

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間： 2008年～2009年

課題番号：20790092

研究課題名（和文） ラフトの構成成分の減少が CERT の脱リン酸化を引き起こすメカニズムの解析

研究課題名（英文） The mechanism of dephosphorylation of CERT by the reduction of raft-components

研究代表者：熊谷 圭悟（国立感染症研究所細胞化学部 研究員）

研究者番号：40443105

研究成果の概要（和文）：

セラミド輸送タンパク質 CERT は脱リン酸化されることで活性化される。本研究はこれまでに知られていた脱リン酸化刺激、即ち、スフィンゴ脂質の生合成を阻害した時に見られる脱リン酸化と、細胞膜上のスフィンゴミエリンを分解した時に見られる脱リン酸化が異なることを明らかにした。また、これまで知られていたリン酸化サイトとは異なるリン酸化サイトを見出し、より複雑な制御がなされていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

It is known that CERT (ceramide transport protein) is activated by the dephosphorylation, which is triggered by the degradation of plasma membrane sphingomyelin or by the treatment of inhibitor for sphingomyelin synthesis. Our research elucidated these two dephosphorylation pathway is qualitatively different. Additionally, a novel phosphorylation site of CERT was found unexpectedly, and the phosphorylation of this site had a significant effect on the previously reported multiple phosphorylation of CERT. The results suggest that the activity of CERT is regulated by more complicated, multi-step mechanism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,800,000		1,800,000
21 年度	1,400,000		1,400,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000		3,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学・生化学

キーワード：脂質

#### 1. 研究開始当初の背景

セラミド輸送タンパク質 CERT は脱リン酸化されることで活性化される。ラフトの構成成分であるスフィンゴミエリンを分解すると、CERT が脱リン酸化されること等が明らかになっていた。

#### 2. 研究の目的

ラフトの構成成分の減少がどのように CERT の脱リン酸化を引き起こすのか明らかにすることを目的とした。

#### 3. 研究の方法

リン酸ラベルを用いて CERT の新規リン酸化・脱リン酸化の速度を調べ、どちらの変化が主たる原因となって脱リン酸化が起きているのか明らかにする。その結果をもとに着目すべき因子を絞り込み、対象とする因子のノックダウンや局在の変化等を調べる。

#### 4. 研究成果

アイソトープラベル実験では、細胞にスフィンゴミエリナーゼ処理を行っても、CERT の脱リン酸化速度は変化しないことが明らかになった。一方、技術的な問題から、新規リン酸化速度を議論するには不十分な結果しか得られなかった。新規リン酸化に関して、PKD のノックダウンなどを試みたが、CERT の脱リン酸化が検出されなかったため現在も検討を続けている。

また、スフィンゴ脂質の合成を阻害することによってもラフトのスフィンゴミエリンを減少させることができるが、この場合の CERT の脱リン酸化プロセスはスフィンゴミエリナーゼ処理の場合とは異なることを明らかにした。スフィンゴ脂質の生合成を阻害した場合には、ホスファターゼの作用が優位に効いていると推測された。

すなわち、計画当初に想定していたようにラフトの状態が CERT のリン酸化に影響するという単純な構図ではなく、細胞内のスフィンゴ脂質生合成の状態も CERT のリン酸化に影響を与えるものと考えられる。

更に、これまで知られていた CERT のリン酸化サイトとは全く異なるサイトがリン酸化されていることを明らかにした。このサイトはこれまで知られていた多重リン酸化サイトのリン酸化状態に影響を与え、CERT のリン酸化はより複雑に制御されてい

ることが明らかになった。

これまで、スフィンゴ脂質の生合成を調節するメカニズムについてはほとんど分かっていなかった。最近、スフィンゴ脂質生合成の律速反応を担う SPT の活性を Orm という因子が制御している旨 Weissman らが報告し、スフィンゴ脂質分野の研究者に大きなインパクトを与えた。CERT のリン酸化制御を明らかにすることはスフィンゴ脂質生合成の調節機構をもう一つ解明することであり、基礎研究を進展させるとともに、血中コレステロール量との相関性を通じて臨床分野への応用・理解へとつながっていくものと期待される。

#### 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 1 件)

Kudo N, Kumagai K, Matsubara R, Kobayashi S, Hanada K, Wakatsuki S, Kato R., Crystal structures of the CERT START domain with inhibitors provide insights into the mechanism of ceramide transfer., J Mol Biol, 査読有, 396(2), 2010, 245-51

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○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

熊谷 圭悟 (KUMAGAI KEIGO)

国立感染症研究所・細胞科学部・研究員

研究者番号：40443105

(2)研究分担者

(0)

研究者番号：

(3)連携研究者

(0)

研究者番号：