

博士論文

セラミド代謝系に関する研究：
Srcによるセラミダーゼ活性制御機構の解明

2013年

豊村 香織

目次

略語表	1
使用薬物	2
緒言	4
実験方法	7
第1章 TLC法を用いたセラミド代謝物の検出法の確立	
1. 序論	11
2. 結果	12
3. 考察	21
第2章 HSP90阻害剤geldanamycin (GA) 及びそのアナログのセラミド代謝、細胞障害性に及ぼす効果	
1. 序論	25
2. 結果	26
3. 考察	34
第3章 SrcによるCDaseおよびCERKの活性制御機構についての検討	
1. 序論	36
2. 結果	37
3. 考察	51
総括	55
参考文献	56
論文目録	68
謝辞	69

略語表

17-AAG	: 17- <i>N</i> -allylamino-17-demethoxygeldanamycin
AA	: arachidonic acid
ACER	: alkaline ceramidase
ASAH	: <i>n</i> -acylsphingosine amidohydrolase
BSA	: bovine serum albumin
C1P	: ceramide-1-phosphate
CERK	: ceramide kinase
CERT	: ceramide transfer protein
CHO	: Chinese hamster ovary
cPLA ₂ α	: cytosolic phospholipase A ₂ α
D- <i>erythro</i> -MAPP	: (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>)-D- <i>erythro</i> -2-(<i>N</i> -myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol
DMEM	: Dullbecco's modified Eagle's Medium
EGF	: epidermal growth factor
ERK	: extracellular signal-regulated kinase
FBS	: fetal bovine serum
GA	: geldanamycin
GF109203X	: bisindolylmaleimide
Gö6976	: 12-(2-cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indolo(2,3- <i>a</i>)pyrrolo(3,4- <i>c</i>)-carbazole
HBSS	: Hank's balanced salt solution
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC	: high performance liquid chromatography
HSP	: heat shock protein
IL-1 β	: interleukin-1 β
LDH	: lactate dehydrogenase
MAPK	: mitogen-activated protein kinase
MEK	: mitogen-activated protein / extracellular signal-regulated kinase kinase
NBD	: 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole
PBS	: phosphate buffered saline
PDGF	: platelet-derived growth factor
PKC	: protein kinase C
PMA	: 4 β -phorbol 12-myristate 13-acetate
PP2	: 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(<i>t</i> -butyl)pyrazolo[3,4- <i>d</i>]pyrimidine
PPMP	: D,L- <i>threo</i> -1-phenyl-2-hexadecanoylamino-3-morpholino-1-propanol
S1P	: sphingosine-1-phosphate
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SFKs	: Src family kinases
shRNA	: short hairpin RNA
SM	: sphingomyelin
TLC	: thin-layer chromatography
Triton X-100	: polyoxyethylene (10) octylphenyl ether
U0126	: 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-amino-phenylthio)butadiene

使用試薬

1-Butanol	: 和光純薬工業株式会社
Acetic acid	: 和光純薬工業株式会社
A23187	: Sigma-Aldrich
Anti- β -tubulin antibody (T4026)	: Sigma-Aldrich
Anti-mouse immunoglobulin G antibody	: GE Healthcare
Anti-rabbit immunoglobulin G antibody	: GE Healthcare
[³ H] arachidonic acid	: 和光純薬工業株式会社
Benzylpenicillin potassium	: 明治製菓株式会社
BSA	: Sigma-Aldrich
Calcium chloride	: 和光純薬工業株式会社
Chloroform	: 和光純薬工業株式会社
D-erythro-MAPP	: Calbiochem
DMEM	: Sigma-Aldrich
Doxycycline	: Sigma-Aldrich
ethylenediaminetetraacetic acid	: 同仁化学研究所
EGF	: ヒゲタ醤油
Ethyleneglycol tetraacetic acid	: LKT Laboratories
Genistein	: 和光純薬工業株式会社
GF109203X	: Sigma-Aldrich
Glycerol	: Sigma-Aldrich
Gö6976	: Calbiochem
H ₂ O ₂	: 和光純薬工業株式会社
Ham's F12	: Sigma-Aldrich
Herbimycin A	: 和光純薬工業株式会社
human ceramide kinase cDNA	: 第一三共株式会社 古濱孝文先生提供
Leupeptin	: Sigma-Aldrich
LipofectAMINE	: Invitrogen
Methanol	: 和光純薬工業株式会社
NBD-C6 ceramide	: 千葉大学大学院薬学研究院 薬品合成化学 研究室提供
Phenylmethylsulfonyl fluoride	: 和光純薬工業株式会社
Phorbol 12-myristate 13-acetate	: Calbiochem
PLUS reagent	: Invitrogen
PMA	: Sigma-Aldrich
Potassium Chloride	: 和光純薬工業株式会社
PP2	: Calbiochem
PPMP	: Enzo Life Sciences
Sodium orthovanadate	: 和光純薬工業株式会社
Sucrose	: 和光純薬工業株式会社
SDS	: 和光純薬工業株式会社
SU6656	: Calbiochem
Sorafenib	: フナコシ
Streptomycin sulfate	: 明治製菓株式会社
SU6656	: Calbiochem
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol	: 和光純薬工業株式会社

Triton X-100
U0126

: 和光純薬工業株式会社
: Calbiochem

プラスミド

pcDNA4TO-Src : 千葉大学大学院薬学研究院 分子細胞生物学研究室提供
pcDNA4TO vector : 千葉大学大学院薬学研究院 分子細胞生物学研究室提供
pENTR4-H1-shRNA for c-Src : 千葉大学大学院薬学研究院 分子細胞生物学研究室提供
pENTR4-H1-Luciferase : 千葉大学大学院薬学研究院 分子細胞生物学研究室提供
pcDNA3.1-myc-His-CerK : 当研究室にて作成

緒言

スフィンゴ脂質はスフィンゴ塩基を基本骨格にもつ脂質の総称であり、グリセロリン脂質、コレステロールと共に細胞膜を構成する主要脂質成分である。スフィンゴ脂質の一種であるセラミド (ceramide; Cer) は恒常的に生成され、骨格分子として複合スフィンゴ糖脂質やスフィンゴミエリン (sphingomyelin; SM) の合成に利用される。一方で、スフィンゴ脂質は細胞内シグナル伝達分子としても機能する重要な生理活性分子であることが明らかになってきている (Ogretmen and Hannun, 2004; Futerman and Riezman, 2005)。セラミドは、細胞の分化、アポトーシスといった多くの細胞内メカニズムにおいて重要な役割を果たし、疾患との関連も示されている (Ogretmen and Hannun, 2004; Baumruker *et al.*, 2005; Futerman and Riezman, 2005; Hait *et al.*, 2006; Lahiri and Futerman, 2007; Schenck *et al.*, 2007; Zeidan and Hannun, 2007)。セラミドは小胞体において、セリンパルミトイルトランスフェラーゼによる L-セリンとパルミトイル CoA の縮合反応を出発点として *de novo* 合成される (Hait *et al.*, 2006)。合成されたセラミドは、ゴルジ装置へ輸送され、大部分のセラミドは多種類のスフィンゴ脂質の骨格分子としてゴルジ装置で糖鎖やホスホコリン等の極性基が付与され形質膜に配置される。

Cer はグルコース付加によりグルコシルセラミド (glucosylceramide; GlcCer) が、スフィンゴミエリン合成酵素によりスフィンゴミエリン (sphingomyelin; SM) に変換され、生体膜に貯蔵される (Futerman and Riezman, 2005)。細胞内の Cer レベルは、通常状態では一定の水準を保つように制御されている。しかし、外界からの刺激やストレス、例として tumor necrosis factor- α や interleukin-1 β (IL-1 β) といったサイトカイン刺激や、化学療法剤、 γ -線照射などにより、SM 加水分解酵素であるスフィンゴミエリナーゼの活性が上昇する。それによって生体膜の SM の加水分解が亢進し、細胞内 Cer レベルが増加し、細胞の分化、アポトーシス、成長阻害といった反応を引き起こす (Radin, 2003; Taha *et al.*, 2006)。一方で、Cer レベルを負の方向に制御する機構も存在する。Cer は、GlcCer 合成酵素により、UDP-グルコースからグルコース残基を付与され、GlcCer となる。GlcCer は、抗癌剤の多剤耐性に関与する (Gouaze-Anderson and Cabot, 2006; Liu, *et al.* 2008) ほか、ガングリオシドなどのさらに複雑なスフィンゴ糖脂質合成の起点となる。ガングリオシドは、神経系の修復、細胞の分化・増殖、外来物質 (毒素、ウイルスなど) に対する受容体機能などの生理活性を有する。Cer はその特異的キナーゼであるセラミドキナーゼ (ceramide kinase; CERK) によって脂質リン酸化され (Sugiura, *et al.*, 2002)、セラミド-リン酸 (ceramide-1-phosphate; C1P) となる (Pettus *et al.*, 2003; Lamour *et al.*, 2007)。C1P は抗アポトーシス作用を示すことが知られる (Granado *et al.*, 2009) ほか、グループ IV A ホスホリパーゼ A₂ (α -type cytosolic phospholipase A₂ α ; cPLA₂ α) の活性を介したエイコサノイド産生への関与 (Pettus *et al.*, 2003, 2004; Nakamura *et al.*, 2006, 2010) や、マスト細胞の脱顆粒促進 (Kumada *et al.*, 2007) など、炎症・免疫への関与が報告されている。また、Cer は、セ

ラミダーゼ (ceramidase; CDase) により加水分解され、スフィンゴシン (sphingosine; Sph) と遊離脂肪酸を生じる。Sph は、スフィンゴシンキナーゼと呼ばれる脂質キナーゼによって脂質リン酸化を受け、スフィンゴシン-1-リン酸 (sphingosine-1-phosphate; S1P) となる。Sph には Cer と同様に、細胞成長阻害やアポトーシス促進作用があるが、S1P は逆に、成長促進、抗アポトーシス作用をもつ (Maceyka, 2002)。以上のような Cer を中心とするスフィンゴ脂質代謝経路はそれぞれの反応を担う酵素によって複雑に制御されている (Fig. 1)。

CDase は細胞内のスフィンゴ脂質蓄積を抑える役割を担う他、S1P を増加させる事で細胞内シグナルを調節する働きを持つ。前立腺癌細胞において酸性 CDase の活性が抗癌剤や放射線照射によるアポトーシス誘導に対して Cer を分解する事で拮抗的に働くこと (Mahdy *et al.*, 2009) や、ヒト子宮頸癌細胞においてアルカリ性 CDase が S1P 産生を促す事で飢餓状態による細胞死を抑制すること (Xu *et al.*, 2006) などが報告されており、CDase は疾病に対する医学的アプローチの奏功を左右する一因子となりうるものとして注目されつつある。しかし現時点における本酵素の研究はあまり進んでおらず、活性制御メカニズムの多くは明らかとなっていない。

本研究では、蛍光色素 (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole; NBD) 標識 Cer (Fig. 2) を用いて、その代謝物を薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography; TLC) により、分離・検出する方法を確立し、この方法を用いてセラミド代謝酵素の新たな活性制御機構の解明を試みた。第 1 章では、CDase、CERK の活性化シグナルにチロシンリン酸化が関与することを示した。第 2 章では、heat shock protein (HSP) 90 阻害剤である geldanamycin (GA) 及びそのアナログのセラミド代謝、細胞障害性に及ぼす効果について検討を行った。第 3 章において、CDase、CERK の活性化シグナルに関してより詳細な検討を行い、CDase のうちアルカリ性 CDase と、CERK の活性化上流に cSrc が存在することを示した。

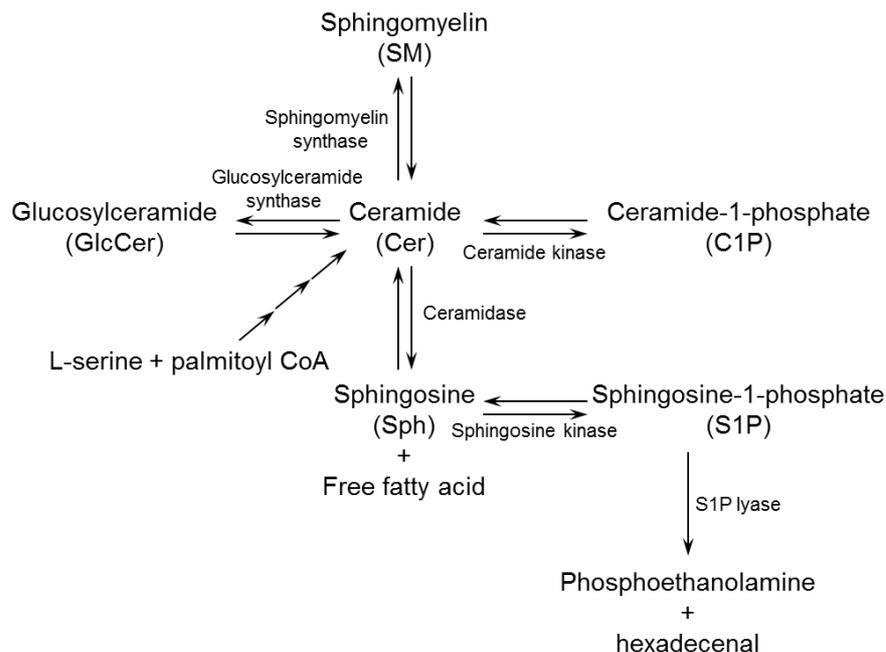
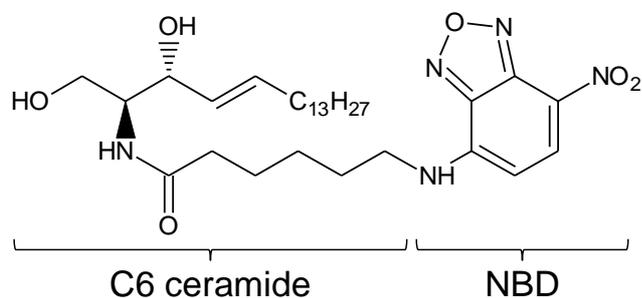


Fig.1. Metabolic pathway of sphingolipids.

(A)



(B)

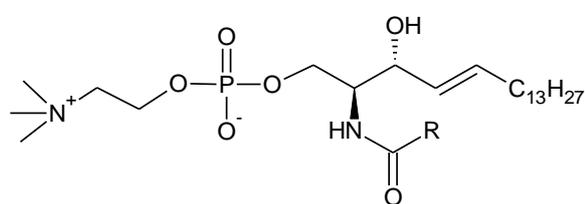
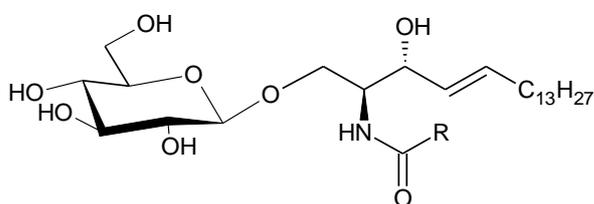
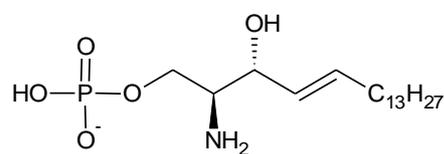
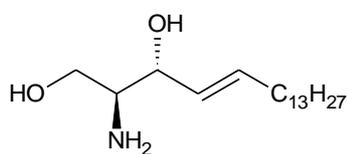
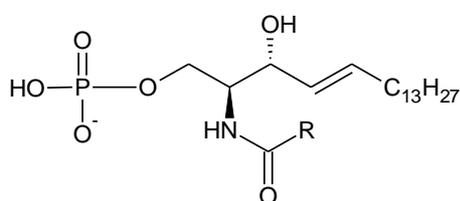
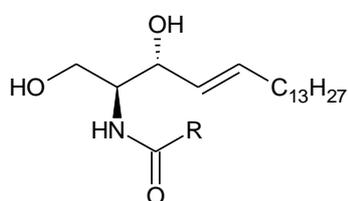


Fig. 2. Structures of NBD-C6-Cer (A) and sphingolipids (B).

NBD-C6-Cer contains NBD (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole) as a fluorochrome and Cer which has six-carbon fatty acid.

実験方法

1. 細胞培養

ヒト肺腺癌上皮細胞株 A549 細胞、ヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLa 細胞および HeLa-Lyn Δ C-HA 細胞は 10 % fetal bovine serum (FBS) および 100 U/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin を含む Dullbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) を用いて、95 % air – 5 % CO₂、37°C の条件下で培養した。CHO-W11A (チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株 CHO-K1 の PAF 受容体過剰発現変異株) は、10 % FBS および 100 U/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin を含む Ham's F-12 を用いて、95 % air – 5 % CO₂、37°C の条件下で培養した。ラット副腎髄質由来褐色細胞腫細胞株 PC12 細胞は、コラーゲンコートディッシュ (Type IV collagen、BD Biosciences) に播種し、10 % FBS および 100 U/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin を含む DMEM を用いて、95 % air – 5 % CO₂、37°C の条件下で培養した。

2. 細胞への遺伝子導入

細胞を播種し、24 時間後に LipofectAMINE PLUS Reagent (Invitrogen) を用い、ベクターを添加後 3 時間 37°C にてインキュベートした。遺伝子導入後 48 時間培養を行い、アッセイに用いた。

3. 細胞におけるスフィンゴ脂質代謝活性測定

12 well plate (Nunc) に播種した細胞を 0.1 % bovine serum albumin (BSA)、10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) pH 7.4 を含む Hank's balanced salt solution (HBSS) で 2 回洗浄し、NBD-Cer (10 μ M) を含む HBSS を 150 μ L 添加し、37°C で 30 分間処置して細胞内に導入させた。処置後、HBSS で 2 回洗浄して細胞に入っていない NBD-Cer を除去した後、HBSS 300 μ L にて 37°C でインキュベートして細胞内の NBD-Cer を代謝させた。NBD-Cer を一定時間代謝させた後、cell scraper により細胞を懸濁させ回収した。脂質抽出には Bligh & Dyer 法 (Bligh and Dyer, 1959) を用いた。回収液のうち 200 μ L を、chloroform : methanol = 1 : 2 の混合液 750 μ L を加えて混合し膜脂質を溶解させた。氷上で静置後、chloroform 250 μ L、水 250 μ L を加えて十分にボルテックスすることでサンプル中の NBD-スフィンゴ脂質を水相と有機相で分配平衡に至らせ、その後 4,000 rpm、4°C で 10 分間遠心して水相と有機相に完全に分離し、水相と有機相それぞれを採取した。採取した水相および有機相をそれぞれ TLC plate Silica Gel 60 (Merck) に

20~40 μL アプライし、風乾後に 1-butanol : acetic acid : water = 3 : 1 : 1 (v/v) にて展開した。展開後のプレートを風乾した後、展開したプレートの未使用部に 0.125~4 pmol の NBD-Cer を外部標準としてスポットし、NBD-スフィンゴ脂質の蛍光および外部標準を LAS-1000 (FujiFilm) にて青色 LED (波長: 470 nm) にて励起させ検出した。検出画像の定量的解析は ImageJ (National Institutes of Health) を用いて行った。

4. in vitro CDase assay

6 cm dish (Nunk) に播種した細胞を、氷上で phosphate buffered saline (PBS) にて 2 回洗浄し、200 μL lysis buffer [25 mM Tris-HCl, 2 mM ethyleneglycol tetraacetic acid, 40 mM KCl, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride] 中で細胞を cell scraper にて懸濁させ回収し、氷上にて超音波破碎処理を 5 秒 \times 7 回 (10 秒インターバル / 回) 行う事で whole cell lysate を作成した。この whole cell lysate 50 μL を reaction buffer [30 μM NBD-Cer, 125 mM sucrose, 5 % glycerol, 0.01 % BSA に加え pH 緩衝剤として、125 mM acetate buffer (pH 4.5)、25 mM Tris-HCl (pH 7.2)、25 mM Tris-NaOH (pH 8.8) のいずれかを含む。濃度は whole cell lysate を混合した後の最終濃度] 150 μL と混合し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、全量 (200 μL) に chloroform : methanol = 1 : 2 の混合液 750 μL を加えて混合し膜脂質を溶解させた。氷上で静置後、chloroform 250 μL 、水 250 μL 、5 N NaOH 10 μL 程度を加えて pH を 10 程度にし (NBD-脂肪酸は二相分配系の pH が 7.2 を下回ると分配平衡が有機相側に偏るため)、十分にボルテックスし、4,000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間遠心して水相と有機相に完全に分離した。水相に含まれる NBD-脂肪酸を有機相に抽出するために、得られた水相 500 μL に chloroform : methanol = 86 : 14 の混合液 (有機相の成分比率を模したもの) 264 μL を加え、さらに 5 N HCl を 10 μL 程度添加し pH を 4 程度にしたものを混和し、再度二相分配を行った (この条件で NBD-脂肪酸はほぼ 100 % 有機相に移行する事を確認している)。採取した有機相を TLC plate Silica Gel 60 に 50 μL アプライし、風乾後に chloroform : methanol : 25 % ammonia solution = 7 : 4 : 1 (v/v) にて展開した。展開後のプレートを風乾した後、展開したプレートの未使用部に 0.125~4 pmol の NBD-Cer を外部標準としてスポットし、NBD-スフィンゴ脂質の蛍光および外部標準を LAS-1000 にて青色 LED (波長: 470 nm) にて励起させ検出した。検出画像の定量的解析は ImageJ を用いて行った。

5. Western Blotting

5-1. サンプル調製

6 cm dish に 3×10^5 cells/well となるように細胞を播種した。24 時間後、LipofectAMINE PLUS Reagent (Invitrogen) を用い、ベクターを添加後 3 時間 37 $^{\circ}\text{C}$ にてインキュベートした。

遺伝子導入後 48 時間培養し、RIPA lysis buffer [150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1 % Nonidet P-40, 0.5 % sodium deoxycholate, 10 mM NaF, 10 mM disodium pyrophosphate, 0.1 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/mL of leupeptin, 10 µg/mL of aprotinin, 1 mM Na₃VO₄ を含む] を用い cell scraper により回収した。回収した懸濁液をローテーターで 4°C にて 20 分間混和した後、4°C、15,000 rpm にて 20 分間遠心し、上清をサンプルとした。アプライ用サンプルは Bradford 法によりタンパク量を 30~50 µg に調製し、laemmli buffer を加えて調製した。

5-2. SDS-polyacrylamidegel electrophoresis / 転写 / 検出

サンプルを 5 分間煮沸後、SDS-polyacrylamidegel electrophoresis (4 % stacking gel / 10 % running gel / 定電圧 80 V) を行い、polyvinylidene fluoride 膜 (Bio-Rad) に転写 (定電流 0.1 mA) した後、4°Cで一晩ブロッキングした。一次抗体を室温で 2 時間反応させ、tris buffered saline with Tween 20 (Tris-HCl 40 mM, NaCl 145 mM, pH 7.4, Tween 20 0.1 %を含む) で 5 分間、2 回洗浄した後、horseradish peroxidase 標識された二次抗体を室温で 1~2 時間反応させ、tris buffered saline with Tween 20 (Tween 20 0.1%を含む) で 5 分間、2 回洗浄した。抗 cSrc 抗体 (Oncogene Reserch Products)、抗リン酸化チロシン抗体 (千葉大学大学院薬学研究院 分子細胞生物学研究室提供)、抗β-tubulin 抗体 (Sigma-Aldrich) を一次プローブ、horseradish peroxidase 標識抗マウス抗体 (GE healthcare) を二次プローブとし、Enhanced chemiluminescence kit (supersignal west pico chemiluminescent substrate; Thermo Scientific) を用い、化学発光を LAS1000 を用いて検出した。

6. [³H]- arachidonic acid (AA) 遊離測定

24 well plate に細胞を 2×10^4 cells/well となるように播種し、翌日に [³H]-AA を DMEM (0.1 % BSA を含む) に添加し、0.033 µCi/well となるよう加え 16 時間ラベルした。PBS (0.1 % BSA を含む) 0.75 mL で 2 回洗浄後に DMEM (0.1 % BSA, 10 mM HEPES、阻害剤を含む) 300 µL/well で前処理し、続いて DMEM (0.1 % BSA, 10 mM HEPES、阻害剤 / アゴニストを含む) 300 µL/well で 30 分間刺激した。上清 200 µL をとり遠心 (8,000 rpm、2 min) 後、その上清 150 µL をバイアルに移し、発光試薬 [2,5-diphenyloxazole、1,4-bis-(5-phenyl-2-oxazolyl)benzene を含む] を加え、³H の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した (count A)。また、上清回収後のプレートに SDS (2 %) を 100 µL 加えて 170 rpm、15 分間の振とうによる溶解後にピペッティングではがし、そのうち 50 µL に含まれる ³H の放射活性を測定した (count B)。得られた値から、次式により切り出された AA を算出した。

$$\begin{aligned} \text{AA release (\% of total)} &= (\text{上清に遊離した放射活性} / \text{取り込まれた放射活性}) \times 100 \\ &= \{(\text{count A} \times 300 / 150) / (\text{count A} \times 200 / 150 + \text{count B} \times 200 / 50)\} \times 100 \end{aligned}$$

7. lactate dehydrogenase (LDH) 漏洩測定

LDH 漏洩の測定は cytotoxicity detection kit (Roche) を用いて行った。薬物刺激後、24 well plate の培養上清 200 μL を回収、遠心 (4 $^{\circ}\text{C}$ 、8000 g、3 分間) し、その上清を培養液画分とした。24 well plate 上に残った細胞には 0.2 % Triton X-100-HBSS を 500 μL 加えて溶解液画分とした。両画分とも HBSS にて 4 倍に希釈し、その 100 μL と Reaction Mixture 100 μL を 96 well plate に加えて 25 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間、遮光下にてインキュベートした。1 M HCl 50 μL を加えて反応を停止させた後、マイクロプレートリーダーを用いて OD₄₉₂ nm を測定した。この時、background control (0.1 % BSA を含む DMEM、0.2 % Triton X-100-HBSS) の吸光度も同様に測定し、各画分中の LDH 活性を補正した。得られた補正值から次式により漏洩した LDH の割合を算出し、細胞障害性の指標とした。

$$\text{LDH 漏洩 (\%)} = \text{上清中の LDH} / (\text{上清中の LDH} + \text{細胞内の LDH}) \times 100$$

第 1 章 TLC 法を用いたセラミド代謝物の検出法の確立

- vanadate によるチロシンリン酸化経路を介したセラミダーゼ、セラミドキナーゼの活性化

1. 序論

Cer とその代謝物は細胞内で重要な生理作用を示す (Gómez-Muñoz, 2006; Kitatani *et al.*, 2008; Hannun and Obeid, 2008)。Cer とその代謝物は炎症に関与することが知られ、例として cPLA₂α の活性化を介したアラキドン酸の放出や、シクロオキシゲナーゼ 2 の誘導を引き起こすことが報告されている (Mitsutake *et al.*, 2004; Chalfant and Spiegel, 2005; Nakamura *et al.*, 2006, 2010)。Cer は 4 種の代謝酵素により代謝される。CERK により C1P が産生され、CDase により遊離脂肪酸と Sph が産生され、Sph はスフィンゴシンキナーゼにより S1P となる。スフィンゴミエリンシターゼにより SM が、グルコシルセラミドシターゼにより GlcCer が産生される。Cer 関連物質の細胞内レベルはこれらの酵素により厳密にコントロールされている。Cer 代謝酵素の活性を定量するためにいくつかの方法が用いられており、よく用いられる手法の一つとして高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography; HPLC) が挙げられ、蛍光標識 (Hayashi *et al.*, 2005) や定量的 mass 解析 (Mano *et al.*, 1997; Yoo *et al.*, 2006) などによる検出が行われている。HPLC は高感度で特異性の高い分離が可能であるが、移動相に対する親油性・溶解性が大きく異なる代謝物を同時に測定できないこと、機器・カラムが高価であることなどの短所がある。検出方法として TLC 法もよく利用されている。TLC は安価で簡便な手法であり、幅広く用いられている。TLC において ¹⁴C などで放射性標識された基質を用いて検出を行う場合がある (Sugiura *et al.*, 2002; Graf *et al.*, 2007, 2008; Boath *et al.*, 2008)。この検出方法は高感度であるが、基質が高価である点や検出手順が複雑であるという点、人体や環境への安全面への問題性などの欠点がある。近年では、さらに簡便な手法として蛍光標識された基質を用いその物質、またはその代謝物の蛍光を検出する方法が用いられるようになってきた (Hayashi *et al.*, 2005; Graf *et al.*, 2007, 2008; Boath *et al.*, 2008; Don and Rosen, 2008)。検出・定量の簡便性・安全性、安価さが利点といえる。本研究では、Cer 代謝を測定するために蛍光基である NBD で標識した炭素鎖 6 の Cer (NBD-C6-Cer; NBD-Cer) を用い、TLC 法を用いて検出を行った。今回用いた TLC 法を用いて Cer 代謝物を検出することで、4 つの主要な Cer 代謝酵素の活性を同時に測定することが可能である。

タンパク質のチロシン残基リン酸化を介したシグナルによって、様々な細胞内生理作用が制御されている。Orthovanadate (Na₃VO₄; vanadate) は、チロシン脱リン酸化酵素の阻害剤である (Huyer *et al.*, 1997; Bhattacharyya and Tracey, 2001; Taniguchi *et al.*, 2007)。バナジウム化合物は糖尿病などの疾患に効果があることが示唆されている (Sakurai, 2002; Heneberg, 2009; Thompson *et al.*, 2009)。Vanadate により、ラット肝細胞における CDase の活性を上昇させるという報告 (Nikolova-Karakashian *et*

al.,1997) があるが、CERK や他の Cer 代謝酵素に対する vanadate の効果は明らかとなっていなかった。我々は既存の TLC 法を改良し、ヒト肺癌細胞株 A549 細胞およびチャイニーズハムスター卵巣細胞株 CHO 細胞において、vanadate 処理によって CDase による NBD-Cer 代謝物である炭素鎖 6 の NBD-遊離脂肪酸 (NBD-caproic acid; NBD-cap)、CERK による NBD-Cer 代謝物である NBD-C1P の産生量がそれぞれ亢進することを示した。Vanadate による NBD-C1P 産生亢進は、human CERK (hCERK) の過剰発現によって亢進し、チロシンキナーゼ阻害剤 herbimycin、genistein によって抑制された。また、A549 細胞において、vanadate による NBD-cap の産生量は、genistein によって顕著に抑制された。

2. 結果

2-1. CDase による Cer 代謝物、NBD-cap の検出

本研究で用いた NBD-Cer は CDase により、NBD-cap と NBD で標識されていない Sph に分解される。Silica60 プレートを用いた TLC 法により、NBD-C1P、NBD-SM といった NBD 修飾化合物として NBD-cap を検出した。以前報告されている (Meyuhas *et al.*, 1992; Destandau *et al.*, 2005) ように、NBD-Cer は有機相にのみ移行するが、NBD-cap の 95 % は水相へ移行した (Fig. 3A)。NBD-Cer と NBD-cap はともに Rf 値が約 0.9 と近似しているが、この 2 つの化合物は溶解性の違いから有機相と水相を分離して検出することで区別することができる。次に、我々はヒト肺癌細胞株 A549 細胞を 10 μ M の NBD-Cer で処置した際の NBD-化合物を検出した (Fig. 3B、Table 1)。抽出した脂質は二層分配を行い、有機相、水相に分離した後、それぞれから TLC 法により Cer 代謝物を検出した。有機相、水相にはそれぞれ Rf 値の異なる主要な 3 種のスポットが確認された。NBD-cap、NBD-C1P を含むそれぞれの NBD-化合物のスポットは、以前の報告による Rf 値および後述する hCERK ベクターの細胞への導入、各種阻害剤の使用などによる薬理学的手法を用いて同定した。細胞から抽出した NBD-cap の Rf 値は NBD-cap の標品の Rf 値と一致した。無刺激の A549 細胞に NBD-Cer を取り込ませ代謝させた際、NBD-GlcCer、NBD-SM、NBD-SM、NBD-cap の産生量は時間依存的に増加し、60 分後には 30 分後の産生量の約 2 倍となった。しかし、代謝 60 分後までの NBD-C1P の産生量は検出限界以下、もしくは非常に少量であった (Exp. I in Table 1)。NBD-SM、NBD-GlcCer は、今回我々が行った結果においては、二層分配前に抽出・検出した総量の 95 % 以上がそれぞれ有機相へ移行した。次に、我々は A549 細胞を NBD-Cer で 30 分間ラベルし、Cer を含まないバッファーで洗浄後、Cer 代謝について検討した (Fig. 3C、Exp. II in Table 1)。この結果、NBD-Cer でラベルした A549 細胞では、時間依存的に NBD-Cer の量が減少し、NBD-GlcCer、NBD-SM が増加した (Fig. 3C、Organic phase)。30 分間のラベル時間中に、NBD-cap は産生されている (約 20 pmol/well、Exp.

I in Table 1) が、ラベル後に洗浄した直後の細胞ではほとんど検出されなかった (Fig. 3C, 0 h, Aqueous phase)。これはラベル中の 30 分間に生成された NBD-cap は細胞外に放出され、洗浄により取り除かれたためであると考えられる。ラベル後の細胞では NBD-cap が時間依存的に産生されているが、NBD-C1P の産生は非常に少量であった。

2-2. vanadate の A549 細胞、CHO 細胞における Cer 代謝に対する効果

我々は、A549 細胞の Cer 代謝に対して変化を引き起こす試薬を探索した。10 mM の vanadate 処理によって、刺激後 1 時間、2 時間での NBD-C1P の産生量が増加し、NBD-cap についても刺激後 2 時間で増加がみられた (Fig. 3C)。vanadate 刺激後 2 時間の時点で NBD-cap と NBD-C1P の産生が大きく上昇し、NBD-SM の産生が抑制された (Exp. II in Table1)。我々の行った条件では、以前の報告 (Boath *et al.*, 2008; Don and Rosen, 2008) と同様、約 80 % の NBD-C1P が水相へ移行した。Vanadate は NBD-Cer と NBD-GlcCer の量には大きな変化を与えなかった。vanadate による NBD-cap、NBD-C1P の産生亢進は vanadate の濃度に依存していた。Vanadate を 5 mM、2 mM 用いた際の NBD-C1P の産生量は、10 mM で用いた場合と比較してそれぞれ 65 %、11 %であった。Vanadate 処理後 30 分後、60 分後の NBD-C1P 量はそれぞれ 6.2 ± 2.0 pmol/well ($n = 5$)、 8.7 ± 1.5 pmol/well ($n = 3$) であったが、vanadate を用いない場合は 30 分後、60 分後ともほとんど検出することができなかった (Fig. 3B)。また、60 分間 NBD-Cer を代謝させた場合の NBD-cap の産生量は無刺激では 55.7 pmol/well、vanadate 処理群では 72.2 pmol/well であった。以上の結果より、A549 細胞を vanadate で処理した際に NBD-C1P、NBD-cap の産生量が亢進することが示された。100 nM 4 β -phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、0.5 mM H₂O₂、100 ng/mL epidermal growth factor (EGF)、およびこれらの薬物の併用によって NBD-Cer の代謝に大きな変化はみられなかった (data not shown)。次に、我々は他の細胞種における Cer 代謝に対する vanadate の影響について調べた (Fig. 4)。A549 細胞と同様に、NBD-Cer で標識した CHO 細胞において、NBD-GlcCer、NBD-SM、NBD-cap の産生量が時間依存的に増加した (Fig. 4A)。10 mM の vanadate で処理した場合、処置後 2 時間において NBD-cap の産生量が大幅に上昇した。NBD-cap の産生量は処置後 1 時間の時点では有意な産生量増加はみられなかった (Fig. 4B)。一方、vanadate 処理によって NBD-C1P の産生量は 1 時間以内に顕著な増加を示した (Fig. 4A, Aqueous phase)。control 群での NBD-C1P 産生量が僅かであったため、vanadate 処置後 1 時間での NBD-C1P 産生量を 100 %として定量値をまとめた (Fig. 4C)。NBD-Cer を 1 時間代謝させた際、無刺激群の NBD-C1P の産生量は 10 ± 5.4 %、代謝 2 時間後の vanadate 処理群では 83.8 ± 5.4 %であった。Vanadate による NBD-C1P 産生の亢進は、刺激開始後 10~20 分間で引き起こされ、1 時間後に最大となった (Fig. 4D)。刺激後 15 分間、30 分間における NBD-C1P の産生量はそれぞれ 68.0 ± 17.6 % ($n = 3$)、 $88.6 \pm$

6.9 % (n = 4) であった。Fig. 4A で示されたように、vanadate 刺激が無い場合は代謝後 1 時間以内での NBD-C1P 産生量は僅かであった。D-erythro-MAPP は中性/アルカリ性 CDase の阻害剤である (Bielawska *et al.*, 1996, Delgado *et al.*, 2006)。30 μ M の D-erythro-MAPP を処置することで、vanadate による NBD-cap の産生亢進は 50 % 程度抑制された (Fig. 4E)。D-erythro-MAPP 処置により、2 時間後に NBD-SM の産生量が無処置群の 126 ± 6 % に増加した ($P < 0.05$) が、NBD-Cer、NBD-GlcCer、NBD-C1P の産生量には有意な影響を与えなかった。D-erythro-MAPP 処置群において vanadate を併用しても、NBD-GlcCer、NBD-Cer レベルに影響を与えなかった。GlcCer 合成酵素阻害剤である PPMP を処置すると、代謝 2 時間後における NBD-GlcCer の産生はほぼ完全に消失し (Fig. 4F)、control 群の 10.5 ± 1.1 % となった (n = 3、 $P < 0.05$)。PPMP 処理により、NBD-SM の産生量が vanadate 無処置の control 群の 1.2~1.4 倍に増加した。PPMP 処理群において、10 mM の vanadate を併用すると NBD-cap、NBD-C1P の産生量がそれぞれ vanadate 無処置群の 1.7 倍、3~4 倍に増加した。A549 細胞と同様、vanadate 処理群では代謝後 2 時間の時点で NBD-SM の産生が減少する傾向がみられた。

2-3. hCERK を過剰発現させた CHO 細胞における Cer 代謝

以前我々は、hCERK ベクターを導入した CHO 細胞 (hCERK-CHO 細胞) では、hCERK がタンパク質レベルで効率良く発現し、C1P レベルが上昇することを示した (Shimizu *et al.*, 2009)。hCERK-CHO 細胞では、NBD-Cer で 30 分間ラベルした細胞中から NBD-C1P が検出でき、その後細胞を 2 時間インキュベーションすると大幅な C1P 産生亢進がみられた (Table 2)。hCERK-CHO 細胞では、30 分間の NBD-Cer のラベル直後では control 細胞と比較して NBD-GlcCer と NBD-SM レベルが有意に低下していたが、2 時間インキュベーションを行うとラベル終了直後の 2~3 倍となった。これは control 細胞と同様な上昇幅である (Table 2)。また、NBD-cap レベルは hCERK-CHO 細胞では control 細胞と比較して大幅に低下した。hCERK の過剰発現により、vanadate による NBD-C1P 産生は増強された (2 hr, Figs. 5A, B)。hCERK-CHO 細胞に vanadate 処理を行った際の他の代謝物産生レベルの変化を Fig. 5C に示した。NBD-GlcCer レベルは vanadate 処理が無い場合の 55.0 ± 5.1 % となり、control vector 導入細胞と比較して大幅に減少した ($P < 0.05$)。NBD-SM については control CHO 細胞と同様に vanadate 処理により減少傾向がみられ、減少幅は control vector 導入細胞と比較して大きい傾向がみられた。一方、vanadate による NBD-cap 産生亢進作用は、hCERK 導入による影響を受けなかった。vanadate により NBD-cap の産生量は control 細胞では 136 ± 14 % ($P < 0.05$) となり、hCERK-CHO 細胞では vanadate により 139 ± 7 % ($P < 0.05$) となった。基質である NBD-Cer の減少幅については hCERK の導入による影響を受けなかった。CERK は Ca^{2+} -カルモジュリンにより活性化されることが様々な細胞種において示

唆されている (Sugiura *et al.*, 2002; Mitsutake *et al.*, 2005; Shimizu *et al.*, 2009)。vanadate は細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度を増加させることが複数の細胞種において報告されている (Törnquist *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998) が、本研究において A549 細胞では Ca^{2+} 濃度の上昇はみられなかった。これは以前当研究室で報告されたマウス線維芽細胞 L929 細胞での結果 (Taniguchi *et al.*, 2007) と一致する。hCERK 導入細胞のホモジネートを用いて Ca^{2+} 、NBD-Cer 存在条件下で反応を行った際、vanadate により CERK の活性が上昇するという結果も得られている (data not shown)。

2-4. vanadate による Cer 代謝変化におけるチロシンキナーゼの関与

以前我々は、vanadate により引き起こされる反応が細胞内のチロシンキナーゼ活性化を介していることを示した (Taniguchi *et al.*, 2007)。そこで 2 種のチロシンキナーゼ阻害剤、herbimycin と genistein の効果について検討した。A549 細胞において、10 μM または 20 μM の herbimycin 処理によって、vanadate による NBD-C1P 産生は 70 % 以上抑制され、20 μM genistein によっても顕著ではないが有意な抑制効果がみられた (Fig. 6A, B)。阻害剤処置群においては vanadate による NBD-SM 産生抑制は引き起こされなかった (data not shown)。興味深いことに、vanadate による NBD-cap 産生亢進は genistein 処理で有意に抑制されたが、herbimycin では有意な抑制効果を示さなかった (Fig. 6C)。同様の結果が CHO 細胞においても得られている。Vanadate による NBD-C1P 産生亢進は、herbimycin 処理によって control 細胞の 25 % 程度にまで減少し、NBD-cap については herbimycin ではなく genistein により部分的な (30 % 程度) 阻害効果がみられた。Vanadate による NBD-C1P と NBD-cap の産生は、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 阻害剤である U0126 処理によって抑制された (data not shown)。A549 細胞、CHO 細胞において、10 μM NBD-Cer、10 mM vanadate、および D-erythro-MAPP、PPMP、herbimycin といった各種阻害剤によって、少なくとも処置後 4 時間では毒性は示されなかった。薬物処理を行ったディッシュに接着していた細胞数は、無処理の場合の 95~105 % であった。

2-5. *in vitro* における vanadate 処理による CDase 活性の亢進

次に、我々は cell-free の *in vitro* 条件において vanadate 処理をした場合の CDase 活性について検討を行った。本研究ではマウス脳由来の粗細胞質画分を用いた。これは脳由来細胞質画分のほうが A549 細胞よりも高い CDase 活性を示したためである。10 mM の vanadate を反応液中に添加すると、反応液の pH に関わらず CDase 活性は大きく上昇した (Fig. 7)。反応液中に genistein を添加することで、vanadate の有無に関わらず CDase 活性は抑制された (data not shown)。

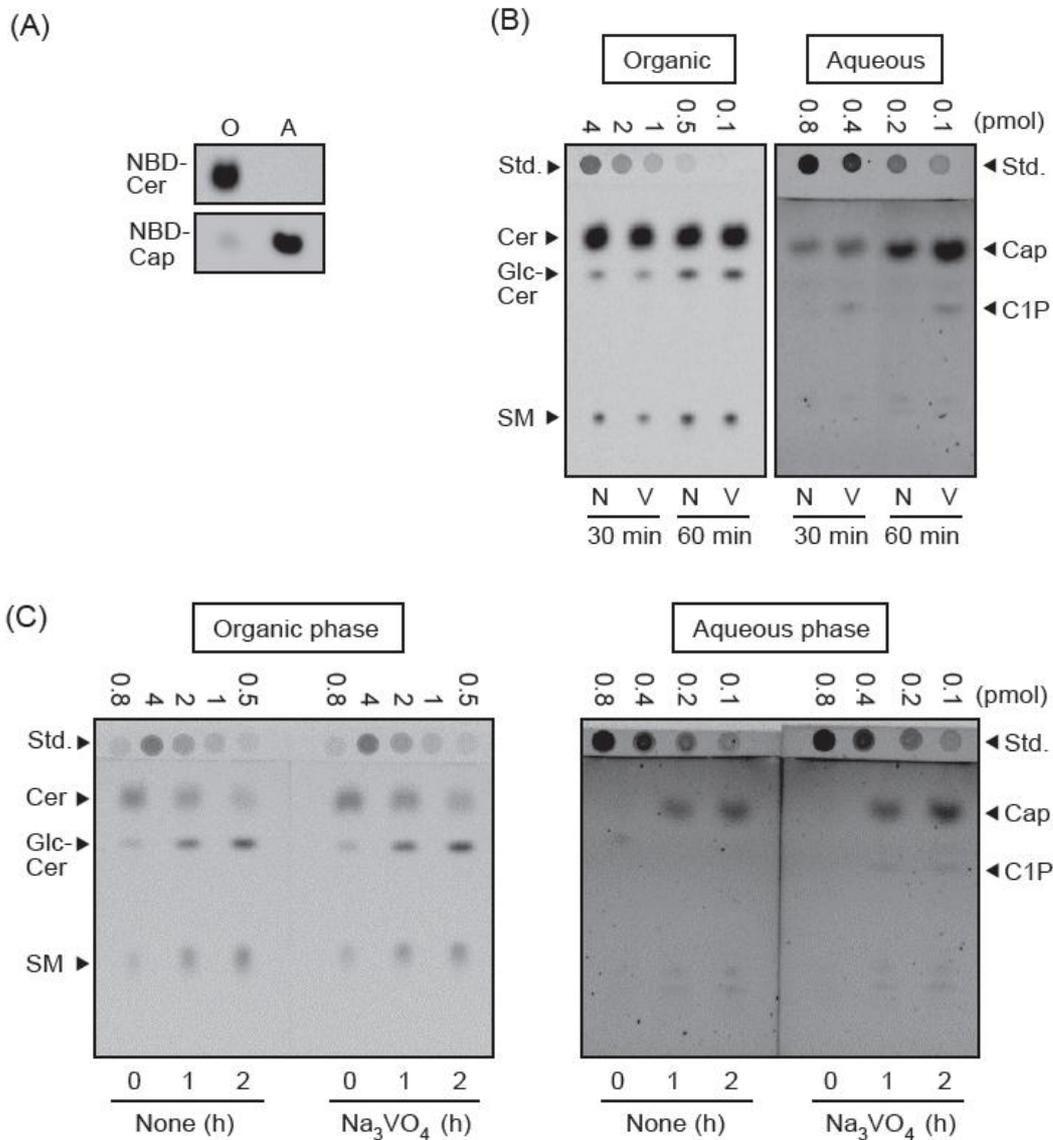


Fig. 3. Separation of NBD-Cer metabolites by TLC and Na_3VO_4 -induced formation of NBD-cap and NBD-C1P in A549 cells. In panel A, solutions containing NBD-Cer and NBD-cap were divided into organic and aqueous phases and analyzed by TLC. In panel B, A549 cells were treated with $10 \mu\text{M}$ NBD-Cer for 30 and 60 min in the presence of vehicle (none, N) or 10 mM Na_3VO_4 (vanadate, V). Then, the lipids both in the cells and the buffer were extracted and divided into organic and aqueous phases. The lipids in both phases were analyzed separately. For quantitative analyses, indicated amounts of standard NBD-Cer were spotted on the upper area in the plate after the separation with TLC. In panel C, A549 cells were labeled with $10 \mu\text{M}$ NBD-Cer for 30 min, and then the washed cells were incubated with Cer-free buffer for 1 and 2 hr in the presence and absence of 10 mM Na_3VO_4 . The data are from a typical experiment. The quantitative data are shown in Table 1.

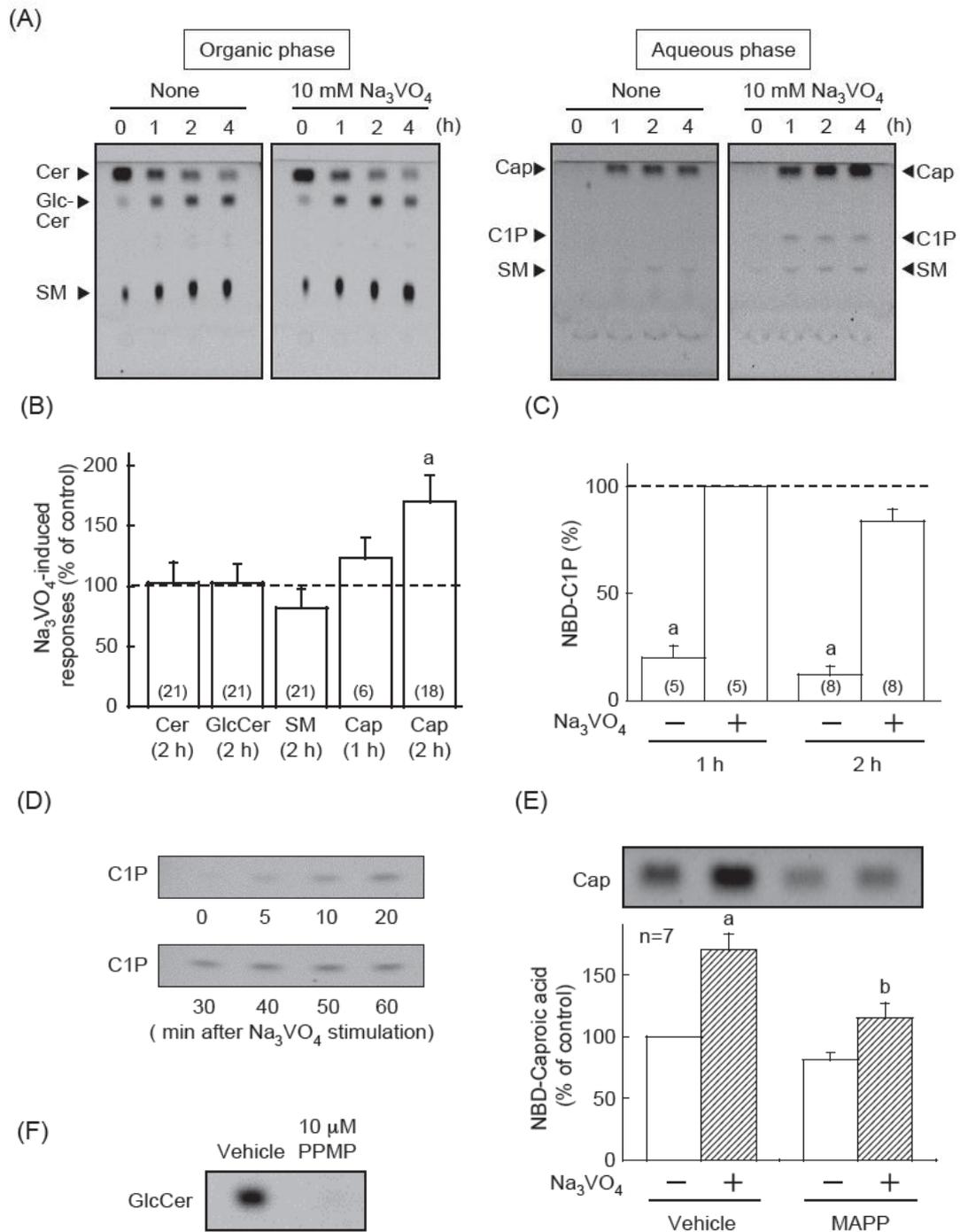


Fig. 4. Na₃VO₄-induced formation of NBD-cap and NBD-C1P in CHO cells. In panel A, CHO cells were labeled with 10 μM NBD-Cer for 30 min, and the washed cells were stimulated with 10 mM Na₃VO₄ for the indicated periods. The extracted lipids were divided into organic and aqueous phases and analyzed by TLC. The quantitative data are shown in panels B and C and are means ± S.D. for the indicated number (n) of independent experiments. The data in panel B were expressed as a percentage of each metabolite without Na₃VO₄ treatment as the control (100 %). ^aP < 0.05, significantly different from the control value. The amounts of NBD-C1P in panel C were expressed as a percentage of the value at 1 hr after Na₃VO₄ treatment, since the amount in the control cells was limited. ^aP < 0.05, significantly different from the value with Na₃VO₄. In panel D, the labeled CHO cells were stimulated with 10 mM Na₃VO₄ for the indicated periods, and the amount of NBD-C1P was examined. In panel E, cells were labeled with NBD-Cer with and without 30 μM MAPP for 30 min, and then the washed cells were stimulated with 10 mM Na₃VO₄ for 2 hr with and without MAPP. The upper panel shows a typical experiment. The quantitative results are shown in the lower panel and are expressed as a percentage of the value at 2 hr in the control cells. The data are means ± S.D. for 7 independent experiments. ^aP < 0.05, significantly different from the value without Na₃VO₄. ^bP < 0.05, significantly different from the value without MAPP. In panel F, cells were labeled with NBD-Cer with and without 10 μM PPMP for 30 min, and then the washed cells were incubated with and without PPMP for 2 hr. The represented picture is from a typical experiment.

Table 1. NBD-Cer metabolism and Na₃VO₄-induced changes in A549 cells.

Exp. I. Intra- and extra-cellular metabolites (pmol/well, n = 3 – 5)		
	30 min	60 min
NBD-Cer	760 – 1420 [3,000 pmol]	1050 – 1290 [3,000 pmol]
NBD-GlcCer	50.8 – 67.4	118 – 143
NBD-SM	45.4 – 78.3	102 – 149
NBD-cap	14.3 – 25.7	40.6 – 55.8
NBD-C1P	0 – 2.3	1.8 – 2.1
Exp. II. Metabolites at 2 hr after stimulation (% of control, n = 4)		
	Vehicle	10 mM Na ₃ VO ₄
NBD-Cer	100 (33 – 60)	104 ± 12 (29 – 71)
NBD-GlcCer	100 (48 – 123)	97.3 ± 11.8 (53 – 146)
NBD-SM	100 (44 – 88)	71.0 ± 8.1 ^a (33 – 72)
NBD-cap	100 (7.0 – 24)	161 ± 16 ^a (10 – 33)
NBD-C1P	5 ± 2 ^a (0 – 1.2)	100 (1.1 – 3.2)

In Exp. I, A549 cells were incubated with 10 µM NBD-Cer (3,000 pmol/well) for 30 and 60 min, and then the lipids both in the cells and in the buffer were extracted. Although the calculated sum of the indicated metabolites was 1,000 – 1,600 pmol, the amount of NBD-Cer on TLC plates was likely to be underestimated since it was much greater than the standard used. In Exp. II, A549 cells were labeled with 10 µM NBD-Cer for 30 min, and the washed cells were incubated with or without 10 mM Na₃VO₄ for 2 hr. The data were expressed as percentages of the control. The data for C1P were expressed as a percentage of the value with Na₃VO₄ since the basal amount of C1P was much less. The absolute values (pmol/well) are shown in parentheses. Data are means ± S.D. for the indicated number of independent experiments. ^a*P* < 0.05, significantly different from the control value without Na₃VO₄ (NBD-SM and NBD-caproic acid) or the value with Na₃VO₄ (NBD-C1P).

Table 2. NBD-Cer metabolism in hCERK-CHO cells.

Transfection	Control vector		Vector for hCERK	
	0 hr	After 2 hr	0 hr	After 2 hr
NBD-Cer	100 %	35.7 ± 4.7	95.0 ± 7.0	57.5 ± 10.2
NBD-GlcCer	100 %	269 ± 5	56.9 ± 18.9 ^a	115 ± 35 (204 ± 15)
NBD-SM	100 %	251 ± 14	41.8 ± 11.1 ^a	116 ± 45 (273 ± 33)
NBD-cap	0	100 %	0	62.4 ± 12.1 ^a
NBD-C1P	Not detected		100 %	200 – 350

CHO cells were transfected with the control vector or the vector for hCERK. The cells were labeled with 10 µM NBD-Cer for 30 min, and lipids were extracted from the washed cells (0 hr). In some experiments, the cells were further incubated for 2 hr before the extraction (after 2 hr). Data for NBD-Cer, NBD-GlcCer, and NBD-SM were expressed as a percentage of the value in control cells. Data for NBD-cap were expressed as a percentage of the control value at 2 hr after incubation, and data for NBD-C1P were expressed as a percentage of the value in hCERK-CHO cells. In parentheses, the metabolites in hCERK-CHO cells are expressed as a percentage of the value before incubation. Data are means ± S.D. for 3 independent experiments. ^a*P* < 0.05, significantly different from the value in control cells.

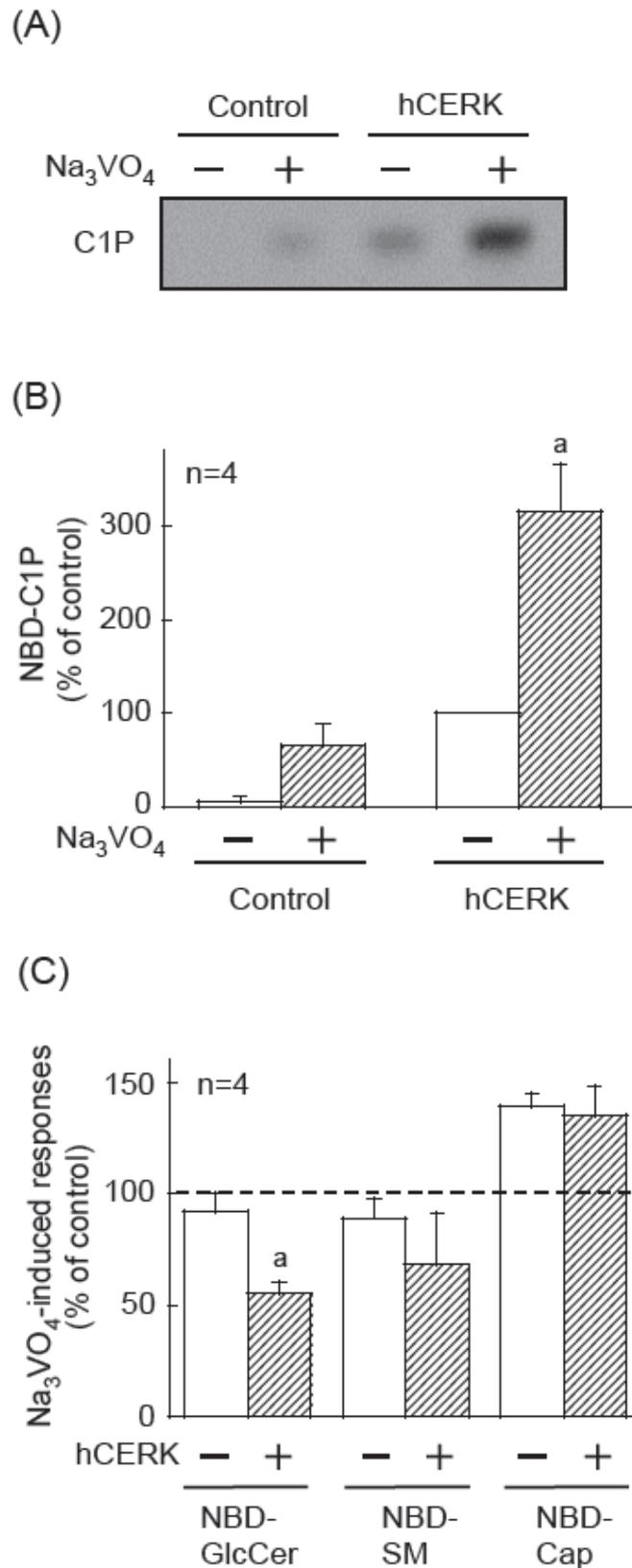


Fig. 5. NBD-Cer metabolism in hCERK-CHO cells. CHO cells were transfected with the control vector or vector for hCERK, and the NBD-Cer-labeled cells were stimulated with 10 mM Na₃VO₄ for 2 hr. In panels A and B, the amount of NBD-C1P was analyzed. Data in panel A are from a typical experiment. In panel B, quantitative data are expressed as a percentage of the value in hCERK-CHO cells. In panel C, the amounts of NBD-GlcCer, NBD-SM, and NBD-cap were expressed as a percentage of each control value without Na₃VO₄ treatment at 2 hr. Data are means \pm S.D. for 4 independent experiments. ^a*P* < 0.05, significantly different from the value without Na₃VO₄.

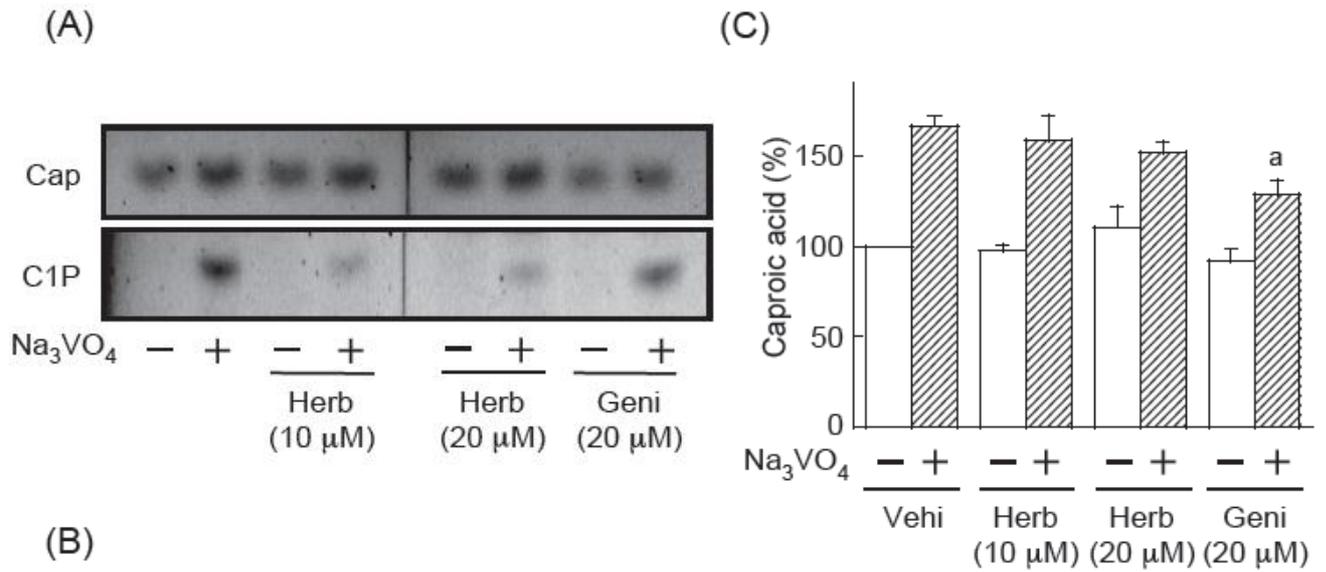


Fig. 6. Effects of tyrosine kinase inhibitors on Na_3VO_4 -induced formation of NBD-C1P and NBD-cap. A549 cells were labeled with 10 μM NBD-Cer in the absence or presence of 10 or 20 μM herbimycin (Herb) or 20 μM genistein (Geni) for 30 min, and then the washed cells were stimulated with Na_3VO_4 for 2 hr. The amounts of NBD-cap and NBD-C1P were analyzed. The data in panel A were from a typical experiment. Quantitative data for NBD-C1P were expressed as a percentage of the value with Na_3VO_4 in panel B, and those for NBD-cap were expressed as a percentage of the value without Na_3VO_4 in panel C. Data are means \pm S.D. for 5 independent experiments. ^a $P < 0.05$, significantly different from the value without the inhibitors.

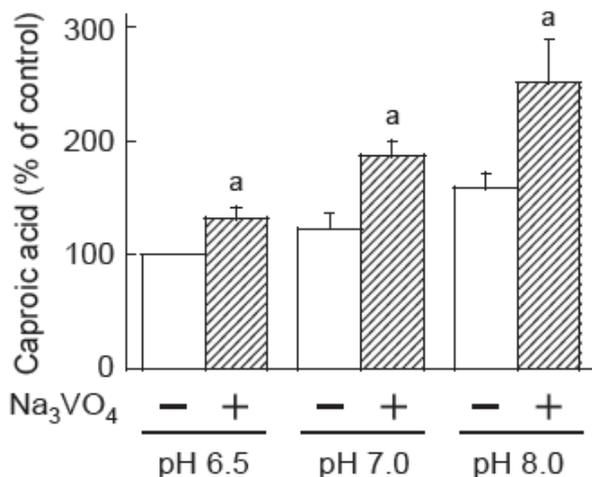


Fig. 7. Na_3VO_4 -induced formation of NBD-cap *in vitro*. CDase activity in crude cytosol fractions from mouse brain was measured at the indicated pH as described under Materials and Methods. The assay mixtures were further supplemented with and without 10 mM Na_3VO_4 . The formation of NBD-cap was expressed as a percentage of the control value at pH 6.5. Data are means \pm S.D. for 4 independent experiments. ^a $P < 0.05$, significantly different from the value without Na_3VO_4 .

3. 考察

3-1. TLC 法による複数の Cer 代謝物の同時検出

本研究により得られた結果を Fig. 8 に示した。蛍光基である NBD を用いた TLC 法は確立された方法として利用されている (Graf *et al.*, 2007, 2008; Boath *et al.*, 2008; Don and Rosen, 2008)。本研究での TLC 法が優れている点は、SM、GlcCer、C1P、caproic acid (Sph の対応物として) の 4 種の主要な NBD-Cer 代謝物と、基質である NBD-Cer の細胞内量を同時に検出できる点である。さらに、TLC プレートに外部標準としてスポットした NBD-Cer を元に、サンプル中の各 NBD-Cer およびその代謝物量を定量することが可能である (Table. 1)。本検出法によって Sph、S1P の量および細胞内外への移動等の挙動を検出することはできないが、CDase の活性を測定可能であることは大きな利点であるといえる。生成された NBD-cap は速やかに細胞外へと放出されるため、メディアム中の NBD-cap 量を測定するという簡便な方法で CDase 活性を測定することができるのである。Sph、S1P を追跡できる新たなプローブとしては、NBD とともに Cer の sn-1 位にアルキル鎖を持った NBD-Cer が有用であると考えられる。

本 TLC 法の欠点の一つとして、内在性の Cer およびその代謝物を測定できないことが挙げられる。いくつかの報告において、PMA や H₂O₂ によって、Cer 代謝が変化することが示されている (Verheij *et al.*, 1996; Becker *et al.*, 2005) が、今回我々が行った NBD-Cer を用いたアッセイ法においては、これらの刺激による Cer 代謝変化は観察できなかった。従って、この方法は薬物刺激により内在性 SM の分解が引き起こされることで生じた Cer の影響による Cer 代謝物の検出には適していないと考えられる。CERK (Van Overloop *et al.*, 1998; Sugiura *et al.*, 2002)、CDase (Delgado *et al.*, 2006; Mao and Obeid, 2008) を含めた Cer 代謝酵素に対する基質特異性は脂質アシル鎖の長さに依存する。さらに、NBD 基は Cer 代謝関連酵素への Cer の結合性を変化させた (Tani *et al.*, 1999)。NBD-Cer を用いて得られたデータの解釈には注意を払う必要がある。

3-2. vanadate による CERK, CDase の活性化

抗原による Immunoglobulin E 受容体の架橋により、細胞質チロシンキナーゼの活性化が引き起こされる。マスト細胞において、CERK は Immunoglobulin E 受容体の架橋に伴い活性化されることが報告されている (Mitsutake *et al.*, 2004)。しかし、我々が知る限り、今までに C1P 産生がチロシンリン酸化に依存するメカニズムによって引き起こされるという直接の証拠は得られていない。本研究において、我々は A549 細胞、CHO 細胞の両方において、vanadate によって NBD-C1P、NBD-cap の産生亢進という 2 つの作用が引き起こされることを見出した。この 2 種の細胞株において、vanadate による NBD-C1P 産生亢進は herbimycin によって大きく抑制された。一方、vanadate による NBD-cap 産

生亢進に対しては herbimycin による抑制効果は示されなかったが、genistein により抑制がみられた (Fig. 6)。CHO 細胞において、vanadate により、刺激後 30 分間で他の Cer 代謝物産生量に影響を与えることなく、C1P のみの産生亢進が引き起こされた。しかし、hCERK を過剰発現させた CHO 細胞では、NBD-Cer でラベル直後に測定した Cer 代謝が変化していた (Table 2)。hCERK の導入により、vanadate による NBD-C1P の産生量が増加し、NBD-cap の産生量は変化していなかった (Fig. 5C)。従って、NBD-C1P 産生と NBD-cap の産生は独立した事象であることが示唆された。Vanadate がラットの脳シナプトソームにおいて非特異的な脂質脱リン酸化酵素阻害剤として働くことを示唆する報告がある (Shinghal *et al.*, 1993) が、ラット肝ホモジネートを用いた実験において、vanadate は C1P 脱リン酸化酵素の活性を抑制しないという報告もある (Boudker and Futerman, 1993)。本研究において vanadate は NBD-Cer の取り込みに影響を与えなかったが、vanadate は赤血球において細胞膜への S1P 輸送を阻害するとの報告がある (Kobayashi *et al.*, 2009)。本研究において、hCERK 導入細胞のホモジネートを用いた実験において、vanadate により CERK の活性が上昇するという結果が得られた (data not shown) ことから、vanadate により引き起こされる C1P 産生は、CERK による NBD-Cer の NBD-C1P への直接の変換によるものであると考えられる。Vanadate を用いた際の NBD-C1P 産生は、刺激後 30~60 分間でプラトーに達する (Fig. 4D) が、これは NBD-cap を含む他の Cer 代謝物が時間依存的に増加を続けるのとは異なる。近年、CERK の活性化コンフォーメーションの安定性に Ser³⁴⁰ 残基のリン酸化が寄与しているとの報告がある (Chen *et al.*, 2010)。従って、細胞内において CERK はリン酸化によって活性制御されている可能性が考えられる。NBD-C1P の増加により基質である NBD-Cer は減少するが、NBD-C1P 生成量は細胞内に取り込まれた NBD-Cer 量と比較して非常に少ないため、NBD-Cer の減少はマスクされていると考えられる。今後は CERK 活性に対するチロシンリン酸化と Ca²⁺シグナルの関連性についても検討する必要がある。

NBD-Cer は CDase により Sph と NBD-cap に分解されるが、CDase は反応の至適 pH により酸性 CDase、中性 CDase、アルカリ性 CDase の 3 種に分類される (Bielawska *et al.*, 1996; Nikolova-Karakashian *et al.*, 1997; Mao and Obeid, 2008)。本研究において、NBD-cap の産生は vanadate により増加し、中性/アルカリ性 CDase 阻害剤である D-erythro-MAPP によって抑制された (Fig. 4E)。vanadate はマウス脳由来の粗細胞質画分間を用いた *in vitro* 条件においても効果を示し、vanadate により中性、アルカリ性において CDase 活性が大きく上昇した (Fig. 7)。プレリミナリーな結果であるが、A549 細胞を用いた実験で、酸性 CDase 阻害剤である N-oleoylethanolamide (Delgado *et al.*, 2006) により、vanadate の有無に関わらず NBD-cap の産生量が抑制されるという結果が得られている (data not shown)。Vanadate はラット肝細胞において酸性、中性条件下での CDase 活性を上昇させたとの報告もある (Nikolova-Karakashian *et al.*, 1997) が、vanadate により活性化される CDase のタイプは未だ明らかにはなっていない。なお、この段階では解明できなかったが、後述する第 3 章にて CDase の活性制御をさらに詳細に検討した。本研究では、A549 細胞、CHO 細胞ともに、vanadate による NBD-cap の産生

亢進は genistein により抑制されたが、herbimycin は効果を示さなかった。一方、vanadate による NBD-C1P の産生亢進は herbimycin により大きく抑制された。Zhu らの報告 (2009) によれば、ラット膵島β細胞において、酸性 CDase は IL-1βを含むサイトカイン混合物で刺激後 30 分間以内にチロシンリン酸化を介したシグナルによって活性化され、この応答は genistein によって抑制されることが示されている。さらに、IL-1βはラット肝細胞において genistein (25 μM) 感受性シグナルによって CDase 活性を増大させる (Nikolova-Karakashian *et al.*, 1997) ことが報告されている。Vanadate によるチロシンリン酸化シグナルが CERK に対して引き起こす作用は CDase に対するものとは異なるのかもしれない。

3-3. vanadate 有 / 無の場合における NBD-Cer 代謝の特徴

CHO 細胞において、内在性の SM レベルは比較的高く、GlcCer を含むスフィンゴ糖脂質レベルは SM の 10 %程度であり、Sph、C1P レベルは Cer の 3 %以下である (Fukasawa *et al.*, 1999, 2000; Hannun and Obeid, 2008)。本研究において、A549 細胞、CHO 細胞とも vanadate 処理後 2 時間の時点における NBD-cap の増加は NBD-SM の減少を伴ったが、NBD-Cer および他の NBD-Cer の代謝物量には影響を与えなかった (Table 1, Figs. 3, 4)。ラット肝細胞ホモジネートを用いた研究で、酸性、アルカリ性条件でのスフィンゴミエリナーゼ活性は vanadate によって増強されず、むしろ若干の抑制傾向が見られた (Nikolova-Karakashian *et al.*, 1997)。従って、vanadate による NBD-SM の減少は NBD-SM 合成の減少によるものであり、NBD-SM の分解促進によるものではないと考えられる。現時点で我々の実験からは vanadate による SM 合成酵素の直接の抑制作用の可能性を排除できないが、NBD-SM の減少はゴルジ装置においてプールされた NBD-Cer の代謝変化によるものと考えられる。Cer は Cer 輸送タンパク (Ceramide transfer protein, CERT) による経路と小胞輸送による経路の 2 経路によりゴルジ装置へ輸送され、SM、GlcCer への合成が行われる (Fukasawa *et al.*, 1999; Boath *et al.*, 2008)。Cer からの SM、GlcCer の合成は CERT 依存性経路、非依存性経路両方により制御されていることが CHO 細胞 (Fukasawa *et al.*, 2000; Hanada *et al.*, 2003)、COS 細胞 (Boath *et al.*, 2008) で報告されている。しかしながら、CERT 非依存性の SM 合成についても複数の細胞における報告がなされている (Lamour *et al.*, 2007)。CERK による C1P の産生は、CERT によりトランスゴルジ装置に輸送された Cer プールから行われることが A549 細胞を含めた複数の細胞で示されている (Lamour *et al.*, 2007) が、COS 細胞では CERT による Cer プールには依存しないと報告されている (Boath *et al.*, 2008)。従って、CERT の役割を含めた Cer 代謝については細胞種、あるいは細胞のコンディションによって異なる可能性がある。本研究において、hCERK の導入は NBD-C1P レベルを上昇させ、NBD-SM、NBD-GlcCer レベルを減少させた (Table 2)。同様の報告が Graf らによりなされており (Graf *et al.*, 2008)、CERK 発現は NBD-SM、NBD-GlcCer

レベルを減少させている。NBD-GlcCer の合成を、本研究で用いた PPMP や tamoxifen (Graf *et al.*, 2008) によって阻害すると、NBD-SM の産生が増加することが CHO 細胞、COS 細胞でそれぞれ示されている。アルカリ性 CDase のうち、D-erythro-MAPP 感受性である alkaline ceramidase 2 (ACER2) や ACER3 はゴルジ装置に局在している (Xu *et al.*, 2006; Mao and Obeid, 2008)。本研究で、我々は vanadate 処理後 2 時間における NBD-cap (および NBD-C1P) 産生は、NBD-SM の産生量減少を伴い、hCERK の発現だけで NBD-cap のレベルを減少させた。上記の報告と我々の得た結果を併せて考えると、SM、C1P、GlcCer、cap (Sph の対応物として) の産生に対する NBD-Cer プールは独立しておらず、CDase を含めた Cer 代謝酵素の活性は NBD-Cer プールを含めた利用可能な Cer の量にそれぞれ影響を与えていると考えられる。代謝後 1~2 時間における NBD-GlcCer の産生量は NBD-SM と似ていることが A549 細胞、CHO 細胞を用いた実験から示された (Table 1, Figs. 3, 4)。興味深いことに、CHO 細胞において CDase を MAPP で阻害すると NBD-SM の産生量は増加するが、NBD-GlcCer については変化せず、hCERK を発現させると NBD-SM は NBD-GlcCer よりも顕著に減少する (Table 2)。結果の項で述べたように、PPMP で GlcCer 合成酵素を阻害すると NBD-SM 量は増加する。従って、SM 合成は他の Cer 代謝経路の応答変化の影響を相殺するように均衡を保っていると考えられる。

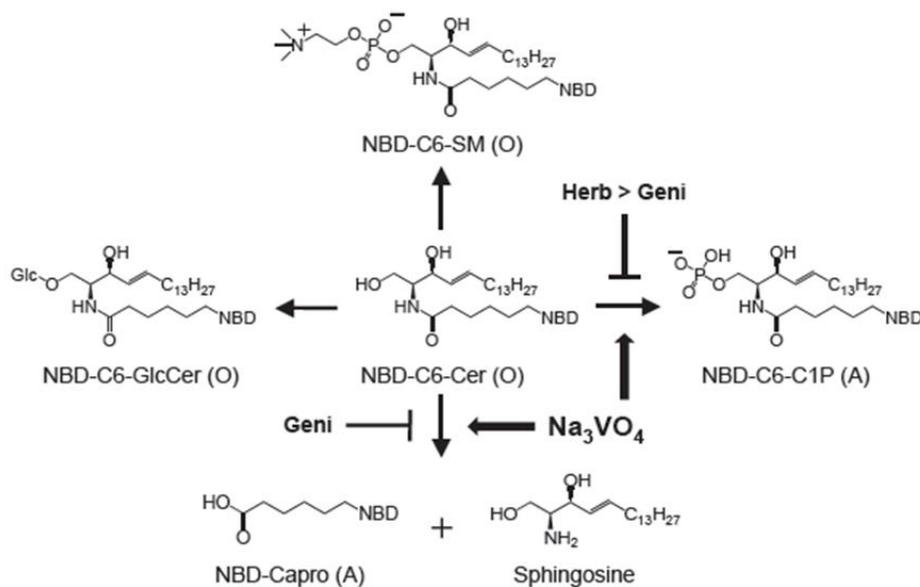


Fig. 8. Metabolism of NBD-Cer and summary of Na₃VO₄-induced responses. NBD-C6-Cer, NBD-Cer having a C6-acyl chain; NBD-Capro, NBD-caproic acid; Herb, herbimycin; Geni, genistein. The indicated NBD-Cer metabolites were recovered into organic (O) and aqueous (A) phases, respectively, under our conditions. Treatment of cells with Na₃VO₄ stimulated formation of NBD-C1P and NBD-Capro, which were mediated by CERK and CDases, respectively. Na₃VO₄-induced formation of NBD-C1P was markedly inhibited by treatment with Herb, but the formation of NBD-Capro was inhibited by treatment with Geni, not by with Herb.

第 2 章 HSP90 阻害剤 geldanamycin (GA) 及びそのアナログの セラミド代謝、細胞障害性に及ぼす効果

1. 序論

HSP は細胞が熱ショックや重金属、砒素、エタノール、活性酸素、アミノ酸誘導体などのストレス条件下にさらされた際に発現が上昇して細胞を保護するタンパク質の一群であり、分子シャペロンとして機能する。タンパク質の安定化や輸送、ミスフォールディングタンパク質の修復および分解に関与することが知られている (Pratt and Toft, 2003; Wandinger *et al.*, 2008)。HSP はヒトから大腸菌、酵母など様々な種が持っており、進化の過程において非常によく保存されている。HSP ファミリーの 1 種である HSP90 は細胞質にほぼ一様に存在し、cell division cycle protein 37 や FK506-binding protein 52 といった他の分子シャペロンと協調しながら、クライアントタンパク質が正しくシグナルに应答して機能する為に必須の因子としてアデノシン三リン酸 (ATP) 依存的に働く。GA およびその誘導体である 17-*N*-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) は、HSP90 の N 末端に存在する ATPase ドメインに結合し、ATP 依存性の作用であるシャペロン機能を阻害することで HSP90 のクライアントタンパク質の不活性化・不安定化と分解を引き起こす。転写因子、細胞周期・細胞死や細胞の生存・癌化に関わる細胞内シグナル伝達関連因子 (受容体タンパク質、Raf ファミリー、Src family kinases; SFKs など) といった多くのタンパク質が HSP90 のクライアントとなることが確立されており、HSP90 阻害剤によって、HSP ファミリーの発現、ミトコンドリアの機能不全、細胞内シグナル伝達阻害など、広範で多面的な細胞障害作用が引き起こされる (Pratt and Toft, 2003; Wandinger *et al.*, 2008)。このことから、HSP90 阻害剤は抗癌剤への臨床応用が期待されており、GA の腎・肝毒性を軽減した誘導体である 17-AAG のヒトに対する治験が行われている (Neckers and Workman, 2012)。Fig. 9 に GA、17-AAG の構造を示す。

ラットの副腎髄質由来褐色細胞腫細胞である PC12 細胞などを含む神経系細胞において、GA などの HSP90 阻害剤を処理することで、一般的に 2 つの作用がみられる。HSP 阻害剤を高濃度 (10 nM~10 μM) で用いることで、HSP 阻害剤そのものによる細胞障害作用の発現、および reactive oxygen species (ROS) 関連刺激を介した細胞障害性の増強がみられる。一方、低濃度 (nM order) で用いると、神経保護的な作用を示す (Sano, 2001; Lu *et al.*, 2002, 2009; Kim *et al.*, 2003; Salehi *et al.*, 2006; Clark *et al.*, 2009) ことが報告されている。しかしながら、HSP90 阻害剤が細胞に対してこのように相反する作用を示す機構については明らかとなっていない。また、vanadate、H₂O₂ などの外部刺激による細胞障害作用に対する HSP90 阻害剤の影響についても未だ明らかとなっていない。

Cer は主要な細胞障害性因子のひとつであることが多くの細胞種で報告されている (Posse de Chaves, 2006)。数種の癌細胞において、17-AAG 処理と他の細胞内シグナル阻害剤とを併用した場合に、Cer 産生増大によって細胞死が引き起こされるとの報告

がある (Walker *et al.*, 2010) 。また、GA はスフィンゴシンキナーゼ阻害剤との併用によって、腫瘍細胞においてオートファジーを引き起こすという報告もある (Beljanski *et al.*, 2010)。しかしながら、HSP90 阻害剤が PC12 細胞においてセラミド代謝の変化を引き起こすかどうかは明らかとなっていない。AA は PC12 細胞を含む多種の細胞で細胞障害性因子として働くことが知られている (Doroshenko and Doroshenko, 2007; Kurosawa *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2012)。AA は多様な経路によって産生されるが、刺激依存的な AA 産生は cPLA₂αによることが知られている。cPLA₂αの活性は ERK などの mitogen-activated protein kinase (MAPK) によるリン酸化や Ca²⁺によって制御されている (Hirabayashi *et al.*, 2004)。受容体刺激、vanadate、H₂O₂による ROS を含む多くのシグナルは mitogen-activated protein / extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) - ERK 経路を介し伝達され、MEK の活性はその上流にある Raf などの MEK キナーゼにより制御される。Raf ファミリー、MEK ファミリーに属するいくつかの分子や、EGF 受容体は HSP90 のクライアントタンパク質であることが知られている。従って、HSP90 阻害剤は PC12 細胞において、セラミド代謝や AA 産生を変化させることで細胞毒性を発揮している可能性がある。本研究において我々は、1) HSP90 阻害剤と vanadate、H₂O₂を併用した際の PC12 細胞におけるセラミド代謝、AA release の変化、2) ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞に対し HSP90 阻害剤を処理した際の AA release に対する影響、の 2 点について検討を行った (Toyomura *et al.*, 2012)。

2. 結果

2-1. PC12 細胞における細胞接着、LDH 漏洩に対する HSP 阻害剤の影響

PC12 細胞に 2 μM の GA を処理すると、処理後 6 時間 (data not shown)、24 時間 (Fig. 10A) では細胞形態変化は引き起こされなかった。また、2 μM の GA を 24 時間処理することによって、細胞接着 (Fig. 10B)、細胞毒性の指標である LDH 漏洩とも変化を引き起こさなかった (Fig. 10C)。10 μM の GA を 24 時間処理すると、接着細胞数は control の 92.3 ± 3.1 %となり、僅かではあるが有意な減少がみられ (n = 6, P < 0.05)、LDH 漏洩も 10~15 %となった。GA を単独で 10 nM~1 μM で用いた場合、LDH 漏洩、細胞接着ともに影響を与えなかった。GA のアナログである 17-AAG を 2 μM で用いた場合、処置後 24 時間で LDH 漏洩、細胞接着とも変化せず、5 μM、10 μM で用いた場合には接着細胞数はそれぞれ 70~90 %、40~60 %となった (n = 3)。

次に、GA もしくは 17-AAG を他の刺激と併用した場合の影響について検討した。Vanadate などのチロシン脱リン酸化阻害剤は、PC12 細胞を含む神経系細胞の生存に影響を与えることが報告されている (Zheng *et al.*, 2000; Gerling *et al.*, 2004)。1 mM の vanadate を 18 時間処理すると細胞の剥離は引き起こされなかった (Fig. 10B) が、5

mM を用いた場合、接着細胞数は $75.1 \pm 11.2 \%$ となった ($n = 5, P < 0.05$)。2 μM の GA と 1 mM の vanadate を併用すると、顕著な細胞剥離 (Fig. 10B)、LDH 漏洩 (Fig. 10C) が引き起こされた。2 μM の 17-AAG と 1 mM の vanadate を併用した場合においても同様の細胞障害性応答の亢進がみられた (data not shown)。GA 10 μM 単独処理においては、接着細胞数は control の $92.3 \pm 3.1 \%$ であったが、vanadate を併用することで顕著な低下がみられた。併用した vanadate が 5 mM の場合、接着細胞数は control の $32.8 \pm 7.9 \%$ ($n = 5, P < 0.05$)、10 mM の場合は $25.7 \pm 8.1 \%$ ($n = 5, P < 0.05$) となった。また、50 μM の H_2O_2 は単独でも細胞接着数を減少させたが、この応答は 2 μM の GA を併用することで顕著に亢進した (Fig. 10B)。 H_2O_2 処理により LDH 漏洩が引き起こされるが、GA の併用によりさらなる LDH 漏洩の亢進はみられなかった (Fig. 10C)。10 μM の GA と 50 μM の H_2O_2 を併用すると、LDH 漏洩は 40 % 以上となった。100 μM の H_2O_2 は単独で強い細胞障害作用を持ち、接着細胞数は 10.3 ± 2.3 となり ($n = 4, P < 0.05$)、LDH 漏洩は 40 % 以上の値を示した。これは我々が以前に示した結果と一致する (Shimma *et al.*, 2003)。1 mM の vanadate とともに GA もしくは 17-AAG を 500 nM、1 μM で用いた場合、どちらの濃度においても同程度の細胞障害性応答の亢進が見られた。これら 2 種の阻害剤を 10 nM~300 nM の比較的低濃度で用いた際に、vanadate、 H_2O_2 の細胞障害作用から PC12 細胞を守るという結果は、今回の我々の検討においては得ることができなかった (data not shown)。

2-2. PC12 細胞における HSP90 阻害剤による NBD-Cer 代謝の変化

本研究で用いた NBD-Cer は各代謝酵素により、NBD-SM、NBD-GlcCer、NBD-C1P、NBD-cap (C6-fatty acid) と非蛍光標識 Sph に代謝、検出される (本論文第 1 章参照; Tada *et al.*, 2010)。初めに、我々は PC12 細胞に 5 μM の NBD-Cer を 37°C で 30 分間ラベルし、Cer を含まないメディウムで洗浄した際の NBD-Cer 代謝物の細胞内レベルを調べた (Fig. 11, 0 hr)。ラベル時間の 30 分間にて PC12 細胞で生成した NBD-GlcCer 量は、2 μM の 17-AAG で 16 時間前処理を行っていた場合において、control 細胞に対して有意に減少していた (Exp. I, Table 3)。一方、NBD-Cer、NBD-SM 量は 17-AAG 処理の有無による影響は無かった。NBD-cap 産生量には変化が無かったが、NBD-cap は生成後直ちに細胞外へ放出されるため、30 分のラベル時間中に産生された NBD-cap は洗浄によって除かれるためであると考えられる (Tada *et al.*, 2010)。次に、ラベル後 1 時間代謝させた場合の NBD-Cer 代謝について検討した。基質である NBD-Cer 量は減少し、NBD-GlcCer、NBD-SM、NBD-cap は増加した (Exp. II, Table 3)。17-AAG 処理により、NBD-GlcCer の産生量は減少したが、他の代謝物量に影響を与えることは無かった。17-AAG 処理を行った場合の NBD-Cer 量は control と比較して多い傾向がみられたが有意ではなかった。2 μM の GA 処理を行った場合においても同様に NBD-GlcCer の減少がみられた (Exp. III, Table 3)。GA または 17-AAG をラベル段階および代謝段階におい

て添加しても変化はみられなかった。5 mM の vanadate を添加すると、僅かではあるが有意な NBD-GlcCer の産生増加が見られた (Exp. II, Table 3) もの、実験間でのばらつきが大きく、Exp. III (Table 3) においては有意な増加とはならなかった。PC12 細胞では 17-AAG、GA により、vanadate による NBD-GlcCer 産生亢進は抑制された。PC12 細胞において、5 mM の vanadate を用いることで NBD-cap 産生量は 1.3~1.5 倍に増加した。vanadate による NBD-cap 産生亢進は、17-AAG、GA 処理によって抑制された。Exp. III (Table 3) において、GA を用いた際の NBD-Cer、NBD-SM 量は vanadate の有無による変化はなかった (data not shown)。NBD-C1P の産生量は vanadate の有無に関わらず検出限界値以下であった。

2-3. AA release に対する GA の効果

序論で述べたように、AA 代謝は、PC12 細胞を含む多くの細胞種において細胞障害性応答に関与していることが知られている。PC12 細胞において、薬物刺激が無い場合の AA release は、2 μ M の GA 処理を 18 時間行った場合は AA 総取り込み量の $1.3 \pm 0.2\%$ 、行わない場合は $1.5 \pm 0.2\%$ となり、GA 処理の有無による影響はみられなかった ($n = 3$)。また、5 mM の vanadate 単独処理では AA release は引き起こされず ($1.7 \pm 0.2\%$)、GA と併用しても変化はみられなかった ($1.8 \pm 0.2\%$)。以前の研究において我々は、vanadate または H_2O_2 と Ca^{2+} イオノフォアである A23187 を併用することで、cPLA₂ の活性化を介して AA release が引き起こされることを示した (Taniguchi *et al.*, 2006, 2007)。PC12 細胞に 2 μ M の A23187 を 1 時間処理すると、有意な AA release の増加が認められた。Vehicle の AA release が $1.3 \pm 0.2\%$ であるのに対し、A23187 単独処理では $5.0 \pm 0.4\%$ ($n = 3, P < 0.05$)、vanadate と A23187 を併用すると $20.3 \pm 0.1\%$ ($n = 3, P < 0.05$) となった。GA を併用した場合、A23187 による AA release は有意ではなかったものの増加傾向がみられたが、vanadate と A23187 を併用した場合における AA release には影響を与えなかった (Fig. 12A)。また、以前の報告同様、1 mM の vanadate による AA release は、A23187 の有無に関わらず引き起こされなかった (Taniguchi *et al.*, 2007)。100 μ M H_2O_2 と A23187 を併用し、1 時間インキュベーションした場合の AA release は約 15% となったが、GA 処理を行っても影響を与えなかった。

次に、HeLa 細胞における AA release に対する GA の影響について検討した。HeLa 細胞に 5 mM の vanadate を単独で用いた場合、vanadate と A23187 を併用した場合ともに AA release は引き起こされなかった。HeLa 細胞において、PMA と A23187 を併用した場合および EGF と A23187 を併用した場合において、cPLA₂ α の活性化を介した AA release が引き起こされることが当研究室において示されていた (Matsuzawa *et al.*, 2009) ため、vanadate の代わりにこれらの薬物刺激を用いることにした。HeLa 細胞に 2 μ M の GA を 18 時間処理すると、PMA/A23187 による AA release は一部抑制され、EGF/A23187 による AA release は完全に抑制された (Fig. 12B)。Sorafenib 感受性の

Raf が、HeLa 細胞における cPLA₂ を介した AA release に関与していることが判っている (Matsuzawa *et al.*, 2009)。5 μM の sorafenib を assay の前に 30 分間投与すると、PMA/A23187 による AA release を部分的に抑制した。sorafenib 処置なしの control では 381 ± 23 % (n = 5) であったのに対し、sorafenib を用いた場合には 232 ± 25 % (n = 4, *P* < 0.05) と有意に抑制した (Fig. 12C)。HeLa 細胞に対し、5 μM sorafenib 処理に加え 2 μM の GA を 18 時間用いると、AA release は 141 ± 8 % となり、sorafenib 単独の場合よりも有意な抑制効果を示した。PMA/A23187 処理、sorafenib 処理がともに無い場合を 100 % (n = 5) とすると、sorafenib のみを単独で用いた場合は 134 ± 23 % (n = 5) であった。PC12 細胞のように、2 μM の GA を単独で用いても、細胞形態、細胞接着に影響を与えず、GA 24 時間処理後に 50 μM の H₂O₂ を用いた場合、H₂O₂ の細胞障害性を増強させた (data not shown)。

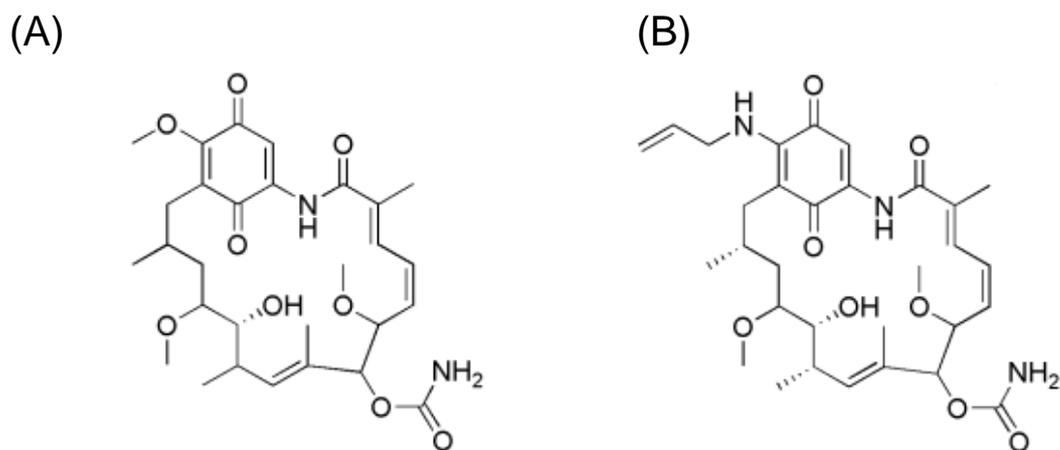


Fig. 9. Structures of (A) Geldanamycin and (B) 17-AAG. Geldanamycin is in a structure of a macrocyclic lactam related to ansamycin antibiotics. 17-AAG is an analog chemically derived from GA. 17-AAG is a less toxic and more stable analog of geldanamycin .

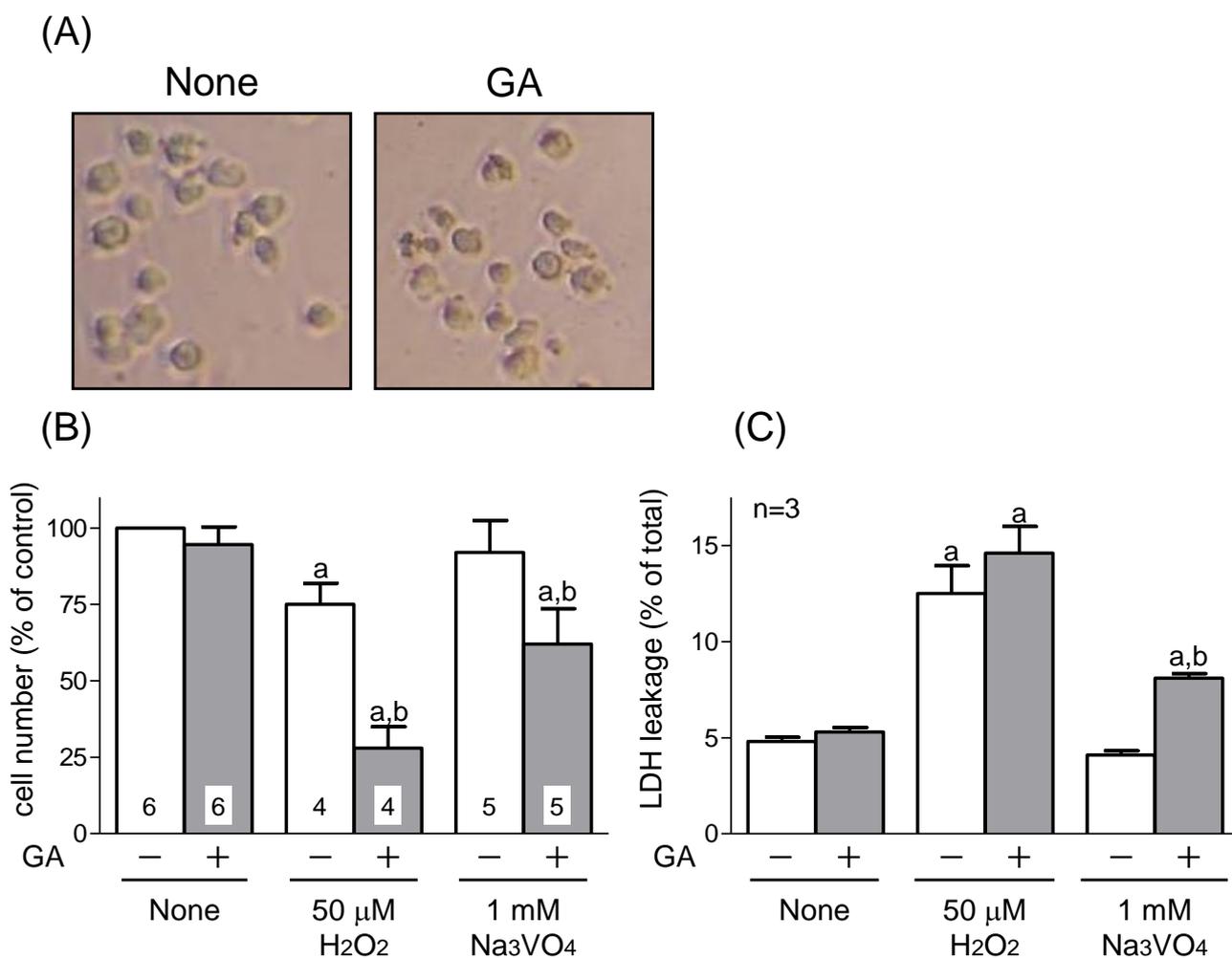


Fig. 10. Effects of GA on cell morphology and on Na₃VO₄- and H₂O₂-induced cell detachment and LDH leakage in PC12 cells. (A) Cell morphology was observed at 24 hr after 2 μM GA treatment. Similar results were obtained three times. In (B) and (C), PC12 cells were treated with 2 μM GA for 6 hr, and then further cultured with the indicated reagents for 18 hr. Numbers of cells attached to dishes (B) and LDH leakage (C) for 24 hr were determined. Data are means ± S.E.M. for the indicated number of independent experiments performed in duplicate. ^a *P* < 0.05 and ^b *P* < 0.05, significantly different from the control and the value without GA, respectively.

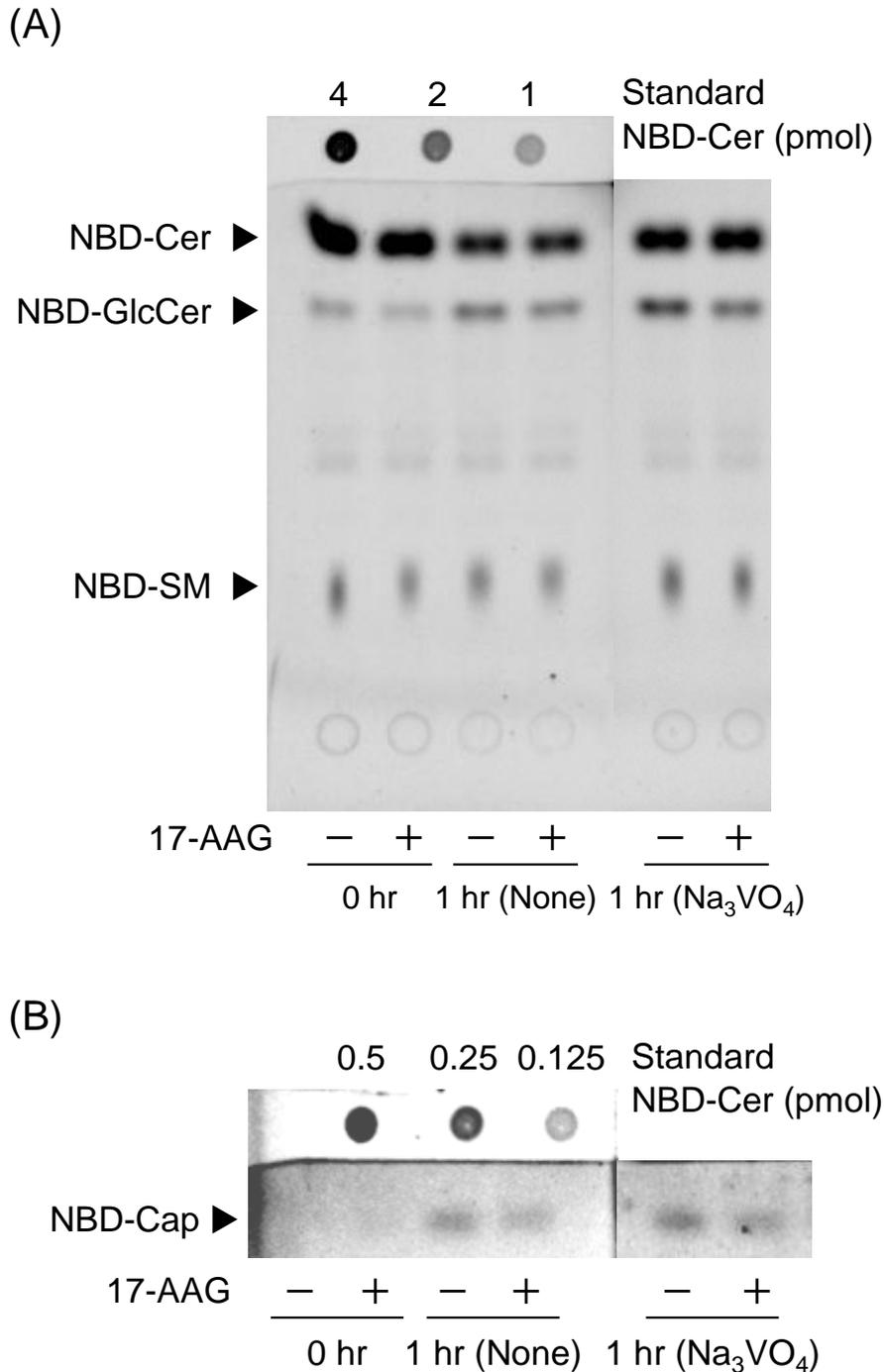


Fig. 11. Effect of 17-AAG treatment on NBD-Cer metabolism. PC12 cells were treated with vehicle and 2 μ M 17-AAG for 16 hr, and then labeled with 5 μ M NBD-Cer for 30 min. The lipids in the labeled and washed cells were extracted (0 hr), and divided into organic (A) and aqueous (B) phases. The lipids in the two phases were analyzed separately. In some cases, the cells were incubated with and without 5 mM Na₃VO₄ for an additional 1 hr, and then the lipids both in the cells and in the buffer were extracted. For quantitative analyses, indicated amounts of standard NBD-Cer (0 ~ 4 pmol) were spotted in the upper area of the plate after the separation by TLC. Data are from a typical experiment, and the quantitative data are shown in Table 1.

Table 3. Effects of HSP90 inhibitors on NBD-Cer metabolism.

Exp. I: Labeling for 30 min (n = 4, %)				
	control		17-AAG treated	
NBD-Cer	100 %	(34.4 ± 2.8)	99.0 ± 7.9	(33.9 ± 1.0)
NBD-GlcCer	100 %	(5.33 ± 0.69)	81.1 ± 6.7 ^a	(4.34 ± 0.86)
NBD-SM	100 %	(5.70 ± 0.94)	41.8 ± 11.1 ^a	(5.4 ± 1.03)
NBD-cap		(< 0.1)		(< 0.1)
Exp. II: Incubation for 1 hr after labeling (n = 4, fold)				
	control		17-AAG treated	
NBD-Cer (–)	1 fold	(66.8 ± 8.9 %)	1.09 ± 0.10	(73.2 ± 12.0)
(V)	1.06 ± 0.10	(70.0 ± 7.5)	0.92 ± 0.04	(66.7 ± 5.6)
NBD-GlcCer (–)	1 fold	(223 ± 13 %)	0.77 ± 0.09 ^a	(174 ± 32)
(V)	1.16 ± 0.05 ^a	(258 ± 20)	0.86 ± 0.08	(192 ± 26)
NBD-SM (–)	1 fold	(116 ± 4 %)	0.94 ± 0.10	(106 ± 18)
(V)	1.04 ± 0.15	(117 ± 12)	0.89 ± 0.11	(100 ± 10)
NBD-cap (–)	1 fold	(2.32 ± 0.31 pmol)	1.01 ± 0.04	(2.07 ± 0.28)
(V)	1.28 ± 0.04 ^a	(2.40 ± 0.61)	1.04 ± 0.07	(1.91 ± 0.59)
Exp. III: Incubation for 1 hr after labeling (n = 3, fold)				
	control		GA treated	
NBD-GlcCer (–)	1 fold		0.73 ± 0.05 ^a	
(V)	1.33 ± 0.19		0.84 ± 0.23	
NBD-cap (–)	1 fold		0.87 ± 0.07	
(V)	1.55 ± 0.21 ^b		1.16 ± 0.25	

PC12 cells were treated with vehicle, 2 μM 17-AAG (Exps. I and II), or 2 μM GA (Exp. III) for 16 hr, and then labeled with 5 μM NBD-Cer for 30 min. The labeled and washed cells were incubated with 5 mM Na₃VO₄ (V) or vehicle (–) for 1 hr. and the NBD-Cer metabolites were analyzed as described in Fig. 11. NBD-Cer metabolites were analyzed immediately after the labeling (Exp. I) and at 1 hr after incubation with Na₃VO₄ (Exps. II and III). In Exp. I, the amounts of NBD-Cer metabolites were expressed as a percentage of each metabolite without 17-AAG treatment, and the data in parentheses were expressed as pmol/well. In Exps. II and III, the data were expressed as the fold-increase of each metabolite in control cells without Na₃VO₄. The data in parentheses were expressed as a percentage of each metabolite in control cells before 1 hr incubation or as pmol/well. ^a*P* < 0.05 and ^b*P* < 0.05, significantly different from the control values without HSP90 inhibitors and without Na₃VO₄, respectively.

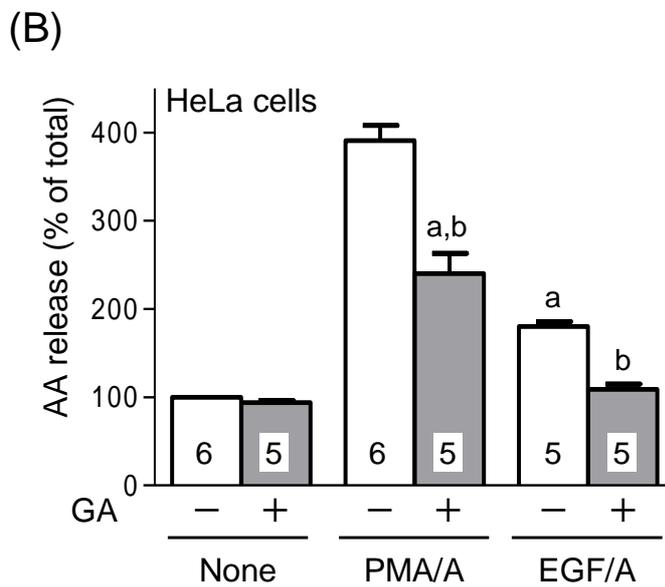
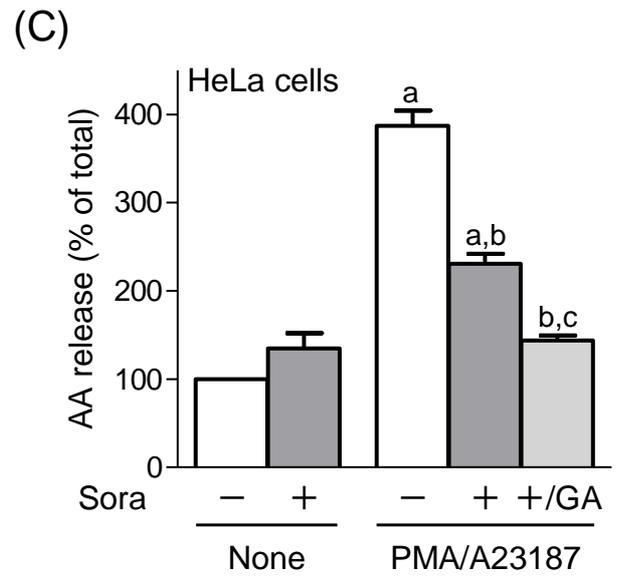
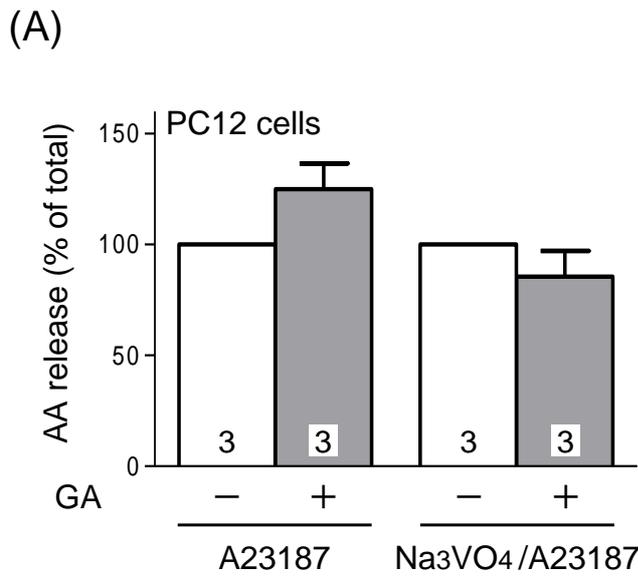


Fig. 12. Inhibitory effect of GA treatment on release of AA in HeLa cells, but not PC12 cells. PC12 cells and HeLa cells were labeled with [³H]AA in the presence of 2 μM GA for 18 hr. (A) PC12 cells were stimulated with and without 5 mM Na₃VO₄ in the presence of 2 μM A23187 for 1 hr. The absolute amounts of AA released are given in the text. Data were expressed as percentages of the respective value without GA, and are means ± S.E.M. (B) HeLa cells were stimulated with vehicle, 10 nM PMA plus 0.1 μM A23187 (PMA/A23187), and 20 ng/ml EGF plus 0.1 μM A23187 (EGF/A23187) for 30 min. (C) HeLa cells were treated with 2 μM GA or 5 μM sorafenib for 30 min, and then stimulated with vehicle, 10 nM PMA plus 0.1 μM A23187, and 20 ng/ml EGF plus 0.1 μM A23187 for 30 min. Data are normalized as percentages of AA release without stimuli from control cells, and are means ± S.E.M. In (A) and (B), ^aP < 0.05 and ^bP < 0.05, significantly different from control values and the values without GA, respectively. In (C), ^aP < 0.05 and ^bP < 0.05, significantly different from the control value and from the values without GA and sorafenib, respectively. ^cP < 0.05, significantly different from the value with sorafenib.

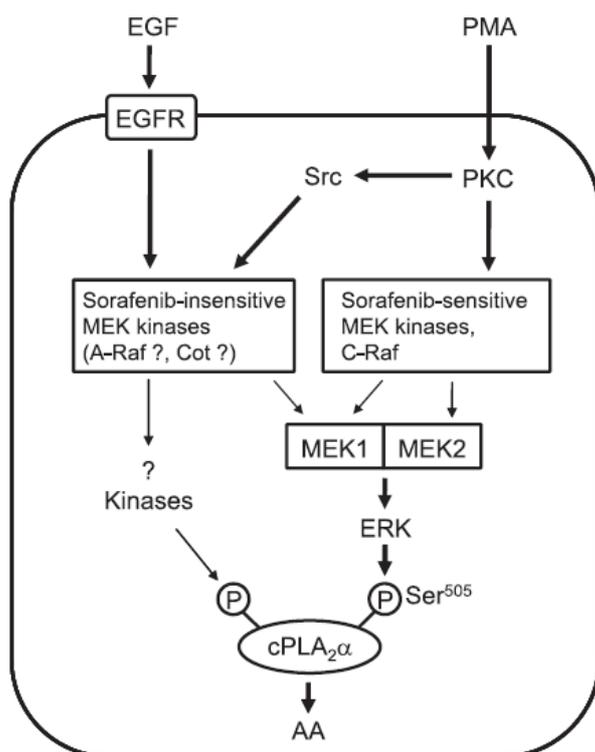


Fig. 13. A proposed mechanism of the MEK-ERK-PLA₂α pathways stimulated by EGF and PMA in HeLa cells. Bold lines show the pathways proposed in our study. Normal lines show the pathways proposed by other investigators.

3. 考察

本研究により、PC12 細胞に GA、17-AAG を 2 μM で処理すると、これら単独処理では細胞接着や LDH 漏洩に影響を与えなかったが、vanadate、 H_2O_2 による細胞障害性応答を亢進させることが示された。PC12 細胞を含む複数の神経系細胞種を用いた研究において報告されている (Sano, 2001; Kim *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2009) ように、HSP90 阻害剤を 5 μM 以上の濃度で作用させると、HSP 阻害剤単独で細胞障害性を示した。一方、HSP 阻害剤濃度について 1 nM から検討を行ったが、どの濃度においても細胞障害性応答から細胞を保護する作用を示すことはなかった。GA を細胞に 1 μM 以下で 12~16 時間処理すると、HSP70 などの HSP ファミリーの発現上昇を引き起こすという報告があり (Lu *et al.*, 2002; Salehi *et al.*, 2006)、結果として酸化ストレスによる細胞障害作用を抑制する (Sano, 2001; Romero *et al.*, 2010) という報告が PC12 細胞においてなされている。PC12 細胞は継代を重ねることで HSP70 の発現量が増加し、細胞障害性刺激への応答が変化することが報告されており (Romero *et al.*, 2010)、内在性 HSP タンパク量レベルの違いや、細胞に存在する HSP タンパク質サブタイプの違いによって HSP90 阻害剤に対する感受性が変化している可能性も考えられる。

外部刺激によって細胞内 Cer レベルが上昇すると、アポトーシス、細胞死が引き起こされる。従って Cer 代謝酵素を阻害することで細胞内に Cer が蓄積し、細胞障害性が増強される (Bejanski *et al.*, 2010)。17-AAG は結腸癌細胞株 HTC116、ヒト肝星状細胞において、Cer シグナルを介して細胞死を引き起こすという報告がある (Myung *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2010)。一方、Cer とは異なり、S1P は細胞増殖作用、抗アポトーシス作用を示す (Posse de Chaves, 2006)。本研究において、我々は HSP90 阻害剤を用いると、vanadate の有無に関わらず NBD-GlcCer の産生が減少することを見出した。また、vanadate により、Sph に対応する化合物である NBD-cap の産生が亢進するが、HSP90 阻害剤によりこの NBD-cap 産生亢進が阻害されることを見出した (Table 3)。Saito ら (2005) は、いくつかの神経系細胞において、エタノールにより引き起こされる細胞障害に伴い、GlcCer レベルが減少することを示している。つまり、Cer が GlcCer に変換され、Cer 量が減ること、あるいは GlcCer そのものにより細胞保護作用が示される可能性が考えられる。従って、PC12 細胞に HSP90 阻害剤を作用させた際の細胞障害性は、S1P や GlcCer による細胞生存シグナルの減弱や、Cer の蓄積によって引き起こされている可能性が考えられる。生成される NBD-GlcCer や NBD-cap の絶対量は、細胞にラベルされた NBD-Cer 量に対してそれぞれ 15 %、6 %と少ないため、HSP90 阻害剤によるこれらの代謝物の生成量減少により NBD-Cer が増加しても、その増加量はマスクされてしまっている可能性も考えられる。HSP90 阻害剤を 1 mM vanadate と併用して 24 時間処理した際、細胞接着阻害作用、LDH 漏洩といった細胞障害性応答を増強させた (Fig. 10)。本研究では vanadate による Cer 代謝の変化に関しては vanadate を 1 時間処理した場合の変化に限って検討を行ったが、Cer 代謝の変化が vanadate による細胞障害作用の発現に影響を与えている可能性があると考えられる。HSP90 による細胞障害作用は様々なシグナル経路が関与していることが示唆されている (Kim *et al.*, 2003; Clark *et al.*,

2009)。HSP90 阻害剤処理を行った細胞において、Cer 代謝の変化がどのような影響を与えるのかに関しては検討の余地が残されている。

AA 代謝は、PC12 細胞を含む多くの細胞種において、細胞障害作用への関与が知られている (Doroshenko and Doroshenko, 2007; Kurosawa *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2012)。HSP 阻害剤により ROS が産生され、cPLA₂α の活性化を介して AA 産生が引き起こされる (Taniguchi *et al.*, 2006) ことが、PC12 細胞を含めた様々な細胞で報告されている (Fukuyo *et al.*, 2008; Clark *et al.*, 2009)。今回我々は HSP90 阻害剤を PC12 細胞に処置した際の Cer 代謝の変化を示した。C1P や S1P などの Cer 代謝物は cPLA₂α の活性化に関わることが報告されており (Hirabayashi *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2006)、HSP90 阻害剤が示す細胞障害作用に AA release が関与している可能性が考えられた。しかしながら、PC12 細胞に GA 処理を行うことによって basal 状態および vanadate/A23187 処理時の AA release はともに変化が引き起こされなかった。一方、HeLa 細胞に GA 処理を行った際に、外部刺激による AA release は減少した。これは、HeLa 細胞において GA により HSP90 のクライアントタンパクである EGF 受容体、Raf などの減少が引き起こされた結果であると考えられ、GA は本来の作用を発揮できていると考えられる。従って、PC12 細胞における AA release は GA 非感受性であると考えられる。この結果により、PC12 細胞において 1) cPLA₂α-AA 経路は GA による細胞障害作用には関与していない、2) vanadate の有無に関わらず、cPLA₂α の活性化は GA による作用とは独立している、ことが示唆された。A23187 によって遊離された AA による 24 時間後の作用については、PC12 細胞、HeLa 細胞ともに A23187 自体によって細胞接着阻害などの細胞障害作用が現れるため、検討できなかった (data not shown)。

上記のように、HeLa 細胞において、GA を作用させると cPLA₂α 経路による AA release は抑制された。これはヒト単核細胞において報告されている結果と一致する (Szántó *et al.*, 2002)。Tucker ら (2008) は、マウスマクロファージにおいてオカダ酸により引き起こされる cPLA₂α の活性化が、HSP90/p54 キナーゼ複合体によって制御され、GA により抑制されることを示した。これらの知見と、今回我々が得た結果を併せて考えると、cPLA₂α の活性調節に対する HSP90 の作用は細胞種により異なることが示唆される。HeLa 細胞における cPLA₂α の活性化経路は少なくとも 3 通り存在する。1) EGF により活性化される Src 非依存的、sorafenib 非感受性経路、2) PMA により活性化される Src を介し、sorafenib 非感受性の経路、3) PMA により活性化される sorafenib 感受性の経路、の 3 通りが存在することが当研究室において報告されている (Fig .13, Matsuzawa *et al.*, 2009)。本研究において、GA 処理を行うことで EGF による AA release がほぼ完全に消失した。また、GA 処理を行うことで、sorafenib 処理の有無に関わらず PMA による AA release も抑制された。GA により HSP90 クライアントタンパクである EGF 受容体、Src ファミリー、Raf ファミリーなどの分解が引き起こされる (Pratt and Toft, 2003; Wandinger *et al.*, 2008)。従って、HeLa 細胞に GA を用いることで、1) EGF レセプターが減少し、EGF による AA release が抑制、2) Src ファミリーおよび sorafenib 非感受性の MEK kinase 様の分子 (A-Raf など) が減少することで PMA による応答が抑制されたと考えられる。

第3章 SrcによるCDaseおよびCERKの活性制御機構についての検討

1. 緒言

CDaseはスフィンゴ脂質代謝酵素群のうち、CerをSphと脂肪酸に加水分解する酵素である。CDaseは異なる染色体にコードされたサブタイプが5種類存在し、細胞内での局在部位と至適pHにより、それぞれ酸性CDase(リソソームに局在、至適pH: 4.5)、中性CDase(細胞膜に局在、至適pH: 7.0)、アルカリ性CDase(小胞体やゴルジ装置に局在、至適pH: 8.5~9.5)の3種類に分類される(Mao and Obeid, 2008)。5種類のサブタイプの内訳は酸性CDaseが1種類(*n*-acylsphingosine amidohydrolase 1; ASAH1)、中性CDaseが1種類(ASAH2)、アルカリ性CDaseが3種類(ACER1~3)であり、ACER1、2、3は互いにホモログである。CDaseは、S1Pの前駆体を生成することで細胞内のスフィンゴ脂質蓄積を抑える役割を担っている(Muramatsu *et al.*, 2002)。酸性CDaseにおいては欠損した際の脂質蓄積の障害が多く報告されており、酸性CDaseをノックアウトしたマウスは胎生致死となり(Li *et al.*, 2002)、ヒトにおいても酸性CDaseの欠損は特定疾患ライソゾーム症の一つであるFarber病の原因となることが分かっている(Muramatsu *et al.*, 2002; Park and Schuchman, 2006)。Farber病は生体内にCerが蓄積する疾患で、主な臨床症状として関節の腫脹による痛みや運動障害、咽頭の肥厚による嚙声が挙げられ、重症化すると肺不全を起こし死に至る難病である(Fujiwaki *et al.*, 1992)。さらに、CDaseは細胞内においてCerの減少とS1Pの増加を担うことで細胞内シグナルを調節する働きも持つ。ヒト前立腺癌細胞においては酸性CDaseの活性がタキサン系抗癌剤や放射線照射によるアポトーシス誘導に対してCerを分解することで拮抗的に働く(Mahdy *et al.*, 2009)。また中性CDaseは、ラット腎メサンギウム細胞においてステロイド系抗炎症薬により活性化され、アポトーシス作用をもたらす要因となっている(Förster *et al.*, 2010)。ヒト子宮頸癌細胞においては、アルカリ性CDaseがCerを分解しS1P産生を促すことで飢餓状態による細胞死を抑制する(Xu *et al.*, 2006)。これらのことから、CDaseは疾病に対する医学的アプローチの奏功を左右する一因子となりうるものとして注目されている。しかし、ヒトにおけるCDaseの活性制御メカニズムについては不明な点が多い。CDaseは1960年代初めにラット脳の抽出液からその活性が見いだされ部分精製されていたが、その分子本体は長い間不明であった(Gatt, 1963; Yavin and Gatt, 1969)。その後、米国のMoserらによって、Farber病の原因遺伝子がリソソームでCerの代謝を担っている酸性CDaseであることが報告された(Sugita *et al.*, 1972)。1996年にはヒトの酸性CDaseのアミノ酸残基配列とコード遺伝子の部位と配列の解明が完了した(Koch *et al.*, 1996)。この後ラットの酸性CDaseもヒト酸性CDaseと相同性が高いことが示され(Li *et al.*, 1998)、現在ではラット睥島細胞腫由来細胞株においてサイトカインにより酸性CDaseがチロシン残基のリン酸化を伴って活性化すること(Zhu *et al.*, 2009)が報告されている。しかし、サイトカインが酸性CDaseをリン酸化する具体的

なメカニズムおよびリン酸化部位は明らかとなっていない。中性 CDase やアルカリ性 CDase は酸性 CDase 発見の約 10 年後に発見された (Sugita *et al.*, 1975; Slife *et al.*, 1989)。3 種のセラミダーゼの一次構造には相同性がなく、異なる祖先遺伝子から進化したものと考えられている。ラット細胞において中性 CDase やアルカリ性 CDase も IL-1 β や platelet-derived growth factor (PDGF) などのサイトカインによって活性が増加し、その活性増加が genistein で抑えられることから、チロシンリン酸化シグナルの関与が示唆されている (Coroneos *et al.*, 1995; Nikolova-Karakashian *et al.*, 1997)。またアルカリ性 CDase は Ca²⁺により活性が増加することが報告されている (Mao *et al.*, 2001) が、具体的な活性制御因子は未だ明らかとなっていない。本研究において我々は、ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞およびヒト肺腺癌上皮細胞株 A549 細胞を用い、アルカリ性 CDase の活性制御の上流に SFKs のうち少なくとも cSrc が存在すること、またこの活性制御はこれまでアルカリ性 CDase の活性制御因子として報告されていた Ca²⁺に対し、Ca²⁺濃度非依存的な様式でなされていることを見出した。

CERK は、ATP から Cer にリン酸基を転移し、C1P を生成する酵素である。C1P は、cPLA₂ α の活性を介したエイコサノイド産生への関与 (Pettus *et al.*, 2003, 2004; Nakamura *et al.*, 2006, 2010) や、マスト細胞の脱顆粒促進 (Kumada *et al.*, 2007) など、炎症反応との関与を示す報告が多くなされており、アレルギー治療の標的になることが期待されている。CERK の活性化には、カルモジュリンが Ca²⁺センサーとして関与することが示されている (Mitsutake and Igarashi, 2005) が、詳細な活性制御機構は明らかになっていない。本研究において、A549 細胞に対して SU6656 を処置する事で、NBD-cap だけでなく NBD-C1P の生成量が減少する事が見出され、さらに NBD-C1P 産生量は cSrc の過剰発現および shRNA 処理によりそれぞれ亢進・抑制されたことから、細胞レベルでの CERK 活性の上流に cSrc が存在する可能性が示唆された。

2. 結果

2-1. NBD-cap の産生に対する SFKs 阻害剤の影響

まず、A549 細胞に SFKs の特異的阻害剤である SU6656、PP2 を用い、Cer 代謝の変化について検討した。SU6656 の濃度が 5 μ M、10 μ M の場合それぞれにおいて、NBD-cap の産生量が大きく減少し、基質である NBD-Cer の量が増加したが、NBD-SM、NBD-GlcCer の産生量に有意な変化は引き起こされなかった (Table 4)。NBD-cap の産生量は NBD-Cer とその代謝物を合わせた全体の NBD 量の 2~5 %であった。また、SU6656 により NBD-C1P の産生量が減少した。NBD-C1P の産生量は SU6656 処理の有無に関わらず非常に少なく、1~4 pmolであった。10 μ M の PP2 を A549 細胞に用いると、NBD-cap は 75.0 \pm 14.2 % ($P < 0.05$, $n = 3$) となり、control 群に対して有意に

減少した。他の NBD-化合物量については、NBD-Cer が $101.2 \pm 2 \%$ 、NBD-SM が $101 \pm 4 \%$ 、NBD-GlcCer が $90.0 \pm 6.3 \%$ となり、有意な変化は認められなかった。従って、CDase による NBD-cap (Sph の対応物として) の産生が SFKs を介して引き起こされていることが示唆された。10 mM の vanadate を A549 細胞に作用させると、本論文の第 1 章で示したように、NBD-cap の産生が亢進し、NBD-SM の産生が抑制された (Fig. 14)。10 μ M の SU6656 を処理すると、vanadate による NBD-cap の産生亢進が有意に抑制されたが、vanadate によって抑制された NBD-SM の産生に対して、SU6656 は影響を与えなかった。D-erythro-MAPP は中性/アルカリ性 CDase の阻害剤である (Bielawska *et al.*, 1996; Canals *et al.*, 2011)。30 μ M の D-erythro-MAPP を用いると、NBD-cap の産生量は、vanadate を用いなかった場合、用いた場合ともに有意に抑制され ($P < 0.05$)、それぞれの場合の NBD-cap 産生量は control 群の $78.3 \pm 4.6 \%$ 、 $107 \pm 4 \%$ ($n = 3$) となった。次に我々は SFKs 阻害剤と vanadate を併用した際の NBD-cap 産生量について、他の細胞株を用いた場合についても検討した。ここでは HeLa 細胞、CHO 細胞を用いた。HeLa 細胞において、SU6656、PP2 を 10 μ M で単独処理すると、NBD-cap の産生量は有意に抑制された (Fig. 15A)。10 mM の vanadate を用いると NBD-cap の産生量は有意に亢進し、SU6656、PP2 を併用すると NBD-cap 産生量は抑制された。CHO 細胞においても、1 章で示したように、vanadate により NBD-cap の産生亢進がみられ、vanadate による反応は SFKs 阻害剤により抑制された (Fig. 15B)。HeLa 細胞 (data not shown)、CHO 細胞 (Tada *et al.*, 2010) においても、vanadate の有無に関わらず、30 μ M の D-erythro-MAPP により NBD-cap の産生は抑制された。これらの結果から、今回用いた 3 種の細胞株において、1) SFKs 阻害剤感受性の経路によって NBD-cap の産生が引き起こされている、2) vanadate により引き起こされる NBD-cap の産生亢進経路に SFKs が関与している、3) vanadate による NBD-cap 産生亢進は D-erythro-MAPP に感受性の中性/アルカリ性 CDase を介していることが示された。

前述のように A549 細胞において、10 μ M の SU6656 を用いても、vanadate により引き起こされた NBD-SM 産生抑制には影響を与えなかった (Fig. 14)。HeLa 細胞において、10 mM の vanadate を用いると、NBD-Cer、NBD-GlcCer の産生量に変化を与えることなく、NBD-SM の産生量が減少した (Table 5)。10 μ M の SU6656 を用いた細胞における NBD-SM 産生量は、vanadate 処理を行った場合では control 群の $73.4 \pm 7.3 \%$ ($n = 4$, $P < 0.05$) であり、vanadate 処理を行わなかった場合に得られた $98.8 \pm 6.2 \%$ と比較して有意な抑制がみられた。SU6656、vanadate 併用群での NBD-Cer レベルは $125 \pm 14 \%$ ($n = 4$) であり、vanadate 単独処理群の $131 \pm 18 \%$ (Table 5) と比較して有意な変化は認められなかった。以上の結果より、HeLa 細胞、A549 細胞において、vanadate による NBD-SM 産生抑制は SU6656 非感受性であり、細胞内 NBD-Cer レベルには依存しないことが示された。CHO 細胞においては、vanadate により、NBD-SM 量は有意ではないが抑制傾向を示した (Tada *et al.*, 2010)。

2-2. HeLa 細胞、CHO 細胞における cSrc の過剰発現による NBD-cap 産生亢進

HeLa 細胞に cSrc を過剰発現させる方法が以前確立されており (Kuga *et al.*, 2007)、活性型 Lyn (Lyn Δ C-HA) を発現誘導させることができる HeLa 細胞クローン (HeLa-Lyn cells) が作製されている。cSrc ベクターの導入により、cSrc のタンパクレベルでの発現を確認し (Fig. 16A)、HeLa-Lyn 細胞を doxycycline で処理することで活性型の Lyn が発現誘導されることを確認した (Fig. 16B)。cSrc を過剰発現させた HeLa 細胞では、vanadate の有無に関わらず、cSrc の過剰発現により NBD-cap の産生量が亢進した (Fig. 16C)。一方、活性型 Lyn の過剰発現を行った細胞では、vanadate の有無に関わらず、NBD-cap の産生量はそれぞれの control 群に対して変化は引き起こされなかった。次に CHO 細胞において、cSrc ベクターの導入により、cSrc のタンパクレベルでの増加を確認し (Fig. 16D)、NBD-cap の産生量は vanadate の有無に関わらず有意な増加が認められた (Fig. 16E)。A549 細胞に cSrc-shRNA を導入すると、cSrc のタンパクレベルでの発現が抑制されることを確認した (Fig. 17A)。cSrc-shRNA の導入により、A549 細胞における cSrc 発現量は $43.4 \pm 9.3 \%$ となった ($n = 3, P < 0.05$)。NBD-cap の産生量については、control 細胞に対して有意な減少がみられた (Figs. 17B, C)。vanadate による NBD-cap 産生についても cSrc-shRNA により有意に抑制された。NBD-Cer、NBD-SM、NBD-GlcCer レベルは cSrc-shRNA による変化は引き起こされなかった (data not shown)。SU6656 処理を行った細胞で得られた結果のように、cSrc-shRNA を導入した A549 細胞においても、vanadate による NBD-SM 産生減少には影響を与えなかった。Vanadate 処理をした A549 細胞および A549-cSrc-shRNA 細胞での NBD-SM 産生量は、それぞれの control 細胞群に対して $83.2 \pm 3.8 \%$ 、 $68.5 \pm 10.2 \%$ であった ($n = 3$)。以上の結果より、細胞内での NBD-cap の産生上流に SFKs のうち Lyn ではなく、少なくとも cSrc が存在することが示唆された。

2-3. A549 細胞を用いた *in vitro* におけるアルカリ性 CDase 活性に対する cSrc の関与

SFKs を活性制御の上流に持つ CDase のサブタイプを同定するために、まずは A549 細胞のホモジネートを用いた *in vitro* CDase assay を酸性条件 (pH 4.5)、中性条件 (pH 7.2)、アルカリ性条件 (pH 8.8) でそれぞれ行う事で、SFKs が寄与しているのはどの至適 pH の CDase かを調べた。SU6656 処置を行った細胞から作製したホモジネートの酵素活性は、それぞれの pH における control 群に対して、pH 4.4 では $91.0 \pm 10.1 \%$ ($n = 3$)、pH 7.2 では $103 \pm 11.5 \%$ ($n = 4$)、pH 8.8 では $45.0 \pm 4.9 \%$ ($n = 3, P < 0.05$) となり、アルカリ性においてのみ有意な抑制がみられた (Fig. 18A)。これらの結果から、SFKs の下流に存在する CDase はアルカリ性 CDase である事が示唆された。3種類あるアルカリ性 CDase (ACER1~3) は、 Ca^{2+} により活性化することが報告されている (Mao and Obeid, 2008; Canals *et al.*, 2011)。アルカリ性 CDase について、SFK を

介した活性化と Ca^{2+} による活性化は独立しているのか、あるいは一方による活性化が飽和する事で他方も飽和するのかは不明である。そこで、私は今回の SFKs による CDase 活性の変化について Ca^{2+} 濃度がどのように影響を与えるかを反応系の Ca^{2+} 濃度を振る事で検討した。その結果、アルカリ性 CDase の活性は Ca^{2+} の濃度依存的に増加し、2.5 mM において飽和した (最大活性は Ca^{2+} 無しの場合の 377.0 ± 70.8 %) が、細胞に SU6656 を処置した際のアルカリ性 CDase の酵素活性は Ca^{2+} 濃度がいずれの場合でも低下していた (Fig. 18B)。なお、none に対する SU6656 処置サンプルのアルカリ性 CDase 活性の割合は、 Ca^{2+} 濃度が 0 mM で 47.2 ± 11.4 %、0.5 mM で 61.4 ± 2.3 %、1 mM で 72.4 ± 14.2 %、2.5 mM で 63.2 ± 13.4 %、5 mM で 62.8 ± 13.9 %であり、 Ca^{2+} の存在下の方が SFKs 阻害によるアルカリ性 CDase 活性の低下の割合は若干小さかったが、SFKs 阻害による活性抑制が Ca^{2+} が無い系でも起こり、逆に Ca^{2+} 濃度が十分に存在する系でも阻害をみせていた。この事から SFKs によるアルカリ性 CDase の活性変化は Ca^{2+} による活性化経路とは別の様式でなされている事が示唆された。次に、HeLa 細胞において、血清枯渇条件下で ACER2 の発現が誘導されるという報告がある (Xu *et al.*, 2006) ことから、A549 細胞でも同様にアルカリ性 CDase の発現誘導が引き起こされる可能性が考えられた。そこで、血清枯渇条件下におけるアルカリ性 CDase の活性について検討を行った (Figs. 18C, D)。Assay 前に 24 時間血清枯渇条件下で培養した A549 細胞のホモジネートを用い、実験を行ったところ、血清 (-) 条件下で培養した場合には、血清 (+) の場合に比べてアルカリ性 CDase 活性は Ca^{2+} 非存在下で約 1.36 倍に、 Ca^{2+} 存在下では約 1.58 倍となり、いずれも有意に上昇していた。従って、A549 細胞でも同様にアルカリ性 CDase の発現誘導が引き起こされる可能性が示唆された。

さらに、A549 細胞に cSrc の過剰発現および cSrc-shRNA を導入した場合それぞれのホモジネートを作製し、 Ca^{2+} 存在下および非存在下における *in vitro* でのアルカリ性 CDase の活性を調べた (Fig. 19A, B)。その結果、 CaCl_2 を処理しない場合のアルカリ性 CDase 活性は、cSrc 導入細胞を用いた場合は control 細胞の 141 ± 7 %、A549-cSrc-shRNA 細胞を用いた場合は 76 ± 9 %となった。 CaCl_2 非存在下での control 細胞を 100 %とすると、 CaCl_2 を添加すると、control 細胞を用いた場合は 151 ± 16 %に、Src 導入細胞を用いた場合は control 細胞の 179 ± 4 %、A549-cSrc-shRNA 細胞を用いた場合は 121 ± 9 %となり、いずれの場合においても Ca^{2+} によるアルカリ性 CDase 活性の上昇が示された。以上の結果から、SFKs による CDase の活性制御は Ca^{2+} 濃度による制御とは非依存的な様式でなされている事が強く示唆された。

2-3. NBD-C1P の産生に対する SFKs 阻害剤の影響

本研究において、A549 細胞に対して vanadate を処理した際に C1P の産生が上昇すること、vanadate と SU6656 を併用することで、vanadate による NBD-C1P の生成量が減少する事が見出された (Fig. 20A)。従って、細胞レベルでの CERK 活性の上流に

SFKsが存在する可能性が示唆された。また、VanadateによるNBD-C1Pの産生亢進は、protein kinase C (PKC) 阻害剤 Gö6976、GF109203Xを用いた場合においても抑制され (Fig. 20B)、SU6656、Gö6976を併用するとNBD-C1Pの産生に対してさらなる抑制効果を示した (Fig. 20C)。細胞における CERK と SFKs の関係を更に調べるために、A549細胞に対し cSrc の過剰発現および cSrc shRNAを用いたノックダウンを行った際に NBD-C1P の産生量についても検討を行った (Fig. 21)。その結果、cSrc の過剰発現を行った場合は NBD-C1P の生成量は vanadate 非処置群で control 群の約 1.42 倍、vanadate 処置群では control 細胞の約 1.7 倍となり、いずれの群でも有意な NBD-C1P レベルの増大がみられた。一方、cSrc-shRNA によるノックダウンを行った場合では、vanadate 非処置群で control 群の約 0.52 倍、vanadate 処置群では control 細胞の約 0.47 倍となり、いずれの群でも有意な NBD-C1P レベルの減少が確認された。また、Lyn の過剰発現を行った際には NBD-C1P の生成量に変化はみられなかった (data not shown)。このことから、細胞レベルでの CERK の活性制御には SFKs が関与し、cSrc が少なくとも含まれる事が示唆された。

Table 4. Effect of SU6656, an inhibitor of Src, on ceramide metabolites in A549 cells.

	Vehicle (8)	5 μ M SU6656 (3)	10 μ M SU6656 (5)
NBD-Cer	100 %	127 \pm 11 ^a	159 \pm 26 ^a
NBD-SM	100 %	105 \pm 9	102 \pm 12
NBD-GlcCer	100 %	105 \pm 2	109 \pm 8
NBD-cap	100 %	67.4 \pm 13.0 ^a	44.8 \pm 10.6 ^a
Total	100 %	109 \pm 12	115 \pm 7

A549 cells were labeled with 10 μ M NBD-Cer at 37°C for 30 min, and then washed cells were further incubated for 2 hr. SU6656 at 5 μ M and 10 μ M was further supplemented in the assay mixture. The lipids both in the cells and in the buffer were extracted, and divided into organic and aqueous phases. The lipids in the two phases were analyzed separately. Data were expressed as percentages of the control, and are mean \pm S.D. for the indicated number of independent experiments shown in parentheses. ^a*P* < 0.05, significantly different from the control value without treatment with SU6656.

Table 5. Na₃VO₄-induced changes in NBD-Cer metabolism in HeLa cells.

	Vehicle	Na ₃ VO ₄
NBD-Cer	100 % (29~65 pmol)	131 \pm 18
NBD-SM	100 % (24~53 pmol)	62.6 \pm 8.5 ^a
NBD-GlcCer	100 % (22~48 pmol)	90.3 \pm 17.2
NBD-cap	100 % (1.0~4.1 pmol)	157 \pm 9 ^a

NBD-Cer-labeled HeLa cells were incubated for 2 hr with and without 10 mM Na₃VO₄. Data were expressed as percentages of the control, and are mean \pm S.D. for 8 experiments. ^a*P* < 0.05, significantly different from the control. The absolute values (pmol/well) are shown in parentheses.

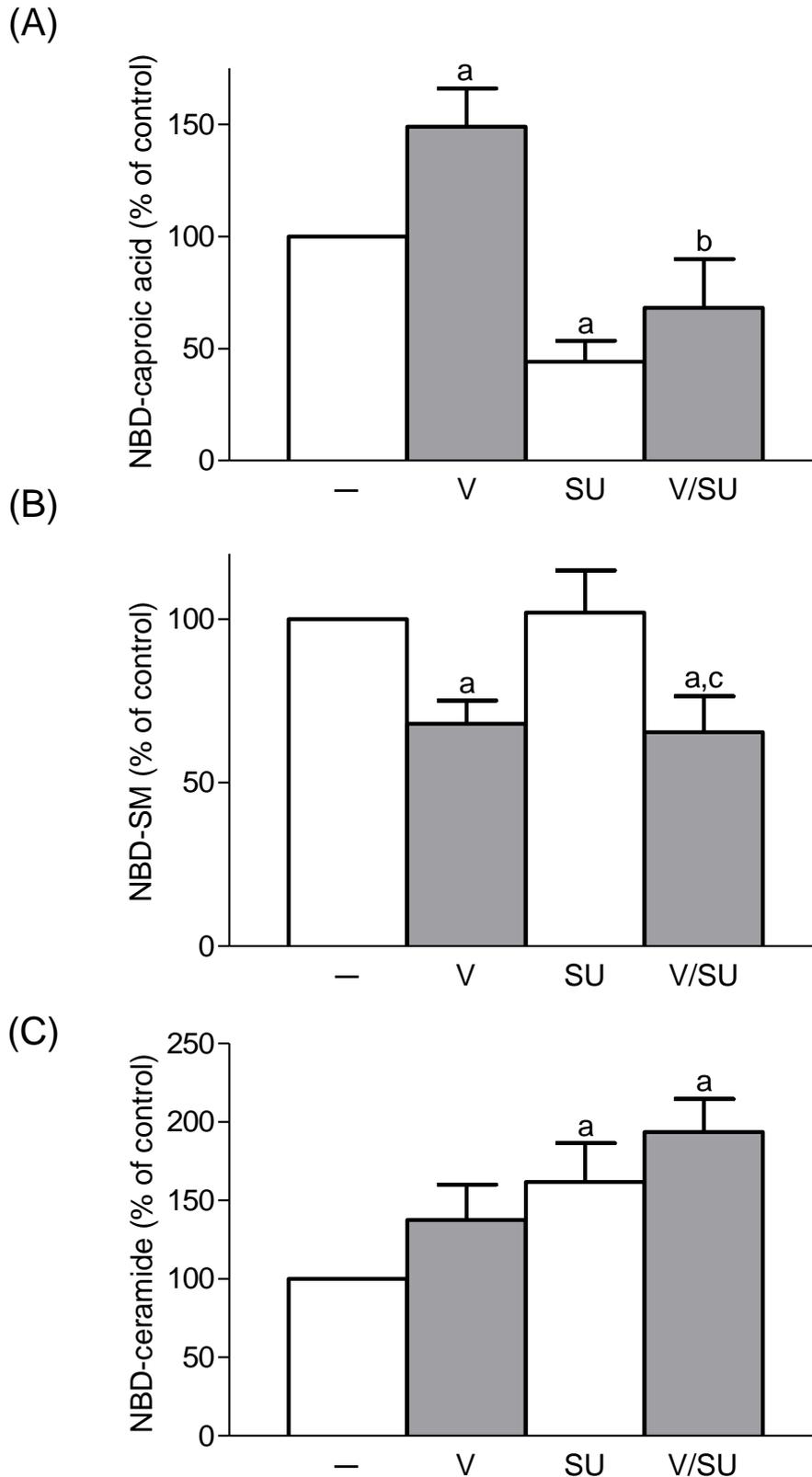
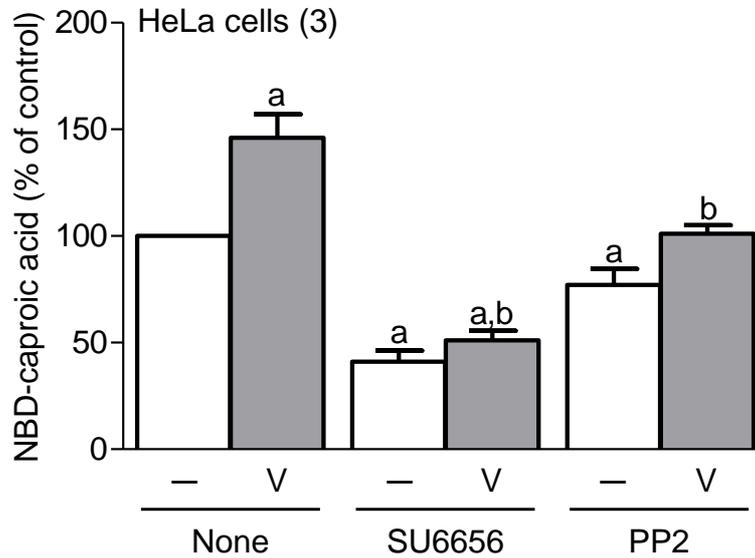


Fig. 14. NBD-Cer metabolites in SU6656- and Na_3VO_4 -treated A549 cells. A549 cells were labeled with 10 μM NBD-Cer, and then the washed cells were further incubated with vehicle, 10 mM Na_3VO_4 (V), and/or 10 μM SU6656 (SU) for 2 hr. The amount of NBD-cap (A), NBD-SM (B), and NBD-Cer (C) were expressed as percentages of the respective control values without stimuli. Data are mean \pm S.D. for 5 independent experiments. ^a $P < 0.05$, significantly different from the value without stimuli. ^b $P < 0.05$ and ^c $P < 0.05$, significantly different from the value with SU6656 and from the value with Na_3VO_4 , respectively.

(A)



(B)

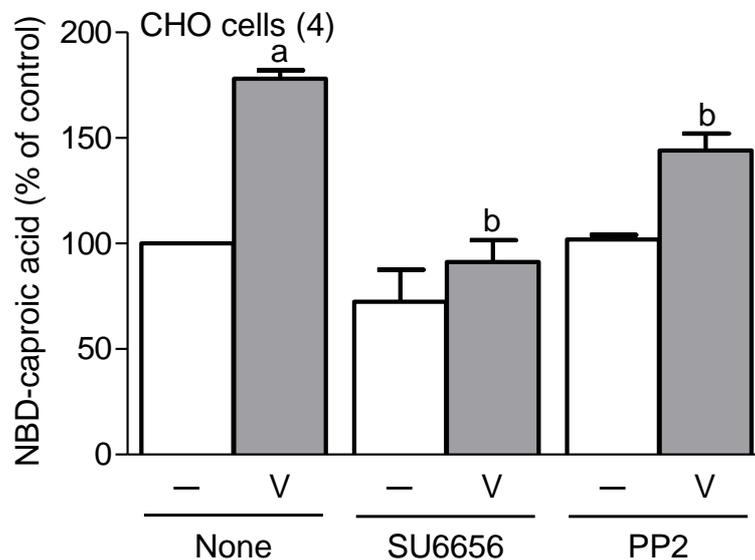


Fig. 15. Inhibition of NBD-cap formation by cSrc inhibitions in HeLa cells and CHO cells. NBD-Cer labeled HeLa cells (A) and CHO cells (B) were incubated for 2 hr with 10 mM Na₃VO₄ (V) in the presence of 10 μM SU6656 or 10 μM PP2. Formation of NBD-cap was expressed as percentage of the control. Data are mean ± S.D. for the indicated number of independent experiments shown in parentheses. ^a*P* < 0.05, significantly different from the value without inhibitors. ^b*P* < 0.05, significantly different from the value with Na₃VO₄ in control cells, respectively.

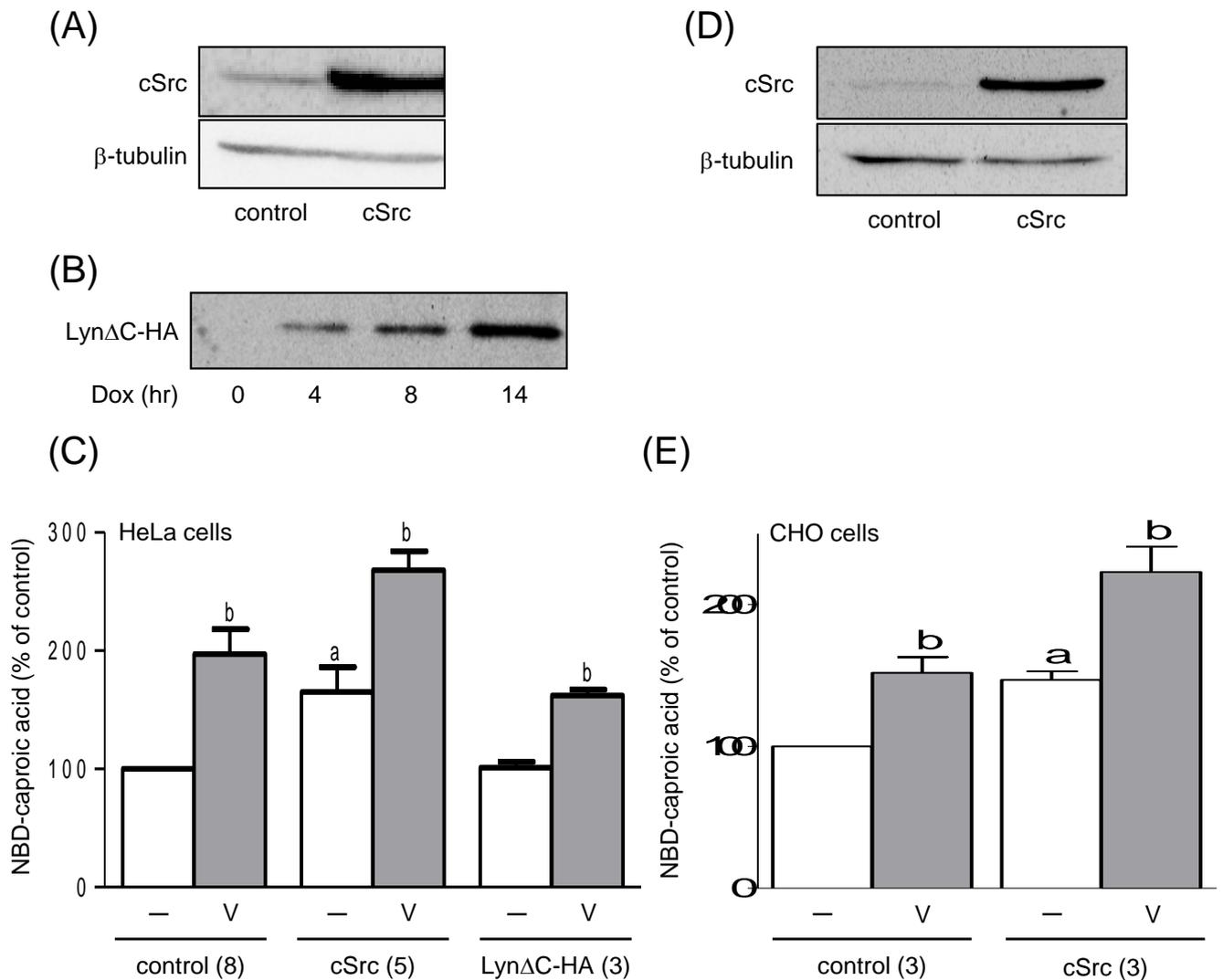


Fig. 16. Amounts of NBD-cap in cells overexpressing cSrc and active form of Lyn (Lyn Δ C-HA). In (A), HeLa cells were transfected with control vector and the vector for human cSrc, and further cultured 48 hr. In (B), HeLa cells transfected with the vector encoding active form of Lyn (Lyn Δ C-HA) were stimulated for the indicated periods with doxycycline (Dox) for the protein expression. Expression of cSrc and Lyn Δ C-HA was confirmed by Western blotting with anti-cSrc and anti-HA antibody, respectively. A lower panel in (A) shows amount of β -tubulin as a control. In (C), HeLa cells overexpressing cSrc and Lyn Δ C-HA (doxycycline treatment for 14 hr) and control cells were labeled with NBD-Cer, and then the washed cells were stimulated with 10 mM Na_3VO_4 (V) for 2 hr. In (D), CHO cells were transfected with the vector for human cSrc, and further cultured for 48 hr. In (E), NBD-Cer-labeled CHO cells were stimulated with 10 mM Na_3VO_4 for 2 hr. In (C) and (E), NBD-Cer labeling was performed at last stage of culture with serum. Formation of NBD-cap was expressed as percentages of the values without Na_3VO_4 in control cells, and Data are mean \pm S.D. for the indicated number of independent experiments. ^a $P < 0.05$, significantly different from the control. ^b $P < 0.05$, significantly different from the values without Na_3VO_4 .

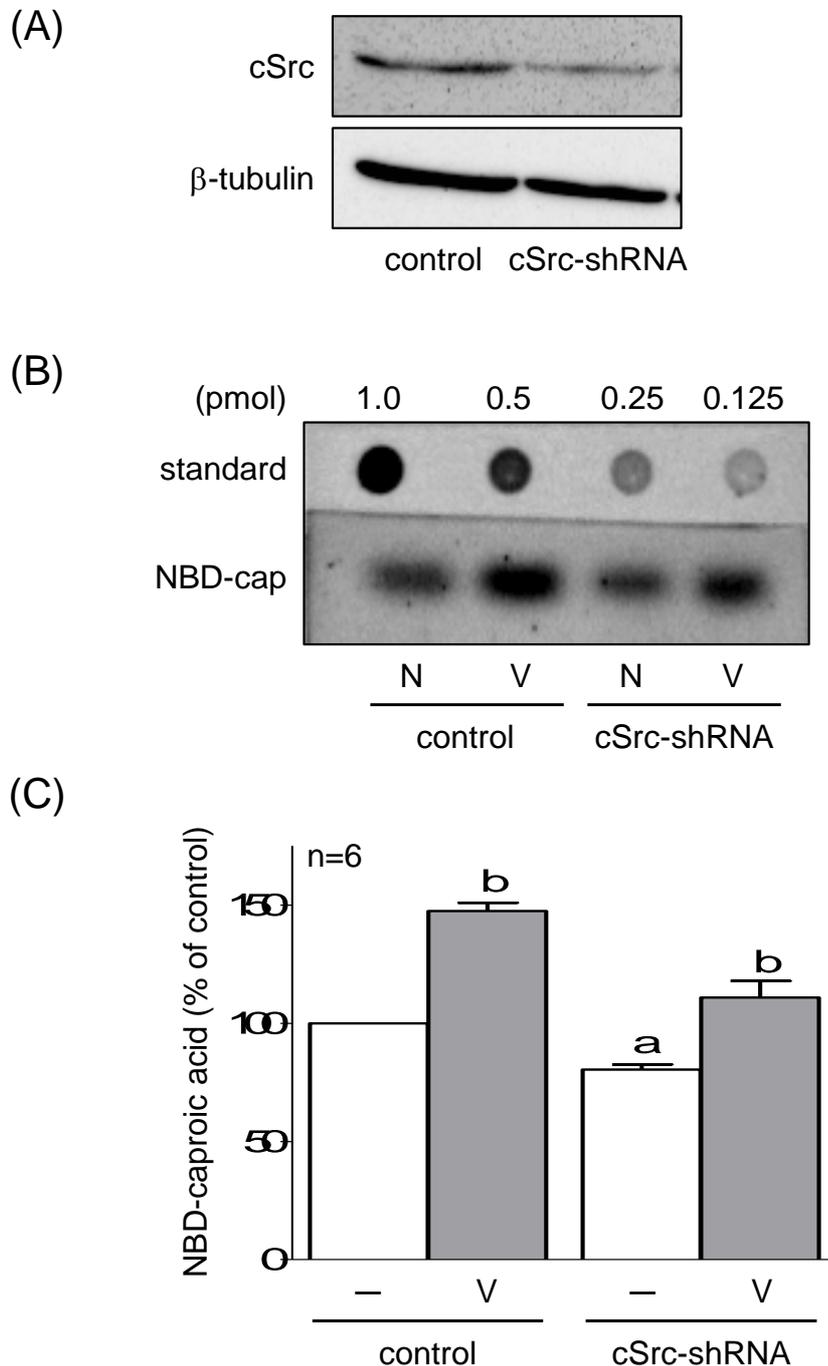


Fig. 17. Amounts of NBD-cap in A549 cells treated with vector for cSrc-shRNA. A549 cells were transfected with control vector and the vector for cSrc-shRNA, and further cultured 48 hr. the protein levels of cSrc and β -tubulin in typical experiments were shown in (A). A549 cells treated with the vector for cSrc-shRNA were labeled with NBD-Cer, and then the washed cells were stimulated with 10 mM Na_3VO_4 (V) for 2 hr. Data for NBD-cap from typical experiments are shown in (B). Quantitative data in (C) were expressed as percentage of the control value, and the data are means \pm S.D. for the 6 independent experiments. ^a $P < 0.05$, significantly different from the control. ^b $P < 0.05$, significantly different from the values without Na_3VO_4 .

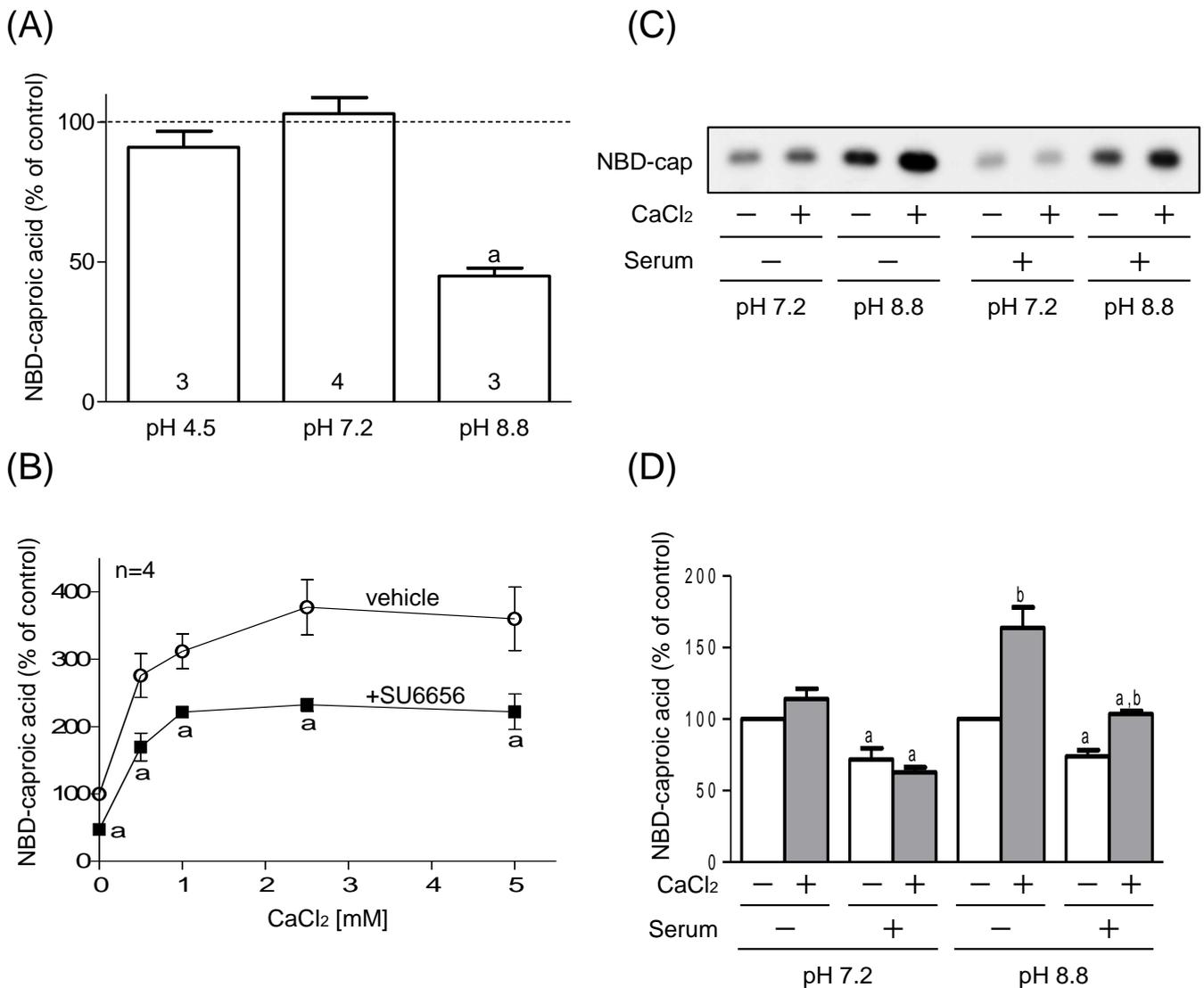
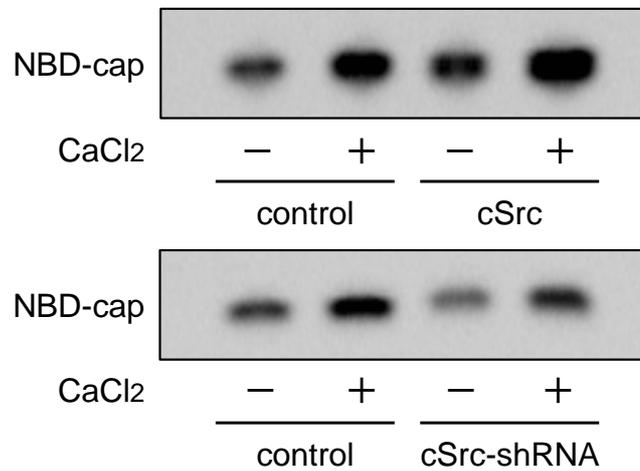


Fig. 18. CDase activity of homogenate fractions of A549 cells at different pH conditions.

In (A), homogenate fractions were prepared from serum-starved A549 cells treated with 10 μ M SU6656 for 30 min, and CDase activity in vitro was measured in the buffers having the indicated pH values in the absence of CaCl₂. Data were expressed as percentages of the respective control values without SU6656 treatment. ^a*P* < 0.05, significantly different from the value without SU6656. In (B), homogenate fractions were prepared from serum-starved A549 cells that were treated with vehicle (O) and 10 μ M SU6656 (●) for 30 min. CDase activities at pH 8.8 were measured with the indicated concentrations of CaCl₂. ^a*P* < 0.05, significantly different from the values without SU6656. In (C) and (D), A549 cells were cultured for 24 hr with and without 5% serum, and CDase activities with and without 3 mM CaCl₂ were measured at pH 7.2 and pH 8.8. Data from a typical experiment are shown in (C), and quantitative data were expressed as percentages of the values without CaCl₂ at pH 7.2 and pH 8.8 in serum-starved cells (D). ^a*P* < 0.05, significantly different from the control. ^b*P* < 0.05, significantly different from the values without CaCl₂.

(A)



(B)

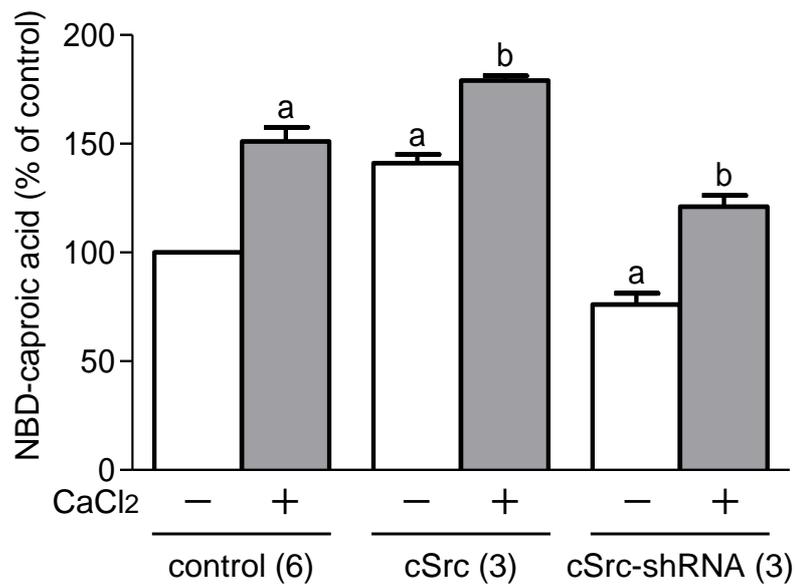


Fig. 19. CDase activity of homogenate fractions of A549 cells overexpressing cSrc and treated with cSrc-shRNA. Homogenate fractions were prepared from A549 cells treated with the vectors for cSrc and cSrc-shRNA. CDase activity at pH 8.8 was measured with and without 3 mM CaCl₂. Data from a typical experiment are shown in (A) Quantitative data were expressed as percentage of the value without CaCl₂ in the control cells (B), and are means \pm S.D. for the indicated number of independent experiments. ^a*P* < 0.05 and ^b*P* < 0.05, significantly different from the control and from the values without CaCl₂, respectively.

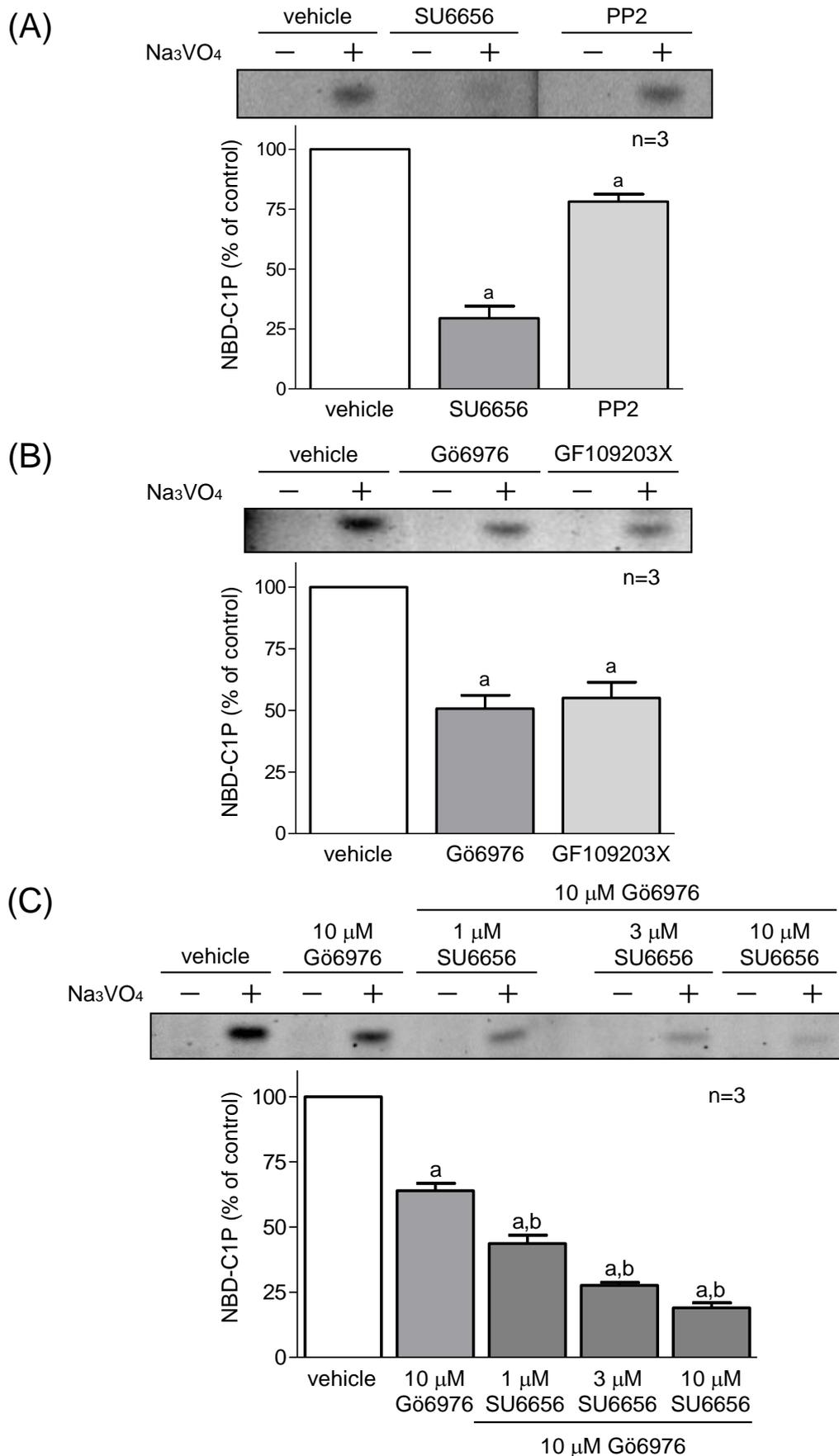


Fig. 20. Effect of SFKs inhibitors and/or PKC inhibitors on Na₃VO₄-treated A549 cells. A549 cells were labeled with 10 μM NBD-Cer, and then the washed cells were further incubated with vehicle, 10 mM Na₃VO₄, and/or inhibitors for 2 hr. Effect of SFKs inhibitors (A), PKC inhibitors (B), and SU6656 and/or Gö6976 (C) on NBD-C1P formation were expressed as percentages of the respective control values without stimuli. Data are mean ± S.D. for 5 independent experiments. ^a*P* < 0.05, significantly different from the values without Na₃VO₄ in control cells. ^b*P* < 0.05, significantly different from the value with Gö6976 and Na₃VO₄.

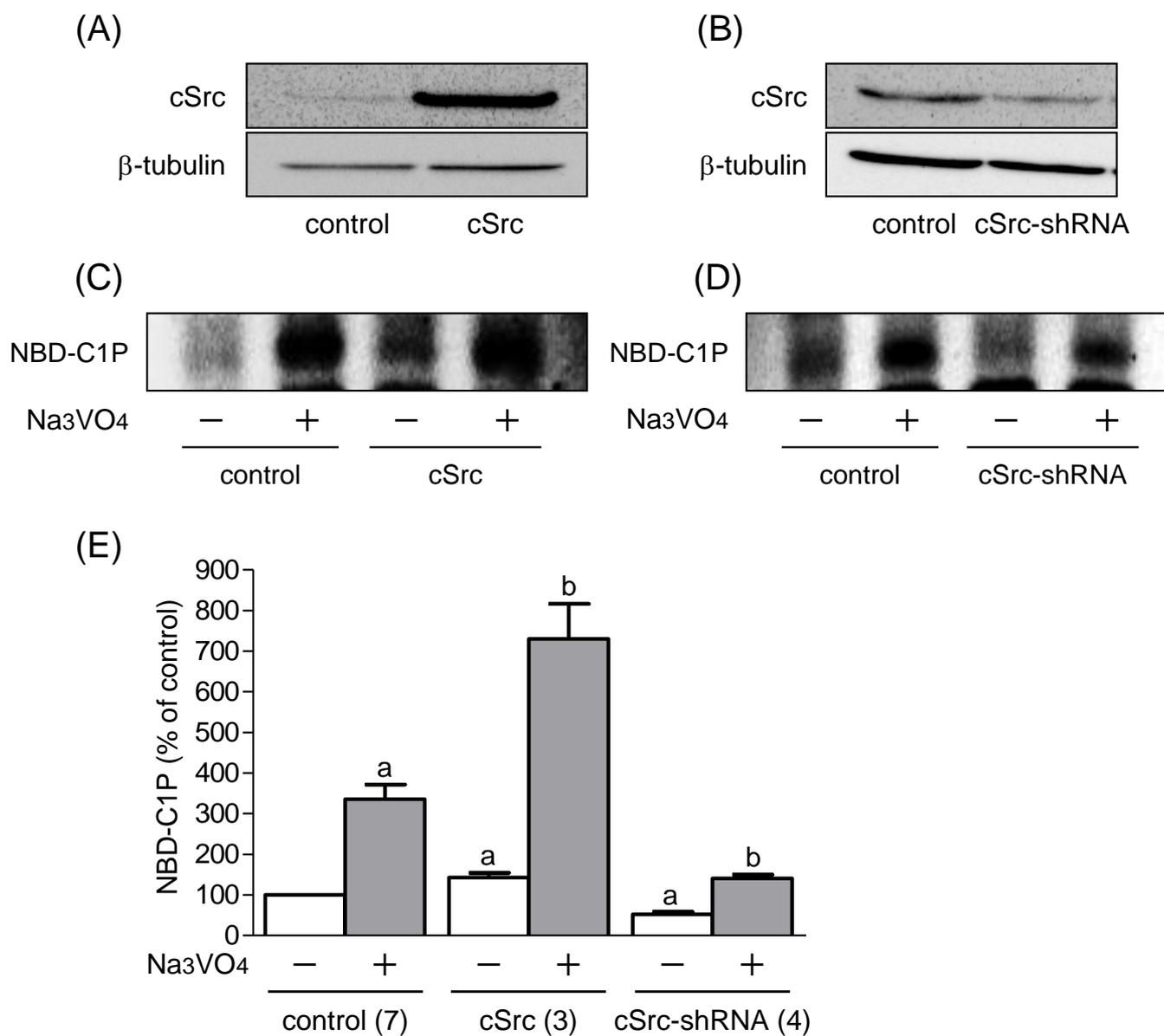


Fig. 21. Amounts of NBD-C1P in A549 cells overexpressing cSrc and treated with cSrc-shRNA. A549 cells treated with the vectors for cSrc and cSrc-shRNA, and further cultured 48 hr. the protein levels of cSrc and β -tubulin in typical experiments were shown in (A) and (B). In (C), A549 cells overexpressing cSrc were labeled with NBD-Cer, and then the washed cells were stimulated with 10 mM Na_3VO_4 for 2 hr. In (D), A549 cells treated with the vector for cSrc-shRNA were labeled with NBD-Cer, and then the washed cells were stimulated with 10 mM Na_3VO_4 for 2 hr. Quantitative data were expressed as percentage of the value without Na_3VO_4 in the control cells (E), and the data are means \pm S.D. for the 6 independent experiments. ^a $P < 0.05$, significantly different from the control. ^b $P < 0.05$, significantly different from the values without Na_3VO_4 .

3. 考察

3-1. NBD-cap 産生に対する cSrc の関与

CDase により、NBD-Cer は Sph と NBD-cap に分解される。A549 細胞、HeLa 細胞において、薬物刺激を行っていない basal 状態での NBD-cap の産生量は、SFKs 阻害剤 SU6656、PP2 によって抑制された (Figs. 14A, 15A)。vanadate 処理により、A549 細胞、HeLa 細胞、CHO 細胞において NBD-cap の産生が亢進し、この反応は中性/アルカリ性 CDase 阻害剤である D-erythro-MAPP によって抑制された。細胞における CDase と SFKs の関係を更に調べるために、SFKs に属するタンパク質の一つである cSrc の過剰発現を行った際の細胞のスフィンゴ脂質代謝解析を行った。HeLa 細胞、CHO 細胞に Src を過剰発現させると、vanadate 処理の有無に関わらず NBD-cap 産生は増大した (Fig. 16)。一方、Tet-on システムによる HeLa-Lyn Δ C-HA 細胞を用いて、HeLa 細胞に Lyn を過剰発現させた場合には NBD-cap 産生量に変化は引き起こされなかった (Fig. 16)。A549 細胞に cSrc-shRNA を導入すると、vanadate の有無に関わらず NBD-cap 産生量は抑制された。これらの結果から、D-erythro-MAPP 感受性の CDase 活性が SFKs のうち Lyn ではなく少なくとも cSrc によって正に制御されていることが示された。

5 μ M、10 μ M の SU6656 処置を行った A549 細胞を 2 時間代謝させると、NBD-SM、NBD-GlcCer レベルは変化しなかったが、NBD-Cer レベルが上昇していた (Table 4)。NBD-Cer 量の増加は、CDase により NBD-cap に分解される量が減ったためだと考えられるため、この実験結果はスフィンゴ脂質代謝に対して SU6656 が CDase 以外の代謝酵素による経路には影響を与えずに CDase 経路のみを止めることで、NBD-Cer の増加および NBD-cap の減少をもたらしたことを意味している。このことから、SFKs の阻害は細胞内で CDase が働くメカニズムを直接抑えることが示された。

3-2. アルカリ性 CDase 活性は cSrc によって正の制御を受ける

CDase には一次構造が異なるサブタイプが 5 種存在する (Mao and Obeid, 2008) ことから、SFKs による CDase 活性制御様式についてタンパク質分子レベルでの検討を行うにあたっては SFKs の下流にある CDase のサブタイプの同定を行う必要がある。5 種類の CDase は、至適 pH により酸性 CDase 1 種、中性 CDase 1 種、アルカリ性 CDase 3 種に分類される (Mao and Obeid, 2008)。アルカリ性 CDase 間でのサブタイプは互いにホモログであるため、まずは細胞ホモジネートを用いた *in vitro* CDase assay を行い、SFKs が寄与しているのはどの至適 pH の CDase なのかを絞り込むことにした。その結果、SU6656 処置を行った細胞にて作成したホモジネートでは、pH 8.8 での酵素活性が有意に減少していた (Fig. 18A)。一方で、pH 4.5 や 7.2 での酵素活性は SU6656 処置の有無によって有意な変化は引き起こされなかった。これらの結果から、SFKs の下流に

存在する CDase はアルカリ性 CDase である事が示唆された。Tani ら (1999) は、*in vitro* CDase assay において、NBD 基のついた Cer はアルカリ性 CDase、中性 CDase の作用を受けやすくなるが、酸性 CDase の作用は受けにくくなることを報告している。従って我々が NBD-Cer を用いて行った研究では、pH 4.5 における CDase の活性は生体内での実際の活性よりも低いと思われるが、SU6656 処置により酵素活性は影響を受けなかった。中性 CDase は活性を示す pH の幅が比較的広いことが報告されており、ヒトを含む多くの種において、pH 9 においても pH 7.4 の場合の半分程度の酵素活性を示すことが報告されている (Mitsutake *et al.*, 2001; Olsson *et al.*, 2004; Galadari *et al.*, 2006, Ohlsson *et al.*, 2007)。従って今回 pH 8.8 条件下において得られた CDase 活性には中性セラミダーゼの活性も含まれている可能性がある。

3 種のアルカリ性 CDase は全て Ca^{2+} により活性が増大することが報告されている (Mao and Obeid, 2008; Canals *et al.*, 2011)。中性 CDase についてはヒト (Ohlsson *et al.* 2007)、マウス (Tani *et al.*, 2000)、ラット (Mitsutake *et al.*, 2001) において Ca^{2+} が活性に寄与しないという報告されているが、ヒト中性 CDase の活性が Ca^{2+} により 2 倍程度上昇したとの報告もある (Galadari *et al.*, 2006)。そこで、A549 細胞ホモジネートを用い、pH 7.2、pH 8.8 において Ca^{2+} を添加した際の *in vitro* での CDase 活性を測定した (Figs. 18C, D)。その結果、今回我々が行った実験においては pH 8.8 では Ca^{2+} により CDase 活性が増大したが、pH 7.2 においては CDase 活性の増大は観察されなかった。

SFKs によるシグナルと Ca^{2+} の 2 つの活性化因子によるアルカリ性 CDase の活性増加は独立しているのか、一方の活性化の飽和によって他方も飽和するのかは不明である。そこで、我々は今回の SFKs による CDase 活性の変化について Ca^{2+} 濃度がどのように影響を与えるかを反応系の Ca^{2+} 濃度を振り検討した (Fig. 18B)。その結果、SU6656 を処置した細胞由来のホモジネートにおけるアルカリ性 CDase の酵素活性の低下は、 Ca^{2+} 存在下の方が活性低下の度合いが若干低くなるものの、どの Ca^{2+} 濃度でも活性の抑制がみられた。 Ca^{2+} が存在しない条件でも働き、また Ca^{2+} による活性化最大触媒速度も低下させたことは、アルカリ性 CDase において、SU6656 がアルカリ性 CDase 活性を低下させることに寄与した部位と Ca^{2+} による活性化に寄与した部位が別である事を示唆している。次に、A549 細胞に cSrc の過剰発現および cSrc-shRNA を導入した場合それぞれのホモジネートを作製し、*in vitro* でのアルカリ性 CDase の活性に対する Ca^{2+} の影響について検討した (Figs. 19A, B)。その結果、cSrc 導入細胞を用いた場合は Ca^{2+} の有無に関わらず control 細胞と比較して CDase 活性は増加し、A549-cSrc-shRNA 細胞を用いた場合は Ca^{2+} の有無に関わらず control 細胞よりも CDase 活性は抑制された。いずれの細胞を用いた場合においても Ca^{2+} によるアルカリ性 CDase 活性の上昇が示された。以上の結果から、SFKs による CDase の活性制御は、 Ca^{2+} 濃度による制御とは非依存的な様式でなされている事が強く示唆された。A549 細胞に Ca^{2+} イオノフォアである A23187 を用いた実験においては NBD-cap の産生量は増加しなかった (data not shown) ため、内在性の Ca^{2+} はアルカリ性 CDase の活性化に十分量存在している可能性が考えられる。従ってアルカリ性 CDase において cSrc を介した活性制御が存在するこ

とを見出したことには大きな意義があると考えられる。

アルカリ性 CDase のうち、ACER1 は皮膚のみに高い発現がみられるのに対し、ACER2、ACER3 は哺乳類では様々な組織に広範に発現している (Mao and Obeid, 2008)。*In vitro* において、ACER2 は C6:0-Cer を含む多くの Cer を代謝するのに対し、ACER1 はアシル鎖が C18 よりも短い Cer を代謝せず、ACER3 は C20:4-Cer のような不飽和長鎖 Cer を選択的に分解し、飽和長鎖 Cer や、C6:0-Cer のような短いアシル鎖を持つ Cer は基質としないとの報告がなされている (Mao and Obeid, 2008; Sun *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010)。本研究で我々が基質として用いたのは炭素鎖 6 のアシル基を持つ Cer であることから、本アッセイ系において活性を測定しているアルカリ性 CDase は ACER2 によるものであると示唆される。ACER2、ACER3 はゴルジ装置に局在しており (Mao and Obeid, 2008; Sun *et al.*, 2010)、また cSrc、Lyn も HeLa 細胞においてゴルジ装置への局在が報告されている (Kasahara *et al.*, 2007; Obata *et al.*, 2010)。CDase についてはサイトカインによる活性化が報告されており、チロシンリン酸化シグナルの関与が示唆されている。酸性、中性での CDase 活性について、ラット肝細胞を IL-1 β で 45 分間処理することにより、*in vitro* において pH 5.0、7.2 での CDase 活性が増大するとの報告がある (Nikolova-Karakashian *et al.*, 1997)。Zhu ら (2009) は、ラット膵島 β 細胞に IL-1 β を含むサイトカイン混合物を作用させることで 30 分以内に酸性 CDase の活性が増加することを報告している。Franzen ら (2002) は、中性 CDase が PDGF により PKC を介してリン酸化されるが pH 7.5 における酵素活性はリン酸化による影響を受けないこと、ラット腎メサンギウム細胞において vanadate が酵素活性に影響を与えなかったことから、チロシンホスファターゼは関与していないことを報告している。しかし、一方で Coroneos ら (1995) は、メサンギウム細胞において PDGF/vanadate を処理すると pH 7.4 における CDase 活性を増大させると報告している。これらの報告から、酸性、中性 CDase が外部刺激によって急激な活性化を引き起こすことが示唆される。アルカリ性 CDase についても、ラット肝細胞を IL-1 β で 45 分処理すること、または vanadate を用いることで、pH 9.0 での CDase 活性が増大することが報告されている (Nikolova-Karakashian *et al.*, 1997)。ラット腎メサンギウム細胞に PDGF または vanadate を 1 時間作用させると、pH 9.0 における CDase 活性が上昇し、また PDGF、vanadate を併用することで PDGF の効果がさらに増強されることが報告されている (Coroneos *et al.*, 1995)。今回見出された cSrc によるシグナルがアルカリ性 CDase を最終的にどのような形で活性化するのかについては不明であるが、アルカリ性 CDase がリン酸化されるか否かについては今後検討していく必要があると考えられる。

HeLa 細胞において、血清枯渇条件下で ACER2 の mRNA 発現および ACER2 活性の上昇が引き起こされるという報告 (Xu *et al.*, 2006) があることから、A549 細胞でも同様にアルカリ性 CDase の発現誘導が引き起こされるか検討を行った。その結果、血清枯渇条件下で 24 時間培養した A549 細胞のホモジネートでは、血清を含む培地で培養した場合に比べてアルカリ性 CDase 活性は上昇していた (Figs. 18C, D)。従って、A549 細胞でも同様にアルカリ性 CDase の発現誘導が引き起こされる可能性が示唆された。いく

つかの癌細胞株において ACER2 の発現は上昇しており、S1P の増加を介して細胞の生存・増殖に寄与している (Xu *et al.*, 2006) と報告されている。また、ゴルジ装置において ACER2 が Sph 産生を増大させることにより、 $\beta 1$ インテグリンの成熟が抑制され、細胞接着が阻害されるという報告がある (Sun *et al.*, 2009)。細胞接着が抑制されることにより癌細胞の転移が促進されると考えられる。従って、腫瘍が増殖し、低栄養状態になったときの生存戦略の一つに ACER2 の発現上昇が含まれるのではないかと考えられる。

3-3. CERK による C1P 産生は cSrc を介している

A549 細胞に対して SU6656 を処置する事で、NBD-cap だけでなく NBD-C1P の生成量が減少する事が見出された。従って、細胞レベルでの CERK 活性の上流に SFKs が存在する可能性が示された。細胞における CERK と SFKs の関係を更に調べるために、A549 細胞に対し cSrc の過剰発現および cSrc-shRNA を用いたノックダウンを行った際に NBD-C1P の産生量についても調べた (Fig. 21)。その結果、cSrc の過剰発現を行った場合は NBD-C1P の生成量は vanadate の有無に関わらず有意に増大し、cSrc-shRNA によるノックダウンを行った場合では vanadate の有無に関わらず NBD-C1P は有意に減少した。また、Lyn の過剰発現を行った際には NBD-C1P の生成量に変化はみられなかった (data not shown)。この事から、細胞レベルでの CERK の活性化上流は SFKs が関与し、Lyn ではなく cSrc が少なくとも含まれることを新たに見出した。第 1 章で述べたように、NBD-C1P の産生は vanadate により増大し、チロシンキナーゼ阻害剤 herbimycin により抑制される。CERK は、アデノシン三リン酸から Cer にリン酸基を転移し、C1P を生成する。CERK の活性化には、カルモジュリンが Ca^{2+} センサーとして関与すること (Mitsutake and Igarashi 2005) など、 Ca^{2+} の関与を示す報告がなされているが、活性化の詳細な機構は明らかとなっていない。CERK はタンパク質合成過程における翻訳修飾時に 2 ヶ所のセリン残基がリン酸化されることが分かっているが、このリン酸化を阻害しても CERK 活性には影響がないことが報告されている (Chen *et al.*, 2010)。従って、本研究で示された vanadate による NBD-C1P の産生亢進は、CERK の直接のリン酸化によるものではないと考えられる。Vanadate による NBD-C1P の産生亢進は、SFKs 阻害剤 SU6656、PP2 により抑制されることが示されており (Fig. 20A)、また PKC 阻害剤 Gö6976、GF109203X によっても抑制されるという結果が得られている (Fig. 20B)。SU6656、Gö6976 を併用すると NBD-C1P の産生に対してさらなる抑制効果を示した (Fig. 20C)。本研究で得られた結果だけでは cSrc、PKC がどのように CERK の活性を制御しているのかは不明であるが、*in vitro* における CERK 活性測定や各ドメインを欠損させた CERK を用いることで新たな CERK 活性制御機構を解明することができる可能性がある。

総括

本研究により、NBD-C6-Cer を用いて、その主要な 4 種の代謝物を TLC 法 により同時に分離・検出する方法が確立された。本検出法によって Sph、S1P を検出することはできないが、CDase の活性を測定可能であることは大きな利点であるといえる。本検出法を用い、アルカリ性 CDase の活性制御の上流に SFKs (特に cSrc) が存在する事が示された。さらに、アルカリ性 CDase において、cSrc による活性制御様式はこれまで報告されていた Ca^{2+} の濃度に依存した様式とは独立している事が示された。アルカリ性 CDase において 2 つ以上の活性制御部位が存在することを見出したことは大きな意義があると考えられる。また、血清枯渇条件によりアルカリ性 CDase の活性亢進が引き起こされることを示した。このことから、腫瘍が増殖し低栄養状態になったときの生存戦略の一つにアルカリ性 CDase の発現上昇が含まれ、S1P の増加を介して細胞の生存・増殖に寄与する可能性が示唆された。アルカリ性 CDase のうち、ACER1 は皮膚組織のみに高い発現がみられる (Mao and Obeid, 2008) ことや、ACER3 は不飽和長鎖 Cer を選択的に分解し (Hu *et al.*, 2010)、本研究で我々が基質として用いたのは C6 アシル鎖を持つ Cer であることから、本アッセイ系において活性を測定しているのは ACER2 であることが示唆される。今後、タンパク質レベルでも ACER2 の発現上昇が起きているかを確認することが必要と考えられる。また、CERK についても、SFks 阻害剤、cSrc の過剰発現およびノックダウンを行い、CERK 活性制御の上流に cSrc が存在する事が示唆された。CERK 活性は PKC 阻害剤によっても抑制されるという結果が得られ、SFks 阻害剤、PKC 阻害剤を併用すると CERK 活性に対しさらなる抑制効果を示した。本研究で得られた結果だけでは cSrc、PKC がどのように CERK の活性を制御しているのかは不明であるが、今後 *in vitro* における活性測定や各ドメインを欠損させた CERK などを用いることにより、新たな CERK 活性制御機構の解明が望まれる。

参考文献

- Becker KP, Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Bielawski J, Hannun YA. Selective inhibition of juxtannuclear translocation of protein kinase c β II by a negative feedback mechanism involving Ceramide formed from the salvage pathway. *J. Biol. Chem.* 280: 2606-2612, 2005.
- Beljanski V, Knaak C, Smith CD. A novel sphingosine kinase inhibitor induces autophagy in tumor cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 333: 454-464, 2010.
- Bhattacharyya S, Tracey AS. Vanadium (V) complexes in enzyme systems: aqueous chemistry, inhibition and molecular modeling in inhibitor design. *J. Inorg. Biochem.* 85: 9-13, 2001.
- Bielawska A, Greenberg MS, Perry D, Jayadev S, Shayman JA, McKay C, Hannun YA. (1S,2R)-D-erythro-2-(N-myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol as an inhibitor of ceramidase. *J. Biol. Chem.* 271: 12646-12654, 1996.
- Boath A, Graf C, Lidome E, Ullrich T, Nussbaumer P, Bornancin F. Regulation and traffic of ceramide 1-phosphate produced by ceramide kinase: comparative analysis to glucosylceramide and sphingosine. *J. Biol. Chem.* 283: 8517-8526, 2008.
- Boudker O, Futerman AH. Detection and characterization of ceramide-1-phosphate phosphatase activity in rat liver plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 268: 22150-22155, 1993.
- Baumruker T, Bornancin F, Billich A. The role of sphingosine and ceramide kinases in inflammatory responses. *Immunol. Lett.* 96: 175-185, 2005.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917, 1959.
- Chalfant CE, Spiegel S. Sphingosine 1-phosphate and Ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J. Cell Sci.* 118: 4605-4612, 2005.
- Canals D, Perry DM, Jenkins RW, Hannun YA. Drug targeting of sphingolipid metabolism: sphingomyelinases and ceramidases. *Br. J. Pharmacol.* 163:694-712, 2011.

- Chen WQ, Graf C, Zimmer D, Rovina P, Krapfenbauer K, Jaritz M, Parker PJ, Lubec G, Bornancin F. Ceramide kinase profiling by mass spectrometry reveals a conserved phosphorylation pattern downstream of the catalytic site. *J. Proteome Res.* 9:420-429, 2010.
- Clark CB, Rane MJ, El Mehdi D, Miller CJ, Sachleben Jr, LR, Gozal E. Role of oxidative stress in geldanamycin-induced cytotoxicity and disruption of Hsp90 signaling complex. *Free Radic. Biol. Med.* 47: 1440-1449, 2009.
- Coroneos E, Martinez M, McKenna S, Kester M. Differential regulation of sphingomyelinase and ceramidase activities by growth factors and cytokines. Implications for cellular proliferation and differentiation. *J. Biol. Chem.* 270: 23305-23309, 1995.
- Delgado A, Casas J, Llebaria A, Abad JL, Fabrias G. Inhibitors of sphingolipid metabolism enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758:1957-1977, 2006
- Destandau E, Vial J, Jardya A, Henniona MC, Bonnet D, Lancelin P. Development and validation of a reversed-phase liquid chromatography method for the quantitative determination of carboxylic acids in industrial reaction mixtures. *J. Chromatogr. A.* 1088: 49-56, 2005.
- Don AS, Rosen H. A fluorescent plate reader assay for Ceramide kinase. *Anal. Biochem.* 375: 265-271, 2008.
- Doroshenko N, Doroshenko P. Lanthanum suppresses arachidonic acid-induced cell death and mitochondrial depolarization in PC12 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 567: 36-42, 2007
- Förster A, Emmeler T, Schwalm S, Ebadi M, Heringdorf DM, Nieuwenhuis B, Kleuser B, Huwiler A, Pfeilschifter J. Glucocorticoids protect renal mesangial cells from apoptosis by increasing cellular sphingosine-1-phosphate. *Kidney Int.* 77: 870-879, 2010.
- Franzen R, Fabbro D, Aschrafi A, Pfeilschifter J, Huwiler A. Nitric oxide induces degradation of the neutral ceramidase in rat renal mesangial cells and is counterregulated by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 277: 46184-46190, 2002.
- Fujiwaki T, Hamanaka S, Koga M, Ishihara T, Nishikomori R, Kinoshita E, Furusho K. A case of Farber disease. *Acta Paediatr. Jpn.* 34: 72-79, 1992.
- Fukasawa M, Nishijima M, Hanada K. Genetic evidence for ATP-dependent endoplasmic

- reticulum-to-Golgi apparatus trafficking ceramide for sphingomyelin synthesis in Chinese hamster ovary cells. *J. Cell Biol.* 144: 673-685, 1999.
- Fukasawa M, Nishijima M, Itabe H, Takano T, Hanada K. Reduction of sphingomyelin level without accumulation of ceramide in Chinese hamster ovary cells affects detergent-resistant membrane domains and enhances cellular cholesterol efflux to methyl- β -cyclodextrin. *J. Biol. Chem.* 275: 34028-34034, 2000.
- Fukuyo Y, Inoue M, Nakajima T, Higashikubo R, Horikoshi NT, Hunt C, Usheva A, Freeman ML, Horikoshi N. Oxidative stress plays a critical role in inactivating mutant BRAF by geldanamycin derivatives. *Cancer Res.* 68: 6324-6330, 2008.
- Futerman AH, Riezman H. The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* 15: 312-318, 2005.
- Galadari S, Wu BX, Mao C, Roddy P, El Bawab S, Hannun YA. Identification of a novel amidase motif in neutral ceramidase. *Biochem. J.* 393: 687-695, 2006.
- Gatt S. Enzymatic hydrolysis and synthesis of ceramides. *J. Biol. Chem.* 238: 3131-3133, 1963.
- Gerling N, Culmsee C, Klumpp S, Krieglstein J. The tyrosine phosphatase inhibitor orthovanadate mimics NGF-induced neuroprotective signaling in rat hippocampal neurons. *Neurochem. Int.* 44: 505-520, 2004.
- Gómez-Muñoz A. Ceramide 1-phosphate/ceramide, a switch between life and death. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758: 2049-2056, 2006.
- Gouaze-Andersson V, Cabot MC. Glycosphingolipids and drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758: 2096-2103, 2006.
- Graf C, Rovina P, Tauzin L, Schanzer A, Bornancin F. Enhanced ceramide-induced apoptosis in ceramide kinase overexpressing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354: 309-314, 2007.
- Graf C, Klumpp M, Habig M, Rovina P, Billich A, Baumruker T, Oberhauser B, Bornancin F. Targeting ceramide metabolism with a potent and specific ceramide kinase inhibitor. *Mol. Pharmacol.* 74: 925-932, 2008.

- Granado MH, Gangoiti P, Ouro A, Arana L, Gómez-Muñoz A. Ceramide 1-phosphate inhibits serine palmitoyltransferase and blocks apoptosis in alveolar macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 1791: 263-272, 2009
- Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M, et al. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 426: 803-809, 2003.
- Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 139-150, 2008.
- Hayashi Y, Horibata Y, Sakaguchi K, Okino N, Ito M. A sensitive and reproducible assay to measure the activity of glucosylceramide synthase and lactosylceramide synthase using HPLC and fluorescent substrates. *Anal. Biochem.* 345: 181-186, 2005.
- Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758: 2016-2026, 2006.
- Heneberg P. Use of protein tyrosine phosphatase inhibitors as promising targeted therapeutic drugs. *Curr. Med. Chem.* 16: 706-733, 2009.
- Hirabayashi T, Murayama T, Shimizu T. Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A₂. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 1168-1173, 2004.
- Huyer G, Liu S, Kelly J, Moffat J, Payette P, Kennedy B, Tsaprailis G, Gresser MJ, Ramachandran C. Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J. Biol. Chem.* 272: 843-851, 1997.
- Hu W, Xu R, Sun W, Szulc ZM, Bielawski J, Obeid LM, Mao C. Alkaline ceramidase 3 (ACER3) hydrolyzes unsaturated long-chain ceramides, and its down-regulation inhibits both cell proliferation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 285: 7964-7976, 2010.
- Kasahara K, Nakayama Y, Kihara A, Matsuda D, Ikeda K, Kuga T, Fukumoto Y, Igarashi Y, Yamaguchi N. Rapid trafficking of c-Src, a non-palmitoylated Src-family kinase, between the plasma membrane and late endosomes/lysosomes. *Exp. Cell Res.* 313: 2651-2666, 2007.
- Kim S, Kang J, Hu W, Evers BM, Chung DH. Geldanamycin decreases Raf-1 and Akt levels

- and induces apoptosis in neuroblastomas. *Int. J. Cancer.* 103: 352-359, 2003.
- Kim YK, Sakong J, Cho KH, Lee CO. Vanadate-sensitive microsomal ATPase and microsomal $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in tracheal epithelial cells. *J. Biochem. (Tokyo).* 124: 1094-1100, 1998.
- Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell. Signal.* 20: 1010-1018, 2008.
- Kobayashi N, Kobayashi N, Yamaguchi A, Nishi T. Characterization of the ATP-dependent sphingosine 1-phosphate transporter in rat erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 284: 21192-21200, 2009.
- Koch J, Gärtner S, Li CM, Quintern LE, Bernardo K, Levrán O, Schnabel D, Desnick RJ, Schuchman EH, Sandhoff K. Molecular cloning and characterization of a full-length complementary DNA encoding human acid ceramidase. Identification Of the first molecular lesion causing Farber disease. *J. Biol. Chem.* 271: 33110-33115, 1996.
- Kuga T, Nakayama Y, Hoshino M, Higashiyama Y, Obata Y, Matsuda D, Kasahara K, Fukumoto Y, Yamaguchi N. Differential mitotic activation of endogenous c-Src, c-Yes, and Lyn in HeLa cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 466: 116-124, 2007
- Kumada H, Mitsutake S, Inagaki Y, Mitsunaga S, Tsuchikawa H, Katsumura S, Igarashi Y. Kinetics of the ceramide kinase inhibitor K1, a suppressor of mast-cell activation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 2581-2584, 2007.
- Kurosawa T, Nakamura H, Yamaura E, Fujino H, Matsuzawa Y, Kawashima T, Murayama T. Cytotoxicity induced by inhibition of thioredoxin reductases via multiple signaling pathways: role of cytosolic phospholipase A₂α-dependent and -independent release of arachidonic acid. *J. Cell. Physiol.* 219: 606-616, 2009.
- Lahiri S, Futerman AH. The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell Mol. Life Sci.* 64: 2270-2284, 2007.
- Lamour NF, Stahelin RV, Wijesinghe DS, Maceyka M, Wang E, Allegood JC, Merrill AH Jr, Cho W, Chalfant CE. Ceramide kinase uses ceramide provided by ceramide transport protein: localization to organelles of eicosanoid synthesis. *J. Lipid Res.* 48: 1293-1304, 2007.

- Li CM, Hong SB, Kopal G, He X, Linke T, Hou WS, Koch J, Gatt S, Sandhoff K, Schuchman EH. Cloning and characterization of the full-length cDNA and genomic sequences encoding murine acid ceramidase. *Genomics*. 50: 267-274, 1998.
- Li CM, Park JH, Simonaro CM, He X, Gordon RE, Friedman AH, Ehleiter D, Paris F, Manova K, Hepbaldikler S, Fuks Z, Sandhoff K, Kolesnick R, Schuchman EH. Insertional mutagenesis of the mouse acid ceramidase gene leads to early embryonic lethality in homozygotes and progressive lipid storage disease in heterozygotes. *Genomics*. 79: 218-224, 2002.
- Liu YY, Yu JY, Yin D, Patwardhan GA, Gupta V, Hirabayashi Y, Holleran WM, Giuliano AE, Jazwinski SM, Gouaze-Andersson V, Consoli DP, Cabot MC. A role for ceramide in driving cancer cell resistance to doxorubicin. *FASEB J*. 22: 2541-2551, 2008.
- Lu A, Ran R, Parmentier-Batteur S, Nee A, Sharp FR. Geldanamycin induces heat shock proteins in brain and protects against focal cerebral ischemia. *J. Neurochem*. 81: 355-364, 2002.
- Lu Y, Ansar S, Michaelis ML, Blagg BSJ. Neuroprotective activity and evaluation of Hsp90 inhibitors in an immortalized neuronal cell line. *Bioorg. Med. Chem*. 17: 1709-1715, 2009.
- Mahdy AE, Cheng JC, Li J, Elojeimy S, Meacham WD, Turner LS, Bai A, Gault CR, McPherson AS, Garcia N, Beckham TH, Saad A, Bielawska A, Bielawski J, Hannun YA, Keane TE, Taha MI, Hammouda HM, Norris JS, Liu X. Acid ceramidase upregulation in prostate cancer cells confers resistance to radiation: AC inhibition, a potential radiosensitizer. *Mol. Ther*. 17: 430-438, 2009.
- Mano N, Oda Y, Yamada K, Asakawa N, Katayama K. Simultaneous quantitative determination method for sphingolipid metabolites by liquid chromatography/ion spray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem*. 244: 291-300, 1997.
- Mao C, Obeid LM. Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta*. 1781: 424-434, 2008.
- Mao C, Xu R, Szulc ZM, Bielawska A, Galadari SH, Obeid LM. Cloning and characterization of a novel human alkaline ceramidase. A mammalian enzyme that hydrolyzes phytoceramide. *J. Biol. Chem*. 276: 26577-26588, 2001.

- Maceyka M. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1585:193-201, 2002.
- Matsuzawa Y, Kiuchi Y, Toyomura K, Matsumoto I, Nakamura H, Fujino H, Murayama T, Kawashima T. Activation of cytosolic phospholipase A₂α by epidermal growth factor (EGF) and phorbol ester in HeLa cells: different effects of inhibitors for EGF receptor, protein kinase C, Src, and C-raf. *J. Pharmacol. Sci.* 111: 182-192, 2009.
- Meyuhas D, Yedgar S, Rotenberg M, Reisfeld N, Lichtenberg D. The use of C6-NBD-PC for assaying phospholipase A₂-activity: scope and limitations. *Biochim. Biophys. Acta.* 1124: 223-232, 1992.
- Mitsutake S, Igarashi Y. Calmodulin is involved in the Ca²⁺- dependent activation of ceramide kinase as a calcium sensor. *J. Biol. Chem.* 280: 40436-40441, 2005.
- Mitsutake S, Kim TJ, Inagaki Y, Kato M, Yamashita T, Igarashi Y. Ceramide kinase is a potent mediator of calcium-dependent degranulation in mast cells. *J. Biol. Chem.* 279: 17570-17577, 2004.
- Mitsutake S, Tani M, Okino N, Mori K, Ichinose S, Omori A, Iida H, Nakamura T, Ito M. Purification, characterization, molecular cloning, and subcellular distribution of neutral ceramidase of rat kidney. *J. Biol. Chem.* 276: 26249-26259, 2001.
- Muramatsu T, Sakai N, Yanagihara I, Yamada M, Nishigaki T, Kokubu C, Tsukamoto H, Ito M, Inui K. Mutation analysis of the acid ceramidase gene in Japanese patients with Farber disease. *J Inherit Metab. Dis.* 25: 585-592, 2002.
- Myung SJ., Yoon JH, Kim BH, Lee JH, Jung EU, Lee HS. Heat shock protein 90 inhibitor induces apoptosis and attenuates activation of hepatic stellate cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330: 276-282, 2009
- Nakamura H, Hirabayashi T, Shimizu M, Murayama T. Ceramide-1-phosphate activates cytosolic phospholipase A₂α directly and by PKC pathway. *Biochem. Pharmacol.* 71: 850-857, 2006.
- Nakamura H, Wakita S, Suganami A, Tamura Y, Hanada K, Murayama T. Modulation of the activity of cytosolic phospholipase A₂α (cPLA₂α) by cellular sphingolipids; inhibition of cPLA₂α by sphingomyelin. *J. Lipid Res.* 51: 720-728, 2010.

- Nakamura H, Yasufuku K, Makiyama T, Matsumoto I, Fujino H, Murayama T. Arachidonic acid metabolism via cytosolic phospholipase A₂ α induces cytotoxicity in Niemann-Pick disease type C cells. *J. Cell. Physiol.* 227: 2847-2855, 2012.
- Neckers L, Workman P. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clin. Cancer Res.* 18: 64-76, 2012.
- Nikolova-Karakashian M, Morgan ET, Alexander C, Liotta DC, Merrill Jr AH. Bimodal regulation of ceramidases by interleukin-1 β . *J. Biol. Chem.* 272: 18718-18724, 1997.
- Obata Y, Fukumoto Y, Nakayama Y, Kuga T, Dohmae N, Yamaguchi N. The Lyn kinase C-lobe mediates Golgi export of Lyn through conformation-dependent ACSL3 association. *J. Cell Sci.* 123: 2649-2662, 2010.
- Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Cancer.* 4:604-616, 2004.
- Ohlsson L, Palmberg C, Duan RD, Olsson M, Bergman T, Nilsson A. Purification and characterization of human intestinal neutral ceramidase. *Biochimie.* 89: 950-960, 2007.
- Olsson M, Duan RD, Ohlsson L, Nilsson A. Rat intestinal ceramidase: purification, properties, and physiological relevance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 287: G929-937, 2004.
- Park JH, Schuchman EH. Acid ceramidase and human disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758: 2133-2138, 2006.
- Pettus BJ, Bielawska A, Spiegel S, Roddy P, Hannun YA, Chalfant CE. Ceramide kinase mediates cytokine- and calcium ionophore-induced arachidonic acid release. *J. Biol. Chem.* 278: 38206-38213, 2003.
- Pettus BJ, Bielawska A, Subramanian P, Wijesinghe DS, Maceyka M, Leslie CC, Evans JH, Freiberg J, Roddy P, Hannun YA, Chalfant CE. Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 279: 11320-11326, 2004.
- Posse de Chaves EI. Sphingolipids in apoptosis, survival and regeneration in the nervous system. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1758: 1995-2015, 2006.

- Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp. Biol. Med.* 228: 111-133, 2003.
- Radin N.S. Killing tumours by ceramide-induced apoptosis: a critique of available drugs. *Biochem. J.* 371: 243-256, 2003.
- Romero C, Benedí J, Villar A, Martín-Aragón S. Involvement of Hsp70, a stress protein, in the resistance of longterm culture of PC12 cells against sodium nitroprusside (SNP)-induced cell death. *Arch. Toxicol.* 84: 699-708, 2010.
- Saito M, Saito M, Cooper TB, Vadasz C. Ethanol-induced changes in the content of triglycerides, ceramides, and glucosylceramides in cultured neurons. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29: 1374-1383, 2005.
- Sakurai H. A new concept: the use of vanadium complexes in the treatment of diabetes mellitus. *Chem. Rec.* 2: 237-248, 2002.
- Salehi AH, Morris SJ, Ho WC, Dickson KM, Doucet G, Milutinovic S, Durkin J, Gillard JW, AEG3482 is an antiapoptotic compound that inhibits Jun kinase activity and cell death through induced expression of heat shockprotein 70. *Chem. Biol.* 13: 213-223, 2006.
- Sano M. Radicicol and geldanamycin prevent neurotoxic effects of anti-cancer drugs on cultured embryonic sensory neurons. *Neuropharmacology.* 40: 947-953, 2001.
- Schenck M, Carpinteiro A, Grassmé H, Lang F, Gulbins E. Ceramide: physiological and pathophysiological aspects. *Arch. Biochem. Biophys.* 462: 171-175, 2007.
- Shimizu M, Tada E, Makiyama T, Yasufuku K, Fujino H, Nakamura H, et al. Effects of ceramide, ceramidase inhibition and expression of ceramide kinase on cytosolic phospholipase A₂α; additional role of ceramide-1-phosphate in phosphorylation and Ca²⁺ signaling. *Cell. Signal.* 21: 440-447, 2009.
- Shimma N, Akiyama N, Umezawa M, Okuma Y, Nomura Y, Saito T, Horie S, Murayama T. Possible role of interleukin-6 in PC12 cell death induced by MPP⁺ and tetrahydroisoquinoline. *J. Pharmacol. Sci.* 93: 471-477, 2003.
- Shinghal R, Scheller RH, Bajjalieh SM. Ceramide 1-phosphate phosphatase activity in brain. *J. Neurochem.* 61: 2279-2285, 1993.

- Slife CW, Wang E, Hunter R, Wang S, Burgess C, Liotta DC, Merrill AH Jr. Free sphingosine formation from endogenous substrates by a liver plasma membrane system with a divalent cation dependence and a neutral pH optimum. *J. Biol. Chem.* 264: 10371-10377, 1989.
- Sugita M, Dulaney JT, Moser HW. Ceramidase deficiency in Farber's disease (lipogranulomatosis). *Science.* 178: 1100-1102, 1972.
- Sugita M, Williams M, Dulaney JT, Moser HW. Ceramidase and ceramide synthesis in human kidney and cerebellum. Description of a new alkaline ceramidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 398: 125-131, 1975.
- Sugiura M, Kono K, Liu H, Shimizugawa T, Minekura H, Spiegel S, et al. Ceramide kinase, a novel lipid kinase. *J. Biol. Chem.* 277: 23294-23300, 2002.
- Sun W, Hu W, Xu R, Jin J, Szulc ZM, Zhang G, Galadari SH, Obeid LM, Mao C. Alkaline ceramidase 2 regulates beta1 integrin maturation and cell adhesion. *FASEB J.* 23: 656-666, 2009.
- Sun W, Jin J, Xu R, Hu W, Szulc ZM, Bielawski J, Obeid LM, Mao C. Substrate specificity, membrane topology, and activity regulation of human alkaline ceramidase 2 (ACER2). *J. Biol. Chem.* 285: 8995-9007, 2010.
- Szántó S, Csermely P, Kovács I, Csongor J, Illés Á, Bakó G, Szegedi G, Sipka S. Inhibition of arachidonic acid release from human peripheral mononuclear cells by heat shock treatment and geldanamycin. *Immunol. Lett.*, 83: 181-185, 2002.
- Tada E, Toyomura K, Nakamura H, Sasaki H, Saito T, Kaneko M, Okuma Y, Murayama T. Activation of Ceramidase and ceramide kinase by vanadate via a tyrosine kinasemediated pathway. *J. Pharmacol. Sci.* 114: 420-432, 2010.
- Taha TA, Mullen TD, Obeid LM. A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758: 2027-2036, 2006.
- Tani M, Okino N, Mitsutake S, Ito M. Specific and selective assay for alkaline and neutral ceramidases involving C12-NBDceramide. *J. Biochem. (Tokyo).* 125: 746-749, 1999.
- Tani M, Okino N, Mitsutake S, Tanigawa T, Izu H, Ito M. Purification and characterization of a

- neutral ceramidase from mouse liver. A single protein catalyzes the reversible reaction in which ceramide is both hydrolyzed and synthesized. *J. Biol. Chem.* 275: 3462-3468, 2000.
- Taniguchi T, Shimizu M, Nakamura H, Hirabayashi T, Fujino H, Murayama T. Hydrogen peroxide-induced arachidonic acid release in L929 cells: roles of Src, protein kinase C and cytosolic phospholipase A₂α. *Eur. J. Pharmacol.* 546: 1-10, 2006.
- Taniguchi T, Shimizu M, Nakamura H, Hirabayashi T, Fujino H, Saito T, Murayama T. Vanadate-induced activation of cytosolic phospholipase A₂α in L929 cells: roles of tyrosine kinase, protein kinase C, and extracellular signal-regulated kinase. *Biochem. Pharmacol.* 73: 854-862, 2007
- Thompson KH, Lichter J, LeBel C, Scaife MC, McNeill JH, Orvig C. Vanadium treatment of type 2 diabetes: a view to the future. *J. Inorg. Biochem.* 103: 554-558, 2009.
- Toyomura K, Saito T, Emori S, Matsumoto I, Kato E, Kaneko M, Okuma Y, Nakamura H, Murayama T. Effects of Hsp90 inhibitors, geldanamycin and its analog, on ceramide metabolism and cytotoxicity in PC12 cells. *J. Toxicol. Sci.* 37: 1049-1057, 2012.
- Törnquist K, Dugué B, Ekokoski E. Protein tyrosine phosphorylation and calcium signaling in thyroid FRTL-5 cells. *J. Cell. Physiol.* 175: 211-219, 1998.
- Tucker DE, Gijón MA, Spencer DM, Qiu ZH, Gelb MH, Leslie CC. Regulation of cytosolic phospholipase A₂α by hsp90 and a p54 kinase in okadaic acid-stimulated macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 84: 798-806, 2008.
- Van Overloop H, Gijbbers S, Van Veldhoven PP. Further characterization of mammalian ceramide kinase: substrate delivery and (stereo)specificity, tissue distribution, and subcellular localization studies. *J. Lipid Res.* 47: 268-283, 1998.
- Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, et al. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature.* 380: 75-79, 1996.
- Walker T, Mitchell C, Park MA, Yacoub A, Rahmani M, Häussinger D, Reinehr R, Voelkel-Johnson C, Fisher PB, Grant S, Dent P. 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin and MEK1/2 inhibitors kill GI tumor cells via Ca²⁺-dependent suppression of GRP78/BiP and induction of ceramide and reactive oxygen species. *Mol. Cancer Ther.* 9: 1378-1395, 2010

- Wandinger SK, Richter K, Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* 283: 18473-18477, 2008.
- Xu R, Jin J, Hu W, Sun W, Bielawski J, Szulc Z, Taha T, Obeid LM, Mao C. Golgi alkaline ceramidase regulates cell proliferation and survival by controlling levels of sphingosine and S1P. *FASEB J.* 20: 1813-1825, 2006.
- Yavin E, Gatt S. Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. 8. Further purification and properties of rat brain ceramidase. *Biochemistry.* 8: 1692-1698, 1969.
- Yoo HH, Son J, Kim DH. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of ceramide and related lipid species in cellular extracts. *J. Chromatogr. B.* 843: 327-333, 2006.
- Zeidan Y.H. and Hannun Y.A. Translational aspects of sphingolipid metabolism. *Trends Mol. Med.* 13: 327-336, 2007.
- Zheng WH, Kar S, Quirion R. Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of the forkhead family transcription factor FKHRL1 is mediated by Akt kinase in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 275: 39152-39158, 2000.
- Zhu Q, Shan X, Maio H, Lu Y, Xu J, You N, et al. Acute activation of acid ceramidase affects cytokine-induced cytotoxicity in rat islet β -cells. *FEBS Lett.* 583: 2136-2141, 2009.

論文目録

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. Tada E*, Toyomura K*, Nakamura H, Sasaki H, Saito T, Kaneko M, Okuma Y, Murayama T. (*Co-top authors) Activation of ceramidase and ceramide kinase by vanadate via a tyrosine kinase-mediated pathway. J. Pharmacol. Sci. 114: 420-432, 2010.
2. Toyomura K, Saito T, Emori S, Matsumoto I, Kato E, Kaneko M, Okuma Y, Nakamura H, Murayama T. Effects of Hsp90 inhibitors, geldanamycin and its analog, on ceramide metabolism and cytotoxicity in PC12 cells. J. Toxicol. Sci. 37: 1049-1057, 2012.

副論文目録

1. Fujino H*, Toyomura K*, Chen XB, Regan JW, Murayama T. (*Co-top authors) Prostaglandin E₂ regulates cellular migration via induction of vascular endothelial growth factor receptor-1 in HCA-7 human colon cancer cells. Biochem. Pharmacol. 81: 379-387, 2011.
2. Matsuzawa Y, Kiuchi Y, Toyomura K, Matsumoto I, Nakamura H, Fujino H, Murayama T, Kawashima T. Activation of cytosolic phospholipase A₂alpha by epidermal growth factor (EGF) and phorbol ester in HeLa cells: different effects of inhibitors for EGF receptor, protein kinase C, Src, and C-Raf. J. Pharmacol. Sci. 111: 182-192, 2009.

謝辞

本研究の遂行に際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院薬効薬理学研究室 村山俊彦教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、多大なる御協力、御助言を頂きました千葉大学大学院薬学研究院薬効薬理学研究室 藤野裕道准教授、中村浩之助教に厚く御礼申し上げます。

さらに、本論文を審査いただき、貴重な御助言を賜りました千葉大学大学院薬学研究院分子細胞生物学研究室 山口直人教授、高齢者薬剤学研究室 上野光一教授、生物薬剤学研究室 堀江利治教授に深く感謝いたします。

また、NBD-C6-ceramide、NBD-caproic acid を御供与頂き、貴重な御助言を頂きました薬品合成化学研究室 西田篤司教授と院生の皆様、プラスミド (pcDNA TO/cSrc, pENTR4-HI/shRNA for cSrc)、HeLa-Lyn Δ C-HA 細胞を御供与頂き、貴重な御助言を頂きました分子細胞生物学研究室 山口直人教授、CERK の cDNA を御供与頂きました第一三共株式会社の古濱孝文博士に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究を通じ御協力を頂きました千葉大学大学院薬学研究院薬効薬理学研究室の卒業生ならびに在校生の皆様に深く感謝いたします。

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 薬学博士 山口 直人

副査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 薬学博士 堀江 利治

副査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 薬学博士 上野 光一