

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460093

研究課題名(和文) ガラクト脂質, スフィンゴミエリンによる炎症とミトコンドリア機能の制御

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of inflammation and mitochondrial function by galactolipids and SM

研究代表者

村山 俊彦 (Murayama, Toshihiko)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：90174317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴ脂質は生体膜構成脂質であるが細胞内・細胞間のシグナル分子としても働く。本研究では、炎症に重要な細胞質型alphaホスホリパーゼA2活性に対するスフィンゴ脂質の役割、セラミドキナーゼなどの制御機構、これら酵素に対するガラクトース結合型スフィンゴ脂質などの作用を解析した。1)ミトコンドリア局在を示す脂質カルジオリピンがセラミドキナーゼと直接結合し活性を調節している、2)ガラクトース結合型脂質ラクトシルセラミドが細胞膜NADPHオキシダーゼを介してホスホリパーゼA2を活性化している、3)セラミドキナーゼノックアウトマウスでは薬剤誘導性大腸炎の悪化を亢進させるなどを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Sphingolipids are components of cellular membranes and also act as extra- and intra-cellular signals. In the present study, I examined following problems such as roles of sphingolipids on alpha-cytosolic phospholipase A2 (cPLA2alpha) that regulates inflammatory responses, regulatory mechanisms of ceramide kinase (CerK), and roles of galactose-containing sphingolipids on these enzymes. I showed that 1) caldiolipin that mainly localizes in the mitochondria bind with and activates ceramide kinase directly, 2) a galactose-containing lipid, lactosylceramide, activated cPLA2alpha via NADPH oxidase-mediated formation of reactive oxygen species, 3) progression of experimental colitis was enhanced in CerK-knockout mice.

研究分野：生化学的薬理学

キーワード：スフィンゴ脂質 セラミド 大腸炎モデルマウス カルジオリピン ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質は生体膜構成成分であると共に、細胞内・細胞間のシグナル分子として機能している。スフィンゴ脂質代謝はセラミドを中心として、スフィンゴミエリン、セラミド-1-リン酸、スフィンゴシン(とその代謝物スフィンゴシン-1-リン酸)、グルコシルセラミド(さらにガラクトースが付加したラクトシルセラミドやガングリオシド)が生成される。スフィンゴ脂質代謝異常は、遺伝性のリソゾーム病が挙げられ、スフィンゴミエリン分解酵素が欠損したニーマンピック病 A/B 型やスルファチド(HSO3-GalCer)の蓄積による神経髄鞘不全を伴う異染性白質変性症などがある。最近の研究では、アルツハイマー型認知症、生活習慣病としての糖尿病や動脈硬化症などにもスフィンゴ脂質代謝の異常が観察されている。これらのことから、スフィンゴ脂質代謝の制御機構の解明、病態時の変動の解析、代謝酵素を修飾できる化合物などの開発は疾患治療などに関しても大きな手掛かりを与える。

本研究では、スフィンゴ脂質、特に標的分子などが未解明なガラクトース結合型スフィンゴ脂質とスフィンゴミエリン(SM)に焦点をあてて研究する。またこれら脂質の標的酵素としてセラミドキナーゼ、SM合成酵素の二つのセラミド代謝酵素と、炎症反応に重要なアラキドン酸生成やプロスタノイド生成の律速酵素の一つである α -type細胞質型ホスホリパーゼA2(cPLA2 α)の三酵素に対する各種スフィンゴ脂質の作用、細胞応答などを研究する。スフィンゴ脂質やアラキドン酸代謝は、サイトカインなどによる炎症反応による細胞死・細胞障害に関与することが示唆されており、最近の研究では炎症や細胞死などに細胞内オルガネラの一つであるミトコンドリアの機能不全が関与していることが明らかにされつつある。しかしながらミトコンドリア機能におけるスフィンゴ脂質の役割はスフィンゴ脂質代謝酵素の存在や機能も含めて明らかにされていない。また炎症性疾患である潰瘍性大腸炎の発症や増悪過程の調節にもスフィンゴ脂質や同脂質代謝に関連した酵素が関与していることから、個体レベルでの検討も行うことも重要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、 α -type細胞質型ホスホリパーゼA2(cPLA2 α)、セラミドキナーゼ、SM合成酵素に焦点をあて、SM、ガラクトース結合型スフィンゴ脂質や合成スフィンゴ脂質誘導体などの細胞応答や薬理作用を検討する。さらにスフィンゴ脂質やアラキドン酸代謝との関連が示唆されている潰瘍性大腸炎に対するスフィンゴ脂質の役割を解明することを目的としている。また、ミトコンドリア機能に対するスフィンゴ脂質などの役割を

解明することを目的としている。

3. 研究の方法

以下の五つの研究計画を設定し記載した方法で研究を行うこととした。

3-1. セラミドキナーゼやcPLA2 α に対する各種のスフィンゴ脂質、特にガラクトース結合型のガラクト脂質の作用を生化学的、細胞薬理的に検討する。

3-2. SM合成酵素の発現、活性制御機構を解明し、同酵素活性を制御できる分子や分子機構を明らかにする。

3-3. スフィンゴ脂質代謝変動と潰瘍性大腸炎の発症・増悪などに関する知見を得る。

3-4. ミトコンドリア機能やミトコンドリア依存性細胞障害に対するスフィンゴ脂質、特にガラクトース結合脂質やSMの役割を解明する。

3-5. 有機合成化学者と連携し、セラミドキナーゼ、SM合成酵素などのスフィンゴ脂質代謝酵素活性を制御できる低分子化合物の合成・探索を行う。あわせて α -type細胞質型ホスホリパーゼA2(cPLA2 α)活性を調節できる分子・化合物の探索を進める。

4. 研究成果

上記の5つの研究計画ごとに得られた成果を示す。

4-1. cPLA2 α の活性に対して、ラクトシルセラミドは無効であったが、ガラクトースを含むラクトースが結合したラクトシルセラミドは酵素活性を上昇させることを以前に私たちは報告している(Nakamura et al., J. Biol. Chem. 2013, 288, 23264-23272: Lactosylceramide interacts with and activates cytosolic phospholipase A2 α)。今回の研究の中で、ラクトシルセラミドが細胞膜で活性酸素を産生し、PKC/ERK経路によるリン酸化シグナルを介して、同酵素を活性化することを見出して国際誌に公表できた(Nakamura et al., 2017, J Cell. Biochem. In press)。また、サイトカインであるTNF α (腫瘍細胞壊死因子, tumor necrosis factor- α)がラクトシルセラミド合成を促進し、生成されたこのガラクトース含有セラミドがcPLA2 α のゴルジ体へのアンカリングとリン酸化シグナル生成という2つの作用を協調的に行うことを示した。セラミドキナーゼに関しては、スルファチド(HSO3-GalCer)が結合することを確認したが、酵素活性には影響しなかった。ミトコンドリアに多く存在するグリセロ脂質であるカルジオリピンがセラミドキナーゼに直接結合し活性化することを見出した。ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルコリン等の一般的なグリセロリン脂質は無効であった。

4-2. 各種の細胞を各種サイトカインや

成長因子などで刺激、長時間の培養処置を行ったが、SM 合成に大きな変動は観察されなかった。また、SM 合成酵素と共役する分子の同定を免疫沈降法で試みたが、まだ未同定である。SM 合成を変動させた細胞では、SM 合成酵素阻害薬処置により枯渇レベルまで SM を減少させた細胞では細胞障害性が高いこと、SM を外から供給した細胞では細胞形態その他に大きな差異は観察されないこと、などを見出した。これらの研究の中で、細胞をバナジン酸で処置した場合に顕著に SM 合成が減少した。現在そのメカニズムを解析中である。

4 - 3 . スフィンゴ脂質変動が潰瘍性大腸炎の発症、進行にどのような影響を与えるかをデキストラン硫酸誘導性の大腸炎モデルマウスで検討した。スフィンゴ脂質変動としてセラミドキナーゼノックアウトマウスを使用した。正常マウスと比較して、セラミドキナーゼノックアウトマウスでは大腸炎の進行速度が速く死亡率も上昇している傾向が観察された。ただしこのモデルでは個体差が大きく、また雌雄で発症の進行度に差があり、さらなる今後の検討が必要である。現在、大腸炎誘導後の経過日数に応じた血中サイトカインの量を測定している。大腸炎モデルマウスから上行結腸、下降結腸、直腸などの組織を単離し運動性を測定したところ、モデルマウスでは顕著な運動性の低下が見られた。この低下は正常群、セラミドキナーゼノックアウト群で有意な差は観察されなかった。また正常マウスにグルコシルセラミド合成酵素の阻害薬ミグスタットを投与して摂食量、飲水量、消化管形態、運動性などを観察したが大きな変化は見られなかった。

4 - 4 . ミトコンドリアに局在する特徴的なグレセロリン脂質であるカルジオリピンがセラミドキナーゼと直接的に結合し、濃度に応じて活性化、抑制化の二つの作用を示すことを明らかにできた (Matsuzaki et al., 2016. Biol. Pharm. Bull) 。大腸菌を用いてリコンビナントのセラミドキナーゼを作製する方法で、変異体セラミドキナーゼを作製した。カルジオリピンの結合部位を検討したところ、PH (pleckstrin homology) ドメインではなく、非 PH ドメインに結合することを明らかにした。ミトコンドリアのカルジオリピン含有量を減らす目的で細胞にミトコンドリア型ホスホリパーゼ D6 を過剰発現させたところ、セラミド - 1 - リン酸と SM の生成が減少することを見出した。この結果は、細胞膜やエンドソームなどの細胞内オルガネラ以外にも、ミトコンドリアにおいてもスフィンゴ脂質代謝が変化することを示している。細胞外からカルジオリピンを添加したところセラミド - 1 - リン酸の産生が減少し、条件によっては細胞死が観察された。

4 - 5 . 連携の有機合成研究者 (西田教授) は、緑色、赤色の蛍光基をもつセラミド誘導体を作製した。本化合物を細胞に取り込ませ、細胞内代謝を測定したところ、グルコシルセラミドに代謝されることが見出された。しかし蛍光団同士の相互作用があり、赤色発光が妨害されていることも判明した。現在、発色団の存在する部位間の距離の最適化を図っている。新規合成されたスフィンゴ脂質誘導体のセラミドキナーゼ活性に対する作用を検討したが、顕著な阻害・活性化作用を示す化合物は得られなかった。また、cPLA2 α 活性に対しても検討したが、従来得られている化合物以上に活性が強いものは見出されなかった。西田教授との共同研究で代謝抵抗性でかつ細胞障害性の少ない蛍光セラミド誘導体が特異的なゴルジ体マーカーとして機能することを見出し (Makiyama et al., 2015, Traffic 16, 476-492) 、国内と米国で特許申請を行っていた。昨年度の米国特許取得に続き国内でも特許が認められた。細胞治療などで用いるために作製された細胞の機能評価に有効であると考えている。

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 11 件)

代表的な論文を 5 篇示した。以下の 5 篇を含む 11 篇の雑誌論文はすべて査読有りの雑誌論文である。

¹ Nakamura H, Moriyama Y, Watanabe K, Tomizawa S, Yamazaki R, Takahashi H, Murayama T: Lactosylceramide-induced phosphorylation signaling to group IVA phospholipase A2 via reactive oxygen species in tumor necrosis factor- α -treated cell. (2017) J. Cell. Biochem. Doi: 10.1002/jcb.26091. In press.

² Hashimoto N, Matsumoto I, Takahashi H, Nakamura H, Murayama T: Cholesterol-dependent increases in glucosylceramide synthase activity in Niemann-Pick disease type C model cells: abnormal trafficking of endogenously formed ceramide metabolites by inhibition of the enzyme. (2016) Neuropharmacology 110, 458-469. Doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.011

³ Matsuzaki W, Takahashi H, Nakamura H, Murayama T: Effects of glycerophospholipids on ceramide kinase activity: cardiolipin-affected cellular formation of ceramide-1-phosphate. (2016) Biol. Pharm. Bull. 39, 1708-1717. DOI 10.1248/bpb.b16-00535

⁴ Nakamura H, Wakita S, Yasufuku K, Makiyama T, Waraya M, Hashimoto N,

Murayama T.: Sphingomyelin regulates the activity of secretory phospholipase A2 in the plasma membrane. (2015) J. Cell. Biochem. 116, 1898-1907. doi:10.1002/jcb.25145.

5 Makiyama T, Nakamura H, Nagasaka N, Yamashita H, Honda T, Yamaguchi N, Nishida A, Murayama T.: Trafficking of acetyl-C16-ceramide-NBD with long-term stability and no cytotoxicity into the Golgi. (2015) Traffic 16, 476-492. .doi: 10.1111/tra.12265.

〔学会発表〕(計 24 件)

代表的な学会発表 14 件を記載した。

1 高橋宏昌, 中村浩之, 村山俊彦. リン酸化シグナルによるセラミドキナーゼ活性制御機構の解析. 日本薬学会第 137 年会 (仙台, 2017:平成 29 年 3 月 24 日~ 27 日)

2 富澤智史, 中村浩之, 村山俊彦. セラミドキナーゼによる細胞骨格制御機構の解明. 日本薬学会第 137 年会 (仙台, 2017:平成 29 年 3 月 24 日~ 27 日)

3 橋本直宏, 松本生, 高橋宏昌, 芦川仁美, 中村浩之, 村山俊彦. ニーマンピック病 C 型のコレステロール蓄積とスフィンゴ糖脂質との関連性の証明. 第 90 回日本薬理学会年会 (長崎, 2017:平成 29 年 3 月 15 - 17 日)

4 西野将平, 山下尚大, 中村浩之, 村山俊彦. セラミド-1-リン酸はスフィンゴシンキナーゼ 1 の活性を直接的に制御する. 第 90 回日本薬理学会年会 (長崎, 2017:平成 29 年 3 月 15 - 17 日)

5 Yamazaki R, Nakamura H, Moriyama Y, Watanabe K, Tomizawa S, Murayama T.: Role of phosphorylation signaling on activation of group IVA phospholipase A2 by lactosylceramide. 57th International Conference on the Bioscience of Lipids (Chamonix-Mont Blanc, France, 2016, 09, 08)

6 Nakamura H, Makiyama T, Nagasaka N, Yamashita H, Honda T, Yamaguchi N, Nishida A, Murayama T.: Trafficking of acetyl-C16-ceramide-NBD with long-term stability and no cytotoxicity into the Golgi complex. Annual Meeting of American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB)-2016 (San Diego, USA, 2016, 04, 02-06)

7 中村浩之, 牧山智彦, 長坂伸夫, 山下尚大, 本田拓也, 山口直人, 西田篤司, 村山俊彦.

彦. 長時間安定的にゴルジ体を標識する新規蛍光標識セラミド誘導体. 日本薬学会第 136 年会 (横浜, 2016:平成 28 年 3 月 26 - 29 日)

8 渡部央, 王亜賓, 長坂伸夫, 橋本直宏, 中村浩之, 村山俊彦, 西田篤司. O-アシル蛍光性セラミド誘導体の合成と細胞膜透過性. 日本薬学会第 136 年会 (横浜, 2016:平成 28 年 3 月 26 - 29 日)

9 中村浩之, 脇田樹男, 安福加菜, 牧山智彦, 藁谷未沙, 橋本直宏, 村山俊彦. スフィンゴミエリンはプラズマメンブレンにおいてホスホリパーゼ A2 α の活性化を調節する. 第 89 回日本薬理学会年会 (横浜, 2016:平成 28 年 3 月 9 - 11 日)

10 山崎璃沙, 中村浩之, 森山友太, 渡邊一祥, 富澤智文, 村山俊彦. ラクトシルセラミドによるリン酸化シグナルを介した細胞質型ホスホリパーゼ A2 α 制御機構の解明. 第 89 回日本薬理学会年会 (横浜, 2016:平成 28 年 3 月 9 - 11 日)

11 成岡詩織, 中村浩之, 西野将平, 山下尚大, 村山俊彦. セラミド-1-リン酸による EphA2 の動態制御機構の解明. 第 89 回日本薬理学会年会 (横浜, 2016:平成 28 年 3 月 9 - 11 日)

12 橋本直宏, 中村浩之, 脇田樹男, 安福加菜, 牧山智彦, 藁谷未沙, 村山俊彦. スフィンゴミエリンによる分泌型ホスホリパーゼ A2 活性制御機構の解明. 第 132 回日本薬理学会関東部会 (浦安市, 2015:平成 27 年 7 月 4 日)

13 中村浩之, 森山友太, 牧山智彦, 山下尚大, 山崎璃沙, 渡邊一祥, 村山俊彦. ラクトシルセラミドによる細胞質型ホスホリパーゼ A2 α 活性化機構の解明. 日本薬学会第 135 年会 (神戸, 2015:平成 27 年 3 月 25 ~ 28 日)

14 松寄渉, 中村浩之, 村山俊彦. カルジオリピンはセラミドキナーゼと結合し, 活性化させる. 第 83 回日本薬理学会年会 (名古屋, 2015:平成 27 年 3 月 18 ~ 20 日)

〔産業財産権〕

取得状況 (計 2 件)

名称: Ceramide derivative and Golgi apparatus-labeling fluorescent probe using same.
発明者: Nishida A, Nakamura H, Makiyama T, Murayama T.

権利者: Chiba University

種類: 特許権

PCT/JP2012/070631: WO2013/024843

番号： US 9,207,232 B2

出願年月日： Nov. 06, 2014

取得年月日： Dec. 08, 2015

国内外の別： United States Patent

名称： セラミド誘導体およびこれを用いた
ゴルジ体標識化蛍光プローブ

発明者： 西田篤司、中村浩之、牧山智彦、
村山俊彦

権利者： 千葉大学

種類： 特許権

番号： 6120222

出願年月日： 20120813

取得年月日： 20170407

国内外の別： 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村山 俊彦 (MURAYAMA Toshihiko)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号： 90174317

(2) 連携研究者

西田 篤司 (NISHIDA Atsushi)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号： 80130029