

新規角質保護素材応用へ向けた 抗炎症性スフィンゴ糖脂質の精製と性質解明に関する研究

独立行政法人産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門

奥田 徹哉

In several vascular inflammatory reactions, inflammatory mediators lead to the activation of vascular endothelial cells (EC). To date, a number of functional molecules induced on the surface of activated-EC have been identified. In this study, we found Globotetraosylceramide (Gb4), a glycosphingolipid expressed in EC, as a novel inducible molecule on EC activated by TNF- α . After TNF- α stimulation for 24 hours, the expression level of Gb4 in activated-EC became approximately three times higher than that of non-treated EC. MALDI-TOFMS analysis revealed that the enhanced Gb4 predominantly contains C24:0 or C24:1 fatty acids in the ceramide moiety. Isolated caveolae/lipid raft-enriched detergent insoluble membrane domains in activated-EC predominantly contain this molecular species of Gb4 (C24-Gb4). Real time RT-PCR analysis revealed that the increased expression of C24-Gb4 was regulated by transcriptional control of key genes for C24-Gb4 synthesis. These observations suggest that Gb4, especially those containing a very long chain fatty acid, play an important role in the inflammatory response of EC.

1. 緒言

セラミドやセラミドより合成されるスフィンゴリピッドは、皮膚表面の角質保護成分として利用されている。これらは水に対して難溶性であるため、角質層内へ効率よく水分を維持するための重要なブロックとして機能する。スフィンゴ糖脂質は皮膚に存在するスフィンゴリピッド成分の一つであり、セラミドとこれに結合する糖鎖から成る分子である。なかでも中性糖から構成される中性スフィンゴ糖脂質 (Neutral glycosphingolipids: N-GSL) は、難水溶性かつエタノールなどの極性の高い有機溶媒へ容易に可溶化できる性質を兼ね備えている。このセラミドよりも加工しやすい性質から、近年、新規な化粧品素材として注目されている。これまでの関連研究では、生体内におけるスフィンゴ糖脂質の発現量を、遺伝子工学的手法に基づき変化させたマウスにおいて、皮膚の異物に対する反応が過敏になり、難治性の皮膚炎が発症することが報告されている¹⁻²⁾。しかしながら、スフィンゴ糖脂質の変化と皮膚炎症との因果関係については未だ不明である。

我々はこれまでの研究過程にて、初代培養下のヒト臍帯由来血管内皮細胞を炎症性サイトカインにより刺激し炎症応答を惹起させると、細胞のN-GSL成分が増大する現象を発見した³⁻⁴⁾。この増大現象は、細胞の炎症応答が衰退し始める時期に一致して観察されることから、炎症の抑制に関与する現象であると推察される。我々は、この増大す

る成分中に抗炎症活性を有するスフィンゴ糖脂質が含まれると予想し、その検証に向けて解析を進めている。本研究期間では、目的とするN-GSL成分の組成分析及び主要成分の構造決定、更には同定した主要成分の発現制御機構及び細胞内局在について検討した。

2. 実験方法

2.1 培養細胞からのスフィンゴ糖脂質成分の大量調製

HuMedia-EG2培地にて培養したヒト初代培養血管内皮細胞 (HUVEC) を検討に用いた。培地中に炎症性物質TNF- α を終濃度20ng/mlに加えて細胞に炎症を惹起し、24時間インキュベートした後に細胞を回収した。

2.2 スフィンゴ糖脂質の抽出

回収した細胞より、クロロホルム：メタノール (2:1) 溶媒を用いて総脂質を抽出した。この総脂質に含まれるN-GSL成分を、Folch分配法により抽出した。

2.3 HPLCを用いたN-GSLの組成分析

抽出したN-GSLはrEndoglycoceramidase II (タカラバイオ) にて酵素消化することで糖鎖部分を遊離させ、これを蛍光分子アントラニル酸で標識し、HPLCにて標識蛍光を指標とした組成分析を行った。HPLC分析にはTSKgel Amido-80カラムを用い、移動層には20% 100mM ammonium acetate (pH 3.85)-80% acetonitrile、及び20% 100mM ammonium acetate (pH 3.85)-60% DW-20% acetonitrileを用いた。蛍光検出器は励起波長360nmに設定し、蛍光波長425nmを検出した。

2.4 質量分析によるセラミド構造の解析

抽出した中性スフィンゴ糖脂質成分を α -CHCAマトリ



Purification and Characterization of Neutral Glycosphingolipids in Human Vascular Endothelial Cells under Inflammatory Condition.

Tetsuya Okuda

Bioproduction Research Institute National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

クスと混合して結晶化し、質量分析装置 (MALDI-TOF-MS) にて分析した。標準物質の MS スペクトルとの比較により構造を決定した。

2. 5 Real time RT-PCR による遺伝子発現解析

炎症刺激前後の HUVEC より mRNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として、目的糖脂質の生合成に関わる酵素遺伝子群の発現量を、LightCycler® 480 システム (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いた Real Time RT-PCR にて測定した。

2. 6 脂質ラフト画分の調製

炎症刺激後の HUVEC を界面活性剤 (1% Triton-X100) 存在下にて Dounce 型ホモジナイザーにて破碎し、5 - 40% のショ糖密度勾配にて遠心することで、脂質ラフトが含まれる界面活性剤不溶性膜を分離した。分離後のサンプルは 10 分画し、各種ラフトマーカー、及びコントロールタンパク質の発現についてウエスタンブロッティング法により検討することで、脂質ラフトを含む画分を同定した。同定した画分より N-GSL を抽出し、上記質量分析法により目的とする N-GSL 成分の MS スペクトルを測定した。

3. 結果

3. 1

HPLC 分析の結果、通常培養下の HUVEC 由来の N-GSL 成分には、グロボテトラオシルセラミド (Gb4) およびその前駆体であるグロボトリアオシルセラミド (Gb3) が主成分として存在していることが判明した (Fig. 1A)。その他、マイナー成分として、Gb3 の前駆体であるラクトシルセラミド (LacCer) や、構造未同定の N-GSL が数種存在することが確認された。炎症を惹起させ 24 時間経過させた細胞では、これら全てに増加傾向が見られ、特に主要成分である Gb4 の変化が大きく、炎症惹起前と比較して約 3 倍

に増加していることが判明した (Fig. 1B)。

3. 2

スフィンゴ糖脂質はセラミド部位の構造にも多様性がある。その構造について、質量分析装置 (MALDI-TOF-MS) を用いて分析した (Fig. 2)。標準物質と比較から、通常培養下の HUVEC 由来の Gb4 は、セラミドの脂肪酸部位にパルミチン酸 (C16:0)、リグノセリン酸 (C24:0)、ネルボン酸 (C24:1) を主成分として有していることが明らかになった (Fig. 2, 中段)。これらの Gb4 分子種に由来する MS スペクトルは、炎症を惹起した後の HUVEC に由来する試料中ではより強く検出された。特に、C24:0 及び C24:1 を有する Gb4 (C24-Gb4) に由来するシグナルの増強が見られた (Fig. 2, 下段)。

3. 3

C24-Gb4 の発現量の増加が、どのような細胞内制御機構にて調節されているのかを検証すべく、その生合成に関与する酵素遺伝子群の転写レベルについて Real time RT-PCR にて解析した (Fig. 3)。まず C24-Gb4 の糖鎖の合成酵素遺伝子群について検討したところ、TNF- α 刺激後 (12 時間後) に一様に発現量が上昇していた。一方で、C24-Gb4 と前駆体 (LacCer) を競合して合成される酸性糖脂質 GM3 の合成酵素遺伝子 (GM3S) の発現量には大きな変化が見られなかった。次に、セラミド部位の合成酵素遺伝子群について検討したところ、C24:0 及び C24:1 脂肪酸の生合成酵素 (脂肪酸鎖長伸長酵素) である Elovl1-3 のうち、Elovl1 遺伝子が強く発現上昇していることを見いだした。一方、脂肪酸をスフィンゴシンに転移しセラミドを合成するセラミド合成酵素 (CerS) については、C24 脂肪酸を選択的に転移する CerS2 遺伝子の発現上昇が見られたが、C16 脂肪酸の転移酵素である CerS5 遺伝子についても同様に発現量が上昇していた。これらの結果は、C24-Gb4 の発

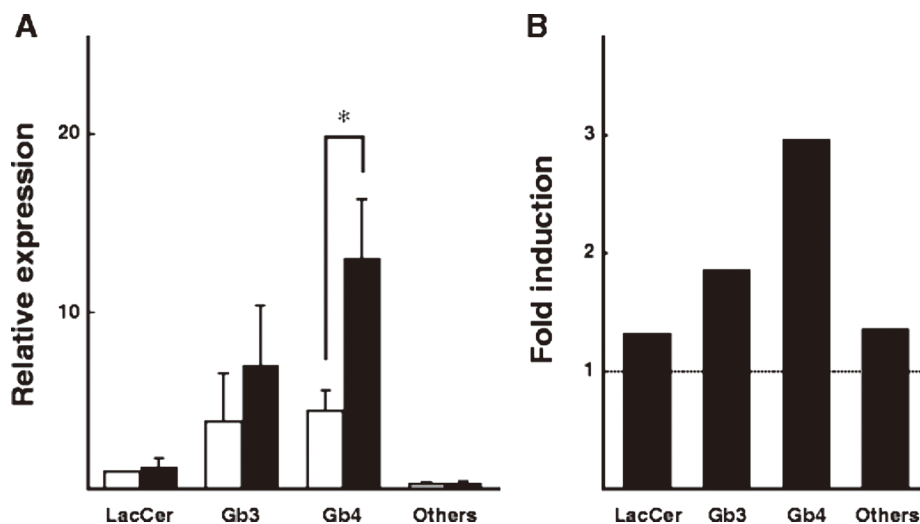


Fig. 1 TNF- α 刺激後の HUVEC における N-GSL の発現変化。

(A) HPLC を用いて N-GSL の各分子種の発現量を、TNF- α 刺激前後で比較検討した。未処理 HUVEC (Open bars) 及び TNF- α 刺激後の HUVEC (closed bars) に由来する N-GSL 各分子種の発現量を示す。Error bars, mean $\pm$ SE, n=3, from three independent experiments, *P < 0.05.

(B) N-GSL 各分子種について、炎症刺激後の増加率 (TNF- α 刺激後 HUVEC / 未処理 HUVEC) を示した。

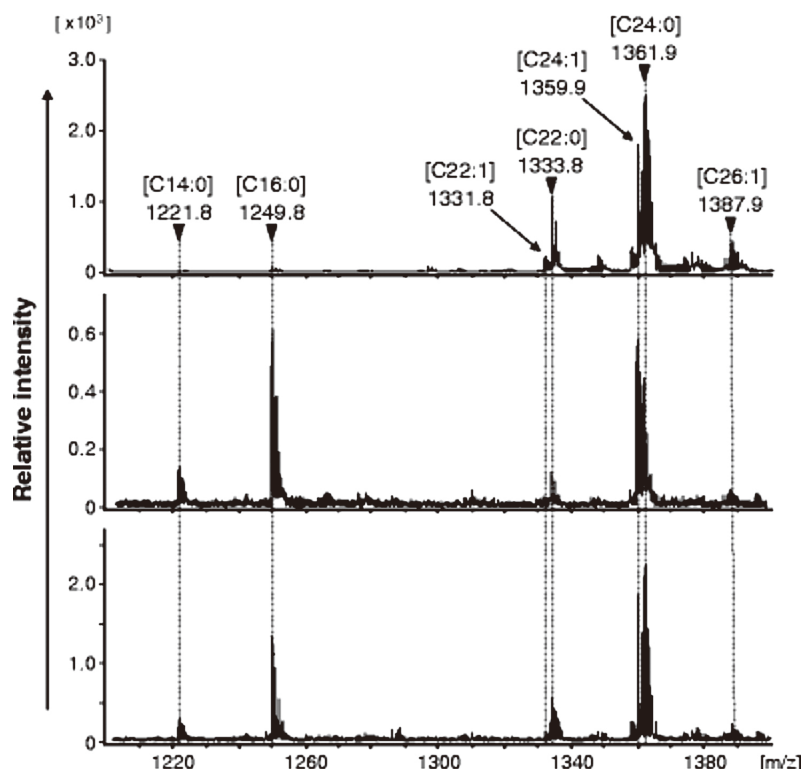


Fig. 2 MALDI-TOF-MS による HUVEC 由来 Gb4 の測定。
 (上段) 標準物質としてヒト赤血球由来精製 Gb4 の MS スペクトルを測定。
 (中段) 未処理 HUVEC より抽出した N-GSL 成分中の Gb4 由来 MS スペクトル。
 (下段) TNF α にて刺激後の HUVEC に由来する Gb4 の MS スペクトル。HUVEC に発現する Gb4 には、脂肪酸構造の差異に由来する分子種 (C14:0 ~ C26:1) が存在することが MS スペクトルより予測され、その位置を上段に示した (arrow heads)。

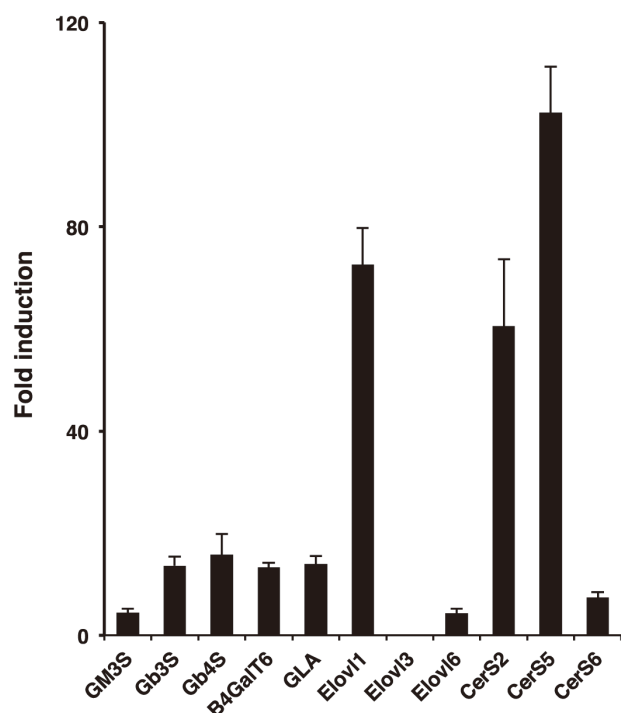


Fig. 3 Real time RT-PCR による C24-Gb4 合成酵素遺伝子群の発現解析。
 TNF α 刺激後 (12 時間後) の HUVEC 及び未処理の HUVEC より調製した cDNA を用いて、C24-Gb4 の合成に関与する生合成酵素遺伝子群の発現量を比較解析した。図は、炎症刺激後 (12 時間) の増加率 (TNF α 刺激後 HUVEC / 未処理 HUVEC) として示してある。C24-Gb4 の糖鎖部位の生合成酵素遺伝子として Gb3S, Gb4S, B4GalT6, C24 脂肪酸生合成酵素として Elovl1, 3, 6, C24 脂肪酸を基質としてセラミドを生合成する酵素である CerS2 について、それぞれ発現量を解析した。また比較対象として、HUVEC に存在する酸性スフィンゴ糖脂質の糖鎖合成酵素遺伝子である GM3S, Gb4 の前駆体の糖鎖分解酵素である GLA, C16 脂肪酸を基質としてセラミドを生合成する酵素遺伝子 CerS5, 6 についても、その発現増加率を示した。Error bars, mean $\pm$ SE, n=4, from two independent experiments.

現量増加においてセラミド合成酵素レベルでの選択性は無く、Elovl1 による C24 脂肪酸合成量の増加が中心的な役割を担うことを意味する。

3. 4

細胞の炎症応答における C24-Gb4 増大の意義について検討するべく、その細胞内における局在について解析した。

スフィンゴ糖脂質は細胞膜内にて脂質ラフトと定義されるシグナル伝達の足場構造を形成すると考えられている。そこで生化学的手法により、C24-Gb4 の脂質ラフトにおける局在について検討した (Fig. 4)。界面活性剤不溶性膜 (DIM) を遠心分離した試料を 10 分画し、そのうち脂質ラフトマーカーが検出される画分 (Fig. 4A, 2-3) から N-GSL を抽出し、MALDI-TOF-MS にて解析したところ、C24-

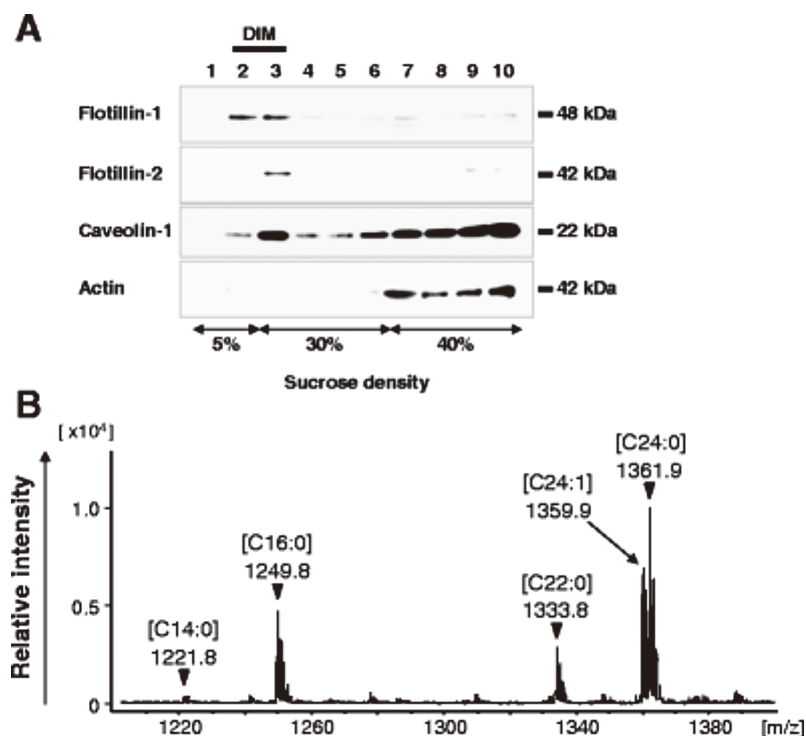


Fig. 4 細胞膜における C24-Gb4 の局在解析
炎症刺激後の HUVEC より界面活性剤不溶性膜 (DIM) をシヨ糖密度勾配遠心法により分離し, C24-Gb4 の局在を MALDI-TOF-MS により解析した。
(A) ウェスタンブロッティングにより、各画分における脂質ラフト (Flotillin-1,2) 及びカベオラ膜 (Caveolin-1) のマーカー分子の局在について検討した。また、コントロールとしてアクチンタンパク質 (Actin) の局在についても検討した。
(B) 分離した脂質ラフト濃縮画分における C24-Gb4 の発現を、MALDI-TOF-MS により解析した。

Gb4 の MS スペクトルが検出された (Fig. 4B)。一方で、非脂質ラフト画分 (Fig. 4A, 7-10) からは、Gb4 に由来するいずれの MS スペクトルも検出されなかった。

4. 考 察

本研究にて、炎症を惹起した血管内皮細胞では超長鎖脂肪酸を含有する N-GSL の発現量が増加することが明らかとなり、その主成分は C24 脂肪酸を含有する Gb4 (C24-Gb4) であった。C24 脂肪酸を含有するスフィンゴ糖脂質は、形質膜の脂質二重層構造において、二つの層間に存在する分子の相互作用を媒介する役割があると考えられている⁵⁾。一方で、炎症性サイトカインにより炎症惹起した血管内皮細胞では、脂質ラフトを介したシグナル伝達が細胞の炎症応答に関与することが知られており⁶⁾、C24-Gb4 の脂質ラフトへの局在からもこれらの現象への関与が示唆される。また遺伝子発現解析の結果から、炎症時における C24-Gb4 の発現増加は遺伝子転写レベルで制御されていることが明らかとなり、その脂肪酸構造の異なる各分子種の発現量まで転写レベルで厳密に制御されていることが判明した。

以上の結果は、炎症下の血管内皮細胞における C24-Gb4 の増加が、細胞の炎症応答にて重要な役割を担うことを示唆しており、今後は C24-Gb4 の関与が予想される膜シグナル伝達経路を中心に、その機能についてアプローチする予定である。

(参考文献)

- 1) Fukumoto S, Yamamoto A, Hasegawa T, et al: Genetic remodeling of gangliosides resulted in the enhanced reactions to the foreign substances in skin. *Glycobiology*, 7, 1111-1120, 1997.
- 2) Inoue M, Fujii Y, Furukawa K, et al: Refractory skin injury in complex knock-out mice expressing only the GM3 ganglioside. *J. Biol. Chem.*, 277, 29881-29888, 2002.
- 3) Okuda T, Tokuda N, Numata S, et al: Targeted disruption of Gb3/CD77 synthase gene resulted in the complete deletion of globo-series glycosphingolipids and loss of sensitivity to verotoxins. *J. Biol. Chem.*, 281, 10230-10235, 2006.
- 4) Okuda T, Nakakita S, Nakayama K: Structural characterization and dynamics of globotetraosylceramide in vascular endothelial cells under TNF- α stimulation. *Glycoconj. J.*, 27, 287-296, 2011.
- 5) Iwabuchi K, Nakayama H, Iwahara C, Takamori K: Significance of glycosphingolipid fatty acid chain length on membrane microdomain-mediated signal transduction. *FEBS Lett.*, 2584, 1642-1652, 2010.
- 6) Kiely JM, Hu Y, García-Cardena G, Gimbrone MA Jr: Lipid raft localization of cell surface E-selectin is required for ligation-induced activation of phospholipase C gamma. *J. Immunol.*, 171, 3216-3224, 2003.