【解説】

細胞の生と死を調節する生体膜脂質

スフィンゴ脂質の細胞内恒常性の破綻によって引き起こされるアポトーシス

梶原健太郎*^{1, 2}, 船戸耕一*¹

細胞を細胞たらしめるもの、それは細胞膜である。細胞膜は細胞の内と外を隔てる境界であり、そこには情報伝達や物質の輸送に関与するさまざまなタンパク質が存在している。また、真核細胞の細胞内に目を移すと、すべてのオルガネラは膜で区画化されており、それによって独立した機能が担保され、さらに高効率な生命現象が実現されている。これら生体膜の主成分である脂質は、生命現象の根幹をサポートしている名脇役であると言える。それでは、この生体膜の構成脂質の代謝が異常になると、細胞はどうなるか？ 細胞は異常を相補するように代謝をさらに変動させ、異常事態を乗り越えようとする。それでも補えない場合はどうなるか？ 答えは想像に難しくなく、細胞死に至る。本稿では、脂質の一種スフィンゴ脂質の恒常性の破綻による酵母のアポトーシス細胞死誘導機構を解説する。

本稿では、まずバックグラウンドとして、スフィンゴ脂質の生体膜の構成要素としての役割、生合成、オルガネラ間輸送について概説し、続いて、酵母のアポトーシス細胞死におけるスフィンゴ脂質の関与について紹介する。

Apoptosis Induced by Disruptions of Intracellular Sphingolipid Homeostasis
Kentaro KAJIWARA, Kouichi FUNATO, *¹広島大学大学院生物圏科学研究科, *²大阪大学微生物病研究所

スフィンゴ脂質とは

脂質の定義は難しいが、簡単に言うならば水に不溶性の低分子化合物である。細胞内外には数千種類を超える脂質が存在している。なぜ膨大な種類の脂質が存在するのかは不明であるが、その多様性が生体膜の柔軟性・剛健性を生んでいると考えられる。また、脂質は比較的に単純な構造ながら、多彩な生物学的役割をもっており、細胞の増殖・分化など高次生命機能をも担っている⁽¹⁾。脂質の機能は大きく3つに分類される。1つめは、生体膜の形成である。脂質は二重膜を形成し、細胞の内外の区別（細胞膜の形成）、細胞機能の区画化（オルガネラの形成）、輸送小胞の形成などに関与している。2つめは、シグナル伝達のメディエーターとしての働きである。生体膜から遊離した脂質は、細胞内や近隣の細胞に対してシグナル伝達の仲介者として機能する。最後は、エネルギーの貯蔵としての働きである。中性脂肪やステロールは効率の良いエネルギー源として細胞内に蓄積されており、必要に応じて利用されている。

生体膜を構成する主要な脂質は、グロセロリン脂質、ステロール、スフィンゴ脂質の3種類であるが、本稿で

は筆者らの主な研究対象であるスフィンゴ脂質について紹介する。スフィンゴ脂質はスフィンゴイド塩基を骨格とする脂質の一群であり^(2,3)、酵母からヒトに至るまで真核細胞に普遍的に存在している（余談であるが、「スフィンゴ」はギリシャ神話に登場する「スフィンクス」に由来し、「謎」という意味がある。機能について不明な点が多いということでスフィンゴ脂質と命名された）。スフィンゴ脂質は生体膜の構成要素としてだけでなく、シグナル伝達メディエーターとしても機能する^(2~4)。また、スフィンゴ脂質の重要な役割の一つに、脂質マイクロドメイン（通称、脂質ラフト）の形成がある^(5~8)（脂質ラフト説は1997年のSimonsによる提唱後、今もなお議論されている）。脂質ラフトは生体膜上にスフィンゴ脂質とステロールが秩序立って集積した領域である。スフィンゴ脂質を構成する脂肪酸は比較的まっすぐな構造のもの（飽和脂肪酸）が多いことから脂肪酸鎖間のファン・デル・ワールス力が強く、またスフィンゴ脂質の間にステロールが入り込むと熱力学的に安定した構造になる⁽²⁾。これらの物理的性質によって秩序液体相からなるドメイン構造が形成される。脂質ラフトにはシグナル伝達に参与する受容体タンパク質やグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカータンパク質（タンパク質のC末端が糖脂質GPIの修飾を受けており、これによって膜に居留されている）などが集積し、細胞膜上のシグナル伝達のプラットフォームやタンパク質の選別輸送の場として機能していると言われている⁽⁷⁾。脂質ラフトは必要（細胞外からのシグナルなど）に応じて形成さ

れ、小さく寿命は短時間であるとされており、大きく安定的に存在するとされた古典的な脂質ラフトは存在しないと最近では考えられている^(7,8)。脂質ドメインの形成メカニズムは不明であるが、GPIアンカータンパク質が核となって、その周辺に脂質分子が集積して安定な脂質ラフトが形成されるモデルが提唱されている⁽⁸⁾。以上のように、スフィンゴ脂質は生体膜を形成するだけでなく、シグナル伝達メディエーターや脂質ラフトの構成要素としてさまざまな細胞機能を制御している。

スフィンゴ脂質の生合成

本稿では酵母細胞を主役に据えるが、スフィンゴ脂質の合成と輸送に関しては動物細胞についても一部紹介する（図1）。

スフィンゴ脂質の新生（*de novo*）合成は小胞体で始まる^(9~11)。はじめに脂肪酸-CoAとセリンの縮合反応と、続く還元によってスフィンゴイド塩基の一つであるジヒドロスフィンゴシン（DHS）が合成される。その後、酵母細胞ではDHSがフィトスフィンゴシン（PHS）に変換された後、脂肪酸の付加によってスフィンゴ脂質の中心的脂質であるフィトセラミドになる^(9,10)。またDHSからジヒドロセラミドを経て、フィトセラミドが合成される経路もある。一方、動物細胞では脂肪酸の付加によってDHSがジヒドロセラミドに変換された後、不飽和化され、セラミドになる^(11,12)。その後、セラミド分子種はゴルジ体へ輸送される（以下、本文中で記載

図1 ■ 酵母細胞と動物細胞におけるスフィンゴ脂質の生合成経路

する「セラミド」は、スフィンゴイド塩基に脂肪酸が結合したセラミド分子種を指す)。

ゴルジ体では、セラミドにリン酸および塩基や糖が結合し、以下のような複合スフィンゴ脂質が合成される。酵母細胞では、イノシトールリン酸の付加によってイノシトールリン酸セラミド (IPC), さらにマンノースの付加によってマンノシルイノシトールリン酸セラミド (MIPC), 2つめのイノシトールリン酸の付加によってマンノシル2イノシトールリン酸セラミド (M(IP)₂C) が合成される^(9,10)。動物細胞では、コリンリン酸の付加によってセラミドがスフィンゴミエリンに変換されるか、グルコースの付加によってグルコシルセラミドに変換された後、ラクトシルセラミドを経てより複雑な構造のスフィンゴ糖脂質群 (ガングリオ系, ラクト系, ネオラクト系, グロボ系, イソグロボ系) になる^(3,11)。その後, 複合スフィンゴ脂質はゴルジ体から細胞膜表面や液胞／リソソームなどのオルガネラへ輸送される。

スフィンゴ脂質の細胞内輸送

スフィンゴ脂質の細胞内輸送を, 小胞体からゴルジ体へのセラミドの輸送, ゴルジ体から細胞膜への複合スフィンゴ脂質の輸送に分けて説明する。

小胞体からのセラミド輸送には, 輸送小胞を介する小胞輸送と輸送小胞を介さない非小胞輸送の2つのルートが存在する^(13~16) (図2) (余談であるが, 細胞内小胞輸送に関する研究は2013年のノーベル医学生理学賞に輝いた)。酵母細胞の小胞輸送はセラミド輸送の約6~8割を担い, 非小胞輸送は残りの約2~4割を担っている⁽¹⁴⁾。セラミドの小胞輸送は, タンパク質の輸送と同様に被覆タンパク質を必要とするCOPII被覆小胞を介した輸送システムである⁽¹⁴⁾。酵母細胞において, セラミドの合成に障害がある場合は, GPIアンカータンパク質 Gas1p の輸送は異常になるが, GPIアンカー型でないタンパク質カルボキシペプチダーゼ Y (CPY) の輸送は正常であることが以前より知られている^(17,18) (図2)。

図2 ■ スフィンゴ脂質の細胞内輸送

小胞体：小胞体で合成されたセラミドは輸送小胞を介してゴルジ体へ運ばれる。GPIアンカータンパク質（たとえばGas1p）はp24複合体による選別を受け、非GPIアンカー型タンパク質（たとえばアミノ酸透過酵素Gap1pやCPY）とは異なる輸送小胞に濃縮され、輸送される⁽⁴⁶⁾。このGPIアンカータンパク質の輸送には正常なスフィンゴ脂質の合成が必要であり、またセラミドの小胞輸送にも正常なGPIアンカータンパク質の合成が必要である（相互調節）。しかし、Oshタンパク質はセラミドの小胞輸送に必要であるが、GPIアンカータンパク質の輸送には必要でないことから、セラミドはGPIアンカータンパク質が含まれる小胞と異なる輸送小胞を介して輸送されることが考えられる⁽²⁰⁾。いずれもCOPII被覆タンパク質依存性の小胞輸送によってゴルジ体へ運ばれる。またセラミドには、輸送タンパク質を介する非小胞輸送によってゴルジ体に運ばれるルートも存在する。ゴルジ体：複合スフィンゴ脂質はゴルジ体で選別され、輸送小胞を介して細胞膜や液胞へ輸送される。この選別はGPIアンカータンパク質やNcr1pによって調節されているかもしれない。

また、筆者らはGPIの生合成に障害があると、セラミドの輸送が異常になることを見いだした⁽¹⁹⁾。これらの結果より、セラミドをゴルジ体へ運ぶCOPII被覆小胞はGPIアンカータンパク質を運ぶ小胞と同じものであり、セラミドを主とした脂質ドメインにGPIアンカータンパク質が集積して輸送されるというモデルを以前提出した⁽¹⁹⁾。しかし最近、酵母細胞のOshタンパク質 (oxysterol binding protein homologue proteins) をコードする遺伝子群を破壊すると、セラミドの小胞輸送は阻害されるのに対して、GPIアンカータンパク質の輸送は影響を受けないことが明らかになったことから、セラミドを運ぶCOPII被覆小胞はGPIアンカータンパク質を運ぶ小胞と異なるというモデルを新たに提出した⁽²⁰⁾。動物細胞においては、セラミドの小胞輸送とGPIアンカータンパク質の小胞輸送の関係はよくわかっていない⁽²¹⁾。一方のセラミドの非小胞輸送は、動物細胞ではセラミド輸送タンパク質 CERT (ceramide transfer protein) が担っているが^(15, 16)、酵母細胞ではCERTに相当するタンパク質は見つかっていない。酵母細胞のセラミドの非小胞輸送は、無細胞実験系によって、ATPのエネルギーを必要としないが、細胞質画分に存在する熱に不安定なタンパク質を必要とすること、さらに小胞体とゴルジ体との間で形成される接触部位が関与していることが示唆されているが⁽¹⁴⁾、それらをコードする遺伝子や調節する遺伝子はいまだ明らかにされていない。

複合スフィンゴ脂質のゴルジ体から細胞膜やほかのオルガネラへの輸送は、タンパク質の輸送と同様に小胞輸送である⁽¹⁰⁾。酵母細胞の定常状態では、ゴルジ体や液胞でのIPC量はMIPC/M(IP)₂Cよりも多く、反対に細胞膜ではMIPC/M(IP)₂Cが相対的に多いことが知られている⁽²²⁾。IPC, MIPC, M(IP)₂Cの3つの複合スフィンゴ脂質はゴルジ体で合成されるので、ゴルジ体において複合スフィンゴ脂質を選別する特異的な機構の存在が示唆される⁽¹⁰⁾。酵母細胞において、脂質ラフトに集積するタンパク質を含むトランスゴルジ網由来の輸送小胞はスフィンゴ脂質とステロールに富むことが報告されている^(23, 24)。その輸送小胞にはGas1pも集積することから⁽²³⁾、複合スフィンゴ脂質の選別にGPIアンカータンパク質の脂質ドメインへの集積が関与する可能性がある。実際に、GPI生合成過程に損傷のある変異株では、スフィンゴ脂質とコレステロールの細胞内バランスが崩れ⁽¹⁹⁾、さらに脂質ラフトに局在するトリプトファン透過酵素Tat2pやウラシル輸送体Fur4pの輸送が異常になることが報告されている⁽²⁵⁾。また、興味深いことに、酵母細胞のNPC1 (human Niemann Pick C disease) 相

同遺伝子 *NCR1* の変異により、複合スフィンゴ脂質の細胞内分布が変化することが知られている⁽²⁶⁾。Ncr1pは複合スフィンゴ脂質の選別輸送を調節するタンパク質であるかもしれない⁽³⁾。

スフィンゴ脂質の代謝バランスの崩壊による生育障害

スフィンゴ脂質は細胞内のさまざまな現象に関与していることから、その合成と分解は厳密に制御されている。スフィンゴ脂質の代謝のバランスが崩れるとどうなるか？ 答えは想像に難しくなく、生育が停止し、細胞死に至る。たとえば、セラミドからIPCへの変換過程を触媒するタンパク質Aur1pの阻害剤 aureobasidin A (AbA) (黒色酵母 *Aureobasidium pullulans* が産生する抗真菌抗生物質) で酵母細胞を処理すると、複合スフィンゴ脂質が減少し、セラミドを含む前駆脂質が蓄積する^(27, 28)。このスフィンゴ脂質の細胞内代謝バランスの崩壊によって、野生型の酵母細胞の生育が停止する。これを利用したのが、形質転換した酵母細胞のセクションに用いられるAbA耐性酵母形質転換システム (タカラバイオ社) である (図3)。このシステムはプラスミド内に選択マーカーとして変異 *AUR1^R* (AbA resistance mutation) 遺伝子が導入されており、形質転換した細胞は高濃度のAbAによる生育障害に対して耐性を示す。この選別システムは栄養要求性変異をもたない実用酵母 (清酒酵母やパン酵母など) にも適用できることから、本稿をお読みの方のなかには使用された方もいるかと思う。しかし、AbA処理によって引き起こされる生育障害の詳細は不明であった。筆者らは、スフィンゴ脂質の細胞内代謝バランスの崩壊によって酵母の細胞死が誘導されるという仮説を立て、AbA処理細胞の解析を進めた。

アポトーシスの誘導

細胞死には大きく分けて2つのタイプがある。ネクローシス (壊死) とアポトーシス (プログラム細胞死) である。前者は受動的な細胞死であるのに対して⁽²⁹⁾、後者はコントロールされた積極的な細胞死である⁽³⁰⁾。アポトーシスは、多細胞生物では損傷細胞や不要細胞の除去、発生過程の形態形成などに利用されている⁽³⁰⁾。その誘導は、細胞内外からの細胞死誘導シグナルによって引き起こされる。アポトーシス誘導機構は単細胞生物である酵母細胞にも存在することが明らかにされている^(31, 32)。

図3 ■ Aureobasidin A 耐性酵母形質転換システムの概略図

A) 酵母ゲノム遺伝子組み込み法：目的遺伝子を挿入した染色体組込み型プラスミドの変異 *AUR1^R* 遺伝子を制限酵素処理し、目的酵母細胞に形質転換する。酵母細胞のゲノム上の野生型 *AUR1* 遺伝子と相同組換えを起こすことで、目的遺伝子が組み込まれる。AbA 耐性酵母をセクションすることで、目的遺伝子を組み込んだ酵母が得られる。B) プラスミド形質転換法：目的遺伝子を挿入した変異 *AUR1^R* 遺伝子発現用プラスミドを酵母細胞に形質転換する。AbA 耐性酵母をセクションすることで、目的遺伝子発現プラスミドを取り込んだ酵母が得られる。プラスミドはその種類によって、単コピーあるいは多コピーの状態が存在する。矢頭：制限酵素切断部位、アスタリスク：アミノ酸残基変異箇所。

まず筆者らは AbA 処理による細胞死を経時的に解析した⁽³³⁾。その結果、短時間（2～4時間）の AbA 処理で細胞死が引き起こされていることが明らかになった。そこで、AbA 処理細胞の形態的特徴を解析した結果、核の形態異常やクロマチンの凝集、活性酸素種（reactive oxygen species; ROS）の蓄積が観察された。同様の変化は代表的なアポトーシス誘導因子である過酸化水素（ H_2O_2 ）で処理した細胞でも観察された。次に、AbA 処理によってアポトーシスが誘導されるかどうか調べるため、アポトーシスの指標となる核 DNA の断片化を TdT-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) 法で解析した。その結果、TUNEL 陽性細胞が AbA 処理濃度に応じて増加することが示された。以上の結果から、AbA 処理によってアポトーシスが誘導されることが明らかになった。

カスパーゼとミトコンドリアの関与

AbA 処理によるアポトーシスの誘導経路はどのようなものだろうか？ 動物細胞では主にカスパーゼと呼ばれるプロテアーゼが活性化され核内タンパク質を分解することで、細胞死が実行される。カスパーゼの活性化シグナルは細胞内のオルガネラや細胞膜などから発せられ、その経路は複雑多岐に渡るが、多くはミトコンドリア

アを経由する⁽³⁰⁾。ミトコンドリアはカスパーゼを活性化するシトクロム *c* やさまざまなアポトーシス誘導因子を内包することから、“生”だけでなく“死”も司るオルガネラといえる。

酵母細胞には動物細胞のカスパーゼに相当するメタカスパーゼ Ycalp が存在する^(31, 32, 34)。そこで筆者らは、AbA 処理によるアポトーシスの誘導が Ycalp を介したものを解析した⁽³³⁾。その結果、*YCA1* 遺伝子の破壊によって、AbA 処理後の生存率が向上し、TUNEL 陽性の割合も減少した。同様の結果は Ycalp の下流で機能する Rsm23p の遺伝子破壊株（*rsm23Δ*）でも確認された。カスパーゼが関与することがわかったので、誘導経路の上流に位置することが予測されるシトクロム *c* とミトコンドリアの関与を解析した。その結果、シトクロム *c* をコードする *CYC1* と *CYC7* の二重破壊株（*cyc1Δ cyc7Δ*）は AbA 耐性を示し、さらにシトクロム *c* の漏出に関与するミトコンドリア ADP/ATP 輸送タンパク質の Aac1p と Aac3p の遺伝子破壊株（*aac1Δ, aac3Δ*）でも同様の AbA 耐性が認められた。また AbA 処理細胞のミトコンドリアの形態を観察すると、アポトーシス誘導時の特徴である異常断片化が認められた。以上の結果から、AbA 処理によってミトコンドリアを介するカスパーゼ依存的なアポトーシスが誘導されることがわかった。

複合スフィンゴ脂質の減少の関与

AbA処理によるアポトーシス誘導の原因は、複合スフィンゴ脂質の減少なのか？ それともセラミドの蓄積なのか？ この疑問を解決するために、セラミドを含むすべてのスフィンゴ脂質の合成量が減少する条件で解析を行った⁽³³⁾。実験には、スフィンゴ脂質の合成の初期過程を阻害する myriocin (Myr) で処理した細胞と、同一の過程に損傷のある *lcbI* 遺伝子変異株 (*lcbI-100*) を用いた。解析の結果、Myr処理によって野生型細胞の生存率が減少すること、*lcbI-100* 変異株は野生株と比較してAbA処理後の生存率が顕著に低下することが確認された。またMyr処理野生株、*lcbI-100* 変異株において細胞内にROSが顕著に蓄積していることも示された。さらに、以前の筆者らの解析によって、GPIの生合成過程に損傷があると、複合スフィンゴ脂質の合成量が減少し、AbAに対して高感受性を示すことが明らかになっている⁽¹⁹⁾。そこで、GPI生合成の損傷のアポトーシス誘導に対する影響を解析したところ、GPI生合成遺伝子変異株ではAbA処理によるカスパーゼ依存的なアポトーシスが亢進することがわかった。以上の結果から、AbA処理によるアポトーシスの誘導の原因は、セラミドの蓄積ではなく、複合スフィンゴ脂質の減少ではないかと考えている。MIPCの合成に損傷のある遺伝子破壊株 (*csgIΔ*, *cshIΔ*) ではAbAによる生育障害に影響が認められなかったことから、IPCの減少が原因ではないかと推察される。

これと一致して、IPCあるいはMIPCが増加するM(IP)₂C合成酵素Ipt1pの遺伝子破壊株 (*ipt1Δ*) では、酸化ストレスに対する耐性は上昇し、経時寿命は延長することが知られている⁽³⁵⁾。しかし、*ipt1Δ*破壊株と同様に複合スフィンゴ脂質の量が増加する複合スフィンゴ脂質加水分解酵素Isc1pの遺伝子破壊株 (*isc1Δ*) では、反対に、酸化ストレスに対する耐性と経時寿命は低下することが報告されている^(36, 37)。興味深いことに、*isc1Δ*破壊株は酢酸処理に対して耐性を示す⁽³⁸⁾。これらの相反する結果は、細胞死誘導は複合スフィンゴ脂質の量的バランスによって制御されており、その仕組みは複数存在していることを示しているのかもしれない。さらに、AbAによる生育障害はスフィンゴ脂質の脂肪酸の長さによって影響を受けることが知られていることから⁽³⁹⁾、量だけでなく、その構造も細胞死誘導に深くかかわっていると考えられる。

小胞体ストレスの関与

小胞体ストレスは、折り畳みや修飾が異常なタンパク質が品質管理システムにひっかかり、輸送されずに小胞体に過剰蓄積することが原因で起こる。細胞はこれに対処するために、ストレスセンサー Ire1pとその下流の転写調節因子Hac1pを駆使して、転写抑制や分子シャペロンの増加、輸送の促進などさまざまな対策を講じる⁽⁴⁰⁾。この一連の対策を小胞体ストレス応答 (unfolded protein response; UPR) と呼ぶ。しかし、小胞体ストレスがUPRによる対応可能なレベルを超えるとアポトーシスが誘導されることが知られている。

そこで筆者らは、GPI生合成に障害が起こるとGPIがアンカーされていない異常なタンパク質が小胞体に蓄積し、その蓄積によって生じる小胞体ストレスがアポトーシスを誘導しているのではないかと考えた。実際に、小胞体ストレスの誘導を解析した結果、GPI生合成遺伝子変異株では、ストレス誘導剤ツニカマイシンに対する感受性が増し、小胞体ストレスによって誘導される分子シャペロンの発現が上昇、さらに小胞体の形態が異常を呈したことから、UPRが起こっていることが示された⁽³³⁾。また、*lcbI-100* 変異株、MyrやAbAで処理した細胞においても同様の小胞体の形態異常が観察されたことから、複合スフィンゴ脂質の減少によって小胞体ストレスが誘導されることが明らかになった。

では複合スフィンゴ脂質の減少によって引き起こされる小胞体ストレスの要因は何であろうか？ 前述したように、スフィンゴ脂質の生合成はGPIアンカータンパク質の小胞体からの輸送に必要である^(17, 18)。これは、スフィンゴ脂質の生合成が異常になるとGPIアンカータンパク質が小胞体に蓄積することを意味している。そこで、Gas1pの成熟過程と局在を解析した⁽³³⁾ (図2)。Gas1pは小胞体でGPIアンカーが付加され、ゴルジ体へ運ばれたのち糖鎖修飾を受けることで成熟型になる。解析の結果、MyrやAbAを処理して複合スフィンゴ脂質の量を減少させると、小胞体型の未成熟Gas1pが蓄積することがわかった。また、その局在をmRFP融合Gas1p発現細胞で解析したところ、未処理の細胞では主に細胞膜に局在するが、薬剤処理した細胞では小胞体に誤局在することが示された。これに対して、CPYの成熟過程は影響を受けなかったことから、複合スフィンゴ脂質の減少によってGPIアンカータンパク質が特異的に小胞体に蓄積することが明らかになった。したがって、未成熟なGPIアンカータンパク質の異常蓄積が小胞体ストレスを引き起こす要因であると考えられる。

GPIアンカータンパク質の小胞体蓄積は、複合スフィンゴ脂質の減少による輸送小胞の形成あるいは集積の障害が原因であると考えられるが、ゴルジ体で合成される複合スフィンゴ脂質の量的変化がどのように影響を与えているかは不明である。しかし、複合スフィンゴ脂質の一部は小胞体へ逆行輸送されると考えられることから⁽³⁾、小胞体での複合スフィンゴ脂質の量的バランスが直接的あるいは間接的にGPIアンカータンパク質を含む輸送小胞の形成や集積に影響を及ぼしている可能性がある。

細胞質内カルシウム濃度の関与

スフィンゴ脂質の生合成を阻害する薬剤処理によって小胞体ストレスが誘導されることはわかったが、アポトーシス誘導経路の中核であるミトコンドリアとはミッシングリンクのままである。2つの空間的に離れたオルガネラをつなぐ現象として、細胞質内カルシウム濃度の上昇がある^(40, 41)。小胞体ストレスが起こると、細胞質内カルシウム濃度が上昇し、これがシグナルとなって、ミトコンドリアを介するアポトーシスが誘導されることが知られている。

そこで、複合スフィンゴ脂質の減少によるアポトーシス誘導シグナルに、細胞質内カルシウム濃度の上昇が関与しているか否かについて検討したところ、MyrやAbAの処理およびGPI生合成遺伝子の変異によって細胞質内カルシウム濃度が上昇することが示された⁽³³⁾。興味深いことに、この細胞質内カルシウム濃度の上昇は、細胞膜に存在するカルシウムチャネルをコードする

MIDI 遺伝子の破壊によって抑えられた。このことは、細胞内カルシウム貯蔵庫内の貯蔵量の減少を感知して細胞外からカルシウム流入を引き起こす経路が細胞質内カルシウム濃度の上昇に起因していることを示唆している。また、*MIDI* 遺伝子の破壊によって細胞質内カルシウム濃度を低下させると、GPI生合成遺伝子変異株のAbAに対する感受性や生存率の低下も抑えられたことから、アポトーシスの誘導と細胞質内カルシウム濃度の間に相関関係があることが示された。以上の結果から、小胞体ストレスによる細胞質カルシウム濃度の上昇がミトコンドリアを介するアポトーシスの誘導に関与していると考えている。

まとめ

複合スフィンゴ脂質が減少したときに起こる一連の現象を順に並べ替える⁽³³⁾ (図4)。まずAbA処理によって、細胞内のスフィンゴ脂質の代謝バランスが異常になる。その結果、GPIアンカータンパク質の輸送が不調になり、小胞体に蓄積する。この異常蓄積によって小胞体ストレスが起こり、細胞質内のカルシウム濃度が上昇する。これによってミトコンドリアが機能不全を起こし、ROSの蓄積、さらにミトコンドリアからシトクロム*c*が漏出する。これによってメタカスパーゼが活性化され、アポトーシスが実行される。これが、現在筆者らが考えているスフィンゴ脂質の代謝バランスが異常になったときのアポトーシス誘導経路モデルである。

スフィンゴ脂質には多くの分子種があり、細胞膜だけでなくさまざまなオルガネラ膜にも存在している^(1, 2)。

図4 ■ スフィンゴ脂質の恒常性の破壊によるアポトーシス誘導機構

したがって、スフィンゴ脂質の代謝異常によるアポトーシス誘導経路は複数存在していると考えられる⁽⁴²⁾。今回明らかになった経路はそのなかの一つであろう。また、スフィンゴ脂質の代謝は進化の過程でよく保存されており、小胞体ストレスを発信源とするアポトーシス誘導機構も高等真核生物に広く存在していることから、私たちヒトにも酵母細胞と同様のスフィンゴ脂質の代謝異常によるアポトーシス誘導機構が備わっていることが予想される。

おわりに

脂質の研究は、代謝関連遺伝子の同定によって分子レベルでの解析が可能になり、大きく発展した。最近では質量分析装置の機能向上によって網羅的な解析や細胞・組織レベルでの解析が可能になってきた。こうした脂質研究の進展に伴い、近年、スフィンゴ脂質をはじめさまざまな脂質の代謝異常が、がんや生活習慣病、神経変性などさまざまな疾患と深くかかわっていることが明らかになってきた^(4, 43, 44)。今後、脂質代謝異常の研究から、疾患の原因解明や治療薬の開発が進むことが期待されている。実際に、現在いくつかのスフィンゴ脂質の代謝阻害剤が抗がん剤の臨床トライアルに入っている⁽⁴³⁾。

しかしながら、ヒトをはじめとした動物細胞において、脂質の代謝異常による細胞内の変化に関しては未知の部分が多く残されている。その一つが、アポトーシスである。これまで、セラミドがアポトーシス誘導に働くことが明らかにされているが⁽²⁾、ほかの脂質に関しては研究が進んでいないのが現状である。酵母は単細胞生物でありながら、多細胞生物がもつアポトーシスの基本的な仕組みを備えていることから、アポトーシスにおける脂質の役割を解明するのに適したモデル生物である。さらに、酵母を用いる研究の利点の一つに、遺伝学の利用がある。本稿で紹介した研究は酵母遺伝学を駆使することにより、その全体像を比較的短時間で明らかにすることができた。現在、国内外で、酵母細胞を用いた脂質代謝の異常による細胞死誘導機構の解析が盛んに行われている^(42, 45)。酵母での脂質代謝の研究が、今後ヒトの疾患の原因解明や創薬などに貢献することを期待している。

謝辞：本研究は科学研究費助成事業、日本学術振興会特別研究員奨励費、広島大学大学院生物圏科学研究科研究科長裁量経費によるサポートを受けました。研究に携わってくださったラボメンバー、共同研究者の皆さまに感謝いたします。

文献

- 1) G. van Meer, D. R. Voelker & G. W. Feigenson : *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 112 (2008).
- 2) Y. A. Hannun & L. M. Obeid : *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 139 (2008).
- 3) Y. Hirabayashi, Y. Igarashi & A. H. Merrill, Jr. (Eds.) : *"Sphingolipid Biology."* Springer, 2006.
- 4) M. P. Wymann & R. Schneider : *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 162 (2008).
- 5) K. Simons & E. Ikonen : *Nature*, **387**, 569 (1997).
- 6) S. Munro : *Cell*, **115**, 377 (2003).
- 7) K. Simons & M. J. Gerl : *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 688 (2010).
- 8) A. Kusumi, T. K. Fujiwara, N. Morone, K. J. Yoshida, R. Chadda, M. Xie, R. S. Kasai & K. G. Suzuki : *Semin. Cell Dev. Biol.*, **23**, 126 (2012).
- 9) L. A. Cowart & L. M. Obeid : *Biochim. Biophys. Acta*, **1771**, 421 (2007).
- 10) K. Funato, B. Vallée & H. Riezman : *Biochemistry*, **41**, 15105 (2002).
- 11) B. Ogretmen & Y. A. Hannun : *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 604 (2004).
- 12) A. Kihara, S. Mitsutake, Y. Mizutani & Y. Igarashi : *Prog. Lipid Res.*, **46**, 126 (2007).
- 13) J. C. M. Holthuis & T. P. Levine : *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 209 (2005).
- 14) K. Funato & H. Riezman : *J. Cell Biol.*, **155**, 949 (2001).
- 15) K. Hanada, K. Kumagai, N. Tomishige & T. Yamaji : *Biochim. Biophys. Acta*, **1791**, 684 (2009).
- 16) K. Hanada, K. Kumagai, S. Yasuda, Y. Miura, M. Kawano, M. Fukasawa & M. Nishijima : *Nature*, **426**, 803 (2003).
- 17) C. Sütterlin, T. L. Doering, F. Schimmöller, S. Schröder & H. Riezman : *J. Cell Sci.*, **110**, 2703 (1997).
- 18) R. Watanabe, K. Funato, K. Venkataraman, A. H. Futerman & H. Riezman : *J. Biol. Chem.*, **277**, 49538 (2002).
- 19) K. Kajiwar, R. Watanabe, H. Pichler, K. Ihara, S. Murakami, H. Riezman & K. Funato : *Mol. Biol. Cell*, **19**, 2069 (2008).
- 20) K. Kajiwar, A. Ikeda, A. Aguilera-Romero, G. A. Castillon, S. Kagiwada, K. Hanada, H. Riezman, M. Muñoz & K. Funato : *J. Cell Sci.*, in press.
- 21) T. Kinoshita, Y. Maeda & M. Fujita : *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 2473 (2013).
- 22) P. Hechtberger, E. Zinser, R. Saf, K. Hummel, F. Paltauf & G. Daum : *Eur. J. Biochem.*, **225**, 641 (1994).
- 23) R. W. Klemm, C. S. Ejsing, M. A. Surma, H. Kaiser, M. J. Gerl, J. L. Sampaio, Q. de Robillard, C. Ferguson, T. J. Proszynski, A. Shevchenko & K. Simons : *J. Cell Biol.*, **185**, 601 (2009).
- 24) M. A. Surma, C. Klose & K. Simons : *Biochim. Biophys. Acta*, **1821**, 1059 (2012).
- 25) M. Okamoto, T. Yoko-o, M. Umemura, K. Nakayama & Y. Jigami : *J. Biol. Chem.*, **281**, 4013 (2006).
- 26) K. Malathi, K. Higaki, A. H. Tinkelenberg, D. A. Balderes, D. Almanzar-Paramio, L. J. Wilcox, N. Erdeniz, F. Redican, M. Padamsee, Y. Liu, S. Khan, F. Alcantara, E. D. Carstea, J. A. Morris & S. L. Sturley : *J. Cell Biol.*, **164**, 547 (2004).
- 27) M. M. Nagiec, E. E. Nagiec, J. A. Baltisberger, G. B. Wells, R. L. Lester & R. C. Dickson : *J. Biol. Chem.*, **272**, 9809 (1997).
- 28) V. Cerantola, I. Guillas, C. Roubaty, C. Vionnet, D. Uldry,

- J. Knudsen & A. Conzelmann: *Mol. Microbiol.*, **71**, 1523 (2009).
- 29) M. Leist & M. Jäättelä: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 589 (2001).
- 30) R. C. Taylor, S. P. Cullen & S. J. Martin: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 231 (2008).
- 31) F. Madeo, E. Herker, C. Wissing, H. Jungwirth, T. Eisenberg & U. Fröhlich: *Curr. Opin. Microbiol.*, **7**, 655 (2004).
- 32) D. Carmona-Gutierrez, T. Eisenberg, S. Büttner, C. Meisinger, G. Kroemer & F. Madeo: *Cell Death. Differ.*, **17**, 763 (2010).
- 33) K. Kajiwara, T. Muneoka, Y. Watanabe, T. Karashima, H. Kitagaki & K. Funato: *Mol. Microbiol.*, **86**, 1246 (2012).
- 34) F. Madeo, E. Herker, C. Maldener, S. Wissing, S. Lächelt, M. Herlan, M. Fehr, K. Lauber, S. J. Sigrist, S. Wesselborg & K. U. Fröhlich: *Mol. Cell*, **9**, 911 (2002).
- 35) A. M. Aerts, I. E. J. A. François, L. Bammens, B. P. A. Cammue, B. Smets, J. Winderickx, S. Accardo, D. E. De Vos & K. Thevissen: *FEBS Lett.*, **580**, 1903 (2006).
- 36) H. Kitagaki, L. A. Cowart, N. Matmati, S. V. de Avalos, S. A. Novgorodov, Y. H. Zeidan, J. Bielawski, L. M. Obeid & Y. A. Hannun: *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 2849 (2007).
- 37) T. Almeida, M. Marques, D. Mojzita, M. A. Amorim, R. D. Silva, B. Almeida, P. Rodrigues, P. Ludovico, S. Hohmann, P. Moradas-Ferreira, M. Côrte-Real & V. Costa: *Mol. Biol. Cell*, **19**, 865 (2008).
- 38) A. Rego, M. Costa, S. R. Chaves, N. Matmati, H. Pereira, M. J. Sousa, P. Moradas-Ferreira, Y. A. Hannun, V. Costa & M. Côrte-Real: *PLoS One*, **7**, e48571 (2012).
- 39) M. Tani & O. Kuge: *J. Biochem.*, **145**, 565 (2010).
- 40) C. Hetz: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 89 (2012).
- 41) C. Pereira, R. D. Silva, L. Saraiva, B. Johansson, M. J. Sousa & M. Côrte-Real: *Biochim. Biophys. Acta*, **1783**, 1286 (2008).
- 42) A. Rego, D. Trindade, S. R. Chaves, S. Manon, V. Costa, M. J. Sousa & M. Côrte-Real: *FEMS Yeast Res.*, in press.
- 43) S. A. F. Morad & M. C. Cobat: *Nat. Rev. Cancer*, **13**, 51 (2013).
- 44) T. Hla & A. J. Dannenberg: *Cell Metab.*, **16**, 420 (2012).
- 45) T. Eisenberg & S. Büttner: *FEMS Yeast Res.*, in press.
- 46) G. A. Castillon, A. Aguilera-Romero, J. Manzano-Lopez, S. Epstein, K. Kajiwara, K. Funato, R. Watanabe, H. Riezman & M. Muñoz: *Mol. Biol. Cell*, **22**, 2924 (2011).

プロフィール

梶原健太郎 (Kentaro KAJIWARA)

＜略歴＞2007年広島大学大学院生物圏科学研究科（博士課程前期）修了／2008年日本学術振興会特別研究員DC2／2010年広島大学大学院生物圏科学研究科（博士課程後期）修了／同年大阪大学微生物病研究所特任研究員＜研究テーマと抱負＞がん化に伴う脂質代謝変動の意義の解明，チロシンキナーゼの自空間的制御機構の解明＜趣味＞旅行，野球観戦（ホークスファン）

船戸 耕一 (Kouichi FUNATO)

＜略歴＞1989年徳島大学薬学部卒業／1994年同大学大学院薬学研究科修了，薬学博士取得／日本学術振興会海外特別研究員（米国ワシントン大学医学部），理化学研究所基礎科学特別研究員，スイスパーゼル大学生物研究所博士研究員，スイスジュネーブ大学理学部上級博士研究員を経て，2004年広島大学大学院生物圏科学研究科助教授／2007年同大学大学院生物圏科学研究科准教授，現在に至る＜研究テーマと抱負＞酵母における脂質の合成，輸送，機能に関する研究＜趣味＞ビールをだらだら飲むこと