

## 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31日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22870041

研究課題名（和文） カベオリンによる生体膜糖脂質量制御の可能性

研究課題名（英文） Elucidation of the regulating mechanism of glycolipid synthesis by caveolin

研究代表者

石橋 洋平 (ISHIBASHI YOHEI)

独立行政法人理化学研究所・神経膜機能研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：90572868

研究成果の概要（和文）：

カベオラ（ $\Omega$ 状の細胞膜ドメイン）形成に関与するカベオリンが GlcCer 合成量を調節しうる因子であるという仮説を軸に研究を進めたが、より生理条件に近い GlcCer 合成酵素アッセイを開発し、この仮説を検証した結果、これを支持するようなデータは得られなかった。しかしながら、AMP-activated protein kinase (AMPK)が GlcCer 合成酵素の活性を制御する因子であることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

We hypothesized that caveolin may regulate the GlcCer synthase activity. We developed a cell-based assay of GlcCer synthase activity to verify our hypothesis. This assay revealed that caveolin is probably not a regulator of GlcCer synthase. We discovered that the energy sensor AMPK regulates the cellular GlcCer level.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,090,000	327,000	1,417,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,090,000	627,000	2,717,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：スフィンゴ脂質、糖脂質、グルコシルセラミド、AMPK、エネルギー代謝、UDP-グルコース

## 1. 研究開始当初の背景

親水性の糖鎖、疎水性のセラミドからなる糖脂質は、生体膜上で脂質ラフトと呼称されるナノスケールの動的クラスターを形成し、細胞環境に応じて各種シグナル伝達に関与するタンパク群を会合・集積させることにより、作業の効率化、高精度化に貢献している。また、セラミドおよびその代謝産物であるスフィンゴシン 1 リン酸は細胞のアポトーシスと生存に関与するシグナル分子としての側面を持つ。これらの事実から、生命活動の維持・管理には、細胞内糖脂質量およびセラミド量の適切な制御機構が必要であると考えられる。糖脂質やセラミドの合成および分解に関与する酵素群はほぼ全てが同定されたにも関わらず、これらがどのようにして制御され、細胞内糖脂質量を調節しているのか今もって不明であり、世界各国で精力的に研究が行われている研究領域である。最近になり、セラミド量の調節因子として **Orm** ファミリータンパクや **SMSr** が立て続けに同定された。これらのタンパクは、細胞内セラミド量の増加に応じ、セラミドの合成に関わる酵素を負に制御することで、セラミド過剰生産を抑制するという働きを有している。これらの遺伝子をノックダウンした細胞ではセラミド量の増加とそれに伴うオルガネラ構造の破綻、および細胞増殖の異常が観察された。細胞内セラミド量の管理機構の複雑さと重要性を物語るという点で、これらの発見は非常に興味深いものである。しかしながら、これらはセラミド量に関するものであり、糖脂質量の制御機構を説明し得るものではない。近年の研究によって、インスリン抵抗性やパーキンソン病等の発症に、グルコース 1 分子とセラミドから構成されるグルコシルセラミド (GlcCer) の過剰蓄積が関与することが分かってきた。GlcCer 量を制御する機構が明らかになれば、より詳細な発症メカニズムの解明や効果的な薬剤開発へと繋がる可能性がある。

## 2. 研究の目的

申請者らは細胞膜上で  $\Omega$  様の陥没構造として観察されるカベオラの構成タンパクであるカベオリン-1 遺伝子 KO マウスの胎児線維芽細胞 (MEF) において、GlcCer 量が顕著に減少するという現象を発見した。本研究は、「カベオリンは、GlcCer 合成酵素の制御因子である」という、申請者らが新たに打ち立てた仮説の検証を通じ、細胞内 GlcCer 量を制御する機構とその生理的意義の解明を目的とする

## 3. 研究の方法

### (1) 研究材料

細胞は、カベオリン - 1 遺伝子欠損 MEF、GlcCer 合成酵素遺伝子欠損 MEF、3T3、CHO および HeLa 細胞を使用した。AMPK による GlcCer 合成酵素活性への影響を調査するために、5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1- $\beta$ -D-ribofuranoside (AICAR)、A769662、Compound C (CC) などの薬剤を使用した。リン酸化タンパクは Pro-Q Diamond により検出した。

### (2) GlcCer 合成酵素細胞内アッセイ

GlcCer 合成酵素の制御機構を解明するにあたり、細胞内 GlcCer 合成酵素アッセイ系を構築した。蛍光標識されたセラミドを細胞内に取り込ませると、ゴルジ体へと輸送され蛍光標識 GlcCer、およびスフィンゴミエリンへと代謝される。1 時間ほど培養した後、細胞を回収し、有機溶媒により脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーによりセラミド、GlcCer、およびスフィンゴミエリンを分離し、それぞれの蛍光強度を定量することで細胞の GlcCer 代謝能を測定した。必要な蛍光標識セラミド量、アッセイ時間、細胞の密度などを検討し、最適なアッセイ条件を確立した。

### (3) GlcCer 定量方法

GlcCer、セラミド、その他スフィンゴ脂質の定量には LC-ESI-MS による MRM 解析を利用した。細胞回収時にインターナルスタンダードとして Avanti Polar Lipid より購入した Cer/Sph mixture II を利用した。有機溶媒により脂質を回収し、アルカリ分解によりグリセロ脂質を排除した。

(4) GlcCer 合成酵素リン酸化修飾の確認  
CHO 細胞に FLAG タグをつけた GlcCer 合成酵素遺伝子を過剰発現させ、AMPK を活性化する AICAR、阻害する CC を添加し、抗 FLAG 抗体によって免疫沈降を行い、SDS-PAGE にアプライし、リン酸化タンパク検出試薬によって GlcCer 合成酵素のリン酸化レベルを観察した。

### (5) UDP-グルコースの測定

脂質抽出時の 2 相分配の水層を濃縮乾固し、炭酸水素アンモニウム溶液に溶解させたサンプルをカーボンカートリッジにより濃縮・精製したサンプルを逆相イオンペアクロマトグラフィーにより分離、検出した。

## 4. 研究成果

(1) カベオリン - 1 が GlcCer 合成酵素活性

に及ぼす影響

細胞内アッセイ系を用いて野生型およびカベオリン-1 遺伝子欠損 MEF における GlcCer 合成活性を調べた結果、WT と遺伝子欠損体に有意な差は認められなかった (図 1)。細胞の培養時間が長くなるほど、GlcCer 合成酵素活性は下がるという傾向があり、これは使用する Dish が大きいほどこの差は顕著になった。予備実験において確認された差は、培養時間や Dish の大きさ、細胞密度が関係しており、カベオリン-1 非依存的な現象をみていたものと考えられた。培養時間が長くなると GlcCer 合成活性が低下するのは何故か。エネルギー代謝との相関があるのではないか。このアイデアが以下の発見につながった。

## (2) AMPK による GlcCer 合成酵素の制御

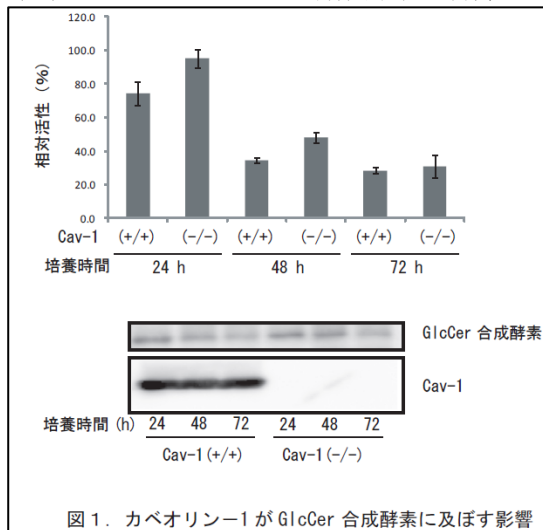


図 1. カベオリン-1 が GlcCer 合成酵素に及ぼす影響

AMP-activated protein kinase (AMPK) は細胞内の AMP/ADP/ATP 比に応じて活性が制御されるセリン/スレオニンキナーゼである。AMPK はエネルギー不足時、即ち AMP 比が高くなると活性化され、ATP の消費を伴う糖、脂質およびタンパク合成を抑制し、一方で解糖系や脂肪酸の  $\beta$  酸化を活性化し ATP 産生をうながす。エネルギー代謝制御の司令塔として注目を集めている分子である。糖や脂質の代謝を制御するならば、GlcCer をはじめとする「糖脂質代謝」にも、AMPK による何らかの制御があるのではないか。この仮説を検証するため、AMPK の活性化剤である AICAR を 3T3 細胞に添加し、LC-MS/MS によりセラミドおよび GlcCer 量を定量したところ、GlcCer 量の大幅な減少が確認された (図 2A)。細胞内アッセイ系により、AMPK が GlcCer 合成酵素活性に与える影響を調べた結果、AICAR 添加により活性が有意に減少し (図 2B)、この効果は AMPK の阻害剤である CC 添加により打ち消さ

れた (図 2C)。AICAR による AMPK の活性化には、上流のキナーゼである LKB1 や CaMKK II によるリン酸化が必要である。LKB1 を欠損している HeLa 細胞では、AICAR 添加による GlcCer 合成酵素活性の低下は観察されなかった (図 2D)。この結果から、AICAR による GlcCer 合成酵素活性低下は AMPK の活性化に依存する、と結論付けた。

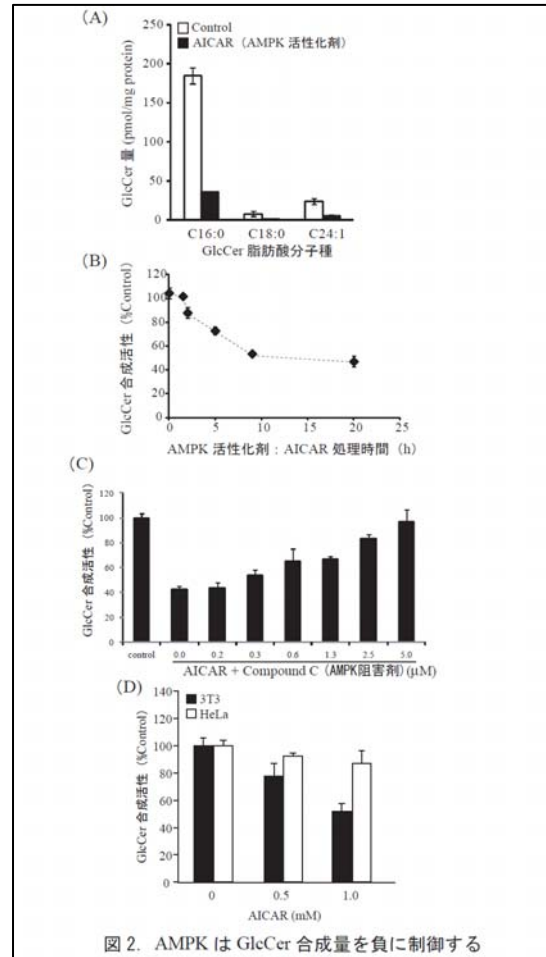


図 2. AMPK は GlcCer 合成量を負に制御する

## (3) AMPK による GlcCer 合成酵素リン酸化修飾の検証

AMPK がどのようにして GlcCer 合成酵素活性を制御するのかを解明するために、まずは AMPK によって GlcCer 合成酵素がリン酸化されるか検証した。しかしながら、GlcCer 合成酵素はセリン、スレオニンおよびチロシン残基におけるリン酸化修飾をうけていないという結果が得られた。AICAR によって AMPK を活性化した細胞のライセートを調製し、in vitro における GlcCer 合成活性を測定したが、細胞内アッセイで見られたような酵素活性の低下は観察されなかった。これらの結果より、AMPK は GlcCer 合成酵素をリン酸化し、酵素活性を制御しているのでは無いという

可能性が強く示唆された。

(5) AMPK による UDP-グルコースレベルへの影響

GlcCer はセラミドと UDP-グルコースを前駆体として合成される。細胞内アッセイでは外部より蛍光セラミドを添加しているため、AMPK 活性化時にみられる GlcCer 合成酵素活性の低下の原因としてセラミド量を考慮する必要はない。UDP-グルコースの量的変動が GlcCer 活性に影響をおよぼしている可能性が考えられた。これを検証するために、AMPK を活性化させた細胞よりヌクレオチドを抽出し、逆相イオンペアクロマトグラフィーにより各種ヌクレオチドを分離・定量した。AMPK を活性化させ、GlcCer 合成酵素活性の低下が認められた細胞では、UDP-グルコースの量が有意に低下していた。この結果より、AMPK による GlcCer 合成酵素活性の低下は、UDP-グルコースレベルの低下が大きな要因であると考えられた。

## 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 2 件)

①Yohei Ishibashi, Kazutaka Ikeda, Keishi Sakaguchi, Nozomu Okino, Ryo Taguchi, Makoto Ito, Quality Control of Fungus-specific Glucosylceramide in *Cryptococcus neoformans* by Endoglycoceramidase-related Protein 1 (EGCrP1), *J. Biol. Chem.*, **287** 368-381 (2012) 査読有

②Naoki Fujitani, Yasuhiro Takegawa, Yohei Ishibashi, Kayo Araki, Jun-ichi Furukawa, Susumu Mitsutake, Yasuyuki Igarashi, Makoto Ito, Yasuro Shinohara, Qualitative and quantitative cellular glycomics of glycosphingolipids based on rhodococcal endoglycosylceramidase-assisted glycan cleavage, glycoblotting-assisted sample preparation, and matrix-assisted laser desorption ionization tandem time-of-flight mass spectrometry analysis, *J. Biol. Chem.*, **286** 1669-1679 (2011) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

①石橋 洋平、真菌より見出されたユニークな糖脂質代謝機構、生命応答を制御する脂質マシナリー 若手ワークショップ、2012年2月1日・2日、東京大学 (東京都)

②石橋 洋平、細胞内エネルギー状態に応じたグルコシルセラミド量調節因子の解明、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13日~16日、パシフィコ横浜 (横浜市)

③石橋 洋平、細胞内エネルギーセンサーAMPKによるグルコシルセラミド合成制御機構の解明、第4回セラミド研究会学術集会、2011年10月27日・28日、北海道大学 (札幌市)

④石橋 洋平、AMP-activated protein kinase negatively regulates Glucosylceramide synthesis in Mouse fibroblast、第30回内藤コンファレンス、2011年6月28日~7月1日、シャトレーゼ ガトーキングダム サッポロ (札幌市)

[その他] (計 2 件)

実験プロトコル執筆 (日本糖鎖科学統合データベース)

①Yohei Ishibashi, Fluorescent labeling of 6-gala (neogala) series glycosphingolipids by EGALC, GlycoScience Protocol Online Database (GlycoPOD)

② Yohei Ishibashi, Degradation of Glycolipids by Endoglycoceramidase, GlycoScience Protocol Online Database (GlycoPOD)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 洋平 (ISHIBASHI YOHEI)

独立行政法人理化学研究所・神経膜機能研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：90572868