

ウイルス感染におけるスフィンゴミエリン生合成の役割

谷口 真

1. はじめに

形質膜は脂質二重層の生体膜からなり、細胞内外を隔てている。形質膜は増殖、分化、遊走、炎症応答などさまざまな細胞機能を発揮するシグナルにおいて、そのリガンド-受容体の起点となるだけでなく、エンドサイトーシスやエキソサイトーシスなどの細胞内外への物質のやりとりが行われる場所である。他方、ウイルスもこの形質膜を介して標的細胞へ吸着・侵入を行い、宿主内の機構を利用して複製・放出を繰り返し、感染を成立することでさまざまな病態を引き起こす。そのため、病態を引き起こすウイルスの生活環を理解することが予防・治療へとつながる。スフィンゴミエリン (sphingomyelin: SM) は、生体膜を構成するスフィンゴ脂質の一つであり、生体膜に存在するスフィンゴ脂質の中では最も多く存在している。このSMは形質膜をはじめとする生体膜において、散在して存在するのではなく、マイクロドメイン (脂質ラフト) と呼ばれる部分に集積している¹⁾。近年、SMを主要因子とする脂質マイクロドメインが、先にあげた細胞機能の制御に関与することが知られており²⁾、本稿では、生体膜SMとその合成酵素 (sphingomyelin synthase: SMS) の役割について、ウイルス生活環への関与を中心として概説したい。

2. 生体膜SMとSMS

SMはセラミドとホスファチジルコリン (phosphatidylcholine: PC) を基質として、SMSによりジアシルグリセロールとともに合成される²⁻⁴⁾。SMSには3種類のアイソフォームSMS1、SMS2およびSMSrが存在するが、SM合成活性を有するのはSMS1およびSMS2のみであり、SMSrはセラミドホスホエタノールアミン (ceramide phosphoethanolamine: CPE) を合成することが知られている (図1)。

SMS1およびSMS2も微弱なCPE合成活性を有しているが、CPEの細胞内の量はわずかであり、その機能はわかっていない。SMS1はゴルジ体、SMS2は形質膜およびゴルジ体に局在することが知られており、細胞種によってはSMS1がゴルジ体において合成するSMが細胞内産生量の大部分に寄与している報告もあるが、SMS2も関与する報告も多数あり、その機能の違いについてはいまだ不明な点が多い。形質膜を含む細胞膜SMは、ゴルジ体においてセラミドとPCから合成されたSMが各生体膜へと輸送されたものであり、ゴルジ体が主なSM産生場だと考えられている (図1)。これまでに我々は、マウスリンパ球細胞WR19Lにおいて、SMS1が形質膜SMの産生に関与しており、SMの有無によってトランスフェリン (transferrin: Tf) およびTf受容体の細胞内動態が異なることを示した⁵⁾。形質膜SMが豊富に存在する場合には、Tf/Tf受容体はクラスリン依存性にエンドサイトーシスで取り込まれ、細胞増殖に必要な鉄分を引き渡した後、細胞外へ放出され再利用されていく。しかし、SMS1が欠失して形質膜SM量が著しく低下している場合には、Tf/Tf受容体はクラスリン非依存性に取り込まれリソソームへと向かい分解されてしまうため、細胞増殖を引き起こすことができない。また、我々は形質膜SMの外部刺激による応答に対する役割を細胞レベルで解析するために、SMS欠損マウスの胎仔から不死化線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast: MEF) を樹立した⁶⁾。SMS1およびSMS2の両方を欠損したマウスは胎生致死であるが、樹立されたMEFは、SM合成活性が完全になくなり、生体膜SMをほとんど失っている。このSMS欠損MEFでは、CXCL12ケモカインとその受容体CXCR4の応答が促進して、細胞遊走が増強されることを明らかにした⁶⁾。SMS欠損により形質膜SMが減少することで、CXCL12-CXCR4複合体が脂質マイクロドメインに集積し、エンドサイトーシスが促進されるため、下流のシグナル (ERK1/2) の活性化が増強されていた。このことから、形質膜SMがリガンド-受容体応答の場としてシグナルを制御し、細胞の運命を決定することが示唆されている。他方、生体膜SMはさまざまな細胞外刺激に応じてスフィンゴミエリナーゼ (sphingomyelinase: SMase) による加水分解によってセラミドの産生に利用され、生じたセラミドは生理活性脂質としてアポトーシスやオートファジーなどのシグナル伝達に関わっている^{3, 7, 8)}。形質膜に局在す

金沢医科大学総合医学研究所生命科学研究領域 (〒920-0293 石川県河北郡内灘町大学1丁目1番地)

Role of sphingomyelin and its synthesis on viral lifecycle

Makoto Taniguchi (Department of Life Science, Medical Research Institute, Kanazawa Medical University, 1-1 Daigaku, Uchinada, Ishikawa 920-0293, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900173

© 2018 公益社団法人日本生化学会

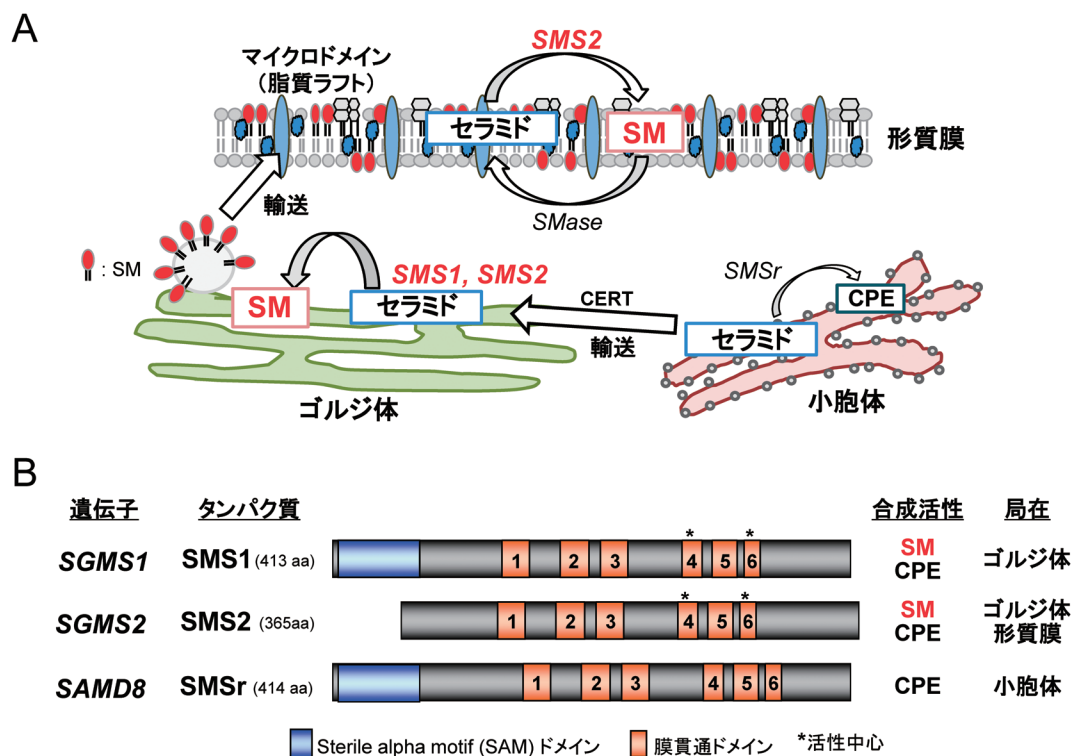


図1 SM合成経路とSMS

(A) SM 合成. SMS の基質であるセラミドは小胞体で合成された後, セラミド輸送タンパク質 CERT によりゴルジ体へ輸送され, SM 合成に利用される. ゴルジ体では細胞の種類によるが, SMS1 および SMS2 によって SM が合成される. ゴルジ体で合成された SM は形質膜を含む生体膜へと輸送される. 生体膜において SM は脂質マイクロドメイン (脂質ラフト) に多く集積している. 他方, SMSr は小胞体で CPE を産生するがその意義は不明である. (B) SMS のドメイン構造. SMS には 3 種類あり六つの膜貫通ドメインを有し, SMS1 および SMS2 のみが SM 合成活性 (SMS) を有する. また, 3 種類とも CPE 合成活性 (CPES) を持つ. SMS1 および SMSr は N 末端に SAM ドメインを有するが, その機能は不明である. 4 番目と 6 番目の膜貫通ドメインに SMS 合成に必要な活性中心が存在する.

る SMS2 は, 外部刺激によって失った SM を, 速やかにセラミドから再び合成することで形質膜 SM の恒常性を保っていると考えられている⁹⁾.

3. 日本脳炎ウイルス感染と形質膜 SM

日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus: JEV) は, 蚊媒介性のフラビウイルス科フラビウイルス属に属する約 11,000 ヌクレオチドを有するプラス鎖 RNA ウイルスであり, 神経細胞に感染して重篤な脳炎を引き起こす. JEV によって引き起こされた脳炎の致死率は約 30% であり, 生存者の約 50% で後遺症が発生する¹⁰⁾. JEV の標的細胞への接着には, エンベロープタンパク質 (E タンパク質) が関与しているが, 細胞側の標的分子に関しては, 熱ショックタンパク質 Hsp70 や多糖グリコサミノグリカン, ラミニンなどの報告もあるが, その実態はわかっていない. また, JEV の標的細胞への侵入方法に関しても細胞によって異なっており, 蚊の細胞やブタ腎上皮細胞 PK15 においてはクラスリン依存性, マウスおよびヒト神経細胞においては

クラスリン非依存性のエンドサイトーシスであること, さらにヒト肝がん細胞 Huh7 では SM に富む膜領域である脂質ラフトから侵入するなど非常に混沌としている. 我々は JEV の細胞接着・感染に対する形質膜 SM の関与を先にあげた MEF を用いて検討した¹¹⁾. JEV を MEF の培養上清に添加し, 1 時間後に除いた後, 48 時間でのウイルス産生量を細胞内および培養上清中の E タンパク質量によって調べたところ, 野生型 MEF に比べ, SMS 欠損 MEF では著しく減少しており, JEV 感染が抑制されていることが示された. また, 野生型 MEF において細菌 SMase により前処理し, 形質膜 SM を減少させておくことで JEV 感染が抑制され, 逆に, SMS 欠損 MEF へ C_6 -SM を添加して形質膜 SM を補充した後に JEV 感染を行うと, JEV 産生量が増加することから, 形質膜 SM が JEV の MEF への接着・侵入に関与することが示唆された. そこでウイルスエンベロープを蛍光色素 DiI によりラベルした蛍光標識 JEV を用いてウイルスの接着を顕微鏡で観察したところ, 4°C における形質膜表面への JEV 接着だけでなく, 37°C, 15 分間の JEV 処理で, 細胞内へ侵入した JEV も SMS 欠損 MEF では観察されなかった. また,

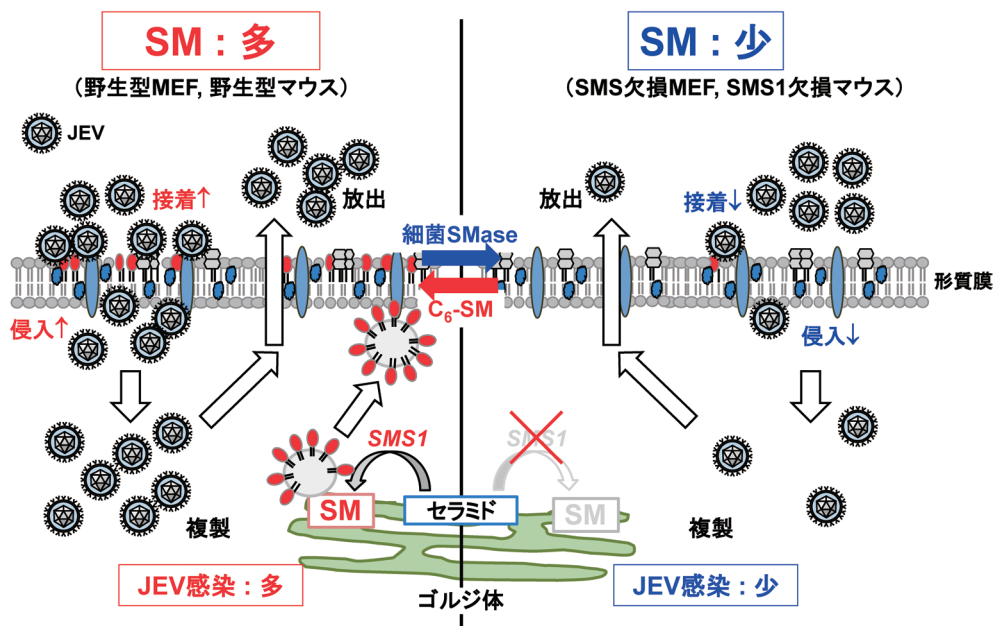


図2 形質膜SM減少によるJEV感染抑制

日本脳炎ウイルス (JEV) は野生型MEFおよび野生型マウスでは、宿主の形質膜SMに接着して侵入し、複製・放出を経て感染が拡大していく。SMS欠損MEFやSMS1欠損マウスでは形質膜SMが減少しているため、JEVの接着・侵入が抑制され、感染拡大が抑えられる。また、細菌SMase処理やC₆-SM添加によって形質膜SM量を変化させることで、JEV接着・侵入も増減する。

JEV感染15分後の細胞内Eタンパク質およびJEV RNA量も、SMS欠損MEFにおいて野生型MEFに比べて減少していたことから、JEVの接着・侵入がSMを介していることを示している。興味深いことに、JEVをSM含有リボソームで前処理し、野生型MEFに感染させたところ、48時間後のEタンパク質量が減少していたことからJEVがSMに接着して細胞へ侵入していることが示された。

ここで用いているSMS欠損MEFは、SMS1およびSMS2両欠損マウスより樹立したものであるため、JEVの接着・感染に関与する形質膜SMの合成に対する貢献度はSMS1とSMS2のどちらが高いのかを明らかにするため、SMS欠損MEFへSMS1またはSMS2を再導入した。SMS欠損MEFへのSMS1の導入はSMS2の導入に比べ、形質膜のSM量が増加しており、それに一致して、JEVの接着および感染量が回復したことから、SMS1により合成される形質膜SMがJEV感染に関与することが示された。このMEFで明らかとなったSMおよびSMS1のJEV感染への関与が、生体でも影響を受けるかを調べるため、SMS1欠損マウスを用いたJEV感染実験にて検討した。野生型およびSMS1欠損マウスに腹腔内注射にてJEVを投与したところ、野生型マウスは徐々に体重減少や衰弱などの感染の病態がみられたにも関わらず、SMS1欠損マウスでは体重減少などはみられなかった。感染13日後のマウス脳におけるEタンパク質を調べたところ、ウエスタンブロット解析および組織免疫染色ともに野生型マウスでは検出されたが、SMS1欠損マ

ウスでは検出されなかった。また、脳組織を観察したところ、野生型マウスの脳では、髄膜炎やリンパ球浸潤などのJEV感染および脳炎の症状がみられたが、SMS1欠損マウスにおいては、これらの脳炎の病態も観察されなかった。炎症のマーカーである炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン6の量も野生型マウスでは著しく増加していたにも関わらず、SMS1欠損マウスでは増加していなかった。以上のことから、SMS1の欠損によりJEV感染が抑制されていることが示唆され、SMS1が合成する形質膜SMのJEV感染への関与が明らかとなった (図2)。しかしながら、SMS欠損細胞でのJEV感染は完全には抑制されてはおらず、残存の少量SMによるものなのか、SM非依存性のJEV接着・侵入の機構が存在するのかは明らかでなく、これからのさらなる研究が期待される。

4. ウエストナイルウイルス複製と宿主SM

最近、Martin-Acebesらによって、ウエストナイルウイルス (West Nile virus: WNV) の感染にも生体膜SMとSMSが関与することが報告された¹²⁾。WNVはJEVと同じく蚊媒介性のフラビウイルス科フラビウイルス属のプラス鎖RNAウイルスであり、ウエストナイル熱およびウエストナイル脳炎の原因となる。この報告で著者らは、酸性SMase (acid SMase: ASM) 欠損マウスを用いている。ASMはニーマン・ピック病A型 (Niemann-Pick disease

type A : NPA) および B 型 (NPB) の原因遺伝子 (*SMPD1*) としても広く知られており、ニーマン・ピック病では *SMPD1* 遺伝子の変異による ASM 活性欠損によって SM の加水分解が抑制されることで、SM が大量に細胞内に蓄積して細胞死が誘導されるが、ASM 欠損マウスにおいても脳内の SM 量が増加する。WNV 感染 20 日後の野生型マウスの生存率は約 70% であるが、ASM 欠損マウスでは 10% 程度とかなり感染が増強されており、感染 6 日目の脳をはじめとする肝臓、脾臓、腎臓などの臓器での WNV RNA 量が増加していた。また脳組織での WNV の E タンパク質の免疫染色においても、ASM 欠損マウスでは野生型マウスに比べて増加していることが観察された。そこで細胞レベルでの WNV 感染への SM の影響を調べるため、NPA 患者より樹立した皮膚線維芽細胞において WNV 感染実験を行った。NPA 患者由来細胞はコントロールのヒト初代培養皮膚線維芽細胞に比べ SM が蓄積しており、感染 24 時間後の細胞内 WNV 量もコントロール細胞に比べ著しく増加していた。また、コントロール細胞へ SM を前処理して補充すると、SM の増加とともに WNV の感染も増加することが示された。さらに、アフリカミドリザル腎上皮細胞 Vero に SMS 阻害剤である D609、SPK-601 および MS-209 で前処理し WNV 感染を行ったところ、すべての阻害剤によって WNV 感染が低下したことから、SMS による SM 合成が WNV 感染に関与していることが明らかとなった。また、WNV 感染した Vero 細胞での共焦点顕微鏡観察より、小胞体由来のウイルス複製複合体において、ウイルスの複製起点である二本鎖 RNA 複合体と SM が共局在することから、SM の WNV 複製への関与が示唆された。しかしながら、複製複合体における SM の役割はわかっておらず、今後の研究が期待される。

5. SM 輸送経路を利用したインフルエンザウイルス放出

SM の生合成経路はインフルエンザウイルス (influenza virus : flu) の生活環にも利用されている¹³⁾。flu を含む多くのウイルスは標的細胞へ接着・侵入後、自分の DNA または RNA を増幅し、宿主のタンパク質合成経路を用いてエンベロープなどのウイルス構成に必要なタンパク質を合成後、子孫ウイルス粒子を再構成し細胞外へ放出され、次の標的細胞へと感染を拡大していく。先にあげた JEV や WNV は細胞内の小胞体内腔へ出芽 (budding) することで子孫ウイルス粒子が産生され、細胞内分泌経路を通じて放出される。他方、flu は構造タンパク質が宿主の細胞内輸送経路によって形質膜まで運ばれ細胞表面に露出し、形質膜から出芽することで子孫ウイルス粒子が再構成され放出される。Tafesse らは、SMS1 遺伝子 *SGMS1* をジ-

ントラップ法により欠失したヒト一倍体細胞 (*SGMS1*^{GT}) では、コントロール細胞 (KBM7) に比べて、flu の子孫ウイルス粒子の産生が抑制されていることを明らかにした¹³⁾。*SGMS1*^{GT} 細胞では、SMS2 (*SGMS2*) が残っているにもかかわらず、約 80% の SM 量が減少しており、SMS1 の SM 合成における貢献度が非常に高い。興味深いことに、*SGMS1*^{GT} 細胞へのウイルス感染後 24 時間において、³⁵S-メチオニン/セリンで標識して flu のヘマグルチニン (hemagglutinin : HA) や M1 タンパク質の合成量を調べたところ、KBM7 細胞と比べて、HA や M1 タンパク質の産生量自体は変化しないことから、flu の接着・侵入には差がないことが明らかとなった。また、感染後に ³⁵S 標識した HA や M1 タンパク質の細胞表面への露出が *SGMS1*^{GT} 細胞において著しく低下しており、イヌ腎臓尿管上皮細胞 MDCK へセリンパルミトイル転移酵素阻害剤 Myriocin 処理を行い、SM を含むスフィンゴ脂質合成を阻害すると、*SGMS1*^{GT} 細胞と同様に flu のタンパク質合成はそのままに、細胞表面への露出が抑えられた。以上のことから、SMS1 欠損または SM 合成の阻害による flu 構造タンパク質のゴルジ体から細胞表面への輸送の抑制は、SMS1 によって合成された SM がゴルジ体から形質膜へ輸送されることから、SM 合成-輸送経路を flu が利用していることを示唆している。しかしながら、SM のゴルジ体から形質膜への輸送の分子メカニズムはわかっておらず、細胞表面タンパク質の輸送、たとえば、MHC クラス I 糖タンパク質のような一般的な輸送経路を阻害しただけでは flu 構造タンパク質の形質膜への輸送・露出抑制されないことから、まったく別の輸送経路が存在していることを示している。

6. まとめ

形質膜 SM はゴルジ体において SMS によって合成され、輸送経路によって運ばれる。JEV では形質膜 SM を介したウイルス接着・侵入を、WNV では SM を利用した複製を、また、インフルエンザウイルスはゴルジ体からの SM 輸送経路を用いた構造タンパク質の輸送を利用して標的細胞へ感染して病態を示している (図 3)。このことから、生体膜 SM と SMS は、各々のウイルス感染を予防し、感染拡大を防ぐための標的因子となりうる。しかしながら、SMS は六つの膜貫通ドメインを有する非常に疎水性の高いタンパク質であり、タンパク質精製はできていない。よって、その立体構造も明らかとなっておらず、酵素としての性質も不明な点が多い。また SM 自身、単一の分子ではなく数多く存在する異なる炭素鎖の分子種が存在し、その生体膜脂質としての機能の違いはわかっていない。さらに、さまざまな分子種を持つ SM の合成を担う SMS1 および SMS2 の基質特異性に関してもいまだ不明である。SMS および SM 生合

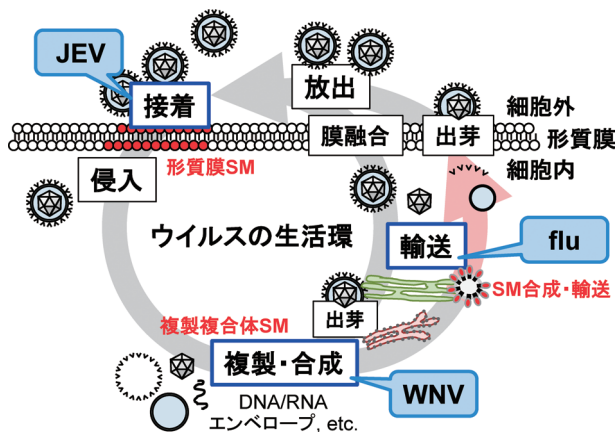


図3 ウイルスの生活環に関わる SM 生合成

多くのウイルスは細胞外から標的細胞へ接着、侵入、複製、タンパク質合成、ウイルス粒子形成を経て、再び細胞外へ放出され感染を拡大していく。JEVやWNVは小胞体内腔へ出芽することで子孫ウイルスが産生され、ゴルジ体からの細胞内分泌経路を経て形質膜へ融合後放出される。他方、fluは合成された構成タンパク質などが、ゴルジ体から輸送され形質膜表面に露出し、形質膜から出芽することで子孫ウイルスが放出される。SM生合成はこれらのウイルスの生活環に関与している。JEVでは形質膜への接着、WNVでは小胞体由来のウイルス複製複合体における複製、fluではウイルスタンパク質の輸送において、SMおよびその生合成経路が利用されている。

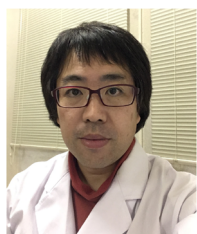
成は、ウイルス感染だけでなく、細胞増殖から炎症に至るまでさまざまな細胞生理活性を制御している可能性を秘めた非常に興味深い研究対象であり、その機能を明らかにすることによって臨床応用につながる事が期待できる。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、岡崎俊朗教授（金沢医科大学 血液免疫内科学）、竹上勉教授（金沢医科大学 総合医学研究所）のご指導、また、多くの共同研究者の方々のご

著者寸描

●谷口 真（たにぐち まこと）



金沢医科大学総合医学研究所生命科学研究所領域講師。博士（生命科学）。

■略歴 1978年岩手県生まれ、福岡県出身。2001年鳥取大学医学部生命科学科卒業。06年同大学大学院医学研究科博士課程修了、同大学医学部博士研究員を経て、12年6月金沢医科大学総合医学研究所助教、14年4月より現職。

■研究テーマと抱負 スフィンゴミエリンおよびセラミドを中心としたスフィンゴ脂質生物学。最近では、動物モデルやイメージングを用いて、生体内でのスフィンゴ脂質の役割を解明することを目的としている。

■趣味 スイーツ探訪、子供と雪遊び、晴れた日はプレイボード。

協力によって得られたものであり、この場を借りて深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Simons, K. & Gerl, M.J. (2010) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 688–699.
- 2) Taniguchi, M. & Okazaki, T. (2014) *Biochim. Biophys. Acta*, **1841**, 692–703.
- 3) 北谷和之, 浅野智志, 橋本真由美, 谷口 真, 岡崎俊朗 (2011) *生化学*, **83**, 495–505.
- 4) Kitatani, K., Taniguchi, M., & Okazaki, T. (2015) *Mol. Cells*, **38**, 482–495.
- 5) Shakor, A.B., Taniguchi, M., Kitatani, K., Hashimoto, M., Asano, S., Hayashi, A., Nomura, K., Bielawski, J., Bielawska, A., Watanabe, K., Kobayashi, T., Igarashi, Y., Umehara, H., Takeya, H., & Okazaki, T. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 36053–36062.
- 6) Asano, S., Kitatani, K., Taniguchi, M., Hashimoto, M., Zama, K., Mitsutake, S., Igarashi, Y., Takeya, H., Kigawa, J., Hayashi, A., Umehara, H., & Okazaki, T. (2012) *Mol. Cell. Biol.*, **32**, 3242–3252.
- 7) Taniguchi, M., Ogiso, H., Takeuchi, T., Kitatani, K., Umehara, H., & Okazaki, T. (2015) *Cell Death Dis.*, **6**, e1717.
- 8) Taniguchi, M., Kitatani, K., Kondo, T., Hashimoto-Nishimura, M., Asano, S., Hayashi, A., Mitsutake, S., Igarashi, Y., Umehara, H., Takeya, H., Kigawa, J., & Okazaki, T. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 39898–39910.
- 9) 光武 進 (2017) *生化学*, **89**, 86–89.
- 10) Takegami, T., Tasaki, T., Murakami, M., Ishigaki, Y., Taniguchi, M., Nojima, T., & Nukuzuma, S. (2015) in *Japanese Encephalitis*, pp. 1–17, SMGroup (USA), USA.
- 11) Taniguchi, M., Tasaki, T., Ninomiya, H., Ueda, Y., Kuremoto, K., Mitsutake, S., Igarashi, Y., Okazaki, T., & Takegami, T. (2016) *Sci. Rep.*, **6**, 37829.
- 12) Martín-Acebes, M.A., Gabandé-Rodríguez, E., García-Cabrero, A.M., Sánchez, M.P., Ledesma, M.D., Sobrino, F., & Saiz, J.C. (2016) *J. Lipid Res.*, **57**, 422–432.
- 13) Tafesse, F.G., Sanyal, S., Shour, J., Guimaraes, C.P., Hermanson, M., Somerharju, P., & Ploegh, H.L. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 6406–6411.