

sci., 26, 11992-12002.

- 17) Tanaka, T., Serneo, F.F., Higgins, C., Gambello, M.J., Wynshaw-Boris, A., & Gleeson, J.G. (2004) *J. Cell Biol.*, 165, 709-721.

古泉 博之

(カリフォルニア大学サンディエゴ校神経科学講座)

Physiological function of the DCX family in brain development

Hiroyuki Koizumi (Department of Neurosciences, University of California, San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093-0691, USA)

スフィンゴ脂質代謝酵素遺伝子の転写調節機序

はじめに

近年、スフィンゴ脂質代謝産物は単なる細胞膜構成成分ではなく、細胞の情報伝達物質としての機能が認知されてきた。特にスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) はその細胞膜受容体が同定され、生理機能、作用機序が明らかにされつつある。S1P はスフィンゴミエリン (SM) の代謝産物セラミド (CER) がさらにスフィンゴシン (SPG) となり、それにリン酸基が付加され産生される (図 1)。S1P 受容

体下流シグナル伝達は、血管内皮の増殖や移動、血管壁の透過性、肥満細胞の活性化、リンパ球のホーミング、抗がん剤への耐性機序、中枢神経の発育などで詳しく調べられている^{1,2)}。CER に関しても、1989年に岡崎らによりヒト白血病細胞株 HL60 のビタミン D₃ による分化に際して、SM が分解され CER の増加が起こることが報告されてから、細胞内機能物質としての役割が注目されるようになった。多くの報告では CER は pro-apoptotic factor として位置づけられている (図 1)。Spiegel らは CER, SPG と S1P の細胞内の量的バランスが細胞の運命を決定するとして sphingolipid rheostat model を提唱した¹⁾。この説によれば、スフィンゴ脂質代謝酵素系の活性変化ないし酵素タンパク質量の変化によってスフィンゴ脂質中間代謝産物の量的変化が生じ、細胞の生存や増殖動態が影響されることになる。一般的に細胞外刺激によるシグナル伝達は大きく分けて初期相と後期相の二つがある。前者は秒～分の迅速応答であり、後者は時間～日の単位の現象である。初期相は細胞の速やかな形態変化、運動、分泌などであり、後者はもう少し長期的な現象の細胞の分化、増殖、細胞死などである。前者は既存酵素あるいは細胞内タンパク質のリン酸化などの修飾により活性、機能あるいは局在が変化して起こると考えられる。後者はタンパク質の量的変化を伴うことが多いと考えられており、転写および翻訳過程が調節機序として重要となる。本稿では我々の最近の研究をもとにこれらスフィンゴ脂質代謝系酵素の転写調節について紹介する。

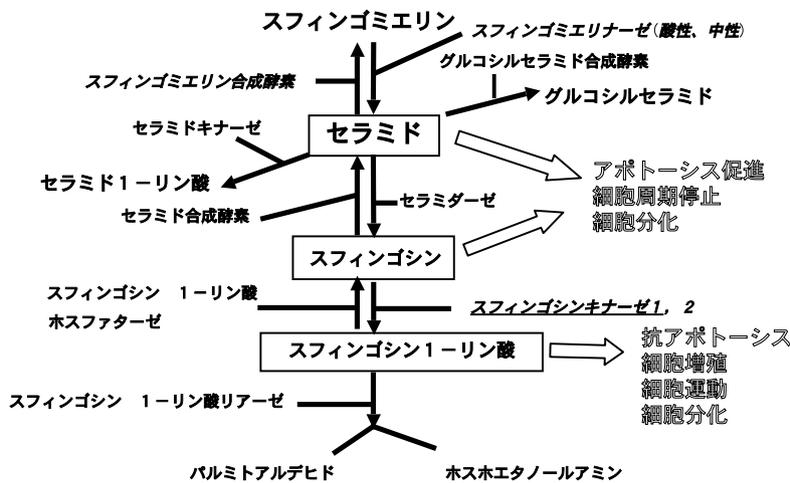


図 1 スフィンゴ脂質代謝経路中間産物と関連する酵素群 SMase および SPHK1 を中心に図示した。代表的な代謝産物 (CER, SPG および S1P) のこれまでに報告された主要な機能も併せて示した。

1. スフィンゴミエリナーゼ (SMase)

SM を CER に分解する SMase には少なくとも酸性 (AS-Mase), 中性 (NSMase) とアルカリ性 (alkaline SMase) の 3 種が報告されており, 異なる細胞内局在や活性化機序が報告されているが, これまでは酵素活性の測定が中心であった. 筆者らはオールトランスレチノイン酸 (RA) で刺激したヒト前骨髄球性白血病細胞株 NB4 の *ASMase* 転写調節を解析した³⁾. RA での分化誘導により *ASMase* 活

性は上昇するが, RA 不応性の NB4/RA 細胞では上昇しない. *NSMase* 活性は NB4, NB4/RA ともに RA 刺激による変化はない. *ASMase* 活性の上昇は CER 量の増加ならびに *ASMase* mRNA レベルと相関しており (図 2A), *ASMase* 5'プロモーター解析では非典型的な retinoic acid responsive element (RARE) ならびに acute phase protein-2 (AP-2) 結合領域が RA 反応性に必須である (図 2B). RA 添加後の *ASMase* 遺伝子転写増強は, RA と RA 受容体である RAR/RXR との複合体並びに AP-2 転写因子がそれぞれのプロ

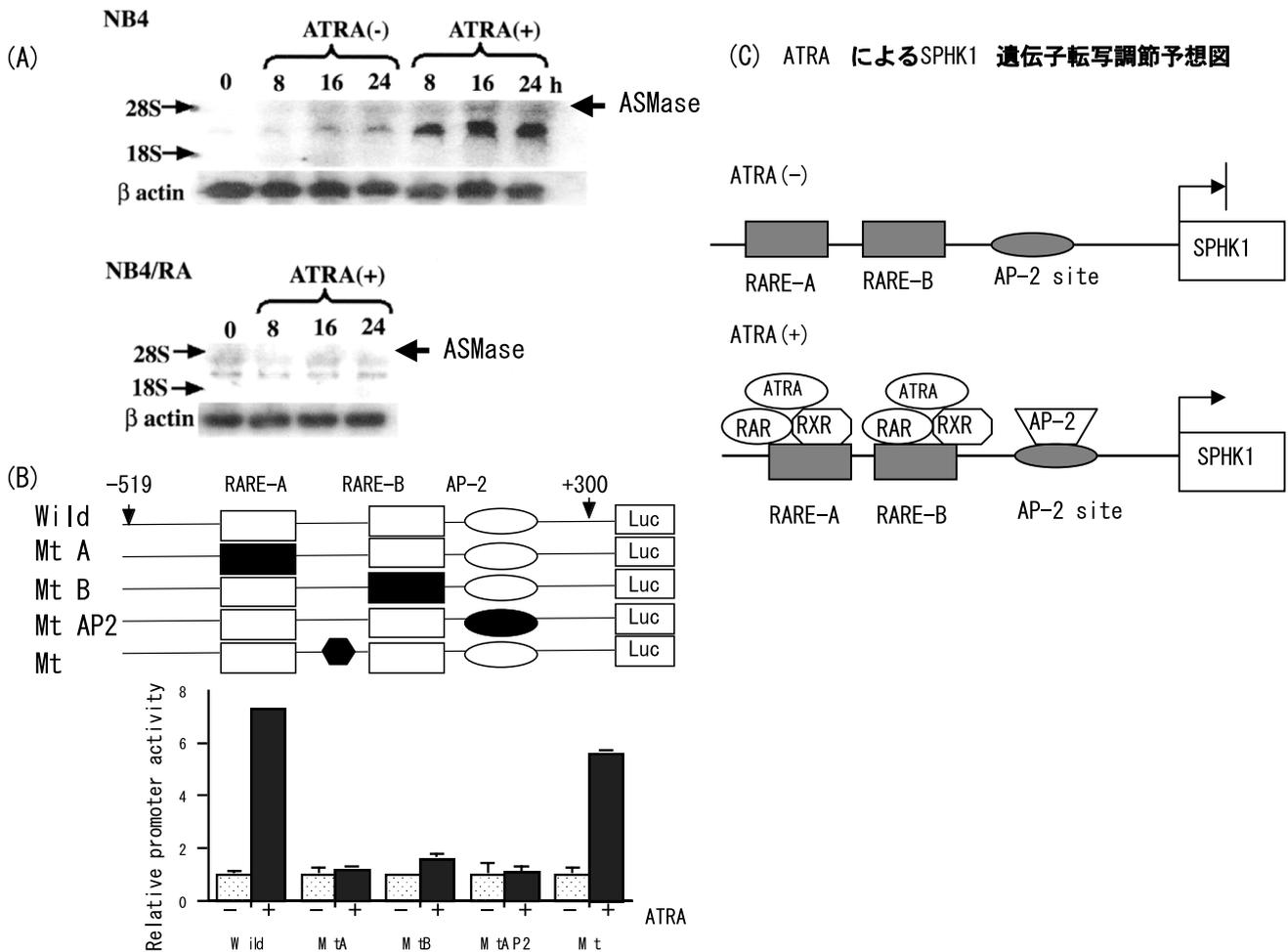


図2 NB4におけるオールトランスレチノイン酸 (ATRA) 刺激後の *SMase* の変化

(A) NB4 および NB4/RA 細胞の ATRA 刺激後 *ASMase* のノーザンブロッティング

(B) NB4 における *ASMase* プロモーター活性

上段は各レポーターの構造, 下段に実際のプロモーター活性を示す. Wild, 野生型プロモーター: MtA, 変異導入プロモーター A (RARE-A): MtB, 変異導入プロモーター B (RARE-B): MtAP2, 変異導入プロモーター (AP-2 結合エレメントに変異): Mt, 非特異部位への変異導入プロモーター

(C) *SPHK1* 遺伝子転写調節機序の予想模式図 (大幅に簡略化し転写に関連する各種コアクチベーターならびにコレプレッサーは省略している. また各転写因子については一部推測を含む)

(文献 3 より一部改変)

モーター上の結合部位と結合することによるものと推定される (図 2C). *ASMase* の転写調節に関しては Langmann ら⁴⁾がヒト白血病細胞株 THP-1 で, 4 α -ホルポール 12-ミリステート 13-アセテート (PMA) 刺激による単球系の分化過程での *ASMase* の PMA 反応領域を同定している. 後述する巨核芽球系白血病細胞株 MEG-O1 の PMA 刺激で *sphingosine kinase 1* (*SPHK1*) の mRNA が増加する際⁵⁾にも, Langmann らの報告と同様に Sp1, AP-2 転写因子結合モチーフが PMA 反応性に必須である. 一方, ヒト *NSMase* における主要な *NSMase 2* は酵素活性を指標としてクローニングされたが, その後の解析により TNF に反応し活性が増加すると報告された⁶⁾. 我々の解析でも各種抗がん剤で *ASMase* ではなく *NSMase 2* の mRNA が増加する. 各 *SMase* の発現調節は刺激の種類また細胞種によって異なると考えられ, その調節機序の比較は今後の興味深い問題である.

2. スフィンゴシンキナーゼ 1 (SPHK1)

Edsall らは酵素活性を指標に多くの刺激因子での *SPHK1* の活性上昇を報告している⁷⁾. マウスに続きヒト *SPHK1* がクローニングされ, その過剰発現が細胞の生存, 増殖をもたらすことが確認された. Pitson らは刺激による初期活性化において, トレオニン残基のリン酸化が起こり, 細胞質から細胞膜へと移行することを報告した⁸⁾. 筆者らはマウス *SPHK1* C 末端 18 アミノ酸でポリクローナル抗体を作成し, マウス中枢神経系の免疫染色でその発現パターンを観察した⁹⁾. さらに *SPHK* 活性の組織分布ならびに組織染色の知見から, 神経系ならびに造血細胞の分化における *SPHK1* 転写調節機序を解析した.

2-1. ニューロトロフィン (神経成長因子) 刺激:

nerve growth factor (NGF) 刺激下でラット褐色細胞腫細胞株 PC12 は突起形成を示し, 同時に *SPHK1* mRNA, タンパク質および *SPHK* 活性が上昇する (図 3A)¹⁰⁾. *SPHK1* (1d type) プロモーターの NGF 反応性は受容体 TrkA の阻害剤 K252a で抑制され, プロモーター内の二つの Sp1 様結合領域が必須である (図 3B). EMSA 並びに CHIP アッセイにより Sp1 タンパク質が実際にこの領域に結合することが示された (図 3C および 3D). この現象が NGF あるいは PC12 細胞特異的か, それとも他のニューロトロフィンでも認められるかを, glia cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) とヒト神経芽細胞腫細胞株 TGW について解析した¹¹⁾. GDNF 受容体である RET の変異では欠失により Hirschsprung's disease, また突然変異により mul-

tipule endocrine neoplasia type 2 (MEN2) と呼ばれる悪性腫瘍が生じる. PC12 細胞は GDNF 刺激で *SPHK1* mRNA, タンパク質, *SPHK* 酵素活性が増加し, siRNA により GDNF による神経突起形成と突起先端部の GAP43 タンパク質の増加が抑制された. このことは *SPHK1* が神経系分化の結果でなく, 分化機序そのものに関与していることを示唆している. 一方, NIH3T3 細胞に MEN2A 型の異常 RET を安定発現させると, 増殖の亢進および足場非依存性の増殖が生じ, *SPHK1* の発現増強も観察された. *SPHK1* の siRNA 処理でこの細胞増殖の増強と足場非依存性増殖は抑制された. このことは MEN2 型腫瘍では *SPHK1* の過剰発現が腫瘍化過程に関与している可能性を示唆している. GDNF 刺激 TGW 細胞の *SPHK1* 5'プロモーター解析では, 転写開始点上流の AP-2 モチーフと Sp1 モチーフが重要である. これらの実験データから複数のニューロトロフィン刺激で共通して *SPHK1* の転写が活性化されること, *SPHK1* の発現上昇が細胞分化・増殖プロセスそのものに密接に関係していること, またその責任 5'プロモーター領域は比較的限局した領域であること, 関係する転写因子は Sp1 や AP-2 などの普遍的な転写因子群であることが示された.

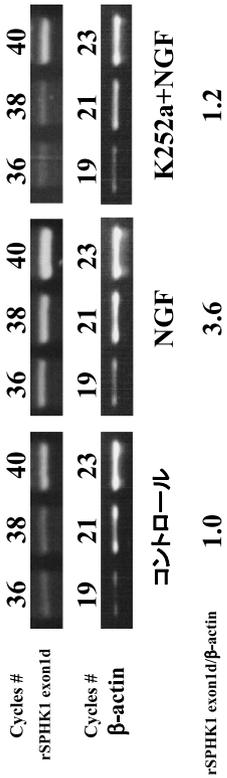
2-2. 造血系の分化:

巨核球系分化での *SPHK1* 転写調節をヒト巨核芽球系白血病細胞株 MEG-O1 で解析したところ⁵⁾, PMA 刺激により MEG-O1 で *SPHK1* mRNA, タンパク質および *SPHK* 活性の増加が観察され, PMA 刺激に反応するプロモーター領域は二つの AP-2 と一つの Sp1 転写因子結合モチーフであることが示された.

2-3. 悪性腫瘍, 白血病化への関与:

筆者らは急性白血病およびその前段階と考えられる骨髄異形成症候群患者 (MDS) のスフィンゴ脂質代謝酵素 9 種類の発現を定量 RT-PCR で測定し, *ABL* 遺伝子発現との相対比で各酵素遺伝子発現量を比較した¹²⁾. 芽球の増加に伴う MDS の病型進展, 白血化と *SPHK1* mRNA の増加, *NSMase 2* mRNA の低下がよく相関している. この発現レベルの変化は細胞内の S1P/セラミドの比を変化させ, 白血化の病態の一因となっていることを予測させる. 現在さらに多くの白血病細胞株を用いて抗がん剤耐性, 遺伝子の発現レベルならびに細胞内スフィンゴ脂質代謝産物の定量を行い解析を進めている (投稿準備中). これに関連して最近, 抗がん剤の耐性と *SPHK1* の活性, 細胞内セラミド/S1P 比との相関がイマチニブ耐性 K562 細胞株¹³⁾あるいはカンプトテシン耐性の異なる前立腺がん細胞株¹⁴⁾等を用

(A) RT-PCR 解析



(C) CHIP アッセイ

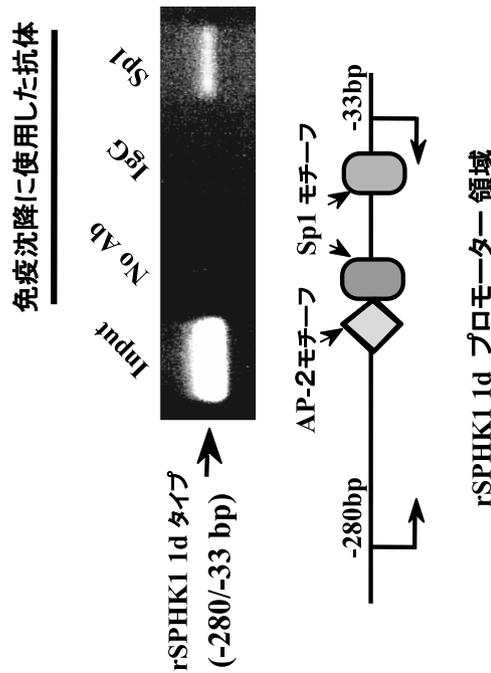
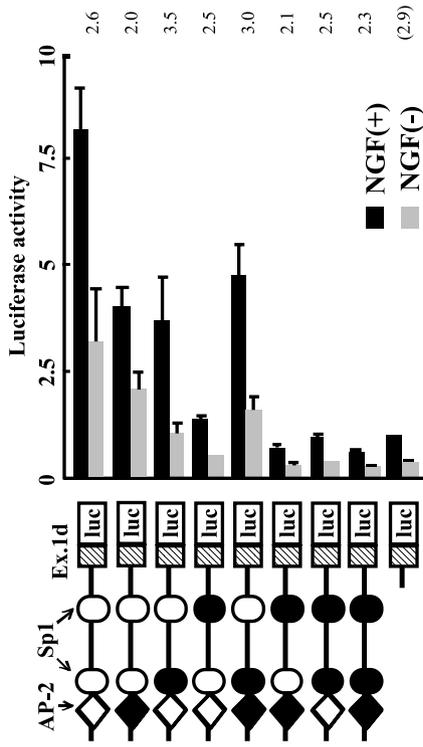


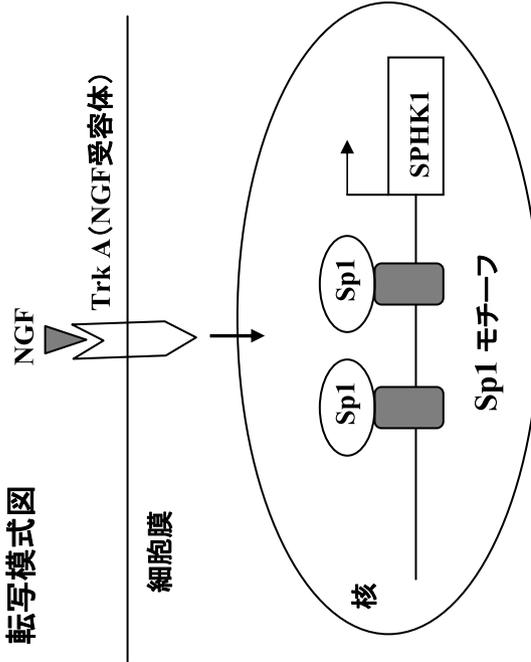
図 3 NGF による SPHK1 の発現調節機序

(A) ラット *SPHK1d* mRNA の半定量 RT-PCR
 NGF, 神経成長因子; K252a, NGF 受容体 TrkA 阻害剤
 (B) プロモーター解析: 転写開始点上流 119 bp プロモーターを含むルシファゼベクターによる *SPHK1d* タイプ遺伝子プロモーターの NGF 刺激反応領域の決定. 黒丸および黒四角は各転写因子結合領域への変異の導入を示す.
 (C) 抗 Sp1 抗体を用いた *SPHK1* 5'プロモーター領域の CHIP アッセイ
 下半分は PCR 増幅した領域を示す.
 (D) 転写因子 Sp1 および 5'プロモーターの Sp1 モチーフを中心とした NGF 刺激での SPHK1 転写の模式図 (関連部分のみの概略を示す)
 (文献 10 より一部改変)

(B) プロモーター解析



(D) 転写模式図



いて報告されている。これらの事実は SPHK1 が抗がん剤の感受性予測因子ならびに抗がん化学療法の新規分子標的である可能性を示している。

おわりに

これらの研究によってスフィンゴ脂質代謝系酵素はタンパク質修飾ないし局在の変化による初期応答の活性化機序に加えて、転写調節によるタンパク質量変化による長期的な活性調節を受けていることが明らかにされた。スフィンゴ脂質代謝中間産物はいくつかの酵素の活性ならびに局在により調節されているため、細胞の分化、増殖、細胞死などのうち、長期応答の生命現象の解析にはこれらすべての酵素の転写レベルでの調節機序の解明が不可欠と考えられる。限られた経験であるが、転写調節に関しては必ずしも調節部位のコンピューターサーチが万能ではなく、実際の地道な検証が必要と実感している。

- Hait, N.C., Oskeritzian C.A., Paugh, S.W., Milstein, S., & Spiegel, S. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, 1758, 2016–2026.
- Taha, T.A., Hannun, Y.A., & Obeid, L.M. (2006) *J. Biochem. Mol. Biol.*, 39, 113–131.
- Murate, T., Suzuki, M., Hattori, M., Takagi, A., Kojima, T., Tanizawa, T., Asano, H., Hotta, T., Saito, H., Yoshida, S., & Tamiya-Koizumi, K. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 9936–9943.
- Langmann, T., Buechler, C., Ries, S., Schaeffler, A., Aslanidis, C., Schuierer, M., Weiler, M., Sandhoff, K., de Jong, P.J., & Schmitz, G. (1999) *J. Lipid Res.*, 40, 870–880.
- Nakade, Y., Banno, Y., T-Koizumi, K., Hagiwara, K., Sobue, S., Koda, M., Suzuki, M., Kojima, T., Takagi, A., Asano, H., Nozawa, Y., & Murate, T. (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, 1635, 104–116.
- Marchesini, N., Luberto, C., & Hannun, Y.A. (2003) *J. Biochem.*, 278, 13775–13783.
- Edsall, L.C., Pirianov, G.G., & Spiegel, S. (1997) *J. Neurosci.*, 17, 6952–6960.
- Pitson, S.M., Moretti, P.A., Zebol, J.R., Lynn, H.E., Xia, P., Vadas, M.A., & Wattenberg, B.W. (2003) *EMBO J.*, 22, 5491–5500.
- Terada, N., Banno, Y., Ohno, N., Fujii, Y., Murate, T., Sarna, J.R., Hawkes, R., Zea, Z., Baba, T., & Ohno, S. (2004) *J. Comp. Neurol.*, 469, 119–127.
- Sobue, S., Hagiwara, K., Banno, Y., Tamiya-Koizumi, K., Suzuki, M., Takagi, A., Kojima, T., Asano, H., Nozawa, Y., & Murate, T. (2005) *J. Neurochem.*, 95, 940–949.
- Murakami, M., Ichihara, M., Sobue, S., Kikuchi, R., Ito, H., Kimura, A., Iwasaki, T., Takagi, A., Kojima, T., Takahashi, M., Suzuki, M., Banno, Y., Nozawa, Y., & Murate, T. (2007) *J. Neurochem.*, 102, 1585–1594.
- Sobue, S., Iwasaki, T., Sugisaki, C., Nagata, K., Kikuchi, R., Murakami, M., Takagi, A., Kojima, T., Banno, Y., Akao, Y., Nozawa, Y., Kannagi, R., Suzuki, M., Abe, A., Naoe, T., &

Murate, T. (2006) *Leukemia*, 20, 2042–2046.

- Baran, Y., Salas, A., Senkal, C.E., Gunde, U., Bielawski, J., Obeid, L.M., & Ogretmen, B. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 10922–10934.
- Akao, Y., Banno, Y., Nakagawa, Y., Hasegawa, N., Kim, T.J., Murate, T., Igarashi, Y., & Nozawa, Y. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342, 1284–1290.

村手 隆

(名古屋大学医学部保健学科)

Transcriptional regulation of sphingolipid metabolic enzymes
Takashi Murate (Nagoya University School of Health Sciences, Daiko Minami 1-1-20, Higashi-ku, Nagoya, 461-8673, Japan)

樹状細胞サブセットの分化経路

はじめに

樹状細胞 (dendritic cell; DC) は強力な抗原提示能を有し、ほぼ生体内全域に分布し、末梢の組織において侵入した細菌やウイルス、あるいはウイルス感染等によって損傷を受けた細胞の死骸・断片などを取り込み、輸入リンパ管を経由し所属リンパ節に移動する¹⁾。移動後、捕獲した抗原を T 細胞に提示し免疫応答を誘導する。また、定常状態において未熟な DC が自己由来の抗原を取り込み、ウイルス由来の RNA, DNA あるいは細菌菌体成分、炎症に伴うサイトカイン刺激等がない場合 (成熟シグナルを受けない場合)、免疫寛容を誘導すると考えられている²⁾。樹状細胞は骨髄由来の白血球であり、抗原提示細胞 (antigen presenting cell; APC) という共通の機能を持つが、分布する組織によって異なるサブセットが存在する³⁾。本稿では異なる樹状細胞サブセットへの分化経路について述べたい。

1. 樹状細胞サブセット

樹状細胞は前述したように不均一な白血球の細胞集団である。例えば、表皮中にはランゲルハンス細胞 (Langerhans cell; LC), 真皮中には真皮内樹状細胞 (dermal DC), 粘膜固有層に存在する DC などはこちら組織において抗原を捕獲後、所属リンパ節に移動し、抗原を T 細胞に提示する。言い換えれば、これら樹状細胞群は migratory DC