

## 9 8 4 0 高塩ストレスによって誘導される新規脂質性メディエーターの解析

助成研究者：小林 哲幸 (お茶の水女子大学 理学部)

ステリルグルコシドは、種々のステロールの3位 OH 基にグルコースがグリコシド結合した物質である。高等植物では普遍的に存在し、ミコバクテリア、酵母、真性粘菌、ヘリコバクターなどにも存在するが、その生理的役割についてはほとんど不明である。

一方我々は、真性粘菌 *Physarum polycephalum* がミクソアメーバから変形体へと分化するのに伴って、ステリルグルコシドの一種であるポリフェラステリルグルコシドが合成誘導されることを以前に見出した。さらに、*Physarum* ミクソアメーバを熱ストレスに曝すことによってもこの物質が速やかに合成誘導されることが示された。この知見は、細胞のストレス応答に関与した新規の脂質成分として、ステリルグルコシドが重要な役割を演じていることを示唆するものである。

本研究では、真性粘菌に限らず哺乳類細胞においても、ストレス応答に依存した類似の現象が観察されるか否かを検討した。その際、熱ストレスの他に高塩ストレスについても細胞膜脂質成分の変化を解析した。また、ステリルグルコシドの細胞内ストレス応答における役割を解明するために、細胞外からのステリルグルコシドの添加が、ストレスタンパク質 (HSP) の誘導に及ぼす影響を解析した。

ヒト由来の正常繊維芽細胞 (TIG-3 細胞) に熱ストレスを与えると、15 から 30 分後にかけて新規の糖脂質が増加することが示された。また、100mM の NaCl を培地に添加して塩ストレスを負荷した場合にも同じ糖脂質の増加が15 から30分後にかけて認められた。この脂質を精製し、ガスクロマトグラフィーと質量分析法にて構造解析した結果、コレステリルグルコシドと同定された。細胞のストレス防御において重要な役割を演じている HSP の合成誘導には、TIG-3 細胞においても1時間以上の時間経過が必要であったのに対し、本脂質の出現はそれに先行しておこった。次に、有機合成したコレステリルグルコシドを細胞外から添加したところ、30分以内にHSPの誘導が観察された。

以上の結果は、HSP の細胞内発現に先立つシグナル伝達系において、コレステリルグルコシドが重要な役割を演じている可能性を示唆するものである。細胞膜は、細胞が最初に高塩状態や熱を認識しうる場所であり、細胞膜中の脂質成分の一つであるコレステロールの誘導体がか塩ストレスなどに呼応して生成し、いわゆる初期のセンサーとして機能している可能性が考えられた。また、胃潰瘍をはじめ、細胞のストレス応答が関与した病態が知られているが、本研究で見出されたコレステリルグルコシドがこれら病態においてどのように関わっているのか、注目される。



9840 高塩ストレスによって誘導される新規脂質性メディエーターの解析

助成研究者：小林 哲幸 (お茶の水女子大学 理学部)

【研究目的】

ステリルグルコシドは、種々のステロールの3位 OH 基にグルコースがグリコシド結合した物質であり、高等植物では普遍的に存在する。また、ミコバクテリア、酵母、真性粘菌、ヘリコバクターなどにも存在するが、その生理的役割についてはほとんど不明である。

一方我々は、真性粘菌 *Physarum polycephalum* がミクソアマーバーから変形体へと分化するに伴って、ステリルグルコシドの一種であるポリフェラステリルグルコシド (図1 A) が合

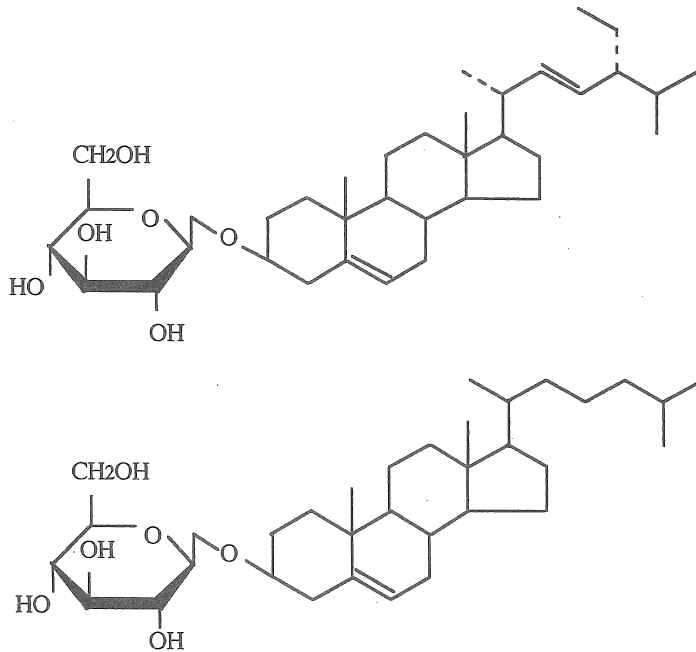


図1. ステリルグルコシドの構造。

(A) 真性粘菌由来ポリフェラステリルグルコシド、(B) ヒト  
繊維芽細胞由来コレステリルグルコシド。

成誘導されることを以前に見出した<sup>1)</sup>。さらに、*Physarum* ミクソアメーバを熱ストレスに曝すことによってもこの物質が速やかに合成誘導されることが示された<sup>2)</sup>。この知見は、細胞のストレス応答に関与した新規の脂質成分として、ステリルグルコシドが重要な役割を演じていることを示唆するものである。本研究では、真性粘菌に限らず哺乳類細胞においても、ストレス応答に依存した類似の現象が観察されるか否かを検討した。その際、ストレスの種類として、熱ストレスの他に高塩ストレスについても細胞膜脂質成分の変化を解析した。また、ステリルグルコシドの細胞内ストレス応答における役割を解明するために、細胞外からのステリルグルコシドの添加が、ストレスタンパク質（HSP）の誘導に及ぼす影響を解析した。

## 【研究方法】

### ヒト繊維芽細胞からの脂質成分の抽出と HPTLC 分析

ヒト由来正常繊維芽細胞株、TIG-3 細胞は 10% FBS を含む Eagle's MEM 培地中で、5% CO<sub>2</sub> 存在下、37℃にて培養した。熱ストレス処理は、予め 42℃に保温した培地に置換し、その後一定時間、42℃の CO<sub>2</sub> インキュベーター中で培養することにより行った。高塩ストレスは、Eagle's MEM 培地にさらに NaCl を 50mM、あるいは 100mM 添加した。ストレス処理してから一定時間を経過した後、冷メタノール、クロロホルム/メタノール混液（1 : 2）、（1 : 1）、（2 : 1）を順次用いて、細胞から脂質を抽出し、これらを合わせて総脂質画分とした。

総脂質画分の一部を HPTLC プレート（E. MERCK, No.5641）にスポットし、クロロホルム/メタノール/水（60:40:9、v/v）を展開溶媒として分離分析した。脂質バンドの検出には、オルシノール試薬（糖脂質の検出）、あるいは塩化第二鉄試薬を噴霧した後、加熱して呈色した。発色したバンドの定量には、画像解析ソフト（Image Gauge、富士フィルム）を用いた。

### TLC、HPLC によるステリルグルコシドの精製

熱ストレスを 30 分間与えた細胞から得た総脂質画分を、次の展開溶媒系を用いた TLC により分離した。

I : クロロホルム/メタノール/水（60 : 40 : 9、v/v）

II : クロロホルム/メタノール/アセトン/酢酸/水（10 : 2 : 4 : 2 : 1、v/v）

スタンダードとしては真性粘菌由来のポリフェラスステリルグルコシドを用い、隣接する領域を順次掻き取って脂質を抽出した。この部分精製標品の一部を用いて、ガスクロマトグラフィー（GLC）による糖とステロールの分析を行った。

TLC による部分精製品は、Capcell Pak C18 カラム（10 x 250 mm, Shiseido Co.）を用い、メタノールを溶出溶媒として HPLC にてさらに精製した。この時のスタンダードには、有機合

成した $\alpha$ -あるいは、 $\beta$ -コレステリルグルコシド（東京理科大学薬学部 小林進先生より供与）を用いた。

### ESI-MS による構造分析

エレクトロスプレーイオン源(ESI)を飛行時間型(TOF)質量測定システムに装備した Mariner (PerSeptive Biosystem 社製) を使用して、陰イオンモードにて分析した。サンプルは、0.1% 脂肪酸アンモニウムを含むアセトニトリル/メタノール（1：1）混液に溶解して注入した。スタンダードには有機合成 $\beta$ -コレステリルグルコシドを用いた。

### HSP 誘導能の解析

$\alpha$ -あるいは、 $\beta$ -コレステリルグルコシド（有機合成標品）を培養上清に添加した後、一定時間後に細胞を集めた。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にてタンパク質を分離後、抗 HSP70 抗体を用いたウェスタンブロットングを行った。検出には ECL 試薬（Amersham 社）を用いて、画像解析により定量分析した。

## 【研究結果】

### ヒト繊維芽細胞における熱ストレス/高塩ストレスによる脂質成分変化

ヒト由来の正常繊維芽細胞株、TIG-3 細胞に対して 42℃の熱ストレスを与え、一定時間後に細胞から総脂質を抽出し、HPTLC にて分析した。その結果、熱ストレス後、15、30 分を経過した時点で顕著に増加し、60 分後には消失する脂質成分が検出された（図 2 中の X）。この成分は、呈色反応から糖とステロールを含有することが示され、また、真性粘菌由来のポリフェラス テリルグルコシドの Rf 値に近いバンドとして検出されたことから、ステリルグルコシド様物質と推定された。

熱ストレスの代わりに、100mM の NaCl 添加によって高塩ストレスを負荷した場合にも、30 分後に熱ストレス時に蓄積されたものと同一の糖脂質バンドが増加した（図 3）。したがって、高温に限らず塩ストレスによってもステリルグルコシド様物質が比較的速やかに蓄積することが示された。

### ステロール配糖体の構造解析

30 分間の熱ストレスをかけた TIG-3 細胞から調製用 TLC にてステロール配糖体を部分精製した。その一部を加メタノール分解によって糖部分とステロール部分に分け、それぞれトリメチルシリル誘導体化してガスクロマトグラフィーにより分析した。その結果、糖としてはグルコー

スのみが、ステロールとしてはコレステロールが検出された（図4）。

さらに ODS 逆相カラムの HPLC によりこの脂質成分を精製し、その標品を用いて質量分析を行った。その結果、コレステリルグルコシドの分子にギ酸イオンが付加した ( $[M+HCOO]^-$ ) イオンに合致する  $m/z$  593.4 のピークが観察された（図5）。また、HPLC における保持時間を標準合成品と比較した結果から、繊維芽細胞由来の物質は $\beta$ -グルコシド結合型が主要であることが示唆された。

以上より、熱ショック後の TIG-3 細胞の脂質画分に、コレステロールモノグルコシド（コレステリルグルコシド、図1B）が存在することが確認された。また、逆相 HPLC カラム上での挙動から、繊維芽細胞由来の物質は $\beta$ -グルコシド結合をもった $\beta$ -コレステリルグルコシドと推定された。

#### 培養上清へのコレステリルグルコシドの添加による HSP の誘導

繊維芽細胞の外から、 $10\mu\text{M}$  のコレステリルグルコシドを与えた結果、30 分以内に HSP70 が蓄積された（図6）。この細胞の場合も熱ストレスによる HSP70 の誘導には 90 分以上かかることと比較して、速やかな誘導であった。また、 $0.1\sim 10\mu\text{M}$  のコレステリルグルコシド濃度で十分な誘導が見られ、時間依存性、用量依存性とも $\alpha$ 、 $\beta$ 型による差は見られなかった。

#### 【考察】

本研究によって、哺乳類細胞においては初めてステリルグルコシドの存在が明らかとなり、その構造は $\beta$ -コレステリルグルコシドと決定された。さらに、細胞内におけるその含量は、熱ストレスや塩ストレスによって速やかに増加することが示された。細胞のストレス防御において重要な役割を演じているストレスタンパク質（熱ショックタンパク質、HSP）の合成誘導には、1時間以上の時間経過が必要であるのに対し、本脂質の出現はそれに先行しておこる。真性粘菌においても同様な関係が既に観察されており<sup>2)</sup>、HSP の細胞内発現に先立つシグナル伝達系において、コレステリルグルコシドが重要な役割を演じている可能性が十分考えられる。

真性粘菌で明らかとなったように、細胞分化にともなってもこのコレステリルグルコシドは合成誘導される<sup>1)</sup>。細胞分化とストレス応答は、互いに密接な関連をもった生体内反応であると考えられ、ステリルグルコシドの下流で働く細胞内情報伝達系の仕組みを知ることによって、これらの接点を明らかにすることが可能と思われる。

## 【今後の課題】

ステリルグルコシドの合成酵素については、真性粘菌の場合、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、熱ストレスによって速やかに活性化されることがわかっている<sup>2)</sup>。我々は既に、ヒト繊維芽細胞においても類似の酵素活性を検出しており、その活性調節機構などを今後明らかにすることによって、ステリルグルコシドの生体内での役割をさらに明らかにしていきたい。

胃潰瘍や胃ガンとの関係が疑われているピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) には、 $\alpha$ -コレステリルグルコシドとその誘導体が豊富に存在するが、その生物学的意義については不明である<sup>3)</sup>。本研究で明らかとなったストレス依存的なコレステリルグルコシドの蓄積との関係から、この問題を考え、検討してみることは医薬品への応用を考えるとたいへん興味深い。

また、コレステリルグルコシドの役割を考える上で、HSP系とは異なった細胞内ストレス応答機構が存在する可能性もあり、その辺も考慮した解析が必要であろう。さらに、ステリルグルコシド以外の細胞膜脂質成分のストレス依存的な変動にも着目することによって、新たなメディエーターの発見に努めたい。

## 【参考文献】

- 1) Murakami-Murofushi, K. *et al.* (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 16719-16723.
- 2) Murakami-Murofushi, K. *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 486-489.
- 3) Hirai, Y. *et al.* (1995) *J. Bacteriol.* 177, 5327-5333.

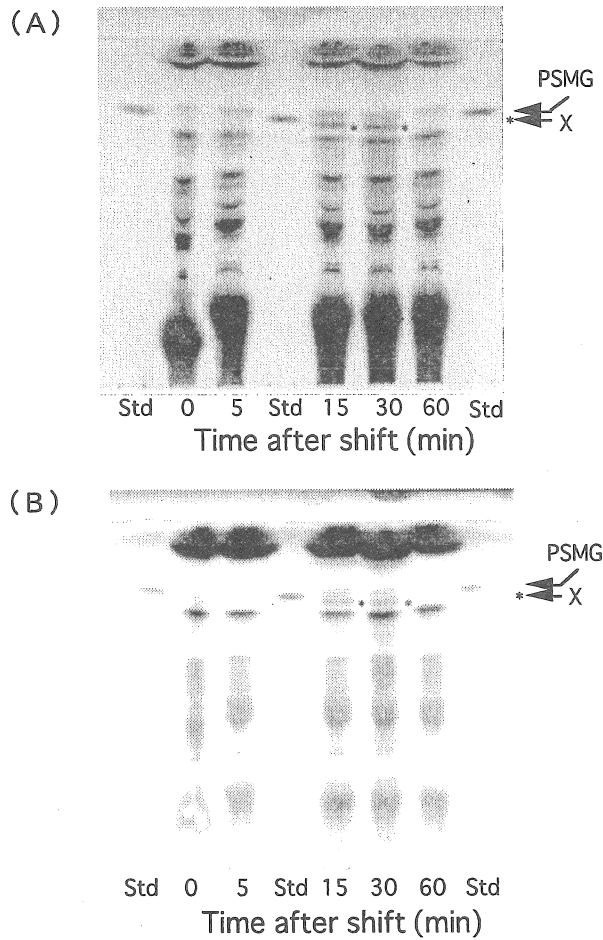


図2. TIG-3 細胞における熱ストレス依存的な糖脂質の変化。(A) オルシノール硫酸試薬による糖の呈色、(B) 塩化第二鉄試薬によるステロールの呈色。PSMG; 真性粘菌由来のポリフェラステルリルグルコシド。

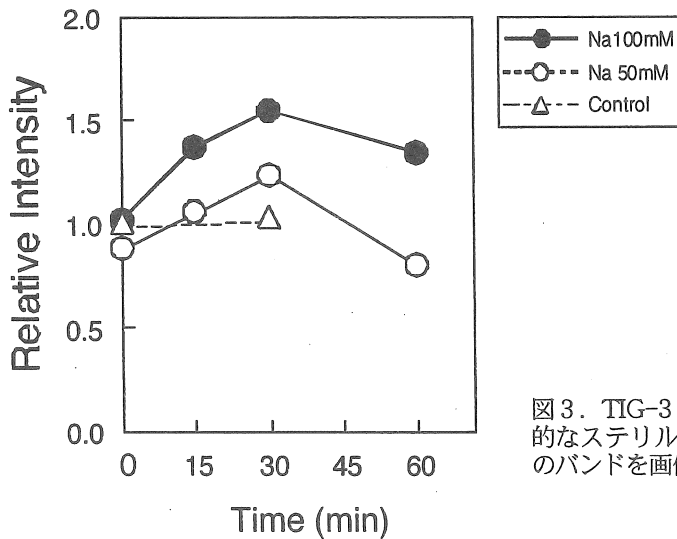


図3. TIG-3 細胞における高塩ストレス依存的なステリルグルコシドの増加。HPTLC 上のバンドを画像解析により定量化。



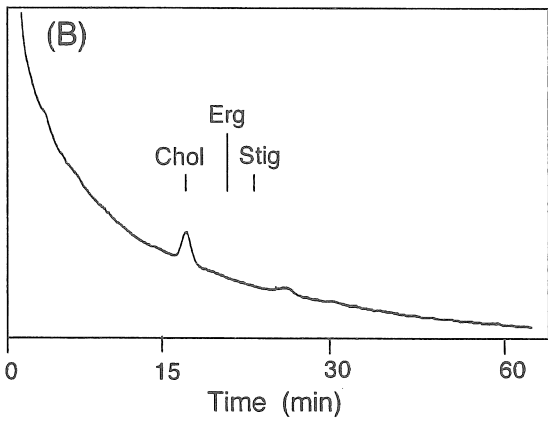
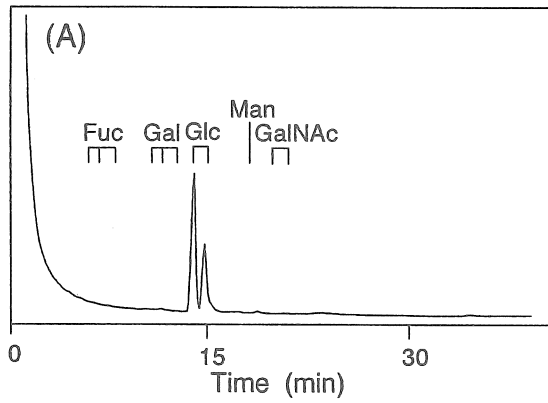


図4. ストレス誘導性糖脂質の GLC 分析。(A) 糖の分析、(B) ステロールの分析。

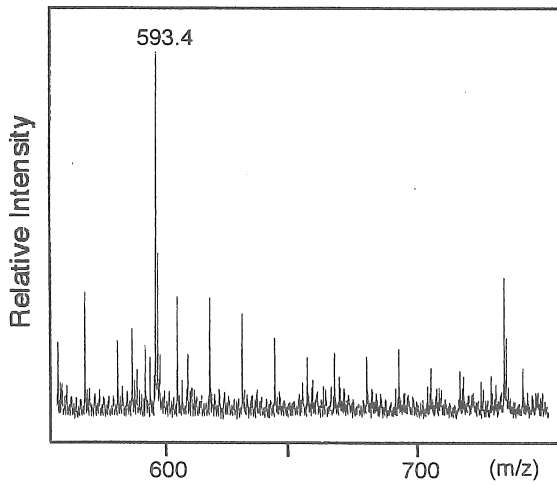


図5. エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) によるヒト繊維芽細胞由来コレステリルグルコシドの同定。

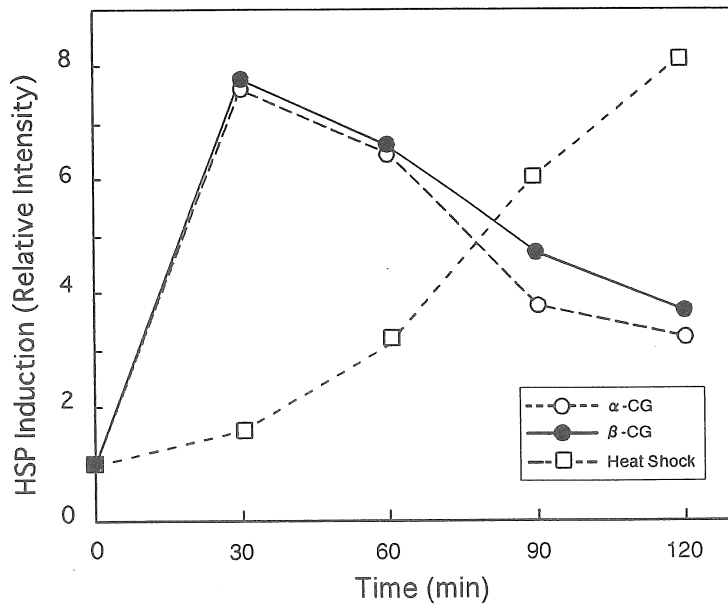


図6. 細胞外から添加したコレステリルグルコシドによる熱ショックタンパク質 (HSP) の誘導。α-CG; α-コレステリルグルコシド、β-コレステリルグルコシド。

## A Novel Lipid Mediator Induced by Salt Stress

Tetsuyuki Kobayashi

(Department of Biology, Faculty of Science, Ochanomizu University)

### Summary

Steryl glucosides are sterol derivatives which are glucosylated at 3-OH of sterol. These are naturally occurring compounds in higher plants, yeast, mold and helicobacter, but their physiological role(s) is not clarified yet.

We reported previously that heat stress induced the immediate production of a poriferasteryl glucoside in the myxoamoebae of *Physarum polycepharum*, and that the activity of UDP-glucose:poriferasterol glucosyltransferase was also expressed rapidly after the heat shock. These observations suggested that steryl glucoside play an important role in cellular stress responses.

In the present study, we investigated the heat-induced glycosylation of membrane sterol in human cultured fibroblasts (TIG-3 cells) to verify if this glycosylation is a general phenomenon in any organism. Salt stress-dependent accumulation of steryl glucoside in TIG-3 cells was also examined.

A certain glycolipid band was detected on a TLC plate in lipid extracts from TIG-3 cells, which were exposed to high temperature (42°C) for 15 and 30 min, while it was hardly detectable without heat shock. The lipid was accumulated similarly by salt stress. The structure of lipid molecule was elucidated to be a cholesteryl glucoside by structural analyses. A 30-min exposure of fibroblasts to chemically synthesized cholesteryl glucoside induced apparently HSP70, a family of proteins known as the enhancer of cell survival following exposure to a variety of stress conditions. Longer treatment (more than 90 min) was necessary for the induction of the same level of HSP70 by heat-treatment at 42°C.

These findings suggested that the heat-induced glycosylation of sterol may have a significant role(s) in a signal transduction system to cause succeeding stress responses such as induction of HSPs in cells from mold to mammal.