

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月10日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770217

研究課題名（和文） 生体膜スフィンゴ脂質の代謝マシーナリーと生物機能の解明

研究課題名（英文） Metabolic machinery and biological function of membrane sphingolipids

研究代表者

谷 元洋（TANI MOTOHIRO）

九州大学・理学研究院・准教授

研究者番号：20452740

研究成果の概要（和文）：

スフィンゴ脂質は生体膜の一構成成分として、シグナル伝達等様々な生命現象に関与する。本研究では、スフィンゴ脂質代謝酵素に着目して、生体膜スフィンゴ脂質及びその代謝産物であるセラミドの生物機能に関して、出芽酵母をモデル生物として解析を行った。具体的な成果として、(1) 特定の複合スフィンゴ脂質、ホスホイノチシド、ホスファチジルセリンという複数のリン脂質の代謝異常は、酵母の生命維持機構（おそらく細胞内小胞輸送系）に重大な影響を及ぼすことが明らかとなった、(2) 複合スフィンゴ脂質及びホスファチジルセリンが協調的に機能することで、特異的な細胞内輸送経路（初期エンドソームからゴルジ体への小胞輸送）を調節していることが初めて明らかとなった、(3) 酵母遺伝学を用いた解析より、セラミドの水酸化や脂肪酸の鎖長の状態が、その生理活性を決定する上での重要な構造ファクターであることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Sphingolipids, the major lipid components of the eukaryotic plasma membrane, play critical roles in many physiologically important events. In this study, we focused on sphingolipid-metabolizing enzymes and investigated physiological function of membrane complex sphingolipids and ceramides by using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism. The results were summarized below: [1] impairment of metabolism of a specific subtype of complex sphingolipid, phosphoinositides, and phosphatidylserine causes synthetic lethal phenotype, [2] specific complex sphingolipid and phosphatidylserine are coordinately involved in vesicular trafficking between early endosomes and the Golgi compartments, [3] hydroxylation states and chain lengths of fatty acids in ceramide are critical structural factors for toxicity of ceramide.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：生体膜、スフィンゴ脂質、リン脂質、脂質代謝酵素

1. 研究開始当初の背景

脂質二重層を構成する生体膜リン脂質はスフィンゴ脂質とグリセロリン脂質に大別され、その極性基や脂肪酸鎖の違いにより 1000 種類以上の分子種が存在する。これらのリン脂質は、膜二重層の細胞内外における非対称性、あるいは形質膜、各オルガネラ膜における特異的な分布など、厳密な制御のもとに構成されている。また近年、形質膜においてスフィンゴ脂質とステロールで構成される脂質マイクロドメインが細胞内外のシグナル伝達の中継地点の役割を果たしていることも注目を集めている。このような生体膜リン脂質の構造多様性と特異的な分布は、生体膜の形成維持に必須であるだけでなく、セラミド、スフィンゴシン 1-リン酸といったスフィンゴ脂質代謝産物が脂質シグナリング分子として細胞の適切な場所で特定のシグナル伝達分子に作用する為にも重要である。しかしながら、このような非常に複雑な生体膜リン脂質の構造多様性の生物学的意義と、空間的ダイナミズムの調節機構は、未だ十分に理解されていない。また、脂質シグナリング分子がどこで、どのようなターゲットに作用するのかについても未解決な点が多い。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、動物細胞を用いてスフィンゴ脂質代謝酵素の局在制御機構を解析し、細胞の特定の場所(形質膜外層を含む細胞外領域、形質膜内層)で機能するスフィンゴ脂質代謝経路の存在を明らかにしてきた。本研究では、モデル生物として分子生物学的アプローチが容易な出芽酵母を用いて、スフィンゴ脂質代謝酵素に着眼点を置き、生体膜スフィンゴ脂質及びその代謝産物であるセラミドの生物機能の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酵母遺伝子ノックアウトライブラリーからの Aureobasidin A 高感受性及び抵抗性変異株のスクリーニング

スフィンゴ脂質代謝阻害剤 Aureobasidin A (AbA)感受性を調べるために、384 ウェル用のレプリケーターを用いて、酵母遺伝子ノックアウトライブラリーの全株(約 4800)を合計 14 枚の YPD plate へ植え継いだ。これを AbA 0.01 µg/ml (高感受性株スクリーニング)、0.1 µg/ml (抵抗性株スクリーニング)含有 YPD plate へ植え継ぎ、生育の評価を行った。

(2) テトラサイクリン誘導発現抑制株の作製と解析

染色体上の標的遺伝子の上位にテトラサイクリン調節プロモーターを組み込み、ドキシサイクリン処理で標的遺伝子の転写抑制を誘導可能な変異株を作製し、解析に用いた。それぞれの遺伝子の発現抑制は、10 µg/ml のドキシサイクリンを含む培地で行った。

4. 研究成果

(1) 出芽酵母における特定の複合スフィンゴ脂質サブタイプとグリセロリン脂質の機能的相互作用の解明

酵母においてセラミドをイノシトールホスホリルセラミド (IPC)に変換する酵素 (Aur1)は生育に必須であり、その特異的阻害剤である AbA は、強力な生育阻害を引き起こすことが知られている。この生育阻害の原因は、(1)複合スフィンゴ脂質 (IPC, MIPC, M(IP)₂C)の減少、または (2)中間代謝産物であるセラミドの細胞内蓄積であると考えられている。申請者はこれまでに AbA が引き起こすスフィンゴ脂質代謝異常に対して高感受性を示す遺伝子欠損株の網羅的なスクリーニングを酵母遺伝子ノックアウトライブラリーを用いて行い、計 18 株の高感受性株を同定した。本研究では、この中よりホスホイノチドホスファターゼ遺伝子 (*SAC1*)に着目して更に解析を進めた。その結果、*SAC1*と特定の複合スフィンゴ脂質代謝酵素遺伝子 (*CSG1*, *CSG2*, *IPT1*, *SCS7*)の二重欠損によって酵母が致死となることが明らかとなった。*sac1* Δ 株のリン脂質組成を解析した結果、ホスファチジルセリン(PS)量が野生株と比較して 40%程度減少していることがわかった。このリン脂質代謝変動と、*SAC1*,スフィンゴ脂質代謝酵素遺伝子の合成致死との関係を調べるために、PS 合成酵素遺伝子 *PSSI* を過剰発現させたところ、*SAC1*,スフィンゴ脂質代謝酵素遺伝子二重変異株の生育損傷が相補されることがわかった。また一方で、*SAC1*,スフィンゴ脂質代謝酵素遺伝子二重変異株では、液胞の激しい断片化が引き起こされるだけでなく、小胞輸送に関連する Arf の GTPase 活性化タンパク質である Age1 の過剰発現によりその生育損傷が相補されることが確認された。これらのことより、特定の複合スフィンゴ脂質サブタイプ、ホスホイノチド、PS という複数のリン脂質の代謝異常が、酵母の生命維持機構(おそらく細胞内小胞輸送系)に重大な影響を及ぼすことが明らかとなった(論文 5)。

(2) 複合スフィンゴ脂質とホスファチジルセリンによるエンドソーム-ゴルジ間小胞輸送の制御

(1)の研究成果を継続させ、PS 合成酵素遺伝子 (*PSSI*)と複合スフィンゴ脂質代謝酵素遺伝子の二重変異によっても強い合成生育阻害が観察されることがわかった(論文 5)。本研究では、複合スフィンゴ脂質とPSの機能的相互作用を詳細に解析した結果、初期エンドソームを介した小胞輸送経路における役割を見出した。複合スフィンゴ脂質、PS の二重代謝異常株では v-SNARE タンパク質 Snc1 の細胞内局在に異常が起こることがわかった。Snc1 は、ゴルジ体から形質膜へと輸送された後、エンドサイトーシス、初期エンドソームを介してゴルジ体へとリサイクリングされる。PS もしくは複合スフィンゴ脂質の単独の代謝異常株において、GFP 融合 Snc1 の分

布に大きな異常は見られなかったが、二重代謝異常株において、GFP融合Snc1は初期エンドソームに非常に強く蓄積した。この蓄積は、エンドサイトーシスされないSnc1変異体では観察されないことから、形質膜からの取り込み以降の過程に損傷が起きていることが示唆された。一方で、後期エンドソーム-ゴルジ体間のタンパク質輸送には大きな損傷は見られず、PS、複合スフィンゴ脂質の二重代謝異常株においては、初期エンドソーム-ゴルジ体間の輸送経路に特異的に損傷が起きていることが考えられた。これらの結果より、複合スフィンゴ脂質及びPSという二つの生体膜脂質が協調的に機能することで、特異的な細胞内輸送経路を調節していることが初めて明らかとなった。

(3) 出芽酵母におけるセラミドの構造と機能の相関に関する研究

AbA に対して抵抗性を示す変異株の探索を、酵母遺伝子ノックアウトライブラリーを用いて網羅的に行った結果、*ELO3* 欠損株を見出した。*ELO3* はセラミドに組み込まれる極長鎖脂肪酸の生合成に関与する遺伝子である。*elo3Δ* 株のAur1抑制に対する抵抗性は、Aur1のテトラサイクリン誘導発現抑制によっても同様に確認された。*ELO3* 欠損は、Aur1抑制によるセラミド蓄積、複合スフィンゴ脂質の低下のどちらが誘導する生育阻害に影響するのか調べるために、セラミド合成酵素のサブユニットLip1の発現抑制株を用いて解析を行った。Lip1の抑制は、複合スフィンゴ脂質の低下を引き起こすが、セラミドの蓄積は引き起こさない。Lip1を発現抑制した*elo3Δ*株は、Lip1の単独発現抑制株よりもむしろ顕著な生育阻害を示した。これらの結果より、*elo3Δ*株はセラミドの蓄積に対して抵抗性となっていることが示唆された(論文6)。

一方で酵母のセラミドは、*SUR2*、*SCS7*、*CCC2*によって3カ所で水酸化修飾を受ける。これらの欠損株のAur1発現抑制に対する感受性を調べた。その結果、*SUR2*欠損によってAur1発現抑制による生育阻害に対して弱い抵抗性が出ることを確認された。一方で、*SCS7*欠損は、Aur1発現抑制による生育阻害に対して高感受性となることがわかった。*elo3Δ*株と同様、Lip1の発現抑制株を用いた解析を行った結果、セラミド合成抑制による生育阻害に対しては、Aur1抑制の際に見られたような抵抗性や高感受性を示さないことがわかった。これらの結果より、*SUR2*及び*SCS7*欠損は、セラミド蓄積に対して、抵抗性、高感受性をそれぞれ示すことが示唆された(論文2)。

今回、*ELO3*、*SUR2*、*SCS7*の欠損株が、Aur1発現抑制下において異なる感受性を示すことが明らかとなった。*ELO3*は長鎖脂肪酸の伸長反応に関わる遺伝子で、*ELO3*欠損株ではC26の極長鎖脂肪酸が生合成されない。酵母のスフィンゴ脂質は、その殆どがC26-脂肪酸によって構

成されているが、*ELO3*欠損株では26未満の脂肪酸鎖を持ったスフィンゴ脂質が生合成される。つまり、*ELO3*欠損下で合成されるC26未満の鎖長を持ったセラミドはC26-セラミドよりも毒性が低いことが示唆される。また*SUR2*はスフィンゴイド塩基の水酸化に関与する遺伝子で、その欠損株はセラミド蓄積に対して抵抗性となる。このことからジヒドロスフィンゴシン骨格のセラミドよりフィトスフィンゴシン骨格のものが毒性は強いということが考えられる。また*SCS7*は脂肪酸の α -水酸化に関与する遺伝子で、その欠損株はセラミド蓄積に対して高感受性となる。このことから、脂肪酸の水酸化によってセラミドの毒性は緩和されることが考えられた。

これらの結果より、セラミドの水酸化や脂肪酸の鎖長はその生理活性を決定する上での重要な構造因子であることが、酵母遺伝学を用いた解析より強く示唆された。

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7件)

1. Nakase M, Tani M, and Takegawa K. Expression of budding yeast *IPT1* produces mannosyldiinositolphosphorylceramide in fission yeast and inhibits cell growth. *Microbiology* 2012 ;158: 1219-1228. 査読有り
2. Tani M, and Kuge O. Hydroxylation state of fatty acid and long-chain base moieties of sphingolipid determine the sensitivity to growth inhibition due to *AUR1* repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 ;417(2): 673-678. 査読有り
3. Kuroda T, Tani M, Moriguchi A, Tokunaga S, Higuchi T, Kitada S, and Kuge O. *FMP30* is required for the maintenance of a normal cardiolipin level and mitochondrial morphology in the absence of mitochondrial phosphatidylethanolamine synthesis. *Mol Microbiol.* 2011 ;80(1): 248-265. 査読有り
4. Nakagawa T, Tani M, Sueyoshi N, and Ito M. The mucin box and signal/anchor sequence of rat neutral ceramidase recruit bacterial sphingomyelinase to the plasma membrane. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011 ;75(5): 987-990. 査読有り
5. Tani M, and Kuge O. Requirement of a specific group of sphingolipid-metabolizing enzyme for growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae* under impaired metabolism of glycerophospholipids. *Mol Microbiol.* 2010 ;78: 395-413. 査読有り
6. Tani M, and Kuge O. Defect of synthesis of

very long-chain fatty acids confers resistance to growth inhibition by inositol phosphorylceramide synthase repression in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem.* 2010 ;148: 565-571.査読有り

7. Nakase M, Tani M, Morita T, Kitamoto-K H, Kashiwazaki J, Nakamura T, Hosomi A, Tanaka N, and Takegawa K. Mannosylinositol phosphorylceramide is a major sphingolipid component and is required for proper localization of plasma membrane proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* 2010 ;123: 1578-1587.査読有り

[学会発表] (計 14 件)

1. スフィンゴ脂質代謝酵素のトポロジーと生物機能の解析
谷 元洋
第 21 回 WS フォーラム, 2011 年 11 月 19 日
2. 出芽酵母のエンドソーム-ゴルジ間輸送における複合スフィンゴ脂質とホスファチジルセリンの機能
谷 元洋, 久下 理
第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011 年 9 月 22 日
3. 複合スフィンゴ脂質によるエンドソーム-ゴルジ間輸送の制御機構の解析
谷 元洋, 久下 理
酵母遺伝学フォーラム, 福岡, 2011 年 9 月 7 日
4. Structural requirements of ceramide for induction of growth defect in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*
Tani M, and Kuge O.
The 30th Naito Conference, Sapporo, June 29, 2011.
- 5 酵母におけるセラミド毒性はその脂肪酸鎖長に依存する
谷 元洋, 久下 理
第 83 回日本生化学会大会, 神戸, 2010 年 12 月 9 日
6. Requirement of the subtype-specific function of sphingolipids for growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae* under aberrant metabolism of glycerophospholipids.
Tani M, and Kuge O.
The 27th Naito Conference, Sapporo, June 30, 2010.
7. スフィンゴ脂質シグナリングの制御機構とその生物機能に関する研究
谷 元洋
平成 22 年度日本生化学会九州支部例会, 鹿児島, 2010 年 5 月 23 日
8. ホスホイノチシドホスファターゼ遺伝子(*SAC1*)欠損下におけるサブタイプ特異的スフィンゴ脂質の生理機能
谷 元洋, 久下 理

2010 年度農芸化学会大会, 東京, 2010 年 3 月 30 日

9. Isolation and phenotypic analysis of high-sensitive mutant against inositol phosphorylceramide synthase inhibitor in *Saccharomyces cerevisiae*
谷 元洋, 久下 理
第 31 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 大阪, 2009 年 11 月 30 日
10. 出芽酵母における *SAC1* と複合スフィンゴリン脂質代謝酵素遺伝子との遺伝学的相互作用の解析
谷 元洋, 久下 理
第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009 年 10 月 22 日
11. 出芽酵母の複合スフィンゴ脂質代謝異常高感受性変異株の探索と表現型解析
谷 元洋, 久下 理
第 51 回日本脂質生化学会, 名古屋, 2009 年 7 月 30 日
12. スフィンゴ脂質代謝酵素と遺伝学的相互作用を示す出芽酵母遺伝子の解析
谷 元洋, 久下 理
第 4 回スフィンゴ脂質セラピ研究会, 米子, 2009 年 7 月 17 日
13. S-palmitoylation is involved in determination of subcellular localization of sphingomyelin synthase 1 and 2
Tani M, and Kuge O.
4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators, Tokyo, May 27, 2009.
14. S-パルミトイル化によるスフィンゴミエリン合成酵素の局在制御
谷 元洋, 久下 理
平成 21 年度日本生化学会九州支部例会, 福岡, 2009 年 5 月 17 日

[図書] (計 3 件)

1. 谷 元洋. スフィンゴ脂質シグナリング分子の代謝マシナリー. 生化学 83(7), 623-627, 2011, 社団法人日本生化学会
2. Bielawski J, Tani M, and Hannun YA. Mass spectrometry methods for the analysis of bioactive sphingolipids: A high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry approach. *Lipid-mediated Signaling* (Eric J. Murphy., ed), 2010, pp177-197, CRC Press
3. 沖野 望, 谷 元洋, 光武 進, 吉村 征浩, 合田初美, 伊東 信. 構造から読み解く中性セラミダーゼの触媒機構, 存在様式及び生理機能. 細胞 Vol.41 No.5, 2009, ニューサイエンス社

6. 研究組織
(1) 研究代表者

谷 元洋 (TANI MOTOHIRO)

九州大学・理学研究院・准教授

研究者番号：20452740