

学位論文題名

飢餓への細胞応答におけるスフィンゴ脂質の機能解析

学位論文内容の要旨

【序論】

細胞は、十分な栄養が存在しない飢餓条件でも生き延びるために様々な細胞応答を行っており、細胞内膜輸送の変化もそのひとつである。例えば、小胞体やゴルジ体に存在するタンパク質、細胞膜に局在するアミノ酸透過酵素などのタンパク質は分解の場である液胞へと輸送され、分解される。また、自己の細胞質成分を新生の膜構造（オートファゴソーム）で取り囲んで大規模に分解することにより栄養源のリサイクルを行うオートファジーも誘導される。このような膜動態の変化に関しては、これまで主にタンパク質に焦点をおいた研究が行われてきたが、膜の構成成分である脂質に着目した研究はあまり進んでいなかった。そこで、本研究では生体膜を構成する脂質のうち特にスフィンゴ脂質に注目し、酵母をモデル生物として用いてスフィンゴ脂質と飢餓応答との関わりを明らかにしようと試みた。

スフィンゴ脂質は単なる膜の構成成分であるだけでなく、細胞レベルでは膜輸送、シグナル伝達など、組織レベルでは皮膚バリア機能や神経系、免疫系における機能など様々な生体機能に関与している。しかし、飢餓応答への関与についての報告はこれまでほとんどなかった。スフィンゴ脂質は長鎖塩基と脂肪酸からなるセラミドを基本骨格としている。セラミドの1位水酸基に様々な極性基が結合し、複合スフィンゴ脂質を形成する。酵母における複合スフィンゴ脂質は IPC、MIPC、M(IP)₂C のみであり、その合成はそれぞれ Aur1、Csg1/ Csh1、Ipt1 が担っている。一方、セラミド骨格には、その長鎖塩基、脂肪酸が水酸化されることによるサブタイプが存在し、長鎖塩基側の水酸化は Sur2、脂肪酸側の水酸化は Scs7 によって行われる。

本研究では、スフィンゴ脂質合成に関わる因子を段階ごとに停止させた酵母を用いて飢餓応答におけるスフィンゴ脂質の機能を明らかにしようと試みた。

【結果および考察】

IPC の正常な合成は窒素炭素飢餓におけるオートファジーの進行に必要である

飢餓応答の一つであるオートファジーへのスフィンゴ脂質の関わりを明らかにするため、スフィンゴ脂質合成を様々な段階で停止させた酵母を窒素源と炭素源の両方を除いた窒素炭素飢餓に曝したときのオートファジーの進行をモニターした。その結果、IPC の合成を特異的阻害剤により阻害したところ、オートファジーの進行が顕著に抑制された。このオートファジーの低下は、スフィンゴ脂質の *de novo* 合成の初発段階の阻害によっても引き起こされたことから、複合スフィンゴ脂質がオートファジーの進行に関与することが明らかとなった。しかし、MIPC や M(IP)₂C の合成停止ではオートファジーの低下は起こらなかったことから、複合スフィンゴ脂質の中でも IPC の正常な合成がオートファジーの進行に重要であることが示唆された。また、IPC がオートファジーのどの素過程に関与するのかを検討した。その結果、IPC の合成が不全となると、オートファゴソームの大きさや数が減少した。このことから、IPC は膜構造の形成に直接働いている

可能性が示唆された。

MIPCの合成が停止した酵母は、窒素飢餓条件で迅速に死滅する

オートファジーは、窒素炭素飢餓以外にも窒素源のみが枯渇した窒素飢餓でも強く誘導される。そのため、窒素飢餓におけるオートファジーの誘導についてもスフィンゴ脂質の関与を検討した。MIPCの合成を停止させた酵母 (*csg1Δ csh1Δ*株) を窒素飢餓に曝したところ、迅速に死滅することが明らかとなった。一方、炭素源のみが枯渇した炭素飢餓や窒素炭素飢餓では死は見られなかった。この細胞の死滅はスフィンゴ脂質の *de novo* 合成の初発段階を阻害すると改善されたことから、MIPCの合成不全ではなく、IPCの蓄積が細胞の死を引き起こすことが明らかとなった。また、セラミド骨格の長鎖塩基側を水酸化する *SUR2* 遺伝子を *csg1Δ csh1Δ*株でさらに欠損させると、生存率の改善が見られた。このことから、長鎖塩基が水酸化された IPC が特に窒素飢餓条件下での細胞の死に重要であることが示唆された。

*csg1Δ csh1Δ*株は、培地中の Ca^{2+} に対して高感受性であることが知られており、*SUR2* をさらに欠損させるとその Ca^{2+} 感受性が抑圧されることが報告されている。本研究による結果との共通点から、*csg1Δ csh1Δ*株の窒素飢餓での死にも Ca^{2+} が関与している可能性が考えられた。そこで、 Ca^{2+} のキレート剤である EGTA を窒素飢餓培地に添加し、培地中の Ca^{2+} (約 1 mM) を除いたところ、EGTA の濃度依存的に *csg1Δ csh1Δ*株の生存率が改善した。しかし、生存率の改善には培地の Ca^{2+} をキレートするのに必要な濃度よりもかなり高濃度の EGTA が必要であったことから、EGTA が細胞内の Ca^{2+} をキレートしたことにより生存率が改善したと考えられた。そこで、 Ca^{2+} を除いた富栄養培地および窒素飢餓培地を用いて、細胞内の Ca^{2+} が死に関与しているのか調べた。その結果、飢餓をかける前から細胞内に蓄積している Ca^{2+} が窒素飢餓条件での細胞の死に関与することが示唆された。

酵母の細胞内で Ca^{2+} を最も豊富に蓄積しているのは液胞であることから、次に液胞と細胞の死との関わりを調べた。液胞の膜を染色する FM4-64 を用いて窒素飢餓条件での液胞の形態を観察したところ、*csg1Δ csh1Δ*株を窒素飢餓に曝すと死滅した細胞では液胞膜のシグナルが見られなくなった。このことから、細胞の死に際して液胞が崩壊している可能性が考えられた。そこで、液胞内などの酸性の環境で蛍光を発する DCFDA で液胞内腔を染色し、連続観察した結果、生きている細胞では液胞内腔から蛍光を観察することができたが、細胞が死ぬ際に蛍光が細胞内全体に広がり、細胞全体が酸性化されていく様子が観察された。また、細胞内に広がった DCFDA の蛍光は、しばらく細胞内に保持されていたことから、液胞の崩壊が死の引き金であり、細胞膜の破綻はその後で起こっていることが強く示唆された。

以上の結果より、MIPC 合成不全株を窒素飢餓に曝すと、長鎖塩基側が水酸化された IPC が液胞に蓄積し、これが液胞内の Ca^{2+} と結合することにより液胞膜が不安定化し、結果的に液胞膜が崩壊することで細胞が死に至ったと考えられる。

今回の研究から、スフィンゴ脂質の正常な合成が窒素炭素飢餓条件におけるオートファジーの進行、また、窒素飢餓条件における細胞の生存に非常に重要であることを示した。これは、スフィンゴ脂質が栄養飢餓への応答に関与することを初めて示したものであり、スフィンゴ脂質の新たな生理機能の発見ともいえるものである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	木原章雄
副査	教授	有賀寛芳
副査	講師	佐々貴之
副査	講師	米田宏

学位論文題名

飢餓への細胞応答におけるスフィンゴ脂質の機能解析

スフィンゴ脂質は真核生物に保存された脂質分子であり、哺乳類では細胞接着、皮膚バリア機能、免疫機能、神経機能、糖代謝、ウイルス/病原菌毒素の侵入など多彩な役割を担っている。このように個体・組織レベルでの生理的及び病態における役割に関しては様々な知見が得られている。しかし、細胞レベルでどのような機能があり、それがどのように個体・組織レベルでの役割に結びついているかは不明な点が多い。スフィンゴ脂質を合成することができない変異体はこれまで調べられたどの生物においても致死となることから、他の脂質では代替できない特異的な機能があることは明らかである。スフィンゴ脂質は他の脂質分子であるグリセロリン脂質に比べて量はかなり少ないため、量的な観点から生体膜を構成するために必要であるとは思えず、むしろ、質的な重要性を持つと考えられる。

本論文では、最も単純な真核生物である酵母をモデル生物として用いて、細胞レベルでのスフィンゴ脂質の役割、特に生物の生存には欠かすことができない飢餓応答での役割を明らかにしている。本論文は大きく2つの内容に分けることができる。1つ目は窒素炭素飢餓応答における複合スフィンゴ脂質 IPC の重要性を明らかにしたものであり、2つ目は窒素飢餓においては IPC の蓄積が逆に迅速な細胞死を引き起こすことを明らかにし、そのメカニズムを解析したものである。

細胞は飢餓状態に陥ると栄養源を確保するためにオートファジーという細胞応答を引き起こして、自身のタンパク質成分をリソソーム/液胞でアミノ酸にまで分解する。オートファジーに関する研究は特に酵母を用いてこの20年間に飛躍的に進展し、オートファジーに関与する30以上のタンパク質因子が同定されている。オートファジーでは、オートファゴソームと言われる脂質二重膜構造が自身の細胞成分を取り囲んだ後、リソソーム/液胞と融合することで進行する。このようにオートファジーではオートファゴソームという膜構造体が中心的な役割を担うが、この膜構造体を形成する脂質分子に関する知見は殆どない。また、スフィンゴ脂質のオートファジーに関する役割に関しても殆ど不明である。本論文では、スフィンゴ脂質の合成を薬剤によって阻害するとオートファジーの進行が大きく低下することを見いだした。この際、オートファゴソームの形成自体が減少していたが、僅かながらに形成されたオートファジーも大きさが低下していた。また、オートファジー進行に必須ないくつかの素過程を調べたところ、Atg5-Atg12 結合体形成、Atg8-PE 結合体形成、PAS (オートファゴソーム形成の足場) 形成共に正常であった。このことから、スフィンゴ脂質の合成はオートファゴソーム形成の初期段階ではなく、膜の伸長などの後期過程に必要であることが示唆された。さらに、著者はスフィンゴ脂質のうち、どの分子種がオートファジーに重要であるかを明らかにしている。酵母の複合スフィンゴ脂質は疎水性骨格であるセラミドにホスホイノシトールが付加した IPC、さらにマンノースが付加した MIPC、もう一分子のホスホイノシトールが

付加した M(IP)₂C により構成される。それぞれの複合スフィンゴ脂質が産生されない欠損株あるいは薬剤を用いた実験により、最も単純な複合脂質である IPC の合成まで行われていればオートファジーは正常に起こることを見いだした。

上記は窒素炭素飢餓におけるスフィンゴ脂質の役割を明らかにしたものであるが、この研究過程で、窒素飢餓（つまり炭素源存在下）条件下では MIPC 合成不全株が迅速な細胞死を引き起こすという現象を見いだした。この細胞死は、細胞内の栄養源が枯渇したために起こったためではなく、何らかの細胞応答の過程に異常が生じたものと考えられた。その後の詳細な解析の結果、この細胞死は MIPC が合成できないことが原因ではなく、MIPC の前駆体である IPC（特に水酸基を持った IPC）が蓄積することが原因であることが明らかとなった。また、この細胞死には液胞のカルシウムが深く関与しており、細胞死の際には液胞が破裂する様子が観察された。これらのことから、下記のようなスフィンゴ脂質の動態と細胞死に関するモデルを提唱するに至った。窒素飢餓時において細胞は窒素源を生み出すために膜動態の変化などを引き起こし、細胞膜に存在するスフィンゴ脂質もエンドサイトーシスによって液胞に運ばれる。スフィンゴ脂質の長鎖塩基部分にはアミノ基が存在するため、窒素源としてリサイクルしようとする細胞応答である可能性がある。IPC はマンノース残基を欠いているためホスホイノシトールが露出しており、そのリン酸基部分で液胞に多く含まれるカルシウムとキレートする。液胞に運ばれた IPC にカルシウムが結合することによって IPC を多く含む領域（脂質ドメイン）の二重層構造が不安定化し、破裂する。このように本来あるべきマンノース残基を欠いているため細胞死が引き起こされた訳だが、逆に言うと正常なスフィンゴ脂質合成が窒素飢餓条件下で生存するためには必要なことが明らかとなった。

本論文はこれまで不明であったスフィンゴ脂質のオートファジー、飢餓応答における役割を初めて明らかにしたという点で重要である。また、本論文の重要性は飢餓状態という限られた条件下での役割の解明に留まらず、そもそもスフィンゴ脂質の細胞レベルでの役割に関してまだまだ不明な点が多かった現状で細胞／分子レベルでの役割を解明したという点においても価値が高い。以上のことから、著者は北海道大学博士（薬科学）の学位を受領するに十分な資質を有するものであることを認める。