

氏 名	ソ ン 孫	イ ッ 一	テ キ 葯
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)		
学位記番号	薬 博 第 461 号		
学位授与の日付	平成 13 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻		
学位論文題目	Studies on the Sphingolipid-Mediated Signaling Pathway (スフィンゴ脂質シグナル伝達機構に関する研究)		
論文調査委員	(主 査) 教授 小 堤 保 則    教授 川 寄 敏 祐    教授 市 川 厚		

### 論 文 内 容 の 要 旨

スフィンゴ脂質はセラミドに種々の糖鎖や、ホスホコリンが結合したものであり、生体膜の主要な構成成分の一つである。近年の研究により、セラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン-1-リン酸といったスフィンゴ脂質は、細胞の接着、分化、増殖、アポトーシス等に重要な生理的機能を担っていることが明らかになってきた。しかしながらそれらの機構については未知な部分も多く残されており、全体像を把握するまでに至っていない。

スフィンゴ脂質シグナル伝達機構の解明にあたって重要な課題の一つとして、スフィンゴ脂質の直接の下流シグナルの解析、すなわちスフィンゴ脂質により活性化される分子(主にリン酸化酵素や脱リン酸化酵素であると考えられている)をクローニングすることがある。しかし、これらのシグナル伝達機構に関与する因子の殆どが明らかにされていない。このような背景から申請者は、もっとも単純な真核細胞である酵母をモデル生物として使用し、スフィンゴ脂質シグナル伝達機構に関与する遺伝子を単離し、更にその伝達機構に関する研究を行った。以下詳細を記す。

#### 第一章、スフィンゴ脂質減少による細胞死の解析

申請者はスフィンゴシン類似構造を有する免疫抑制剤 ISP-1 の作用機構を解析したところ、ISP-1 が酵母に対して、IL-2 依存性マウス細胞障害性 T 細胞株 CTLL-2 の場合と同様、スフィンゴ脂質生合成経路の最初のステップを媒触するセリンパルミトイルトランスフェラーゼ (SPT) を阻害することにより、細胞内のスフィンゴ脂質を減少させ、細胞死を誘導する事を明らかにした。酵母と哺乳動物細胞におけるスフィンゴ脂質生合成経路が非常に類似していることから、スフィンゴ脂質減少による細胞死を解析するにあたり酵母をモデルとして使用が可能であると考えた。

一方、種々のスフィンゴ脂質合成関連酵素の変異株を用いて検討したところ ISP-1 による酵母の細胞死に関わるのはセラミドやスフィンゴシン-1-リン酸などではなく、ジヒドロスフィンゴシンやファイトスフィンゴシンなどスフィンゴイド塩基であることが明らかにされた。

#### 第二章、スフィンゴ脂質シグナル伝達経路の解析

##### 第一節、酵母の細胞内スフィンゴ脂質シグナルに関与するキナーゼの同定

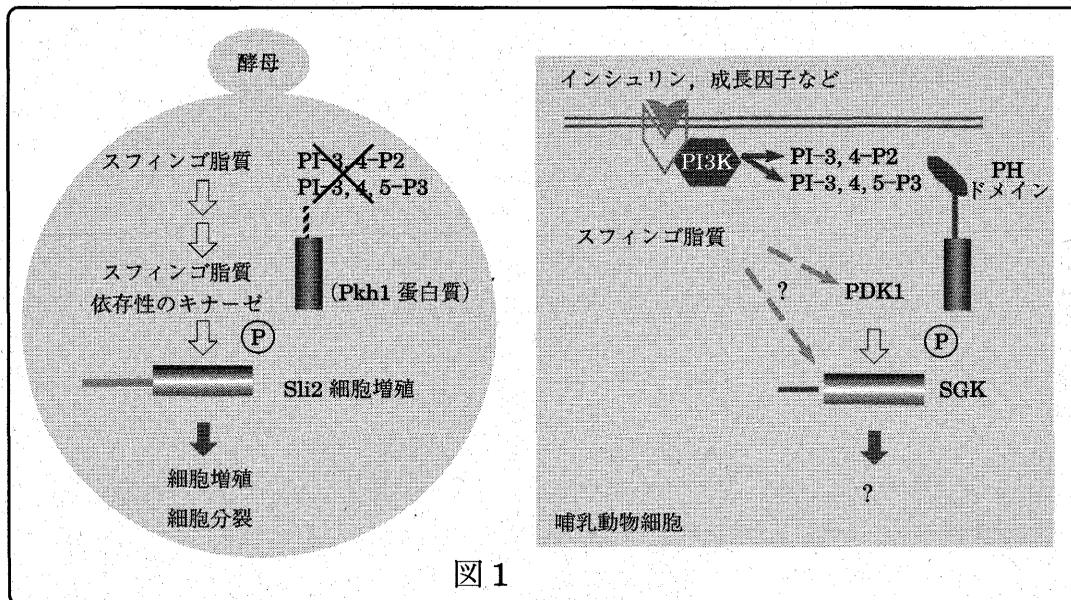
申請者は新たなスフィンゴ脂質代謝に関連するタンパク質やスフィンゴ脂質シグナル関連タンパク質の単離を目指して、酵母を用いて ISP-1 耐性遺伝子のスクリーニングを行ったところ、4 種類の遺伝子のクローニングに成功した。これらの遺伝子を *SLI1-4* (Sphingosine-Like Immunosuppressant Resistant Gene) と命名した。このうち *SLI2* はすでにマウスの PKC キナーゼのホモログとして単離された YPK1 と同一遺伝子であった。これまでに、Sli2 タンパク質 (Sli2p) は酵母の増殖に重要であることが報告されているが、その作用メカニズムは明らかにされていなかった。そこで申請者はまず *SLI2* に注目し、解析を進めた。

申請者は始めに Sli2p のキナーゼドメインが ISP-1 耐性に必須であることを明らかにした。更に、Sli2p は酵母のスフィンゴ脂質の生合成に影響を与えないことを示した。即ち、Sli2p はスフィンゴ脂質の上流ではなく、下流で働く可能性が示

唆された。そこで Sli2p がスフィンゴ脂質によって制御されているかについて検討を加えた。その結果 Sli2p はリン酸化されており、そのリン酸化は細胞内でのスフィンゴ脂質量によって調節されることが分かった。又、共焦点レーザー顕微鏡を用いて Sli2-EGFP 融合タンパク質の細胞内局在を観察したところ、各細胞周期において Sli2p の特異的な局在変化を観察された。更にこの局在の変化は細胞内でのスフィンゴ脂質量によって制御されていた。これらの結果により Sli2p はスフィンゴ脂質シグナル伝達経路の下流のキナーゼであることが示された。(図1の左)。

### 第二節、哺乳動物細胞と酵母におけるスフィンゴ脂質シグナル伝達経路の解析

Sli2p の哺乳動物ホモログとして SGK が知られている。SGK は Akt/PKB ファミリーの一つで図1の右に示すような経路に関わっていることが知られている。即ち、細胞外の様々な成長因子が細胞表面のレセプターと結合すると細胞内の PI3-kinase が活性化され、それによって PI(3, 4, 5, )P3 や PI(3, 4)P2 が産生される。PDK1 は PH ドメインを介してこれらのイノシトールリン脂質と結合することで活性化され、SGK をリン酸化する。SGK を強制発現した酵母は ISP-1 耐性を示したことから図1で示している左右二つの経路がある程度共通していることが予想された。また、PDK1 の酵母のホモログは *PKH1* であることが知られている。Pkh1 蛋白質 (Pkh1p) を酵母に強制発現したところ、これらの酵母は ISP-1 耐性を示した。さらに申請者は Pkh1p を種々の *SLI2* の変異株に強制発現させ、検討したところ、Pkh1p は Sli2p 上流のスフィンゴ脂質依存性キナーゼの一つである可能性を明らかにした。酵母では PI(3, 4, 5, )P3 や PI(3, 4)P2 が産生できないことが知られている。また、Pkh1p にはこれらのイノシトールリン脂質と結合する PH ドメインが存在しない。これらのことを考え合わせると酵母においてイノシトールリン脂質の代わりにスフィンゴ脂質が脂質メディエーターとして利用されている可能性が考えられる。また、哺乳動物において、PDK1 や SGK を介する経路がスフィンゴ脂質により、影響を受ける可能性も考えられる。



以上、申請者は本研究においてスフィンゴ脂質減少による細胞死の誘導機構を明らかにしたと同時に、酵母を用いてスフィンゴ脂質シグナル伝達経路に関与するプロテインキナーゼ遺伝子 (*SLI2*) の単離にはじめて成功した。更に、Sli2 タンパク質の機能を解明することにより、酵母および哺乳動物細胞において、スフィンゴ脂質シグナル伝達系の一部を明らかにした。これらの結果はスフィンゴ脂質シグナル伝達系の全容を解明していく上で、重要な知見になるものである。

### 論文審査の結果の要旨

スフィンゴ脂質は生体膜の主要な構成成分であり、細胞の接着、分化、増殖、アポトーシス等に重要な生理的機能を担っていることが明らかにされている。しかしながらそれらの生体内での役割については、未知な部分が多い。本論文では、冬虫夏草由来の免疫抑制剤がスフィンゴ脂質生合成を抑制することを利用し、スフィンゴ脂質シグナル伝達経路を明らかにし

たものである。

まず、スフィンゴシン類似構造を有する免疫抑制剤 ISP-1 の作用機構を解析したところ、ISP-1 が哺乳動物の場合と同様、酵母に対して、スフィンゴ脂質生合成経路の最初のステップを媒触するセリンパルミトイルトランスフェラーゼを阻害することにより、細胞内のスフィンゴ脂質を減少させ、細胞死を誘導する事を明らかにした。

次に、スフィンゴ脂質シグナル関連タンパク質の単離を目指して、酵母を用いて ISP-1 耐性遺伝子のスクリーニングを行ったところ、4種類の遺伝子のクローニングに成功した。これらの遺伝子のうち *SLI2* の転写産物である Sli2タンパク質 (Sli2p) はセリンスレオニンキナーゼドメインを有しており、その作用メカニズムについて検討を加えた。その結果、Sli2p のキナーゼドメインが ISP-1 耐性に必須であることが明らかになった。更に、Sli2p は酵母のスフィンゴ脂質の生合成に影響を与えないことから、Sli2p はスフィンゴ脂質の上流ではなく、下流で働く可能性が示唆された。そこで Sli2p がスフィンゴ脂質によって制御されているかについて検討を加えたところ、Sli2p はリン酸化されており、そのリン酸化は細胞内でのスフィンゴ脂質量によって調節されることが示された。また、その細胞内局在を観察したところ、各細胞周期において Sli2p の特異的な局在変化が観察され、この局在の変化は細胞内でのスフィンゴ脂質量によって制御されていた。これらの結果により Sli2p はスフィンゴ脂質シグナル伝達経路の下流のキナーゼであることが示された。

Sli2p の哺乳動物ホモログとして Akt/PKB ファミリーの SGK が知られている。SGK を強制発現した酵母は ISP-1 耐性を示したことから酵母と哺乳動物のシグナル経路がある程度共通していることが予想された。また、SGK の上流のキナーゼである PDK1 の酵母のホモログは Pkh1 蛋白質 (Pkh1p) であることが知られている。Pkh1p を酵母に強制発現したところ、これらの酵母は ISP-1 耐性を示した。このことから、Pkh1p は Sli2p の上流のスフィンゴ脂質依存性キナーゼの一つである可能性が示唆された。また、SGK の上流の因子である PI(3,4,5)<sub>3</sub> や PI(3,4)<sub>2</sub> の産生が酵母ではできないことを考えると、酵母においてイノシトールリン脂質の代わりにスフィンゴ脂質が脂質メディエーターとして利用されている可能性が考えられた。また、哺乳動物において、PDK1 や SGK を介する経路がスフィンゴ脂質により、影響を受ける可能性も示唆された。

以上、本研究は、スフィンゴ脂質合成阻害剤を用いて、スフィンゴ脂質シグナル伝達経路に関与するプロテインキナーゼの遺伝子クローニングに成功し、その性質について明らかにしたものである。この研究は、スフィンゴ脂質シグナル伝達系の全容を解明していく上で、重要な知見になるものである。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成13年2月27日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。