



スフィンゴシン 1-リン酸の代謝経路の全容と中間代謝体としての重要性

1. はじめに

スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) はリゾホスファチジン酸 (LPA) と並ぶ代表的なリゾリン脂質メディエーターであり、細胞表面に存在する受容体 (S1P₁-S1P₅) を介して、細胞運動、細胞増殖、接着結合、アクチン骨格再編成などを引き起こす。この作用は特に免疫系、血管系で重要である。免疫系では T 細胞の胸腺及び二次リンパ組織からの移出において中心的な役割を果たし、血管形成では胎生時

の血管安定化に必須である。免疫系での作用は既に臨床応用されており、S1P 前駆体スフィンゴシン (SPH) のアナログであるフィンゴリモド (FTY720) が多発性硬化症の治療薬として用いられている。フィンゴリモドは生体内でリン酸化されて、フィンゴリモドリン酸となり、S1P 受容体に結合する。脂質メディエーターとしての S1P の役割及びフィンゴリモドの作用機序の詳細に関しては筆者が以前に本誌で紹介した総説に記載してあるので、ご参照願いたい¹⁾。

2. 中間代謝体としての S1P

S1P はスフィンゴ脂質の代謝産物である。スフィンゴ脂質とは、真核生物の生体膜を構成する脂質分子の一種であり、特に細胞膜に多く存在する。スフィンゴ脂質の疎水性部分はセラミドと呼ばれ、長鎖塩基と脂肪酸がアミド結合した構造を持つ²⁾。長鎖塩基はセリンとアシル CoA を材料として合成され、1 位と 3 位に水酸基、2 位にセリン由来のアミノ基を持つ。SPH は哺乳類では最も多い長鎖塩基であり、1 位がスフィンゴシンキナーゼによってリン酸化されたものが S1P である (図 1)。SPH は 4 位と 5 位の間にトランス二重結合を持つが、この二重結合を持たない長鎖塩基をジヒドロスフィンゴシン (DHS; スフィンガニン)

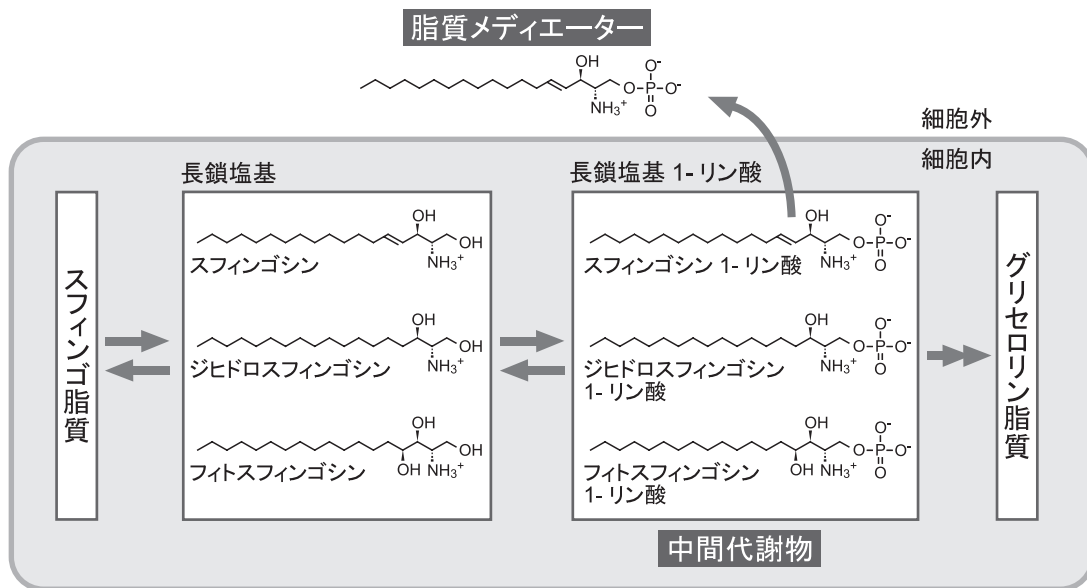


図 1 細胞内外での S1P/長鎖塩基 1-リン酸の役割

スフィンゴ脂質は長鎖塩基、長鎖塩基 1-リン酸を介してグリセロリン脂質まで代謝される。このため、長鎖塩基 1-リン酸/S1P は細胞内ではスフィンゴ脂質代謝の中間代謝体として機能する。血液細胞、内皮細胞など一部の細胞は細胞内で産生した S1P を細胞外へと放出する。放出された S1P は脂質メディエーターとして働き、細胞膜表面に存在する S1P 受容体に結合して様々な細胞応答を引き起こす。

と呼び、*de novo* スフィンゴ脂質合成において産生されるので、量は多くないもののすべての組織に必ず存在する。DHSの4位に水酸基を持つフィトスフィンゴシン (PHS) は、皮膚、小腸、腎臓などの限られた組織にのみ存在する。

細胞のスフィンゴ脂質量は合成と分解のバランスによって規定されており、合成はセラミドまでが小胞体、それ以降がゴルジ体で行われる。一方、分解の殆どはリソソームで行われる。リソソームには、スフィンゴ脂質の極性基部分を分解する各種酵素やセラミドを分解するセラミダーゼが存在し、スフィンゴ脂質を最終的に脂肪酸と SPH (長鎖塩基) にまで分解する。スフィンゴ脂質の分解の各段階を触媒する酵素の遺伝子に変異が入るとスフィンゴ脂質代謝異常症、いわゆるスフィンゴリポドーシスを引き起こす。これまでに30以上のスフィンゴリポドーシスが知られている³⁾。

スフィンゴ脂質の分解で生じた脂肪酸はアシル CoA へと変換後、グリセロリン脂質あるいは他の脂質 (トリグリセリド、スフィンゴ脂質、コレステロールエステルなど) へ代謝されたり、 β 酸化によって分解されたりするなど、多彩な代謝を受けることができる⁴⁾。一方で、スフィンゴ脂質の分解で生じた SPH はそのままと再度スフィンゴ脂質にリサイクルされるしかない。しかし、SPH が S1P になることで、後述する経路によってパルミトイル CoA へと変換可能となる。生じたパルミトイル CoA は主にグリセロリン脂質へと代謝されるが、他の脂質への代謝や β 酸化を受ける場合もある。この S1P を介した代謝経路はスフィンゴ脂質をグリセロリン脂質へ代謝させる唯一の経路である (図1)。したがってこの経路が遮断されると分解によって生じた SPH は常にスフィンゴ脂質にリサイクルされることになり、スフィンゴ脂質量を減少させることができなくなる。このため、スフィンゴ脂質のホメオスタシスは破綻し、様々な細胞機能に障害が生じることが予測される。事実、この S1P 代謝経路の最初の反応を触媒する S1P リアーゼの遺伝子 (*SPL*) がノックアウトされたマウスでは、肺、心臓、尿管、骨の形態異常、肝臓での代謝異常、骨髄細胞の過形成などが生じ、生後1ヶ月程度で死亡する^{5,6)}。

S1P/長鎖塩基1-リン酸が脂質メディエーターとして機能し始めるのは進化の過程では原索動物からであり、比較的最近である⁷⁾。一方、スフィンゴ脂質からグリセロリン脂質への代謝経路の中間代謝物としての役割は酵母から哺乳類に至るまで普遍的であり、進化上非常に古くから存在することが分かる。酵母の長鎖塩基は DHS と PHS である

が、SPH と同様の経路によってグリセロリン脂質に代謝される⁸⁾。

脂質メディエーターとしての S1P は細胞外液 (血漿、リンパ液、脳脊髄液など) に存在しているが、S1P の産生場所は細胞内である。このため、脂質メディエーターとして働くためには、細胞の中で産生された S1P は特異的なトランスポーターを介して細胞外へと排出されなくてはならない (図1)。しかし、殆どの細胞の S1P 放出活性は弱く、血漿 S1P の供給源となる血液細胞 (赤血球、血小板) と内皮細胞 (血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞など) のみが S1P トランスポーターを高発現している⁹⁾。近年、内皮細胞に発現する S1P 特異的なトランスポーターとして SPNS2 が同定されている¹⁰⁾。S1P を産生するスフィンゴシンキナーゼ及び分解酵素である S1P リアーゼはほぼ全ての細胞において発現しており、S1P の産生と分解は常時活発に起こっている^{1,2)}。細胞内の S1P 濃度は血漿に比べると圧倒的に低いが、これは合成活性よりも分解活性が高いことに起因する。このように血液細胞や内皮細胞以外の殆どの細胞では産生された S1P は放出されることなく、つまり脂質メディエーターとして機能することなく、速やかに分解される。このことから、S1P が広範な細胞で産生される生理的意義は、脂質メディエーターを生じることでなく、中間代謝物としてスフィンゴ脂質からグリセロリン脂質へ代謝を促すためであることが分かる。

3. S1P の代謝に関わる ALDH3A2 と シェーグレン・ラルソン症候群

スフィンゴ脂質が S1P を介してグリセロリン脂質に代謝されることは1960年代の終わりには既に報告されていた¹¹⁾。しかし、どのように S1P がグリセロリン脂質まで代謝されるのか、その詳細な経路とその経路に関わる酵素の遺伝子は不明なまま残されていた。一方、SPH に比べて二重結合を持たない長鎖塩基である DHS の代謝経路は容易に推測できた。DHS はスフィンゴシンキナーゼによって DHS1P となった後にまず、S1P リアーゼによってヘキサデカナール (パルミトアルデヒド) とホスホエタノールアミンとなる。ヘキサデカナールは引き続いて脂肪族アルデヒドデヒドロゲナーゼ (FALDH) によって酸化されてパルミチン酸となり、パルミトイル CoA を介してグリセロリン脂質に代謝されるというものである。S1P がまず S1P リアーゼによってヘキサデセナールとホスホエタノールアミンに分解されることまでは既に知られていた。しかし、ヘキサデセナールには S1P 由来の二重結合が存在す

るので、最終的にパルミトイル CoA になるまでには、DHS1P の代謝過程での反応に加えてもう一段階、二重結合を飽和するステップが必要となる。このステップが DHS1P の代謝における FALDH による酸化、アシル CoA 合成酵素による脂肪酸の活性化の前後あるいはそれらの間に存在する可能性があり、少なくとも S1P の代謝経路には 3 通りが考えられた。これまで私自身の総説を含めて、S1P 代謝に関する総説ではヘキサデセナールはまず飽和されてヘキサデカノールに変換後、パルミチン酸、パルミトイル CoA へと代謝されていくと記述されているものが多いが、実験的な根拠はなかった。

S1P の代謝経路が不明なだけでなく、DHS1P や S1P が S1P リアーゼ (酵母では *DPL1* 遺伝子、哺乳類では *SPL* 遺伝子産物) によって分解され生じた脂肪酸アルデヒドを脂肪酸に変換する FALDH の遺伝子も未同定であった。そのため、まず筆者らはこの遺伝子の同定を試みた。酵母欠

損株を用いた解析を足がかりに、筆者らは酵母 *HFD1* 遺伝子、哺乳類 *ALDH3A2* 遺伝子を同定することに成功した⁸⁾ (図 2)。酵母 *HFD1* 遺伝子の欠損株 ($\Delta hfd1$) では長鎖塩基 1-リン酸のグリセロリン脂質への代謝は完全に停止した。一方、哺乳類 CHO-K1 細胞由来の *ALDH3A2* 欠損細胞 (FAA-K1A) 中では、長鎖塩基 1-リン酸のグリセロリン脂質への代謝は大きく減少したものの完全には停止せず、一部はエーテルリン脂質へ異常代謝されていた⁹⁾。FAA-K1A 中では代謝されずに蓄積した脂肪酸アルデヒドが還元されて長鎖アルコールとなり、エーテルリン脂質の原料に使用されたと思われる (図 2)。これらの結果から、哺乳類では *ALDH3A2* が主要な FALDH であることが明らかとなったが、*ALDH3A2* 以外の FALDH が存在することも示唆された。

ALDH3A2 はもともとシェーグレン・ラルソン症候群 (SLS) の原因遺伝子として報告されていた¹²⁾。SLS は皮膚

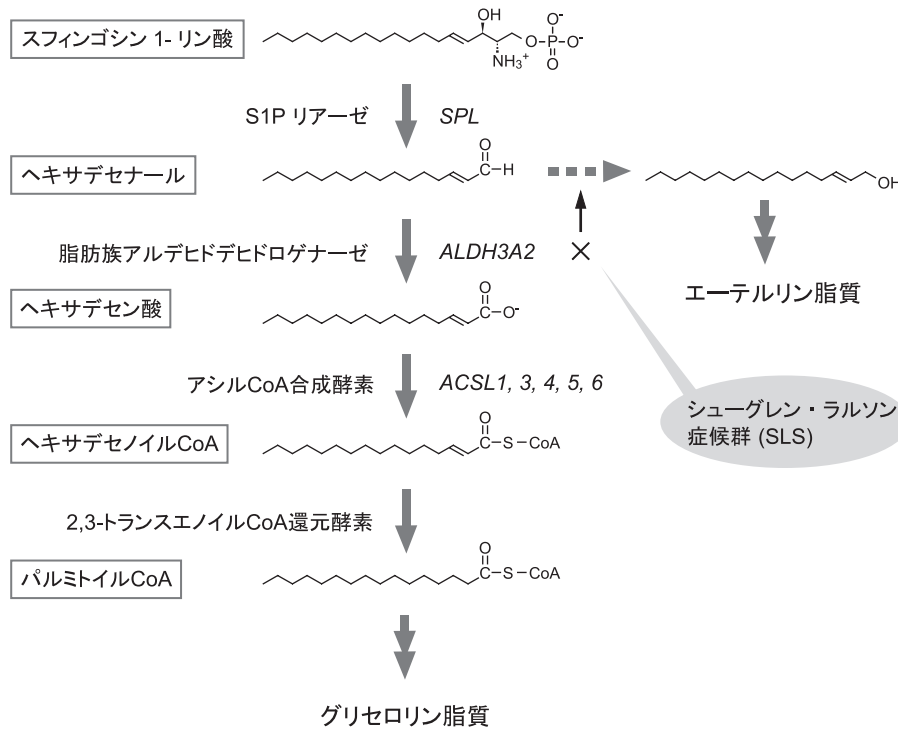


図 2 S1P の代謝経路

S1P はヘキサデセナール、ヘキサデセン酸、ヘキサデセノイル CoA、パルミトイル CoA を介してグリセロリン脂質に代謝される。それぞれの反応は S1P リアーゼ、脂肪酸アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アシル CoA 合成酵素、2,3-トランスエノイル CoA 還元酵素によって触媒される。矢印の右側に、各反応を触媒する酵素をコードする哺乳類遺伝子を記した。ヒト *ALDH3A2* 遺伝子に変異が入ると SLS を引き起こす。*ALDH3A2* 遺伝子が欠損した細胞では、ヘキサデセナールの一部がアルコールに還元され、エーテルリン脂質へと代謝される。

魚鱗癬，重度の精神遅滞，痙性対麻痺を示す皮膚精神疾患であり，網膜色素変性を伴うこともある．ALDH3A2は長鎖脂肪酸アルデヒドを中心とした幅広い炭素鎖を持つアルデヒドに活性を示すことは知られていたが¹³⁾，S1P代謝に関わることは全く知られていなかった．アルデヒド分子のカルボニル炭素は酸素と炭素の電気陰性度の違いから δ^+ に帯電しており，求核試薬（アミンやアルコールなど）による攻撃を非常に受けやすい．そのため，アルデヒドは反応性が高く，SLSの発症メカニズムとしても蓄積したアルデヒドが何らかの重要な生体分子と反応することで細胞機能を障害するということが予測されている¹²⁾．生体では様々な経路からアルデヒドが生じる．例えば，食事から摂取した植物にはフィトールが含まれ，代謝されるとアルデヒド（プリスタナール）を生じる¹²⁾．また，エイコサノイドの一種ロイコトリエンB₄も代謝の過程でアルデヒドとなる¹²⁾．しかし，どの経路で生じたアルデヒドが最も生体に多く，SLS発症に寄与しているかは不明である．上述のようにS1P代謝は広範な組織で活発に行われていることから，S1P代謝産物のヘキサデセナールは恒常的に産生され，しかも生体アルデヒドの中では多い方であると考えられる．また，S1Pリアーゼの細胞内局在を考えるとキサデセナールは小胞体で産生されるはずである¹⁴⁾．ALDH3A2の細胞内局在も小胞体であり¹⁵⁾，両者の局在場所は一致している．これらのことから筆者らはヘキサデセナールがSLSの主要な基質の一つではないかと推測している．さらに，ヘキサデセナールは2位と3位の間にトランス二重結合を持つ共役カルボニル化合物（ α, β -不飽和アルデヒド）であり，アルデヒドの中でも特に反応性が高いと予想される．例えば，最も単純な共役カルボニル化合物であるアクロレインは毒性が極めて高いことが知られている¹⁶⁾．飽和アルデヒドがタンパク質リシン残基の ϵ アミノ基などの1級アミンと反応して Schiff塩基を形成するのに対し， α, β -不飽和アルデヒドはマイケル付加反応によってリシン，システイン，ヒスチジン残基とも反応する¹⁷⁾．このように推定されるヘキサデセナールの反応性の高さからも，筆者らはS1P代謝異常がSLS発症の唯一の原因ではないにしても，大きく関与していると考えている．

4. S1P代謝経路の同定

筆者らはさらにS1P/長鎖塩基1-リン酸代謝過程に関わるアシルCoA合成酵素として酵母FAA1, FAA4遺伝子，哺乳類ACSLファミリー（ACSL1-6；ただしACSL2は存在しない）を同定した⁸⁾．これらの欠損株あるいは阻害剤

による活性阻害の条件下では，S1P代謝産物のうち，ヘキサデセン酸が蓄積していた．アシルCoA合成酵素は脂肪酸を基質としてアシルCoAを産生する反応を触媒することから，S1P代謝経路ではヘキサデセン酸がヘキサデセニルCoAへと代謝されるステップが存在することが明らかとなった．上述のように，S1Pの代謝経路には，アルデヒドの酸化，脂肪酸のCoA付加，二重結合の飽和化の3段階が存在し，その順序の違いから三つの経路が考えられたが，その中でヘキサデセン酸からヘキサデセニルCoAを生じる経路は一つだけであった．つまり，S1Pはヘキサデセナール，ヘキサデセン酸，ヘキサデセニルCoA，パルミトイルCoAの順に代謝されることが明らかになった（図2）．このように，アシルCoA酵素を阻害したときに蓄積する中間代謝物を同定したことで，S1Pの代謝経路を明らかにすることに成功した．

5. おわりに

筆者らのS1P代謝経路の同定により，S1P代謝異常が病態と関連する可能性が浮かび上がってきた．またこれまで脂質メディエーターとしての機能ばかりが注目されていたS1Pに対して，筆者らの報告は中間代謝物としての重要性もあることを再認識させるものである．今後の課題は，ヘキサデセノイルCoAをパルミトイルCoAへ変換する酵素（2,3-トランスエノイルCoA還元酵素）の同定と，S1P代謝異常がどこまで密接にSLS発症に関わっているかを明らかにすることである．

- 1) 木原章雄 (2006) 生化学, 78, 725-737.
- 2) Kihara, A., Mitsutake, S., Mizutani, Y., & Igarashi, Y. (2007) *Prog. Lipid Res.*, 46, 126-144.
- 3) Kolter, T. & Sandhoff, K. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, 1758, 2057-2079.
- 4) 木原章雄 (2010) 生化学, 82, 591-605.
- 5) Vogel, P., Donoviel, M.S., Read, R., Hansen, G.M., Hazlewood, J., Anderson, S.J., Sun, W., Swaffield, J., & Oravec, T. (2009) *PLoS One*, 4, e4112.
- 6) Bektas, M., Allende, M.L., Lee, B.G., Chen, W., Amar, M.J., Remaley, A.T., Saba, J.D., & Proia, R.L. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 10880-10889.
- 7) Hla, T. (2004) *Semin. Cell Dev. Biol.*, 15, 513-520.
- 8) Nakahara, K., Ohkuni, A., Kitamura, T., Abe, K., Naganuma, T., Ohno, Y., Zoeller, R.A., & Kihara, A. (2012) *Mol. Cell*, 46, 461-471.
- 9) Kihara, A. & Igarashi, Y. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, 1781, 496-502.
- 10) Kawahara, A., Nishi, T., Hisano, Y., Fukui, H., Yamaguchi, A., & Mochizuki, N. (2009) *Scienc*, 323, 524-527.
- 11) Stoffel, W. & Sticht, G. (1967) *Hoppe Seylers Z. Physiol.*

- Chem.*, 348, 941-943.
- 12) Rizzo, W.B. (2007) *Mol. Genet. Metab.*, 90, 1-9.
- 13) Kelson, T.L., Secor McVoy, J.R., & Rizzo, W.B. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, 1335, 99-110.
- 14) Ikeda, M., Kihara, A., & Igarashi, Y. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 325, 338-343.
- 15) Ashibe, B., Hirai, T., Higashi, K., Sekimizu, K., & Motojima, K. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 20763-20773.
- 16) Beauchamp, R.O., Jr., Andjelkovich, D.A., Kligerman, A.D., Morgan, K.T., & Heck, H.D. (1985) *Crit. Rev. Toxicol.*, 14, 309-380.
- 17) Catalá, A. (2009) *Chem. Phys. Lipids*, 157, 1-11.

木原 章雄

(北海道大学大学院薬学研究院生化学研究室)

Complete metabolic pathway of sphingosine 1-phosphate and its importance as a metabolic intermediate

Akio Kihara (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Kita 12-jo, Nishi 6-choume, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan)

グレリンシグナルの多様性を支える分子メカニズム

1. はじめに

グレリンは、下垂体からの成長ホルモン分泌を誘導するGタンパク質共役型受容体の内因性リガンドとして児島、寒川らにより胃から精製、同定されたペプチドホルモンである¹⁾。グレリン発見に先立ち、1980年代は医薬サイドの要請から成長ホルモンの分泌を促す薬剤の開発が盛んになった。その中である種の短鎖ペプチド(GHRP-6など)は、成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)とは異なる経路を介して成長ホルモンの分泌を促していることがわかってきた。1996年になるとGHRP-6や非ペプチド性アゴニストMK-0677の受容体として下垂体の成長ホルモン放出細胞に発現するGHSR1a (growth hormone secretagogue receptor type 1a) がクローニングされた。そして1999年になりGHSR1aの内因性リガンドとしてようやくグレリンが同定された。今日のグレリン研究の隆盛にはグレリンが食欲刺激作用をはじめとするエネルギー代謝に深く関与している事実が多分に寄与している。95, 96年に相次いでGHRP-6の脳室内投与によりラットの食餌量が増加することが報告されたことから、グレリンやGHSR1aが食欲に深く関与するであろうことは発見以前に既に想定されていたものと

思われる。その機序はGHRP-6のオピオイド類との構造類似性やGHRHの食欲亢進作用から類推されており、いずれの場合も構造と機能に関わる洞察が契機になった。グレリンの発見とともに「道は拓けていた」ことに感じ入らずにおれない。今やグレリンによる中枢性の食欲制御は視床下部弓状核にあるNPY/AGRP神経系の修飾を介していることが明らかになっており、現在から当時に舞い戻ってもグレリンを精製、同定するのであれば脳や下垂体が第一選択と思われる。しかし、ここに大きな難関があった。グレリンの主要な産生臓器は脳ではなく胃なのである。成長ホルモン分泌を刺激するホルモンが、実は中枢で食欲を促進し、さらには胃の蠕動運動にも関わるかもしれない、とすればあるいは胃でも発現しているかもしれない、という類推の光は当時あまりにも微かであったに違いない。児島らによる発見の経緯は、生化学者であるならば深く頷首せざるをえない物語としてご自身により紹介されているので是非ともご参照願いたい(児島将康先生のホームページ http://www.lsi.kurume-u.ac.jp/molecular_genetics/index.html)。

2. 機能多様性の担保

一般に分子が機能多様性を獲得するには二通りの方法が考えられる。一つは分子の構造を簡単な融通の利くものにして生体内の様々な現象に関わる方法である。これには例えば細胞内セカンドメッセンジャーであるcAMPがあり、あるいは最近では亜鉛イオンなど更にシンプルな分子による「特別な」役割も注目されるようになってきた²⁾。もう一つは少しずつ形の違った構造類似体を数多く用意して〇〇ファミリーのような体裁を整えることである。そこで、グレリンは後者の範疇に入ると想定した上で、グレリンの分子種多様性について考察する。

ペプチドホルモンのとりうる分子多様性は1) アミノ酸配列、2) アミノ酸鎖長、これに加えてグレリンの場合は、3) 脂肪酸修飾の種類に依存する。これをまとめたものが図1Aである。グレリンのアミノ酸配列は種間で極めてよく保存されており、第1コアはカエル(GLTFLSP)などの一部の両生類を除いてほぼ全てのグレリン分子において同一である。また、アミノ末端から14番目のグルタミンや28番目のアルギニンの欠失がラットとヒトにおいて遺伝子配列上の変異体として報告されている。そもそもヒツジやウシなどでは14番目のグルタミンはグレリン遺伝子にコードされていない。第2, 第3コアは哺乳類間での保存性は高いが、鳥類や魚類では第3コアに多様性が存在