

令和 3 年 8 月 23 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06635

研究課題名(和文) ヒト免疫不全ウイルスの膜融合に関わるSMS2のヘテロオリゴマー解析

研究課題名(英文) Complex formation of sphingomyelin synthase with glucosylceramide synthase increases sphingomyelin and decreases glucosylceramide levels

研究代表者

林 康広 (Hayashi, Yasuhiro)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：70582857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、SM合成酵素2 (SMS2) がヒト免疫不全ウイルスのエンベロープタンパク質を介した膜融合を促進することを発見した。その解析の過程で、SMS2のアイソフォームタンパク質であるSMS1とグルコシルセラミド合成酵素(GlcT) が近接することを見出した。二つのタンパク質はゴルジ体で実質的には異なる分布を示すが部分的に共局在することが知られている。しかしながら、ゴルジ体で共局在するSMS1とGlcTの役割については不明な点が多い。免疫沈降法および蛍光タンパク質再構成法より、SMS1とGlcTのヘテロ複合体はSM産生を促進し、GlcCer産生を抑制する役割を果たしていることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、SMはメタボリックシンドロームへの関与のみならず、機能性食品素材としても注目されている。このことは、SM量は生体内で適切にコントロールされるべきであり、体内でのSM量の過剰な産生および減少は、私たちの健康寿命を縮めることを示唆している。本研究は、SM産生の制御のメカニズムの一部を解明したという学術的な発見にとどまらず、SMのメタボリックシンドロームへの関与を解明する研究基盤へと繋がっていくことが期待される。

研究成果の概要(英文)： Sphingomyelin synthase 1 (SMS1) and glucosylceramide synthase (GlcT) are key enzymes that catalyze the conversion of ceramide (Cer) to sphingomyelin (SM) and glucosylceramide (GlcCer), respectively. GlcCer synthesis has been postulated to occur mainly in cis-Golgi, and SM synthesis is thought to occur in medial/trans-Golgi; however, SMS1 and GlcT are known to partially colocalize in cisternae, especially in medial/trans-Golgi. Here, we report that SMS1 and GlcT can form a heteromeric complex, in which the N terminus of SMS1 and the C terminus of GlcT are in close proximity. Deletion of the N-terminal sterile alpha motif of SMS1 reduced the stability of the SMS1/GlcT complex, resulting in a significant reduction in SM synthesis *in vivo*. In contrast, chemical-induced heterodimerization augmented SMS1 activity, depending on an increase in the amount and stability of the complex. These results suggest that formation of the SMS1/GlcT heteromeric complex increases SM synthesis.

研究分野：脂質代謝酵素

キーワード：脂質代謝酵素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は、脂質代謝酵素であるスフィンゴミエリン合成酵素 2 (SMS2) がヒト免疫不全ウイルス (HIV) と宿主細胞の膜融合を促進することを明らかにした (Hayashi et al., J. Biol. Chem., 2014)。興味深いことに、SMS2 の活性残基の変異体 (H229A) はスフィンゴミエリン合成能が無いにもかかわらず、HIV と宿主細胞の膜融合を促進した。これより、SMS2 が産生するリン脂質ではなく、SMS2 そのものが膜融合に関わることが示唆された。SMS2 は形質膜上の情報伝達分子が集積するマイクロドメインに局在することから、シグナル伝達を担う様々なタンパク質と相互作用 (ヘテロオリゴマーを形成) し、HIV 感染に関与することが考えられる。そこで、SMS2 と相互作用する分子を化学架橋剤法およびビオチンリガーゼ法で同定し、SMS2 のヘテロオリゴマー形成が HIV 感染に関与するのかを明らかにすることで、新しい作用機序の抗 HIV 剤の開発につながる基礎研究基盤を確立していく。

### 2. 研究の目的

我々は、SM 合成酵素 2 (SMS2) がヒト免疫不全ウイルスのエンベロープタンパク質を介した膜融合を促進することを明らかにした。その解析の過程で、SMS2 のアイソフォームタンパク質である SMS1 とグルコシルセラミド合成酵素 (GlcT) が近接することを見出した。二つのタンパク質はゴルジ体で実質的には異なる分布を示すが部分的に共局在することが知られている。しかしながら、ゴルジ体で共局在する SMS1 と GlcT の役割については不明な点が多い。そこで、SMS1 と GlcT のヘテロ複合体の機能を明らかにすることを目的として実験を行った。

### 3. 研究の方法

以下に記す方法で、研究を行った。

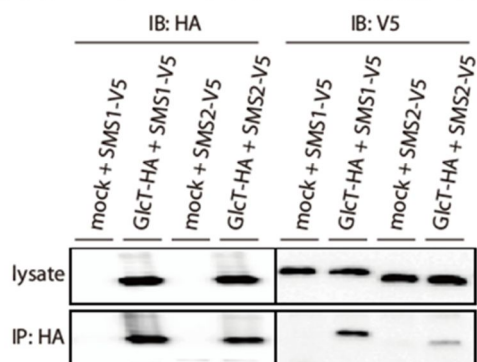
### 4. 研究成果

#### (A) GlcT は、SMS2 よりも SMS1 に親和性が高い

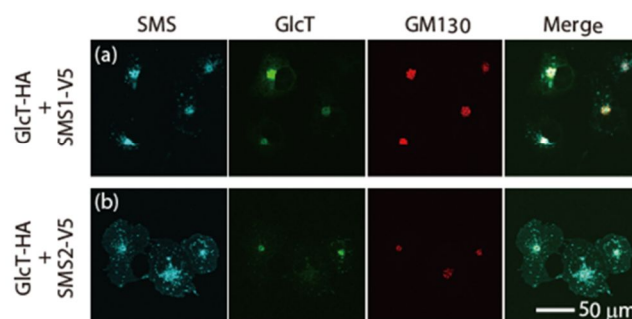
レトロウィルスの発現系を用いて、C 末端に V5-tag を付加した SMS1 および SMS2 を安定に発現する COS-7 細胞を作製した。これらの細胞に C 末端に HA-tag を付加した GlcT を発現させ、1% CHAPS で可溶化し、抗 HA ビーズを用いて免疫共沈を行った。その結果、GlcT は SMS2 よりも SMS1 と親和性が高いことが分かった (図 1)。SMS1 はホモダイマーを形成するので、SMS1 ホモダイマーと SMS1-GlcT ヘテロ複合体の親和力を免疫共沈で比較したところ、SMS1-GlcT ヘテロ複合体の相互作用は SMS1 ホモダイマーの相互作用よりも 5 倍程度弱かった (data not shown)。

コンフォーカル顕微鏡で細胞内局在を調べると、SMS1 はゴルジ体で GlcT と完全に共局在するが、SMS2 はゴルジ体および形質膜に局在するため、部分的にゴルジ体で GlcT と共局在した (図 2)。これらの結果より、SMS1 と GlcT は相互作用が弱いながらも、ゴルジ体でヘテロ複合体を形成することが示唆された。

【図1】 GlcT は SMS2 よりも SMS1 に親和性が高い



【図2】 SMS1 はゴルジ体で GlcT と共局在する

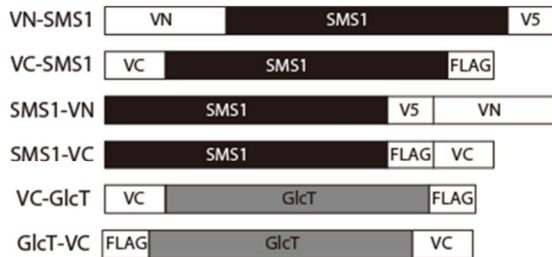


#### (B) SMS1-GlcT ヘテロ複合体における近傍領域の同定

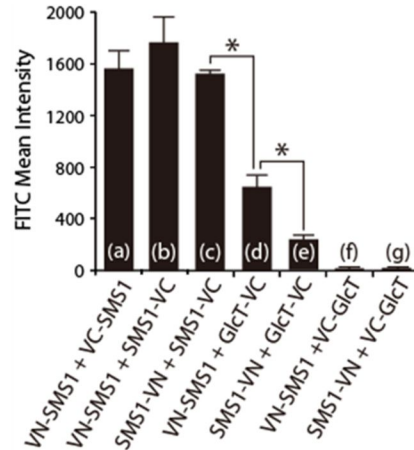
SMS1 と GlcT のアミノ末端が近接するのかを BiFC 法で調べた。蛍光タンパク質 Venus の N

末端側 (VN) あるいは C 末端側 (VC) を SMS1 の N 末端あるいは C 末端に付加したキメラ蛋白質、そして VC を GlcT の N 末端あるいは C 末端に付加したキメラ蛋白質の発現ベクターを構築した (図 3)。これらを COS-7 細胞に発現させ、コンフォーカル顕微鏡およびフローサイトをを用いて細胞内局在および蛍光強度を解析した。コンフォーカル顕微鏡より、各キメラ蛋白質はゴルジ体に局在することが分かった (data not shown)。フローサイトの解析より、SMS1-GlcT ヘテロ複合体の蛍光強度 (図 4 の棒グラフ d-g) は、SMS1 ホモダイマーの蛍光強度 (図 4 の棒グラフ

【図3】SMS1, GlcT のキメラ蛋白質の模式図



【図4】SMS1のN末端はGlcTのC末端の近傍にある

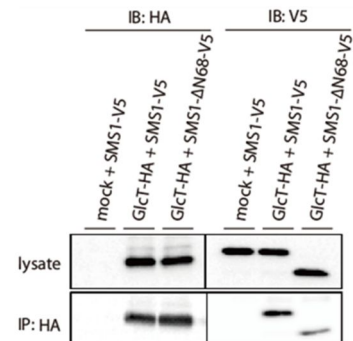


a-c) よりも低かった。しかしながら、一部の組み合わせで Venus 蛍光が検出されたことから SMS1 と GlcT は細胞内において近接することが明らかとなった。SMS1-GlcT ヘテロ複合体において、GlcT の C 末端は SMS1 の N 末端と最も近接し (図 4 の棒グラフ d)、SMS1 の C 末端とも接する (図 4 の棒グラフ e) ことが分かった。しかしながら、GlcT の N 末端は SMS1 の N, C 末端と近接していないことが分かった (図 4 の棒グラフ f, g)。N, C 末端にタグを付けた SMS1, GlcT を細胞に発現させ、digitonin 処理後に細胞を免疫染色し、SMS1 と GlcT の N, C 末端配向を調べた。その結果、SMS1 の N, C 末端はゴルジ体において細胞質に配向するが、GlcT は N 末端がゴルジ体のルーメン側、C 末端を細胞質側に配向することが明らかになり (data not shown)、BiFC 法の結果を支持するものであった。これらの結果より、SMS1 の N 末端と GlcT の C 末端はゴルジ体の細胞質側で近接することが分かった。

**(C) SMS1 の N 末端の SAM 領域は GlcT との親和性に重要である**

SMS1 の N 末端 (4-68 a.a.) には、sterile alpha motif (SAM) 領域が存在する。SAM 領域はタンパク質相互作用を媒介すると考えられているが、SMS1 の SAM 領域の機能は解明されていない。BiFC 法の結果より、SMS1 の N 末端は GlcT の近傍に存在することから、SMS1 の SAM 領域が SMS1-GlcT ヘテロ複合体の形成に関与するのかを免疫共沈で調べた。興味深いことに、SMS1-ΔN68 は野生型 SMS1 と比較して GlcT との親和性が低下することが明らかとなった (図 5)。コンフォーカル顕微鏡より、SMS1-ΔN68 はゴルジ体に局在し、細胞内局在に変化はなかった (data not shown)。さらに、BiFC 法を用いた解析より、SMS1-ΔN68 の N, C 末端と GlcT の C 末端との距離は、野生型 SMS1 と変化がなかった (data not shown)。以上のことから SMS1 の SAM 領域は、細胞内局在や GlcT との距離に影響せず、SMS1-GlcT ヘテロ複合体間の親和性に関与することが分かった。

【図5】SAM領域はGlcTとの親和性に関わる



本研究の結果より、SMS1 は N 末端を介して GlcT とヘテロ複合体を形成しうることが明らかになった。

#### **(D) FKBP/FRB システムを用いたヘテロ 2 量体における SM、GlcCer 産生**

内因性 SMS1, GlcT による影響を防ぐために、CRISPR/Cas9 システムを用いて HEK293 細胞より SMS1/GlcT DKO 細胞を作製した。FKBP-SMS1 キメラタンパク質と FRB-GlcT キメラタンパク質を発現する SMS1/GlcT 欠損細胞をラパマイシンで処理し、ヘテロ 2 量体の形成を誘導した後、細胞を<sup>14</sup>C]ステアリン酸で 3 時間ラベルし、Blight-Dyer 法により脂質を抽出、TLC で展開後、Typhoon FLA9500 により検出した。FKBP-SMS1 キメラタンパク質と FRB-GlcT キメラタンパク質を SMS1/GlcT 欠損細胞に発現させ、ラパマイシン存在下でヘテロ 2 量体を形成させると、SM 産生が促進したが、GlcCer 産生には影響がなかった。

#### **(E) GlcT-SMS1 キメラタンパク質における SM、GlcCer 産生**

SMS1 と GlcT のヘテロ 2 量体の量を増やすため、SMS1 と GlcT を異なる長さのリンカーで接続したキメラタンパク質を作製した。GlcT-SMS1 キメラタンパク質を発現する SMS1/GlcT 欠損細胞を<sup>14</sup>C]ステアリン酸で 3 時間ラベルし、Blight-Dyer 法により脂質を抽出、TLC で展開後、Typhoon FLA9500 により検出した。また、GlcT-SMS1 キメラタンパク質では SM 産生が促進するが、GlcCer 産生は抑制された。GlcCer 産生量は、キメラタンパク質における SMS1 と GlcT 間のリンカーの長さに依存することから、SMS1 と GlcT が極めて近距離に局在するヘテロ複合体において GlcCer 産生が抑制されることが示唆された。そのため、10 kDa を超えるタンパク質である FKBP/FRB を用いて形成誘導したヘテロ 2 量体では SMS1 と GlcT が極めて近距離に局在できないため、FKBP-SMS1 キメラタンパク質と FRB-GlcT キメラタンパク質によるヘテロ 2 量体では GlcCer 産生に影響しなかったと推測している。以上から、SMS1 と GlcT のヘテロ複合体は SM 産生を促進し、GlcCer 産生を抑制する役割を果たしていることが考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murakami Chiaki, Hoshino Fumi, Sakai Hiromichi, Hayashi Yasuhiro, Yamashita Atsushi, Sakane Fumio	4. 巻 295
2. 論文標題 Diacylglycerol kinase and sphingomyelin synthase-related protein functionally interact via their sterile motif domains	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 2932 ~ 2947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.012369	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hama Kotaro, Fujiwara Yuko, Takashima Shigeo, Hayashi Yasuhiro, Yamashita Atsushi, Shimozawa Nobuyuki, Yokoyama Kazuaki	4. 巻 61
2. 論文標題 Hexacosenoyl-CoA is the most abundant very long-chain acyl-CoA in ATP binding cassette transporter D1-deficient cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 523 ~ 536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1194/jlr.P119000325	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 林 康広	4. 巻 91
2. 論文標題 スフィンゴミエリン合成酵素のホモおよびヘテロ複合体の解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学会誌ミニレビュー	6. 最初と最後の頁 523 ~ 528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasuhiro Hayashi, Yoko Nemoto-Sasaki, Naoki Matsumoto, Kotaro Hama, Takashi Tanikawa, Saori Oka, Tadaaki Saeki, Tatsuya Kumasaka, Takanori Koizumi, Seisuke Arai, Ikuo Wada, Kazuaki Yokoyama, Takayuki Sugiura, and Atsushi Yamashita	4. 巻 293
2. 論文標題 Complex formation of sphingomyelin synthase 1 with glucosylceramide synthase increases sphingomyelin and decreases glucosylceramide levels	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 17505-17522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.002048.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Yasuhiro, Nemoto-Sasaki Yoko, Matsumoto Naoki, Hama Kotaro, Tanikawa Takashi, Oka Saori, Saeki Tadaaki, Kumasaka Tatsuya, Koizumi Takanori, Arai Seisuke, Wada Ikuo, Yokoyama Kazuaki, Sugiura Takayuki, Yamashita Atsushi	4. 巻 293
2. 論文標題 Complex formation of sphingomyelin synthase 1 with glucosylceramide synthase increases sphingomyelin and decreases glucosylceramide levels	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 17505 ~ 17522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.002048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 林 康広
2. 発表標題 スフィンゴミエリン合成酵素のホモ・ヘテロ複合体の機能解析
3. 学会等名 第63回 日本薬学会関東支部大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhiro Hayashi, Yoko Nemoto-Sasaki, Naoki Matsumoto, Takanori Koizumi, Kotaro Hama, Kazuaki Yokoyama, Atsushi Yamashita
2. 発表標題 Sphingomyelin synthase 1 forms a complex with glucosylceramide synthase that is involved in the regulation of selective ceramide usage
3. 学会等名 International Conference on the Bioscience of Lipids
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhiro Hayashi
2. 発表標題 Sphingomyelin synthase 1 forms a complex with glucosylceramide synthase that is involved in the regulation of selective ceramide usage
3. 学会等名 Gordon Research Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 康広、佐々木洋子、松本直樹、濱 弘太郎、小泉昂範、横山和明、山下純
2. 発表標題 スフィンゴミエリン合成酵素1とグルコシルセラミド合成酵素のヘテロ複合体形成の解析
3. 学会等名 日本脂質生化学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 林 康広(担当:分担執筆, 範囲:ヒト免疫不全ウイルスとスフィンゴミエリン合成酵素)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 食品化学新聞社	5. 総ページ数 237
3. 書名 セラミド研究の新展開 基礎から応用へ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関