

脂質を標的とする膜作用物質の反応機構の研究

牧野 麻美

目次

第 1 章	はじめに	7
第 2 章	細胞膜の内層に局在する脂質、PE を標的にした毒素、シンナマイシンの作用機序	14
2-1	序論	14
2-2	方法	15
2-2-1	細胞	15
2-2-2	試薬	15
2-2-3	ビオチン化シンナマイシンの作製	15
2-2-4	固相法によるシンナマイシンの脂質への結合	15
2-2-5	乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)法による細胞生存率の測定	16
2-2-6	HeLa 細胞におけるシンナマイシンによる脂質のフロップの観察	16
2-2-7	リポソームの作製	16
2-2-8	人工膜を用いた脂質のフロップの測定	16
2-2-9	リポソーム融合の測定	16
2-2-10	電子顕微鏡による観察	17
2-3	結果	18
2-3-1	シンナマイシンの PE への結合	18
2-3-2	シンナマイシンの細胞毒性	19
2-3-3	細胞におけるシンナマイシンによる脂質のフロップの誘導	20
2-3-4	人工膜におけるシンナマイシンによる脂質のフロップの誘導	22
2-3-5	シンナマイシンによる PE を含む膜の再編成を膜融合実験で観察する	23
2-3-6	シンナマイシンによる PE を含む膜の再編成を電子顕微鏡で観察する	24
2-4	考察	25
2-4-1	シンナマイシンの細胞毒性の作用機序	25
2-4-2	PE プローブとしての可能性	26
第 3 章	細胞膜脂質 SM を標的にした毒素、ライセニンの作用機序	27
3-1	序論	27
3-2	方法	28
3-2-1	試薬	28

3-2-2	組み換えライセニンの作製	28
3-2-3	ELISA 法によるライセニンの脂質への結合	29
3-2-4	溶血活性の測定	29
3-3	結果	29
3-3-1	組み換えライセニンの作製と活性の解析	29
3-3-2	トリプトファン変異体の作製と活性の解析	32
3-3-3	I210F 変異体の作製と活性の解析	34
3-4	考察	35
3-4-1	LRP-1、LRP-2 の性状解析	35
3-4-2	芳香族アミノ酸の影響	35
3-4-3	ライセニンは SM ドメインを認識する	36
3-4-5	無毒化プローブの作製	37
第 4 章	D-PDMP による多剤耐性がん細胞の抗がん剤感受性のメカニズムの解析	38
4-1	序論	38
4-2	方法	39
4-2-1	細胞	39
4-2-2	試薬	39
4-2-3	脂質の抽出	40
4-2-4	抗 BMP 抗体による細胞染色	40
4-2-5	Filipin による細胞染色	40
4-2-6	抗 CD63 抗体による細胞染色	40
4-2-7	Nile red による細胞染色	41
4-2-8	糖脂質合成測定	41
4-2-9	電子顕微鏡による観察	41
4-2-10	細胞分画と脂質分析	41
4-2-11	X 線小角散乱測定	42
4-2-12	酸性リパーゼの測定	42
4-2-13	LDL の再構成	42
4-2-14	LDL の取り込み	43
4-2-15	LDL の分解	43

4-2-16	細胞内コレステロールとコレステロールエステル量の測定	43
4-2-17	正常ヒト線維芽細胞のコレステロールのエステル化	43
4-2-18	GM95 細胞と Neuro-2a 細胞のコレステロールのエステル化	44
4-2-19	ストレプトリシン O 処理	44
4-2-20	パクリタキセル (タキソール) による細胞毒性	44
4-2-21	蛍光パクリタキセルの取り込み	44
4-3	結果	45
4-3-1	D-PDMP と MB-DNJ は糖脂質の合成を阻害するが L-PDMP は阻害しない	45
4-3-2	D-PDMP は後期エンドソームに富む BMP-ドメインの形態を変化させる	46
4-3-3	D-PDMP は BMP を含む膜に分配される	47
4-3-4	D-PDMP は pH 依存的に BMP 膜の組成を変化させる	48
4-3-5	D-PDMP は BMP による酸性リパーゼの活性化を阻害する	50
4-3-6	D-PDMP は LDL の分解を阻害し、細胞内のコレステロールエステル量を 増加させる	51
4-3-7	D-PDMP、または L-PDMP はコレステロールのエステル化を阻害する	53
4-3-8	D-PDMP はコレステロールの分布を変える	54
4-3-9	PDMP はコレステロール依存的にニューロブラストーマ細胞における パクリタキセルの輸送を調節する	56
4-4	考察	57
4-4-1	D-PDMP は糖脂質合成非依存的にコレステロールのホメオスタシスを変える	57
4-4-2	D-PDMP はコレステロールのホメオスタシスを変えることで、 抗がん剤の輸送を調節する	58
4-4-3	多剤耐性における糖脂質の役割	59
4-4-4	BMP ドメインは疎水性アミンの一般的なターゲットか?	60
第 5 章	まとめと展望	61
引用文献		63
謝辞		73

*略称について

本論文にて使用した略称を以下に示す

ACAT	Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase
BHK	Baby hamster kidney
BSA	Bovine serum albumin
CHO	Chinese hamster ovary
D-PDMP	D- <i>threo</i> -1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FITC-SA	Streptavidin, fluorescein
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
HPLC	High performance liquid chromatography
ITC	Isothermal titration calorimetry
L-PDMP	L- <i>threo</i> -1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol
LDH	Lactate dehydrogenase
LDL	Low-density lipoprotein
LPDS	Lipoprotein-deficient serum
MBP	Maltose-binding protein
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NB-DNJ	N-butyl-deoxynojilimycin
PBS	Phosphate-buffered saline
PEG	Poly(ethylene glycol)
TBS	Tris-buffered saline
TLC	Thin-layer chromatography

*略称について

本論文にて使用した脂質の略称を以下に示す

C6-NBD-Cer	6-[[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]hexanoyl]sphingosine
C6-NBD-PC	1-Palmitoyl-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholine
C6-NBD-PE	1-Myristoyl-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]- <i>s</i> <i>n</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamine
CL	Cardiolipin
Cer	Ceramide
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholine
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamine
GM1	Monosialoganglioside GM1
GM3	Monosialoganglioside GM3
GalCer	Galactosyl Ceramide
Gb3	Globotriaosylceramide
GlcCer	Glucosyl Ceramide
LBPA/BMP	Lyso-bis-Phosphatidic acid/Bis(monoacylglycero)phosphate
LacCer	Lactosyl Ceramide
N-LRh-PE	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (Ammonium Salt)
N-NBD-PE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-(Lissamine Rhodamine B Sulfonyl) (Ammonium Salt)
PA	Phosphatidic acid
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidylethanolamine
PI	Phosphatidylinositol
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholine
POPE	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamine

PS	Phosphatidylserine
S1P	D- <i>erythro</i> -Sphingosine-1-phosphate
SM	Sphingomyelin
SPC	D- <i>erythro</i> -Sphingosylphosphorylcholine
Sph	D- <i>erythro</i> -Sphingosine

第1章 はじめに

細胞膜やオルガネラ膜は脂質二重層を基本構造としている。脂質分子は両親媒性で親水性部位と疎水性部位を持つ。細胞膜を形成する主要脂質であるリン脂質の多くは、親水性の頭部と2本の疎水性の炭化水素鎖の尾部がある。脂質分子はその構造と両親媒性のおかげで、水溶液中で疎水性の尾部を内側に包み込み、親水性の頭部を水相に面するように集合し、自然に二重層を形成する。この脂質二重層によって細胞の内部と外部、またはオルガネラの内部と外部を区切っており、細胞独自、またはオルガネラ独自の環境を保っている。細胞膜には数多くのタンパク質が存在し、隣接細胞との結合や、外部からのシグナルを内部に伝達している。

生体膜の基本構造である脂質二重層構造はたった一種類の脂質分子を用いて人工的に作ることができる。しかし、自然界には数千種類の脂質が存在し、各脂質の存在意義が想像される。そして様々な生物、臓器において脂質組成は異なり、植物にある脂質が動物にはない、脳にはスフィンゴ脂質が豊富に存在するといったように自然界での脂質の分布は一様ではない。また同じ臓器の中でも異なった細胞では脂質組成は異なる。例えば、小脳に存在する二つの細胞、プルキンエ細胞とグリア細胞は脂質組成が異なる。さらには一つの細胞の中においてもオルガネラ間で脂質組成は異なる(Fig.1-1)。ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)は全てのオルガネラにほぼ均等に分布している。スフィンゴミエリン(SM)はゴルジ体や細胞膜に多く存在する。一方でカルジオリピン(CL)はミトコンドリアに、リゾビスホスファチジン酸(LBPA)/ビス(モノアシルグリセロ)リン酸(BMP)は後期エンドソームにという様にオルガネラに特異的に存在する脂質もある。このように、多種多様な脂質が存在し、特定の局在を示す理由は明らかになっていないが、脂質の合成、分解、輸送、拡散の動的平衡が脂質の分布を決めていると考えられる。脂質合成酵素の多くは小胞体の細胞質側に局在しているため、生合成された脂質は小胞輸送または輸送タンパク質を介する輸送によって各オルガネラに運ばれている。例えば、セラミドは小胞体で合成された後、一部は糖脂質に合成され、もう一方はゴルジ体に輸送され、SMになる。SMはゴルジ体で合成された後、細胞膜に輸送される。また細胞内で合成された脂質の輸送だけではなく、細胞外から取り込んだ脂質の輸送も細胞内のオルガネラの脂質組成が異なることの理由と考えられる。低密度リポタンパク質の形で取り込まれた脂質は細胞膜からエンドサイトーシスされ、初期エンドソーム、後期エンドソームを経てリソソームで分解される。また、細胞膜上の脂質はエンドサイトーシスされ、リサイクリングエンドソームを経て細胞膜に戻る。このように脂質が細胞内を輸送されることで、脂質は不均一な分布を示す。

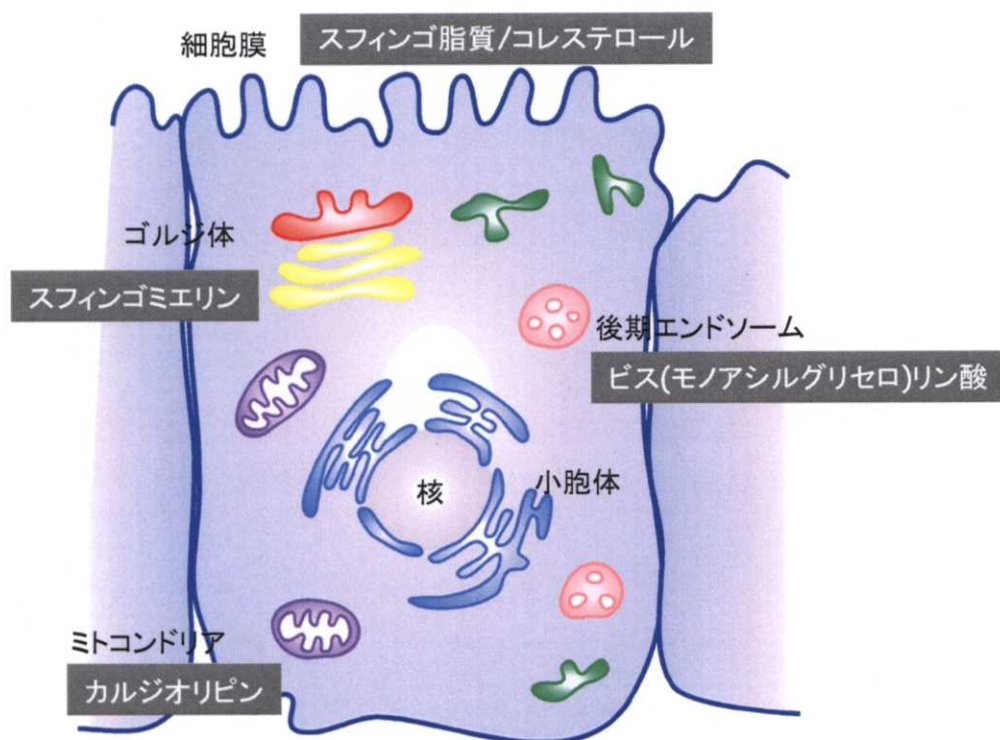


Fig.1-1 細胞内のオルガネラにおける脂質の分布

さらに脂質は同一膜上でも分布の偏りが見られる。先に述べたように SM は細胞膜に多く存在するが、その SM が糖脂質やコレステロールとともに微小なドメイン構造を形成していると考えられている(Fig.1-2)。スフィンゴ脂質は長い飽和脂肪酸鎖を持ち、スフィンゴ脂質同士が相互作用しやすい性質を持つ。その長い飽和脂肪酸鎖の間にコレステロールが入り込み、その結合をより強固にしている。そして多くのタンパク質がこの微小なドメインに存在し、シグナル伝達などに重要であると考えられている。

また同一膜上において脂質は二重層の外層と内層においても分布が異なる。ヒト赤血球膜ではコリンを頭部を持つ PC や SM のほとんどは外層に、一級アミノ基を末端を持つ PE やホスファチジルセリン(PS)のほとんどは内層に存在するといわれている。PC と PE を用いて作った人工膜では PE は膜の外層内層の両方に分布することから、脂質の構造上の性質により、細胞膜の外層内層の脂質の非対称性を形成しているわけではない。また細胞内のタンパクキナーゼ C は細胞外部からのシグナルに応じて活性化される際、負電荷を持った PS などの脂質が必要であるということからわかるように、生物が生きていくために、脂質はこのような非対称性の分布をしていると考えられる。

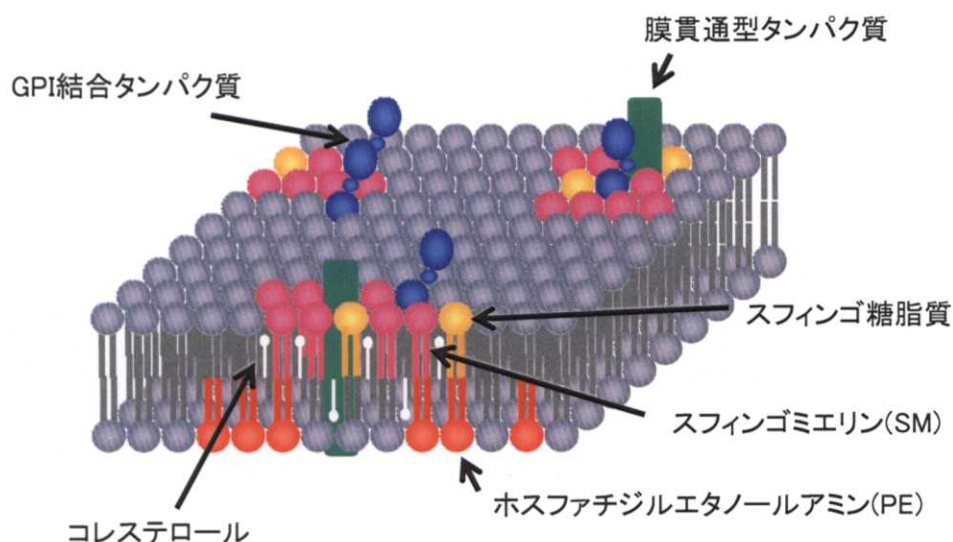


Fig.1-2 脂質ドメインの構造

つまり、特徴的な分布を示すことが栄養の取り込みや輸送、分解、細胞分裂や遺伝情報の維持、伝達といった生物のホメオスタシスに重要であると考えられる。脂質は単に膜を形成する構成成分であるだけでなく、脂質あるいは脂質集合体そのものに機能が存在するのである。

脂質の機能を知る一つの方法は脂質に働きかけるタンパク質を研究する方法である。脂質の代謝や輸送に関与するタンパク質の機能を破壊、修飾するなどして特定の脂質の存在量と分布を変化させ、生理的役割を知るというものである。もう一つは脂質に直接働きかける方法である。特定の脂質に結合する物質、または特定の脂質の性質に影響を与える物質を用いて、結果として生ずる脂質動態の変化あるいは細胞機能の変化からその脂質の機能を知るアプローチである。本研究で私は後者の、脂質に直接働きかける方法を用いて幾つかの脂質プローブの作用と標的脂質の機能を研究した。

脂質に直接作用し、脂質の機能を変化させる物質は、脂質のプローブとしても用いることが可能である。特定の脂質を見るためのプローブとして用いられている物質は以下のようなものがあげられる。

コレステロールを見る物質

1、ポリエー系抗生物質

コレステロール、エルゴステロールといったステロールに結合する(Norman et al., 1972)。①フィリピンは分子量が比較的小さく、共役二重結合に由来する特有の吸収・蛍光スペクトルを示すため(Castanho et al., 1992)、細胞内のコレステロールを染色するのも最もよく用いられている。

しかし毒性が強いため、生きた細胞では用いることができず、退色も早い。②ナスタチンは細胞に処理すると、コレステロールに富んだ陥入構造、カベオレ依存的なエンドサイトーシスを阻害することが報告されており、阻害剤として用いられている(Singh et al., 2003)。③アンホテリシン B は細胞表面のコレステロールを認識し、細胞膜に穴を開けて毒性を示すため、細胞表面のコレステロール量を測定するときに用いられる。

2、コレステロールアナログ

①fPEG-Chol はコレステロールに親水性の PEG(polyethylene glycol)を結合させ、さらにその先に蛍光をつけたものである。我々の研究により、最近 fPEG-Chol がコレステロールに富んだ膜に親和性があることが示された(Sato et al., 2004)。毒性が低いため生きた細胞でのコレステロールの局在を調べることができる。fPEG-Chol を細胞にマイクロインジェクションしたときにゴルジ体が染色されたことから、ゴルジ体の細胞質側にはコレステロールが豊富にあることが示された。②デヒドロエルゴステロールは多くの点でコレステロールと同じ性質を持ち(Hao et al., 2002; Mukherjee et al., 1998; Scheidt et al., 2003)、それ自身が蛍光を発するためコレステロールの動態の研究に用いられるが、シグナルが弱いため検出が難しい。

3、コレステロール結合性細菌毒素

Clostridium perfringens の θ 毒素(パーフリンゴリジン O)やストレプトリシン O(SLO)はコレステロールをターゲットとして細胞膜に結合するポア形成毒素である。 θ 毒素のコレステロールへの結合特異性は高く(Ohno-Iwashita et al., 1990)、結合にコレステロールの 3β -OH 基が必須である。 θ 毒素をタンパク質分解酵素により限定分解後ビオチン化することで毒性を欠損したプローブが作製され、研究に用いられている(Iwamoto et al., 1997)。

リン脂質を見る物質

1、シンナマイシン、デュラマイシン

PE を特異的に認識する放線菌由来の毒素。酵母におけるシンナマイシン感受性変異株の解析から、リン脂質のフリップフロップに関与していると考えられている Ros3p が同定された(Kato et al., 2002)。シンナマイシンの細胞毒性機構については第 2 章で紹介する。

2、アネキシン

アネキシンは Ca^{2+} 依存的に膜リン脂質と結合することが知られているタンパク質ファミリーである(Reutelingsperger and van Heerde, 1997)。その中でもアネキシン V は主に細胞膜の内側に存在する PS と強く結合する。PS は細胞がアポトーシスを起こした際、細胞膜の外層に露出することから、蛍光標識したアネキシン V はアポトーシスのマーカーとして用いられている。

3、ホスファチジルイノシトールリン酸の特異的結合ドメイン

シグナル伝達脂質のひとつであるイノシトールリン脂質は、その特異的部位のリン酸化により合計 7 種類存在する。イノシトールリン脂質は主に細胞膜の内側に存在し、シグナル伝達の場合として注目されている。イノシトールリン脂質がリン酸化されることにより、イオンチャンネル、タンパク質リン酸化酵素など、多くのシグナル伝達分子の働きが調節されている。リン酸化されたイノシトールリン脂質はそれぞれを認識するシグナル分子を引き寄せ、シグナル伝達複合体を形成することが知られている。このシグナル分子のドメインがイノシトールリン脂質を認識していることがわかり、幾つかのドメインが同定された(Overduin M, 2001)。FYVE ドメインは $\text{PI}(3)\text{P}$ を特異的に認識する。PH ドメインは $\text{PI}(4)\text{P}$, $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ などに結合する。これらのタンパク質に、GFP(green fluorescent protein)を結合させたキメラタンパク質を用いて細胞内のイノシトールリン酸を検出しているが、特異性を疑問視する報告もある。

4、抗 BMP 抗体

後期エンドソームに特異的に局在する BMP に特異的に結合するモノクローナル抗体である(Kobayashi et al., 1999)。細胞の後期エンドソームマーカーとして広く用いられている。また抗 BMP 抗体を細胞に処理すると後期エンドソームからのタンパク質の輸送が阻害される、後期エンドソームにコレステロールが蓄積することが報告されており(Kobayashi et al., 1999)、細胞のホメオスタシスに影響を及ぼすことが示唆される。

5、蛍光標識リン脂質アナログ

天然型の脂質の脂肪酸部分を蛍光標識した鎖長の短い脂肪酸で置換した蛍光標識リン脂質は脂質の輸送やリサイクリングを調べるのに用いられる。一番の利点は生きた細胞で脂質の輸送を顕微鏡下でリアルタイムに観察できることである。一方、脂肪酸が短く、蛍光がついた分、疎水性は下がり、蛍光誘導体が天然の脂質の動態と反映しているかどうかは議論の余地がある。

スフィンゴ脂質を見る物質

1、コレラ毒素 B サブユニット(CTB)

コレラの原因であるコレラ毒素は毒素活性を持つ A サブユニットと、ガングリオシド GM1 に結合する B サブユニット 5 量体からなる。GM1 は 5 糖の糖鎖を持つスフィンゴ脂質であり、主に細胞膜の外層に存在する。毒性もなく GM1 へ特異的に結合するため、CTB は広く用いられている。一方で、CTB が GM1 の架橋を誘導する可能性が議論されており、自然状態の GM1 の局在を検出するのは難しい。

2、ライセニン

SM を特異的に認識するシマミミズ(*Eisenia foetida*)の体腔液から得られる毒素(Sekizawa et al., 1997)。ライセニンの SM への結合のメカニズムは第 3 章で詳しく紹介する。

3、蛍光標識スフィンゴ脂質アナログ

蛍光標識リン脂質アナログと同様に、NBD-SM といった蛍光標識スフィンゴ脂質アナログは *de novo* 合成されたスフィンゴ脂質の輸送を見るのに用いられている。

4、抗 SM 抗体・抗糖脂質抗体

抗 SM 抗体は SM 特異的ではなく、PC などのコリン含有リン脂質を認識する。抗糖脂質抗体も、特異性が低い。これらの抗体はサブクラスとして IgM に属するものが多い。

以上に一部ではあるが、脂質アナログ及び、脂質をターゲットにして結合する毒素や化合物をあげた。先に述べたように脂質はオルガネラ間、または外層内層によって分布が異なるが、これらの結果は主に、細胞内からオルガネラを精製し、脂質分析を行うというような生化学実験を元に報告されている。このような生化学実験では各オルガネラの微量の混入を防ぐことはできず、脂質の詳細な分布はわからない。上記した脂質プローブは、細胞内の脂質の分布や動態を観察するのに有用であると考えられる。

いろいろな研究者により、これらの物質の性状解析が行われ、一部の毒素は無毒化、ビオチン化、あるいは蛍光標識され、脂質プローブとして利用されているが、特異性が低かったり、使用方法が限定されていたりと未だに問題点が多い。この中で、シンナマイシン、ライセニンはそれぞれリン脂質、スフィンゴ脂質を特異的に結合する珍しい毒素である。本研究ではこの二つの毒

素の作用機序を研究し、プローブとしての有用性、発展性を考察した。第 2 章でシンナマイシンについて、第 3 章でライセニンについて述べる。またいろいろなプローブの中で興味深いのは抗 BMP 抗体である。この抗体は細胞内の BMP に結合することで BMP の働きを阻害することが可能である。単に脂質を見るプローブとしてではなく、脂質の働きを阻害する阻害剤でもあると考えられる。このように、脂質を標的にして脂質自身の働きを阻害する化合物として今回、糖脂質合成阻害剤 D-PDMP の新たな作用について第 4 章で言及する。D-PDMP は特定の脂質を認識するプローブではないが、ある条件下で脂質の構造を変化させ、その結果脂質に制御されているタンパク質の活性を阻害している。本研究ではシンナマイシン、ライセニン、D-PDMP という脂質を標的とする物質の作用機構を解析し、これらを用いて脂質機能の解明への応用について考察した。

第 2 章

細胞膜の内層に局在する脂質、PE を標的にした毒素、シンナマイシンの作用機序

2-1 序論

細胞膜の内層と外層で脂質は不均等に分布している。スフィンゴ脂質や PC は主に細胞膜の外層に存在し、PS や PE のようにアミノ基を持ったリン脂質は細胞膜の内層に存在する。第 1 章で述べたように、脂質を認識する毒素が幾つか知られている。それらの多くは細胞膜の外層に局在する脂質を認識する。ライセニン は SM を特異的に認識する。コレラトキシンはガングリオシド GM1 に結合し(Lencer et al., 1999)、シガトキシンは Gb3 に結合する(Lingwood, 1999)。

シンナマイシン(Ro09-0198)は 19 アミノ酸からなるテトラサイクリックペプチドで、放線菌 *Streptovorticillium griseovorticillatam* から精製される(Fig.2-1)(Kessler et al., 1992)。シンナマイシンは lantibiotics に分類されている。Lantibiotics はバクテリオシンで、通常存在しないアミノ酪酸といったアミノ酸をもつという特徴がある(McAuliffe et al., 2001)。多くの lantibiotics が他のグラム陽性菌に対して働くのに対して、シンナマイシンはバクテリアだけがターゲットではない。様々な動物の赤血球はシンナマイシン処理により溶血する(Choung et al., 1988a)。シンナマイシンは細胞に対しても毒性を示すが、その標的脂質が細胞膜の内層に多く存在する PE であることはとても興味深い(Choung et al., 1988b; Machaidze et al., 2002; Hosoda et al., 1996)。しかしシンナマイシンがどのように細胞膜の内層の PE に結合し、毒性を示すのかはわかっていなかった。本研究ではシンナマイシンの細胞毒性のメカニズムの解明を目的とし、研究を行った。

シンナマイシンはまた PE のプローブとしても有用である。榎本らはシンナマイシンのビオチン化誘導体と蛍光標識したストレプトアビジンとにより複合体を形成させ、細胞毒性を消失した FL-SA-Ro を作製した。FL-SA-Ro を用いて CHO 細胞を観察した結果、分裂終期の細胞の分裂溝にのみ、蛍光シグナルが検出され、分裂溝では PE が細胞膜の外層に露出していることがわかった。しかしシンナマイシンに、ビオチン、ストレプトアビジンさらには蛍光を結合したこのプローブは分子量が大きく、分子量 2000 というシンナマイシンのプローブとしての利点が活かされていない。リン脂質を認識するプローブは貴重であることから、シンナマイシンのプローブとしての可能性、無毒化プローブ作製の可能性についても考察する。

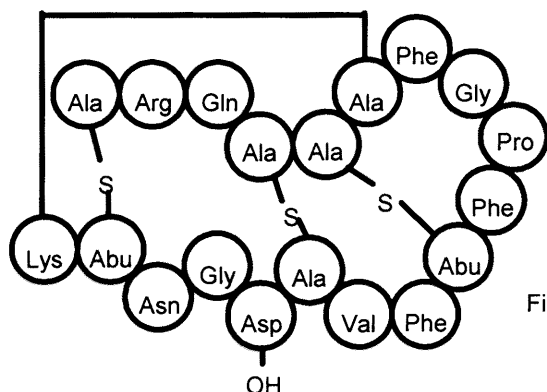


Fig.2-1 シンナマイシンの構造

2-2 方法

2-2-1 細胞

HeLa 細胞は 10 %血清を含む DMEM 培地で培養した。

2-2-2 試薬

DOPC、POPC、DOPE、POPE、C6-NBD-PC、C6-NBD-PE、N-LRh-PE は Avanti Polar Lipids から購入した。Alexa488-Annexin V、Alexa546-streptavidin は Molecular Probes から購入した。シンナマイシンは日本ロシュの石塚先生より分与された。

2-2-3 ビオチン化シンナマイシンの作製

シンナマイシンを 0.1 M NaHCO₃ に溶かし約 0.5 mM の溶液を調製し、500 μ l を、EZ-Link™ sulfoNHS-LC-Biotin 500 μ l と混合し室温で 2 時間放置した。1 M lysine を 100 μ l 加えて反応を停止した。減圧遠心を行い、反応後の溶液を 250 μ l に濃縮し、20 μ l ずつ HPLC にかかけ、6.8 ~ 7.3 分付近に現れるピークを回収した(Aoki et al., 1994)。

2-2-4 固相法によるシンナマイシンの脂質への結合

エタノールに溶解した 10 μ M の脂質を 50 μ l ずつ 96 穴のプラスチックプレート(Immuron 1、Dinatech Laboratories)に加えた。室温で放置し、溶媒を蒸発させ、200 μ l の 3 % BSA/TBS (10 mM Tris-HCl(pH7.4)、150 mM NaCl)を加えて室温で 2 時間放置し、ブロッキングした。TBS で洗浄後 50 μ l の 100 nM ビオチン化シンナマイシン/ 1% BSA-TBS を加えて室温で 2 時間結合させた。Peroxidase-conjugated ストレプトアビジンを室温で 30 分間処理してから、 α -phenylenediamine を基質として発色し、490 nm の波長で吸光度を測定した。

2-2-5 乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)法による細胞生存率の測定

死細胞から遊離される LDH の測定は MTX”LDH”(極東製薬工業株式会社)のキットを用いて行った。細胞にシンナマイシンを 37°C で処理した後、試験試薬を加えて 37°C で 30 分間インキュベートした。希釈反応停止液を加えてプレートリーダーにて 560 nm 波長で測定した。0.2% Tween を細胞に処理したときの値を 100%細胞死とした。

2-2-6 HeLa 細胞におけるシンナマイシンによる脂質のフロップの観察

HeLa 細胞はカバーガラスに培養し、緩衝液(10 mM Hepes-NaOH(pH 7.4)、140 mM NaCl、2.5 mM CaCl₂)で洗浄した。1 μ M ビオチン化シンナマイシンを加えた。この時緩衝液には Alexa488 Annexin を加えておいた。1、5、10、30 分後に細胞を洗浄し、3 % PFA で固定した。Alexa546 streptavidin を加えて室温で 1 時間放置した。PBS で洗浄後、Mowiol でマウントした。サンプルは Zeiss LSM510 共焦点顕微鏡を用いて観察した。

2-2-7 リポソームの作製

多重層リポソーム(MLVs)は lipid film に緩衝液を加えてボルテックスして作製した。大きな一枚膜リポソーム(LUVs)は MLVs を作製した後、凍結融解を 3 度繰り返し、extruder を用いて 0.1 μ m のフィルターを通して作製した。

2-2-8 人工膜を用いた脂質のフロップの測定

0、1、5、10 % DOPE,POPE を含んだ DOPC、POPC リポソームに C6-NBD-PC、C6-NBD-PE を加えて LUVs を作製した。LUVs は初め 400 μ g/ml BSA と混合し膜表面の蛍光脂質を消光しておいた。次に 2.5 μ M シンナマイシンを加えた。30°C で時間変化測定を行い、蛍光を測定した。(励起波長 475 nm、 蛍光波長 530 nm) 測定は FP-6500(JASCO)を用いた。

2-2-9 リポソーム融合の測定

1 mol% N-NBD-PE と N-LRh-PE を含んだ 100 μ M MLVs (ドナーリポソーム) と蛍光を含まない 1 mM MLVs (アクセプターリポソーム) を混合し、そこに 1 μ M シンナマイシンを加えた。FP-6500(JASCO)を用いて蛍光の時間変化測定を行った。膜が融合することで N-LRh-PE によって消光されていた N-NBD-PE の蛍光が検出された(Struck et al., 1981; Kobayashi and Pagano, 1988)。(励起波長 475 nm、 蛍光波長 530 nm)

2-2-10 電子顕微鏡による観察

50 nmol の脂質を含む多重層リポソームを 2 μ g のビオチン化シンナマイシンと 37°C で 30 分間インキュベートした。2.5 % グルタルアルデヒドを加えて、37°C で 1 時間固定してから PBS で洗浄し遠心した。懸濁液をポリ-L-リジン処理した銅グリッドまたはホルムバール支持膜つき銅グリッドに吸着してから 4 % 酢酸ウラニルでネガティブに染色した。サンプルは電子顕微鏡(日立 H-7500)を用いて観察した。

免疫染色では上記のように固定したサンプルに 2 % BSA/PBS 加えて 4°C で 1 時間ブロッキングした。その後同様に、ポリ-L-リジン処理した銅グリッドまたはホルムバール支持膜つき銅グリッドに吸着してから金コロイド標識抗ビオチン IgG を室温で 1 時間処理した。水で洗浄後、1 % グルタルアルデヒドを加えて 5 分間再び固定し、4 % 酢酸ウラニルでネガティブ染色した。

フリーズフラクチャー法ではシンナマイシンと処理した多重層リポソームは高圧凍結機(HPM 010, BALTEC)により凍結し、液体窒素にすばやく入れた。サンプルは凍結エッチング機(BAF 400T, BALTEC)により-110°C で分断後、platinum/carbon によりレプリカし、Formvar/carbon コートした銅グリッドに吸着してから観察した。

2-3 結果

2-3-1 シンナマイシンの PE への結合

シンナマイシンはバクテリアばかりでなく哺乳細胞や酵母に対して毒性を示す(Emoto et al., 1999; Kato et al., 2002)。シンナマイシンに耐性な CHO 細胞は PE の合成ができない(Emoto et al., 1999; Emoto and Umeda, 2000)。つまりこれはシンナマイシンが毒性を示すのに PE が必要であることを示している。シンナマイシンの様々な脂質、またはタンパク質への結合の検証は報告されているが、糖脂質についての報告はなかった(Choung et al., 1988b; Machaidze et al., 2002)。そのためまず初めにいろいろなリン脂質と糖脂質へのシンナマイシンの結合の可能性を固相法により検討した。その結果、シンナマイシンは PE に特異的に結合し、PS にもわずかだが結合した(Fig.2-2)。そのほかのリン脂質、糖脂質への結合は見られなかった。シンナマイシンは 4℃でも 37℃でも PE に結合した(Fig.2-2)(Makino et al., 2003)。

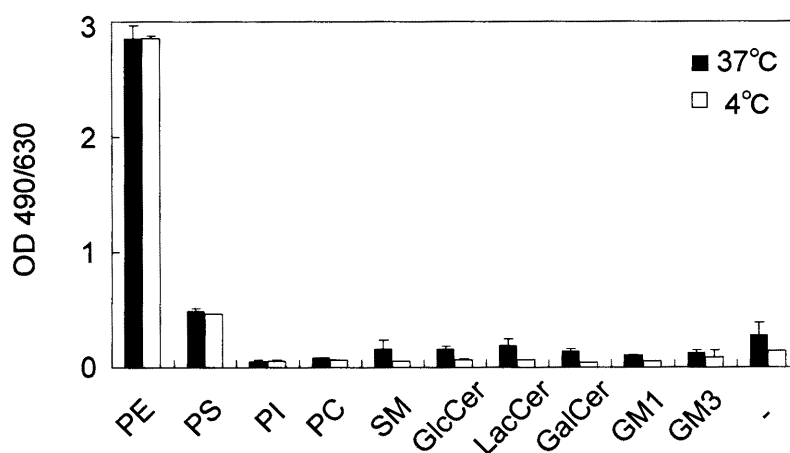


Fig.2-2 シンナマイシンのPEへの結合(固相法により測定)。
実験は2回行った。-は脂質をくわえなかったもの。

2-3-2 シンナマイシンの細胞毒性

シンナマイシンは 4℃においても PE に結合することが示された。次に HeLa 細胞に対するシンナマイシンの毒性の温度依存性を LDH 法を用いて測定した。37℃でシンナマイシンを処理すると細胞は時間依存的に LDH を放出し、細胞質が漏出していることがわかった(Fig.2-3)。ビオチン化シンナマイシンにおいても同様の結果が得られた。しかし 4℃で細胞に処理すると 30 分たっても LDH の漏出は見られなかった。次に 4℃で細胞にシンナマイシンを処理してから、余分なシンナマイシンを洗浄し除き 37℃で 30 分処理をした。この場合にも LDH の漏出は見られなかった。以上の結果は 4℃で細胞に結合したシンナマイシンの量では細胞に毒性を示さないことを示している。この結果から 4℃では細胞表面の PE の量が少ないため、十分量のシンナマイシンが結合できないものと考えられた。

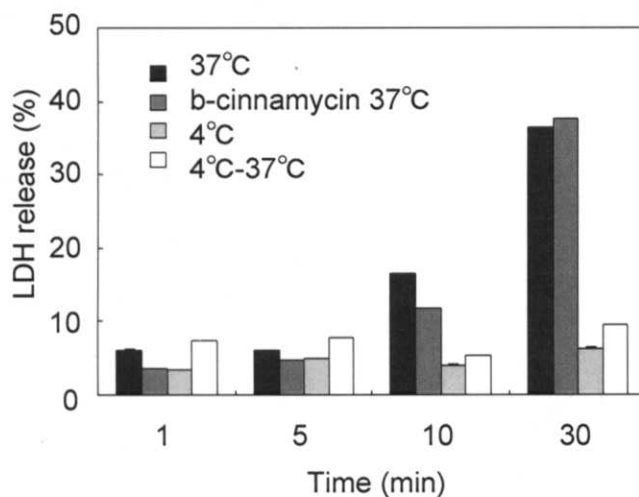


Fig.2-3 シンナマイシンの細胞毒性 (LDH法により測定)。
37°C:37℃でシンナマイシンを処理した。
b-cinnamycin 37°C:37℃でビオチン化シンナマイシンを処理した。4°C:4℃でシンナマイシンを処理した。4°C-37°C:4℃でシンナマイシンを30分間処理してから洗い、37℃でさらに30分間インキュベーションした。実験は2回行った。

2-3-3 細胞におけるシンナマイシンによる脂質のフロップの誘導

次に、シンナマイシン処理により細胞の脂質分布がどう変化するのかを細胞を用いて観察した。この実験では細胞表面の PE の分布を知るためにビオチン化シンナマイシンを使用した。また PE 同様に細胞膜の内側に多く存在する PS のプローブとして、Alexa488 Annexin V を用いた。Annexin V はカルシウム依存的に PS のようなマイナス荷電をもった脂質に結合することが知られている(Reutelingsperger et al., 1985; Reutelingsperger et al., 1988; Andree et al., 1992; Tait et al., 1989)。今回の実験では細胞表面の PE, PS を観察するため、細胞を固定してから穴あけを行わず、細胞染色を行った。HeLa 細胞を 37℃ でビオチン化シンナマイシンで処理してから、細胞を観察したところ、1 分後では PE も PS もほとんど観察されなかった。5 分後、10 分後には細胞の表面に糸状のシグナルが観察された。30 分後には細胞膜のほぼ全体において、PE、PS の両方のシグナルが観察された(Fig.2-4 A)。この結果はシンナマイシンを加えることで、細胞表面に PE、PS が露出してくることを示している。4℃ でシンナマイシン処理して細胞を洗浄後 37℃ に加温し 30 分後に細胞を観察してもシグナルは得られなかった(Fig.2-4 B)。またシンナマイシンを加えないと、PS は外層に露出しないことがわかった。この結果から、シンナマイシンにより細胞の表面に PE や PS が露出することが細胞毒性に関係していることが示唆された。

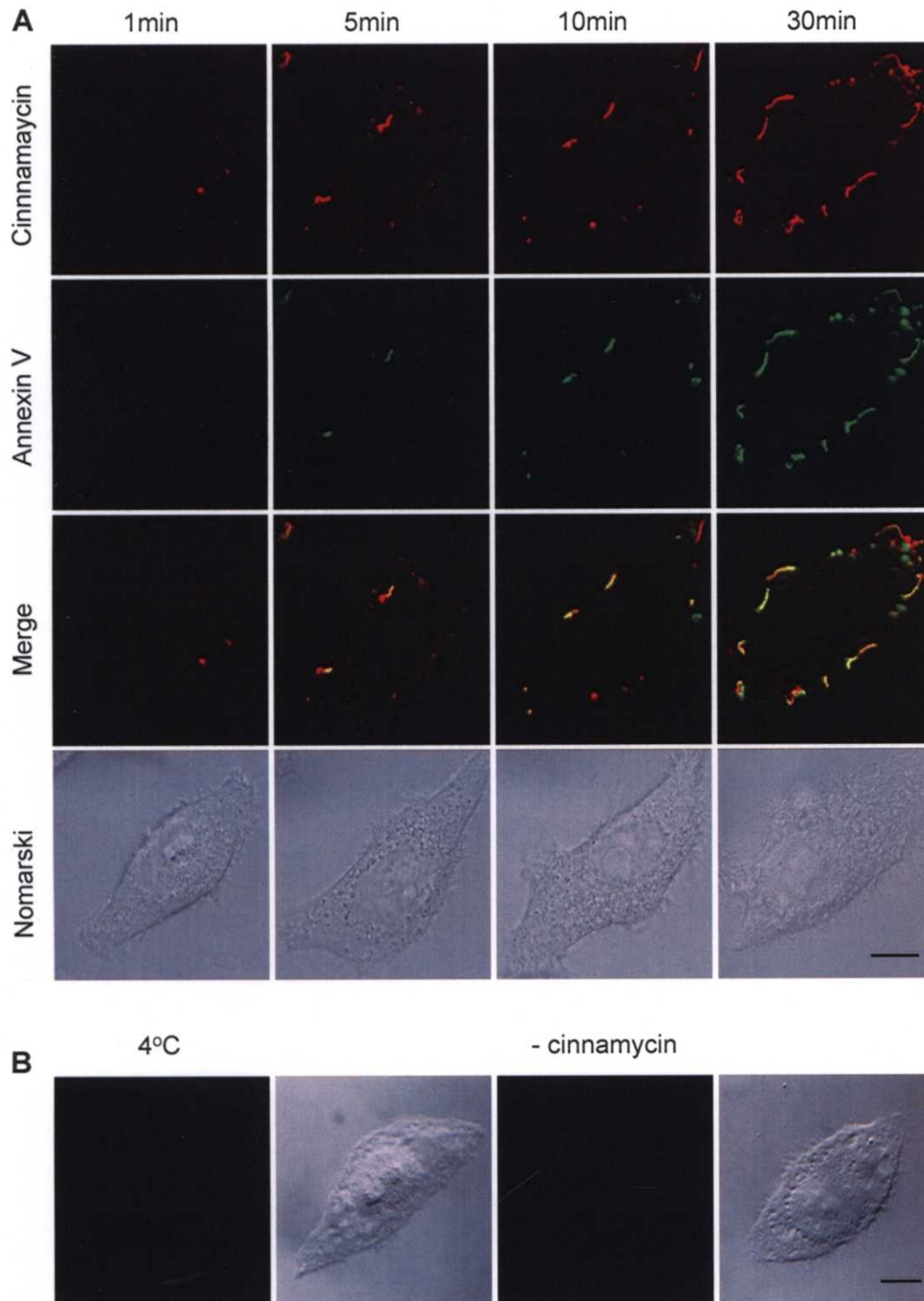


Fig.2-4 シンナマイシンによる細胞の脂質のフロップの誘導。
 (A)HeLa細胞に1 μ Mのビオチン化シンナマイシンとAlexa 488 Annexin V(緑)を加えて37°Cで1, 5, 10, 30分間インキュベーションした。固定してからAlexa 546 ストレプトアビジン(赤)を加えて観察した。Bar=10 μ m。(B左)細胞にAlexa 488 Annexin Vと1 μ Mシンナマイシンを4°Cで処理した。(B右)細胞にAlexa 488 Annexin Vのみを処理して37°Cで30分間処理した。固定してからAlexa 546 ストレプトアビジン(赤)を加えて観察した。

2-3-4 人工膜におけるシンナマイシンによる脂質のフロップの誘導

シンナマイシンによる脂質のフロップの誘導が、シンナマイシン自身によるものか、または細胞のタンパク質が関与しているのかを検討するために、人工膜を用いた実験を行った。C6-NBD-PC を含んだリポソームを作製し、そこに BSA を加える。BSA は膜表面の C6-NBD-PC を引き抜き、蛍光を消光するため、蛍光量が減少する(Valcarcel et al., 2001; Marx et al., 2000)。そこにシンナマイシンを加えたところ蛍光量はさらに減少した(Fig.2-5A)。POPE を含むリポソームではシンナマイシンの添加により、脂質のフロップが誘導され、リポソームの内層から外層に出てきた蛍光脂質が BSA により消光されたためと考えられる。この減少の度合は、リポソームに含まれる POPE の量に依存していることがわかった。またわずか 1% の POPE がはいっているだけでもシンナマイシンによってフロップが誘導された。POPE が 0 % のリポソームでは脂質のフロップが誘導されなかったことから、シンナマイシンは PE 依存的に脂質のフロップを誘導していることがわかった。この実験では PE のまったく含まれていないリポソームを用意するため、C6-NBD-PC を用いたが、この実験で見ているのは C6-NBD-PC という PE ではない脂質のフロップである。そこで次に C6-NBD-PE を用いて実験を行った(Fig.2-4 B)。C6-NBD-PE を含むリポソームにおいても C6-NBD-PC と同様にシンナマイシンによりフロップが誘導された。この結果は PE が存在するとシンナマイシンが脂質を選ばずフロップさせることを示している。また人工膜の実験において脂質のフロップが誘導されたことから、この現象はシンナマイシン自身の働きによるものと考えられる。

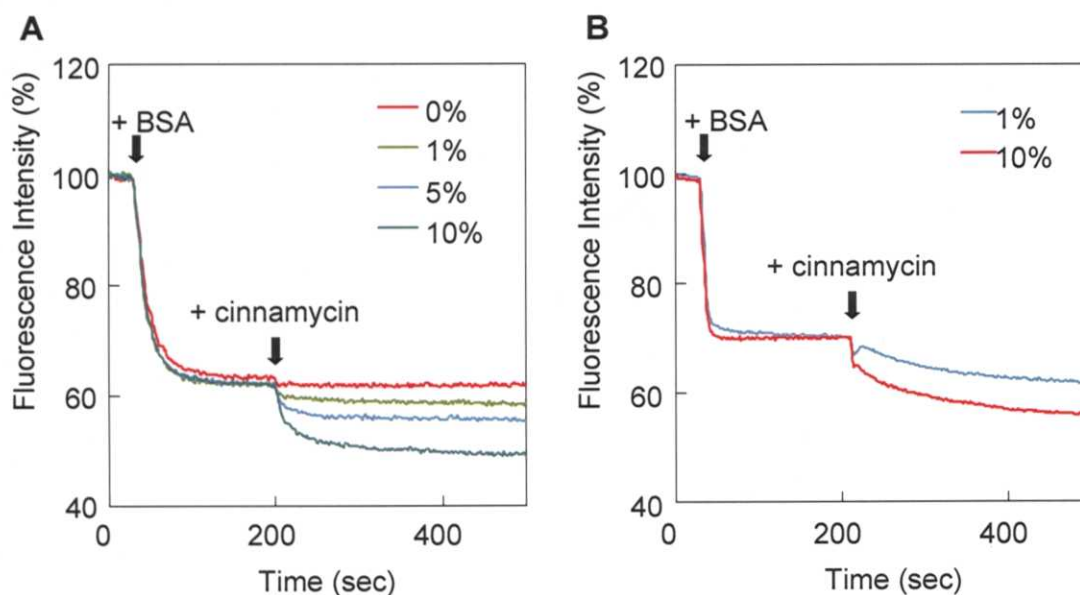


Fig.2-5 人工膜におけるシンナマイシンによる脂質のフロップの誘導。
POPC/POPE LUVsは0.25 %のC6-NBD-PC(A)またはC6-NBD-PE(B)を加えて作製した。
Ex=475 nm, Em=535 nm。BSAとシンナマイシンは矢印のところで加えた。BSAを加えることにより、外側に存在する蛍光脂質が消光され、蛍光値が下がる。

2-3-5 シンナマイシンによる PE を含む膜の再編成を膜融合実験で観察する

以上の結果から膜表面の PE の量が多いとき、シンナマイシンは膜のダイナミックな再編成を誘導することが示唆された。そのような膜の再編成によって引き起こされる事象を調べた。その一例として、膜同士の融合が起こるかどうか検討した。蛍光脂質 N-LRh-PE と N-NBD-PE を含むリポソームに蛍光脂質の入っていないリポソームを添加し、二つのリポソームが融合すると、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)により消光していた N-NBD-PE は、消光が解除され蛍光を発する。PE を含むリポソームを用意し、シンナマイシンを加えたときの蛍光量の変化を見た。その結果、DOPC/DOPE(1:1)、POPC/POPE(1:1)の膜ではシンナマイシンの添加によりリポソームの融合が見られた(Fig.2-6)。PC のみのリポソームではシンナマイシンを添加してもリポソームの融合は見られなかった。リポソームを DOPC/DOPE(1:0.1)にし、PE の量を下げると、リポソームの融合は起こらなかったことから、膜に PE が多量に存在することが融合に重要であると考えられる。

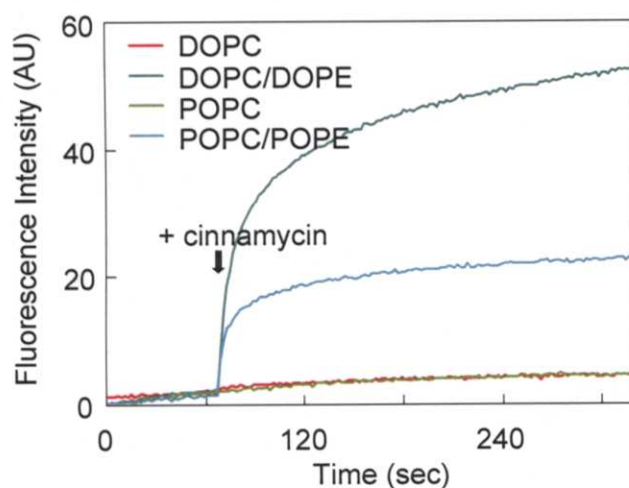


Fig.2-6
シンナマイシンによる膜の融合。
ドナーリポソームにN-LRh-PEに
よって消光されたN-NBD-PEを加え
おき、蛍光脂質の入っていないアク
セプターリポソームと混ぜる。矢印
のところでシンナマイシンを加えると
膜の融合が起こり、消光が解除され
上昇した蛍光を測定した。

2-3-6 シンナマイシンによる PE を含む膜の再編成を電子顕微鏡で観察する

シンナマイシンを添加したときの PE を含むリポソームの状態を電子顕微鏡を用いて、ネガティブ染色法とフリーズフラクチャー法により観察した。PC のみのリポソームではシンナマイシンの添加により変化は見られなかった。50%の DOPE を含むリポソームはシンナマイシンを添加することにより、ストロー状の構造が観察された(Fig.2-7 C,D)。ネガティブ染色ではストロー状の構造の部分に特異的にシンナマイシン由来の金コロイドが観察された(Fig.2-7 A,B)。

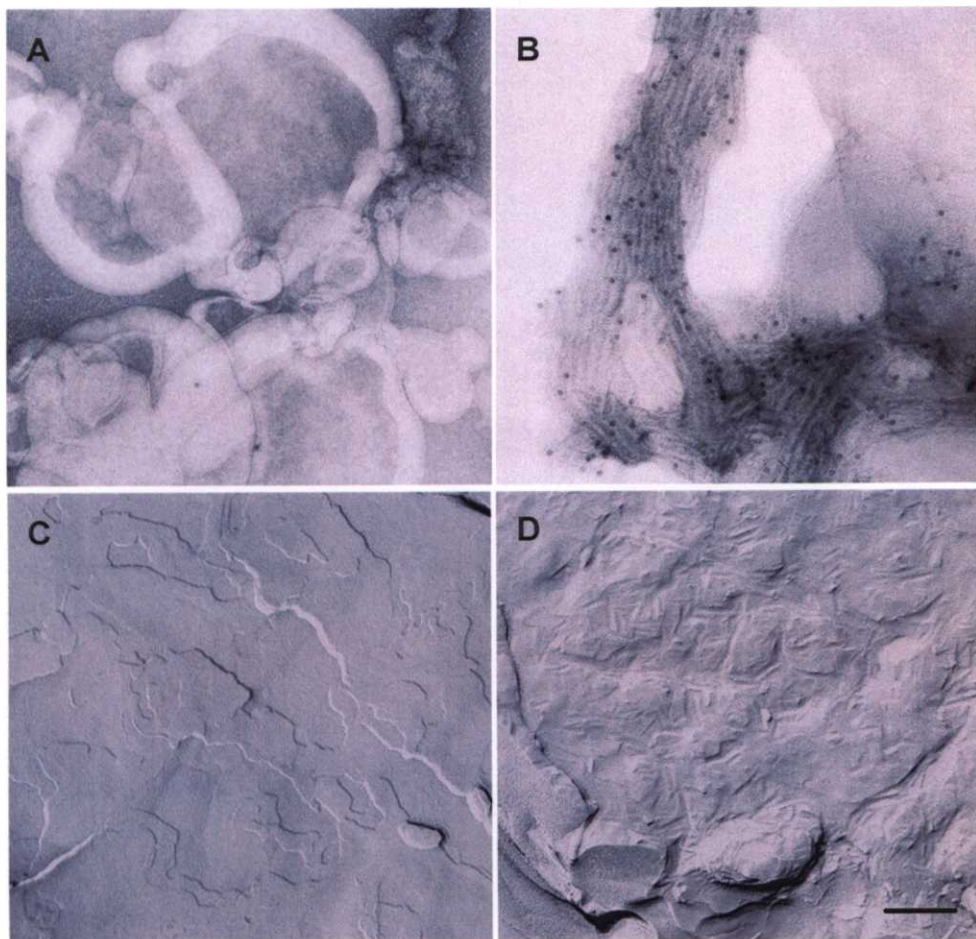


Fig.2-7 リポソームにシンナマイシンを加えたときの電子顕微鏡ネガティブ染色像(A,B)、フリーズフラクチャー像(C,D)。DOPCリポソームにシンナマイシンを加えたもの(A,C)とDOPC/DOPEリポソームにシンナマイシンを加えたときのイメージ(B,D)。Bar=100nm。

2-4 考察

2-4-1 シンナマイシンの細胞毒性の作用機序

PE はそのほとんどが細胞膜の内層に存在し、外層の存在量はわずかであると考えられている。細胞にシンナマイシンを処理すると、このわずかに存在する外層の PE にシンナマイシンは結合する。その結果、シンナマイシンにより脂質のフロップが誘導され、PE や PS が細胞表面に露出する。シンナマイシンは PE と 1:1 の比で結合するので(Wakamatsu et al., 1990)、表に露出した PE にさらにシンナマイシンは結合すると考えられる。その結果、脂質のフロップが劇的に誘導され、細胞膜は壊れ細胞は死に至ると考えられる。つまりシンナマイシン自身が膜脂質のフロップを誘導することが細胞死の直接の原因であると考えられた。アミノ基に特異的なプローブ、トリニトロベンゼンスルホン酸を用いた実験で通常状態の線維芽細胞において、全 PE の 2-2.5 % が細胞表面に出ていることが報告されている(Sleight and Pagano, 1983; Kobayashi and Pagano, 1989)。我々の研究では 4℃ でシンナマイシンは PE に結合できるが、細胞にシンナマイシンを処理したときには、シグナルが得られなかった。つまり通常状態では細胞表面の PE の量は蛍光顕微鏡では検出できないほど少ないということが示唆される。しかしながら、シンナマイシンはこの少量の PE に結合し、リン脂質のフロップを誘導する。細胞に 4℃ でシンナマイシンを処理した場合は、毒性は見られず、4℃ で結合させてからさらに 37℃ で反応させたときでも毒性が見られなかったことから、通常状態で細胞表面の PE に結合している量のシンナマイシンでは、細胞毒性を発揮できないということが示唆される。しかし、4℃ で細胞に長時間シンナマイシンを処理したときは、死細胞の増加が認められた。シンナマイシンのようにタイプ I lantibiotic であるナイシンは、陽イオン性ペプチドで、膜を破壊することなく脂質のフロップを引き起こすことがわかっている(Moll et al., 1998)。最近では Zhang らが天然および合成の陽イオン性抗菌性ペプチドが膜の破壊を引き起こす濃度より 3 から 5 倍低いとき脂質のフリップフロップを誘導することを報告している(Zhang et al., 2001)。抗菌性ペプチドのマガイニン 2 も脂質のフロップを誘導することが報告されている(Matsuzaki et al., 1996)。ナイシンや脂質のフロップを誘導するほかのペプチドと異なり、シンナマイシンの電荷はほぼ中性である。シンナマイシンは PE 依存的に脂質のフロップを誘導するという点でユニークであり、細胞への多量の結合はフロップによって露出した PE に依存している。つまりシンナマイシンは細胞膜の内層に存在する PE がターゲットであり、PE をフロップさせることにより、毒性を発揮する。

シンナマイシンが脂質のフロップを誘導するメカニズムは明らかではない。人工膜においても

シンナマイシンはフロップを誘導するため、タンパク質などの関与は認められず、シンナマイシン自身の働きと考えられる。Proton NMR 分析よりシンナマイシン 1 分子が PE 1 分子に結合することがわかっている(Wakamatsu et al., 1990)。膜に PE が多量に存在するとき、シンナマイシンは膜を劇的に壊す。Machaidze らにより最近、 ^{31}P と ^2H を用いた NMR 実験により、シンナマイシンが POPC/POPE(4:1)のリポソームの二重膜構造を変化させることが報告されている(Machaidze et al., 2002)。電子顕微鏡の結果からもシンナマイシンを処理したリポソームでは膜の構造が劇的に変化することがわかる。本研究により、シンナマイシンは細胞膜外層のわずかな PE に結合し、その後細胞膜内層の PE のフロップを誘導し、さらに多くのシンナマイシンが PE に結合する。その結果、劇的な膜の構造変化がおこし、細胞は死に至ると考えられ、シンナマイシンの細胞毒性の作用機序が明らかになった。

2-4-2 PE プローブとしての可能性

第 1 章で述べたように、脂質を認識するプローブは数多く存在する。しかしそれらの多くはタンパク質であるため、分子量が大きい。脂質の分子量は 1000 程度なので、分子量数万程度のタンパク質が脂質を認識することは、脂質の状態を大きく変化させる可能性がある。また細胞膜の本来の脂質の存在状態を認識しているかどうかは明らかではない。シンナマイシンは分子量 2000 と脂質の約 2 倍程度であるため、プローブとして有効であると考えられる。また細胞内の PE の局在はあまり知られていないため、シンナマイシンを用いて細胞内の PE の局在や動態を調べることが期待される。しかし毒性が強く生きた細胞で PE の局在を調べることは不可能である。また固定した細胞を用いる際は、固定剤として使用するパラホルムアルデヒドがアミノ基を認識することから、アミノ基をもつ PE にも影響があり、細胞内の PE を染色することはできない。19 個のアミノ酸からなるペプチドであるシンナマイシンは大腸菌に発現させて調製することもできず、変異体を作製することも難しいと考えられていた。しかし最近になってシンナマイシン合成遺伝子クラスターがクローニングされ、さらにシンナマイシンの構造遺伝子を変化させることにより *Streptomyces lividans* にシンナマイシンの類縁化合物であるデュラマイシンを合成させることが報告されている(Widdick et al., 2003)。この方法により、無毒化したシンナマイシンの獲得を試みることは大変興味深い。

第 3 章

細胞膜脂質 SM を標的にした毒素、ライセニンの作用機序

3-1 序論

シマミミズ(*Eisenia foetida*)の体腔液中に、溶血、血液凝集、抗菌、細胞毒性などの活性を持つ物質が含まれていることが以前から知られていた。その中の一つライセニンは 297 アミノ酸からなるタンパク質で、ミミズの体腔液に含まれる毒素であり、1997 年に関沢らによって精製、クローニングされた(Sekizawa et al., 1997)。当初は血管平滑筋収縮作用、心筋の陽性変力・変時作用をもつタンパク質として単離された。ライセニンは細胞に対して毒性を示し、赤血球を溶血させるが、どのようなメカニズムで毒性を示すかわかっていなかった。その後、山路らによりライセニンは細胞膜を形成する脂質の一つである SM に特異的に結合することがわかった(Yamaji et al., 1998)。SM を認識する抗体も存在するが、それらの特異性は低く、また脂質を抗原とする抗体の多くがそうであるように、サブクラスとして IgM に属している。このような理由からライセニンは脂質を見るプローブとして有効であることが期待される。

SM に結合する毒素はライセニン以外にもいくつか報告されている。イソギンチャクから得られる equinatoxin II は SM 膜を加えたことで細胞毒性が阻害される(Bernheimer and Avigad, 1976)。しかし equinatoxin II は SM に特異的に結合するわけではなく、PC やホスファチジルグリセロール(PG)にも結合することがわかっている(Poklar et al., 1999; Caaveiro et al., 2001)。*Stichodactyla helianthus* から得られる Sticholysin I と II もまた SM 膜を好む(Valcarcel et al., 2001)。*Vibrio cholerae* の cytolysin は毒性を示すのに SM とコレステロールが必要である(Zitzer et al., 1999)。ミミズ(*E. foetida*)から得られる eiseniapore は SM もしくは GalCer を含む膜を溶解する(Lange et al., 1997)。こういった数多くの SM 認識毒素の中でライセニンだけが SM のみを特異的に認識する(Yamaji et al., 1998)。しかしライセニンと SM との相互作用についてはほとんどわかっていない。本研究ではライセニンによる毒性発現のメカニズムの理解を目的とし、ライセニンとライセニン同様ミミズ体腔液に存在するライセニン関連タンパク質、LRP-1 (lysenin2)と LRP-2 (lysenin3)の性状解析を行った。LRP-1 はライセニンと相同性 76 %、類似性 88 %で、LRP-2 は相同性 89 %、類似性 94 %である(Cooper et al., 2002; Shakor et al., 2003)。そこでライセニンと LRP-1、2 について組み換えタンパク質を作製し、SM への結合、赤血球への溶血活性を調べた。

ライセニンの毒性に関しては、当研究室の山路により、オリゴマー化とポアの形成に関する解析が行われている(Yamaji-Hasegawa et al., 2003)。その結果ライセニンは SM 存在下で SDS 耐性のオリゴマーを形成することがわかった。また大きさの異なる糖鎖を用いてライセニンの赤血球の溶血阻害実験を行い、ライセニンの形成するポアの大きさを検討した結果、ヒツジの赤血球にライセニン进行处理する際、直径 1.2・1.4 nm のラフィノースと一緒に処理した際にはライセニンによる溶血の阻害は見られなかったが、直径 3・3.5 nm のデキストラン 4 を一緒に処理するとライセニンによる溶血が阻害された。この結果から、ライセニンが形成するポアはおおよそ 3 nm であることが示唆された。細胞膜に穴を開けて殺す、ポア形成毒素は、細胞膜との相互作用にタンパク質中のトリプトファンが重要であるという報告がある(Hong et al., 2002; Malovrh et al., 2000; Raja et al., 1999)。そこで本研究で私は、ライセニンの芳香族アミノ酸に注目し、6 つあるトリプトファン(W)を各々アラニン(A)に置換した変異体の作製を試み、SM への結合、また溶血活性を調べた。またライセニンの 210 番目の芳香族アミノ酸、フェニルアラニン(F)は LRP-2 には保存されているが、LRP-1 には保存されていない。そこで LRP-1 中のイソロイシン(I)をフェニルアラニンに置換した変異体を作製し、活性を調べた。

3-2 方法

3-2-1 試薬

Brain SM、egg PC、liver PE、brain PS、liver PI、PA、brain Cer、brain GalCer は Avanti Polar Lipids から購入した。Sphingosine、S1P、SPC は Biomol Research から購入した。Anti-maltose-binding-protein(MBP) antisera、pMAL-c2X vector、amylase resin は New England Biolabs から購入した。ライセニンの cDNA とライセニン抗体は全薬工業株式会社の関沢先生、小林先生より分与された。

3-2-2 組み換えライセニンの作製

ライセニンの cDNA を polymerase chain reaction(PCR)法により増幅し、pMAL-c2X ベクターに組み込んだ。MBP タグ付きの組み換えタンパク質は大腸菌 JM109 または BL21 に発現させ、アミロース樹脂を用いて精製した。アミノ酸置換は変異オリゴヌクレオチドを用いた PCR 法、または二重鎖位置特異的変異導入 (Chameleon TM) により行った。野生型および変異型の cDNA は増幅の後、塩基配列を確認した。

3-2-3 ELISA 法によるライセニンの脂質への結合

エタノールに溶解した 10 μ M の脂質を 50 μ l ずつ 96 穴のプラスチックプレート(Immuron 1、Dinatech Laboratories)に加えた。室温で放置し、溶媒を蒸発させた。200 μ l の 3% BSA/TBS(10mM Tris-HCl (pH7.4)、150 mM NaCl)を加えて室温で 2 時間放置し、ブロッキングした。TBS で洗浄後 50 μ l の様々な濃度の MBP ライセニンまたは MBP-LRP-1、2 / 1% BSA-TBS を加えて室温で 2 時間結合させた。TBS で洗浄後抗 MBP 抗体で室温で 2 時間処理し、ビオチン化抗ウサギ IgG 抗体で室温で 2 時間処理した。その後 peroxidase-conjugated ストレプトアビジンを室温で 30 分間処理してから σ phenylenediamine を基質として発色し、490 nm の吸光度を測定した。

3-2-4 溶血活性の測定

ヒツジの全血 (Nippon Bio-Supp Center) を冷却した PBS で洗い、 3×10^7 cells/ml に調製した赤血球を様々な濃度の MBP ライセニンまたは LRP-1、2 と混合し 37°C で 30 分間インキュベーションした。4000 rpm で遠心し得られた上清を 405 nm の波長で測定した。赤血球を凍結解凍した時の値を溶血 100 %とした。

3-3 結果

3-3-1 組み換えライセニンの作製と活性の解析

ライセニン、LRP-1、LRP-2 の cDNA を用いて大腸菌で組み換えタンパク質を調製した。GST、ヒスチジン、MBP など様々なタグをつけることを試みた結果、MBP タグライセニンが最も高い回収率を示したため、以後の研究では MBP ライセニンを用いて実験を行った。

MBP ライセニン、LRP-1、2 の SM への結合を ELISA 法により測定した(Yamaji-Hasegawa et al., 2003; Kiyokawa et al., 2004)。SM の他に、種々のリン脂質、およびスフィンゴ糖脂質を 96 穴のプレートに固定化し、そこに MBP ライセニンを加えた後、抗 MBP 抗体により検出した。MBP ライセニンはミミズから精製したライセニン同様に、SM に特異的に結合した(Fig.3-1 A)。つぎに LRP-1、2 について、SM への結合を同様に ELISA 法で調べた。96 穴プラスチックプレートに SM を固定化し、そこに MBP-LRP-1、2 を加えた後、抗 MBP 抗体により検出した。MBP-LRP-2 は MBP ライセニンと同様に SM に結合したが、MBP-LRP-1 の SM 結合活性は MBP ライセニンに比べて 1/10 に低下した(Fig.3-1 B,C)(Kiyokawa et al., 2004)。

ヒツジの赤血球には SM が多く含まれており、ライセニンの溶血活性を調べるのに用いられている(Yamaji et al., 1998)。様々な濃度の MBP ライセニン、MBP-LRP-1、2 をヒツジの赤血球に処理し、溶血活性を調べた。MBP ライセニン、MBP-LRP-2 は 1 nM 以上の濃度で溶血活性を示したが、MBP-LRP-1 は 10nM 以上の濃度でないと、溶血活性を示さなかった(Fig.3-2)(Kiyokawa et al., 2004)。

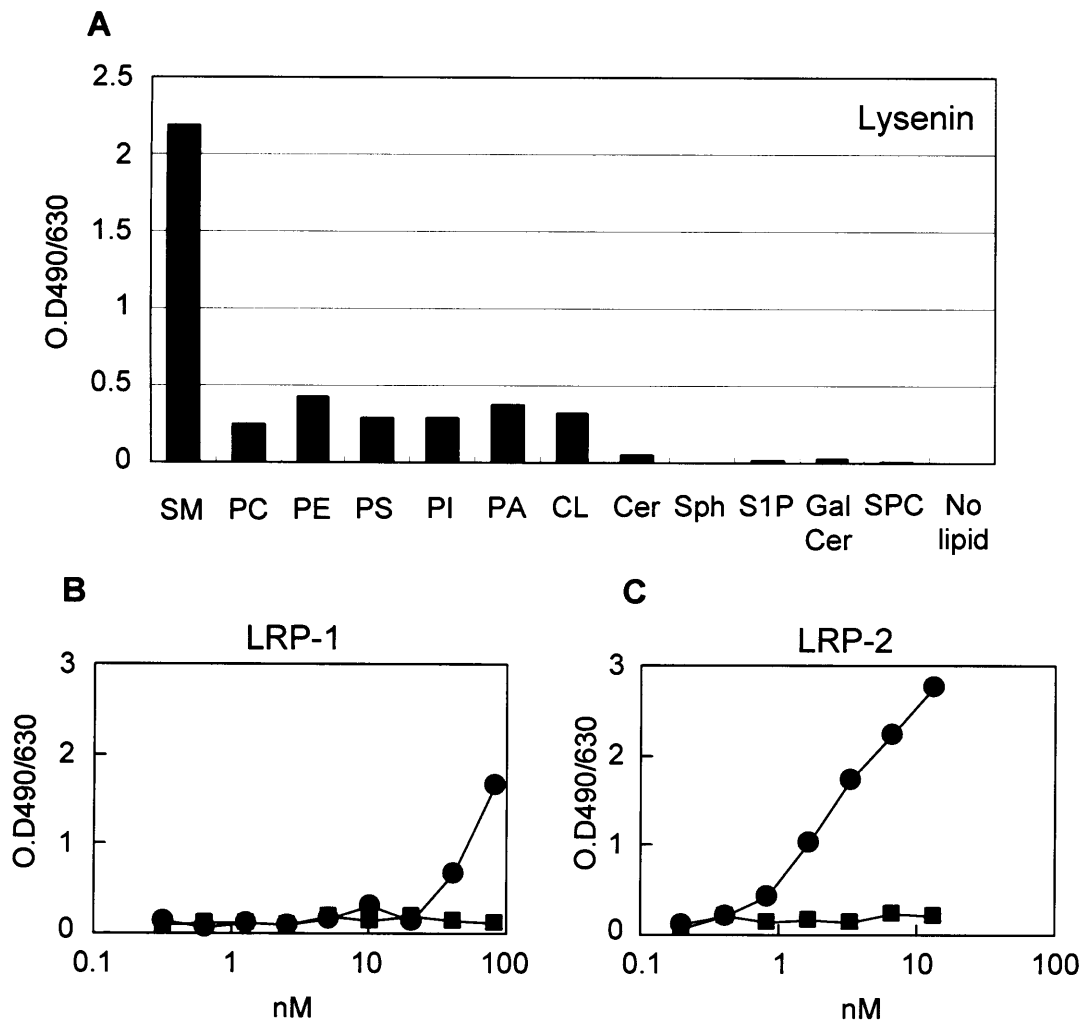


Fig. 3-1 MBPライセニン、LRP-1、2のSMへの結合(ELISA法にて測定)。
(A)0.5μg/mlMBPライセニンのいろいろな脂質への結合を調べた。(B,C)LRP-1(B)とLRP-2(C)を濃度を変えて、SM(●)とPC(■)への結合を調べた。

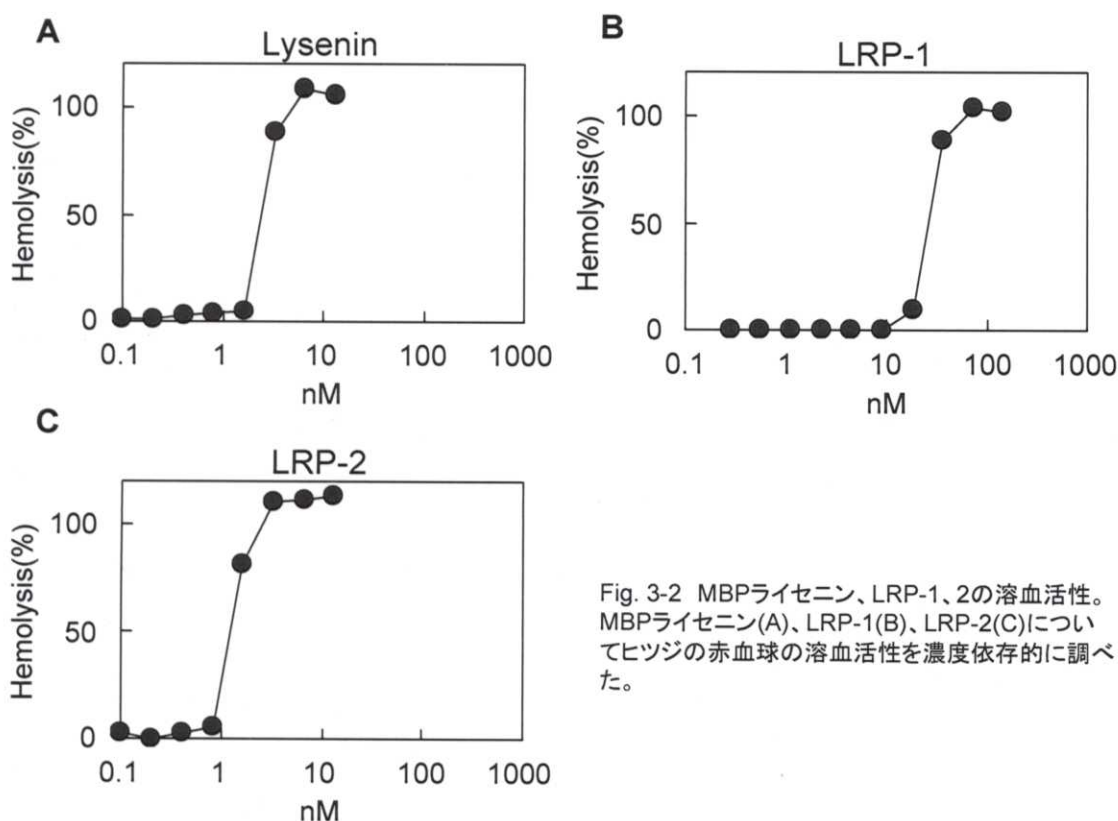


Fig. 3-2 MBPライセニン、LRP-1、2の溶血活性。
MBPライセニン(A)、LRP-1(B)、LRP-2(C)についてヒツジの赤血球の溶血活性を濃度依存的に調べた。

		20		40		
Lysenin	MSAKA--AEG	YEQIEVDVAVW	KEGYVY	ENRGSTSV	DQKITITKGMKNVNSETRTVTATH	
LRP-1	MSSTV-MADG	FEEIEVDVSVW	KEGYAY	ENRGNSSV	QQKITMTKGMKNLNSETKTLTATH	
LRP-2	MSSRAGIAEG	YEQIEVDVAVW	KEGYVY	ENRGSTS	VEQKIKITKGMRLNSETKTLTASH	
	60		80		100	
Lysenin	SIGSTISTGDA	FEIGSVEVS	YSHSHEESQV	SMTETEVY	ESKVIEHTITIPPTSKFTRWQL	
LRP-1	TLGETLKVGD	PFEIASVEVS	YTFSHQKSQV	SMTQTEVY	SSQVIEHTVTIPPNNKKFTRWKL	
LRP-2	SIGSTISTGDL	FEIATVDVS	YSYSHEESQV	SMTETEVY	ESKEIEHTITIPPTSKFTRWQL	
	120		140		160	
Lysenin	NADVGGADIE	YMYLIDEVT	PIGGTQSIPQV	ITSRAKII	VGRQIILGKTEIRIKHAERKEY	
LRP-1	NADVGGTGIE	YMYLIDEVT	AI	GADLTIPEVN	KSRAKILVGRQIHLGETEIRIKHAERKEY	
LRP-2	NADVGGADIE	YMYLIDEVT	PIGGT	LSIPQVIK	SRAKILVGREIYLGETEIRIKHADRKEY	
	180		200		220	
Lysenin	MTVVS	RKSWPAATLGHSK	L	FKFVLYEDW	GGFRIKTLNTMYSGY	EYAYSSDQGGIYFDQGT
LRP-1	MTVIS	RKSWPAATLGNSN	L	FKFVLFEDSS	GIRIKTLNTMYPGY	EWAYSSDQGGIYFDESS
LRP-2	MTVVS	RKSWPAATLGHSK	L	YKFVLYEDM	YGFRIKTLNTMYSGY	EYAYSSDQGGIYFDQGS
	240		260		280	
Lysenin	DNPKQRW	AINKSLPLRHGDV	V	TFMNKYF	TRSGLCYDDGPATNVY	CLDKREDKWILEVVG-
LRP-1	DNPKQRW	ALSKAMPLRHGDV	V	TFRN	FFTNSGMCYDDGPATNVY	CLEKREDKWILEVVNT
LRP-2	DNPKQRW	AINKSLPLRHGDV	V	TFMNKYF	TRSGLCY-DGPATDVY	CLDLREDKWILEVVKP

Fig. 3-3 ライセニン、LRP-1,2のアミノ酸配列。
芳香族アミノ酸をピンクで示す。青の四角で囲ってあるところはトリプトファンを示す。
ピンクの四角で囲ってあるところは、210番目のフェニルアラニン/イソロイシンを示す。

3-3-2 トリプトファン変異体の作製と活性の解析

ライセニン、LRP-1、LRP-2 のアミノ酸配列を芳香族アミノ酸に注目して調べた。Fig.3-3 にライセニンと LRP-1、2 のアミノ酸配列を示す。ライセニンには 6 個のトリプトファンがある。6 個のトリプトファンをそれぞれアラニンに置換したタンパク質を大腸菌に発現させたところ 5 つの変異体を得ることができた。W116A 変異体は大腸菌では発現されなかった。そこで得られた 5 つの変異体について、SM への結合、溶血活性を調べた。その結果、206 番目のトリプトファンをアラニンに換えた W206A 変異体の活性はライセニンと変わらなかったが、それ以外の W20A、W187A、W245A、W291A では SM への結合活性、溶血活性が消失した(Fig.3-4)。20、187、245、291 番目のトリプトファンはライセニン、LRP-1、2 間で保存されている。一方 206 番目のトリプトファンは LRP-1 ではセリン、LRP-2 ではメチオニンに置換されている。本研究で 206 番目のトリプトファンは SM への結合、溶血活性のどちらにも関与していないことが示された。SM への結合と溶血活性は平行して見られることから、ライセニンによる溶血には SM への結合が重要であることが示唆された。

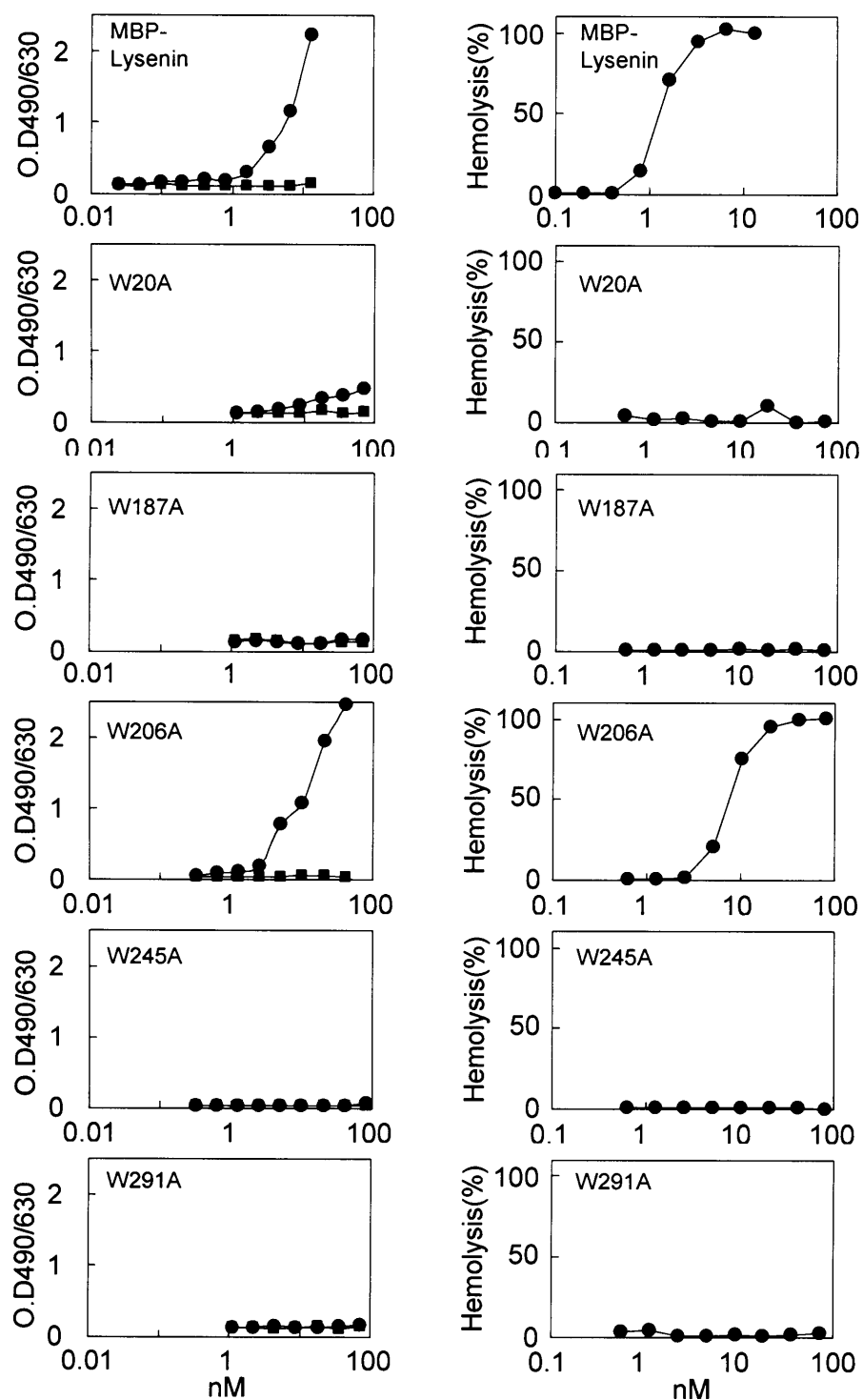


Fig. 3-4 W変異体のSMへの結合と溶血活性。
左列にELISA法により測定したSM(●)とPC(■)への結合を示す。
右列に溶血活性を示す。

3-3-3 I210F 変異体の作製と活性の解析

Fig.3-1、3-2 の結果から LRP-1 はライセニン、LRP-2 に比べて活性が低いことがわかった。ライセニンと LRP-2 では 30 個の芳香族アミノ酸が共通であったが、これらの共通の芳香族アミノ酸のうち 209 番目のフェニルアラニンが LRP-1 ではイソロイシンに置き換わっている(Fig.3-3)。そこでLRP-1の210番目のイソロイシンをフェニルアラニンに置換した I210F 変異体を作製し、活性の上昇が見られるかどうかを検討した。

I210F 変異体の SM への結合を ELISA 法で調べた結果、ライセニンや、LRP-2 と同様の強い結合を示した(Fig.3-5 A)。ヒツジの赤血球を用いた溶血活性も上昇した(Fig.3-5 B)。以上のことからライセニンの SM への結合や溶血活性には 209 番目の芳香族アミノ酸が重要であることがわかった。

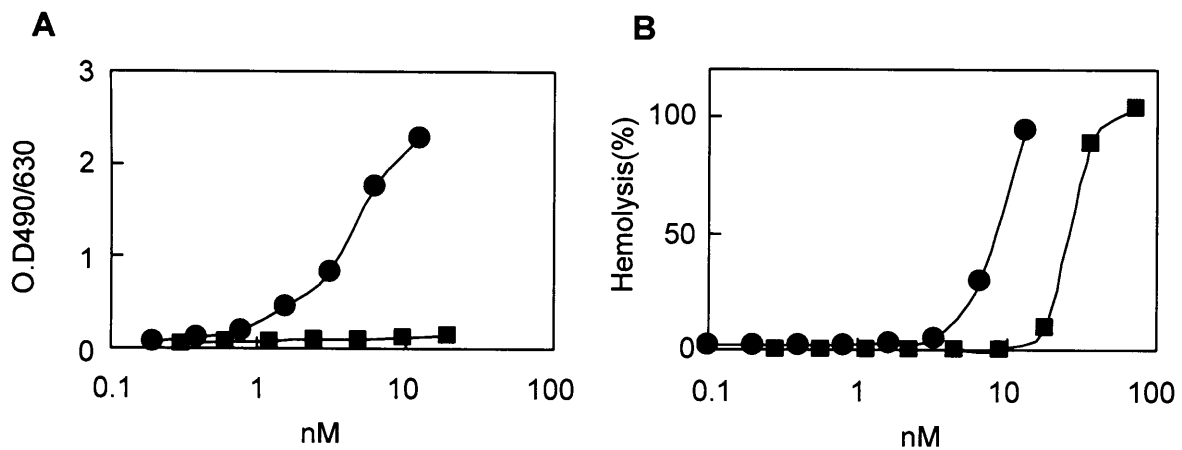


Fig. 3-5 F210I変異体のSMへの結合活性と溶血活性。
(A)F210I変異体(●)とLRP-1(■)のSMへの結合をELISA法により測定した。(B)F210I変異体(●)とLRP-1(■)のヒツジの赤血球における溶血活性を調べた。

3-4 考察

3-4-1 LRP-1、2 の性状解析

ミミズの体腔液にはライセニンのような毒素がいくつか含まれている。Coelomic cytolytic factor 1 は glucan と lipopolysaccharide 結合タンパク質で、prophenoloxidase cascade の活性に関与している(Beschin et al., 1998; Olivares Fontt et al., 2002)。Eiseniapore は 38kDa の溶血活性のあるタンパク質だが、アミノ酸配列は報告されていない(Lange et al., 1999; Lange et al., 1997)。ライセニンはこの様な毒素の中の一つである。ライセニンは多くの哺乳細胞の細胞膜を形成する主な脂質の一つである SM に特異的に結合する。よってライセニンを用いることにより、細胞内の SM の分布、動態を調べる事が可能になった。また SM の生合成や代謝、輸送に関してもライセニンを用いて研究されている。最近ではライセニンに耐性を示す CHO 細胞から SM の前駆体であるセラミドの輸送に関与している CERT が発見された(Hanada et al., 2003)。

ライセニン関連タンパク質、LRP-1、2 はライセニンと高い相同性を持つ(Sekizawa et al., 1997; Cooper et al., 2002; Shakor et al., 2003)。LRP-2 の cDNA 配列は fetidin として同定されている(Lassegues et al., 1997; Milochau et al., 1997)。Fetidin は糖タンパク質で溶血活性と抗菌作用を持つ。しかしながら、LRP-1 と LRP-2 / fetidin はライセニン同様 SM を認識するかどうか研究されていなかった。本研究で LRP-2 / fetidin はライセニン同様の活性を持つことがわかったが LRP-1 は 1/10 に活性が低下した。興味深いことに LRP-2 / fetidin は抗菌作用を持つことが報告されている(Lassegues et al., 1997)。しかしバクテリア(*B. megaterium*)が SM を持つということは報告されていない。細胞表面の SM を除去したときライセニンは細胞毒性を示さないことから、LRP-2/fetidin は SM だけでなくバクテリア表面の別の物質を認識している可能性が示唆される(Hanada et al., 1998)。

3-4-2 芳香族アミノ酸の影響

タンパク質と膜の相互作用についてはあまりよくわかっていない。蛍光分光光度計を用いた実験はタンパク質の構造的、動態的な変化を調べる事が可能であり、可溶性タンパク質と膜との相互作用の研究に用いられている。トリプトファンはそれ自体が蛍光を発する性質があることから、臭素原子や窒素酸化物のようなクエンチャーが脂肪酸に結合した脂質と共に用いて、タンパク質中のトリプトワンの蛍光波長の変化を調べることで、タンパク質と膜の相互作用を調べる事が可能である。その結果、膜中におけるトリプトファン残基の局在がわかる。もう一つ、ク

エンチャーを用いずに、トリプトファン自身の蛍光を観察する方法がある。トリプトファンが極性のある環境に存在すると、トリプトファンの蛍光は高波長側に変移する。当研究室の山路は様々なリポソームの存在下で、ライセニンのトリプトファンの蛍光を調べたところ、SM/コレステロールのリポソームの存在下でライセニン中のトリプトファンの蛍光量は増加し、その波長は短波長側に変移した。つまり、SM 膜中でライセニンは極性の低い環境にある。このことはライセニンが SM 膜中に挿入されていることを示唆している。

ポア形成毒素の膜への挿入にはタンパク質のトリプトファン残基が重要な役割を果たしていることが示唆されている。そこで Hong らはポア形成毒素である equinatoxin II の 112 番目と 116 番目のトリプトファンをフェニルアラニンに置換した変異体を作製し、解析を行い、細胞へのポア形成活性が低下したことがわかった(Hong et al., 2002)。ライセニンは SM に結合するポア形成毒素であることが当研究室の山路により示された(Yamaji-Hasegawa et al., 2003)。本研究で我々は芳香族アミノ酸に注目し、変異体の作製を行った。ライセニンと LRP-2 は 30 個の芳香族アミノ酸をもつ。6 個のトリプトファンを各々アラニンに置換した変異体では、LRP-1、2 に保存されていない 206 番目を除いて全て活性がなくなったことから、ライセニンと SM との相互作用にトリプトファンが重要であることが示唆された。トリプトファン以外の芳香族アミノ酸のうち、209 番目のフェニルアラニンが LRP-1 では保存されていない。LRP-1 は SM への結合活性、溶血活性共にライセニンや LRP-2 より低い。LRP-1 の 210 番目のイソロイシンをライセニンや LRP-2 同様フェニルアラニンに置換した変異体では SM への結合活性、溶血活性がともに上昇したことから、フェニルアラニンがライセニンの活性に重要であると示唆された。この結果はトリプトファンだけでなく、他の芳香族アミノ酸もライセニンの SM への結合、溶血活性に重要な役割を果たしていることを示唆している。

3-4-3 ライセニンは SM ドメインを認識する

SM は細胞膜を形成する脂質の一つで主に細胞膜の外層に存在する。細胞膜の脂質組成は細胞の種類によって異なっている。また脂質は細胞膜中で不均等に分布している。例えば、極性のある上皮細胞ではアピカル面とバソラテラル面では脂質組成が異なる。さらに同一膜上でも相転移温度、脂肪酸組成といった脂質の性質によって脂質同士が相互作用しドメインを形成する。細胞はこの様に脂質の存在状態を変えることで、生きていくために必要な物質の取り込みや、シグナル伝達などを行っていると考えられる。ライセニンは SM をターゲットとするが、SM が存在するにもかかわらずライセニンに耐性の細胞が存在する(Hanada et al., 1998)。ライセニンがどの

ような SM 状態を認識するか、我々は詳細な実験を行った。マウスメラノーマ MEB4 細胞はライセニンに耐性を示す細胞の一つである。しかし MEB4 細胞の糖脂質合成酵素(GCS)を欠損した GM95 細胞はライセニンに感受性であった。また上皮細胞 MDCK においては、ライセニンをバソラテラル面から処理すると毒性のため細胞は死ぬが、アピカル面よりライセニンを処理すると耐性を示した(Ishitsuka et al., 2004)。いずれの膜にも SM が存在することから、ライセニンは単に SM の有無だけでなく、SM の存在状態を認識していることが示唆された。このことは人工膜を用いて人工的に SM の存在状態を変化させたときにライセニンの認識を調べた結果からも確認された。SM は DOPC と混ぜると混ざらない(Yuan et al., 2002)。一方で相転移温度の近い DPPC とは良く混ざる(Maulik and Shipley, 1996)。また SM と GalCer は混ざる(Johnston and Chapman, 1988)。そこで SM/DOPC、SM/DPPC、SM/GalCer の組成で作製した一重膜の巨大リポソーム(GUVs)へのライセニンの結合を調べた。その結果、ライセニンは SM/DOPC の組成の GUVs により多く結合した(Ishitsuka et al., 2004)。以上の結果からライセニンは、SM ドメインを認識することがわかった。今まで脂質の存在状態を認識するタンパク質は報告例が少なく、ライセニンは非常に貴重な例であるといえる。SM ドメインについての研究は様々な分野で行われており、いろいろなタンパク質が SM ドメインを介して機能していることが報告されていることから、SM ドメインをターゲットとするライセニンは、有用なツールであると考えられる。

3-4-4 無毒化プローブの作製

SM に結合するが、毒性のないライセニンプローブを作製するために、当研究室の清川により 297 アミノ酸のうち、C 末を削ったもの、N 末を削ったもの、また両端を削ったものなど 14 種類の変異体を作製され、SM への結合活性と赤血球の溶血活性を調べられた。その中で、N 末を最大で 160 個削った変異体は SM に結合するが溶血活性は示さず、無毒の SM プローブとして利用できると考えられた(Kiyokawa et al., 2005)。無毒化ライセニンを用いることにより、生きた細胞における SM の局在と動態の観察が可能になった。

第 4 章

D-PDMP による多剤耐性がん細胞の抗がん剤感受性のメカニズムの解析

4-1 序論

D-*threo*-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (D-PDMP)(Fig.4-1)は糖脂質合成酵素である UDP-glucose : ceramide glucosyltransferase (GCS)の阻害剤としてよく知られている(Radin et al., 1993; Sillence et al., 2002)。D-PDMP の蛍光類似体である C₁₂-NBD-PMP は D-PDMP 同様に糖脂質の合成を阻害する。C₁₂-NBD-PMP を CHO 細胞に処理すると、後期エンドソーム・リソソームに蓄積される(Rosenwald and Pagano, 1994)。後期エンドソーム・リソソームは特徴的なマルチベシクル構造をとるオルガネラであり(Kobayashi et al., 1998a; Gruenberg, 2001)、その内膜は BMP と呼ばれているユニークな脂質に富んでいる(Kobayashi et al., 1998b; Kobayashi et al., 2001; Kobayashi et al., 2002)。BMP に富んだ膜が後期エンドソームからの膜輸送と、スフィンゴ脂質の分解に関与していることが示されている(Kobayashi et al., 1999; Kolter and Sandhoff, 2005; Le Blanc et al., 2005)。BMP はまたマルチベシクル構造の形成に関与しており、この特徴的な構造こそがこの BMP の機能に必要不可欠であると考えられている(Matsuo et al., 2004)。最近の研究により BMP に富むエンドソームドメインは細胞のコレステロールホメオスタシスに重要な役割を果たしていることが示唆された。本研究では、D-PDMP の細胞内における作用と BMP との相互作用について研究した。

D-PDMP には GCS の活性阻害だけでは説明できないいくつかの興味深い性質がある(Norris-Cervetto et al., 2004)。一つの例に、多剤耐性細胞における抗がん剤の感受性の増大(chemosensitization) (Lavie et al., 1997; Morjani et al., 2001; Olshefski and Ladisch, 2001; Radin, 2003b; Sietsma et al., 2000; Shabbits and Mayer, 2002; Gouaze et al., 2005)がある。しかし D-PDMP 同様に糖脂質の合成を阻害する *N*-nonyl-deoxygalactonojirimycin(C₉DGJ)や *N*-butyl-deoxygalactonojirimycin(C₄DGJ)は多剤耐性細胞において、抗がん剤の感受性に影響を与えなかった(Norris-Cervetto et al., 2004)。また糖脂質合成酵素を欠損したマウスメラノーマ GM95 細胞を用いた実験では、GCS 遺伝子を発現させたトランスフェクタントと抗がん剤の感受性に変化はなかったことから多剤耐性における糖脂質の関与は疑問視されている(Veldman et al., 2003)。多剤耐性細胞において抗がん剤は細胞膜上の P-糖タンパク質により細胞外へ排出される(Dean et al., 2001; Ambudkar et al., 2003)。P-糖タンパク質の活性を阻害することにより、多剤

耐性を解消するという結果が報告されている。P-糖タンパク質は細胞膜上でコレステロールに富んだドメインに局在することが報告されており、コレステロールと P-糖タンパク質の関連が示唆されている。また PDMP がリソソームのコレステロールを上昇させるという報告もある(Roff et al., 1991)。そこで私は多剤耐性細胞の抗がん剤感受性機構における D-PDMP の影響について、後期エンドソーム/リソソーム特異的脂質 BMP のコレステロール代謝への役割に注目して研究した。

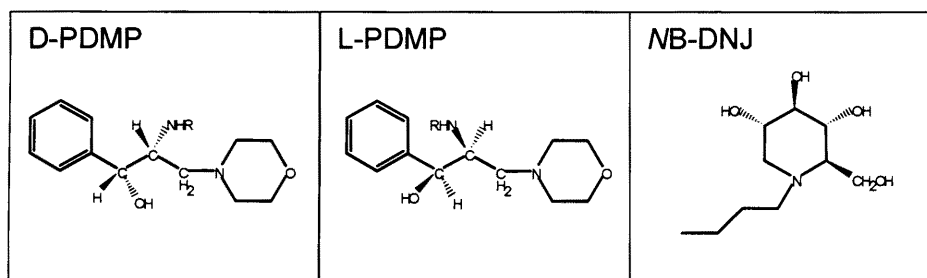


Fig. 4-1 D-PDMP、L-PDMP、NB-DNJの構造式

4-2 方法

4-2-1 細胞

正常ヒト線維芽細胞は 10 %血清を含む F10 培地中で培養した。メラノーマ由来糖脂質合成酵素欠損株 GM95 細胞は理化学研究所・BSI・平林義雄先生より分与された。GM95 細胞は 10 %血清を含む DMEM 培地中で培養した。BHK 細胞は 10 %血清、50 ml/500 ml Tryptosephosphate Broth を含む GMEM 培地中で培養した。Neuro-2a 細胞は理化学研究所・BSI・東秀好先生より分与された。5 %血清を含む DMEM 培地中で培養した。

4-2-2 試薬

D-PDMP, L-PDMP は Matreya から購入した。NB-DNJ, filipin, 25-hydroxycholesterol, human lipoprotein-deficient serum(LPDS)は SIGMA から購入した。U18666A は BioMol から購入した。C6-NBD-Cer、cholesteryl BODIPY FL C12、BODIPY FL paclitaxel は Molecular Probes から購入した。抗 CD63 抗体は Cymbus Biotechnology Ltd から購入した。抗 BMP 抗体はハイブリ

ドーマ 6C4 細胞の培養上清を用いた。 $[^{14}\text{C}]$ Oleic acid、Cholesteryl oleate [$\text{cholesteryl } 1\text{-}^{14}\text{C}$] は American Radiolabeled Chemicals Inc より購入した。ストレプトリシン O は Dr. Sucharit Bhakdi から分与された。LDL は超遠心により精製した。

4-2-3 脂質の抽出

Bligh and Dyer 法により脂質を抽出した(Bligh and Dyer, 1959)。0.8 ml のサンプルの水溶液に 1 ml クロロホルムと 2 ml メタノールを加えてよく混合した。氷の上で 30 分ほど放置してから、1 ml クロロホルムと 1 ml 水溶液を加えてボルテックスした。2000 rpm で 4°C で 5 分間遠心し、下層（脂質画分）を回収し、窒素ガスでクロロホルムを蒸発させ、その後の分析に用いた。

4-2-4 抗 BMP 抗体による細胞染色

細胞はカバーガラスにて培養した。PBS で二回洗浄し、3 % パラホルムアルデヒドで 20 分間室温で固定した。PBS で洗浄後、50 mM NH_4Cl を 15 分間室温で処理した。PBS で洗浄後、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ジギトニンを室温で 5 分処理して細胞に穴を開けた。PBS で洗浄後、0.2 %ゼラチンを室温で 30 分間処理してブロッキングを行った。抗 BMP 抗体を室温で 30 分処理してから、PBS で洗浄し、Alexa488 mouse IgG 抗体を室温で 30 分処理した。PBS で洗浄後、封入剤 Mowiol でマウントした。サンプルは Zeiss LSM510 共焦点顕微鏡を用いて観察した。

4-2-5 Filipin による細胞染色

細胞はカバーガラスにて培養した。PBS で二回洗浄し、3 % パラホルムアルデヒドで 20 分間室温で固定した。PBS で洗浄後、50 mM NH_4Cl を 15 分間室温で処理した。PBS で洗浄後、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ジギトニンを室温で 5 分処理して細胞に穴を開けた。PBS で洗浄後、0.2 %ゼラチンを室温で 30 分間処理してブロッキングを行った。一次抗体を室温で 30 分処理する際、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ filipin を同時に加えた。PBS で洗浄し、二次抗体と 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ filipin を室温で 30 分処理した。PBS で洗浄後、Mowiol でマウントし、Zeiss LSM510 共焦点顕微鏡を用いて観察した。

4-2-6 抗 CD63 抗体による細胞染色

抗 BMP 抗体による染色法と同様に行った。Zeiss LSM510 共焦点顕微鏡を用いて観察した。

4-2-7 Nile red による細胞染色

抗 CD63 抗体による染色を行うときに、二次抗体と同時に 100 ng/ml Nile red を加えた。Zeiss LSM510 共焦点顕微鏡を用いて観察した。

4-2-8 糖脂質合成測定

正常ヒト線維芽細胞は 6 cm ディッシュにて、D-PDMP、L-PDMP、NB-DNJ 存在下で 37°C で 3 日間培養した。血清の入っていない培地で洗浄してから、5 μ M C6-NBD-Cer を含んだ血清の入っていない F10 培地を加え、37°C で 1 時間処理した。細胞を PBS で洗浄してから、セルスクレイパーで細胞をかきとり、一部についてタンパク質定量を行った後、脂質を抽出した。HPTLC プレートに細胞をスポットし、クロロホルム/メタノール/水=65/25/4 の展開溶媒により展開した。FLA3000 を用いて、蛍光脂質を検出した。

4-2-9 電子顕微鏡による観察

正常ヒト線維芽細胞はフィブロネクチンコートされた Aclar プラスチックシートにまき、10 % 血清入りの培地で D-PDMP を加えて 2 日間培養した。4 % パラホルムアルデヒドと 2.5 % グルタルアルデヒドを加えて室温で 30 分間固定した後、1 % 四酸化オスミウムと 0.1 M イミダゾールで処理した。その後 0.2 % タンニン酸で 30 分間染色した。細胞はアセトンで脱水し、Araldite resin に封入した後、超薄切片を調製した。

4-2-10 細胞分画と脂質分析

BHK 細胞を 10 cm ディッシュに 5 枚培養した。氷冷した PBS で 2 回細胞を洗浄してからセルスクレイパーでかきとり、15 ml チューブに回収した。1000 rpm で 5 分間 4°C で遠心し上清を除き、2.5 ml HB buffer (250 mM sucrose, 3 mM imidazol-HCl (pH 7.4))を加えて緩やかにピペッティングしてから 2100 rpm で 10 分間 4°C で遠心した。上清を除いてから 0.5 ml HB buffer を加えて 10 回ピペッティングし、さらに 22 G の針のついた 1 ml シリンジで 10 回ピペッティングをした。2100 rpm で 8 分間 4°C で遠心し、上清(=post nuclear supernatant(PNS)画分)を回収した。PNS 量の 90 % 分の量の 62 % ショ糖溶液を加えてよく混合し 42 % ショ糖溶液として、遠心チューブの一番下に入れた。35 %、25 % のショ糖溶液を順に重層し、さらに HB buffer を重層した。35000 rpm で 1 時間 4°C で遠心した。Beckman Optima MAX-E 超遠心機と、MLS-50 ローターを用いた。25 % ショ糖溶液と HB buffer の界面にくる後期エンドソーム画分を回収し、脂質を抽

出した(Kobayashi et al., 1998b; Kobayashi et al., 2002; Gorvel et al., 1991)。二次元 TLC により、脂質を分析した。クロロホルム/メタノール/32%アンモニア=65/35/5 の展開溶媒により、一次元 TLC を展開した。一次元展開後、真空中で完全に溶媒を蒸発させた。クロロホルム/メタノール/アセトン/酢酸/水=10/2/4/2/1 の展開溶媒により、二次元目を展開した。プリムリン発色液をスプレーし、UV 下でプレートを観察した。プリムリンは非特異的に脂質を検出する試薬である。

4-2-11 X線小角散乱測定

本研究で用いた 2,2'-Dioleoyl-*sn* 1,1'-BMP は化学合成されたもので、就実大学の松尾浩民先生より分与された。100 nmol の BMP をガラスチューブにフィルム上に乾燥させ、阻害剤を含んだ 100 μ l の緩衝液を加えて溶解しボルテックスをしてから、サンプルセルに入れた。阻害剤の濃度は 1 mM もしくは 2.5 mM になるように調製した。サンプルセルは 1.5 mm の長さで 30 μ m の厚さの石英の板で作製したものをを用いた。測定は理化学研究所 SPring-8 にある RIKEN Structural Biology Beamline I(BL-45XU)で行った。X 線の波長は 0.9 Å、サンプル位置におけるビームサイズは 0.4 x 0.7 mm²であった。サンプルから検出器までの距離は 851 mm であった。測定は 37°C で 30 秒間行い、CCD 検出器を用いて検出した。得られた 2 次元の散乱パターンは FIT2D プログラムで 1 次元化した。ピーク位置からラメラ距離 d を計算して求めた。

$$s=1/d=(2/\lambda)\sin \theta$$

$$q=2\pi s=(4\pi/\lambda)\sin \theta$$

4-2-12 酸性リパーゼの測定

正常ヒト線維芽細胞を 10 cm ディッシュに培養し、0.2 M クエン酸緩衝液 pH 4.6 で洗浄後、セルスクレイパーでかきとり、30 秒間超音波処理(Branson sonicator)をした。キュベットに細胞破碎液(24 μ g/ml)、BMP リポソーム(100nM)、酸性リパーゼの基質である 4-methylumbelliferil oleate(100 nM)および様々な濃度の D-PDMP を加えて、37°C で蛍光を測定した(Imanaka et al., 1981)。(励起波長 327 nm、蛍光波長 449 nm)

4-2-13 LDL の再構成

有機溶媒に溶解した脂質はチューブ内で窒素ガスにより、有機溶媒を蒸発させ、脂質フィルムを作製する。全体の 10 %量の DMSO を加えてボルテックスし、37°C で 10 分間インキュベーション

ョンした。適量の LDL を加えてボルテックスし、37℃でさらに 30 分から 60 分インキュベーションし、再構成 LDL とした。

4-2-14 LDL の取り込み

正常ヒト線維芽細胞は 10 %血清入りの F10 培地でガラスボトムディッシュに培養し、10 μ M D-PDMP を 24 時間処理した。5 % LPDS を含む F10 培地に交換し、10 μ g/ml cholesteryl BODIPY FL C12 を含む LDL を加えて 37℃で 5 時間インキュベーションした。細胞は生きたまま、Zeiss LSM510 で観察した。

4-2-15 LDL の分解

正常ヒト線維芽細胞を 3.5 cm ディッシュに 10 %血清入り F10 培地で 1 日培養した後、5 %LPDS を含む F10 培地に交換した。さらに 1 日培養してから、20 μ M mevinolin、0.25 mM メバロン酸を含む 5 %LPDS -F10 培地に交換し D-PDMP を加えた。1 日培養してから、cholesteryl oleate [cholesteryl 1-4- 14 C] (0.2 μ Ci/ml)を含む 10 μ g/ml LDL を添加しインキュベートした。2 時間後、培地を D-PDMP, 20 μ M mevinolin, 0.25 mM メバロン酸を含む 5 % LPDS-F10 培地に交換し、さらに 0-6 時間培養した。PBS で洗浄し、脂質を抽出し、TLC により分離した。展開溶媒はヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸=80/20/2 を用いた。放射活性を BAS2500 により、検出した。

4-2-16 細胞内コレステロールとコレステロールエステル量の測定

正常ヒト線維芽細胞は 6 cm ディッシュに培養した。D-PDMP を加えて 3 日間培養してから、PBS で洗浄し、細胞をかきとってから一部をタンパク定量し、残りのサンプルを脂質抽出した。脂質は HPTLC にスポットし、展開した。展開溶媒は、コレステロールの定量的場合は、ヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸=80/20/2 を用い、コレステロールエステルの定量的場合は、ヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸=90/10/1 を用いた。LAS1000 により検出した。

4-2-17 正常ヒト線維芽細胞のコレステロールのエステル化

正常ヒト線維芽細胞を 3.5 cm ディッシュに 10 %血清入り F10 培地で 1 日培養した後、5 % LPDS を含む F10 培地に交換した。さらに 1 日培養してから、20 μ M mevinolin、0.25 mM メ

パロン酸を含む 5%LPDS-F10 培地に交換し D-PDMP を加えた。同時に LDL を添加した。1 日培養してから、 $[^{14}\text{C}]$ oleate(0.5 $\mu\text{Ci/ml}$)を添加しインキュベートした。1 時間後、PBS で洗浄し、脂質を抽出し、TLC により分離した。展開溶媒はヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸=80/20/2 を用いた。BAS2500 より、検出した。

4-2-18 GM95 細胞と Neuro-2a 細胞のコレステロールのエステル化

細胞は 3.5 cm ディッシュに 10 % 血清入り培地で培養し、 $[^{14}\text{C}]$ oleate(0.5 $\mu\text{Ci/ml}$)を添加しインキュベートした。1 時間後、PBS で洗浄し、脂質を抽出し、TLC により分離した。展開溶媒はヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸=80/20/2 を用いた。BAS2500 により、検出した。

4-2-19 ストレプトリシン O 処理

正常ヒト線維芽細胞を 24 穴プレートにまき、10 % 血清入り培地に D-PDMP を加えて 37°C で 3 日間培養した。血清を除いた培地で細胞を洗ってから、ストレプトリシン O を含む、血清を除いた培地を加え、氷上で 10 分間インキュベートした。MTT アッセイ法により細胞生存率を測定した(Ishitsuka et al., 2004)。

4-2-20 パクリタキセル (タキソール) よる細胞毒性

Neuro-2a 細胞を 6 穴プレートにまき、5 % 血清入り培地に D-PDMP を加えて 37°C で 1 日間培養した。1 日後に、パクリタキセルと D-PDMP を含む 5 % 血清入り培地に交換し、3 日間培養した。培地は 1 日ごと新しいものに交換した。3 日後に MTT アッセイ法により細胞生存率を測定した(Ishitsuka et al., 2004)。

4-2-21 蛍光パクリタキセルの取り込み

Neuro-2a 細胞は 5 % 血清入り培地で培養し、D-PDMP を加えて 3 日間さらに培養する。細胞を血清を含まない培地で洗浄後、フェノールレッドを含まない DMEM-F12 培地に交換し、50 nM BODIPY-FL パクリタキセルを加えた。37°C で 1 時間インキュベーションしてから、培地を回収し最終濃度 0.1 % になるように TritonX100 を加えた。細胞は 0.1 % TritonX100 を含む PBS を加えて溶解した。蛍光光度計(JASCO FP6500)を用いて蛍光を測定した。(Ex=505nm、Em=515nm) メチルベータシクロデキストリン(m β CD)/コレステロール複合体を加える場合は、D-PDMP を 3 日間処理した後、5%血清入り培地に m β CD/コレステロール(コレステロールの最

終濃度は 100 μM)を混ぜ細胞に 37°Cで 30 分処理した。洗浄後、細胞に BODIPY-FL パクリタキセルを処理した。

4-3 結果

4-3-1 D-PDMP と NB-DNJ は糖脂質の合成を阻害するが L-PDMP は阻害しない

D-PDMP と NB-DNJ は GCS の阻害剤としてよく知られている(Radin et al., 1993; Sillence et al., 2002)。対照的に L-PDMP は糖脂質合成を阻害しないということが報告されている。初めにこれらの阻害剤が私の条件で糖脂質の合成を阻害するか確かめた。C6-NBD-セラミドはセラミドの蛍光アナログである。C6-NBD-セラミドを細胞に処理したとき、C6-NBD-スフィンゴミエリンと C6-NBD-グルコシルセラミドが合成される。阻害剤を処理した細胞に C6-NBD-セラミドを処理したのち、細胞から脂質を抽出し TLC により脂質を解析した。Fig.4-2 に示すように私の実験条件下でも、D-PDMP と NB-DNJ は糖脂質の合成を阻害したが、L-PDMP は阻害しなかった。

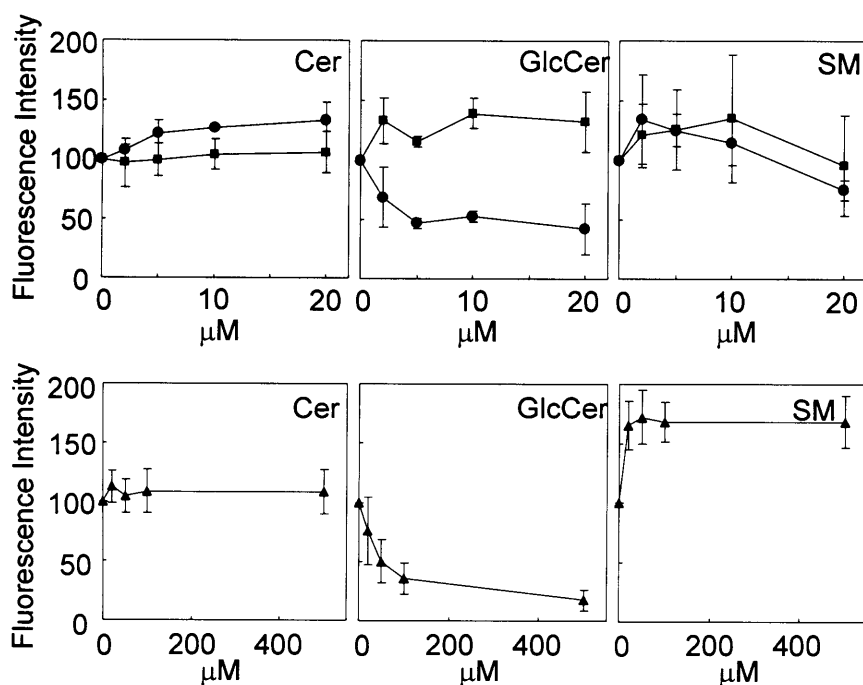


Fig. 4-2 D-PDMPとNB-DNJは糖脂質合成を阻害するがL-PDMPは阻害しない。正常ヒト線維芽細胞に様々な濃度のD-PDMP(●),L-PDMP(■),NB-DNJ(▲)を3日間処理してからC6-NBD-Cerを加えて、合成されたC6-NBD-SMとC6-NBD-GlcCerを定量した。実験は3回行った。

4-3-2 D-PDMP は後期エンドソームに富む BMP-ドメインの形態を変化させる

PDMP は後期エンドソーム・リソソームの空胞化を誘導することが報告されている(Rosenwald and Pagano, 1994)。後期エンドソームの内膜は負電荷を帯びたユニークな脂質、BMP に富んでいる(Kobayashi et al., 1998b; Kobayashi et al., 2001; Kobayashi et al., 2002)。そこで PDMP の BMP に与える影響について BMP 特異的抗体を用いて検証した(Kobayashi et al., 1998b)。その結果、PDMP を処理した細胞では BMP を含む小胞が巨大化していることがわかった(Fig.4-3 A-D)。この細胞を電子顕微鏡で観察したところ、多重膜構造が細胞内に蓄積していることがわかった(Fig.4-4 A-F)。この構造は BMP 抗体で認識されたことから BMP に富んだ膜がこの様な構造に変化したことを示している。

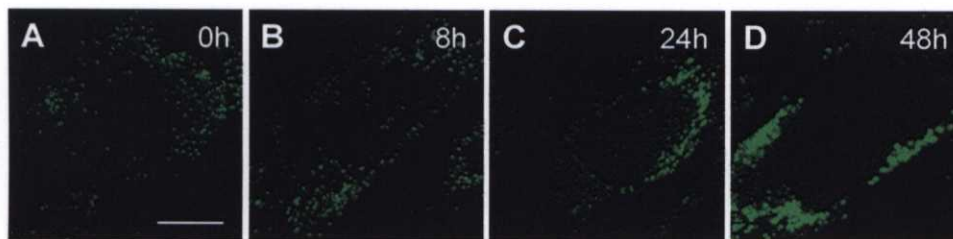


Fig. 4-3 D-PDMPは後期エンドソームに富むBMP-ドメインの形態を変化させた。
(A-D)正常ヒト線維芽細胞に10 μ MのD-PDMPを処理して細胞を固定し、抗BMP抗体で染色した。Bar=20 μ m。

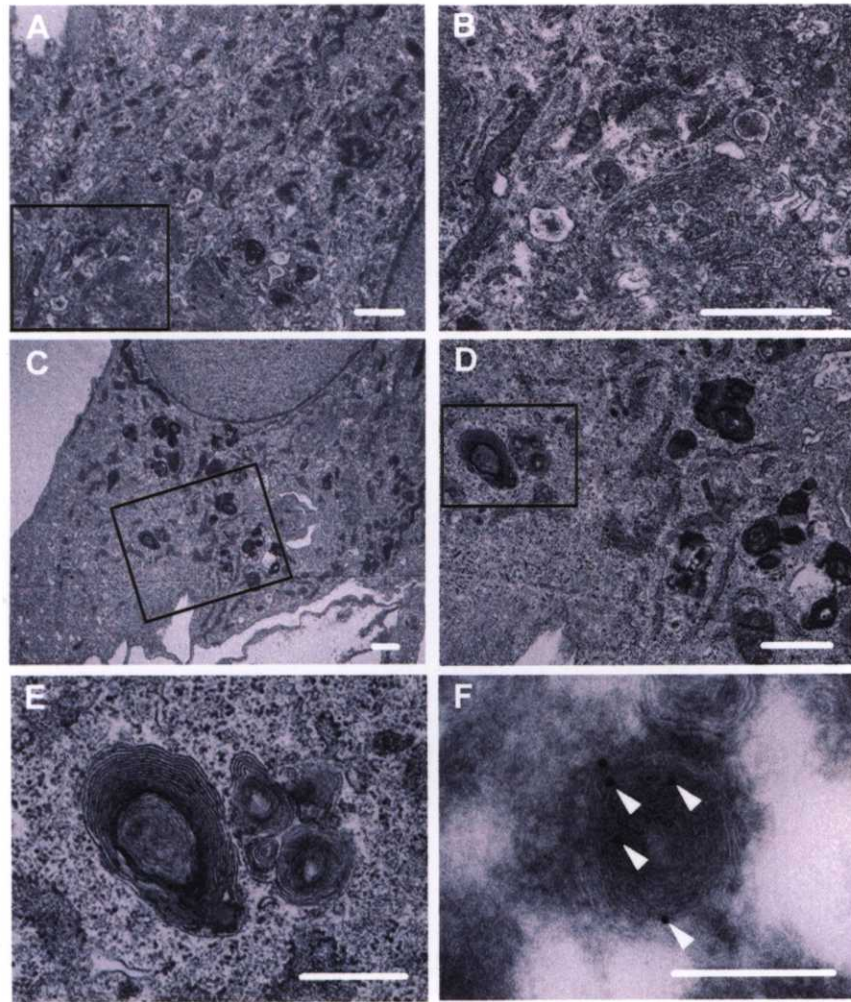


Fig. 4-4 D-PDMPは後期エンドソームに富むBMP-ドメインの形態を変化させた。正常ヒト線維芽細胞は2日間D-PDMP非存在下(A,B)または存在下(C-F)で培養した。BはAの四角のところであり、DはCの四角のところ、EはDの四角のところである。Fの矢印の先端は金コロイドを示す。Bar=1 μ m(A-D), 500 nm(E,F)

4-3-3 D-PDMP は BMP を含む膜に分配される

蛍光 PDMP 類似体は後期エンドソームに蓄積することは以前報告されているが蛍光標識されていない PDMP が実際にエンドソーム・リソソームに存在するかはわかっていなかった。(Rosenwald and Pagano, 1994; Kok et al., 1998)。PDMP のような疎水性の強いアミンは膜を簡単に通ることができ、一度酸性コンパートメントに蓄積されるとアミノ基が正に帯電し、オルガネラの中にトラップされると考えられる。Fig4-5 では蛍光のついていない PDMP の細胞内分布を検証した。BHK 細胞ではエンドソーム画分を精製する方法が確立しているため、BHK 細胞を用いて実験を行った(Kobayashi et al., 1998b; Gorvel et al., 1991)。PDMP 処理をした細胞からエンドソーム画分を精製してから、脂質を抽出し、TLC で分析した。PDMP はプリムリン発色液

により検出した(Fig.4-5 A)。標準サンプルのプリムリン染色像から、後期エンドソーム内の PDMP と BMP の割合は約 1:3 であるということがわかった(Fig.4-5 D)。しかし、D-PDMP は初期エンドソーム画分など他の画分からも検出されたことから、D-PDMP は後期エンドソームのみに制限されていないことが示された(Fig.4-5 B,C)。この結果は D-PDMP は糖脂質合成阻害剤であり糖脂質合成酵素が主としてゴルジ体に分布していることから支持される。

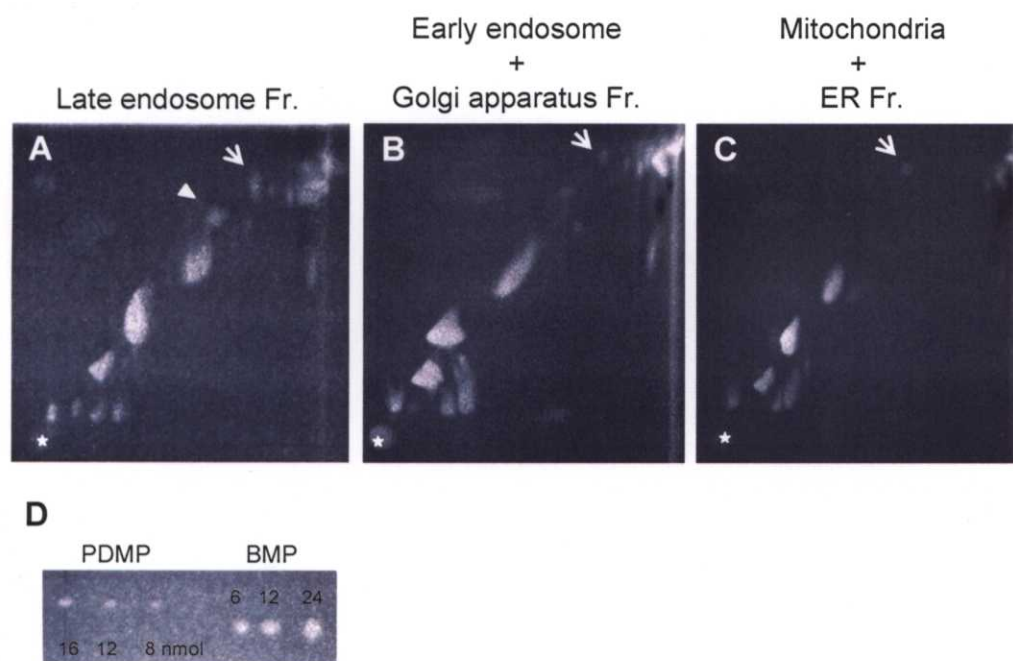


Fig. 4-5 D-PDMPの細胞内分布。

Baby hamster kidney (BHK)細胞は10 μ M D-PDMP存在下で24時間インキュベーション後、各フラクションに分けられ2次元TLCによって分析した。後期エンドソーム画分(A)にはBMPとD-PDMPが検出された。初期エンドソーム/ゴルジ体画分(B)、またミトコンドリア/小胞体画分(C)にもD-PDMPは検出された。TLCプレートにBMPとD-PDMPをスポットし発色したものをスタンダードとし、量を比較した(D)。矢印はD-PDMP、矢印の先はBMPを示す。

4-3-4 D-PDMP は pH 依存的に BMP 膜の組成を変化させる

今までの結果から、D-PDMP は BMP を含む膜に存在していることがわかった。BMP に富んだ膜ドメインは後期エンドソームからの膜輸送、また後期エンドソームにおけるスフィンゴ脂質の分解に関与していることが示唆されている(Kolter and Sandhoff, 2005; Kobayashi et al., 1999; Le Blanc et al., 2005)。BMP 特異的抗体により膜輸送が阻害されたことから、特異的な脂質組成が BMP に富んだ脂質ドメインの機能に重要な役割をしていることが示されている(Kobayashi et al., 1999; Le Blanc et al., 2005; Matsuo et al., 2004)。BMP は脂肪酸としては sn-1, sn-1' というユニークな立体配置を持ち、脂肪酸は不安定な 2-, 2'-位置に結合している(Kobayashi

et al., 2002)。哺乳類の細胞ではジオレオイル(diC18:1)分子種がもっとも主要である。私たちは 2,2'-dioleoyl sn-1, sn-1' BMP を用い(Matsuo et al., 2004; Chevallier et al., 2000)、PDMP との相互作用を X 線小角散乱解析によって調べた。後期エンドソームの内膜は酸性であるため、pH 4.6、7.4、8.5 について実験を行った。BMP のみでは pH に関係なく、散乱スペクトル $q \sim 0.90 \text{ nm}^{-1}$ と $q \sim 1.50\text{--}1.90 \text{ nm}^{-1}$ の位置にブロードなピークが観察された(Fig.3-5 A)。 $q \sim 0.90 \text{ nm}^{-1}$ のピークは BMP 膜のラメラ構造に由来する一次のピークである。一方、 $q \sim 1.50\text{--}1.90 \text{ nm}^{-1}$ のピークは二重膜の形状因子に起因しており、BMP の膜状態は膨潤し、ゆるくパックした構造であることを示している。つまり二つの状態が混在している。pH 4.6 のとき PDMP を加えると BMP の散乱パターンは劇的に変化した(Fig.4-6 A)。1mM の D-PDMP を加えたとき、ブロードだった $q \sim 0.90 \text{ nm}^{-1}$ のピークは減少し、 $q = 1.30 \text{ nm}^{-1}$ にシャープなピークが検出された。2.5 mM の D-PDMP を加えたときはピークは広角のほうへシフトし、ラメラ構造の一次、二次のピークが観察された。膜間距離を計算すると 4.58 nm であった。 $q \sim 0.9 \text{ nm}^{-1}$ の小さなピークも一次、二次のラメラ構造を表しているが、こちらは膜間距離が 6.10 nm であった。つまり、D-PDMP を 2.5 mM 加えた状態では二つの状態が相分離して共存していることを示している。この効果は pH に依存しており、中性、アルカリ性のときは酸性のときのようなパターンの変化は見られなかった(Fig.4-6 B,C)。L-PDMP は D-PDMP のように BMP の散乱パターンを変化させたが、NB-DNJ では影響なかった(Fig.4-6 D,E)。

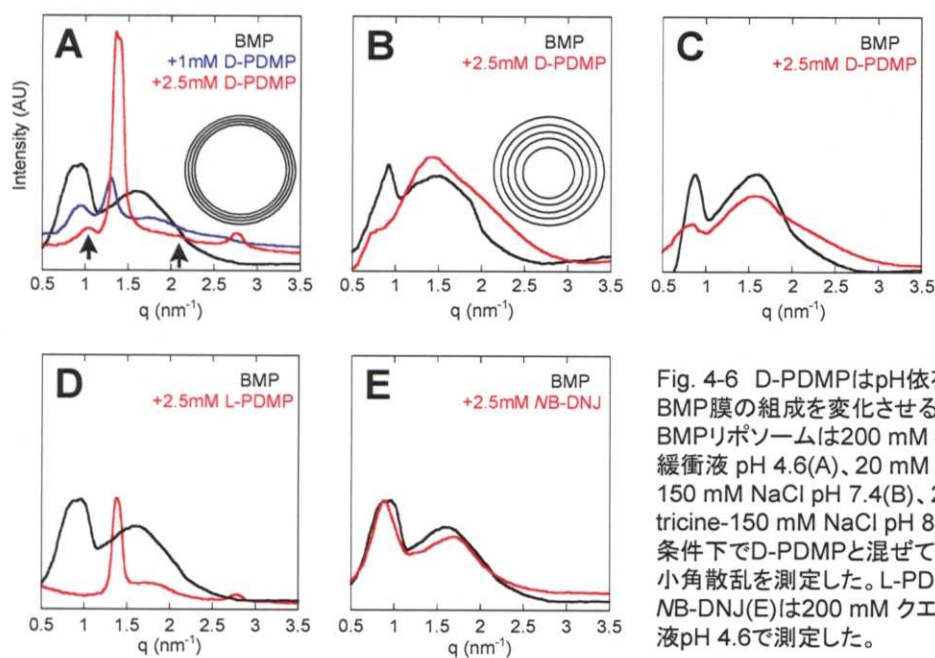


Fig. 4-6 D-PDMPはpH依存的に BMP膜の組成を変化させる。BMPリポソームは200 mM クエン酸緩衝液 pH 4.6(A)、20 mM Hepes-150 mM NaCl pH 7.4(B)、20 mM tricine-150 mM NaCl pH 8.5(C)の条件下でD-PDMPと混ぜてからX線小角散乱を測定した。L-PDMP(D)とNB-DNJ(E)は200 mM クエン酸緩衝液pH 4.6で測定した。

4-3-5 D-PDMP は BMP による酸性リパーゼの活性化を阻害する

上記の結果から D-PDMP は後期エンドソームに蓄積し、BMP と相互作用をしていることがわかった。散乱パターンから D-PDMP は酸性条件化で BMP の負電荷を覆うことが示された(de Wolf et al., 1990)。酸性リパーゼは活性化の際に負に荷電したリン脂質が必要であることが報告されている(Takeuchi et al., 1985)。BMP は後期エンドソームの内膜のリン脂質の 50 %以上を占めるため、後期エンドソームにおいて負に荷電したリン脂質の最も主要なものであるといえる(Kobayashi et al., 2002)。4-methylumbelliferyl oleate を基質として、細胞の酸性リパーゼを測定したところ、BMP によって活性化されることがわかった(Fig.4-7 A)。またこの活性化は D-PDMP によって濃度依存的に阻害された。BMP 非存在下での活性は D-PDMP によって阻害されなかったことから、D-PDMP は直接酸性リパーゼを阻害するわけではないことがわかった(Fig.4-7 B)。以上の結果から D-PDMP は後期エンドソーム特異的脂質 BMP の構造を変化させ、酸性リパーゼを阻害することがわかった。

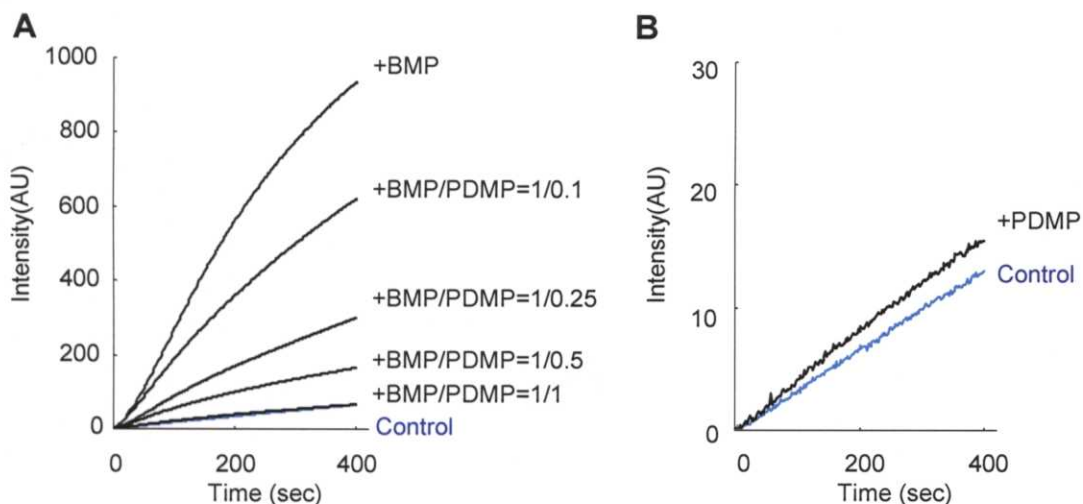


Fig. 4-7 D-PDMPはBMPによって活性化された酸性リパーゼを阻害する。
(A)正常ヒト線維芽細胞の細胞破碎液にBMPリポソームとD-PDMPを様々な割合で加えて、酸性リパーゼの活性を測定した。(B)BMPリポソームを加えず、D-PDMPだけを加えてもコントロールにおいても変わらなかった。

4-3-6 D-PDMP は LDL の分解を阻害し、細胞内のコレステロールエステル量を増加させる

酸性リパーゼは LDL の分解に関与している。そこで LDL の取り込みと分解における D-PDMP の影響を細胞を用いて調べた。蛍光コレステロールエステルを再構成した LDL を細胞に取り込ませたところ、D-PDMP を処理した細胞においてもコントロール細胞同様に LDL の取り込みが観察された(Fig.4-8 A、B)。

LDL の分解は、 ^{14}C ラベルしたコレステロールエステルを再構成した LDL を用いて実験を行った。 ^{14}C ラベルしたコレステロールエステルを含む LDL を細胞に 1, 3, 6 時間処理したのち、細胞から脂質を抽出し TLC で分析したところ、コントロール細胞では分解してできた ^{14}C コレステロールが検出されたが、D-PDMP 処理した細胞からは検出されなかった(Fig.4-8 C)。L-PDMP も同様に LDL の分解を阻害した。一方 NB-DNJ はほとんど影響を与えなかった(Fig.4-8 D)。

D-PDMP によって LDL の分解が阻害されたことから、細胞内にコレステロールエステルが蓄積することが予想されたので、次にコレステロールエステルの量を測定した。D-PDMP、または L-PDMP を処理した細胞ではコレステロールエステルが蓄積していたが、NB-DNJ を処理した細胞では蓄積していなかった(Fig.4-8 E)。Nile red は中性脂質を染色するマーカーである (Greenspan et al., 1985; Kobayashi et al., 2000)。Nile red を用いて細胞を染色したところ、コントロール細胞ではゴルジ体が染色された。D-PDMP、または L-PDMP を処理した細胞ではゴルジ体に加えて、細胞内に強いシグナルが観察された(Fig.4-9)。後期エンドソームマーカーである CD63 (Escola et al., 1998) と一部共局在したため、後期エンドソームにコレステロールエステルが蓄積していることが示唆される。また Fig.4-3 と同様、後期エンドソームがコントロール細胞に比べて巨大化していることも観察された。NB-DNJ は影響を与えなかった。以上のことから D-PDMP、または L-PDMP は LDL の分解を阻害することがわかった。

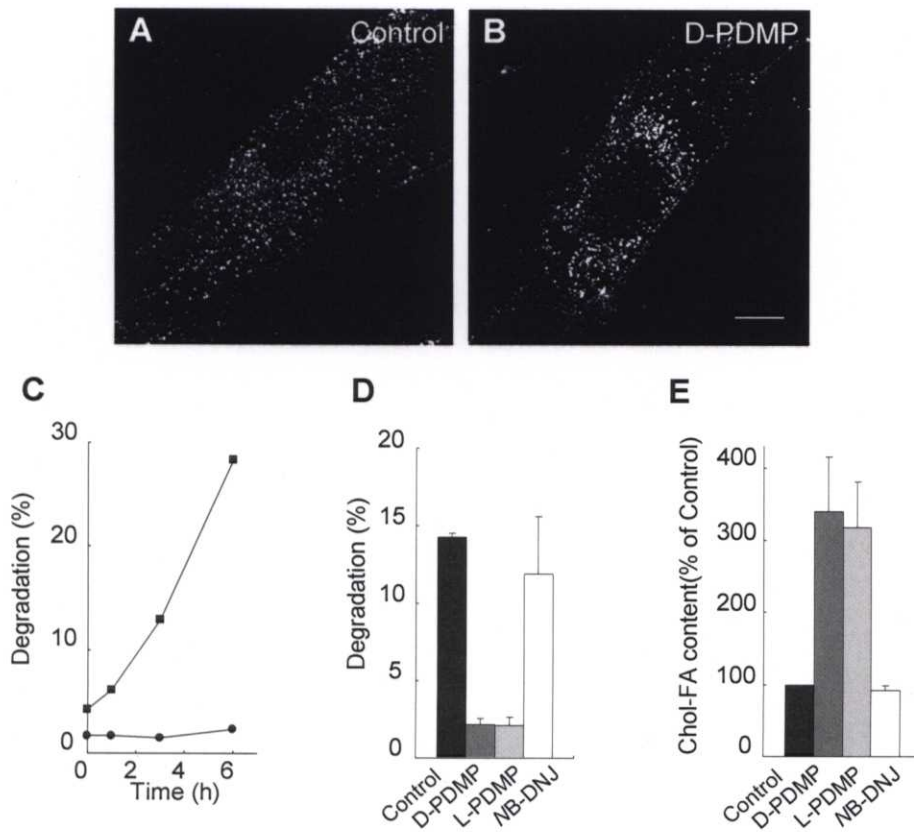


Fig. 4-8 D-PDMPはLDLの分解を阻害し、細胞内のコレステロール量を増加させる。(A、B)正常ヒト線維芽細胞を10 μ M D-PDMPの非存在下(A)または存在下(B)で培養し、BODIPY FL C12を再構成したLDLの取り込みを見た。Bar=10 μ m。(C、D)[cholesteryl-4- 14 C] oleateを再構成したLDLを細胞に6時間取り込ませた後、D-PDMPなし(■)、あり(●)で時間依存的に分解を見た(C)、10 μ M D-PDMP、L-PDMPまたは500 μ M NB-DNJを加えた時の影響を見た(D)。(E)細胞にいろいろな阻害剤を加えたときのコレステロールエステル量を定量した。実験は3回行った。

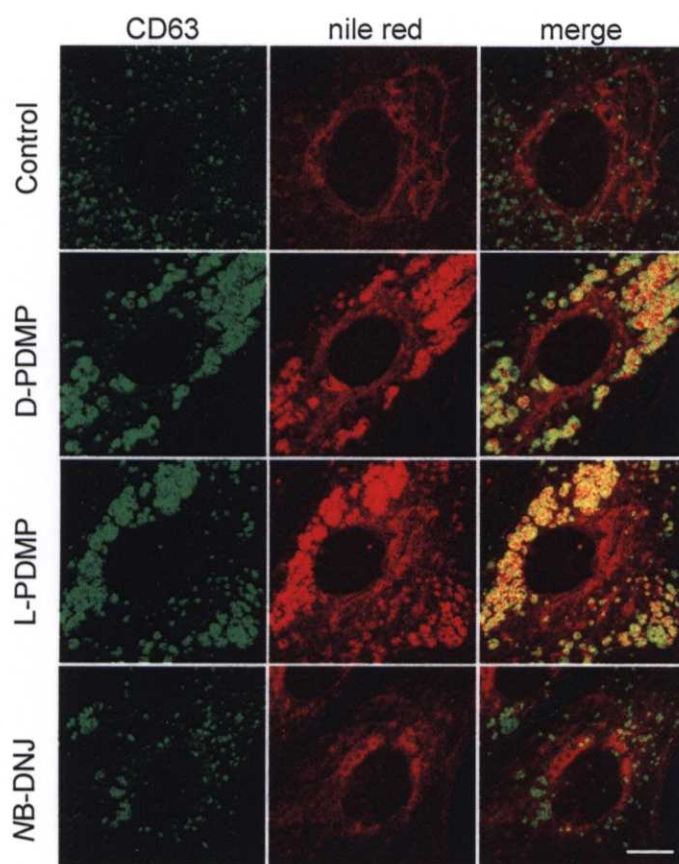


Fig. 4-9 細胞内の中性脂質の分布。
正常ヒト線維芽細胞に10 μ M D-PDMP、10 μ M L-PDMP、100 μ M NB-DNJを加えて3日間培養後、Nile red(赤)と抗CD63抗体(緑)で染色した。Bar=10 μ m。

4-3-7 D-PDMP、または L-PDMP はコレステロールのエステル化を阻害する

取り込まれた LDL 内のコレステロールエステルは後期エンドソームで分解され、コレステロールになった後、細胞膜を介して、または直接小胞体に運ばれ、ACAT により再びコレステロールエステルにエステル化される。PDMP は LDL の分解を阻害することが示されたので、次に小胞体におけるエステル化を測定した。細胞に HMG-CoA reductase の阻害剤である mevinolin(lovastatin)を処理して、コレステロールの合成を止めた状態で、LDL を処理し PDMP の存在下でコレステロールのエステル化を調べた。その結果、D-PDMP は LDL によるコレステロールのエステル化を阻害した(Fig.4-10 A、B)。U18666A は後期エンドソームからのコレステロールの輸送を阻害し、コレステロールのエステル化を抑制することが知られており(Lange, 1994; Liscum and Underwood, 1995; Underwood et al., 1996)、我々の実験においてもエステル化は抑制された。NB-DNJ はコレステロールのエステル化を抑制しなかった。

PDMP による LDL の分解、そしてコレステロールのエステル化の阻害と糖脂質の合成阻害の関係についてさらに検討するため、糖脂質合成酵素を欠損した GM95 細胞を用いて(Ichikawa et al., 1994)、コレステロールのエステル化を調べた。正常ヒト線維芽細胞同様に GM95 細胞においても D-PDMP を処理するとコレステロールのエステル化が阻害されたので、D-PDMP は糖脂質の合成に関係なくコレステロールの代謝に影響していることがわかった(Fig.4-10 C)。

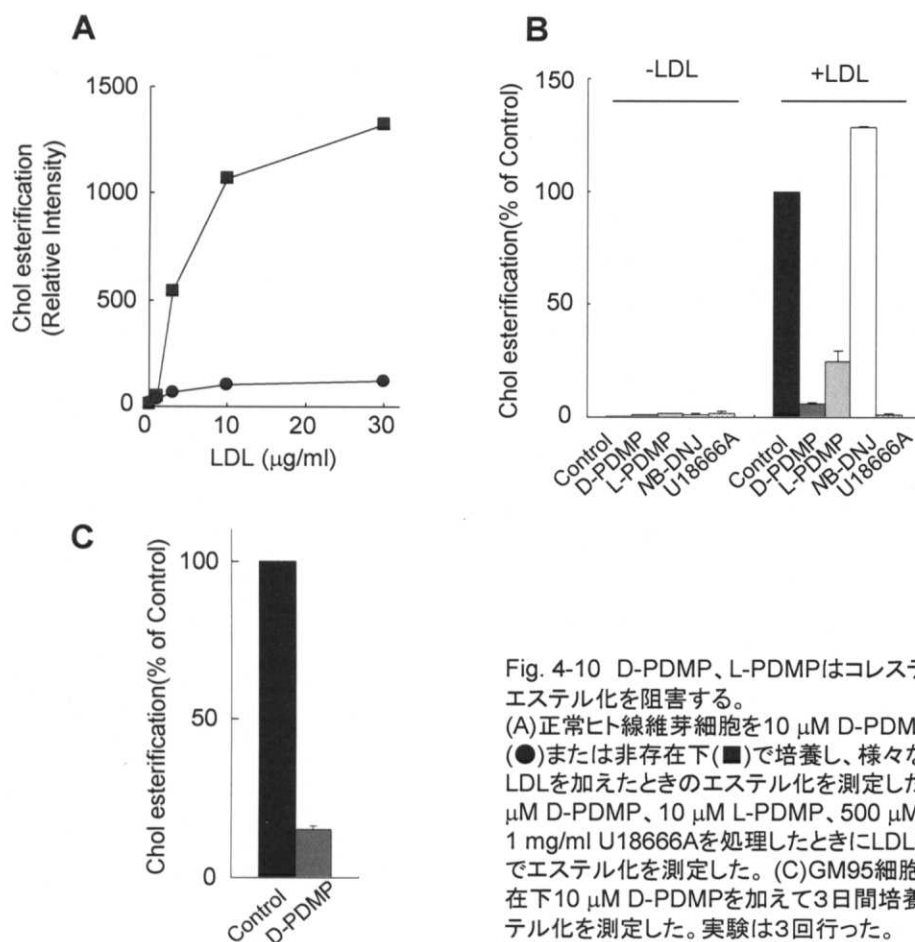


Fig. 4-10 D-PDMP、L-PDMPはコレステロールのエステル化を阻害する。
(A)正常ヒト線維芽細胞を10 μM D-PDMP存在下(●)または非存在下(■)で培養し、様々な濃度のLDLを加えたときのエステル化を測定した。(B)10 μM D-PDMP、10 μM L-PDMP、500 μM NB-DNJ、1 mg/ml U18666Aを処理したときにLDL有り無しでエステル化を測定した。(C)GM95細胞に血清存在下10 μM D-PDMPを加えて3日間培養し、エステル化を測定した。実験は3回行った。

4-3-8 D-PDMP はコレステロールの分布を変える

PDMP 処理した細胞でのコレステロールの分布を観察するため Fig.4-11A ではコレステロールに結合するフィリピンを用いて細胞を染色した(Sato et al., 2004; Sokol et al., 1988)。D-PDMP、または L-PDMP を処理した細胞では、フィリピンのシグナルが強く観察されたことからコレステロールが細胞内に蓄積していることが示唆された。フィリピンのシグナルは BMP 抗体の分布と一致したことから、コレステロールは後期エンドソームに蓄積していることがわかった(Fig.4-11 B)。次に細胞のコレステロール含量を調べたが、D-PDMP 処理した細胞と処理していない細胞の

間でコレステロールの量に変化はなかった(Fig.4-11 C)。ストレプトリシン O はバクテリアの毒素で細胞表面のコレステロールに結合し、穴を開けて細胞を殺す(Kobayashi et al., 1992; Bhakdi et al., 1993)。この毒素を用いて細胞表面のコレステロール量を調べた。D-PDMP を処理した細胞と処理していない細胞にストレプトリシン O を処理して、細胞毒性を MTT 法により測定した。細胞は D-PDMP 処理により、少しではあるが確実にストレプトリシン O に耐性になった(Fig.4-11 D)。この結果は細胞表面のコレステロール量が減少していることを示している。

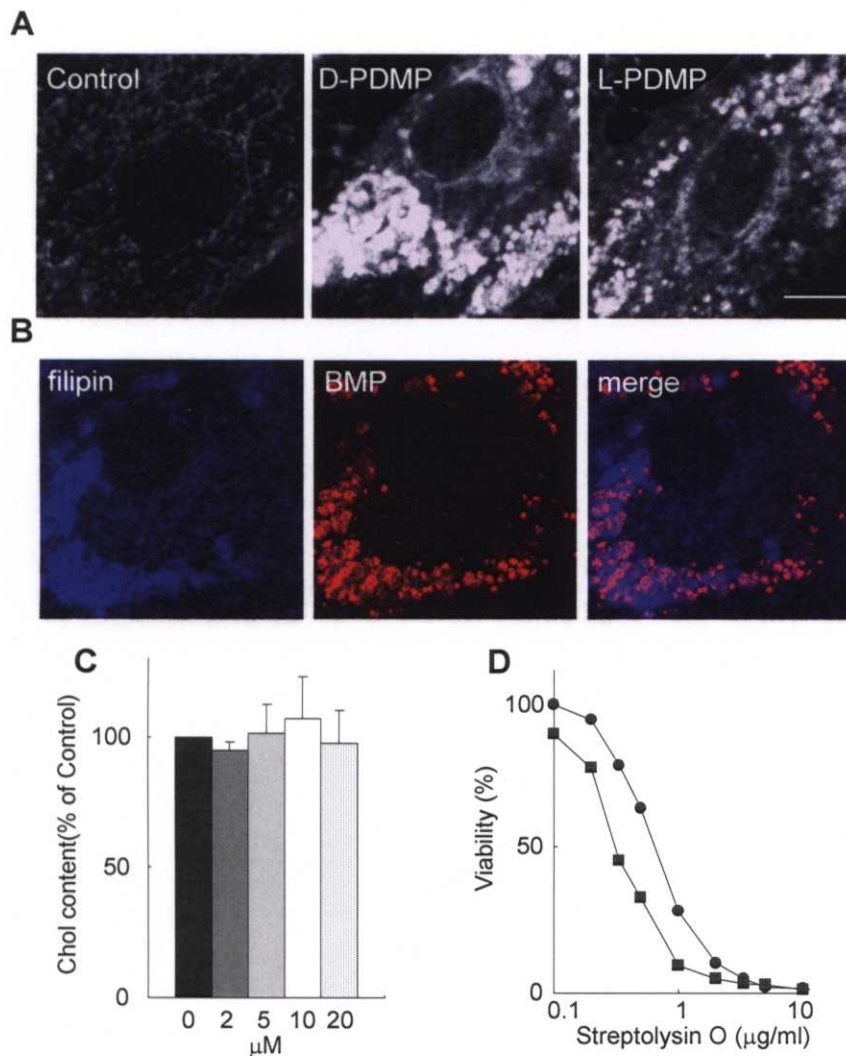


Fig. 4-11 D-PDMPはコレステロールの分布を変える。
 (A)正常ヒト線維芽細胞を10 μ M D-PDMP、10 μ M L-PDMPと培養しfilipin染色をした。(B)正常ヒト線維芽細胞を10 μ M D-PDMPと培養し抗BMP抗体とFilipinで染色した。Bar=10 μ m。(C)正常ヒト線維芽細胞を様々な濃度のD-PDMPと培養してからコレステロール量を定量した。実験は3回行った(D)正常ヒト線維芽細胞を10 μ M D-PDMP存在下(●)または非存在下(■)で培養しストレプトリシンOの感受性を調べた。実験は4回行い、そのうちの1回の結果を示す。

4-3-9 PDMP はコレステロール依存的にニューロblastoma細胞におけるパクリタキセルの輸送を調節する

今までの結果から D-PDMP は LDL の分解を阻害し、細胞のコレステロールの代謝を変化させ、その結果細胞表面のコレステロール量が減少することがわかった。多剤耐性細胞において PDMP は薬剤感受性に影響を与えているが、この影響は PDMP によって引き起こされたコレステロールのホメオスタシスの変化に起因していることが考えられた。P-糖タンパク質は細胞膜でコレステロールに富んだラフト様のドメインに局在しているタンパク質で、多剤耐性細胞で薬剤の細胞外への流出に関与している (Modok et al., 2004; Troost et al., 2004)。P-糖タンパク質の活性はコレステロールによって制限されることが報告されている。そこで PDMP の P-糖タンパク質活性への影響を調べた。細胞は、パクリタキセルに多剤耐性を示すニューロblastoma、Neuro-2a 細胞を用いた。Neuro-2a 細胞に D-PDMP を処理するとパクリタキセルに感受性になることが報告されている (Sietsma et al., 2000)。Fig.4-12 A では D-PDMP、または L-PDMP を処理した細胞がパクリタキセルに感受性になることを再確認した。NB-DNJ では影響がなかった。Neuro-2a 細胞も正常ヒト線維芽細胞と同様に D-PDMP 処理によりコレステロールのエステル化が阻害され、コレステロールエステルの量が増加していることがわかった (Fig.4-12 B)。P-糖タンパク質の活性を検討するために、蛍光パクリタキセルの取り込みを測定した。D-PDMP を処理した細胞では細胞内の蛍光パクリタキセルの量が約 2 倍に増加した (Fig.4-12 C)。つまりパクリタキセルの流出が阻害されていることを示しており、P-糖タンパク質の活性が低下していることを示唆している。L-PDMP でも同様の結果が得られたが、NB-DNJ ではコントロールと差がなかった。細胞内の蛍光パクリタキセルの量が増加したのは PDMP 処理により細胞表面のコレステロール量が減少し P-糖タンパク質の活性が低下したためと考えられたため、次にコレステロールの影響を調べた。m β CD/コレステロールの複合体を処理して細胞膜のコレステロール量を増加し、同様の実験を行った。その結果、蛍光パクリタキセルの取り込みは D-PDMP 処理をしたにもかかわらず、コントロールと変化がなかった。以上の結果から、PDMP はコレステロールに依存して Neuro-2a 細胞においてパクリタキセルの輸送を調節していることがわかった。

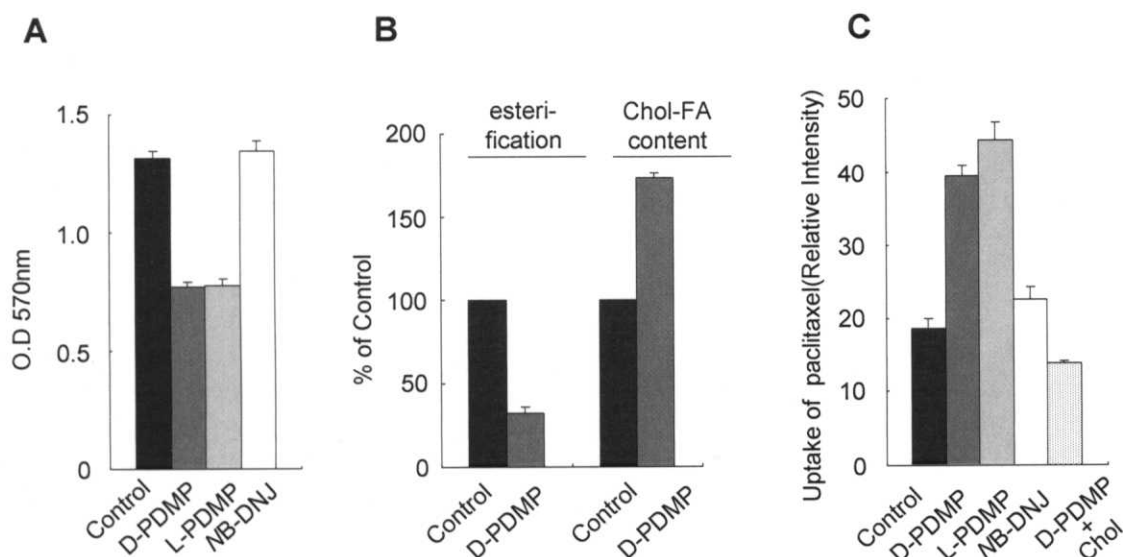


Fig. 4-12 PDMPはコレステロール依存的にパクリタキセルの輸送を調節する。
 (A)Neuro-2a細胞を10 μ M D-PDMP、10 μ M L-PDMP、500 μ M NB-DNJと培養し、パクリタキセルを加えて生存率を測定した。(B)Neuro-2a細胞に10 μ M D-PDMPを処理して $[^{14}\text{C}]$ oleic acidを加えてエステル化を測定した。またコレステロールエステルの量を定量した。実験は3回行った。(C)Neuro-2a細胞に10 μ M D-PDMP、10 μ M L-PDMP、500 μ M NB-DNJを処理してから蛍光パクリタキセルを加えて取り込みを見た。D-PDMP+Cholは10 μ M D-PDMPを処理してからm β CD/Cholesterolを加えてから蛍光パクリタキセルを処理した。実験は3回行った。

4-4 考察

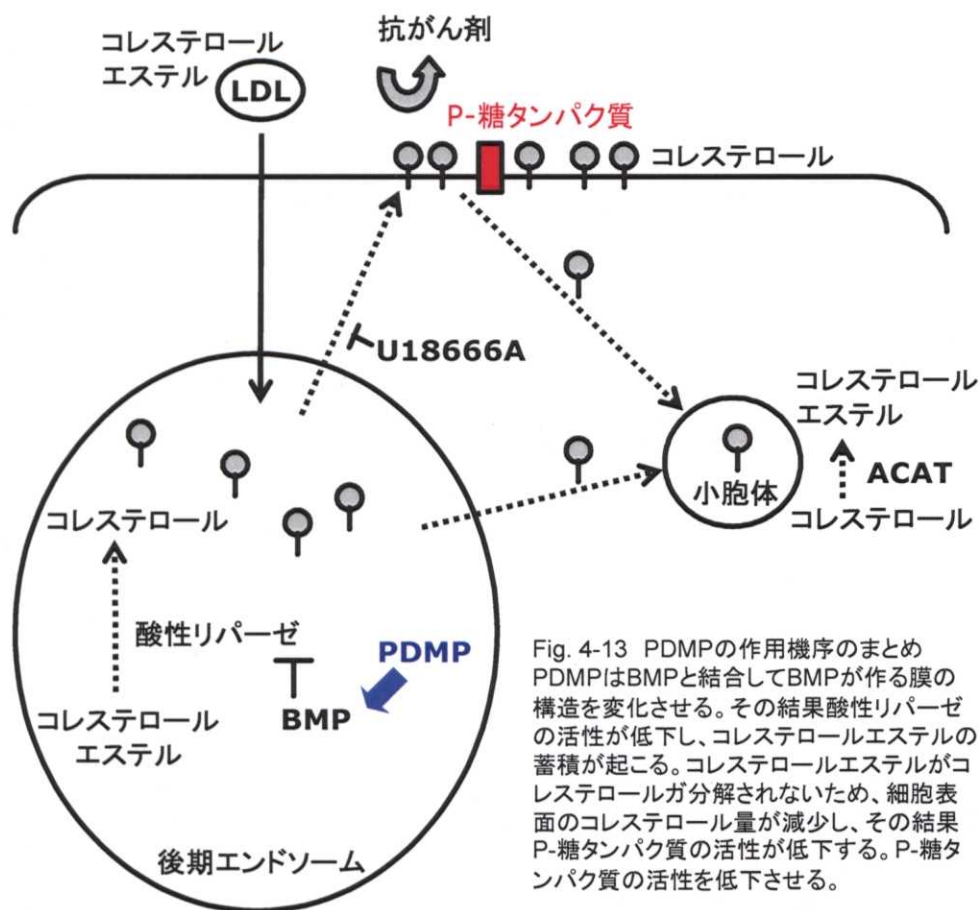
4-4-1 D-PDMP は糖脂質合成非依存的にコレステロールのホメオスタシスを変える

PDMP は糖脂質合成阻害剤としてよく知られている(Radin et al., 1993; Sillence et al., 2002)。しかしながら、糖脂質合成の阻害だけでは説明できない様々な活性が報告されている。これらには①糖脂質の分解に関係する酵素の阻害(Radin, 2003a; Bieberich et al., 1999)、②細胞周期の停止(Rani et al., 1995)、③ゴルジ体からの膜輸送の阻害(Kok et al., 1998; Rosenwald et al., 1992)、④リソソームの分断(Rosenwald and Pagano, 1994)、⑤細胞内のコレステロールの蓄積(Roff et al., 1991; Inokuchi et al., 2000)、などがあげられる。RoffらはPDMPがコレステロールエステルの形成を阻害し、リソソームにコレステロールが蓄積することを報告している(Roff et al., 1991)。PDMPの蛍光アナログが細胞内に蓄積することも報告されている(Rosenwald and Pagano, 1994; Kok et al., 1998)。彼らはコレステロールが蓄積することは、PDMPやU18666Aのような疎水性アミンの性質であると推測している。一方、井ノ口らはD-PDMPによってコレステロールが蓄積するのは糖脂質とコレステロールの物理的な結合が糖脂質ドメインの中にコレステロールをトラップすることが原因であると、推測している(Inokuchi et al., 2000)。本研究にお

いて、私は D-PDMP が後期エンドソームに蓄積し、BMP 膜の構造を修飾することにより、LDL の分解を阻害し細胞内のコレステロールのホメオスタシスを変えることを示した。この効果は糖脂質の合成に関与しない L-PDMP でも示され、糖脂質を持たない GM95 細胞においても見られた。つまり、D-PDMP により細胞にコレステロールが蓄積するのは、糖脂質に関係なく起こることが示された。

4-4-2 D-PDMP はコレステロールのホメオスタシスを変えることで、抗がん剤の輸送を調節する

D-PDMP により多剤耐性細胞は抗がん剤に感受性になる(Lavie et al., 1997; Morjani et al., 2001; Olshefski and Ladisch, 2001; Radin, 2003b; Sietsma et al., 2000; Shabbits and Mayer, 2002)。多剤耐性の主な原因は P-糖タンパク質の活性化である(Ambudkar et al., 2003; Dean et al., 2001)。P-糖タンパク質は ATP-binding cassette (ABC) transporter super family のひとつで、ATP 依存的な排出ポンプとして働き、様々な抗がん剤を細胞外へ流出する。P-糖タンパク質の ATPase 活性は細胞膜の脂質の状態に影響されると考えられている(Gayet et al., 2005; Modok et al., 2004; Rothnie et al., 2001; Troost et al., 2004; Urbatsch and Senior, 1995)。Modok らは人工膜を用いた実験でコレステロールとスフィンゴ脂質から作られる liquid-ordered 相において P-糖タンパク質が機能することを報告した(Modok et al., 2004)。Gayet らはコレステロールがヒト CEM 急性白血病の多剤耐性の度合を増加することを報告した(Gayet et al., 2005)。つまりコレステロールが P-糖タンパク質によって引き起こされる多剤耐性に大きく関与しており、ATPase の活性と薬剤の流出の両方をコントロールしていると考えられる。本研究において、D-PDMP が LDL の分解を阻害し、細胞表面のコレステロールを減少させることが示された。その結果、細胞膜の P-糖タンパク質の活性が低下し、抗がん剤のひとつであるパクリタキセルの取り込みの増加を引き起こしたと考えられる(Fig.4-13)。コレステロールを細胞に加えた時に、パクリタキセルの取り込みが減少したことは、P-糖タンパク質の活性がコレステロールに依存していることを示している。プロゲステロンも P-糖タンパク質の活性を阻害することが報告されている。プロゲステロンは細胞膜から小胞体へのコレステロールの輸送を阻害することで知られている。同様に後期エンドソームからのコレステロールの輸送を阻害する U18666A では P-糖タンパク質の阻害は報告されていない。



4-4-3 多剤耐性における糖脂質の役割

多剤耐性において糖脂質が関与していることが報告されている。これらは①いくつかのがん細胞において、多剤耐性と糖脂質レベルの上昇に相互関係がある(Lavie et al., 1996; Lucci et al., 1998; Morjani et al., 2001; Veldman et al., 2002)。②糖脂質合成酵素を高発現した MCF-7 乳がん細胞で薬剤耐性が上昇した(Liu et al., 1999; Liu et al., 2001)。③D-PDMP とその誘導体は多剤耐性を示すがん細胞を薬剤感受性にする(Lavie et al., 1997; Morjani et al., 2001; Olshefski and Ladisch, 2001; Radin, 2003b; Sietsma et al., 2000; Shabbits and Mayer, 2002; Gouaze et al., 2005)、等である。最近の研究では糖脂質合成酵素 Cer-Glc トランスフェラーゼ(GCS)を欠損したメラノーマ細胞と GCS 遺伝子を発現させたトランスフェクタントで抗がん剤の感受性に変化はなかったことが Veldman らによって報告された(Veldman et al., 2003)。また、PDMP が多剤耐性細胞を感受性にさせる条件下において、別の糖脂質合成阻害剤である C₉DGJ や C₄DGJ は

PDMP と同様の効果は示さなかったということも報告されている(Norris-Cervetto et al., 2004)。以上のことから、多剤耐性における PDMP の効果は糖脂質だけでは説明できないと結論付けられている。本研究において、多剤耐性細胞が D-PDMP 処理により薬剤感受性になることが確認された。これは D-PDMP がコレステロールのホメオスタシスを変えることに起因している。D-PDMP はいくつかの細胞でセラミドを蓄積することが報告されており(Bieberich et al., 1999; Radin et al., 1993; Sietsma et al., 2000)、セラミド依存的なシグナルが D-PDMP 依存的な薬剤感受性に関与している可能性もある。しかしながら、(1)糖脂質の合成を阻害しない L-PDMP は D-PDMP と同様の効果を示す。(2)糖脂質欠損細胞においても PDMP によりコレステロールの代謝が変わる。(3)30 分間の m β CD/コレステロールの複合体処理により D-PDMP の効果は消される。といった結果からセラミドの関与は考えにくい。D-PDMP の多剤耐性における効果というのは糖脂質に無関係に起こると考えられる。

4-4-4 BMP ドメインは疎水性アミンの一般的なターゲットか？

疎水性アミンが細胞内コレステロールのホメオスタシスを変えることは良く知られている(Lange and Steck, 1994; Liscum and Underwood, 1995)。しかしながら、その機構はあまりわかっていない。本研究では疎水性アミンのターゲットのひとつが後期エンドソーム・リソソーム特異的脂質、BMP であることがわかった。BMP は細胞の全リン脂質の 1 %以下しか存在しない。しかし後期エンドソームにおいては全リン脂質の 15 %が BMP である(Kobayashi et al., 1998b)。さらに、後期エンドソームの内膜においては全リン脂質の 70 %が BMP である(Kobayashi et al., 2002)。BMP 特異的な抗体を用いてこれまでに、後期エンドソームからのタンパク質や脂質の輸送における BMP ドメインの役割が研究されている(Kobayashi et al., 1999; Le Blanc et al., 2005)。BMP はまた、後期エンドソーム・リソソームにおいて、いくつかのスフィンゴ脂質分解複合体のコファクターである(Kolter and Sandhoff, 2005)。本研究により、疎水性アミンである D-PDMP は BMP の構造を修飾し、膜ドメインの機能を変化させることが示された。私の結果は一般的に疎水性アミンは BMP をターゲットとしてその活性を発揮していることを示唆するものである。

第5章 まとめと展望

シンナマイシンは強力な毒素である。しかしシンナマイシンは分子量約 2000 と小さく、また特殊なアミノ酸を含む環状ペプチドであるため、大腸菌に作らせることができない。榎本らはシンナマイシンをビオチン化し、さらにストレプトアビジンを付加した誘導体(SA-Ro)を作製し、シンナマイシン同様 PE に結合することを確認した(Emoto et al., 1997)。興味深いことに SA-Ro は毒性を示さなかった。SA-Ro にさらに蛍光を付加した FL-SA-Ro を用いて生きた CHO 細胞を染色したところ、分裂後期の分裂溝のみが染色され(Emoto et al., 1997)、分裂溝において PE が細胞膜の外側に多く存在する、または分裂溝では脂質のフリップフロップが早いため FL-SA-Ro によって認識された可能性があることが示された。一方でシンナマイシンは分子量が 2000 と小さいことが、分子量の小さい脂質をターゲットとするプローブの利点であったため、FL-SA-Ro はその利点が失われている。シンナマイシンの利点を生かした無毒化プローブ作りが今後の課題である。シンナマイシンとアミノ酸が 1 つ異なるデュラマイシンはシンナマイシン同様に PE に特異的に結合し、脂質のフリップフロップを誘導することが最近、我々の研究室で示された(岩本ら、脂質生化学研究 48 巻、286-289)。デュラマイシンは PE を含んだ大きさの異なるリポソームを用いて結合実験をすると、直径の小さいリポソームのみ認識することから、膜の曲率を認識していることが示唆され、興味深いプローブであると考えられる。

第3章で述べたようにライセニンは SM のプローブとして有用である。しかしコレラ毒素のようにタンパク質の結晶化は未だに成功していないため、3 次元構造が決定されていない現在ではライセニンのどの部位が毒性を示し、どの部位が SM への結合に関与しているかはわかっていない。ライセニンに対して抗ペプチド抗体を用いた実験によると、C 末部位で作製された抗体がよりオリゴマーを認識することから、ライセニンの C 末部位は膜の外に出ていることが示唆された(Yamaji-Hasegawa et al., 2003)。また当研究室の清川がライセニンの欠損変異体を作製し、SM への結合活性と赤血球の溶血活性を調べたところ、N 末を最大で 160 個削った変異体は SM に結合するが溶血活性は示さず、無毒な SM プローブとして利用できると考えられた(Kiyokawa et al., 2005)。SM はコレステロールと糖脂質と共に微小なドメイン(ラフト)を形成することが提唱されている。実際に細胞膜にこのようなドメインが存在するかは明らかではない。さらに清川は GFP タグ付きの無毒化ライセニンを精製し、蛍光顕微鏡を用いて実験を行った。その結果、糖脂質 GM1 のプローブとしてコレラトキシンを用いて、無毒化ライセニンと二重染色をしたところ、細胞膜は一様に染まり、微小なドメインは観察されなかったが、電子顕微鏡を用いて同様の実験を行う

と、コレラトキシンの分布とライセニンの分布は異なった(Kiyokawa et al., 2005)。これらの結果は細胞においては脂質の微小なドメインは多様であることを示唆している。また無毒化ライセニンを用いることにより、生きた細胞で SM の局在とエンドサイトーシスを見ることが可能になり、現在我々の研究室で実験を行っている。

脂質をターゲットとした物質が少しずつ報告され、脂質を見る研究は進んできた。しかし依然、脂質を見ているのではなく脂質をターゲットとした物質を見ているという現状がある。今後、細胞にある脂質を直接検出し、脂質自体の局在、輸送をみる技術の開発が必要になってくると考えられる。Otto らのグループはラマン分光顕微鏡を用いて細胞内の脂質の分布を調べている(van Manen et al., 2005)。ラマン分光光度計では重水素特異的なシグナルが 2200cm^{-1} 付近に検出される。そこで重水素を持つアラキドン酸を細胞に処理してその局在を調べた。この報告はプローブを使わないで細胞内の脂質を見ている例であり、いろいろな実験に応用できると考えられる。

第 4 章で PDMP が脂質に作用し、脂質の膜構造を変化させ、生体のホメオスタシスに影響を及ぼしたことを示した。PDMP のターゲットとなった BMP により活性が制御されていた酸性リパーゼのように、脂質によって制御されているタンパク質、脂質の輸送や代謝に関与しているタンパク質がたくさん存在する。これらタンパク質は脂質と密接に相互作用しており、様々な機能に関与していると考えられる。PDMP 処理により、コレステロールの代謝が変わり、その結果影響を受けた P-糖タンパク質もその一つといえる。P-糖タンパク質は ABC タンパク質の一つで異物排出ポンプであると考えられている。生物は有益なものだけでなく、多くの有害物質を取り込む。これらの有害物質を生体外へ排出するのがポンプの役割である。第 4 章でも触れたが、癌治療においてこの異物排出ポンプが大きく関与している。癌治療の問題点のひとつが“獲得性多剤耐性”である。治療の際に、作用機構や構造の異なる多数の抗がん剤を用いるが、癌細胞がこれらの抗がん剤に対して耐性を獲得する。ABC タンパク質が抗がん剤を細胞外に放出しているからである。生体を異物から守るポンプが、癌治療においてはマイナスに働いていることは興味深いことである。ABC タンパク質は細胞膜に存在するが、近年の研究で、細胞膜上のスフィンゴ脂質とコレステロールに富んだドメイン（ラフト）に局在することが報告された。よって細胞表面のコレステロールを減少させると、タンパク質の活性が低下する。私の研究は特定の脂質をターゲットとする物質が脂質を介してタンパク質の機能を制御することができる可能性を示唆している。

引用文献

- Ambudkar, S.V., C. Kimchi-Sarfaty, Z.E. Sauna, and M.M. Gottesman. 2003. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*. 22:7468-85.
- Andree, H.A., M.C. Stuart, W.T. Hermens, C.P. Reutelingsperger, H.C. Hemker, P.M. Frederik, and G.M. Willems. 1992. Clustering of lipid-bound annexin V may explain its anticoagulant effect. *J Biol Chem*. 267:17907-12.
- Aoki, Y., T. Uenaka, J. Aoki, M. Umeda, and K. Inoue. 1994. A novel peptide probe for studying the transbilayer movement of phosphatidylethanolamine. *J Biochem (Tokyo)*. 116:291-7.
- Bernheimer, A.W., and L.S. Avigad. 1976. Properties of a toxin from the sea anemone *Stoichacis helianthus*, including specific binding to sphingomyelin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73:467-71.
- Beschin, A., M. Bilej, F. Hanssens, J. Raymakers, E. Van Dyck, H. Revets, L. Brys, J. Gomez, P. De Baetselier, and M. Timmermans. 1998. Identification and cloning of a glucan- and lipopolysaccharide-binding protein from *Eisenia foetida* earthworm involved in the activation of prophenoloxidase cascade. *J Biol Chem*. 273:24948-54.
- Bhakdi, S., U. Weller, I. Walev, E. Martin, D. Jonas, and M. Palmer. 1993. A guide to the use of pore-forming toxins for controlled permeabilization of cell membranes. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 182:167-75.
- Bieberich, E., B. Freischutz, M. Suzuki, and R.K. Yu. 1999. Differential effects of glycolipid biosynthesis inhibitors on ceramide-induced cell death in neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry*. 72:1040-9.
- Bligh, E.G., and W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol*. 37:911-7.
- Caaveiro, J.M., I. Echabe, I. Gutierrez-Aguirre, J.L. Nieva, J.L. Arrondo, and J.M. Gonzalez-Manas. 2001. Differential interaction of equinatoxin II with model membranes in response to lipid composition. *Biophys J*. 80:1343-53.
- Castanho, M.A., A. Coutinho, and M.J. Prieto. 1992. Absorption and fluorescence spectra of polyene antibiotics in the presence of cholesterol. *J Biol Chem*. 267:204-9.
- Chevallier, J., N. Sakai, F. Robert, T. Kobayashi, J. Gruenberg, and S. Matile. 2000. Rapid access to synthetic lysobisphosphatidic acids using P(III) chemistry. *Org Lett*. 2:1859-61.
- Choung, S.Y., T. Kobayashi, J. Inoue, K. Takemoto, H. Ishitsuka, and K. Inoue. 1988a. Hemolytic activity of a cyclic peptide Ro09-0198 isolated from *Streptovorticillium*. *Biochim Biophys Acta*. 940:171-9.
- Choung, S.Y., T. Kobayashi, K. Takemoto, H. Ishitsuka, and K. Inoue. 1988b. Interaction of a cyclic peptide, Ro09-0198, with phosphatidylethanolamine in liposomal membranes. *Biochim*

Biophys Acta. 940:180-7.

- Cooper, E.L., E. Kauschke, and A. Cossarizza. 2002. Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff. *Bioessays*. 24:319-33.
- de Wolf, F.A., M. Maliepaard, F. van Dorsten, I. Berghuis, K. Nicolay, and B. de Kruijff. 1990. Comparable interaction of doxorubicin with various acidic phospholipids results in changes of lipid order and dynamics. *Biochim Biophys Acta*. 1096:67-80.
- Dean, M., Y. Hamon, and G. Chimini. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*. 42:1007-17.
- Emoto, K., O. Kuge, M. Nishijima, and M. Umeda. 1999. Isolation of a Chinese hamster ovary cell mutant defective in intramitochondrial transport of phosphatidylserine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:12400-5.
- Emoto, K., N. Toyama-Sorimachi, H. Karasuyama, K. Inoue, and M. Umeda. 1997. Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells. *Exp Cell Res*. 232:430-4.
- Emoto, K., and M. Umeda. 2000. An essential role for a membrane lipid in cytokinesis. Regulation of contractile ring disassembly by redistribution of phosphatidylethanolamine. *J Cell Biol*. 149:1215-24.
- Escola, J.M., M.J. Kleijmeer, W. Stoorvogel, J.M. Griffith, O. Yoshie, and H.J. Geuze. 1998. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 273:20121-7.
- Gayet, L., G. Dayan, S. Barakat, S. Labialle, M. Michaud, S. Cogne, A. Mazane, A.W. Coleman, D. Rigal, and L.G. Baggetto. 2005. Control of P-glycoprotein activity by membrane cholesterol amounts and their relation to multidrug resistance in human CEM leukemia cells. *Biochemistry*. 44:4499-509.
- Glaros, E.N., W.S. Kim, C.M. Quinn, J. Wong, I. Gelissen, W. Jessup, and B. Garner. 2005. Glycosphingolipid accumulation inhibits cholesterol efflux via the ABCA1/apolipoprotein A-I pathway: 1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol is a novel cholesterol efflux accelerator. *J Biol Chem*. 280:24515-23. Epub 2005 May 11.
- Gorvel, J.P., P. Chavrier, M. Zerial, and J. Gruenberg. 1991. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell*. 64:915-25.
- Gouaze, V., Y.Y. Liu, C.S. Prickett, J.Y. Yu, A.E. Giuliano, and M.C. Cabot. 2005. Glucosylceramide synthase blockade down-regulates P-glycoprotein and resensitizes multidrug-resistant breast cancer cells to anticancer drugs. *Cancer Research*. 65:3861-67.
- Greenspan, P., E.P. Mayer, and S.D. Fowler. 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *Journal of Cell Biology*. 100:965-73.
- Gruenberg, J. 2001. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:721-30.
- Hanada, K., T. Hara, M. Fukasawa, A. Yamaji, M. Umeda, and M. Nishijima. 1998. Mammalian

- cell mutants resistant to a sphingomyelin-directed cytolysin. Genetic and biochemical evidence for complex formation of the LCB1 protein with the LCB2 protein for serine palmitoyltransferase. *J Biol Chem.* 273:33787-94.
- Hanada, K., K. Kumagai, S. Yasuda, Y. Miura, M. Kawano, M. Fukasawa, and M. Nishijima. 2003. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide.[see comment]. *Nature.* 426:803-9.
- Hao, M., S.X. Lin, O.J. Karylowski, D. Wustner, T.E. McGraw, and F.R. Maxfield. 2002. Vesicular and non-vesicular sterol transport in living cells. The endocytic recycling compartment is a major sterol storage organelle. *J Biol Chem.* 277:609-17.
- Hong, Q., I. Gutierrez-Aguirre, A. Barlic, P. Malovrh, K. Kristan, Z. Podlesek, P. Macek, D. Turk, J.M. Gonzalez-Manas, J.H. Lakey, and G. Anderluh. 2002. Two-step membrane binding by Equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone, involves an exposed aromatic cluster and a flexible helix. *J Biol Chem.* 277:41916-24.
- Hosoda, K., M. Ohya, T. Kohno, T. Maeda, S. Endo, and K. Wakamatsu. 1996. Structure determination of an immunopotentiator peptide, cinnamycin, complexed with lysophosphatidylethanolamine by 1H-NMR1. *J Biochem (Tokyo).* 119:226-30.
- Ichikawa, S., N. Nakajo, H. Sakiyama, and Y. Hirabayashi. 1994. A mouse B16 melanoma mutant deficient in glycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:2703-7.
- Imanaka, T., K. Muto, S. Ohkuma, and T. Takano. 1981. Purification and properties of rabbit liver acid-lipase (4-methylumbelliferyl oleate hydrolase). *Biochim Biophys Acta.* 665:322-30.
- Inokuchi, J.I., S. Uemura, K. Kabayama, and Y. Igarashi. 2000. Glycosphingolipid deficiency affects functional microdomain formation in Lewis lung carcinoma cells. *Glycoconjugate Journal.* 17:239-45.
- Ishitsuka, R., A. Yamaji-Hasegawa, A. Makino, Y. Hirabayashi, and T. Kobayashi. 2004. A lipid-specific toxin reveals heterogeneity of sphingomyelin-containing membranes. *Biophys J.* 86:296-307.
- Iwamoto, M., I. Morita, M. Fukuda, S. Murota, S. Ando, and Y. Ohno-Iwashita. 1997. A biotinylated perfringolysin O derivative: a new probe for detection of cell surface cholesterol. *Biochim Biophys Acta.* 1327:222-30.
- Johnston, D.S., and D. Chapman. 1988. A calorimetric study of the thermotropic behaviour of mixtures of brain cerebroside with other brain lipids. *Biochim Biophys Acta.* 939:603-14.
- Kato, U., K. Emoto, C. Fredriksson, H. Nakamura, A. Ohta, T. Kobayashi, K. Murakami-Murofushi, and M. Umeda. 2002. A novel membrane protein, Ros3p, is required for phospholipid translocation across the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 19:19.
- Kessler, H., D.F. Mierke, J. Saulitis, S. Seip, S. Steuernagel, T. Wein, and M. Will. 1992. The structure of Ro 09-0198 in different environments. *Biopolymers.* 32:427-33.

- Kiyokawa, E., T. Baba, N. Otsuka, A. Makino, S. Ohno, and T. Kobayashi. 2005. Spatial and functional heterogeneity of sphingolipid-rich membrane domains. *J Biol Chem.* 280:24072-84. Epub 2005 Apr 19.
- Kiyokawa, E., A. Makino, K. Ishii, N. Otsuka, A. Yamaji-Hasegawa, and T. Kobayashi. 2004. Recognition of sphingomyelin by lysenin and lysenin-related proteins. *Biochemistry.* 43:9766-73.
- Kobayashi, T., M.H. Beuchat, J. Chevallier, A. Makino, N. Mayran, J.M. Escola, C. Lebrand, P. Cosson, and J. Gruenberg. 2002. Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *J Biol Chem.* 277:32157-64.
- Kobayashi, T., M.H. Beuchat, M. Lindsay, S. Frias, R.D. Palmiter, H. Sakuraba, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 1999. Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat Cell Biol.* 1:113-8.
- Kobayashi, T., F. Gu, and J. Gruenberg. 1998a. Lipids, lipid domains and lipid-protein interactions in endocytic membrane traffic. *Semin Cell Dev Biol.* 9:517-26.
- Kobayashi, T., and R.E. Pagano. 1988. ATP-dependent fusion of liposomes with the Golgi apparatus of perforated cells. *Cell.* 55:797-805.
- Kobayashi, T., and R.E. Pagano. 1989. Lipid transport during mitosis. Alternative pathways for delivery of newly synthesized lipids to the cell surface. *J Biol Chem.* 264:5966-73.
- Kobayashi, T., S.W. Pimplikar, R.G. Parton, S. Bhakdi, and K. Simons. 1992. Sphingolipid transport from the trans-Golgi network to the apical surface in permeabilized MDCK cells. *FEBS Lett.* 300:227-31.
- Kobayashi, T., E. Stang, K.S. Fang, P. de Moerloose, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 1998b. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature.* 392:193-7.
- Kobayashi, T., U.M. Vischer, C. Rosnoblet, C. Lebrand, M. Lindsay, R.G. Parton, E.K. Kruithof, and J. Gruenberg. 2000. The tetraspanin CD63/lamp3 cycles between endocytic and secretory compartments in human endothelial cells. *Mol Biol Cell.* 11:1829-43.
- Kobayashi, T., A. Yamaji-Hasegawa, and E. Kiyokawa. 2001. Lipid domains in the endocytic pathway. *Semin Cell Dev Biol.* 12:173-82.
- Kok, J.W., T. Babia, C.M. Filipeanu, A. Nelemans, G. Egea, and D. Hoekstra. 1998. PDMP blocks brefeldin A-induced retrograde membrane transport from golgi to ER: evidence for involvement of calcium homeostasis and dissociation from sphingolipid metabolism. *Journal of Cell Biology.* 142:25-38.
- Kolter, T., and K. Sandhoff. 2005. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:81-103.
- Lange, S., E. Kauschke, W. Mohrig, and E.L. Cooper. 1999. Biochemical characteristics of

- Eiseniapore, a pore-forming protein in the coelomic fluid of earthworms. *Eur J Biochem.* 262:547-56.
- Lange, S., F. Nussler, E. Kauschke, G. Lutsch, E.L. Cooper, and A. Herrmann. 1997. Interaction of earthworm hemolysin with lipid membranes requires sphingolipids. *J Biol Chem.* 272:20884-92.
- Lange, Y. 1994. Cholesterol movement from plasma membrane to rough endoplasmic reticulum. Inhibition by progesterone. *Journal of Biological Chemistry.* 269:3411-4.
- Lange, Y., and T.L. Steck. 1994. Cholesterol homeostasis. Modulation by amphiphiles. *J Biol Chem.* 269:29371-4.
- Lassegues, M., A. Milochau, F. Doignon, L. Du Pasquier, and P. Valembois. 1997. Sequence and expression of an *Eisenia-fetida*-derived cDNA clone that encodes the 40-kDa fetidin antibacterial protein. *Eur J Biochem.* 246:756-62.
- Lavie, Y., H. Cao, S.L. Bursten, A.E. Giuliano, and M.C. Cabot. 1996. Accumulation of glucosylceramides in multidrug-resistant cancer cells. *Journal of Biological Chemistry.* 271:19530-6.
- Lavie, Y., H. Cao, A. Volner, A. Lucci, T.Y. Han, V. Geffen, A.E. Giuliano, and M.C. Cabot. 1997. Agents that reverse multidrug resistance, tamoxifen, verapamil, and cyclosporin A, block glycosphingolipid metabolism by inhibiting ceramide glycosylation in human cancer cells. *Journal of Biological Chemistry.* 272:1682-7.
- Le Blanc, I., P.P. Luyet, V. Pons, C. Ferguson, N. Emans, A. Petiot, N. Mayran, N. Demareux, J. Faure, R. Sadoul, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 2005. Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat Cell Biol.* 7:653-64. Epub 2005 Jun 12.
- Lencer, W.I., T.R. Hirst, and R.K. Holmes. 1999. Membrane traffic and the cellular uptake of cholera toxin. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1450:177-90.
- Lingwood, C.A. 1999. Glycolipid receptors for verotoxin and *Helicobacter pylori*: role in pathology. *Biochim Biophys Acta.* 1455:375-86.
- Liscum, L., and K.W. Underwood. 1995. Intracellular cholesterol transport and compartmentation. *Journal of Biological Chemistry.* 270:15443-6.
- Liu, Y.Y., T.Y. Han, A.E. Giuliano, and M.C. Cabot. 1999. Expression of glucosylceramide synthase, converting ceramide to glucosylceramide, confers adriamycin resistance in human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry.* 274:1140-6.
- Liu, Y.Y., T.Y. Han, A.E. Giuliano, and M.C. Cabot. 2001. Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *FASEB Journal.* 15:719-30.
- Lucci, A., W.I. Cho, T.Y. Han, A.E. Giuliano, D.L. Morton, and M.C. Cabot. 1998. Glucosylceramide: a marker for multiple-drug resistant cancers. *Anticancer Research.* 18:475-80.
- Machaidze, G., A. Ziegler, and J. Seelig. 2002. Specific binding of Ro 09-0198 (cinnamycin) to phosphatidylethanolamine: a thermodynamic analysis. *Biochemistry.* 41:1965-71.

- Makino, A., T. Baba, K. Fujimoto, K. Iwamoto, Y. Yano, N. Terada, S. Ohno, S.B. Sato, A. Ohta, M. Umeda, K. Matsuzaki, and T. Kobayashi. 2003. Cinnamycin (Ro 09-0198) Promotes Cell Binding and Toxicity by Inducing Transbilayer Lipid Movement. *J Biol Chem.* 278:3204-3209.
- Malovrh, P., A. Barlic, Z. Podlesek, P. MaCek, G. Menestrina, and G. Anderluh. 2000. Structure-function studies of tryptophan mutants of equinatoxin II, a sea anemone pore-forming protein. *Biochem J.* 346 Pt 1:223-32.
- Marx, U., G. Lassmann, H.G. Holzthutter, D. Wustner, P. Muller, A. Hohlig, J. Kubelt, and A. Herrmann. 2000. Rapid flip-flop of phospholipids in endoplasmic reticulum membranes studied by a stopped-flow approach. *Biophys J.* 78:2628-40.
- Matsuo, H., J. Chevallier, N. Mayran, I. Le Blanc, C. Ferguson, J. Faure, N. Satori Blanc, S. Matile, J. Dubochet, R. Sadoul, R.G. Parton, F. Vilois, and J. Gruenberg. 2004. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science.* 303:531-534.
- Matsuzaki, K., O. Murase, N. Fujii, and K. Miyajima. 1996. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry.* 35:11361-8.
- Maulik, P.R., and G.G. Shipley. 1996. N-palmitoyl sphingomyelin bilayers: structure and interactions with cholesterol and dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochemistry.* 35:8025-34.
- McAuliffe, O., R.P. Ross, and C. Hill. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev.* 25:285-308.
- Milochau, A., M. Lassegues, and P. Valembois. 1997. Purification, characterization and activities of two hemolytic and antibacterial proteins from coelomic fluid of the annelid *Eisenia fetida andrei*. *Biochim Biophys Acta.* 1337:123-32.
- Modok, S., C. Heyward, and R. Callaghan. 2004. P-glycoprotein retains function when reconstituted into a sphingolipid- and cholesterol-rich environment. *Journal of Lipid Research.* 45:1910-8.
- Moll, G.N., W.N. Konings, and A.J. Driessen. 1998. The lantibiotic nisin induces transmembrane movement of a fluorescent phospholipid. *J Bacteriol.* 180:6565-70.
- Morjani, H., N. Aouali, R. Belhoussine, R.J. Veldman, T. Levade, and M. Manfait. 2001. Elevation of glucosylceramide in multidrug-resistant cancer cells and accumulation in cytoplasmic droplets. *International Journal of Cancer.* 94:157-65.
- Mukherjee, S., X. Zha, I. Tabas, and F.R. Maxfield. 1998. Cholesterol distribution in living cells: fluorescence imaging using dehydroergosterol as a fluorescent cholesterol analog. *Biophys J.* 75:1915-25.
- Norman, A.W., R.A. Demel, B. de Kruijff, and L.L. van Deenen. 1972. Studies on the biological

- properties of polyene antibiotics. Evidence for the direct interaction of filipin with cholesterol. *J Biol Chem.* 247:1918-29.
- Norris-Cervetto, E., R. Callaghan, F.M. Platt, R.A. Dwek, and T.D. Butters. 2004. Inhibition of glucosylceramide synthase does not reverse drug resistance in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry.* 279:40412-8.
- Ohno-Iwashita, Y., M. Iwamoto, S. Ando, K. Mitsui, and S. Iwashita. 1990. A modified theta-toxin produced by limited proteolysis and methylation: a probe for the functional study of membrane cholesterol. *Biochim Biophys Acta.* 1023:441-8.
- Olivares Fontt, E., A. Beschin, E. Van Dijck, V. Vercruysse, M. Bilej, R. Lucas, P. De Baetselier, and B. Vray. 2002. Trypanosoma cruzi is lysed by coelomic cytolytic factor-1, an invertebrate analogue of tumor necrosis factor, and induces phenoloxidase activity in the coelomic fluid of Eisenia foetida foetida. *Dev Comp Immunol.* 26:27-34.
- Olshefski, R.S., and S. Ladisch. 2001. Glucosylceramide synthase inhibition enhances vincristine-induced cytotoxicity. *International Journal of Cancer.* 93:131-8.
- Overduin M, C.M., Kutateladze TG. 2001. Signaling with Phosphoinositides: Better than Binary *Molecular Interventions* 1:150-159.
- Poklar, N., J. Fritz, P. Macek, G. Vesnaver, and T.V. Chalikian. 1999. Interaction of the pore-forming protein equinatoxin II with model lipid membranes: A calorimetric and spectroscopic study. *Biochemistry.* 38:14999-5008.
- Radin, N.S. 2003a. Designing anticancer drugs via the achilles heel: ceramide, allylic ketones, and mitochondria. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 11:2123-42.
- Radin, N.S. 2003b. Killing tumours by ceramide-induced apoptosis: a critique of available drugs. *Biochemical Journal.* 371:243-56.
- Radin, N.S., J.A. Shayman, and J. Inokuchi. 1993. Metabolic effects of inhibiting glucosylceramide synthesis with PDMP and other substances. *Advances in Lipid Research.* 26:183-213.
- Raja, S.M., S.S. Rawat, A. Chattopadhyay, and A.K. Lala. 1999. Localization and environment of tryptophans in soluble and membrane-bound states of a pore-forming toxin from Staphylococcus aureus. *Biophys J.* 76:1469-79.
- Rani, C.S., A. Abe, Y. Chang, N. Rosenzweig, A.R. Saltiel, N.S. Radin, and J.A. Shayman. 1995. Cell cycle arrest induced by an inhibitor of glucosylceramide synthase. Correlation with cyclin-dependent kinases. *Journal of Biological Chemistry.* 270:2859-67.
- Reutelingsperger, C.P., G. Hornstra, and H.C. Hemker. 1985. Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *Eur J Biochem.* 151:625-9.
- Reutelingsperger, C.P., J.M. Kop, G. Hornstra, and H.C. Hemker. 1988. Purification and characterization of a novel protein from bovine aorta that inhibits coagulation. Inhibition of the phospholipid-dependent factor-Xa-catalyzed prothrombin activation, through a high-affinity binding of the anticoagulant to the phospholipids. *Eur J Biochem.* 173:171-8.

- Reutelingsperger, C.P., and W.L. van Heerde. 1997. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cell Mol Life Sci.* 53:527-32.
- Roff, C.F., E. Goldin, M.E. Comly, A. Cooney, A. Brown, M.T. Vanier, S.P. Miller, R.O. Brady, and P.G. Pentchev. 1991. Type C Niemann-Pick disease: use of hydrophobic amines to study defective cholesterol transport. *Developmental Neuroscience.* 13:315-9.
- Rosenwald, A.G., C.E. Machamer, and R.E. Pagano. 1992. Effects of a sphingolipid synthesis inhibitor on membrane transport through the secretory pathway. *Biochemistry.* 31:3581-90.
- Rosenwald, A.G., and R.E. Pagano. 1994. Effects of the glucosphingolipid synthesis inhibitor, PDMP, on lysosomes in cultured cells. *Journal of Lipid Research.* 35:1232-40.
- Rothnie, A., D. Theron, L. Soceneantu, C. Martin, M. Traikia, G. Berridge, C.F. Higgins, P.F. Devaux, and R. Callaghan. 2001. The importance of cholesterol in maintenance of P-glycoprotein activity and its membrane perturbing influence. *European Biophysics Journal.* 30:430-42.
- Sato, S.B., K. Ishii, A. Makino, K. Iwabuchi, A. Yamaji-Hasegawa, Y. Senoh, I. Nagaoka, H. Sakuraba, and T. Kobayashi. 2004. Distribution and transport of cholesterol-rich membrane domains monitored by a membrane-impermeant fluorescent polyethylene glycol-derivatized cholesterol. *Journal of Biological Chemistry.* 279:23790-6.
- Scheidt, H.A., P. Muller, A. Herrmann, and D. Huster. 2003. The potential of fluorescent and spin-labeled steroid analogs to mimic natural cholesterol. *J Biol Chem.* 278:45563-9.
- Sekizawa, Y., T. Kubo, H. Kobayashi, T. Nakajima, and S. Natori. 1997. Molecular cloning of cDNA for lysenin, a novel protein in the earthworm *Eisenia foetida* that causes contraction of rat vascular smooth muscle. *Gene.* 191:97-102.
- Shabbits, J.A., and L.D. Mayer. 2002. P-glycoprotein modulates ceramide-mediated sensitivity of human breast cancer cells to tubulin-binding anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics.* 1:205-13.
- Shakor, A.B., E.A. Czurylo, and A. Sobota. 2003. Lysenin, a unique sphingomyelin-binding protein. *FEBS Lett.* 542:1-6.
- Sietsma, H., R.J. Veldman, D. Kolk, B. Ausema, W. Nijhof, W. Kamps, E. Vellenga, and J.W. Kok. 2000. 1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol chemosensitizes neuroblastoma cells for taxol and vincristine. *Clinical Cancer Research.* 6:942-8.
- Sillence, D.J., V. Puri, D.L. Marks, T.D. Butters, R.A. Dwek, R.E. Pagano, and F.M. Platt. 2002. Glucosylceramide modulates membrane traffic along the endocytic pathway. *Journal of Lipid Research.* 43:1837-45.
- Singh, R.D., V. Puri, J.T. Valiyaveetil, D.L. Marks, R. Bittman, and R.E. Pagano. 2003. Selective caveolin-1-dependent endocytosis of glycosphingolipids. *Mol Biol Cell.* 14:3254-65.

- Sleight, R.G., and R.E. Pagano. 1983. Rapid appearance of newly synthesized phosphatidylethanolamine at the plasma membrane. *J Biol Chem.* 258:9050-8.
- Sokol, J., J. Blanchette-Mackie, H.S. Kruth, N.K. Dwyer, L.M. Amende, J.D. Butler, E. Robinson, S. Patel, R.O. Brady, M.E. Comly, M.T. Vanier, and P.G. Pentchev. 1988. Type C Niemann-Pick disease. Lysosomal accumulation and defective intracellular mobilization of low density lipoprotein cholesterol. *J Biol Chem.* 263:3411-7.
- Struck, D.K., D. Hoekstra, and R.E. Pagano. 1981. Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry.* 20:4093-9.
- Tait, J.F., D. Gibson, and K. Fujikawa. 1989. Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family. *J Biol Chem.* 264:7944-9.
- Takeuchi, R., T. Imanaka, S. Ohkuma, and T. Takano. 1985. Effect of phospholipids on the hydrolysis of cholesterol oleate liquid crystals by lysosomal acid lipase. *J Biochem (Tokyo).* 98:933-8.
- Troost, J., N. Albermann, W. Emil Haefeli, and J. Weiss. 2004. Cholesterol modulates P-glycoprotein activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications.* 316:705-11.
- Underwood, K.W., B. Andemariam, G.L. McWilliams, and L. Liscum. 1996. Quantitative analysis of hydrophobic amine inhibition of intracellular cholesterol transport. *Journal of Lipid Research.* 37:1556-68.
- Urbatsch, I.L., and A.E. Senior. 1995. Effects of lipids on ATPase activity of purified Chinese hamster P-glycoprotein. *Archives of Biochemistry & Biophysics.* 316:135-40.
- Valcarcel, C.A., M. Dalla Serra, C. Potrich, I. Bernhart, M. Tejuca, D. Martinez, F. Pazos, M.E. Lanio, and G. Menestrina. 2001. Effects of lipid composition on membrane permeabilization by sticholysin I and II, two cytolysins of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophys J.* 80:2761-74.
- van Manen, H.J., Y.M. Kraan, D. Roos, and C. Otto. 2005. Single-cell Raman and fluorescence microscopy reveal the association of lipid bodies with phagosomes in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:10159-64.
- Veldman, R.J., K. Klappe, J. Hinrichs, I. Hummel, G. van der Schaaf, H. Sietsma, and J.W. Kok. 2002. Altered sphingolipid metabolism in multidrug-resistant ovarian cancer cells is due to uncoupling of glycolipid biosynthesis in the Golgi apparatus. *FASEB Journal.* 16:1111-3.
- Veldman, R.J., A. Mita, O. Cuvillier, V. Garcia, K. Klappe, J.A. Medin, J.D. Campbell, S. Carpentier, J.W. Kok, and T. Levade. 2003. The absence of functional glucosylceramide synthase does not sensitize melanoma cells for anticancer drugs. *FASEB Journal.* 17:1144-6.
- Wakamatsu, K., S.Y. Choung, T. Kobayashi, K. Inoue, T. Higashijima, and T. Miyazawa. 1990. Complex formation of peptide antibiotic Ro09-0198 with lysophosphatidylethanolamine:

- ¹H NMR analyses in dimethyl sulfoxide solution. *Biochemistry*. 29:113-8.
- Widdick, D.A., H.M. Dodd, P. Barraille, J. White, T.H. Stein, K.F. Chater, M.J. Gasson, and M.J. Bibb. 2003. Cloning and engineering of the cinnamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces cinnamoneus cinnamoneus* DSM 40005. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:4316-21.
- Yamaji-Hasegawa, A., A. Makino, T. Baba, Y. Senoh, H. Kimura-Suda, S.B. Sato, N. Terada, S. Ohno, E. Kiyokawa, M. Umeda, and T. Kobayashi. 2003. Oligomerization and Pore Formation of a Sphingomyelin-specific Toxin, Lysenin. *J Biol Chem*. 278:22762-70.
- Yamaji, A., Y. Sekizawa, K. Emoto, H. Sakuraba, K. Inoue, H. Kobayashi, and M. Umeda. 1998. Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding protein. *J Biol Chem*. 273:5300-6.
- Yuan, C., J. Furlong, P. Burgos, and L.J. Johnston. 2002. The size of lipid rafts: an atomic force microscopy study of ganglioside GM1 domains in sphingomyelin/DOPC/cholesterol membranes. *Biophys J*. 82:2526-35.
- Zhang, L., A. Rozek, and R.E. Hancock. 2001. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *J Biol Chem*. 276:35714-22.
- Zitzer, A., O. Zitzer, S. Bhakdi, and M. Palmer. 1999. Oligomerization of *Vibrio cholerae* cytolysin yields a pentameric pore and has a dual specificity for cholesterol and sphingolipids in the target membrane. *J Biol Chem*. 274:1375-80.

謝辞

本研究を行う場を与えてくださり、常に暖かく、多くのご指導を賜りました理化学研究所・フロンティア研究システム・スフィンゴ脂質機能研究チーム・チームリーダー、小林俊秀先生に心より感謝いたします。本研究を行った当初から親切にご指導くださいました、現理化学研究所・辻本細胞生化学研究室、山路一長谷川顕子博士に心より感謝いたします。リコンビナントライセニンに関する実験上の手法や有益なご助言をいただきました、現京都大学医学部・大学院医学研究科・基礎病態学講座・病態生物医学分野、清川悦子博士に心より感謝いたします。また常日頃から親切にご指導いただき、幅広い視点からの有効なご助言をいただきました、現理化学研究所・小林脂質生物化学研究室、石塚玲子博士に心より感謝いたします。

GM95 細胞は理化学研究所・脳科学研究センター・ユニットリーダー、平林義雄先生にいただきました。また折に触れ有益なご助言をいただき、深く感謝いたします。シンナマイシンは京都大学・化学研究所・複合基盤化学研究系超分子生物学(理学研究科生物科学専攻・生物物理学系 協力講座)教授、梅田真郷先生にいただきました。シンナマイシン、ライセニンに関する実験手法や有益なご助言をいただき、深く感謝いたします。Neuro-2a 細胞は現東北薬科大学・分子生体膜研究所・生体膜情報学研究室・教授、東秀好先生にいただきました。深く感謝いたします。電子顕微鏡観察を行って頂き、多くのご助言をいただきました、現茨城県立医療大学・医科学センター・教授、馬場健先生に深く感謝いたします。

研究を始めるきっかけを与えてくださり、多くのご指導を賜りました、東京理科大学・理工学部・応用生物科学科・教授、池北雅彦先生に深く感謝いたします。

博士論文の提出に当たり、親身にお世話いただいた、東京大学大学院・農学生命科学研究科・細胞遺伝学研究室・教授、太田明德先生に深く感謝いたします。

最後になりましたが、研究生活において多くのご協力や励まし、そしてご助言をいただきました、理化学研究所・スフィンゴ脂質機能研究チームならびに小林脂質生物化学研究室内の皆様に深く感謝いたします。

論文の内容の要旨

論文題目 脂質を標的とする膜作用物質の反応機構の研究

氏名 牧野 麻美

自然界には数千種類の脂質が存在し、各脂質の存在意義が想像される。様々な生物、臓器、細胞において脂質組成は異なっている。さらには一つの細胞の中においてもオルガネラ間で脂質組成は異なる。スフィンゴミエリンはゴルジ体や細胞膜に多く存在する。カルジオリピンはミトコンドリアに、リゾビスホスファチジン酸/ビス(モノアシルグリセロ)リン酸は後期エンドソームにという様にオルガネラに特異的に分布する脂質も存在する。このように、多種多様な脂質が存在し、特定の局在を示す理由は明らかになっていないが、脂質の合成、分解、輸送、拡散の動的平衡が脂質の分布を決めていると考えられる。

また同一膜上においても脂質は外層と内層においても分布が異なっている。ヒト赤血球膜ではホスファチジルコリンやスフィンゴミエリンのほとんどは外層に、ホスファチジルエタノールアミンやホスファチジルセリンのほとんどは内層に存在するといわれている。さらに細胞膜の外層においてはスフィンゴミエリンが糖脂質やコレステロールとともに微小なドメイン構造を形成していると考えられている。スフィンゴ脂質は長鎖の飽和脂肪酸を有するため、スフィンゴ脂質同士の疎水的相互作用によりドメインを形成しやすい。コレステロールはその結合をより強固にしていると考えられている。シグナル伝達に関わる多くのタンパク質がこの微小なドメインに局在することが示唆されている。

このように脂質が特徴的な分布を示すことが栄養の取り込みや輸送、分解、細胞分裂や遺伝情

報の維持、伝達といった生物活動に重要であると考えられる。脂質は単に膜を形成する構成成分であるだけでなく、脂質あるいは脂質集合体そのものに機能が存在するのである。

本研究では、特定の脂質に結合する物質、または特定の脂質の性質に影響を与える物質を用いて、それらの物質の作用機序と、標的脂質の機能を研究した。

1.放線菌由来毒素、シンナマイシンの作用機序

シンナマイシン(Ro09-0198)は 19 アミノ酸からなるテトラサイクリックペプチドで、放線菌 *Streptoverticillium griseoverticillatam* から精製される。アミノ酪酸などの希少なアミノ酸をもち、グラム陽性の細菌に対して殺菌活性を持つだけでなく、様々な動物細胞の赤血球を溶血させる。シンナマイシンは細胞膜の内層に存在するホスファチジルエタノールアミンに特異的に結合するという点で非常にユニークである。しかしシンナマイシンがどのように細胞膜の内層のホスファチジルエタノールアミンに結合するのかわかっていなかった。本研究ではシンナマイシンが標的細胞の内層の脂質を外層に移行させる、脂質のフロップを引き起こし、その結果細胞膜の内層に存在したホスファチジルエタノールアミンが外層に露出することを示した。シンナマイシンによって引き起こされる脂質のフロップは人工膜においても観察され、脂質のフロップはタンパク質などを介した間接的なものではなく、シンナマイシン自身の作用によるものであると考えられた。シンナマイシンが脂質のフロップを誘導するにはホスファチジルエタノールアミンが必要であることが人工膜の実験より示された。細胞膜や人工膜の外層にホスファチジルエタノールアミンの量が多くなると、シンナマイシンは膜の融合や形態変化を引き起こす。これらの結果は、シンナマイシンは細胞に結合すると脂質のフロップを誘導し、細胞膜の秩序を壊し、細胞死を誘導することを示唆している。

2.ミミズ毒素、ライセニンの作用機序

ライセニンは 297 アミノ酸からなるタンパク質で、ミミズの体腔液に含まれる毒素である。シンナマイシンと同様に細胞に対して毒性を示し、赤血球を溶血させる。ライセニンは多くの哺乳細胞の細胞膜を形成する主な脂質の一つであるスフィンゴミエリンに特異的に結合する。この性質を使用してライセニンを用いることにより、細胞内のスフィンゴミエリンの分布、動態を調べることが可能である。ライセニンのほかに、シマミミズにはライセニン関連タンパク質、LRP-1(lysenin2)と LRP-2(lysenin3)が存在する。LRP-1 はライセニンと相同性 76 %、類似性

88 %で、LRP-2 は相同性 89 %、類似性 94 %である。しかし、これら LRP の性状解析は行われていなかった。本研究ではライセニンと LRP-1、2 について組み換えタンパク質を作製し、スフィンゴミエリンへの結合、赤血球への溶血活性を調べた。その結果、LRP-2 はライセニン同様にスフィンゴミエリンに特異的に結合し、溶血活性をもっているが LRP-1 はその活性が 1/10 であることが明らかになった。ライセニンと LRP-2 は 30 個の芳香族アミノ酸を共有するが、このうち、209 番目のフェニルアラニンが LRP-1 ではイソロイシンに置換されている。LRP-1 の 210 番目のイソロイシンをフェニルアラニンに置換した I210F 変異体を作製したところ、この変異体は野生型ライセニンと同様の活性を示し、芳香族アミノ酸がライセニンの活性に重要であることが明らかになった。

ライセニンによるスフィンゴミエリンの認識、溶血活性における芳香族アミノ酸の重要性はライセニンのトリプトファン変異体を用いることにより確かめられた。ライセニンは 6 個のトリプトファンを含むが、このうちの 5 個は LRP-1 および LRP-2 に保存されている。保存されているトリプトファンをアラニンに置換した変異体は脂質への結合、溶血活性を共に失ったのに対して、保存されていないトリプトファンの変異は活性に影響を与えなかった。これらの結果はライセニン、LRP-1、LRP-2 の活性に芳香族アミノ酸が重要な役割を果たしていることを示している。

3.糖脂質合成阻害剤、PDMP の脂質に与える影響

D-*threo*-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (D-PDMP)は糖脂質合成酵素の阻害剤として広く用いられている。しかし、本研究において D-PDMP の糖脂質合成とは無関係な作用が明らかになった。D-PDMP は細胞に加えると後期エンドソーム・リソソームに蓄積する。後期エンドソームの内膜はビス(モノアシルグリセロ)リン酸(BMP)と呼ばれているユニークな脂質に富んでおり、このオルガネラは特徴的なマルチベシクル構造をとる。この特徴的な構造こそが BMP が後期エンドソームで形成する膜ドメインの機能に必要不可欠であると考えられている。本研究で D-PDMP が pH 依存的に BMP 膜ドメインの構造を変化させ、マルチラメラ構造を誘導することが明らかになった。大きく構造変化した BMP 膜ドメインでは様々な機能障害が起こると考えられる。BMP の機能は幾つか報告されているが、本研究により BMP がコレステロールエステルの分解を触媒する酸性リパーゼの活性を亢進するという新たな機能が明らかになった。この BMP による酸性リパーゼの亢進は D-PDMP の添加により阻害され、その結果細胞内でコレステロールエステルの分解が抑制された。コレステロールエステルは通常細胞外から、低密度リポ

タンパク質の形で取り込まれ、後期エンドソームで分解されコレステロールを生成する。生成されたコレステロールは細胞膜、小胞体に輸送される。D-PDMP で処理した細胞では、コレステロールエステルの分解が抑制されるため、コレステロールは細胞膜に輸送されず、細胞膜のコレステロール量が減少することが明らかになった。また、これらの作用は光学異性体の L-PDMP でも同様に起こるため、糖脂質の合成とは無関係であることが示された。

細胞膜上でコレステロールに富んだドメインに局在するといわれるタンパク質は幾つか報告されている。その中の一つ、P-糖タンパク質に注目した。細胞膜に存在する P-糖タンパク質は抗がん剤を細胞の中から外に排出しており、P-糖タンパク質の活性化により癌細胞は多剤耐性になると考えられている。PDMP を処理した細胞では、細胞膜のコレステロールが減少することから、P-糖タンパク質の活性が低下しており、PDMP で処理することで、多剤耐性を解消できることが示された。