

## スフィンゴ糖脂質による細胞膜分子制御機構の普遍性

川島 永子<sup>1</sup>, 仲山 賢一<sup>2</sup>

### 1. はじめに

糖脂質研究は、赤血球の血液型抗原が糖脂質であるという発見が契機となり、これまで多くの研究が積み重ねられてきた。さらに近年の分子生物学の進歩により、多くの糖転移酵素のcDNAのクローニング、糖脂質合成酵素遺伝子欠損動物の樹立により、糖脂質の機能研究が大いに進んだことはいうまでもない<sup>1-3)</sup>。我々はガングリオシドGM3を中心に、1980年代から報告されてきた知見である「スフィンゴ糖脂質による膜タンパク質の制御」に関する理解をさらに深めようと研究を行ってきた。本稿では、これまでの我々の研究を紹介しながら、さまざまな病態におけるスフィンゴ糖脂質の発現量の違いとシグナル伝達制御の関係、さらに病態進行阻止の可能性について述べる。

### 2. 扁平上皮がん・神経膠腫における糖脂質の機能

これまでに、ガングリオシドが関与するさまざまな病態が報告されてきたが、特にガングリオシドGM3 [NeuAc $\alpha$ (2-3)Gal $\beta$ (1-4)Glc-Cer] は、上皮成長因子受容体(EGFR)に対し負の制御をすることが以前より知られていた。箱守らにより、GM3は糖タンパク質のN結合型糖鎖と相互作用するとの報告がなされたことから<sup>4)</sup>、GM3とN結合型糖鎖を持つEGFRとの互いの糖鎖を介した相互作用が、EGFRの制御に関わっていると予想された。そ

こで我々は、扁平上皮がん細胞株A431で豊富に発現するEGFRに付加するN結合型糖鎖を改変することで、GM3のEGFR制御能が変化し、増殖シグナルを調節できるかどうか検証した。すでに、GlcNAc(N-アセチルグルコサミン)末端N結合型糖鎖とGM3の糖鎖との相互作用が示されていたことから<sup>5)</sup>、A431細胞に発現するEGFRに付加するN結合型糖鎖の末端をシアリダーゼおよびガラクトシダーゼ処理することで、GlcNAc非還元末端の糖鎖の存在比率を4.3%から67%に増加させたところ、EGFRのリン酸化はGM3によって顕著に抑制された。これにより、GM3の糖鎖はEGFRのN結合型糖鎖のGlcNAc還元末端と強く結合することが証明された<sup>6)</sup>。我々はまた、GM3のEGFR活性化の抑制能を利用し、がんなどの治療応用への可能性も追求してきた。生理的ガングリオシドの血中濃度は約10 $\mu$ Mと考えられているのに対し、これまでの*in vitro*実験から、EGFR活性化の抑制には高濃度(100~250 $\mu$ M)のガングリオシドの添加が必要であることが示されている。必要なガングリオシドの血中濃度を得るためには相当量の投与が必要となることや、分解による減少も考え併せると、ガングリオシドの投与による成長因子受容体の機能制御の検討は難しい。そこで我々は、GM3合成酵素遺伝子(ST3GAL5)の発現亢進機能が報告されているバルプロ酸<sup>7,8)</sup>を用いて内因的にA431細胞におけるGM3の発現を増強させ、さまざまな機能を検証した。その結果、バルプロ酸処理によっても、EGFR活性化は明確に抑制され、細胞増殖も阻害されることが示された<sup>9)</sup>(図1)。なお、バルプロ酸はGM3合成酵素遺伝子の発現を亢進させるが、GM2やGD3合成酵素などの発現には影響を与えることなく、GM3特異的に発現を増加させることが確認されている。さらに遺伝子ST3GAL5発現ベクターの導入でも同様な効果が観察されたことから、バルプロ酸処理による一連の現象は、GM3の発現亢進によるものと考えられた。また、使用したA431細胞に加えU87細胞(神経膠腫細胞: グリオーマ)においても、バルプロ酸処理によるEGFRの抑制を介した細胞増殖の阻害がみられることから、この化合物などは細胞種を問わず作用する可能性が示唆される。

### 3. リソソーム病における蓄積糖脂質の機能

我々は、病態モデルマウスを使って蓄積ガングリオシ

<sup>1</sup> 北里大学医学部腎臓内科 (〒252-0374 神奈川県相模原市南区北里1-15-1)

<sup>2</sup> 国立研究開発法人産業技術総合研究所機能化学研究部門 (〒739-0046 広島県東広島市鏡山3-11-32)

Control mechanism of cell membrane molecules by sphingoglycolipids

Nagako Kawashima<sup>1</sup> and Ken-ichi Nakayama<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Department of Nephrology, Kitasato University School of Medicine, 1-15-1 Kitasato, Minami, Sagami-hara, Kanagawa 252-0374, Japan, <sup>2</sup>Research Institute for Sustainable Chemistry, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 3-11-32 Kagamiyama, Higashi-hiroshima, Hiroshima 739-0046, Japan)

本論文の図版はモノクロ(冊子版)およびカラー(電子版)で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900075

© 2018 公益社団法人日本生化学会

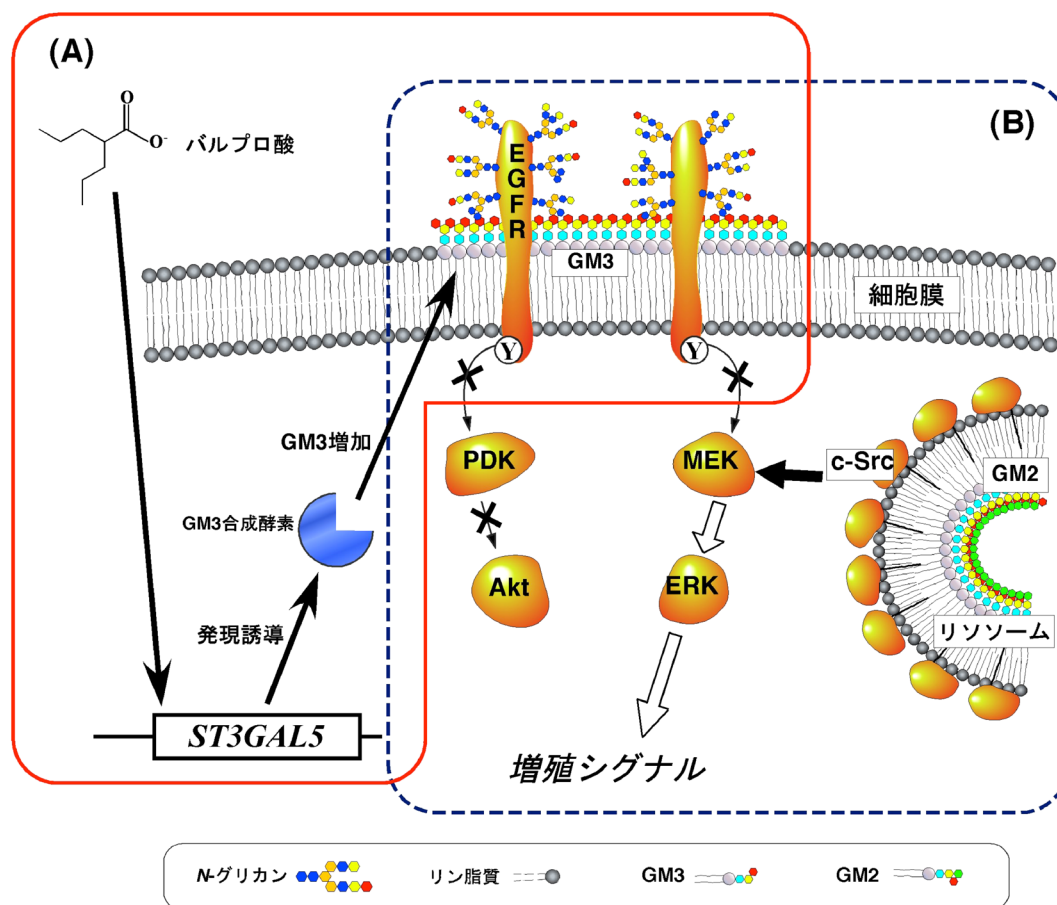


図1 細胞外膜とオルガネラ膜を介したスフィンゴ脂質からの増殖シグナルの制御

(A) GM3によるEGFR由来の増殖シグナルの抑制機構 (赤実線囲み): 細胞表層に発現するGM3は、EGFRに付加するN結合型糖鎖、特にGlcNAc非還元末端と強く結合する。この結合により、EGFRのリン酸化は抑制され、細胞内増殖シグナルは減弱される。また、パルミト酸によりGM3合成酵素遺伝子 (*ST3GAL5*, *SAT-1*) を介してGM3合成酵素が活性化し、細胞表層のGM3量が増加する。その結果、EGFRのリン酸化が抑制され、細胞増殖性が低下する。(B) リソソームに過剰蓄積したGM2からの細胞増殖シグナル亢進機構 (青破線囲み): Sandhoff病モデルマウス由来のアストロサイト (ASD) では、リソソームに過剰にGM2が蓄積している。リソソーム内に蓄積したGM2はリソソーム膜近傍に集まるSrcキナーゼと相互作用することでc-Srcが活性化され、MAPK/ERKの増殖シグナルが活性化される。このシグナル伝達経路の活性化により、ASDは異常増殖性を示す。

下の増殖シグナルへ与える影響も探っている。Sandhoff病は、リソソーム性 $\beta$ -ヘキササミニダーゼ (Hex) の $\beta$ サブユニットの遺伝子 (*HEXB*) 変異に基づくHex活性欠損により、ガングリオシドGM2およびGlcNAc末端糖鎖等が中枢神経細胞等に過剰蓄積して起こる神経変性疾患である。我々は、*Hexb*をノックアウトした病態モデルマウス (*Hexb*<sup>-/-</sup>マウス)<sup>10)</sup> の新生仔脳由来のアストロサイト (ASD) が、野生型マウス由来のアストロサイト (AWT) と比べて異常な増殖を示すことから、リソソームに蓄積しているGM2と増殖シグナル経路の活性化との関係を解析した。その結果、i) ASDではERKのリン酸化が亢進する一方で、Aktのリン酸化は抑制されること、ii) ERKリン酸化は細胞外の増殖因子に非依存的であることがわかった。この細胞外増殖因子非依存的な増殖の亢進は、ASD

の細胞表面に多量に発現しているGM3と増殖因子受容体に付加するGlcNAc末端糖鎖によるものと推察している。また、ASDのリソソームに過剰蓄積したGM2等を、組換えヒトHexAにより分解したところ、ERKのリン酸化は抑制され、増殖速度も減少傾向がみられた。これらの事実から、ASDにおけるERKのリン酸化亢進と細胞増殖性の異常亢進は、HexAおよびHexBの欠損に基づいてリソソームで過剰蓄積する基質 (GM2等) に依存していることが示唆されただけでなく、GM2等のガングリオシド基質の過剰蓄積が直接増殖シグナルの亢進に寄与していることも推察される<sup>11)</sup>。ASDのリソソーム膜周囲には多くのc-Srcが集積しているため、リソソーム内に蓄積しているGM2とc-Srcの相互作用により、細胞内のERKより細胞増殖シグナル経路が活性化され、結果として細胞増殖性を異常に

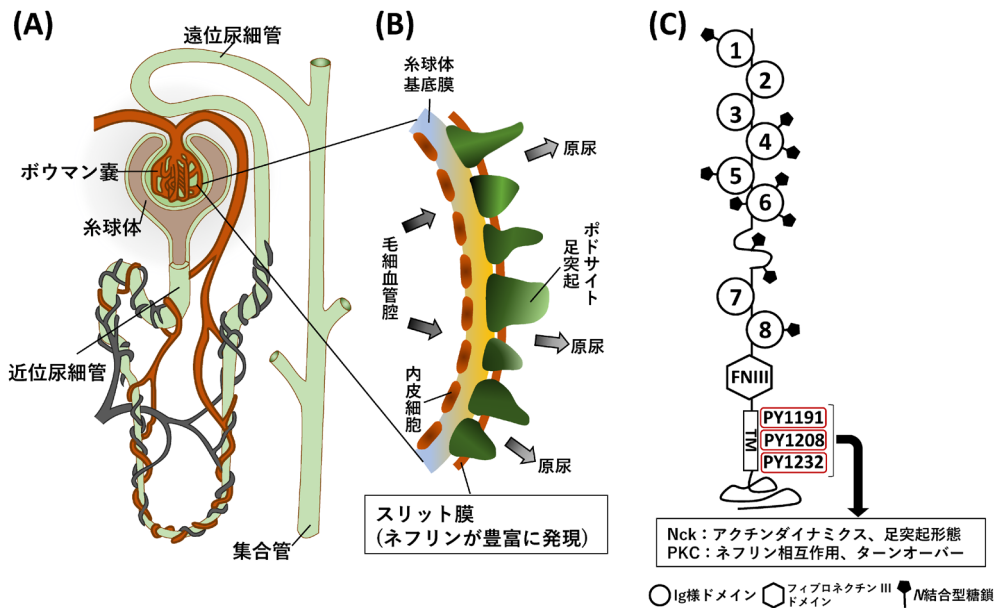


図2 腎糸球体におけるポドサイトとスリット膜の構造

(A) ネフロン構造。腎臓の基本的な機能単位であるネフロンでは、糸球体における濾過により作られた原尿を、尿細管で再吸収・分泌・濃縮する過程を経て、尿が作られる。(B) 糸球体毛細血管からの原尿の濾過機構。糸球体毛細血管の血液は、毛細血管腔より基底膜を抜けて、ポドサイト足突起間にある最終濾過フィルター（スリット膜）を通過し、原尿となる。ポドサイト（足突起を含む）の細胞膜にはGM3が豊富に発現し、スリット膜は主要分子ネフリンで構成されている。(C) ネフリン分子の構造。細胞外に8個のイムノグロブリン（Ig）様ドメインと1個のフィブロネクチン様ドメインを持つ1回膜貫通型タンパク質である。細胞内ドメインには、数か所のチロシンリン酸化部位があり、特にPY<sup>1191</sup>、PY<sup>1208</sup>、PY<sup>1232</sup>部位（マウス）の活性化は、NckやPKCなどのキナーゼを介したシグナル伝達経路を通じて、アクチンダイナミクスやポドサイト足突起の形態維持などに関与すると考えられている。

高めている機序を想定している（投稿準備中）。これまでに、細胞表層におけるスフィンゴ糖脂質の機能と同様の分子機序が、細胞内オルガネラ膜を介しても起きていることが示唆される（図1）。

#### 4. ネフローゼ症候群における糖脂質の機能

ネフローゼ症候群とは、大量のタンパク尿に伴う低タンパク血症および浮腫などを生じる病態である。さまざまな先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子の解析結果から、ネフローゼ症候群は、ポドサイト障害に起因すると考えられている。この障害の進行により、ポドサイトが脱落した結果、巣状分節性糸球体硬化症（FSGS）が発症して腎機能が低下することが知られている。近年、増殖能を持たないポドサイトの脱落抑制（ポドサイト保護）が重要視され、その治療標的としてネフリンが注目されている<sup>12)</sup>。糸球体ポドサイトのスリット膜を構成するネフリンは、糸球体タンパク質濾過バリアを構成する細胞膜タンパク質であるとともに、その1191、1208、1232番目のチロシン残基のリン酸化を介してポドサイトのアクチン骨格を制御する（図2）。最近、ポドサイトにおけるネフリンがGM3と共局在して

いることが報告され、ポドサイトに発現するGM3の機能に関する仮説も提唱された<sup>13)</sup>。また、糸球体の血管内皮細胞成長因子受容体について、GM3等のスフィンゴ糖脂質が形成するラフトの関与を示唆する報告もなされた<sup>14)</sup>。

そこで、我々はヒト糸球体疾患に酷似したモデルである抗ネフリン抗体障害性FSGSマウス<sup>15)</sup>を用いて、GM3によるポドサイト障害の発症予防および進行抑制に焦点をあてた研究を行っている。このモデルでは、抗ネフリン抗体投与後に、i) 大量のタンパク尿、ii) ポドサイトにおけるGM3量の低下、iii) ネフリンの減少、iv) 糸球体硬化病変がみられた（図3）。さらに、作製したHEK293/mu-Nephrin細胞に抗ネフリン抗体を添加したところ、マウス糸球体と同様、ネフリンおよびGM3の減少、さらにF-アクチンの線維束の消失も確認された。しかし、細胞におけるGM3量を増加させると、抗ネフリン抗体による障害を免れ、ネフリンとF-アクチンの線維束は正常細胞とほぼ同等に維持・回復した。また、抗体によるネフリン障害は、ネフリンPY<sup>1232</sup>を長期かつ強く活性化させるが、GM3量を増加させると、この活性化パターンは正常細胞と同レベルに戻った。さらにネフリンは、TritonX-100非可溶性画分でGM3やFynなどと挙動をともにしているが、抗体による障害を



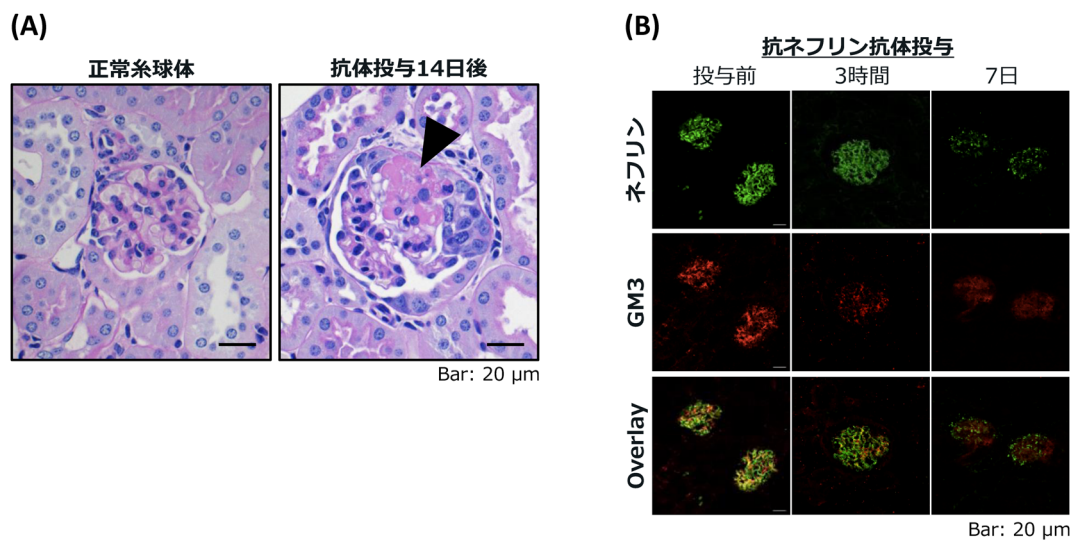


図3 抗体障害性FSGSモデルマウスの腎組織病変と各分子の発現変化

(A)抗ネフリン抗体投与14日後の糸球体硬化病変。抗ネフリン抗体投与により、糸球体硬化病変（黒矢印）と糸球体肥大の所見がみられる。(B)抗ネフリン抗体投与3時間後と7日後の糸球体におけるネフリンとGM3の発現変化の様子。抗体投与3時間後にGM3の発現は明確に減少し、7日後にはネフリンは、GM3とともに発現がほとんどみられなくなる。

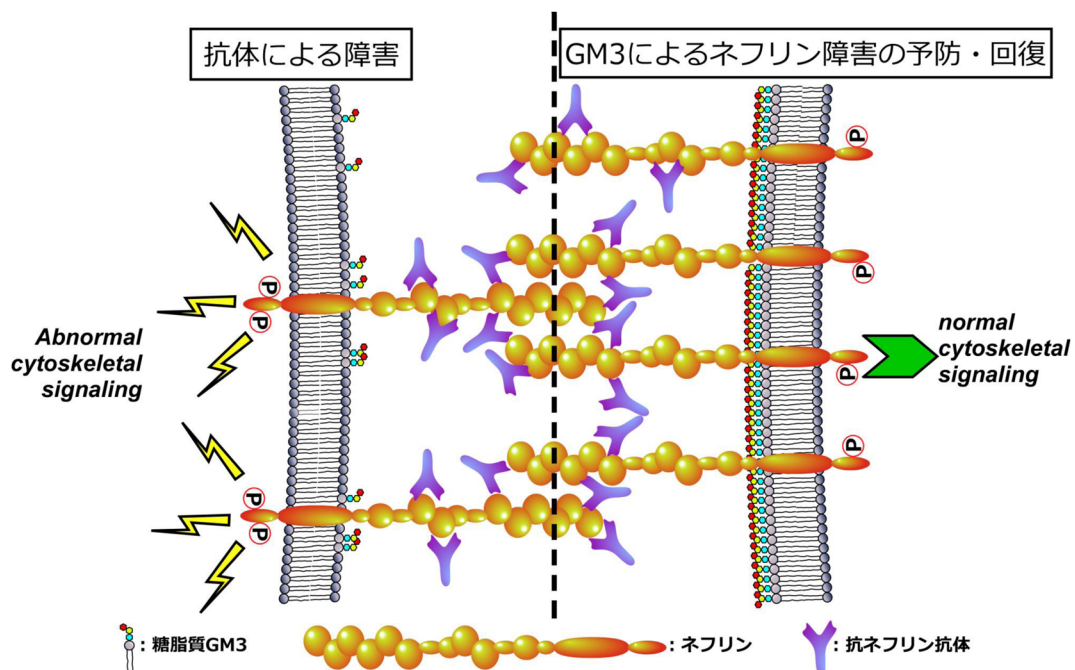


図4 (仮説) 腎糸球体ポドサイトにおけるGM3によるネフリンのリン酸化調節機構

抗ネフリン抗体を投与すると、大量の抗体がポドサイトスリット膜におけるネフリンに結合する。ネフリンの細胞骨格シグナルに影響するリン酸化部位には、長期的かつ強いリン酸化状態の維持により異常な細胞骨格シグナルが伝達され、ポドサイト細胞のF-アクチン線維束の崩壊、さらにスリット膜周辺のポドサイトの細胞膜も崩壊する。細胞質内外からの崩壊によって、ポドサイト死と脱落が起こり、ネフローゼ症候群が発症する。しかし、あらかじめまたは病態初期にポドサイトにGM3を過剰発現させておくことで、抗体によるネフリン障害を免れることができる。

受けるとこれらの分子はともにTritonX-100可溶性画分に移行した。これらの結果より、ポドサイトにおけるGM3量の増加は、ネフリンの発現と機能を維持し、かつ障害ネフリンのリン酸化を正常化することで細胞内アクチン骨格の再構成にも関与することが示唆される。このように、ネフローゼ症候群においても、スフィンゴ糖脂質がその病態と大きく関わっている可能性が高まっていることから、「ポドサイトのスリット膜におけるGM3量の調節により、同膜に発現するネフリン機能不全を回復できるのではないか」と考えている(図4)。

## 5. おわりに

第三の生命鎖でもある(スフィンゴ)糖脂質の真の機能を理解するには、いまだ解決すべき課題は多い。近年、1分子解析技術やクライオ電子顕微鏡解析技術など、生体膜解析に応用できるさまざまな技術の飛躍的な進歩が著しい。このような新たな解析技術も取り入れながら、細胞膜を取り巻くさまざまな挙動に関する解析結果を体系化することで、生体反応のゲートとなる細胞膜およびスフィンゴ糖脂質の機能がさらに明らかになることを期待している。

## 謝辞

本稿で紹介した研究を遂行するにあたり終始御指導いただきました、箱守仙一郎先生、飯田和子先生(Univ of Washington, PNRI)を始め、国立研究開発法人産業技術総合研究所、北里大学医学部腎臓内科、生化学など多くの方から御支援いただきましたこと、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Takamiya, K., Yamamoto, A., Furukawa, K., Yamashiro, S., Shin, M., Okada, M., Fukumoto, S., Haraguchi, M., Takeda, M., Fujimura, K., Sakae, M., Kishikawa, M., Shiku, H., Furukawa, K., & Aizawa, S. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10662-10667.
- 2) Yamashita, T., Hashiramoto, A., Haluzik, M., Mizukami, H., Beck, S., Norton, A., Kono, M., Tsuji, S., Daniotti, J.L., Werth, N., Sandhoff, R., Sandhoff, K., & Proia, R.L. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 3445-3449.
- 3) Yoshikawa, M., Go, S., Takasaki, K., Kakazu, Y., Ohashi, M., Nagafuku, M., Kabayama, K., Sekimoto, J., Suzuki, S., Takaiwa, K., Kimitsuki, T., Matsumoto, N., Komune, S., Kamei, D., Saito, M., Fujiwara, M., Iwasaki, K., & Inokuchi, J. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 9483-9488.
- 4) Bremer, E.G., Schlessinger, J., & Hakomori, S. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 2434-2440.
- 5) Yoon, S.J., Nakayama, K., Hikita, T., Handa, K., & Hakomori, S.I. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 18987-18991.
- 6) Kawashima, N., Yoon, S.J., Itoh, K., & Nakayama, K. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 6147-6155.
- 7) Kwon, H.Y., Kang, N.Y., Dae, H.M., Kim, K.S., Kim, C.H., Do, S.I., & Lee, Y. (2008) *Acta Pharmacol. Sin.*, **29**, 999-1005.
- 8) Song, N., Kim, S.J., Kwon, H.Y., Son, S.W., Kim, K.S., Ahn, H.B., & Lee, Y.C. (2011) *BMB Rep.*, **44**, 405-409.
- 9) Kawashima, N., Nishimiya, Y., Takahata, S., & Nakayama, K. (2016) *J. Biol. Chem.*, **291**, 21424-21433.
- 10) Sango, K., Yamanaka, S., Hoffmann, A., Okuda, Y., Grinberg, A., Westphal, H., McDonald, M.P., Crawley, J.N., Sandhoff, K., Suzuki, K., & Proia, R.L. (1995) *Nat. Genet.*, **11**, 170-176.
- 11) Kawashima, N., Tsuji, D., Okuda, T., Itoh, K., & Nakayama, K. (2009) *J. Neurochem.*, **111**, 1031-1041.
- 12) Fomoni, A., Merscher, S., & Kopp, J.B. (2014) *Nat. Rev. Nephrol.*, **10**, 379-388.
- 13) Kaneko, T., Tsubakihara, Y., Fushimi, H., Yamaguchi, S., Takabatake, Y., Rakugi, H., Kawakami, H., & Isaka, Y. (2015) *Clin. Exp. Nephrol.*, **19**, 403-410.
- 14) Jin, J., Sison, K., Li, C., Tian, R., Wnuk, M., Sung, H.K., Jeanson, M., Zhang, C., Tucholska, M., Jones, N., Kerjaschki, D., Shibuya, M., Fantus, I.G., Nagy, A., Gerber, H.P., Ferrara, N., Pawson, T., & Quaggin, S.E. (2012) *Cell*, **151**, 384-399.
- 15) Takeuchi, K., Naito, S., Kawashima, N., Ishigaki, N., Sano, T., Kamata, K., & Takeuchi, Y. (2017) *Nephron, Exp. Nephrol.*, doi: 10.1159/000479935.

## 著者寸描

### ●川島 永子 (かわしま ながこ)



北里大学医学部腎臓内科助教。博士(薬学)。

■略歴 1995年北海道大学水産学部卒業、97年同大学院修士課程修了、2010年徳島大学大学院薬科学教育部博士後期過程修了。97年麒麟麦酒株式会社、2005年(独)産業技術総合研究所、12年Pacific Northwest Research Institute(箱守研)博士研究員、17年より現職。

■研究テーマと抱負 糖脂質の機能を調べながら、細胞膜を介した様々な生体反応を明らかにし、少しでも多くの創薬シーズ提供へ繋げたいと思っています。

■趣味 愛猫と過ごす事、山歩き、映画鑑賞。

### ●仲山 賢一 (なかやま けんいち)

国立研究開発法人産業技術総合研究所機能化学研究部門。博士(農学)。

■略歴 1985年北海道大学薬学部卒業、87年同大学院薬学研究科修士課程修了、99年筑波大学大学院農学研究科博士課程修了。87年通産省工業技術院入所、2001年(独)産業技術総合研究所、02年University of Washington客員研究員兼任、16年より現職。

■研究テーマと抱負 糖脂質の生物学的な役割、特に細胞表面でのシグナル制御機構を解明し、疾病の治療・予防法の開発への応用へ繋げたい。

■趣味 山登り。