



Sphingosine Kinase 2 is a Nuclear Protein and Inhibits DNA Synthesis

五十嵐, 宣明

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-01-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2928

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002928>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 84 】

氏 名・(本 籍) 五十嵐 宣明 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学 位 記 番 号 博い第1544号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成16年1月31日

【 学位論文題目 】

sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and
inhibits DNA synthesis

(スフィンゴシンキナーゼ2は核タンパク質であり、
DNA合成を阻害する)

審 査 委 員

主 査 教 授 中村 俊一

教 授 山村 博平

教 授 横山 光宏

【緒言】

スフィンゴシンキナーゼ(SPHK)はスフィンゴシンをリン酸化し細胞内のスフィンゴシン1リン酸(SPP)を産生する脂質リン酸化酵素である。SPPは、カルシウム動員、細胞増殖、分化、細胞骨格系の構築、抗アポトーシス能といった生理的または病理的な様々な過程において、細胞内もしくは細胞外で作用する情報伝達物質である。現在、哺乳類では二種類のSPHKサブタイプSPHK1とSPHK2が同定されている。SPHK1は主に細胞質に分布し、細胞増殖や抗アポトーシス作用を有することが知られる。一方、SPHK2に関しては、その生理作用は不明であった。今回の研究では、SPHK2が核移行シグナル(NLS)を有する核蛋白質であり、DNA合成抑制能を有することを明らかにしたので報告する。

【方法】

プラスミドcDNAと変異体

SPHK1はマウスの脳から、またSPHK2はヒトの肝臓及びマウスの腎臓からクローニングし、N末端にHAタグ(HA-SPHK)もしくはC末にGFPタグ(SPHK-GFP)と融合したプラスミドとして作成し、細胞内に発現させて使用した。また、SPHK2のNLSを同定するために、SPHK2のN末端、C末端、中間部をそれぞれ欠損させた変異体とNLS部位に点変異させたものを使用した。

免疫細胞染色

スライド内の細胞にFugene6投与下にプラスミドcDNAを導入し、蛋白質として発現させた後、我々が作成した、ヒトSPHK2に対するウサギポリクロナール抗体を用いて免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて細胞内局在を観察した。

細胞核の調整

スクロース勾配と超遠心により細胞質分画と核分画とを分離し、核分画を免疫沈降やSPHK活性測定のための試料として使用した。

SPHKの活性測定

SPHKの活性測定は $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ と基質であるスフィンゴシンの存在下で、*in vitro*の条件でリン酸化反応をおこない、産生された ^{32}P SPPを薄層クロマトグラフィーを用いて分離し、定量を行った。

DNA合成の測定

目的遺伝子を導入し培養したNIH3T3細胞を、プロモデオキシウリジン(BrdU)で標識し、抗BrdU抗体と抗HA抗体を用いて免疫細胞染色を行ない、目的遺伝子を発現した細胞の内、BrdUで標識された細胞数を数えDNA合成の測定を行った。

また、SPHK2を発現するHeLa細胞の安定株を用いて、 ^3H チミジンの細胞内への取り込みを測定することでもDNA合成を測定した。

フローサイトメトリー

NIH3T3細胞に対照群としてGFPを単独導入したものと、SPHK2を導入したものを用意し、ダブルサイミジン・ブロックを用いて細胞を同調培養し、プロピディウムイオダイド(PI)で細胞核を染色した。FACSCaliburにてGFPとPI色素を解析し細胞周期解析を行った。

【結果】

SPHK2は主に細胞核に局在する

SPHK2-GFPをCOS7細胞に導入したところ、SPHK2は主に細胞核に局在することが判明した。ヒトSPHK2をHela細胞に導入し抗ヒトSPHK2抗体による免疫細胞染色でも同様の結果を得た。次に内因性SPHK2の細胞核への局在を生化学的手法により確認した。細胞核画分を回収し、これを抗ヒトSPHK2抗体で免疫沈降反応を行なったところ、免疫沈降物中にSPHK活性を認め、ウェスタンブロットングにおいてもこの試料内にSPHK2の分子量に相当するバンドを認めた。

NLSはSPHK2のN末端に存在する

マウスSPHK2はマウスSPHK1と比較してN末端と中間部に相同性の認められない配列を有しており、これらの部位が核への局在に関係していると考え、それぞれの部位を欠損させた変異体を作成して免疫細胞染色を行った。中間部欠損SPHK2では変化が認められなかったが、N末端欠損SPHK2では核移行能が欠損していたため、この部位にNLSが存在すると考えられた。

SPHK2のNLS配列の同定

SPHK2のN末部に、以前から報告されているNLS配列に近い配列としてアルギニンの豊富な配列部位を発見した。この配列内の93番目と94番目のアルギニンをグルタミン酸に変異させた点変異体(SPHK2R93E/R94E)を作成し免疫細胞染色を行ったところ、SPHK2R93E/R94Eは核移行能に欠損が認

められた。これにより同部位がNLSであることが判明した。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

SPHK2はDNA合成を抑制する

SPHK2を安定的に発現するHeLa細胞の安定株を使用して、チミジンの細胞内取込み率を指標にDNA合成を測定した。ドキシサイクリン誘導により細胞内にSPHK2を発現させたものは、誘導発現させなかった対照に比べ約50%のチミジンの細胞内取込み率の抑制を認めた。

核内移行はSPHK2がDNA合成抑制するために必要

SPHK2をNIH3T3細胞に発現させ、BrdUの取り込みを指標にDNA合成を測定すると、対照細胞に比較してDNA合成は著明に抑制されていた。SPHK1を導入したものでは以前の報告のように、BrdUの取り込みは約40%亢進した。核内移行欠損変異体SPHK2R93E/R94Eを導入したものでは、DNA合成の抑制は解除されており、またSPHK1が核内移行能を獲得した変異体NLS-SPHK1（SPHK2のNLS部位をSPHK1のN末端に融合させたもの）では、DNA合成は抑制されていた。以上の結果から、SPHK2の核内移行がDNA抑制に必要なことが分かった。

SPHK2の発現は細胞周期をG1/S期で停止させる

SPHK2-GFPをNIH3T3細胞に発現したものと、対照細胞としてGFP単独をNIH3T3細胞に発現したものを用意した。ダブルチミジン・ブロックによりG1/S期停止を行なった後、チミジン添加により細胞周期を再開させ、0時間、3時間、9時間後にフローサイトメトリーで細胞周期を解析した。9時間後でG2/M期に達していた細胞は、対照細胞ではほぼ40%であったのに対し、SPHK2-GFP発現細胞では7%のみで、後者ではG1/S期停止が認められた。

【考察】

SPHK1と異なり、SPHK2が核蛋白質であり、DNA合成抑制能を有することを初めて明らかにした。これまでスフィンゴミエリンの代謝産物による細胞機能の調節を説明するのに、「rheostatモデル」がよく使われてきた。これは細胞内のセラミドとスフィンゴシンの総和に対するSPPの比が大きければ、細胞はアポトーシスの方向に進み、小さければ細胞増殖の方向に進むとする説である。今回の結果から、これらの細胞機能の調節は単なるスフィンゴミエリン代謝産物の比により決定されるのではなく、SPPの細胞内局在も重要な要素であることから、「rheostatモデル」に修正が必要となるであろう。核内でのSPP結合タンパク質の同定が今後の重要課題である。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲第1545号	氏名	五十嵐 宣明
論文題目	Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis スフィンゴシンキナーゼ2は核タンパク質であり、DNA合成を阻害する		
審査委員	主 査 中村 俊一 副 査 山 田 隆 平 副 査 山 田 光 彦		
審査終了日	平成15年12月26日		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

【はじめに】

スフィンゴシン-1-リン酸 (SPP) は細胞外及び細胞内で作用する情報伝達物質として細胞増殖、アポトーシスの抑制、細胞運動の亢進など多岐にわたる細胞機能の調節に関わっている。SPP を産生する酵素、スフィンゴシン・キナーゼ SPHK には SPHK1 と SPHK2 の2種類のアイソザイムが知られる。SPHK1 は多くの研究者により解析がなされ、その細胞生物学的な特徴が明らかにされている。一方、SPHK2 は細胞に於ける機能に関して不明であった。今回の研究では SPHK2 の細胞機能を明らかにする目的で、SPHK2 を過剰発現した細胞を用いてその細胞内局在を調べたところ、SPHK1 と異なり SPHK2 は主に核内に存在することを明らかにした。そこで、SPHK2 の核内移行のメカニズム並びに核内移行の細胞に及ぼす効果について解析をおこなった。

【方法】

＜SPHK1, SPHK2 の cDNA クローニング並びに各種変異体の作成＞

マウス SPHK1 及び SPHK2 はそれぞれマウスの脳および腎臓の cDNA ライブラリーより PCR を用いて作成した。点変異体の作成に関しては、Stratagene 社のキットを使用した。

＜共焦点顕微鏡＞

10⁶ 個/ml の形質転換 COS7 細胞をカバースリップ上で培養し、4% パラホルムアルデヒドで固定、0.2% Triton X-100 で可溶化処理、1% BSA でブロッキング、抗体処理を行い、共焦点顕微鏡で観察した。

＜Bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込み測定＞

NIH3T3 細胞をチャンバースライド上で培養し、SPHK2 をトランスフェクト後2日目に 10 mM BrdU で3時間細胞を処理した後、Roche 社のキットを用いて BrdU 取り込みを測定した。

【結果】

SPHK2 を COS7 細胞に発現させたところ、多くが核内に分布し、一部は細胞質に認められた。一方、SPHK1 は従来の報告通り、細胞質に大部分が分布し、核内には認められなかった。

SPHK2 は SPHK1 の N 末部分と中央部にそれぞれ相同性の認められない約 130 アミノ酸と 120 アミノ酸の挿入が存在することが知られる。SPHK2 に特異的な核移行シグナル (NLS) は、これらの2カ所の挿入部分のいずれかに存在すると考え、これらの挿入部分を欠損した変異体を作成し、核内移行を解析した。中央部分の欠損体では野生型と同じく核内に分布するのに対し、N 末部分の欠損体では核に移行することが出来なかった。このことから SPHK2 の N 末に NLS が存在すると予測された。更に N 末部分に存在する塩基性アミノ酸のクラスター部分に点変異を導入したところ、変異体は核移行能を消失していた。これらの結果から新たな NLS 配列 R/KRxxRR/K を同定した。

次に SPHK2 発現による DNA 合成への影響を調べたところ、SPHK2 発現により著明な DNA 合成阻害が認められた。一方、SPHK1 発現では従来の報告通り、DNA 合成の促進が認められた。更に、核移行能の消失した変異体 (N 末欠損体、NLS の点変異体) では野生株に認められた DNA 合成阻害効果は消失していた。尚、これらの変異体では野生株と同程度の活性は保たれていた。

【考察】

これまで SPHK1 が細胞増殖作用を有することから、スフィンゴシン 1 リン酸が細胞増殖作用や抗アポトーシス作用を有すると信じられてきた。しかし今回の研究結果から、SPHK (恐らく SPP) の存在部位により DNA 合成に対する効果が全く異なることが明らかにされた。今後、細胞質並びに核に於けるスフィンゴシン 1 リン酸の受容体を同定することが必須の課題であると考えられる。

本研究は、SPHK2 が新規核移行シグナルを有する核タンパク質であること、更に SPHK2 の核移行に伴い DNA の合成を抑制することを初めて見出したものであり、スフィンゴシン 1 リン酸を介する細胞内情報伝達機構を理解する上で重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。