

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590340

研究課題名(和文)スフィンゴ脂質による酸化ストレス制御機構の解明

研究課題名(英文)Analysis in the regulation mechanism of oxidative stress by sphingolipid

研究代表者

矢野 正人 (Yano, Masato)

熊本保健科学大学・保健科学部・准教授

研究者番号：60315299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、様々な病態の発症にスフィンゴ脂質代謝異常が関与することが示唆されてきたが、そのメカニズムに関しては十分に明らかにされていなかった。本研究では、スフィンゴ脂質代謝酵素であるスフィンゴミエリン合成酵素1(SMS1)欠損マウスの解析を行い、酸化ストレスの亢進だけでなく、ミトコンドリア機能の低下、リポプロテインリパーゼの活性低下、脂肪酸取り込み能の低下なども、SMS1欠損マウスで観察される脂肪萎縮の原因である可能性を見出した。また、SMS1欠損マウスの脂肪組織ではミトコンドリアストレス応答経路が活性化されていることを見出し、これに関与すると予想された候補因子の機能解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Although it has been suggested that disorder of sphingolipid metabolism is involved in the pathogenesis of a variety of disease, the mechanism has not been fully elucidated. In this study, we analyzed sphingomyelin synthase 1 (SMS1, a sphingolipid metabolizing enzyme) deficient mice, and found that lipodystrophy observed in this mice was probably caused not only by increased oxidative stress, but also by reduction of mitochondrial function, reduced activity of lipoprotein lipase, and a decrease in fatty acid uptake. Moreover, we found that the mitochondrial stress response pathway was activated in the adipocytes of SMS1-deficient mice, and performed functional analysis of the candidate factors involved in this pathway.

研究分野：生化学

キーワード：スフィンゴミエリン合成酵素 ミトコンドリア 酸化ストレス ミトコンドリアストレス応答 ABCB10
TMEM65

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質の機能は、その代謝経路が非常に複雑であることや、代謝酵素遺伝子の同定が遅れていたため、長らく明らかにされていなかった。しかし、研究開始当初には、スフィンゴ脂質代謝酵素遺伝子の同定が進み、スフィンゴ脂質代謝の異常が様々な病態の原因になることが次第に明らかにされてきた。例えば、スフィンゴ脂質代謝産物は細胞増殖の制御に関与しており、その異常は細胞のガン化やアポトーシスを引き起こすことが報告された。また、スフィンゴ脂質代謝は炎症の制御にも関与することが報告された。さらに、糖尿病や、動脈硬化にも関与することが解明されつつあった。このように、当時、様々な病態の発症にスフィンゴ脂質代謝異常が関与することが示唆されてきたが、そのメカニズムに関しては十分に明らかにされていなかった。スフィンゴ脂質代謝異常による疾患発症メカニズムを明確にするためには、様々なスフィンゴ脂質代謝異常モデルマウスを作成し、表現型を明らかにするとともに、表現型発現に至るまでの分子作用機序を解析することが必要であった。

当時、研究代表者らは、スフィンゴ脂質代謝酵素であるスフィンゴミエリン合成酵素 1 (SMS1) ノックアウトマウス (SMS1-KO マウス) の表現型解析を行い、SMS1-KO マウスの表現型として、インスリン分泌不全、短寿命、脂肪萎縮などの表現型を見出していた。また、SMS1-KO マウスのインスリン分泌不全に関して解析を進めた結果、SMS1-KO マウスの膵島では、スフィンゴミエリン量が低下するとともにセラミド量が増加していること、SMS1-KO マウスの膵島では、活性酸素種 (ROS) の増加による酸化ストレスが亢進していること、SMS1-KO マウスの膵島では、ミトコンドリアの機能 (グルコース刺激時の ATP 産生能) が低下していること、SMS1-KO マウスの膵臓では、ミトコンドリアのスフィンゴ脂質成分が変化していること、SMS1-KO マウスに抗酸化剤を摂取させると、酸化ストレスが低下し、インスリン分泌が改善すること、などを明らかにしていた。これらのことから、『スフィンゴ脂質代謝異常によって起こるミトコンドリア機能不全に伴う酸化ストレスの亢進 (ROS の異常産生) が SMS1-KO マウスのインスリン分泌不全の原因の 1 つである』ことが示唆された (引用文献参照)。

2. 研究の目的

研究代表者らによる当時の解析結果から、先述の『スフィンゴ脂質代謝異常によって起こる酸化ストレスの亢進は、病態発症の原因の 1 つである』という概念は、インスリン分泌不全だけでなく、SMS1-KO マウスで観察される他の表現型 (短寿命や脂肪萎縮など) にも当てはまることが明らかになりつつあった。例えば、SMS1-KO マウスの尿中に酸化ス

トレスマーカーが多量に検出されることから、SMS1-KO マウスでは、全身で酸化ストレスが亢進している可能性が示された。また、SMS1-KO マウスに抗酸化剤を摂取させると寿命が延びたことから、『酸化ストレスの亢進が、SMS1-KO マウスが短寿命となる原因の 1 つである』ことが示唆された。さらに、SMS1-KO マウスの萎縮した脂肪組織では、極度の酸化ストレスが起きていることを示す preliminary な結果が得られていた。また、予め SMS1-KO マウスに抗酸化剤を摂取させることで、脂肪の萎縮を抑制できることもわかりつつあった。これらのことから、研究代表者らは、『酸化ストレスの亢進が、SMS1-KO マウスにおける脂肪萎縮の原因の 1 つである』可能性が高いと考えていた。このように、『スフィンゴ脂質代謝異常によって亢進する酸化ストレスが、SMS1-KO マウスの示す諸病態 (インスリン分泌不全、短寿命、脂肪萎縮) の原因である』ことが当時わかりつつあった。しかし、SMS1-KO マウスが示す酸化ストレスの亢進による短寿命や脂肪萎縮の原因に、ミトコンドリアの機能低下が含まれているか否かについては不明のままであった。

そこで、本研究においては、『スフィンゴ脂質が酸化ストレス状態を制御するメカニズムの解析』を目的とし、ミトコンドリアの脂質成分の異常により、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体が不安定化して ROS の産生増加や ATP 合成不全などの機能障害を起こしている可能性を検討した。また、SMS1-KO マウスの脂肪組織における酸化ストレス状態を更に詳しく解析し、酸化ストレスの亢進が脂肪細胞の機能 (脂肪の取り込みや脂質代謝など) を障害している可能性を検討した。さらに、ミトコンドリア機能の異常により脂肪細胞の ATP 産生に異常が生じている可能性も検討した。また、酸化ストレスの亢進に伴い発現量が増加していたミトコンドリアストレス応答経路の候補因子 ABCB10 や機能未知因子 TMEM65 についても解析を行い、これらの因子の機能と酸化ストレス亢進との関連性についても解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) SMS1-KOマウスの解析

リポプロテインリパーゼ (LPL) の活性測定は、Progen Biotechnik社の Total Lipase Test kit を用いて行った。なお、組織のホモゲナイズは Krebs-Ringer buffer 中で行い、ヘパリンを添加して LPL を遊離させた後、遠心分離して得られた上澄みを用いて解析を行った。

マウスの生体内における脂肪酸取り込み能の測定には、トリチウム (^3H) 標識されたパルミチン酸 (BSA に結合したものを) を用いた。具体的には、マウスを 4 時間絶食させた後、腹腔内に標識パルミチン酸を投与し、さらに一定時間経過後に臓器を回収して、その中に含まれる放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。

脂肪組織における各種遺伝子(酸化ストレス応答因子、ミトコンドリアストレス応答因子、ミトコンドリア生合成関連因子、ミトコンドリア呼吸鎖複合体構成因子)の mRNA 発現量は、リアルタイム PCR 法により解析した。

ミトコンドリアの電子伝達系複合体の分離には、Blue-native ゲル電気泳動法(膜タンパク質複合体の立体構造を壊さずに分離する方法)を用いた。必要に応じて、ゲルを各種複合体の基質の入った溶液中に浸すことで、複合体の活性測定を行った。また、ウエスタンブロット法でも各種複合体の同定を行った。

(2) ABCB10およびTMEM65の解析

ABCB10 および TMEM65 のノックダウンは、HeLa細胞中に siRNA を導入することで行った。ノックダウン効率の確認は、リアルタイム PCR 法およびウエスタンブロット法により行った。

ABCB10 や TMEM65 (あるいは、それらを FLAG-tag や蛍光タンパク質 GFP と融合したものなど)の過剰発現株は、これらのタンパク質を発現するプラスミド(G418 耐性遺伝子を持つもの)を HeLa 細胞に導入し、G418 存在下での培養および限界希釈を行うことで回収した。

4. 研究成果

(1) SMS1-KOマウスの解析

脂肪組織における各種 mRNA の発現量を測定することで、SMS1-KOマウスにおける酸化ストレスに対する生体応答を調べた。その結果、SMS1-KOマウスでは、酸化ストレス応答因子、ミトコンドリア機能促進因子、ミトコンドリアストレス応答因子などの発現量が上昇していた。また、既知の因子だけでなく、ミトコンドリアストレス応答経路に関わると予想される候補因子 ABCB10(ABC トランスポーターの一種)や、ミトコンドリア機能を促進すると予想される候補因子 TMEM65 などの発現量も増加していることがわかった。

また、脂肪酸の各組織への取り込みを *in vivo* で評価した。その結果、肝臓への取り込みに関しては野生型マウスと SMS1-KOマウスとの間で差はなかったが、脂肪組織への取り込みは SMS1-KOマウスで顕著に低下していた。また、肝臓および脂肪組織中のリポタンパク質リパーゼ(LPL)の活性を測定した結果、SMS1-KOマウスでは、両臓器において、活性が有意に低下していることがわかった。なお、LPL活性の低下は、肝臓よりも脂肪組織において、より顕著であった。さらに、SMS1-KOマウスでは、脂肪組織中の ATP 量が低下していた。

さらに、ブルーネイティブゲル電気泳動法を用いた解析から、SMS1-KOマウスの脂肪組織のミトコンドリアでは、呼吸鎖複合体 I と V の量が減少していることがわかった。特に、複合体 V に関しては、酵素活性も低下していることがわかった。

以上の結果から、SMS1-KOマウスの脂肪組織では、酸化ストレスが亢進するだけでなく、ミトコンドリアの機能も低下していることが示された。恐らく、SMS1の欠損により、ゴルジ体膜や小胞体膜だけでなく、ミトコンドリア内膜でも脂質のバランスが崩れ、その影響でミトコンドリア内膜タンパク質である呼吸鎖複合体(電子伝達系および ATP 合成酵素)の安定性や機能が低下するのであろうと推察された。また、SMS1-KOマウスの脂肪組織では、LPLの活性や脂肪酸の取り込み能も低下していることが示された(ただし、酸化ストレスの亢進やミトコンドリア機能の低下との関連性は不明のままである)。恐らく、これらの要因が複雑に絡みあった結果、脂肪細胞が萎縮するのであろうと推察された。

(2) ABCB10 および TMEM65 の解析

SMS1-KO マウスでは、哺乳類のミトコンドリアストレス応答経路の候補因子 ABCB10 や機能未知因子 TMEM65 の発現量も増加していることがわかった。この結果を受け、ABCB10 や TMEM65 の過剰発現系およびノックダウン系を用いて、それらのタンパク質の細胞レベルでの機能解析を行った。その結果、ABCB10 の発現量を低下させると、細胞の増殖能が顕著に低下することがわかった。また、TMEM65 がミトコンドリア内膜の膜タンパク質であることや、TMEM65 のアミノ酸配列中のアミノ末端側にミトコンドリア移行シグナル配列が含まれており、TMEM65 がミトコンドリア内膜に輸送されると、そのシグナル配列が切除されることなどがわかった。さらに、TMEM65 は、ミトコンドリア内膜において、多量体もしくは他のタンパク質と複合体を形成している可能性が示された。

<引用文献>

M. Yano *et al.*, Mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species impair insulin secretion in sphingomyelin synthase 1-null mice. *The Journal of Biological Chemistry* (2011) 286, 3992-4002. DOI:10.1074/jbc.M110.179176.

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4件)

Naotaka Nishimura, Tomomi Gotoh, Yuichi Oike, Masato Yano^{*}. (*corresponding author) TMEM65 is a mitochondrial inner-membrane protein. (2014) 2, e349. DOI:10.7717/peerj.349. (査読あり)

Masato Yano^{*,#}, Tadashi Yamamoto[#], Naotaka Nishimura, Tomomi Gotoh, Ken Watanabe, Kazutaka Ikeda, Yohei Garan,

Ryo Taguchi, Koichi Node, Toshiro Okazaki, Yuichi Oike*. (*corresponding author, #equally contribution)
Increased oxidative stress impairs adipose tissue function in sphingomyelin synthase 1 null mice. PLOS ONE (2013) 8, e61380.
DOI:10.1371/journal.pone.0061380. (査読あり)

Mei-Hong Lu, Makoto Takemoto, Ken Watanabe, Huan Luo, Masataka Nishimura, Masato Yano, Hidekazu Tomimoto, Toshiro Okazaki, Yuichi Oike, Wen-Jie Song.
Deficiency of sphingomyelin synthase-1 but not sphingomyelin synthase-2 causes hearing impairments in mice. The Journal of Physiology (2012) 590, 4029-4044.
DOI:10.1113/jphysiol.2012.235846. (査読あり)

Lingli Dong, Ken Watanabe, Mari Itoh, Cheng-Ri Huan, Xiao-Peng Tong, Takuji Nakamura, Miyuki Miki, Haruka Iwao, Akio Nakajima, Tomoyuki Sakai, Takafumi Kawanami, Toshioki Sawaki, Yasufumi Masaki, Toshihiro Fukushima, Yoshimasa Fujita, Masao Tanaka, Masato Yano, Toshiro Okazaki, Hisanori Umehara. CD4+ T-cell dysfunctions through the impaired lipid rafts ameliorate concanavalin A-induced hepatitis in sphingomyelin synthase 1-knockout mice. International Immunology (2012) 24, 327-337. DOI:10.1093/intimm/dxs008. (査読あり)

[学会発表](計4件)

矢野 正人、西村 尚剛、後藤 知己、尾池 雄一. TMEM65 はプレ配列型のミトコンドリア内膜タンパク質である. 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 17 日, 京都(国立京都国際会館)

矢野 正人、山本 格士、西村 尚剛、加覧 洋平、渡辺 研、後藤 知己、野出 孝一、岡崎 俊朗、尾池 雄一. スフィンゴミエリン合成酵素 1 欠損マウスにおける脂肪萎縮と酸化ストレスの解析. 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 16 日, 博多(福岡国際会議場)

山本 格士、矢野 正人、西村 尚剛、渡辺 研、後藤 知己、野出 孝一、岡崎 俊朗、尾池 雄一. スフィンゴミエリン合成酵素 1 欠損マウスにおける脂肪肝の抑制. 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 16 日, 博多(福岡国際会議場)

矢野 正人、山本 格士、渡辺 研、岡崎 俊朗、尾池 雄一. スフィンゴ脂質代謝異常による病態発症機序の解析. 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 23 日, 京都(国立京都国際会館)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 正人 (YANO MASATO)
熊本保健科学大学・保健科学部・准教授
研究者番号: 60315299

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

尾池 雄一 (OIKE YUICHI)
熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号: 90312321