

学位論文題名

スフィンゴ糖脂質生合成における  
ラクトシルセラミド分岐の生物学的意義

学位論文内容の要旨

スフィンゴ糖脂質(GSL)は、細胞膜上で超分子複合体(ラフト)を形成し、細胞の認識や情報伝達、分化・増殖、癌化、細胞接着、免疫応答、神経機能など多様な生命現象に深く関わる分子であることが知られている。GSLの糖鎖構造の多様性は、根幹となるラクトシルセラミド(LacCer)を基質として4種の糖転移酵素および硫酸転移酵素の発現が律速となり、これらの上流には200種以上のGSLが存在している。LacCer分岐に作用するGSL合成酵素の活性発現は空間的・時間的に異なるため、このような輻輳した系では個々の糖脂質の本質的な機能を解析するのが困難であった。しかしながら最近、LacCerを基質とするGSL合成酵素遺伝子群のクローニングが次々と達成されたことで、糖脂質再構成細胞の構築が可能になった。本研究ではLacCer分岐の生物学的意義解明の目的として糖脂質特異的硫酸転移酵素(CST)およびシアル酸転移酵素(SAT-I)の遺伝子を導入し、それぞれラクトシルサルファチド(SM3)およびガングリオシドGM3の再構成細胞を作成して機能解析を行った。

SM3とはゴルジ体内腔に局在する糖脂質特異的硫酸転移酵素(CST)により、LacCerのガラクトース残基に硫酸を転移することで生合成される分子である。CSTはLacCer以外に、ガラクトシルセラミドやガラクトシルアルキルアシルグリセロールも基質とし、それぞれガラクトシルセラミド硫酸(SM4)、セミノリピド(SM4g)を生合成する。これらの硫酸化糖脂質を総称してスルファチドと呼ぶが、狭義的にはSM4を指すことが多い。SM4はミエリン鞘の主要成分として多方面から研究されてきたが、SM3の生理機能を明らかにする試みはほとんど成されていない。本研究ではマウスの自然発症肺癌由来の3LLルイス肺癌細胞のうちLacCerを高発現しているJ5株を用いて、この細胞にCST遺伝子を導入し、SM3の安定発現株を樹立した。また、体系的な糖脂質再構成細胞の解明を目的としてGM3再構成細胞も構築した。

SM3再構成細胞は血清存在下の増殖能に全く変化はなかった。しかしながら、形態は球状を示し、プラスチック上での伸展能の低下が認められた。同様の手法で作成したGM3再構成細胞では逆に伸展能の亢進が認められた。そこで細胞外マトリックス(ECM)蛋白のフィブロネクチンおよびラミニンとの接着能を検討したところ、Mockに対しSM3再構成細胞は顕著に低下していた。次にECM蛋白の接着分子受容体であるインテグリンの細胞表面発現量をフローサイトメトリーにより調べたところ、SM3再構成細胞

では各インテグリンサブユニットともに減少していた。膜透過後の総インテグリン量およびウェスタンブロット法による検討においても同様に発現低下が確認された。そこでインテグリン分子の遺伝子発現を $\alpha$ 5 および $\beta$ 1 サブユニットについてノーザンブロット法および RT-PCR 法を用いて検討したところ、 $\beta$ 1 インテグリン mRNA の発現のみが低下するという結果が得られた。

また、SM3 再構成細胞のうち SM3 の発現量が異なる 4 つの株で $\beta$ 1 インテグリンの mRNA 量を比較したところ、SM3 と $\beta$ 1 インテグリン mRNA の発現量には逆相関が認められた。この時 GM3 再構成細胞には変化はなかった。これらの結果より、SM3 再構成細胞では $\beta$ 1 インテグリンの生合成が選択的に抑制されることにより、小胞体における効率的なインテグリン $\alpha\beta$ ヘテロダイマー形成が障害され、余剰の $\alpha$ サブユニット単体は分解経路へ移行し、結果的にインテグリン分子全般が減少する可能性が考えられた。

細胞と ECM 蛋白との接着現象における GSL の関与は以前から報告されている。ケラチノサイトのフィブロネクチンへの接着をガングリオシド GT1b が阻害する現象や、FUA169 細胞に外から GM3 を取り込ませるとフィブロネクチンとの接着が亢進する現象が見られている。インテグリン分子もまたラフトに存在することが最近になって示唆されており、4 回膜貫通型タンパク質(TMP)と会合して機能を発現していることが想定されている。しかしながら、GSL と細胞外マトリックスとの直接的な相互作用は未だ明確にされておらず、インテグリンの発現制御における GSL の役割については全く検討されていなかった。従って本研究の結果は GSL の接着分子および接着シグナル伝達機構への関わりを示唆する新しい知見である。

また作成した糖脂質再構成細胞において腫瘍形成能の検討も行った。SM3 再構成細胞は通常培養条件下での増殖能(足場依存性増殖)に全く変化はなかったが、寒天培地中でのコロニー形成能(足場非依存性増殖)は Mock に対し著しく劣り、ほとんど消失していた。さらに、C57BL6 マウスの腋下に SM3 再構成細胞および Mock を移植し、3 週間後の腫瘍重量を測定した結果、SM3 再構成細胞の原発腫瘍重量は著しく低下、もしくは全く認められなかった。この際、主要組織適合抗原(MHC クラス I 抗原)の発現は変化せず、ヌードマウスでの造腫瘍能も低下していた。これらの結果は、SM3 再構成細胞において造腫瘍能の低下すなわち癌細胞の三次元増殖を抑制する機構が働いていることを示唆しており、インテグリンの発現低下が一つの要因ではないかと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	五十嵐	靖之
副査	助教授	井ノ口	仁一
副査	教授	有賀	寛芳
副査	助教授	松本	健一

学位論文題名

## スフィンゴ糖脂質生合成における ラクトシルセラミド分岐の生物学的意義

スフィンゴ糖脂質(GSL)は、細胞膜上で超分子複合体(ラフト)を形成し、細胞の認識や情報伝達、分化・増殖、癌化、細胞接着、免疫応答、神経機能など多様な生命現象に深く関わる分子であることが知られている。GSLの糖鎖構造の多様性は、根幹となるラクトシルセラミド(LacCer)を基質として4種の糖転移酵素および硫酸転移酵素の発現が律速となり、これらの上流には200種以上のGSLが存在している。LacCer分岐に作用するGSL合成酵素の活性発現は空間的・時間的に異なるため、このような輻輳した系では個々の糖脂質の本質的な機能を解析するのが困難であった。しかしながら最近、LacCerを基質とするGSL合成酵素遺伝子群のクローニングが次々と達成されたことで、糖脂質再構成細胞の構築が可能になった。樺山らはLacCer分岐の生物学的意義解明の目的として糖脂質特異的硫酸転移酵素(CST)およびシアル酸転移酵素(SAT-I)の遺伝子を導入し、それぞれラクトシルサルファチド(SM3)およびガングリオシドGM3の再構成細胞を作成して機能解析を行った。

SM3安定発現株は血清存在下の増殖能に全く変化はなかったが、伸展能に低下が見られ、球状の形態を示し、フィブロネクチンおよびラミニンとの接着能が顕著に低下していることを見いだした。そこで、インテグリン分子 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ および $\beta 1$ の発現量を調べたところ、SM3安定発現株では各サブユニットともに減少していた。さらにインテグリン分子の遺伝子発現をノーザンプロテイングを行ったところ、 $\beta 1$ インテグリン mRNAの発現のみが低下するという興味ある結果をえている。ここで樺山は、内因性SM3により $\beta 1$ インテグリンの生合成量の選択的に抑制を受け、小胞体における効率的なインテグリン $\alpha\beta$ ヘテロダイマー形成が障害され、余剰の $\alpha$ サブユニット

単体は分解経路へ移行し、結果的にインテグリン分子全般が減少するという興味ある可能性を指摘しているが、今後の検討により明らかにされることを期待する。

次に樺山らは、C57BL/6 マウスの腋下に SM3 発現株および Mock 株を移植し、3 週間後の腫瘍重量を測定し結果、SM3 発現株由来の原発腫瘍重量は著しい低下、もしくは消失を認めた。SM3 株においては通常培養条件下での増殖能は全く低下していないことから、インテグリンの発現低下によって癌細胞の造腫瘍能すなわち三次元増殖が断たれた結果であると考えられる。事実、寒天培地中でのコロニー形成能（足場非依存性増殖）は Mock に比較して SM3 株では著しく劣り、ほとんど消失していた。すなわち、内因性 SM3 では癌細胞の最も基本的な性質である足場非依存性増殖の選択的消失という、非常に興味ある結果が得られたことになる。これらの研究結果は、2001 年 7 月 20 日の J. Biol. Chem. 276 巻、26777-26783 に掲載されている。また、今年 2 月の蛋白質 核酸 酵素 47 巻にも総説として掲載されている。

本論文において、内在性 SM3 による  $\beta 1$  インテグリン遺伝子の発現抑制機構の存在を示した。この発見は、GSL と細胞外マトリックスとの機能的相関関係を明らかにする上での新たな命題を我々に与えており、今後の研究の進展が待たれる。

GSL 合成酵素遺伝子群のクローニングがほぼ達成された現在、日本を含む世界中でこれらの遺伝子を駆使した研究が進展しており、GSL の根本的な生物学的意義の解明に大いに期待される。本論文では、CST 遺伝子を肺癌細胞に導入し SM3 を発現させると、 $\beta 1$  インテグリンの発現が遺伝子レベルで減少し、造腫瘍能が激減することを世界に先駆けて発見している。現在、その作用機序の解明へ向けての研究とともに CST 遺伝子による癌の遺伝子治療への可能性についてもアプローチを開始している。一方、GM3 発現株では、細胞伸展が亢進し、造腫瘍能は亢進するという対称的な結果が得られている。糖脂質生合成におけるラクトシルセラミド分岐における硫酸化およびシアリル酸化による特異的遺伝子発現制御機構の存在が示唆されたことから、その生物学および病態生理学的意義の解明が今後の重要な課題である。果たして、細胞膜マイクロドメイン（ラフト）に集積した GM3 および SM3 が、どのようなシグナル伝達機構を制御してインテグリンの遺伝子発現を変化させるのか？合目的かつ時空的な糖脂質分子による遺伝子発現制御機構の実証はポストゲノム時代の重要な研究課題である。

以上、樺山氏の研究はその新奇性と発展性を持っており、十分に博士論文に値すると認められるものである。