

細胞分化・ストレス応答とステリルグルコシド

室伏きみ子・小林哲幸

細胞分化やストレス応答と関連して、UDP-グルコースからステロールへグルコースを転移するグルコシルトランスフェラーゼが速やかに活性化され、ステリルグルコシドが合成誘導されることを見いだした。筆者らの研究結果を軸としてこれまでのステリルグルコシドに関する知見をまとめ、ステリルグルコシドが細胞分化やストレス応答における脂質性メディエーターとして働く可能性について概説する。

Key words 【ステリルグルコシド】【脂質性メディエーター】【細胞分化】
【ストレス応答】

はじめに ステリルグルコシドは、種々のステロールとグルコースが α あるいは β -グルコシド結合した物質であり、高等植物では普遍的に存在している^{1,2)}。グルコースの6位が修飾された分子種も知られている。ミコバクテリア³⁾、カンジダ⁴⁾、スピロプラスマ⁵⁾、真性(真正)粘菌⁶⁻⁸⁾、酵母⁹⁾、ヘリコバクター¹⁰⁻¹²⁾などにも存在するが、それらの働きについてはまだはっきりしたことはわかっていない。ステロールやグルコースの輸送、膜融合などに働く可能性^{6-8,13-15)}や、グルコシルセラミド合成のグルコース供与体として働く可能性¹⁶⁾が考えられているが、積極的な証拠は得られていない。また、めずらしいところではヘビの表皮からも分離された¹⁷⁾が、この働きについては、原始的な防御機構の痕跡として残っているもので、外部の環境変化から自己を守るためのバリアではないかという考えが示されている。

ステリルグルコシドの生合成については、いくつかの報告がある。幼若なワタやダイズ^{18,19)}、あるいは成長した植物^{20,21)}、ミコバクテリア³⁾、カンジダ²²⁾などでス

テリルグルコシドの生合成とその反応を触媒する酵素であるグルコシルトランスフェラーゼやアシルトランスフェラーゼの存在が示された。イネ科の1年草であるライグラスの培養細胞²³⁾やクロガラシ、粘菌²¹⁾からグルコシルトランスフェラーゼが可溶化され、筆者も真性粘菌からの部分精製を行なってその性質を調べた²⁴⁾が、まだそれらの酵素の精製に成功したという報告はない。

筆者らは、真性粘菌 *Physarum polycephalum* (図1にその生活環を示す) が単相のミクソアメーバから複相の変形体へと分化するに伴ってステリルグルコシドが合成誘導されることを明らかにした⁷⁾。さらに最近、この物質が *Physarum* ミクソアメーバをストレスに曝すことによって速やかに合成誘導されることを見いだして、これがストレス応答においても重要な役割を果たしている可能性を示唆した²⁵⁾。ヒトの培養細胞でも同様な現象が起こることを見いだしており、ストレス応答におけるステリルグルコシドの役割について、データを蓄積しつつある。本稿では、まだほとんどわかっていないこの物質の役割について、筆者らの研究を軸

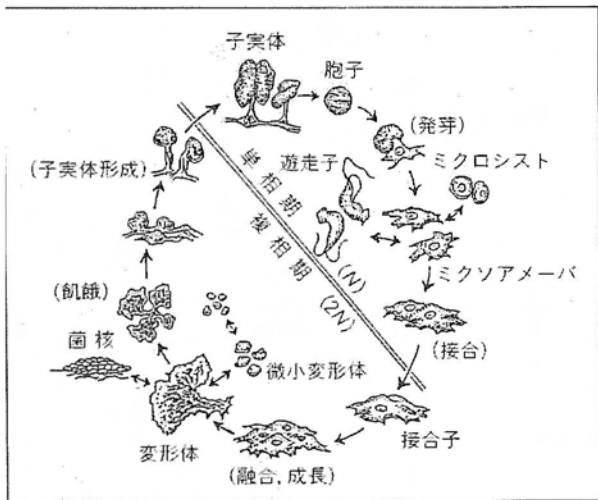


図 1 真性粘菌 *Physarum polycephalum* の生活環

にして考察を試みたいと考えている。

1. 真性粘菌における細胞分化とステリルグルコシドの合成誘導

真性粘菌 *P. polycephalum* のミクソアメーバは単一の核をもつ単細胞であるが、異なった接合型のアメーバどうしが出会うと、それらの間で接合が起こり、複相体で多核細胞である変形体 (plasmodium) へと分化する (図 1)。筆者らは、この細胞分化に伴ってステリルグルコシドの合成誘導が起こることを見いだした。誘導されるステリルグルコシドを精製し、その構造解析を行なったところ、ポリフェラステリルグルコシド (ポリフェラステロールモノグルコシド) であることがわかった (図 2 a)。 *Physarum* は、ポリフェラステロール、 Δ^5 -エルゴステロール、22-ジヒドロポリフェラステロールを 80 : 15 : 5 で含む²⁵⁾が、 Δ^5 -エルゴステロールや 22-ジヒドロポリフェラステロールの配糖体は検出されず、またアシル化誘導体の合成もみられなかった。ミクソアメーバから変形体への分化の過程で、UDP-グルコースからポリフェラステロールへとグルコースを転移するグルコシルトランスフェラーゼが活性化されることも明らかになった²⁴⁾ (図 3)。部分精製酵素の性質を表 1 に示す。

ミクソアメーバの接合を機にグルコシルトランスフェラーゼが活性化され、ポリフェラステロールモノグルコシドが合成されることが確かめられたが、細胞分

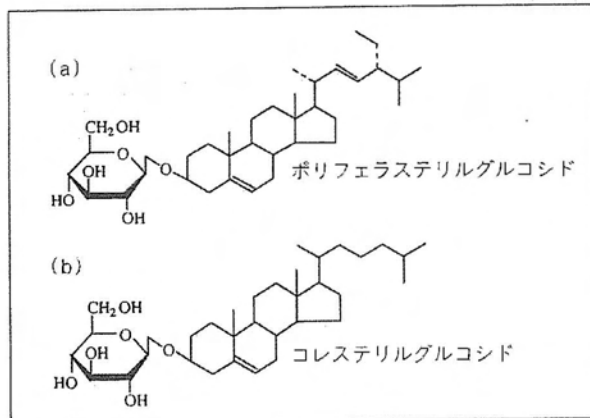


図 2 ステリルグルコシドの構造

(a) ポリフェラステリルグルコシド (ポリフェラステロールモノグルコシド)、(b) コレステリルグルコシド (コレステロールモノグルコシド)

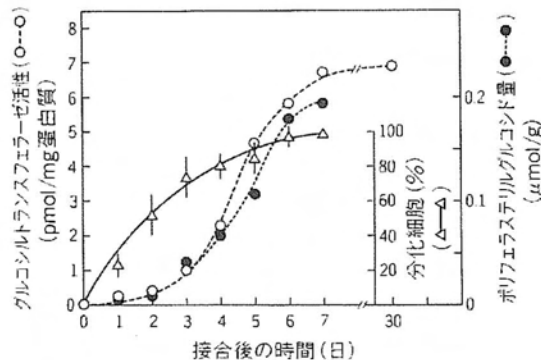


図 3 ミクソアメーバから変形体への細胞分化に伴う UDP-グルコース：ポリフェラステロールグルコシルトランスフェラーゼ活性とポリフェラステリルグルコシドの変化
○：トランスフェラーゼの比活性、●：ポリフェラステリルグルコシドの含量、△：分化細胞の割合

表 1 部分精製酵素の性質

分子量	72 K
至適 pH	7.2
K_m 値 UDP-グルコース	$1.2 \times 10^{-4} M$
ポリフェラステロール	$4.8 \times 10^{-6} M$
基質特異性	
ポリフェラステロール	100
ステグマステロール	14
ポリフェラステロール + ステグマステロール	65
シトステロール	105
カンベステロール	80
エルゴステロール	9
コレステロール	12

化とこの反応を結ぶメカニズムについてはまだ何もわかっていない。しかし、明らかに分化に伴った誘導が起こることから、この物質が細胞の分化において何らかの積極的な意味をもつ可能性が考えられる。いずれ本酵素の遺伝子クローニングを成功させて、その発現調節あるいは活性化の機構と生理的役割を明らかにしたいと考えている。

一方、筆者らは *Physarum* の突然変異体である *Colonia* 株でもこの物質の検索を行なった。*Colonia* 株は、接合の過程を経ずに、すなわち核相の変化なしにミクソアメーバから変形体へと分化する細胞で、培養温度を 30°C から 25°C へと変化させるだけで分化が誘導される。ちなみに野生型の *Physarum* の培養温度は 24°C である。この株では、ミクソアメーバ期にすでにポリフェラステリルグルコシドが存在しており、この物質の合成にあずかるグルコシルトランスフェラーゼ活性も、ミクソアメーバ期、変形体期のいずれの時期

でも検出された⁹⁾(表 2)。突然変異体と野生株の膜機能の違いを比較検討したところ、突然変異体では D-グルコースの取込み活性が顕著に高まっていることが観察された(図 4)。アミノ酸の取込み能は両者で変化がみられず、またいずれも L-グルコースの取込みはみられなかった。野生株のミクソアメーバは細菌を餌としていて、液体培地中では生育できないのに対し、*Colonia* 株のミクソアメーバは液体培地中で(増殖速度は非常に遅いが)生育可能である。野生株と *Colonia* 株ではかの膜脂質組成に明らかな違いがみられなかった^{24,27)}ことから、ステリルグルコシドが D-グルコース取込み活性に密接な関連をもつ可能性が考えられる。ただし、後述のように熱ストレスとステリルグルコシドの誘導との関連が明らかになってくると、*Colonia* 株の生育温度が高いことがこの物質の発現に影響していることも考えられ、いくつかの要素が絡みあってこのような現象がみえているのかもしれない。

表 2 野生株と *Colonia* 株の UDP-グルコース：ポリフェラステロールグルコシルトランスフェラーゼ活性

	ミクソアメーバ (pmol/mg 蛋白質/分)	変形体
野生株	0.10	6.10
<i>Colonia</i> 株	2.95	4.90

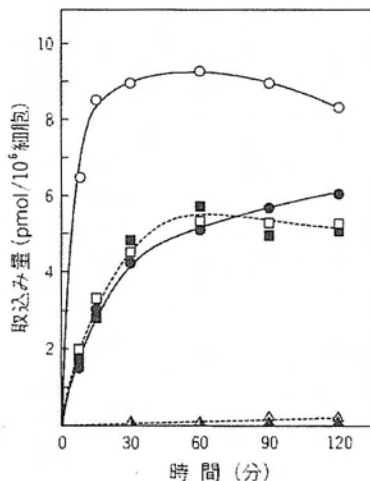


図 4 ミクソアメーバへの D-グルコース、L-グルコース、L-ロイシンの取込み

○：D-グルコースの *Colonia* 株への取込み、●：D-グルコースの野生株への取込み、△：L-グルコースの *Colonia* 株への取込み、▲：L-グルコースの野生株への取込み、□：L-ロイシンの *Colonia* 株への取込み、■：L-ロイシンの野生株への取込み。

II. 真性粘菌におけるステリルグルコシドの合成誘導とストレス応答

筆者らは先に、*Physarum* のミクソアメーバを熱ストレスに曝すと、新規のストレス蛋白質 p66 が合成誘導されることを見だし、その機能に関する研究を続けてきた。p66 についてはここでは詳しく述べないが、*Physarum* のストレスに伴うミクソアメーバからミクロシストへの細胞分化の過程で、そのアクチン繊維再編成の調節において重要な役割をすること²⁸⁻³⁰⁾、さらに、細胞性粘菌 *Dictyostelium* を用いた実験から、細胞質分裂に関与する蛋白質である可能性が示されている(筆者ら：投稿中)。さらに、そのストレス蛋白質の合成誘導に先立って、新規の Ca^{2+} 依存性のプロテインキナーゼが活性化されることもわかっている³¹⁾。このプロテインキナーゼは、自身の活性化にリン酸化は不必要であり、これまでに知られているストレス誘導性のプロテインキナーゼがその活性化に自身のリン酸化を必要とすることを考えあわせると、筆者らが見いだしたこのキナーゼがストレス応答における最初のリン酸化反応を司る酵素である可能性が考えられる。

これまでに、ストレス蛋白質(熱ショック蛋白質、HSP)の機能と合成誘導に関しては、数多くの研究者によって遺伝子レベルでの研究が盛んに行なわれ、多

くの知見が蓄積されてきている。しかし、細胞外からのストレス情報を細胞がいかにして受け取り、さらにそれをどのようにして下流の応答反応、すなわち HSP の合成誘導へとつなげていくかという問題については、まだほとんどわかっていない。筆者らは、細胞が熱ストレスに曝されると、まず細胞膜で何らかの変化が起こるはずだと考え、熱ショック後の細胞膜成分の変化を分析した。そして細胞が熱ストレスを受けると、ただちに膜ステロールへのグルコース転移を触媒するグルコシルトランスフェラーゼの活性化が起こり、ポリフェラステリルグルコシドの合成が起こることを確かめた²¹⁾ (図 5)。この反応は熱ショック後 5 分で最大に達するが、HSP の合成は数分後から始まって、約 60 分で最大値となった。前述した Ca²⁺ 依存性プロテインキナーゼの活性化は、ステリルグルコシドの合成誘導に遅れて、しかし HSP の合成に先立って一過性に起こった (図 6)。これらの結果から、膜ステロールへのグルコース転移反応は熱ショックに対する初発的な応答反応であることが示唆される。

これらの結果から、筆者らは図 7 に示すような機構を考えている。細胞が熱ストレスに曝されると、細胞膜脂質の流動性が高まり、細胞膜中に存在する不活性型のトランスフェラーゼが活性化されて、細胞膜中にステリルグルコシドが作られる。合成されたステリルグルコシドは細胞質中に放出されて、細胞質中でストレス応答性のプロテインキナーゼを活性化し、さら

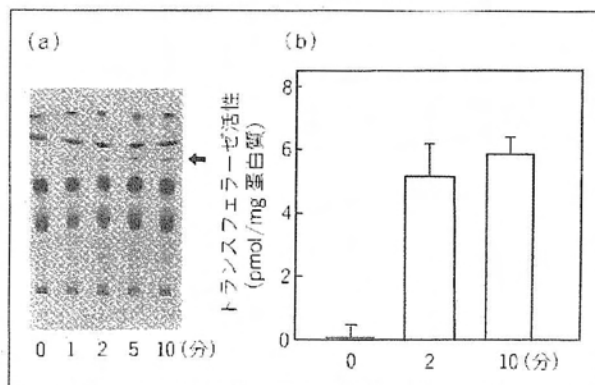


図 5 熱ショック後のステリルグルコシド合成誘導とグルコシルトランスフェラーゼの活性化 (a) *Physarum* 細胞脂質画分の薄層クロマトグラム。ステリルグルコシドの位置を ← で示す。(b) UDP-グルコース:ポリフェラステロールグルコシルトランスフェラーゼ活性。(a), (b)ともに横軸は、24%から40%への温度シフト後の経過時間を表わす。

にそのプロテインキナーゼが間接的あるいは直接的に HSF (heat shock transcription factor) に働いて活性化をひき起こし、HSF によって仲介される HSP 誘導へと反応をつなげるのではないだろうか。つくられたステリルグルコシドが細胞外に放出されて、細胞膜受容体を介して働く可能性もあるかもしれない。また、キャリア蛋白質と結合して核まで運ばれる可能性も否定できない。この仮説を証明するために、現在、これらの反応の相関関係を検討している。まだ明確な結果は得られていないが、予備的な実験から、非ストレス条件下でステリルグルコシド自身に HSP 誘導能がある

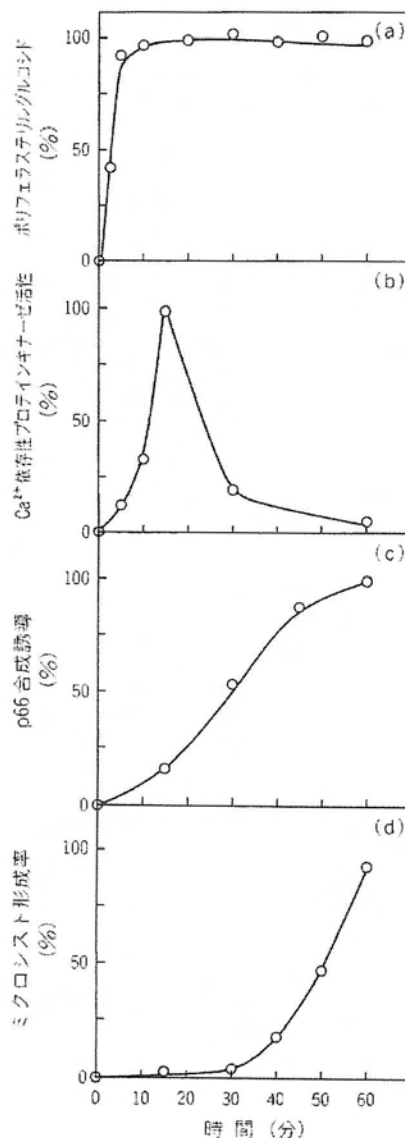


図 6 熱ストレスに伴うステリルグルコシド (a)、プロテインキナーゼ (b)、p66 (c) の誘導とミクロソーム形成 (d)。

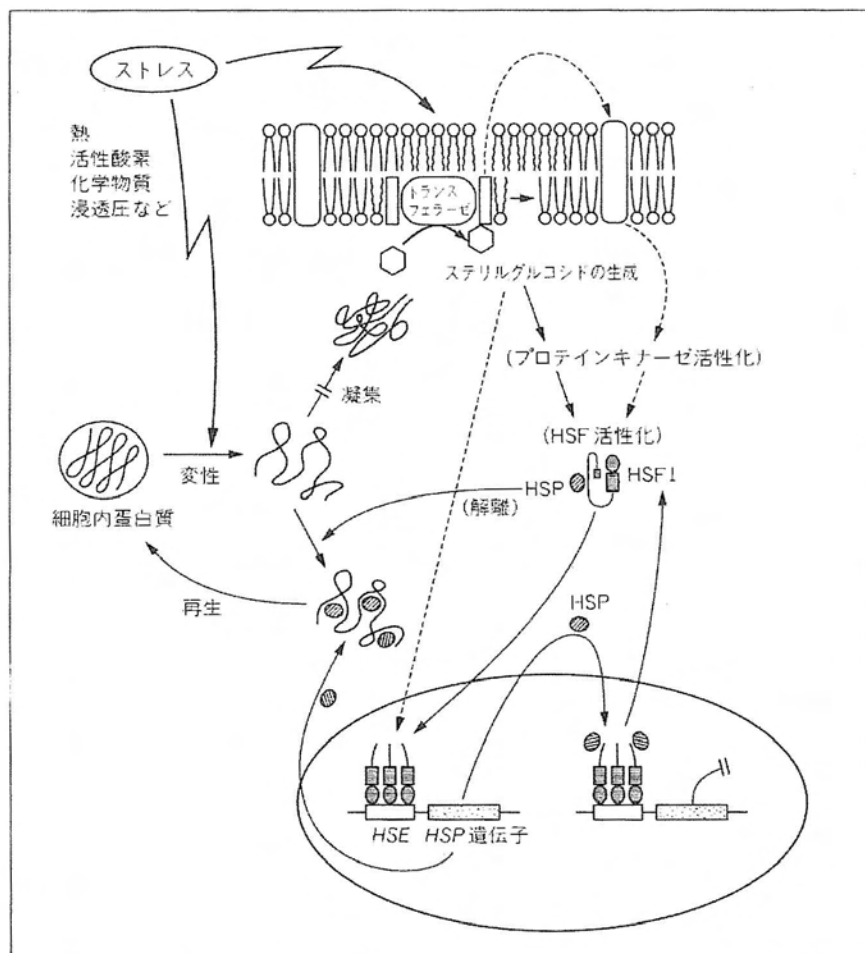


図7 ストレス応答におけるステリルグルコシドの役割 (仮説)

ことが確かめられている。この事実は、ステリルグルコシドがストレス応答の脂質性メディエーターとして働く可能性を強く支持する。

III. ヒト繊維芽細胞におけるステリルグルコシドの役割

Physarum で観察されたストレスによるステリルグルコシドの合成誘導が、生物に普遍的な現象であることを証明するために、ヒトの繊維芽細胞を用いて、*Physarum* の例にならって同様な実験を行なった。その結果、ストレス条件下でのヒト細胞でもステリルグルコシドが検出され³²⁾、図2(b)に示したコレステリルグルコシドがヒトのステリルグルコシドの成分の1つであることが示された。また、その合成にかかわる膜結合性の酵素活性が存在することも確かめられた。ヒトのステリルグルコシドについて、その完全な構造と機能を明

らかにするために、現在、種々の実験が進行中である。動物細胞でこの種の反応が起こることはこれまでにまったく報告されていない。ストレス応答においてステリルグルコシドが普遍的な働きをする可能性が示唆されたわけで、今後の展開には大きな期待がもたれる。図7に示した仮説を証明するために、今後、ステリルグルコシドの下流に位置する情報伝達の仕組みなどを明らかにしたいと考えている。

IV. ヘリコバクター・ピロリのコレステリルグルコシド

ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) は、慢性活動性胃炎の原因菌であり、消化性潰瘍や胃がん、胃リンパ腫との密接な関係が指摘され、近年注目を集めている病原体である。*H. pylori* には図

8に示すような3種類のコレステリルグルコシドが存在することが報告されている¹⁰⁻¹²⁾。ほかの生物で知られているステリルグルコシドはほとんどが β 型であるが、*H. pylori* では α 型のみが検出された。またホスファチジル基が結合しているもの(図8c)は、ほかには知られていないめずらしい分子種である。これらのステリルグルコシドは、ヘリコバクター属の登録菌種のほとんどすべてに含まれており、この菌の特徴をなすものと考えられる。細菌は一般にコレステロール合成能をもたないが、外部環境にコレステロールが存在すると、それを取り込むことがわかっている。*H. pylori* にもコレステロール合成能はないが、ヒトの胃上皮はコレステロールが豊富な環境であるので、それを取り込んでコレステリルグルコシドを合成するのであろう。

H. pylori のステリルグルコシドの生理的な役割についてはまだわかっていないが、発見者である Haque ら

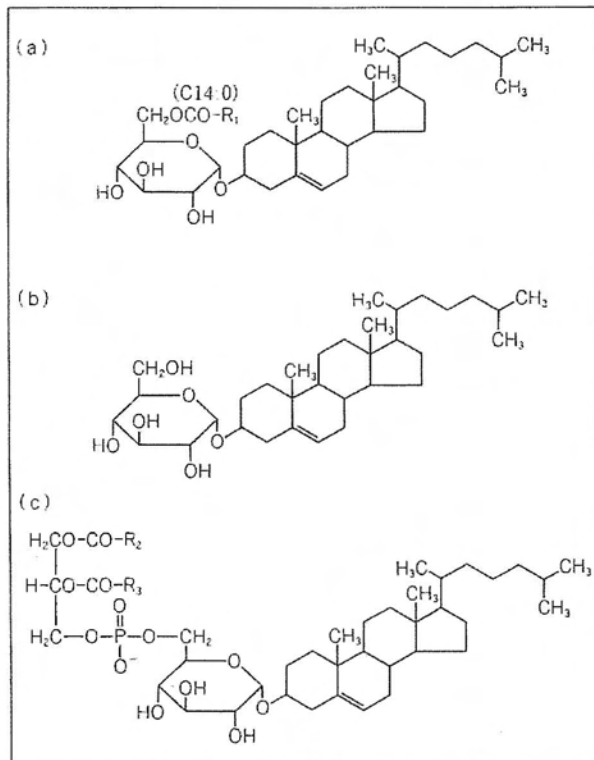


図 8 *H. pylori* のステリルグルコシド

は、それらが *H. pylori* の細胞障害因子の1つとして、ステリルグルコシド単独で、あるいは細胞表層に存在するリポ多糖と協同して胃上皮細胞に有害な影響を与えていると考えている。

おわりに ステリルグルコシドは、最初に植物でその存在が知られるようになってから30年をこえる物質であるが、その生理的な機能については、まだほとんど明らかにされていない。細胞の動的な機能と結びついた形でこの物質が見いだされたのは、おそらく筆者らの研究^{7,24,25)}が初めてであろう。この物質が細胞のストレス応答や分化の過程で、新規の脂質性メディエーターとして働く可能性を検証するために、筆者らは現在、鋭意研究を進めている。また、細胞分化に伴うステリルグルコシドの合成誘導と、ストレス応答における誘導とがどのような接点をもつのかという点についても解明する必要がある。細胞のストレス応答と分化とは、密接な関連をもった生体内反応であるから、ステリルグルコシドの下流で働く情報伝達の仕組みなどを知ることによって、これらの接点をも明らかにすることが

できるであろう。

文 献

- 1) Lepaga, M. : *J. Lipid Res.*, **5**, 587-592 (1964)
- 2) Bush, P. B., Grunwald, C. : *Plant Physiol.*, **50**, 69-72 (1972)
- 3) Elbein, A. D., Forsee, W. T. : *Lipids*, **10**, 427-436 (1975)
- 4) Kastelic-Suhadolc, T. : *Biochim. Biophys. Acta*, **620**, 322-325 (1980)
- 5) Patel, K. R., Smith, P. F., Mayberry, W. P. : *J. Bacteriol.*, **136**, 829-831 (1978)
- 6) Wojciechowski, Z. A., Zimowski, J., Zielenska, M. : *Phytochemistry*, **15**, 1681-1683 (1976)
- 7) Murakami-Murofushi, K., Nakamura, K., Ohta, J., Suzuki, M., Suzuki, A., Murofushi, H., Yokota, T. : *J. Biol. Chem.*, **262**, 16719-16723 (1987)
- 8) Murakami-Murofushi, K., Kamiya, Y., Mimura, K., Ohta, J. : *Proc. Japan Acad.*, **66**, 197-202 (1990)
- 9) Pardi, A. J. : *Acta Physiol. Lat. Am.*, **26**, 430-433 (1976)
- 10) Haque, M., Hirai, Y., Yokota, K., Oguma, K. : *J. Bacteriol.*, **177**, 5334-5337 (1995)
- 11) Haque, M., Hirai, Y., Yokota, K., Mori, N., Jahan, I., Ito, H., Hotta, H., Yano, I., Kanemasa, Y., Oguma, K. : *J. Bacteriol.*, **178**, 2065-2070 (1996)
- 12) Hirai, Y., Haque, M., Yoshida, T., Yokota, K., Yasuda, T., Oguma, K. : *J. Bacteriol.*, **177**, 5327-5333 (1995)
- 13) Evans, F. J. : *J. Pharm. Pharmacol.*, **24**, 645-650 (1972)
- 14) Smith, P. F. : *Lipids*, **4**, 331-336 (1969)
- 15) Grunwald, C. : *Plant Physiol.*, **48**, 653-655 (1971)
- 16) Lynch, D. V., Criss, A. K., Lehoczy, J. L., Bui, V. T. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **340**, 311-316 (1997)
- 17) Abraham, W., Wertz, P. W., Burken, R. R., Downing, D. T. : *J. Lipid Res.*, **28**, 446-449 (1987)
- 18) Hou, C. T., Umemura, Y., Nakamura, M., Funabashi, S. : *J. Biochem.*, **63**, 351-360 (1968)
- 19) Staver, M. J., Grick, K., Baisted, D. J. : *Biochem. J.*, **169**, 297-303 (1978)
- 20) Wojciechowski, Z. A., van Uon, N. : *Acta Biochim. Pol.*, **22**, 25-38 (1975)
- 21) Wojciechowski, Z. A., Zimowski, J., Zimowski, J. G., Lyznik, A. : *Biochim. Biophys. Acta*, **570**, 363-370 (1979)
- 22) Esders, T. W., Light, R. J. : *J. Biol. Chem.*, **247**, 7494-7497 (1979)
- 23) Henry, R. J., Stone, B. A. : *Biochem. J.*, **203**, 629-636 (1982)

- 24) Murakami-Murofushi, K., Ohta, J. : *Biochim. Biophys. Acta*, **992**, 412-415 (1989)
- 25) Murakami-Murofushi, K., Nishikawa, K., Hirakawa, E., Murofushi, H. : *J. Biol. Chem.*, **272**, 486-489 (1997)
- 26) Murakami-Murofushi, K., Nakamura, K., Ohta, J., Yokota, T. : *Cell Struct. Funct.*, **12**, 519-524 (1987)
- 27) Minowa, A., Kobayashi, T., Maeda, H., Shimada, Y., Inoue, K., Murakami-Murofushi, K. : *Biochim. Biophys. Acta*, **1043**, 129-133 (1990)
- 28) Shimada, Y., Kasakura, T., Yokota, M., Miyata, Y., Murofushi, H., Sakai, H., Yahara, I., Murakami-Murofushi, K. : *Cell Struct. Funct.*, **17**, 301-309 (1992)
- 29) 室伏きみ子 : *生体の科学*, **46**, 352-355 (1995)
- 30) Matsumoto, S., Ogawa, M., Kasakura, T., Shimada, Y., Mitsui, M., Maruya, M., Isohata, M., Yahara, I., Murakami-Murofushi, K. : *J. Biochem.*, **124**, 326-331 (1998)
- 31) Maruya, M., Mitsui, M., Murakami-Murofushi, K. : *Cell Struct. Funct.*, **21**, 533-538 (1996)
- 32) Kunimoto, S., Kobayashi, T., Murakami-Murofushi, K. : *Cell Struct. Funct.*, **22**, 782 (1997)