

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006-2009

課題番号：18370049

研究課題名(和文) セラミド輸送タンパク質 CERT のリン酸化修飾の部位決定とその役割

研究課題名(英文) Determination of phosphorylated sites of the ceramide transport protein CERT and a role of the phosphorylation on the function of CERT

研究代表者 花田 賢太郎 (HANADA KENTARO)

国立感染症研究所・細胞化学部・部長

研究者番号：30192701

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：脂質輸送、セラミド、スフィンゴミエリン、小胞体、ゴルジ体

### 1. 研究計画の概要

主要膜リン脂質の一種であるスフィンゴミエリン(SM)の生合成では、小胞体で合成されたセラミドが、ゴルジ体に移行して SM へと変換される。我々は、SM 生合成に異常を有する哺乳類培養細胞変異株を複数分離し、その中にセラミド輸送欠損変異細胞を見出し、さらに、当該変異株の相補遺伝子をクローニングするという手段によって、セラミドの小胞体-ゴルジ体間選別輸送に特異的に関わる分子装置(CERT と命名)の同定に成功した。

我々は CERT 自身がリン酸化修飾されていることを見出し、リン酸化部位の決定とリン酸化が担う役割を明らかにすることを目的とした。

### 2. 研究の進捗状況

CERT は、ホスファチジルイノシトール4モノリン酸(PI4P)を認識する PH ドメインとセラミドの膜間転移を触媒する START ドメインを有し、小胞体からゴルジ体へのセラミド選別輸送を仲介する。PH ドメインと START ドメインとの間の約 250 アミノ酸の領域のなかの約 20 アミノ酸の領域(セリンが 3 残基ごとに繰り返す領域なので serine repeat motif; SRM と命名)が多重リン酸化を受けていることを明らかにした。SRM の最初のセリンをアラニンに置換した S132A 変異体は、リン酸化を受けなくなった。また、多重リン酸化を擬似する変異体として SRM 中の全てのセリン・スレオニンがグルタミン酸に置換した 10E 変異体も作成した。HeLa 細胞に発現させた CERT 蛋白質を精製し、セミインタクト細胞を用いた小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送活性検出系で解析すると、S132A 変異体は野生型 CERT

の約 3 倍の活性を示し、一方、10E 変異体はほとんど活性を示さなかった。PI4P 結合活性とセラミド転移活性の両方に関して、S132A 変異体は野生型 CERT よりも高い活性を示し、野生型 CERT を脱リン酸化酵素処理すると活性が S132A 変異体レベルに上昇した。当該処理の有無に関わらず 10E 変異体はほとんど活性を示さなかった。しかし、10E 変異体の START ドメインを切り離すと PI4P 結合活性が回復し、PH ドメインを切り離すとセラミド転移活性が回復した。これらの結果から、SRM のリン酸化は CERT 機能を負に制御していることが明らかとなり、また、SRM のリン酸化によって PH ドメインと START ドメインとがお互いをマスクするような相互阻害をおこすことが示唆された。さらに、このリン酸化にはカゼインキナーゼ I $\gamma$ 2 が関与していることも明らかにした。

### 3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

CERT のリン酸化部位を決定し、その役割を明らかにしたことで当初の目的をほぼ達成した。さらに、このリン酸化に関わるタンパク質リン酸化酵素を同定したことで初期の計画以上の成果を得た。

### 4. 今後の研究の推進方策

細胞のスフィンゴミエリン量の減少などによって、CERT のリン酸化状態が低下して活性化することを観察している。この変化がリン酸化の変化によるものなのか、脱リン酸化の変化によるものなのかを放射性無機リン酸を用いたトレーサー実験によって解析する。

5. 代表的な研究成果  
(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)

1. N. Tomishige, K. Kumagai, J. Kusuda, M. Nishijima, and K. Hanada: Casein kinase I $\gamma$ 2 down-regulates trafficking of ceramide in the synthesis of sphingomyelin. *Mol. Biol. Cell* 20, 348-357, 2009
2. S. Saito, H. Matsui, M. Kawano, K. Kumagai, N. Tomishige, K. Hanada, S. Echigo, S. Tamura, and T. Kobayashi: Protein phosphatase 2C $\epsilon$  is an endoplasmic reticulum integral membrane protein that dephosphorylates the ceramide transport protein CERT to enhance its association with organelle membranes. *J. Biol. Chem.* 283, 6584-6593, 2008
3. N. Kudo, K. Kumagai, N. Tomishige, T. Yamaji, S. Wakatsuki, M. Nishijima, K. Hanada, and R. Kato: Structural basis for specific lipid recognition by CERT responsible for nonvesicular trafficking of ceramide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 488-493, 2008
4. M. Kawano, K. Kumagai, M. Nishijima, and K. Hanada: Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT. *J. Biol. Chem.* 281, 30279-30288, 2006.
5. K. Kumagai, M. Kawano, F. Shinkai-Ouchi, M. Nishijima, and K. Hanada: Inter-organelle trafficking of ceramide is regulated by phosphorylation-dependent co-operativity between the PH and

START domains of CERT. *J. Biol. Chem.* 282, 17758-17766, 2007.

[学会発表] (計 38 件)

1. K. Hanada: Regulation of CERT-mediated trafficking of ceramide, 4<sup>th</sup> International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (PLM2009), May 25-28, 2009, Tokyo
2. K. Hanada: Regulation of intracellular trafficking of ceramide by phosphorylation of CERT、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会・合同大会、平成19年12月11-15日、横浜
3. K. Hanada: Regulation of CERT-mediated trafficking of ceramide, 48<sup>th</sup> International Conference on the Bioscience of Lipids, September 4-8, 2007, Turku, Finland.
4. K. Hanada: Regulation of intracellular trafficking of ceramide, FEBS special meeting, New concepts in lipidology: from lipidomics to disease, October 22-25, 2006, Noordwijkerhout, The Netherlands.
5. K. Hanada: Regulation of CERT-mediated trafficking of ceramide, 20<sup>th</sup> International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, June 22, 2006, Kyoto, Japan.