

スフィンゴ脂質発現制御研究チーム

Sphingolipid Expression Laboratory

チームリーダー 鈴木明身
SUZUKI, Akemi

生体膜に存在し、情報認識・伝達にかかわる生体超分子構造をミクロドメインと呼ぶことができる。ミクロドメインはスフィンゴ脂質、コレステロール、膜タンパク質によって構成される。スフィンゴ脂質の一種であるスフィンゴ糖脂質もミクロドメインを形成する膜物質である。当研究チームでは、スフィンゴ脂質、スフィンゴ糖脂質の発現制御の機序を解析するとともに、スフィンゴ糖脂質のミクロドメイン形成、機能への関与を解析し、発現制御の機序とこれら機能発現との関係を明らかにする。

1. 水酸化によるスフィンゴ脂質、スフィンゴ糖脂質修飾の生物学的意味の解析(榎本, 尾前)

シアル酸は N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) の誘導体に対して与えられたファミリー名であるが、シアル酸の一種 N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) はヒトでは発現しないことが知られている。シアル酸はスフィンゴ糖脂質、糖タンパク質糖鎖の重要な構成単糖であり、この単糖の発現欠損はヒトの進化の過程で、重要な意味を持つ可能性がある。ヒトでの欠損の原因は NeuGc 生合成の律速を形成する CMP-NeuAc 水酸化酵素遺伝子に発見された 92 塩基の欠損にある。シアル酸は神経系で多量に発現しており、スフィンゴ糖脂質、糖タンパク質ともに NeuGc ではなく NeuAc が使われている。興味深いことに、NeuGc を発現できる哺乳動物のマウスでも、神経組織では CMP-NeuAc 水酸化酵素 mRNA は検出できない。このことから、神経系で特異的な発現抑制の起きている可能性が考えられる。しかもこの抑制は遺伝子産物が既に不活性化されているヒトでも保存されている。神経系での抑制機構を解析する目的で、CMP-NeuAc 水酸化酵素遺伝子の転写制御を解析している。マウス CMP-NeuAc 水酸化酵素遺伝子をクローニングし、全長 13 kb、水酸化酵素遺伝子 5' 上流域 6.5 kb を含むクローンを得、塩基配列を決定した。イントロン 1 は 3 kb の長さがある。ルシフェラーゼを使ったレポーターアッセイのための DNA を準備している。遺伝子導入細胞の候補として L929, Neuro2a 細胞を選択し、それぞれの細胞の持つ NeuAc と NeuGc を定量した。

膜ドメインを形成するスフィンゴ脂質の中で、親水性部分と疎水性部分の中間に、水酸基を 1 個多く持つスフィンゴ脂質分子が存在し、この分子は膜輸送の活発な微絨毛膜に特徴的に存在する。この水酸化を行う酵素スフィンゴシン 4-水酸化酵素の生化学、分子生物学的解析を行っている。

2. 組織特異的スフィンゴ脂質の発現制御とその生物学的重要性の解析(吉岡, 尾前)

Gsl5 遺伝子はマウス腎臓のスフィンゴ糖脂質の発現を制御する遺伝子として同定された。本遺伝子は N-アセチルグ

ルコサミン (GlcNAc) を β 1-6 結合で転移する糖転移酵素活性を腎臓特異的に制御しているが、その実体と制御のメカニズムは不明である。本酵素の腎臓特異的発現は、近位尿管上皮細胞に限局している。さらに、スフィンゴ糖脂質のみならず、糖タンパク質糖鎖の発現も制御していることが明らかになっている。本酵素によって骨格が作られる糖鎖 ($\text{Gal}\beta$ 1-4($\text{Fuc}\alpha$ 1-3) $\text{GlcNAc}\beta$ 1-6($\text{Gal}\beta$ 1-3) GalNAc) に対する抗体を用いてウェスタン解析を行うと、分子量 600 kDa の糖タンパク質がマイクロソーム画分に検出され、免疫組織化学で腎臓近位尿管上皮細胞の微絨毛膜直下に存在する小胞が染色された。本糖タンパク質の本体について、分子量、局在性から推定するとメガリンと呼ばれる LDL レセプター関連タンパク質ファミリーに属する分子である可能性が考えられた。そこで、マウス・メガリンのアミノ酸配列中にある 17 アミノ酸からなるペプチドを抗原とし、抗体を作成した。ウェスタン解析を行って、600 kDa 糖タンパク質はメガリンであることを確認した。今後メガリンの機能をメガリン上の糖鎖が修飾可能か、メガリンの局在する小胞の膜を構成しているスフィンゴ脂質がメガリンの機能を修飾しうるかどうか、超分子形成の観点から解析する。

Ggm1 遺伝子はスフィンゴ糖脂質である GM1 ($\text{Gal}\beta$ 1-3 $\text{GalNAc}\beta$ 1-4($\text{NeuAc}\alpha$ 2-3) $\text{Gal}\beta$ 1-4 $\text{Glc}\beta$ 1-Ceramide) の発現をマウス肝臓特異的に制御している。*Ggm1* 遺伝子座は第 17 染色体上の *H-2K* から 1 cM の距離にあることが判明している。*Ggm1* 遺伝子は GM1 生合成の最終段階に関わる糖転移酵素の β 1-3 ガラクトース転移酵素 (β 3GalT) の活性発現を制御している可能性が考えられる。 β 3GalT 遺伝子はゲノムプロジェクトで既に配列が解析され、*H2-K* 遺伝子の 5' 側 50 kb の位置にあることが報告されている。1 cM という生物学的染色体上の距離は少なくとも 10000 kb 程度の距離であることが考えられ、この違いは β 3GalT 遺伝子とその肝臓特異的発現制御遺伝子とが大きな距離を隔てて存在している可能性を示唆している。*Ggm1* 遺伝子に欠損のあるマウスは肝臓機能に障害があるとは考えられず、肝臓に必須の機能分子は正常に作られていることが予測されることから、肝臓特異的な転写制御因子が欠損する可能性は低く、転写制御因子の結合配列である可能性が考えられた。そこで、 β 1-3Gal 転移酵素遺伝子 5' 上流側の配列を解析したが、得られた配列には、*Ggm1*(-/-) 個体と *Ggm1*(+/+) 個体間で、表現型を説明できる差が存在しなかった。

3. 質量分析による構造解析法の検討(鈴木(實))

スフィンゴ脂質、スフィンゴ糖脂質、糖タンパク質の脂質あるいは糖鎖の構造解析、微量検出はそれら分子の機能を解析する上で不可欠である。HPLC および質量分析法を使った上記物質の微量構造解析法の開発、生体超分子複合体

を検出する質量分析法の開発を目指している。糖脂質, 糖タンパク質由来のオリゴ糖のピリジリアミノ誘導体を HPLC で分離後, MALDI-TOF 質量分析法で解析した。HPLC-蛍光検出および MALDI-TOF による分子イオン検出の感度は 20 fmol, PSD (post source decay) による糖配列情報取得の感度は 2 pmol であった。スフィンゴ脂質と膜タンパク質からなる超分子複合体の質量分析による検出を検討している。

4. その他の研究課題

表皮のスフィンゴ脂質の構造解析を行った。血清中糖タンパク質糖鎖の多型の解析をウェスタン法を用いて検討した。日韓ウィンターコースに来日した Kim 研修生と共同実験として抗ガン剤によるアポトーシス誘導時におけるセラミドの変化を解析した。

誌上発表 Publications

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Suzuki M. and Suzuki A.: "Structural characterization of fucose-containing oligosaccharides by high-performance liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry", *Biol. Chem.* **382**, 251-257 (2001). *

Nakamura K., Kojima H., Suzuki M., Suzuki A., and Tamai Y.: "Novel polysialogangliosides of skate brain: Structural determination of tetra-, penta-, and hexa-sialogangliosides with a NeuAc-GalNAc linkage", *Eur. J. Biochem.* **267**, 5198-5208 (2000). *

Sekine M., Taya C., Kikkawa Y., Yonekawa H., Takenaka M., Matsuoka Y., Imai E., Izawa M., Kannagi R., and Suzuki A.: "Regulation of mouse kidney tubular epithelial cell-specific expression of core 2 GlcNAc transferase", *Eur. J. Biochem.* **268**, 1129-1135 (2001). *

Uchida Y., Hara M., Nishio H., Sidransky E., Inoue S., Otsuka F., Suzuki A., Elias P. M., Holleran W. M., and Hamanaka S.: "Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides", *J. Lipid Res.* **41**, 2071-2082 (2000). *

Duvar S., Suzuki M., Muruganandam A., and Yu R. K.: "Glycosphingolipid composition of a new immortalized human cerebrovascular endothelial cell line", *J. Neurochem.* **75**, 1970-1976 (2000). *

(総説)

橋本康弘, 中村京子, 東秀好, 鈴木明身: "細胞膜表面糖鎖による細胞間コミュニケーション", *膜* **25**, 180-183 (2000).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Suzuki A.: "Tissue specific regulation of core 2 β 1-6GlcNAc transferase", Japan-The Netherlands 400 Years Symp. on Recent Advances in Glycobiology, Tokyo, Apr. (2000).

Hashimoto Y., Nakamura K., Yamaji T., Crocker P. R., and Suzuki A.: "A macrophage subpopulation in rat lymph nodes expresses high sialoadhesin activity", *Gor-*

don Research Conf. on Glycolipid and Sphingolipid Biology, Barga, Italy, May (2000).

Suzuki A.: "Kidney tubular cell specific regulation of β -1,6-GlcNAc transferase transcription", Gordon Research Conf. on Glycolipids and Sphingolipids, Barga, Italy, May (2000).

Suzuki A., Omae F., Enomoto A., Yoshioka S., Sekine M., Kikkawa Y., Taya C., Yonekawa H., Takenaka M., Matsuoka Y., Imai E., Izawa M., and Kannagi R.: "Tissue specific control of glyco-chains", 4th Meet. of Hirosaki Int. Forum of Science New Developments in Glycomedicine, Hirosaki, Oct. (2000).

Hashimoto Y., Nakamura K., Yamaji T., Crocker P. R., and Suzuki A.: "Identification of a novel subset of rat macrophages that expresses unmasked forms of sialoadhesin in a high level", Gordon Research Conf. on Glycobiology, Ventura, USA, Mar. (2001).

(国内会議)

大橋陽子, 八杉朋子, 笠間健嗣, 明石知子, 脊山洋右, 永井克孝: "メチル分枝スフィンゴイドの FAB CID-MS/MS: 飽和長鎖塩基の場合", 第 48 回質量分析総合討論会, 名古屋, 5 月 (2000).

橋本康弘, 中村京子, 東秀好, 鈴木明身: "細胞膜表面糖鎖による細胞間コミュニケーション", 日本膜学会第 22 年会, 東京, 5 月 (2000).

鈴木明身: "糖脂質糖鎖の発現制御", 第 42 回日本脂質生化学研究会シンポジウム, 北九州, 6 月 (2000).

尾前二三雄, 橋本康弘, 鈴木明身: " β 1-3 ガラクトース転移酵素遺伝子発現の解析", 第 21 回日本糖質学会年会, 名古屋, 7 月 (2000).

中村京子, 橋本康弘, 鈴木明身: "シアロアドヘジン高発現・マクロファージの存在", 第 21 回日本糖質学会年会, 名古屋, 7 月 (2000).

鈴木實, 鈴木明身: "長鎖アルキル基を有する逆相カラムを用いたピリジリアミノ化糖の HPLC 分析", 第 21 回日本糖質学会年会, 名古屋, 7 月 (2000).

鈴木明身, 関根美知子, 多屋長治, 米川博通, 神奈木玲児, 竹中優, 今井圓裕: "Gsl5 遺伝子による近位尿管管特異的糖鎖発現制御", 第 73 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2000).

関根美知子, 吉川欣亮, 高浜純代, 津田薫, 米川博通, 鈴木明身: "Gsl5 遺伝子座の野生マウス亜種における分布と DBA/2 アリルの起源", 第 73 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2000).

甘利真司, 米澤直人, 橋本康弘, 鈴木明身, 中野實: "ウシ卵子透明帯の精子結合部位", 第 73 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2000).

中村京子, 山地俊之, 橋本康弘, 鈴木明身: "ラット・マクロファージにおけるシアロアドヘジンの糖鎖結合活性", 第 73 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2000).

濱中すみ子, 大塚藤男, 原真理子, 西尾裕幸: "ヒトおよびマウス表皮のスフィンゴミエリンの構造決定", 日本皮膚科学会第 760 回東京地方会, 東京, 12 月 (2000).

Research Subjects and Members of Sphingolipid Expression Laboratory

1. Studies on Hydroxylations Modifying Sphingolipids and Glyco-Chains
2. Molecular Mechanisms of Tissue-Specific Regulation of Sphingolipid and Glycosphingolipid Expression
3. Development of New Methods for Structural Analysis of Sphingolipids, Glyco-Chains, and Supra-Molecular Complex
4. Other Subjects: Skin Sphingolipids, Polymorphic Difference of Serum Glyco-Chains, and Ceramide Induced by Apoptosis

Head

Dr. Akemi SUZUKI

Research Scientists

Dr. Minoru SUZUKI
Dr. Fumio OMAE
Dr. Sigemi YOSHIOKA

Technical Staffs

Ms. Ayako ENOMOTO

Visiting Members and Postdoctoral Fellows

Dr. Sumiko HAMANAKA (HH Clinic)
Ms. Mikiko ABE (Tokyo Bunka Coll. Med. Technol.)
Ms. Hae-Jon KIM (Chung-Ang Univ.)

Collaborators (Outside of RIKEN)

Dr. Reiji KANNAGI (Aichi Cancer Cen.)
Dr. Michiko SEKINE (Tokyo Metrop. Inst. Med. Sci.)
Dr. Choji TAYA (Tokyo Metrop. Inst. Med. Sci.)
Dr. Hiromichi YONEKAWA (Tokyo Metrop. Inst. Med. Sci.)