

学位論文題名

スフィンゴ糖脂質合成酵素の活性調節機構と
その生理機能に関する研究

学位論文内容の要旨

スフィンゴ糖脂質は真核生物の形質膜の外層に特徴的な構成成分である。哺乳動物と酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のスフィンゴ糖脂質の構造は、膜のアンカーとして作用する疎水性のセラミド部分は共通であるが、親水性の糖鎖部分が大きく異なる。しかしながら、哺乳動物は糖鎖における糖残基の種類、数、結合の変化により多様性を生み、酵母では Sur2p、Scs7p、Ccc2p によるセラミドへの水酸化の位置と数によって多様性を生んでおり、構造多様性という観点から比較した場合、両者は類似しているといえるだろう。また、両者のスフィンゴ糖脂質が細胞の生育に必須ではないことや細胞膜マイクロドメインと呼ばれる微小領域の構成成分であることなど、機能の上でも類似点が幾つか存在する。これらの事実を総合すると、酵母と哺乳動物細胞のスフィンゴ糖脂質の本質的な意義は保存されていると考えられる。本研究では、酵母における新規 MIPC 合成酵素 (Csh1p) を同定し、その活性調節機構の一端を明らかにした。さらに哺乳動物細胞において、ラクトシルセラミド (LacCer) にシアル酸を転移し、GM3 を合成する酵素 (SAT-I) の糖鎖による活性調節機構と肺癌細胞における GM3 の生理機能を明らかにした。

1. 出芽酵母におけるスフィンゴ糖脂質合成酵素の活性調節機構

1-1. 出芽酵母における新規スフィンゴ糖脂質合成酵素の同定

酵母の *Saccharomyces cerevisiae* にはスフィンゴ糖脂質として myo-inositol を含む mannosylinositol phosphorylceramide (MIPC) と mannosyldiinositol phosphorylceramide (M(IP)₂C) の 2 種類が存在する。多種多様なスフィンゴ糖脂質の機能の本質を理解するために、より単純で、なおかつ遺伝学的な解析が容易な酵母を用いることは有用であると考えた。今回はその足掛かりとして、スフィンゴ糖脂質合成の最初のステップである MIPC 合成を触媒する酵素に着目し、新規 MIPC 合成酵素を同定した。これまでに MIPC 合成に関与するタンパク質としては Csg1/Sur1p と Csg2p が知られていた。Csg1p には Och1p や Hoc1p などの α -1, 6 マンノース転移酵素と相同性の高い配列があるが、Csg2p にはそのような配列は無い。また、Csg2p は EF-Ca²⁺-結合ドメインを持っており、細胞内 Ca²⁺ ホメオスタシスに関与することが知られている。そこで、我々は Csg1p が酵素本体であり、Csg2p が調節サブユニットである可能性を考え、 Δ csg1 の MIPC 合成活性を [³H]-DHS でラベルすることにより調べた。その結果、 Δ csg1 においても MIPC 合成活性は十分に残っており、Csg1p とは異なる MIPC 合成酵素が存在する可能性が示唆された。そこで、Csg1p と非常に高い相同性を持つ YBR161w (*CSG1/SUR1* homolog L, *CSH1*) の遺伝子産物が MIPC 合成に関与するかを [³H]-DHS ラベルで調べた。その結果、 Δ csh1 の MIPC 合成は野生株と大きな差はないが、 Δ csg1 Δ csh1 で完全に MIPC 合成が消失した。以上の結果より Csh1p が新規の MIPC 合成酵素である可能性が示唆された。また、Csh1p は Csg1p と比較して IPC-C と IPC-B に対する反応性が低く、両者で基質特異性が異なることを明らかにしている。

1-2. Csg2p による活性調節

Csg2p は α -1, 6 マンノース転移酵素と相同性の高い配列を持っていないが、 Δ csg2 において MIPC 合成が著しく減少することが報告されている。このことは Csg2p が MIPC 合成に調節因子として機能している可能性を示唆している。そ

ここで Csg2p が Csg1p や Csh1p と複合体を形成している可能性を Ni-NTA カラムを用いた pull-down アッセイにより検討した。その結果、Csg2p-3xHA は Csg1p-His₆-Myc や Csh1p-His₆-Myc を共発現させることで Ni-NTA カラムに結合し、Csg2p が Csg1p や Csh1p と複合体を形成することが明らかとなった。次に Csg2p の変異が Csg1p や Csh1p の MIPC 合成に与える影響を [³H]-DHS ラベルにより調べた。その結果、Csg2p の変異により Csh1p の MIPC 合成活性は完全に消失するのに対し、Csg1p の MIPC 合成活性は若干残っていた。つまり、Csh1p にとって Csg2p が MIPC 合成に必須であることを示している。以上の結果より、Csg2p が Csg1p と Csh1p のそれぞれと結合し、調節サブユニットとして機能していることが示唆された。

2. 糖鎖による GM3 合成酵素 (SAT-I) の活性調節機構

2-1. マウス GM3 合成酵素 (mSAT-I) におけるアスパラギン型糖鎖の意義

SAT-I はヒト、マウス、ラット、ゼブラフィッシュでクローニングが完了しており、多くの糖転移酵素と同じように、SAT-I には糖鎖付加部位と予想される配列 (NXS/T) が存在した。しかしながら、SAT-I の糖鎖付加部位は 1 カ所を除いて、種間で保存されておらず、このことが何を意味するかは不明であった。そこで、まず初めに mSAT-I における糖鎖の意義を検討した。CHO 細胞に mSAT-I を一過性に発現させ、SAT-I の C 末端を抗原として作成した抗 SAT-I 抗体で検出することで、SAT-I に複合型糖鎖が付加していることを明らかにした。次に CHO 細胞に mSAT-I を一過性に発現させる際、Tunicamycin、Castanospermine、Kifunesine で処理し、SAT-I の酵素活性を *in vitro* で測定した。その結果、Tunicamycin で処理した場合のみ SAT-I 活性が著しく減少した。この結果はハイマンノース型糖鎖の付加が SAT-I の活性に必須であることを示している。mSAT-I には 3 カ所 (¹⁸⁰N、²²⁴N、³³⁴N) に糖鎖付加部位と予想される配列がある。そこで、これらの N を Q に置換した変異体 (N180Q、N224Q、N334Q、N180, 224, 336Q) を作成し、SAT-I 活性を測定した。その結果、すべての変異体で著しく SAT-I 活性が低下し、3 カ所すべての糖鎖が SAT-I 活性に重要であることが示唆された。

2-1. 糖鎖代替アミノ酸置換法

mSAT-I の活性には 3 カ所全ての糖鎖が重要であるにも関わらず、種間で糖鎖付加部位が保存されていないことから、糖鎖の付加されないアミノ酸配列が糖鎖の機能を代替している可能性が示唆された。そこで、mSAT-I の ²²⁴N を K に、³³⁶T を Q に置換した変異体を作成し、SAT-I 活性を測定した。その結果、N224K、T336Q 変異体の活性は野生型と同等またはそれ以上の活性を保持していた。この結果はある特定のアミノ酸配列が糖鎖の代替を可能にすることを示唆している。次に全ての種間で保存されている ¹⁸⁰N の糖鎖代替アミノ酸置換について検討した。¹⁸⁰N はシアル酸転移酵素に保存された配列であるシアルモチーフ L の中にあり、SAT-I と近縁のシアル酸転移酵素と配列を比較すると、mSAT-I の糖鎖付加部位である ¹⁸⁰N は S であった。また、ヒトとマウスにおける SAT-I の ¹⁷⁸H は、ゼブラフィッシュの SAT-I を含む他のシアル酸転移酵素では D であった。そこで mSAT-I の N180S、H177D-N180S 変異体を作成し、SAT-I 活性を測定した。その結果、N180S 変異体で野生型の約 50%、H177D-N180S 変異体で野生型と同等の活性を有していた。以上の結果より、mSAT-I における ¹⁸⁰N に付加する糖鎖も *in vitro* での SAT-I 活性を維持することができるアミノ酸置換が明らかとなった。

3. 肺癌細胞における GM3 の機能解析

SAT-I が作り出す GM3 の生理機能を明らかにするために、GM3 が欠損している 3LL ルイス肺癌細胞のサブクローン (J5) に SAT-I 遺伝子を導入し、GM3 再構成細胞 (J5/SAT-I) を構築した。J5/SAT-I は Mock と比較し、通常培養条件下での増殖能に大きな差は見られないが、造腫瘍能、軟寒地培地上でのコロニー形成能、血清飢餓条件下での増殖が亢進していた。これらの結果は、肺癌細胞において GM3 が癌の悪性度の亢進に関与していることを示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査	助教授	井ノ口 仁 一
副 査	教 授	五十嵐 靖 之
副 査	教 授	有 賀 寛 芳
副 査	助教授	松 本 健 一

学 位 論 文 題 名

スフィンゴ糖脂質合成酵素の活性調節機構と その生理機能に関する研究

上村聡志君は酵母と哺乳類におけるスフィンゴ糖脂質合成酵素の活性調節機構と生理機能に関して、下記に要約される研究を行った。

1. 酵母における新規 MIPC 合成酵素の同定とその活性調節機構

既知の MIPC 合成酵素 (Csg1p) のホモロジー検索により、新規 MIPC 合成酵素 (Csh1p) を明らかにし、Csg1p と Csh1p で基質特異性が異なることを証明した。また、Csg2p が Csg1p と Csh1p のそれぞれと複合体を形成し、特に Csh1p は Csg2p の有無により、自身の分解経路が変化することを明らかにした。さらに Csg1p と Csh1p のゴルジ体での局在が異なることを示唆した。以上のように MIPC 合成酵素は酵母独自の酵素であり、哺乳類で保存されていないが、ゴルジ体に局在する脂質-糖転移酵素としての本質的な活性調節機構が哺乳類と似通っている可能性が考えられる。本研究は、2003 年 J. Biol. Chem. に発表されている。今後、こうした酵母での解析が哺乳類における脂質-糖転移酵素の理解を深めると考えられ、評価に値する。

2. GM3 合成酵素 (SAT-I) におけるアスパラギン結合型糖鎖の意義と糖鎖代替え置換法の検討

GM3 合成酵素 (SAT-I) にアスパラギン結合型糖鎖が付加することを見出し、その糖鎖が酵素活性に必須であることを明らかにした。さらに、その糖鎖機能を代替えしうるアミノ酸置換を SAT-I の種間及び近縁のシアル酸転移酵素のアミノ酸配列を比較することで見出し、実際にそのアミノ酸置換が有効であることを証明した。この糖鎖

アミノ酸置換代替え法は独創的かつ応用が多岐にわたることから非常に評価できる。

3. 肺癌細胞における GM3 の機能解析

肺癌細胞の GM3 欠損細胞に SAT-I 遺伝子を導入し、GM3 を再構成させた細胞を構築し、その細胞を解析することにより、GM3 が癌細胞の悪性度を亢進させることを明らかにした (Glycobiology 2003)。GM3 発現によって PDGF α 型受容体の発現が遺伝子レベルで低下し、その結果、PDGF 刺激によって分解される PKC δ の発現が上昇する。またそれとは別経路で Bcl-2 の発現が上昇する。つまり PKC δ と Bcl-2 の発現上昇が癌の悪性度を亢進させていると考えられる。これらの成果は特に肺癌細胞における GM3 の生理的意義を示しており、非常に興味深い。

上述の3つの研究についての研究成果および、First author 2編を含む原著論文5編と総説2編の業績は、本学の薬学博士号を授与するに値すると判断される。