

学 位 論 文 題 名

Functional Study of the Pleckstrin Homology
Domain of Ceramide Kinase

(セラミドキナーゼの PH ドメインの機能解析)

学位論文内容の要旨

Sphingolipids are now recognized as bioactive molecules that regulate a number of signaling pathways involved in controlling cell development, differentiation, activation and proliferation. One sphingolipid metabolite recently proposed to be a signaling lipid, ceramide 1-phosphate (C1P), is generated from ceramide (Cer) by the action of ceramide kinase (CERK). In fact, signaling roles have been examined for both C1P and CERK by several groups, including my laboratory. C1P has been reported to have mitogenic effects and to mediate arachidonic acid release in response to interleukin-1 β and a calcium ionophore. Additionally, C1P was shown to induce the translocation of cytosolic phospholipase A2 α (cPLA2 α) to the Golgi apparatus and to directly interact with cPLA2 α *in vitro*. CERK was found to be involved in phagolysosome formation in polymorphonuclear leukocytes and in liposome fusion. More recently, my laboratory reported that CERK is a mediator of calcium-dependent degranulation in mast cells. CERK was originally cloned by its sequence homology to sphingosine kinase (SPHK). The N-terminus of the CERK protein encompasses a sequence motif known as a pleckstrin homology (PH) domain, which is conserved only in CERK and not found in the SPHKs. However, little is known regarding the functional roles of this domain in CERK.

In this study, I have demonstrated that the PH domain of CERK is essential for its subcellular localization and for its enzyme activity. The deletion mutant of the PH domain

significantly reduced the ability of CERK to localize in the plasma membrane. *In vitro* lipids binding assays revealed that the PH domain of CERK shown high affinity for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate PI(4,5)P₂. Additionally, CERK containing the intact PH domain was translocated with the plasma membrane, and the C1P formation was increased in response to hyperosmotic stress. However, the deletion of the PH domain failed. Using site-directed mutagenesis, I have further determined that Leu10 in the PH domain has an important role in CERK activity. Replacing this residue with a neutral alanine or isoleucine, caused a dramatic decrease in CERK activity to 1% and 29%, respectively, compared to CERK, but had no effect on substrate affinity. Therefore, my study presented here suggests that the PH domain of CERK is not only indispensable for its activity, but might also act as an allosteric regulator of CERK. Furthermore, my study provides evidence for the novel insight that the PH domain of CERK is crucial for the plasma membrane localization of the enzymes and its phosphorylating activity.

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	五十嵐 靖 之
副 査	教 授	松 田 正
副 査	助教授	井ノ口 仁 一
副 査	助教授	高 橋 和 彦

学 位 論 文 題 名

Functional Study of the Pleckstrin Homology Domain of Ceramide Kinase

(セラミドキナーゼの PH ドメインの機能解析)

スフィンゴ脂質の細胞内外で働くシグナル伝達などにおける多彩な役割が近年明らかになってきた。そのなかでもスフィンゴシンキナーゼによって作られる代謝産物であるスフィンゴシン 1-リン酸はその受容体が最近明らかにされたこともあり、医薬への応用開発を含めて注目されている。最近、このスフィンゴシンキナーゼとホモロジーを持つ脂質キナーゼの一つであるセラミドキナーゼがクローニングされた。そしてセラミドキナーゼとその産物であるセラミド 1-リン酸 (C1P) は肥満細胞の抗原刺激による脱顆粒反応の活性化にとって極めて重要であることが本研究室の研究で明らかにされた。しかし現在までセラミドキナーゼの活性化機構や細胞内局在移行機構は全く不明であった。セラミドキナーゼは他の脂質キナーゼであるスフィンゴシンキナーゼともホモロジーの高い C1-C5 共通ドメインを持っており、その部位で ATP や基質との結合および触媒作用を行っていると考えられている。ただセラミドキナーゼはスフィンゴシンキナーゼに比して長い N 末端配列を有しており、その一部にはいわゆる Pleckstrin Homology (PH) ドメインが含まれる。申請者はこのセラミドキナーゼに特異的に存在する PH ドメインの、酵素の活性制御や局在性の変化における役割の解明を目指し、以下のような結果を得た。

まず第一に、セラミドキナーゼの PH ドメイン欠損変異体を作製することによって申請者はこのドメインが酵素が細胞膜に移動するために必須であることを見いだした。更に *in vitro* の結合実験からセラミドキナーゼは幾種類かのイノシトールリン脂質と結合するが、とりわけ PI(4,5)P₂ との結合が最強であることを見いだした。更に細胞を高浸透圧刺激すると細胞膜の PI(4,5)P₂ 含量が増えることが知られているが、この刺激に伴って PH ドメインを持った正常のセラミドキナーゼは細胞膜に移行するが、PH 欠損体では膜移行が見られず細胞質にとどま

ることを明らかにした。この結果は *in vitro* の結合実験の結果と合わせて、*in vivo* 即ち細胞内でもセラミドキナーゼはその PH ドメインを介して細胞膜に存在する PI(4,5)P₂ と結合することによって膜移行することが初めて実験的に示された。これまで知られている PH ドメイン含有タンパクでは PH ドメインはその活性化に影響を与えることが知られており、そこで申請者は、PI(4,5)P₂ と PH ドメインの酵素活性に及ぼす影響を調べたが、酵素活性そのものは変化せず、従って、この結合はセラミドキナーゼの細胞内移行、即ち膜結合にたいして重要な役割を果たしていることが確定された。この事実はセラミドキナーゼとその産物である C1P が、肥満細胞の顆粒放出を促進すること、すなわち、細胞膜と顆粒膜の fusion に関わっていることを考えると極めて意義深い結果であると言える。

第2に、申請者はセラミドキナーゼの活性には N 末端の PH ドメインに隣接した位置にある N 末から 10 番目のアミノ酸残基が極めて重要な役割を果たしていることを、種々の site-directed 欠損変異体を導入し、それらの酵素活性を調べることによって明らかにした。即ちこの実験において、10 番目のロイシン (Leu10) をアラニンやイソロイシンに返還しただけで活性をほとんど失ったり、半分に減らすことを見いだした。この原因を申請者は基質との結合親和性の減少である可能性を考え調べたが、親和性そのものは影響を受けないことが示され、むしろタンパク質の高次構造への影響が強く示唆された。しかしこの詳細な検討には X 線解析など構造生物学的解析が不可欠であり、申請者はそのため本タンパク質の大量発現系の構築に取り組んでいる。

結論として申請者は、不明であったセラミドキナーゼの PH ドメインの役割について研究し、PH ドメインが細胞膜の PI(4,5)P₂ との結合を介して、細胞膜 fusion のおこる細胞膜に移行し、そこで C1P を局所的に産生すること、またこの PH ドメインに隣接した 10 番目のロイシン残基が、酵素の活性にとって極めて重要な構造的な役割を果たしていることを明らかにした。肥満細胞の脱顆粒は生体のアレルギー反応に関わっており、その制御は抗アレルギー薬の開発などにとって極めて重要であり、本酵素の PH ドメインやその近縁部の一つのアミノ酸の制御的役割を明らかにした今回の申請者の研究は、そうした可能性を多いに開くものである。よって、申請者は博士（薬学）の学位を受領するに十分な脂質を有するものであることを認めた。