2016年3月5日 立命館大学 BKC キャンパス.

10) 小野佐保子、松田純子、河野美奈、赤池洋人、荻田聡子、升野光雄、尾内一信: septo-optic dysplasia の2症例 第13回岡山臨床小児内分泌・代謝研究会 2016年2月18日 岡山.

11) 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2015年12月14日 仙台 (東北薬科大学) (招待講演).

12) 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.

13) 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 (招待講演).

14) 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 2015年11月12日 岡山 (招待講演).

15) 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).

16) 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).

〔図書〕(計1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.

〔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・医学部・教授

研究者番号：60363149

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

小野 公嗣 (ONO Koji)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：00548597