

志田 敏夫

(信州大学大学院総合工学研究科
生命機能・ファイバー工学専攻)

AP site recognition mechanism by the tryptophan residue in the vicinity of the catalytic center of AP endonucleases
Toshio Shida (Department of Bioscience and Textile Technology, Interdisciplinary Graduate School of Science and Technology, Shinshu University, Tokida 3-15-1, Ueda, Nagano 386-8567, Japan)

スフィンゴ脂質シグナリング分子の代謝マシナリー

はじめに

生体膜脂質二重層を構成する両親媒性脂質は、グリセリン脂質とスフィンゴシン塩基を骨格としたスフィンゴ脂質に大別される。スフィンゴ脂質は、生体膜の10%程度しか占めない比較的マイナーな膜脂質であるが、現在おもに二つの観点から注目を集めている。一つ目は、スフィンゴ脂質は形質膜上のラフトと呼ばれるマイクロドメインの構成分子として機能し、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点である。二つ目は、膜のスフィンゴ脂質の一部が分解することで微量に産生されるセラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン1-リン酸(S1P)等の代謝産物が、細胞死、増殖、分化等を制御するシグナリング分子として機能するという点である。これらスフィンゴ脂質シグナリング分子の量的変動は、細胞の運命を決定する重要な要因となると考えられている。その主要な生成経路は、膜のスフィンゴミエリンのスフィンゴミエリナーゼによる分解を起点としておりと考えられている(図1A)。この生成経路は、形質膜、リソソーム、ミトコンドリア、小胞体、細胞外等、様々な領域に存在しており、スフィンゴ脂質シグナリング分子が部位特異的な機能を発揮するために必要であると考えられている(図1B)。近年、スフィンゴ脂質シグナリング分子の代謝に関与する酵素遺伝子のクローニングが殆ど終了したが、個々のスフィンゴ脂質代謝酵素が細胞のどこでどのような制御下で機能するのか、すなわち「スフィンゴ脂質シグナリング分子の代謝マシナリー」に関しては未だ多くの未解明点が存在する。本稿では、スフィンゴ脂質シグナリング分子の代謝酵素のトポロ

ジーや局在制御機構に着目した最近の我々の研究を紹介する。

1. 中性セラミダーゼによる細胞外スフィンゴ脂質代謝

セラミダーゼ(CDase)は、セラミドの酸アミド結合を加水分解して、スフィンゴシンと遊離脂肪酸を生成する酵素である。CDaseは、スフィンゴ脂質シグナリング分子として機能するセラミド、S1P量の調節酵素として古くから重要視されてきた酵素である。CDaseには、最適pHが酸性とアルカリ性の酵素が存在することが示唆されてきたが、近年の遺伝子クローニングの進展でCDaseには一次構造が異なる三つのファミリー(酸性、中性、アルカリ性CDase)が存在することが明らかとなった。我々は、哺乳類の中性セラミダーゼの遺伝子クローニングに最初に成功したことを皮切りとして¹⁾、本酵素が細胞のどこでどのようにスフィンゴ脂質代謝に関与するのか、について研究を行った。その結果、中性CDaseは形質膜にII型膜結合型タンパク質として存在し、触媒領域を細胞の外側に向けていることが明らかとなった²⁾。更に本酵素の一部は、膜貫通領域が切断され、細胞外に分泌されることも確認された。また、本酵素は膜貫通領域近傍にO型糖鎖が密集して付加しており、この構造によって細胞表面で安定に発現できることもわかった²⁾。これらのことから、形質膜外層を含む細胞外領域においてセラミドの代謝に関与することが示唆された。実際、CHOP細胞(ポリオーマウイルスのLT抗原を発現するCHO細胞)を用いた本酵素の過剰発現実験で、細胞外領域に存在する中性CDaseは形質膜外層や血清中で出現したセラミドをスフィンゴシンに分解することが示された。更に、生成されたスフィンゴシンは、S1Pにまで変換されることも確認された³⁾(図1B)。

細胞外S1Pは細胞表面のS1P受容体を介してリンパ球動態や血管新生に関与することが知られており、中性CDaseを介した細胞外S1P産生経路の重要性に関しては今後詳細な解析が必要である。一方で、中性CDaseのノックアウトマウスの解析から、本酵素は食事由来のセラミドを腸内で分解することが示されており、細胞外に分布することで食物の消化にも関与することが示唆されている⁴⁾。従来、スフィンゴ脂質の代謝経路は、主に細胞の中に存在すると考えられてきたが、一連の研究によって形質膜外層を含む細胞外領域においてセラミドからS1Pまでを生成する代謝経路の存在とその重要性が示された。

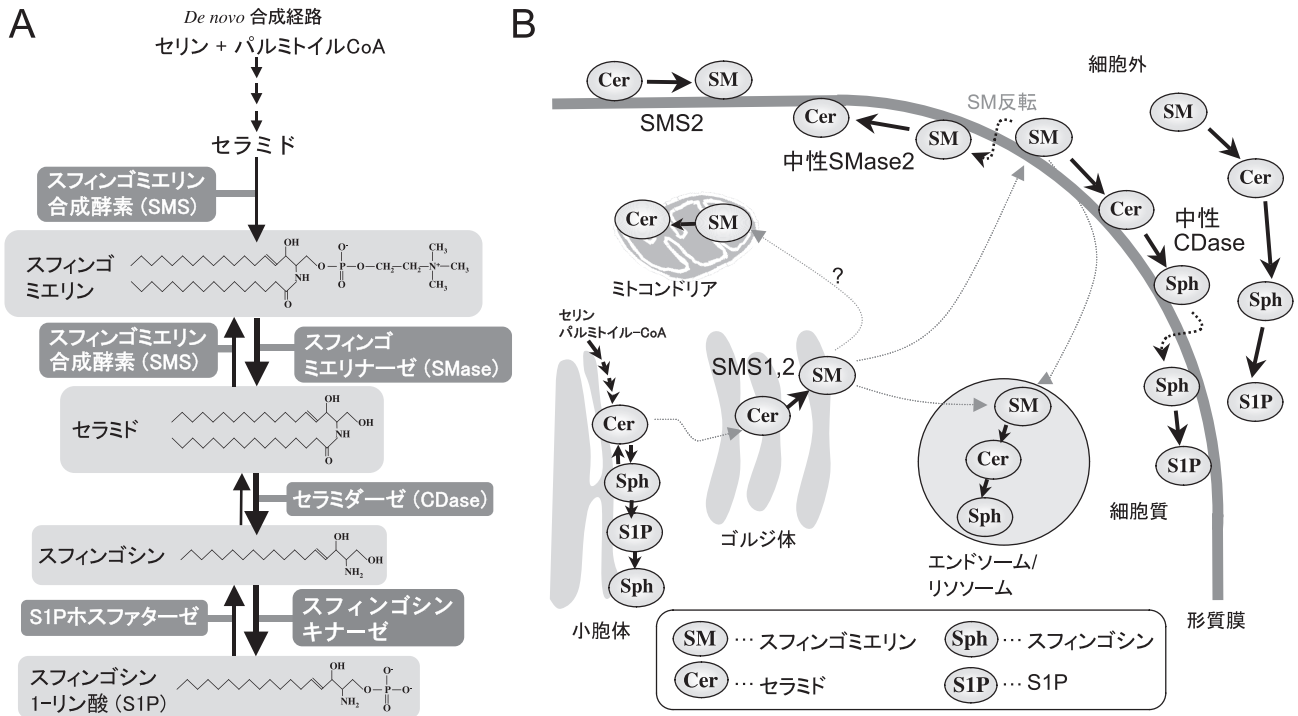


図1 スフィンゴミエリンからS1Pに至る代謝経路

(A) スフィンゴ脂質合成は、セリンとパルミトイル CoA の縮合反応からスタートし、いくつかの反応を経てセラミドが生合成される。セラミドは、スフィンゴミエリン合成酵素 (SMS) によってスフィンゴミエリンに変換される。スフィンゴミエリンはスフィンゴミエリナーゼ (SMase)、セラミダーゼ (CDase)、スフィンゴシンキナーゼによる代謝過程を経てS1Pにまで変換される。

(B) 細胞の特異的部位に存在するスフィンゴ脂質代謝経路。スフィンゴミエリンを起点とするスフィンゴ脂質シグナリング分子の代謝経路は、細胞の様々な場所に存在する。

2. 中性スフィンゴミエリナーゼ2の形質膜トポロジーと局在制御機構

スフィンゴミエリナーゼ (SMase) は、スフィンゴミエリンを加水分解してセラミドを生成する酵素である。SMase は様々な細胞外刺激 (サイトカインや各種ストレス等) によって活性化され、産生されたセラミドは、細胞内シグナル伝達経路を制御することで細胞分化、増殖、アポトーシス等の調節に関与することが示唆されている。SMase には、最適 pH の異なる三つのグループ、酸性、中性、アルカリ性 SMase が存在する。中性 SMase は、細胞内シグナル伝達系に深く関与する酵素として古くから研究されて来ており、現在4種類のアイソフォーム (中性 SMase1~3, ミトコンドリア中性 SMase) が同定されている。その中でも中性 SMase2 は、ノックアウトマウスや siRNA 等の解析により、個体レベルでは骨形成等を含む成長過程における機能が示唆され、細胞レベルでは TNF- α

や酸化的ストレス応答に関与することが判明する等、多彩な生理機能を持つことが示されている⁵⁾。

中性 SMase2 は、N 末端に2個の疎水性セグメントを持つ膜タンパク質である。しかしながら、その細胞内局在、活性調節機構等の基本的な性質に関して不明な点が多かった。我々は、マウスの中性スフィンゴミエリナーゼ2の細胞内局在を詳細に解析した。本酵素を MCF7 細胞に過剰発現させるとその多くが形質膜に分布することが確認された。過剰発現した本酵素の形質膜トポロジーを解析した結果、大部分が形質膜の細胞質側に配向していることが判明した⁶⁾。更に本酵素は、疎水性セグメント近傍と触媒領域にシステインのクラスターを持ち、複数の S-パルミトイル化を受けていることが判明した⁷⁾ (図 2A)。パルミトイル化は膜へのアンカーリングによって、本酵素の形質膜における安定発現に寄与しているらしく、パルミトイル化部位を欠損した変異体は形質膜に分布せず、リソソームで分解されることが明らかとなった。

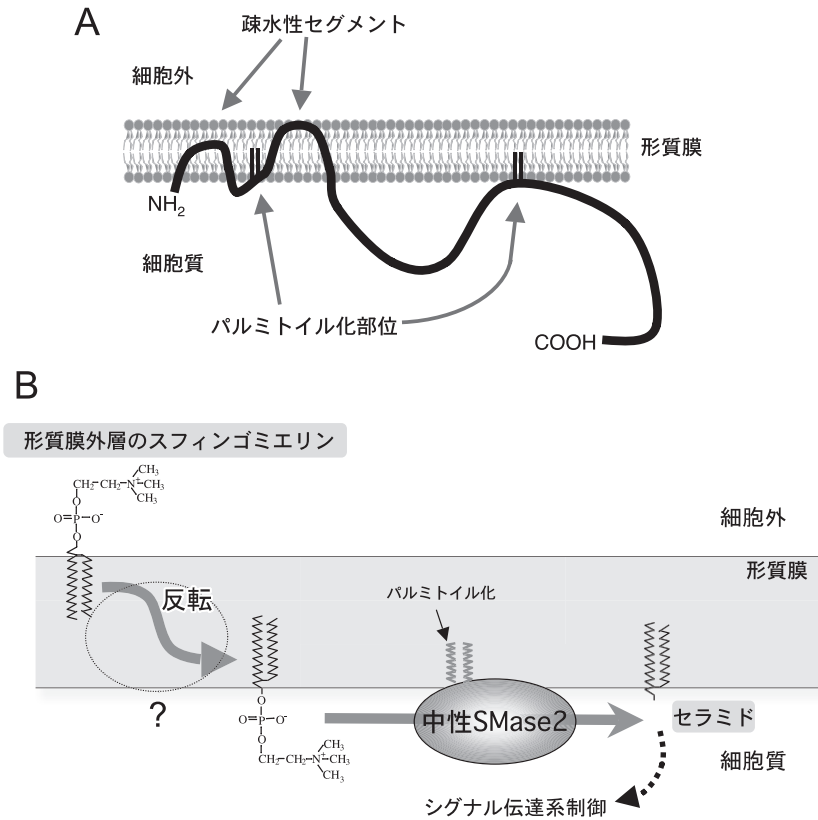


図2 中性 SMase2 の推定膜トポロジー (A) とスフィンゴミエリン分解 (B)
 (A) 中性 SMase2 の形質膜における推定トポロジー. 本酵素は N 末端に疎水性セグメントを二つ持ち、膜の細胞質側に結合している. 疎水性セグメント近傍及び触媒領域に存在する 2 箇所のパルミトイル化によって、形質膜に安定に発現できるものと考えられる.
 (B) スフィンゴミエリンは、その殆どが形質膜の外層に存在する. そのため、形質膜細胞質側に存在する中性 SMase2 によって分解されるためには、スフィンゴミエリンが膜の外側から内側へと反転 (フリップ) する必要がある.

ところで最近、中性 SMase2 のホモログである *Bacillus cereus* の SMase の結晶構造が解析され、膜に存在するスフィンゴミエリンと酵素との結合モデルが提示された⁶⁾。このモデルを中性 SMase2 にあてはめてみると、触媒領域に存在するパルミトイル化部位は、膜に接触した活性中心の非常に近傍に位置することがわかった。このことから、パルミトイル化の膜へのアンカーリングは、酵素と膜に存在する基質との接触を強める役割を持つ可能性が考えられる。一般的にパルミトイル化は、その可逆的反応により、タンパク質の活性制御に関与するといわれており、中性 SMase2 についてもパルミトイル化によって膜のスフィンゴミエリンへのアクセスの調節が行われていることが予想され興味深い。

シグナル伝達系に関与するセラミドが形質膜細胞質側で

生成されることは、古くから指摘されて来た事象であるが、これまでに決定的な証拠は得られていなかった。本研究は、セラミド生成酵素の膜トポロジーという観点からこの問題を分子レベルで証明した最初の例となった。一般的にスフィンゴミエリンは、形質膜の外側に殆どが配向していると考えられている。また、後述するスフィンゴミエリン合成酵素は、ゴルジ体ルーメン側あるいは形質膜の外側においてスフィンゴミエリンの合成を行っている。これらのことから、中性 SMase2 によってスフィンゴミエリンが分解されるためには、スフィンゴミエリンの形質膜の外側から内側への反転が必要となると考えられるが、このような挙動に関与する因子は特定されていない(図 2B)。今後、中性 SMase によるセラミド産生機構を解明するにあたって、形質膜スフィンゴミエリンの反転の分子メカニ

ズムの解析は重要な課題になると思われる。

3. パルミトイル化によるスフィンゴミエリン合成酵素 1, 2 の局在制御機構

スフィンゴミエリン合成酵素 (SMS) は、ホスファチジルコリンからセラミドへコリンリン酸を転移することでスフィンゴミエリンを合成する (図 3A)。従来の考えでは、小胞体からゴルジ体へと輸送されたセラミドがゴルジ体ルーメン側においてスフィンゴミエリンに変換されると考えられていた。このことから、SMS は、ゴルジ体にも局在すると考えられて来た。しかし最近、二つの細胞内局在の異なる SMS (SMS1, SMS2) がクローニングされた⁹⁾。SMS1 は従来の定説通り、ゴルジ体に局在する酵素であったが、SMS2 はゴルジ体だけではなく形質膜にも存在することがわかった。このことから、形質膜でスフィンゴミエリンが合成されることの生物学的意義とはどのようなもの

か? という新たな疑問が生じた。我々は、両酵素が細胞内で異なる局在を示す原因を探った結果、SMS2 のみが C 末端にシステインのクラスター構造を持ち、この位置で複数の S-パルミトイル化を受けていることを見出した。さらにパルミトイル化が SMS2 の形質膜への発現に重要であることがわかった¹⁰⁾。このことから、SMS1 と SMS2 の違いを規定している要因がパルミトイル化の有無にあることが強く示唆された (図 3B)。SMS1 と SMS2 の固有の生理機能に関しては、まだ不明な点が多い。が、最近 SMS2 のノックアウトマウスを用いた実験で SMS2 が肝臓や血漿中のスフィンゴミエリン量の維持に関与することや、SMS1 が持たないセラミドホスホエタノールアミン合成活性を持つこと等が報告されている^{11,12)}。今後、SMS1 と SMS2 の生理機能の違いを明確にしていくことで、形質膜に SMS が存在することの生物学的意義が解明されていくことを期待したい。

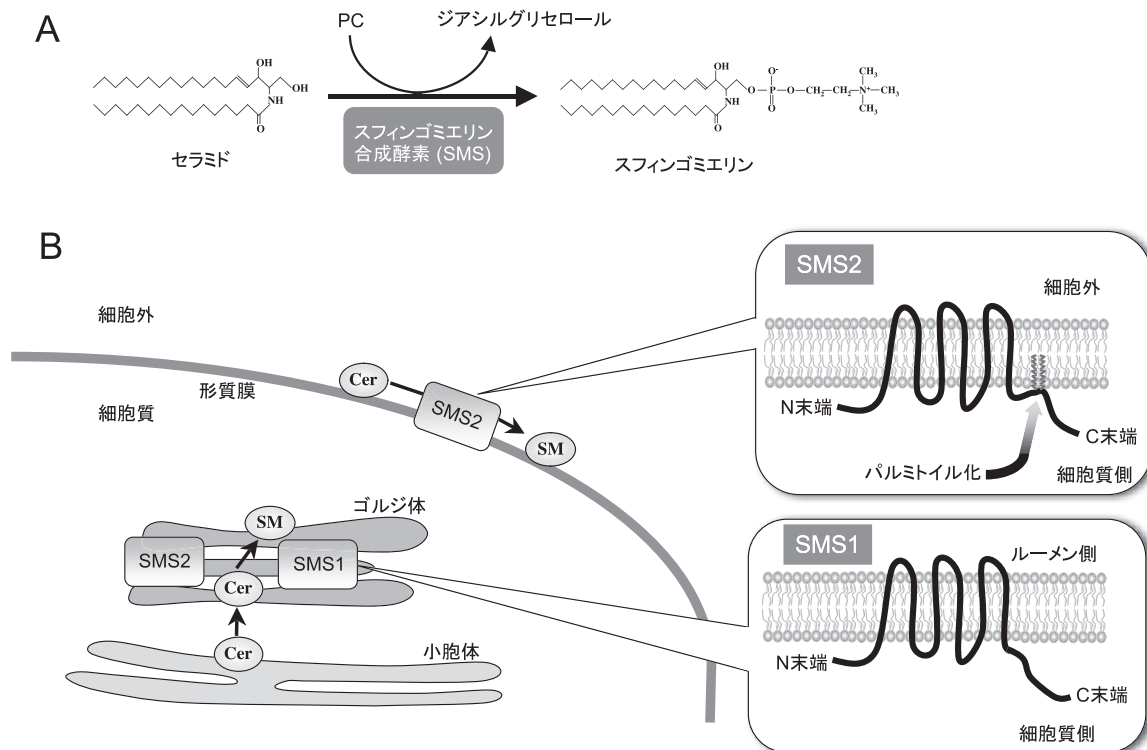


図 3 SMS の反応機構(A)とパルミトイル化による局在制御(B)

(A) SMS は、ホスファチジルコリンからセラミドへコリンリン酸を転移することでスフィンゴミエリンを合成する。

(B) SMS には、ゴルジ体にも局在する SMS1 と形質膜とゴルジ体に局在する SMS2 が存在する。SMS2 は C 末端の細胞質テイルにシステインのクラスターを持ち、複数の S-パルミトイル化を受けている。このクラスター構造は、SMS1 には存在しない。パルミトイル化は、両酵素の局在の違いを規定している要因の一つと考えられる。

おわりに

図1で示されるようにスフィンゴ脂質シグナリング分子の代謝経路は一見単純であるが、細胞のどの場所で行われるのか?という観点からみると大変複雑で多彩な経路であることがわかる。このように多様な経路の存在とその制御機構を一つずつ明らかにしていくことは、スフィンゴ脂質シグナリング分子の部位特異的な生物機能を理解する上で重要な基盤になると考えられる。例えば、今回紹介した3種類の酵素は形質膜セラミドの量的調節と密接に関連している。形質膜で生成されたセラミドは、様々な細胞内シグナル伝達系因子の活性制御を行うことが指摘されている一方で、形質膜マイクロドメインに集積することでドメイン内に存在する受容体の多量体化の調節を行う等、その役割は非常に多彩であると考えられている。また、S1Pが細胞表面の受容体に作用することを考慮すると、今回記述した中性CDaseを介した細胞外S1P生成経路の存在の重要性が示唆される。一方で、他の脂質を介したシグナリングとのクロストークも考慮にいれていかなければならない。例えばSMSは、その反応過程においてジアシルグリセロールの生成も行っており、スフィンゴ脂質だけでなくグリセロ脂質を介したシグナリングの調節に関わっている可能性も指摘したい。

スフィンゴ脂質シグナリング研究におけるもう一つの大きな課題は、細胞内における未同定の分子ターゲットを明らかにすることである。特にセラミドに関しては、その直接のターゲットとなる分子がなんであるか、という根幹的な疑問に対して不透明な点が多く混沌としている。「細胞の特定の場所におけるスフィンゴ脂質シグナリング代謝マシナリー」と共に「スフィンゴ脂質シグナリング分子の分子レベルでの作用メカニズム」という非常に基本的な問題をはっきりと解明することが、今後のスフィンゴ脂質研究の発展の大きな原動力となることを最後に指摘したい。

謝辞: 本総説のうち、中性CDaseに関する研究は九州大学大学院農学研究院の伊東信教授ならびに北海道大学大学院薬学研究所の五十嵐靖之教授のもとで、中性SMase2に関する研究は米国サウスカロライナ医科大学のYusuf A. Hannun教授のもとで、SMSに関する研究は九州大学大学院理学研究院の久下理教授のもとで、それぞれ行われたものである。本研究に携わったすべての共同研究者の皆様にも深く感謝致します。

- 1) Tani, M., Okino, N., Mori, K., Tanigawa, T., Izu, H., & Ito, M. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275, 11229–11234.
- 2) Tani, M., Iida, H., & Ito, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 10523–10530.
- 3) Tani, M., Igarashi, Y., & Ito, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 36592–36600.
- 4) Kono, M., Dreier, J.L., Ellis, J.M., Allende, M.L., Kalkofen, D. N., Sanders, K.M., Bielawski, J., Bielawska, A., Hannun, Y.A., & Proia, R.L. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 7324–7331.
- 5) Clarke, C.J., Snook, C.F., Tani, M., Matmati, N., Marchesini, N., & Hannun, Y.A. (2006) *Biochemistry*, 45, 11247–11256.
- 6) Tani, M. & Hannun, Y.A. (2007) *FEBS Lett.*, 581, 1323–1328.
- 7) Tani, M. & Hannun, Y.A. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 10047–10056.
- 8) Ago, H., Oda, M., Takahashi, M., Tsuge, H., Ochi, S., Katunuma, N., Miyano, M., & Sakurai, J. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 16157–16167.
- 9) Huitema, K., van den Dikkenberg, J., Brouwers, J.F., & Holthuis, J.C. (2004) *EMBO J.*, 23, 33–44.
- 10) Tani, M. & Kuge, O. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 381, 328–332.
- 11) Liu, J., Zhang, H., Li, Z., Hailemariam, T.K., Chakraborty, M., Jiang, K., Qiu, D., Bui, H.H., Peake, D.A., Kuo, M.S., Wadgaonkar, R., Cao, G., & Jiang, X.C. (2009) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 29, 850–856.
- 12) Ternes, P., Brouwers, J.F., van den Dikkenberg, J., & Holthuis, J.C. (2009) *J. Lipid. Res.*, 50, 2270–2277.

谷 元洋

(九州大学大学院理学研究院化学部門)

Metabolic machinery of sphingolipid signaling molecules
Motohiro Tani (Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan)

メダカにおける生殖幹細胞と性分化

1. はじめに

生殖腺は将来卵や精子となる生殖細胞と、その周りの生殖腺体細胞から構成される。哺乳類を中心とした研究により、性分化、すなわち生殖腺が卵巣・精巣どちらへ分化するかは主に体細胞からのシグナルによって決められることが分かっている。性分化した成体卵巣、精巣では配偶子形成により卵と精子がつくられる。哺乳類では、成体精巣には生殖幹細胞が存在し、ここから絶えず精子が供給されるのに対し、卵巣では減数分裂に入った原始卵胞のプールか