様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年　4 月 13 日現在

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 のリン酸化修飾部位の決定とその役割

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

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

研究成果の概要（和文）：
小胞体からゴルジ体へのセラミド輸送蛋白質 CERT は、N 末端領域にホスファチジルイノシトール４モノリン酸を認識する PH ドメインを持ち、C 末端領域にセラミドの膜間転移を触媒する START ドメインを持っている。CERT は多重リン酸化によって PH ドメインと START ドメインが相互阻害を起こして負に制御されることを明らかにした。また、この多重リン酸化にはカゼインキナーゼ Iγ2 が関与することを明らかにした。
研究成果の概要（英文）：
The ceramide transport protein CERT has a PH domain recognizing phosphatidylinositol 4-monophosphate and a START domain catalyzing intermembrane transfer of ceramide. We showed that multiple phosphorylations of CERT induce an auto-inhibitory interaction between the PH and START domains, thereby down-regulating the function of CERT, and that casein kinase Iγ2 is relevant to the phosphorylation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2006 年度	4,000,000	0	4,000,000
2007 年度	3,700,000	0	3,700,000
2008 年度	3,700,000	0	3,700,000
2009 年度	3,700,000	0	3,700,000
年度			
総　計	15,100,000	0	15,100,000

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：セラミド、スフィンゴミエリン、脂質輸送、小胞体、ゴルジ体

１．研究開始当初の背景

脂質は、生物の基本ユニットである細胞において内外の環境間の境界壁を成す生体膜の主要分子基盤であり、それには、親水性環境から自律的に分離する脂質の特性が合理的に生かされている。さらに、脂質は、重量当たりの酸化的エネルギー備蓄が大きく栄養学的にも重要であり、環境からの情報を細胞内へ伝達する際の制御因子としても機能するなど、実に多彩な生物学的役割を担って

いる。脂質を生体内のような親水性環境において恒常的に利用するには、そのための特別な仕組みが存在しなければならないが、その仕組みを解き明かすことは、水と油を同時に扱わねばならぬ技術的困難のために大変遅々としている。

膜脂質が生合成されるとき、異なる細胞内小器官（オルガネラ）の膜で起こる複数のステップを経るために、脂質分子自身は目的とする場所へ的確に移動している。しかし、特定のオルガネラ膜に存在する多種多様な脂質の中から特定の脂質を選びだして他のオルガネラ膜へと運んでいるメカニズムは、どの種類の脂質をとってみてもほとんどわからないままであった。

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関わる分子装置(CERT と命名)の同定に成功した。そして、CERT の解析から、セラミドを小胞体から特異的に引き抜き、ゴルジ体に運搬して放出する「分子引き抜き転移」機構でセラミドの選別輸送は行われていることを主張するに至っていた。しかし、CERT の活性が制御を受けているのか否かについては未解明であった。

２．研究の目的

CERT の活性が制御を受けているのか否かは未解明であったが、我々は CERT 自身がリン酸化修飾されていることを予備的に見出していた。すなわち、哺乳動物細胞で発現させた場合、CERT は SDS-PAGE ゲル上で複数のバンドとなるが、タンパク質ホスファターゼ処理によって、低分子側のバンドに収束した。この結果は、哺乳動物細胞において CERT は複数のリン酸化修飾を受けていることを示している。このような背景を踏まえ、本研究課題では、CERT のリン酸化修飾に注目し、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。

３．研究の方法

(1) CERT のリン酸化部位の決定

HA-epitope タグを付加させた CERT (HA-CERT)を安定発現する HeLa-S3 細胞を大量培養し、細胞質画分を調製した。抗 HA 抗体を結合させた HA-アフィニティーカラムに細胞質画分を供し、洗浄後に HA ペプチドで溶出することで HA-CERT を精製した。精製 HA-CERT をプロテアーゼ消化したペプチドの中からリン酸化ペプチドを精製し、それを質量分析器で解析した。

(2) CERT 変異体の作製と解析

CERT の様々な変異体は、PCR 法を用いたヌクレオチド置換により作製した。ホスファチジルイノシトール４モノリン酸(PI4P)結合活性、膜間セラミド転移活性、セミインタクト細胞を用いたセラミドの小胞体-ゴルジ体間輸送活性は、我々が以前確立した方法に従った。

４．研究成果

CERT のアミノ末端領域約 100 アミノ酸は PI4P を認識する PH ドメインを形成し、カルボキシル末端約 200 アミノ酸はセラミドの膜間転移を触媒する START ドメインを形成している。START ドメインの上流には、小胞体との相互作用に関わる FFAT モチーフが存在する。

(1) CERT 機能におけるリン酸化の意義

哺乳動物細胞で発現している CERT の大部分はリン酸化されていることを我々は観察していた。そこで、哺乳動物細胞から CERT

タンパク質を精製し、リン酸化されたままの精製 CERT をトリプシン処理し、そこから得られたリン酸化ペプチドを質量分析法で解析することにより、PH ドメインの下流にある約 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・スレオニンをグルタミン酸に置換した 10E 変異体も作成し、以下の解析に利用した。HA-epitope を付加させた CERT の野生型、S132A 変異体、10E 変異体を HeLa 細胞に発現させ、それぞれを親和性クロマトグラフィー法で精製し、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倍の活性を示した。野生型 CERT を脱リン酸化酵素処理すると活性が S132A 変異体のレベルに上昇した。10E 変異体はほとんど活性を示さなかった。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った。

(2) CERT の PH ドメインおよび START ドメインに対する SRM リン酸化の影響

上述したように SRM のリン酸化は CERT 機能を負に制御することから、CERT の機能ドメインに対する影響を調べた。興味深いことに、PH ドメインが有する PI4P 結合活性と START ドメインの有する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 変異体のレベルに上昇した。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。これらの結果は、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起こすことを示唆している。

(3) SM 代謝に影響を及ぼすキナーゼの同定

SM 代謝に影響を及ぼすような因子を同定することを目的として、レトロウイルスベクターを用いたヒト cDNA 発現ライブラリーを CHO 細胞に導入後、SM 結合性毒素・ライセニンに対して耐性を付与するような cDNA を探索した。その結果、カゼインキナーゼ Iγ2(CKI γ2)をコードする cDNA が得られた。CKI γ2 高発現細胞ではセラミドの SM への変化が低下しているが、SM 合成酵素の活性は正常であった。そこで、セラミドの小胞体-ゴルジ体間輸送への影響を調べたところ、CKI γ2 高発現細胞では当該輸送能が低下していることが明らかとなった。

(4) CKI γ2 が CERT に及ぼす影響

CKI γ2 高発現 CHO 細胞では CERT は多重リン酸化状態になっていた。この細胞に野生型 CERT を過剰発現してもほぼ全ての CERT は多重リン酸化状態となり、SM 生合成は低いままであるが、SRM の多重リン酸化を受けない S132A 変異体を発現させると SM 合成は正常レベルに回復した。HeLa 細胞において、RNA 干渉法により内在性の CKI γ2 mRNA レベルを低下させると CERT の多重リン酸化型が低リン酸化型へと移行した。CKI γの他のアイソフォームである CKI γ1 および CKI γ3 のノックダウンでは CERT のリン酸化状態にほとんど変化がなかった。これらの結果から、CKI γ2 は CERT の機能を負に制御する SRM の多重リン酸化に関わ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１４件）

(1) Miyuki Kawano, Keigo Kumagai, Masahiro Nishijima, and Kentaro 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.

(2) Kentaro Hanada, Keigo Kumagai, Nario Tomishige, and Miyuki Kawano: CERT and intracellular trafficking of ceramide. ***Biochim. Biophys. Acta*** 1771, 644-653, 2007.

(3) Keigo Kumagai, Miyuki Kawano, Fumiko Shinkai-Ouchi, Masahiro Nishijima, and Kentaro 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.

(4) Norio Kudo, Keigo Kumagai, Nario Tomishige, Toshiyuki Yamaji, Soichi Wakatsuki, Masahiro Nishijima, Kentaro Hanada, and Ryuichi Kato: Structural basis for specific lipid recognition by CERT responsible for nonvesicular trafficking of ceramide. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA*** 105, 488-493, 2008

(5) Nario Tomishige, Keigo Kumagai, Jun Kusuda, Masahiro Nishijima, and Kentaro Hanada: Casein kinase Iγ2 down-regulates trafficking of ceramide in the synthesis of sphingomyelin. ***Mol. Biol. Cell*** 20, 348-357, 2009

(6) Kentaro Hanada, Keigo Kumagai, Nario Tomishige, and Toshiyuki Yamaji: CERT-mediated trafficking of ceramide. ***Biochim. Biophys. Acta*** 1791, 684-691, 2009.

〔学会発表〕（計２７件）

(1) K. Hanada: Regulation of CERT-mediated trafficking of ceramide, 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, June 22, 2006, Kyoto, Japan.

(2) 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.

(3) K. Hanada: CERT and ceramide trafficking, Japan-Switzerland 2nd Joint Seminar on synthesis and trafficking of glycolipids and glycolipid anchored proteins, January 30-February 2, 2007, Tsukuba, Japan.

(4) K. Hanada: Regulation of CERT-mediated trafficking of ceramide, 48th International Conference on the Bioscience of Lipids, September 4-8, 2007, Turku, Finland.

(5) K. Hanada: Regulation of CERT-mediated trafficking of ceramide, 4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (PLM2009), May 25-28, 2009, Tokyo

〔図書〕（計０件）

〔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〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
花田　賢太郎 (HANADA KENTARO)
感染研・細胞化学部・部長
研究者番号：30192701

(2)研究分担者
(　　)

研究者番号：

(3)連携研究者
熊谷　圭悟 (KUMAGAI KEIGO)
感染研・細胞化学部・研究員
研究者番号：40443105
冨重　斉生 (TOMISHIGE NARIO)
感染研・細胞化学部・協力研究員
研究者番号：10435711
河野　美幸 (KAWANO MIYUKI)
感染研・細胞化学部・協力研究員
研究者番号：10454498