

マウス神経芽腫細胞の増殖・形態・ 脂質代謝に及ぼす非天然型 リゾスフィンゴ脂質の影響

杉 山 英 子

信州大学医学部心脈管病研究施設脂質生化学部門
(主任: 武富 保教授)

Effects of Unnatural Lysosphingolipids on Cell Growth, Morphology and Lipid Metabolism in Mouse Neuroblastoma Cells in Culture

Eiko SUGIYAMA

*Department of Lipid Biochemistry, Institute of Cardiovascular Disease,
Shinshu University School of Medicine
(Director: Prof. Tamotsu TAKETOMI)*

Effects of exogenous lysosphingolipids, which are composed of sphingosine base and polar head groups such as phosphocholine and sugar chain, on cell growth, morphology, and lipid composition were examined in three neuroblastoma cell lines derived from A/J C1300 clone; NS-20Y, Neuro2a, and N1E-115. All of the synthetic lysosphingolipids such as L-threo dominant sphingosylphosphocholine and D-erythro psychosine, glucosyl-psychosine and lysosulfatide inhibited cell growth and produced various kinds of cell damage. These cells had similar phospholipid compositions, being mainly composed of phosphatidylethanolamine, ethanolamine-plasmalogen, phosphatidylcholine, choline-plasmalogen, phosphatidylserine and sphingomyelin. However, we observed differences in ganglioside compositions, which consisted of GM3, GM2, GM1, GD3 and GD1a in NS-20Y and Neuro2a, and of GM3 and GM2 in N1E-115. The exogenous sphingosylphosphocholine induced neurite outgrowth in all cell lines at a concentration of more than 50 μ M. Synthetic N-acetyl sphingosylphosphocholine showed a similar effect but natural sphingomyelin did not. Moreover, the exogenous sphingosylphosphocholine was found to increase cellular sphingomyelin, cholesterol and GM3 in all cell lines, although the mechanism is unknown. From pulse and chase experiments of L-threo dominant [3- 3 H]sphingosylphosphocholine in cells, it was assumed that the exogenous sphingosylphosphocholine is incorporated and degraded into phosphocholine and sphingosine by phospholipase C or sphingomyelinase in cells, and that the sphingosine is rapidly acylated to newly synthesized ceramide which is gradually converted to newly synthesized sphingomyelin either by phosphatidylcholine: ceramide cholinephosphotransferase, or by CDP-choline: ceramide cholinephosphotransferase. *Shinshu Med. J.*, 40: 45-59, 1992

(Received for publication September 10, 1991)

Key words: lysosphingolipids, neuroblastoma cells, sphingosylphosphocholine, sphingomyelin, lipid metabolism

リゾスフィンゴ脂質, 神経芽腫細胞, スフィンゴシルホスホコリン, スフィンゴミエリン, 脂質代謝

I 緒 言

スフィンゴ脂質の代謝と機能についての関心は高い。Fig. 1 に示すように、リゾスフィンゴ脂質は疎水性のスフィンゴシン塩基に親水性のホスホコリンや糖鎖

駆構造を持つので、当研究室ではかねてよりこれがスフィンゴ脂質の代謝と機能の研究に有用であることに注目し、種々のリゾスフィンゴ脂質を調製して、その化学的、物理学的性質だけでなく生物学的活性の一端を明らかにしてきた⁹⁾⁻¹¹⁾。本研究ではこれまでの知見

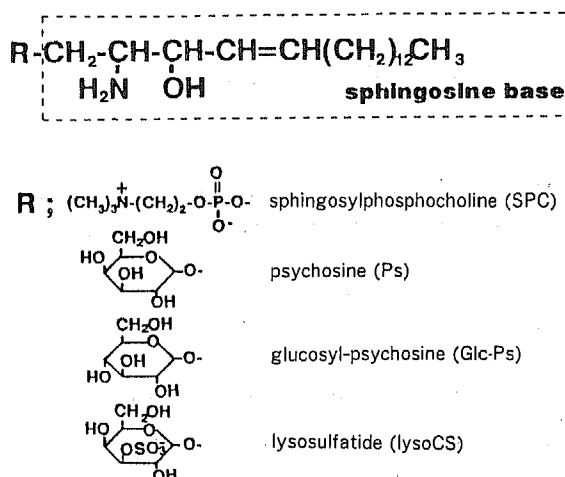


Fig. 1 Chemical structure of lysosphingolipids

が結合している。したがって両親媒性であり、スフィンゴ脂質と異なり、水に易溶である。近年、リゾスフィンゴ脂質はスフィンゴシンとともにプロテインキナーゼC活性を阻害するといわれ、細胞機能における内因性調節因子ではないかと注目されている¹⁾。これらの生理活性についての報告は多いが、リゾスフィンゴ脂質に限れば、スフィンゴシルホスホコリン (sphingosylphosphocholine, 以下 SPC) (いわゆるリゾスフィンゴミエリン) によるミトコンドリアの機能の阻害²⁾、サイコシン (psychosine, 以下 Ps) やグルコシルサイコシン (glucosyl-psychosine, 以下 Glc-Ps) によるチトクロムCオキシダーゼ活性の阻害³⁾、リゾGM3 (ガングリオシドの略号は、Svennerholm の命名法⁴⁾に従った。) による EGF (epidermal growth factor, 表皮増殖因子) レセプターのチロシンリン酸化の阻害⁵⁾などが挙げられる。しかしながら、リゾスフィンゴ脂質の細胞内レベルは非常に低く、正常な細胞に本当に存在するのかどうかについては疑問が残されている。リゾスフィンゴ脂質の真の生理的役割はまだ解明に至っていない。

リゾスフィンゴ脂質は天然にはほとんど存在しない、いわば非天然型の物質であるが、スフィンゴ脂質の前

を踏まえて、まずマウス神経芽細胞腫の細胞株に4種のリゾスフィンゴ脂質を与えて、それらが細胞の増殖、形態、脂質組成に及ぼす影響を調べた。その結果、特に特徴的な効果を示した SPC の細胞への取り込みと代謝について、さらにN-アセチルスフィンゴシルホスホコリン (N-acetyl SPC, 以下 NAcSPC) やスフィンゴミエリン (sphingomyelin, 以下 SM) との比較を行い、SM より調製した $[3-^3\text{H}]$ SPC を用いての代謝標識実験による検討を加えた。

II 材料と方法

A 脂質

SM, セレブロシド, スルファチドはそれぞれヒツジ赤血球, ヒト脳, ブタ脊髄から調製された。SPC は、ブタ脊髄由来の SM から調製され、非天然型の L-threo 体が70% (これまでに同定されている天然のスフィンゴ脂質のスフィンゴシン塩基は総て D-erythro 型である。) を占めるという組成のものである⁹⁾。Ps はセレブロシドから¹⁰⁾、リゾスルファチド (lysosulfatide, 以下 lysoCS) はスルファチドから¹¹⁾、Glc-Ps はグルコシルセラミドから、それぞれ調製されたが、これらはいずれも D-erythro 体から成るもの

である。NAcSPCはSPCのN-アセチル化により調製された⁹⁾。

B 細胞培養

本研究に用いたマウス神経芽細胞腫の細胞株NS-20Y (cholinergic), Neuro2a (inactive), N1E-115 (adrenergic) はA/JマウスのC1300細胞よりクローン化されたもので、名古屋市立大学医学部加藤泰治、田中 亮両教授より分与された。継代培養は、10% FCS (Flow. Lab.), penicillin (100 Units/ml, Flow Lab.), streptomycin (100 μ g/ml, Flow Lab.) 含有 Dulbecco's MEM (Flow. Lab.) 培地で37°C, 5% CO₂下で行った。通常の培養には、培養フラスコ (50 ml, 260ml; NUNC) を用いた。

C 細胞に対する各種リゾスフィンゴ脂質の効果の検討

細胞増殖に対する各種脂質の影響をみるために、細胞を1×10⁴個/cm²の密度で培養ペトリディッシュ (径35mm, NUNC) に播種し、それぞれの脂質30~150 μ M (終濃度) を加えた培養液2 ml中で5~6日間培養した。途中3日目に培養液を交換した。培養終了後、0.1% trypsin (阪大微研) 処理で細胞を剥離採集し、細胞数を算定した。併せて培養中に位相差顕微鏡による形態観察も行った。

脂質組成の分析のためには、培養スクウェアディッシュ (240×245×20mm, NUNC) を用い、同様に播種時に脂質 (100 μ MのSPC, SM, および50 μ MのNAcSPC) を加えて5~6日間培養し、培養終了後に上記のごとく採集した細胞を速やかにリン酸緩衝溶液 (phosphate-buffered saline, 以下PBS) で洗浄し、クロロホルム/メタノール (2:1, v/v) によって全脂質を抽出した。この抽出液に1/4容の水を加えて二層に分配し¹²⁾、上層をSep-Pak C18カートリッジカラム (Waters) で脱塩処理後、ガングリオンドの分析に、下層をリン脂質とコレステロールの分析に供した。

D [3-³H]SPCの調製

Iwamori ら¹³⁾の方法に従い、ヒツジ赤血球由来のSMを3% 2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone (Nakarai Tesque) ジオキサン溶液で3-keto SMに酸化し (Fig. 2, Step I), 次にこれをテトラヒドロフランに溶解し [³H]NaBH₄で還元して[3-³H]SMを得た (Fig. 2, Step II)。これをKaller¹⁴⁾の方法に従い、沸騰浴中で1時間、6N塩酸ブタノールで脱アシル化し、粗[3-³H]SPCを得た

(Fig. 2, Step III)。さらにケイ酸カラムクロマトグラフィーで精製し、液体シンチレーションスペクトロメーターで比活性を測定した。また、3種類の溶媒 (溶媒B, D, F) を用いたTLC-フルオログラフィーで均一性を確認した。

E [3-³H]SPCによる代謝標識実験

NS-20Y細胞を用い、pulse実験では、培養フラスコ (50ml) に細胞を1×10⁴個/cm²の密度で播種して培養し、3日目に25 μ Mの[3-³H]SPC (0.46 μ Ci/flask) を加え、さらに0.5~24時間培養を続けた。Chase実験では、培養フラスコ (260ml) を用い、同様に3日目に同濃度の[3-³H]SPC (1.53 μ Ci/flask) を加えて4時間培養した後で[3-³H]SPCを含まない培地に交換し、さらに1~48時間培養を継続した。両実験とも培養終了後 cell scraper (NUNC) で速やかに細胞を剥離採集、冷PBSで洗浄し、Bligh-Dyer法¹⁵⁾に従い脂質を抽出し、Sep-Pak C18カラムを通した後、分析に供した。

F 脂質の分析

1 薄層クロマトグラフィー (Thin Layer Chromatography, TLC)

TLCにはMerck社製のシリカゲル60プレート (リン脂質, コレステロール分析用) およびHP-TLC (ガングリオンド分析用) を使用した。展開には分析の目的に応じて、以下の組成の溶媒を用いた。溶媒A: クロロホルム/メタノール/水, 混液 (以下C/M/Wと略, 65:25:4, v/v), 溶媒B: C/M/2.5Nアンモニア水, (60:35:6), 溶媒C: C/M/アセトン/酢酸/W, (70:15:30:15:7.5), 溶媒D: C/M/0.2% CaCl₂水溶液, (60:35:8), 溶媒E: C/M/2.5Nアンモニア水, (60:35:8), 溶媒F: n-ブタノール/酢酸/W, (6:2:2), 溶媒G: C/M/酢酸, (94:1:5), 溶媒H: C/M/濃アンモニア水, (80:20:2)。

リン脂質の分析には二次元展開を行い、溶媒Bで一次元目の展開をした後、塩化水素ガスにさらし、溶媒Cで二次元目の展開をした。各スポットの検出には酢酸銅リン酸試薬¹⁶⁾を噴霧し150°Cで15分間加熱した。またガングリオンドの分析には溶媒DあるいはEを用い、レゾルシノール塩酸試薬¹⁷⁾を噴霧し95°Cで25分間加熱して検出した¹⁸⁾。

2 フルオログラフィー

標識脂質は溶媒Aを用いたTLCで分離後、EN³HANCE (NEN Research Products) を噴霧し

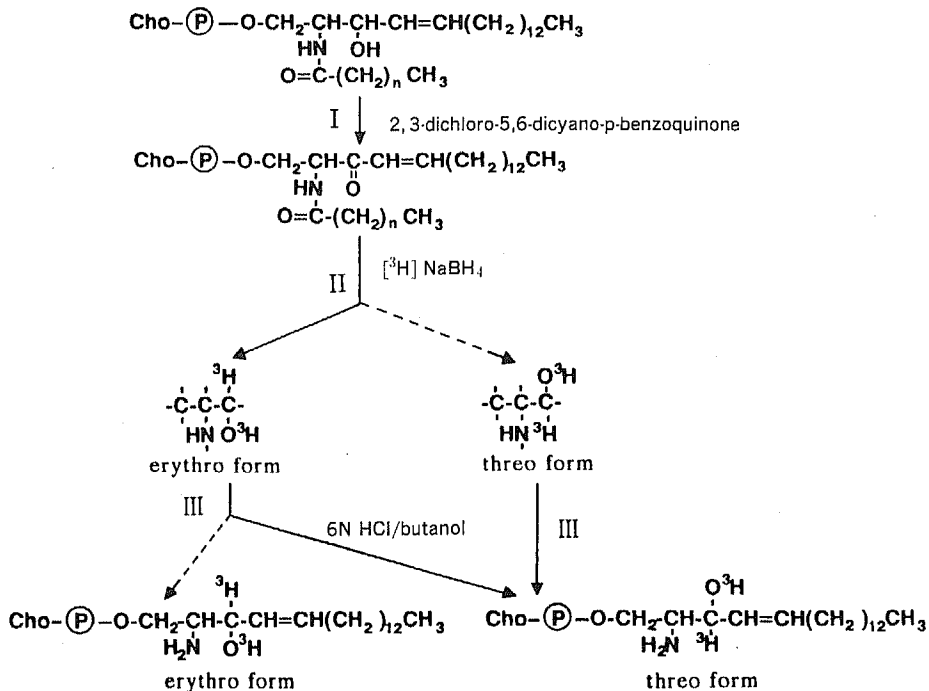


Fig. 2 The scheme for preparation of $[\text{3-}^3\text{H}] \text{SPC}$ Cho-(P); phosphocholine

てFuji RXフィルムあるいはRX-Hフィルム (Fuji Photo Film) を用いて -75°C でフルオログラフィーを行い分析した。細胞への放射活性の取り込みの総量は液体シンチレーションスペクトロメーターで測定した。TLCで分離された各脂質への取り込みにはフルオログラムをデンストメーター (CS9000, Shimadzu) で測定する方法と、薄層プレートより各スポットをかきとってバイアルに入れ液体シンチレーションスペクトロメーターで測定する方法とを併用した。

3 標識脂質の同定

TLCで分離された標識脂質の同定のため、それぞれのスポットをプレートからかきとって、 70°C で18時間、水性塩酸メタノールによるメタノリシス¹⁹⁾、あるいはスフィンゴミエリナーゼ (*Staphylococcus aureus*, Sigma)²⁰⁾やホスホリパーゼC (*Clostridium perfringens*, Sigma)²¹⁾による水解を行った。水解産物は溶媒AおよびHを用いた TLC-フルオログラフィーで分析した。

4 各脂質の定量

リン脂質、コレステロールの定量には、Bartlett

法²²⁾、Zak法²³⁾をおのおの用いた。また、ガングリオシドの定量はAndoら¹⁸⁾の方法に準じた。

III 結 果

A 細胞の増殖および形態に及ぼす非天然型リノスフィンゴ脂質の影響

Fig. 3 に示すように4種のリノスフィンゴ脂質は総ての細胞株で増殖を阻害したが、その効果の強度は様ではなかった。NS-20YはlysoCSやPsによって強く増殖が阻害され、これらを $50\mu\text{M}$ の濃度で添加したウェルでは5日間の培養終了時の総細胞数が対照の30%以下であった。一方、この細胞はSPCやGlc-Psによって強い阻害は受けず、少なくとも $100\mu\text{M}$ までは対照細胞と同等に増殖できた (Fig. 3, A)。Neuro2aはいずれのリノスフィンゴ脂質によっても $50\mu\text{M}$ 付近までは強い増殖阻害は受けないが $50\sim 100\mu\text{M}$ の範囲ではPs, lysoCSやGlc-Psにより強い阻害を受けた (Fig. 3, B)。N1E-115の増殖は、4種のうちlysoCSにより特に強く阻害され、 $30\mu\text{M}$ で6日間培養後の細胞数は対照細胞の約30%にすぎなかった。 (Fig. 3, C)。

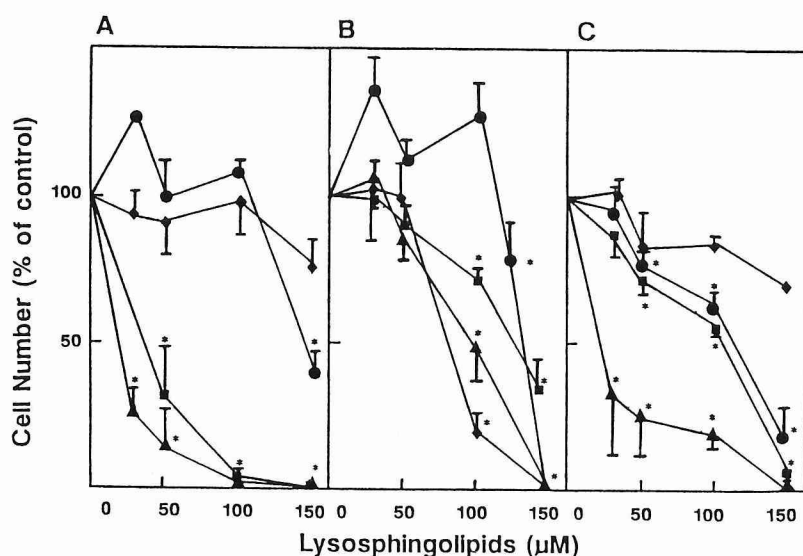


Fig. 3 Effects of four lysosphingolipids on cell growth in three mouse neuroblastoma cell lines, NS-20Y (A), Neuro2a (B) and N1E-115 (C). Cells were seeded at a density of 1×10^4 cells/cm², and then cultured for 5 or 6 days with 2 ml of Dulbecco's MEM containing 10% FCS, 100 Units/ml of penicillin, 100 μ g/ml of streptomycin and one of the following lysosphingolipids: SPC (●), Ps (■), Glc-Ps (◆) and lysoCS (▲). After the culture, cells were harvested by trypsin treatment and the number of cells was counted. Each cell number is expressed as a percentage of the control. * $P < 0.01$ (vs. control)

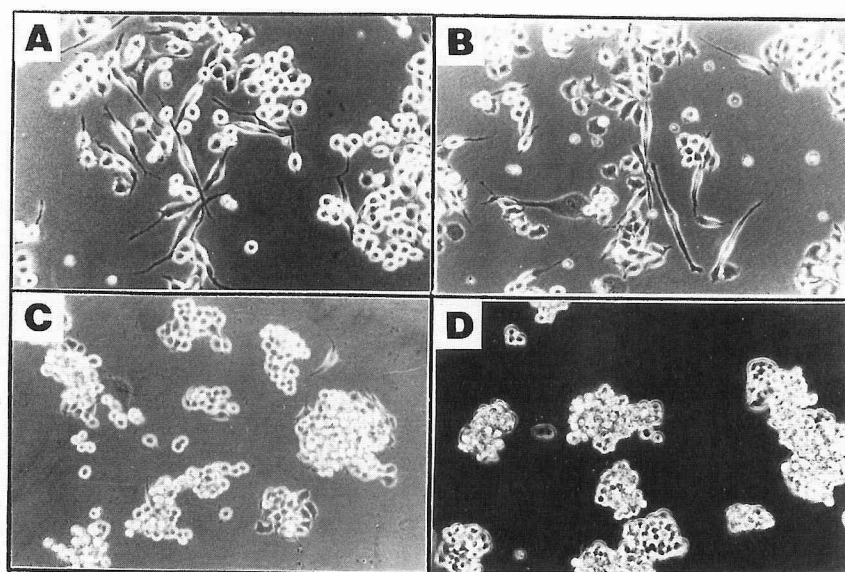


Fig. 4 Morphology of NS-20Y cells incubated with 100 μ M of SPC (A), NAcSPC (B), SM (C) and no-treated (control, D) at 3 days in culture. (original magnification $\times 78$)

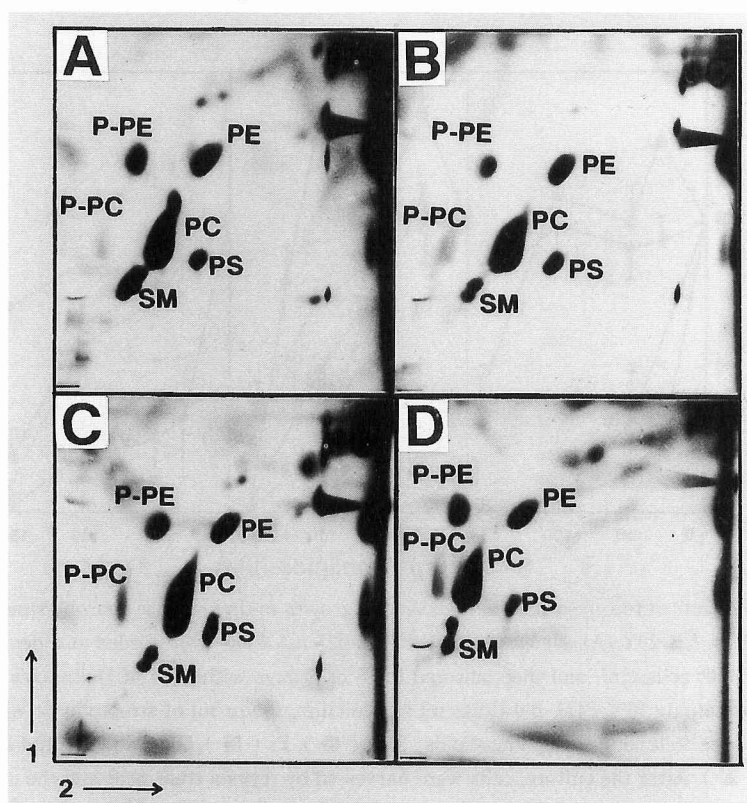


Fig. 5 Distribution patterns of phospholipids treated with SPC (A), NAcSPC (C), SM (D) and control (B) from NS-20Y cells. For developing, solvent B (for the first run, see text) and solvent C (for the second run) were used. All spots were detected by spraying cupric-phosphoric acid reagent and heating at 150°C for 15 min¹⁸⁾. PC, phosphatidylcholine; P-PC, choline-plasmalogen; PE, phosphatidylethanolamine; P-PE, ethanolamine-plasmalogen; PS, phosphatidylserine; SM, sphingomyelin

Table 1 Phospholipid composition in mouse neuroblastoma cells

	NS-20Y				Neuro2a				N1E-115			
	CTL ^a	SPC	NAcSPC	SM	CTL	SPC	NAcSPC	SM	CTL	SPC	NAcSPC	SM
	phospholipids (%)											
PE ^b	9.4	7.0	6.4	10.1	12.1	14.2	13.9	7.5	14.4	15.8	17.5	14.2
E-PL ^c	12.4	11.9	16.8	28.4	21.4	6.9	15.5	32.5	21.0	15.7	14.6	13.4
PC ^d	65.1	58.8	65.4	50.5	42.7	47.7	40.2	46.8	50.2	41.5	49.6	45.4
C-PL ^e	3.0	4.1	4.0	6.5	9.8	8.1	14.1	6.7	3.9	7.1	6.9	8.7
PS ^f	6.4	5.9	1.4	2.3	9.6	11.7	7.6	3.1	5.6	6.7	4.7	9.7
SM	3.5	11.3	5.9	2.0	4.4	11.4	8.7	3.5	4.9	13.2	6.8	8.6

^a control; ^b phosphatidylethanolamine; ^c ethanolamine-plasmalogen;

^d phosphatidylcholine; ^e choline-plasmalogen; ^f phosphatidylserine

この実験で50~150 μ MのSPCを与えたウェルにのみ、3種の細胞に共通して神経突起の伸張が観察された。また、血清無添加の条件下でも1~10 μ MのSPCを与えた場合に突起を伸張した細胞が対照のウェルよりも多く認められた。そこで比較のため、SPCをその構造骨格に持つ天然のSMと、SPCより調製したNacSPCの効果についても同様に検討した。天然のSMを細胞に与えても特に増殖や形態に対して効果を示さなかったが、NacSPCを与えるとSPCと同様に細胞の増殖は阻害され、突起伸張の効果も認められた (Fig. 4)。

B 非天然型 SPC による細胞脂質組成の変化

SPCにこのような特徴的な効果が見られたので、3種の神経芽腫細胞にこのSPCと、対照としての上述したNacSPC、SMをそれぞれ与えて細胞の脂質組成を比較した。

Table 1にそれぞれの細胞のリン脂質の組成パターンを示した。おもな構成成分はホスファチジルコリン(PC)、コリン-プラスマローゲン(C-PL)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、エタノールアミン-プラスマローゲン(E-PL)、ホスファチジルセリン(PS)、そしてSMであり、3細胞とも類似のパターンを示した。SPCを与えたことにより、3種の細胞のリン脂質のうちSMの増加(対照細胞の約3倍に増加)が顕著に認められた (Fig. 5, Table 1)。SPCとの比較の目的で用いたNacSPCやSMによっては、SPCとは異なり3種の細胞におけるSMの著増は認められなかったが、NacSPCを与えたことによりやや細胞のSMは増加した。またSPCを与えたことで3種の細胞のコレステロールも増加していた。

ガングリオシドについては、Table 2とFig. 6にその組成パターンを示した。NS-20YとNeuro2aの

Table 2 Ganglioside composition in mouse neuroblastoma cells

	NS-20Y				Neuro2a				N1E-115			
	CTL	SPC	NacSPC	SM	CTL	SPC	NacSPC	SM	CTL	SPC	NacSPC	SM
gangliosides (%)												
GM3	2.0	9.9	4.2	1.9	16.5	26.2	21.7	15.8	30.3	47.0	33.5	34.5
GM2	15.2	24.5	12.8	19.4	23.2	33.0	20.5	33.6	69.6	53.0	66.5	65.5
GM1	4.9	12.2	5.1	5.3	16.0	10.9	15.5	14.3				
GD3	4.2	1.6	7.7	5.3	5.0	3.5	7.3	6.7				
GD1a	73.3	51.1	70.2	66.7	39.2	26.4	35.0	29.7				

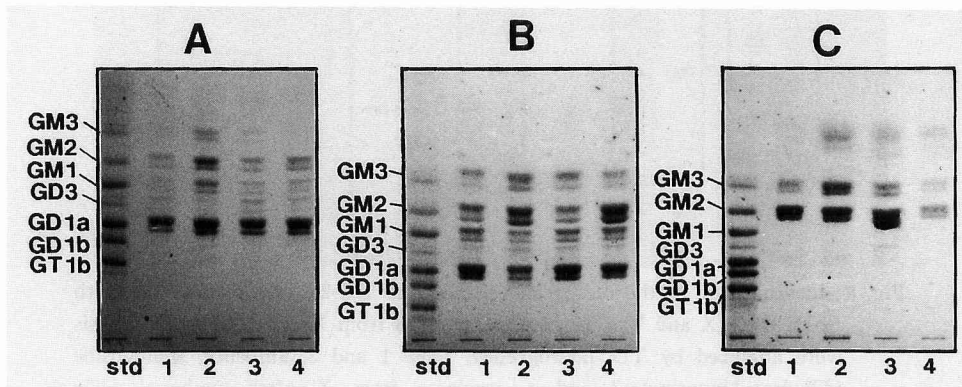


Fig. 6 Distribution patterns of gangliosides treated with SPC (lane 2), NacSPC (lane 3), SM (lane 4) and control (lane 1) from three neuroblastoma cell lines. Developing was carried out with solvent D (see text) and all spots were detected by spraying resorcinol-HCl reagent¹⁷⁾ and heating at 95°C for 25 min¹⁸⁾.

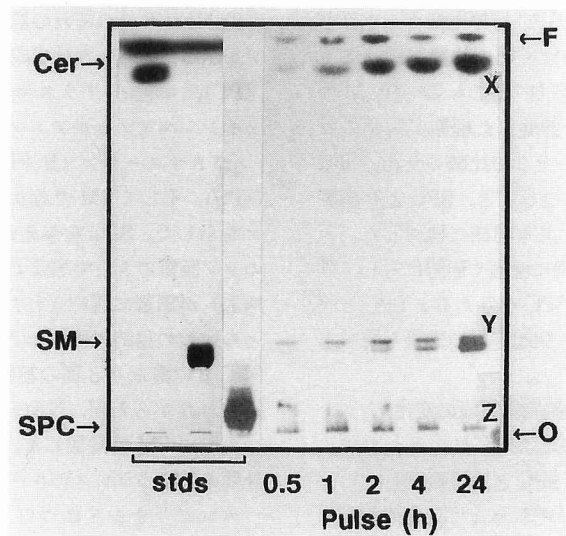


Fig. 7 Distribution of radioactivity incorporated into NS-20Y cells after pulse with $25\mu\text{M}$ of $[3\text{-}^3\text{H}]\text{SPC}$ ($0.46\mu\text{Ci}/\text{flask}$) for 0.5-24 hrs. TLC was carried out with solvent system A (see text) and visualized by fluorography. Authentic SM and ceramide (Cer) were detected with cupric-phosphoric acid reagent¹⁶⁾. Major three radioactive spots are shown as X, Y and Z. O, origin; F, front

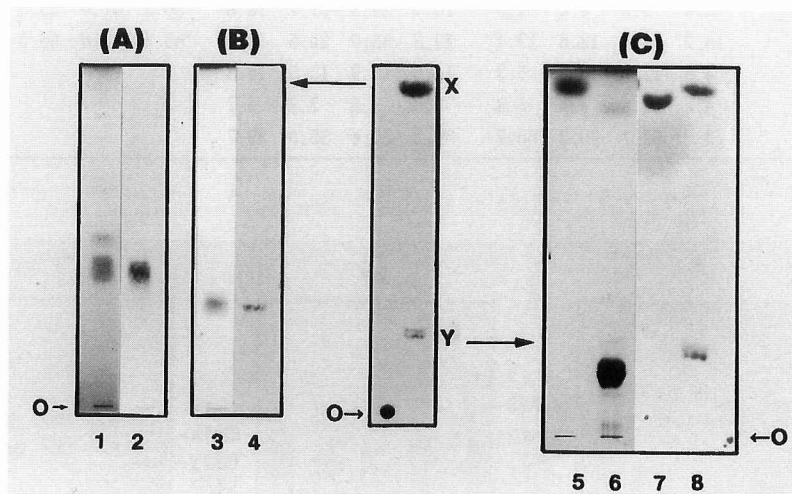


Fig. 8 Identification of the radioactive lipids from NS-20Y cells incubated with $[3\text{-}^3\text{H}]\text{SPC}$ (X and Y). The products derived from X and Y after hydrolysis were analyzed by TLC-fluorography. Lane 1 and 3, authentic sphingosine (dihydrosphingosine); 2 and 4, products from X after methanolysis¹⁹⁾; 5, authentic ceramide; 6, authentic SM; 7, product from Y after phospholipase C treatment²¹⁾; 8, product from Y after sphingomyelinase treatment²⁰⁾. Panel (A) was developed with solvent H. Panels (B) and (C) were developed with solvent A (see text). O, origin

Table 3 Distribution of radioactive compounds from NS-20Y cells after pulse with 25 μ M of [3-³H]SPC (0.46 μ Ci/flask). Values are shown as mean \pm S.D. of 3 experiments.

Incubation time (h)	[3- ³ H]SPC incorporation (dpm/10 ⁵ cells)		
	Cer	SM	SPC
0.5	124 \pm 18	120 \pm 17	321 \pm 34
1	343 \pm 105	175 \pm 13	500 \pm 92
2	715 \pm 48	323 \pm 25	456 \pm 57
4	992 \pm 184	776 \pm 131	791 \pm 77
24	2,358 \pm 114	2,288 \pm 163	788 \pm 234

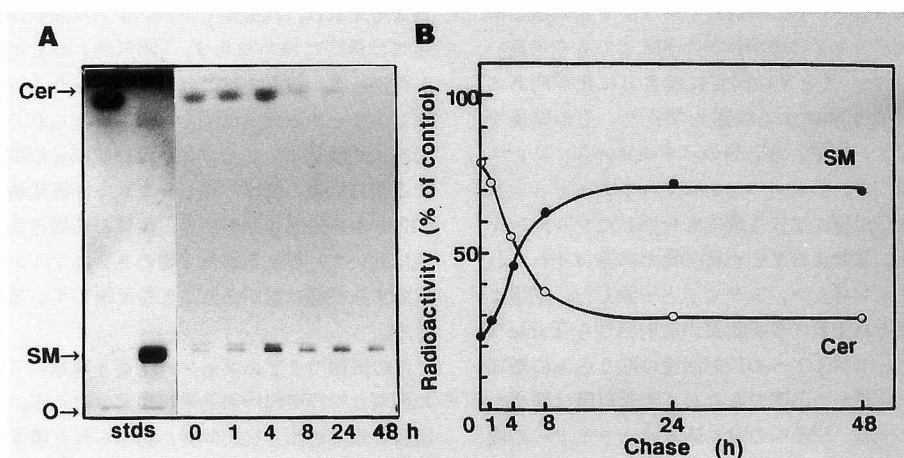


Fig. 9 Distribution of radioactive ceramide and SM from NS-20Y cells during the chase.

Panel (A), fluorogram; Panel (B), Each lane of the fluorogram was determined by densitometric scanning and plotted; O, origin; Cer, ceramide

The condition of TLC-fluorography and detection was same as that in Fig. 7.

ガングリオシドパターンはGM3, GM2, GM1, GD3, GD1aで構成されるが, N1E-115のパターンはGM3とGM2とから成り, 細胞種間で差が見られた。SPCを与えたことにより, 3種類の細胞のガングリオシド組成においてはGM3の増加が認められた。特にNS-20YではGM3の組成比が対照細胞の約5倍に達した。

C L-threo dominant [3-³H]SPCの調製

Fig. 2に示すような過程を経て, [3-³H]SPCを得た。比活性は6.1 mCi/molであった。3種類の溶媒(溶媒B, D, F)を用いたTLC-フルオログラフィーでは, いずれの溶媒系においても単一のバンドで検出され, 放射活性の純度は98%以上であった。しかしながら, この方法では, 天然型のD-erythro [3-³H]SPCとともに非天然型のL-threo [3-³H]SPC

が生ずる。前述したように, ブタ脊髄由来SMからKaller法で調製したSPCはL-threo体が70%であるが⁹⁾, この[3-³H]SPCの調製にあたっては, Fig. 2に示すようにL-threo体が生ずる確率はさらに増すことが予測できる。Step II (Fig. 2)でL-threo体が生ずる確率は約35%である²⁴⁾ので, 本研究で調製された[3-³H]SPCは非天然型のL-threo体を約80%含むものと推定された。収率は, Step Iを経てIIまでで約50%, Step IIIで約65%であった。

D NS-20Y細胞におけるL-threo dominant [3-³H]SPCの細胞への取り込みと代謝

25 μ Mの[3-³H]SPC (0.46 μ Ci/flask)で0.5~24時間のpulseの結果, 細胞に取り込まれた放射活性の総量は以下に示すとおりである。放射活性はpulse 4時

間までに急速に取り込まれ、0.5時間では 565 ± 79 dpm/ 10^5 cells (平均値 \pm 標準偏差)、その後 pulse 1 時間、2 時間、4 時間ではそれぞれ $1,017 \pm 174$, $1,495 \pm 29$, $2,560 \pm 180$ dpm/ 10^5 cells であった。Pulse 4 時間以降は取り込みは緩やかになり、pulse 24 時間では $5,434 \pm 694$ dpm/ 10^5 cells であった。

[$3\text{-}^3\text{H}$]SPC で pulse した後で細胞より抽出した放射性脂質の組成を Fig. 7 に示した。図中 X, Y, Z で示す 3 つのスポットは、それぞれ標準試料のセラミド、SM, SPC と溶媒 A を用いた TLC 上で同様に挙動した。これらはいずれもアルカリ非感受性であった。スポット X はまた、セラミドの分析に使用される溶媒 G を用いた TLC でも標準試料のセラミドと同様に挙動した。スポット Y は標準試料の SM よりもやや高い Rf 値を示した。X と Y の同定にはさらに化学的あるいは酵素的な水解による検討を加えた。その結果を Fig. 8 に示す。図中、A と B のパネルはメタノリシスによる生成物を、C はスフィンゴミエリナーゼとホスホリパーセ C 処理による生成物を分析したフルオログラムである。X および Y の水解産物の挙動はそれぞれ標準のスフィンゴシン、セラミドと一致した。細胞より抽出したそれぞれの標識脂質の放射活性を Table 3 にまとめた。セラミドへの放射活性の取り込みの増加は pulse 2 時間まで迅速であるが 4 時間以降は緩やかであった。一方、SM への取り込みはセラミドへの取り込みよりも緩やかに 24 時間まで増加を続けた。この pulse の間、[$3\text{-}^3\text{H}$]SPC の放射活性は常に SM よりもセラミドへ、より多く取り込まれていた。細胞より抽出された SPC の放射活性は pulse の間に増加していたが、セラミドや SM のそれと比べると相対的には時間とともに減少しており、新たに生成されたというよりも代謝されていることが示唆された。

Fig. 9 には chase 実験の結果を示した。パネル A のフルオログラムに示すように chase 開始時にはセラミドに大部分の放射活性が取り込まれているのに対し、SM への取り込みは少なかった。しかし、時間依存的に相補的な標識セラミドの減少と SM の増加が観察された。B のパネルはこのフルオログラムをデンストメーターで測定した結果をプロットしたものである。Chase 開始時には [$3\text{-}^3\text{H}$]SPC の放射活性の取り込みはセラミドに 78%, SM に 22% という割合で検出されたが、chase 4 時間にはセラミド 56%, SM 44% へと変化し、その後両者の量関係は逆転して 24 時間~48 時間の間ではほぼ平衡状態に達していることがわかった。

Chase 48 時間では放射活性はセラミドに 29%, SM に 71% と測定された。

IV 考 察

4 種のリゾスフィンゴ脂質 (SPC, Ps, lysoCS, Glc-Ps) はいずれも 3 種の神経芽腫細胞の増殖を阻害した (Fig. 2)。初期実験的にこれらの細胞の [^3H]thymidine の取り込みに対する 4 種のリゾスフィンゴ脂質の影響を調べた限りでは、DNA 合成の抑制は見られず、この増殖阻害効果はリゾスフィンゴ脂質の持つ細胞障害性の影響が強いと考えられた。リゾスフィンゴ脂質の細胞内レベルの低さ、その細胞障害性を考えれば、大量のリゾスフィンゴ脂質は細胞にとっては異物にはかならず、「非天然」のものである。したがって、細胞ではこれらの異物をなるべく速く代謝しようとする機構が働くものと考えられる。これらの非天然型リゾスフィンゴ脂質の種類と細胞の種類による阻害効果の差は、同じマウスの神経芽腫細胞 A/J C1300 から由来しながらも、変異の結果それぞれの細胞において、与えられた 4 種のリゾスフィンゴ脂質を代謝する機構に差があることを反映していると解釈できる。

この実験でリゾスフィンゴ脂質 4 種類のうち、SPC に顕著な神経突起伸展効果が観察されたが、細胞増殖阻害の濃度範囲と突起伸展が認められた濃度範囲が対応していないことや、SPC のみに効果が認められたことを考えると突起伸展と増殖阻害との間に直接の因果関係はないものと考えられる。この神経突起伸展のメカニズムの検討は今後の課題だが、SPC を与えたことによる細胞の脂質代謝の変化との間に関係があるのかどうかは重要な問題であり、この点については後で考察する。

さて、この非天然型 SPC を与えた細胞では、細胞から抽出した脂質のうち、SM、コレステロール、GM3 が増加していた (Fig. 5, 6)。このうち、まず SM の増加については、以前にも同じ L-threo dominant SPC を与えたグリオーマ U251 細胞²⁹⁾や家兎皮膚線維芽細胞 NS-1 (未発表データ) で認められた。これらの研究と本研究に共通して、この SPC を与えた細胞にのみ、TLC 上で標準試料の天然の SM や、対照細胞から抽出した SM よりも少し Rf 値の高いバンドが検出されている。この Rf がやや高いバンドが L-threo SPC が細胞により代謝されてできた L-threo SM であることはすでにグリオーマ細胞を用いた実験

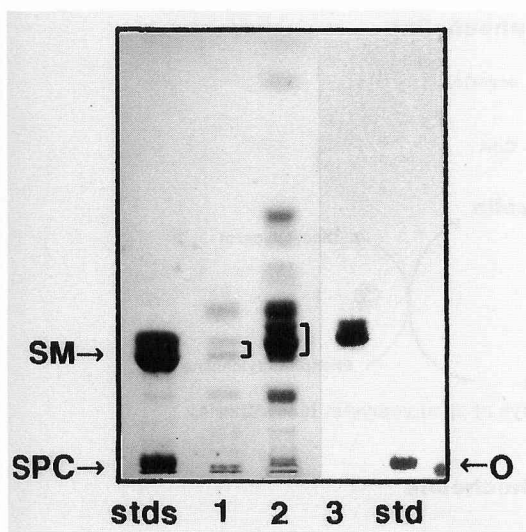


Fig. 10 The difference between naturally occurring sphingomyelin and newly synthesized *L-threo* dominant sphingomyelin extracted from NS-20Y cells after the incubation with SPC. Lane 1, total lipids from NS-20Y cells (control); lane 2, total lipids from NS-20Y cells incubated with SPC; lane 3, radioactive lipids from NS-20Y cells incubated with [$^3\text{-}^3\text{H}$]SPC. The samples applied to the lane 1 and 2 were treated with 0.2N NaOH in methanol at 37°C for 2 hrs. TLC condition was same as that in Fig. 7. O, origin

の際に間接的に証明されている²⁵⁾。本研究ではさらに NS-20Y 細胞において [$^3\text{-}^3\text{H}$]SPC の代謝で生じた放射性の SM (Fig. 10 の lane 3) が、放射性標識していない *L-threo* dominant SPC を与えた NS-20Y 細胞より抽出した SM (Fig. 10 の lane 2, 印をつけたバンド) の Rf の高いものと一致することを確認した。これらの現象は、非天然型の *L-threo* SPC でも細胞に取り込まれると SM 生合成に利用されうることを示唆している。培養細胞が本来細胞にほとんど存在しない物質でも培地中に存在すれば取り込んで、代謝・生合成に利用する例は、他に神経細胞のスフィンゴ脂質生合成における長鎖脂肪酸 (C24: 1 や C22: 1) の利用²⁶⁾や初代培養の神経のスフィンゴ脂質生合成における短鎖の C12-スフィンゴシンの利用²⁷⁾があり、その生理的意義の追究は興味深いことである。

ところで、SM の生合成については、これまでにおもに Fig. 11 に示すような 3 経路が提唱されている。まず Sribney と Kennedy²⁸⁾がセラミドと CDP-コリンとから SM が生成することをニワトリ肝より調製した酵素画分において見いだした (Fig. 11, ①)。しかしながら、この反応では非天然型の *threo*-セラミドがより反応性に富んだ基質であった。その後、Sribney²⁹⁾は、天然型の *erythro*-セラミドもビタミン K₃ やある種の界面活性剤の存在下では基質になりうることを報告したが、この経路の生理学的意義は疑問視されてきた。次に Brady ら³⁰⁾がラット脳の酵素画分で Kaller 法で調製した SPC が直接 N-アシル化されて SM が合成されたと報告した (Fig. 11, ②)。Fujino と

Negishi³¹⁾もマウス脳ミトコンドリアおよびミクロソームで同様の結果を得ている。しかし、これらの実験では放射性の acyl-CoA の取り込みを SPC 存在下で調べているに過ぎず、本当に SPC がこの反応の基質であるかどうか疑問が残された。その後、Ullman と Radin³²⁾によって、ホスファチジルコリンからセラミドへのホスホコリン転移反応による合成経路が提唱された (Fig. 11, ③)。現在ではこれが最も有力視されている。この反応を触媒する酵素、ホスファチジルコリン:セラミド ホスホコリントランスフェラーゼの諸性質も明らかにされつつある³³⁾³⁴⁾。ただ、この経路は脳において酵素活性が低いという点が唯一の弱点である。

本研究では、NS-20Y 細胞を用いた pulse 実験において、*L-threo* dominant [$^3\text{-}^3\text{H}$]SPC の放射性が、pulse の間中、細胞の SM よりもセラミドにより多く取り込まれたことを示した。そして、chase 実験では時間依存的な放射性セラミドの減少とそれに伴う SM の増加を見いだした。これらの結果から以下のことが示唆された。Fig. 12 に示すように、この非天然型の SPC は細胞に取り込まれた後で、まず、スフィンゴミエリナーゼかホスホリパーゼ C でホスホコリンとスフィンゴシンに分解される。実際に *L-threo* dominant SPC が細胞膜上あるいは細胞内でこれらの酵素の基質となるかどうかは今後の検討課題であろうが、*in vitro* ではスフィンゴミエリナーゼ、ホスホリパーゼ C ともにこの SPC を基質とした。そしてこれらの酵素で水解されて生じたと推測されるスフィンゴシン

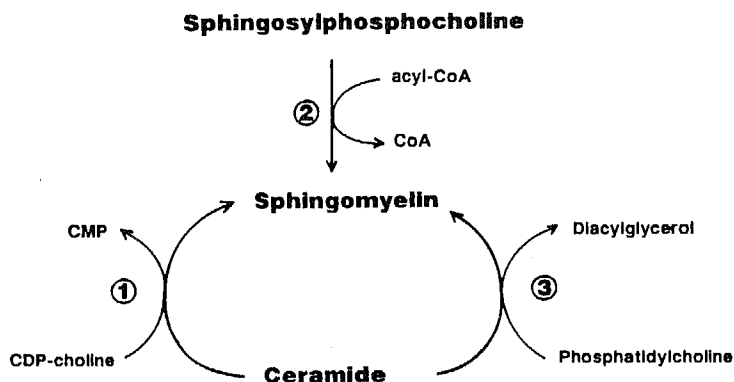


Fig. 11 The major proposed pathways of sphingomyelin biosynthesis.

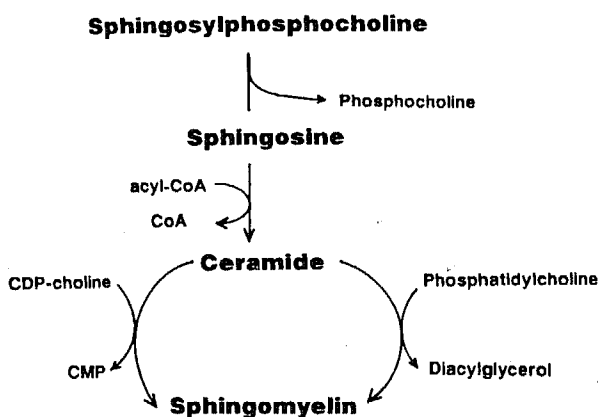


Fig. 12 The assumed metabolism of exogenous *L-threo* dominant sphingosylphosphocholine in mouse neuroblastoma NS-20Y cells.

は検出されなかったことから、おそらく非常に速くセラミドにN-アシル化され、こうして生じたセラミドにCDP-コリン：セラミド ホスホコリントランスフェラーゼ、あるいはホスファチジルコリン：セラミド ホスホコリントランスフェラーゼによってホスホコリンが転移されてSMが合成されるという代謝経路をとると考えられた。SPCが直接N-アシル化されてSMになる経路 (Fig. 11, ②) をとる可能性は非常に低いと考えられる。Stoffel と Assmann³⁹⁾は³Hと¹⁴Cで二重標識したSPC (Kaller 法により調製されたもの) を用い、ラット肝で*in vitro*と*in vivo*両方においてSPCのアシル化によるSMの生合成は起こらないことを示しているが、細胞は異なるにもかかわらず本研究の結果と合致している。したがって、NS-20Y以外の神経芽腫細胞、グリオーマ細胞や線維芽細胞でもお

そらく Fig. 12 に示す経路で与えられたSPCを代謝していたものと推測される。

さて、神経芽腫細胞における非天然型SPCの代謝の概略が明らかになったところでSPCによる神経突起伸張効果との関係を考えてみたい。この効果は4種類のリゾスフィンゴ脂質のうちではSPCだけに見られ、さらにこのSPCから調製されたNAcSPCにも見られたが、天然のSMには見られなかった。SPCとNAcSPCに共通するのはどちらも70%以上のL-*threo*体を含むことで、効果のないものはこれを含まない。したがってこの突起伸張は非天然型のL-*threo*体のスフィンゴ脂質に誘発された効果とも考えられるかもしれない。この可能性についてはさらに検討が必要なのは言うまでもない。

細胞のSMとコレステロールの密接な関係について

は知見が多い。Demel ら³⁶⁾はおもなリン脂質とコレステロールとの相互作用を調べ、SM が最もコレステロールに対する親和力が強いことを示した。Gatt と Bierman³⁷⁾は SM 含有リボソームを培養液に添加すると、ヒト皮膚線維芽細胞への LDL (low density lipoprotein) の結合と細胞におけるその分解を抑え、一方細胞のコレステロール合成を高めることを見込んでいる。本研究の神経芽腫細胞においても SPC 処理によって増加した細胞の SM が細胞内のコレステロール合成や LDL の取り込みに影響を与えたことが考えられた。

これまでの検討では $[3\text{-}^3\text{H}]$ SPC の放射活性はほとんどがセラミドを経て SM に取り込まれており、糖脂質合成に使われるセラミドはあってもごく僅かだと思われる。したがって GM3 の増加に関して SPC の代謝産物が基質となって糖脂質合成に影響を与える可能性は小さいと考えられる。これについてはさらに検討する必要がある。GM3 は細胞増殖との関連でその生理的役割が注目されているが⁵⁾、本研究においては、GM3 が積極的に細胞機能を変化させたというよりは、非天然型の SPC に誘導された細胞機能の変化を反映していると考えるのが妥当かもしれない。

V 結 語

スフィンゴ脂質の代謝と機能を調べる目的で非天然型リゾスフィンゴ脂質を神経芽腫細胞に与えることで細胞の増殖、形態や脂質代謝にどのような変化が誘導されるか、その影響を調べた。その結果、以下の知見を得た。

- 1 4 種のリゾスフィンゴ脂質 SPC, Ps, Glc-Ps, lysoCS はいずれも細胞増殖を阻害したが、その効果は一様ではなかった。
- 2 4 種のうちで L-*threo* dominant SPC にのみ神経突起伸展効果を見いだした。SPC の N-アセチル誘導体 (NAcSPC) にも類似の効果を認めた。
- 3 SPC を与えた細胞では、SM, コレステロール、ガングリオンド GM3 の増加が認められた。
- 4 $[3\text{-}^3\text{H}]$ SPC を用いた代謝標識実験より、SPC は細胞に取り込まれた後、スフィンゴミエリナーゼかホスホリパーゼ C によってホスホコリンとスフィンゴシンとに分解され、そのスフィンゴシンが N-アシル化されてセラミドになり、CDP-コリン：セラミド ホスホコリントランスフェラーゼ、あるいは、ホスファチジルコリン：セラミド ホスホコリントランスフェラーゼによって SM に合成されることが示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました信州大学医学部心脈管病研究施設脂質生化学部門、武富保教授に深謝いたします。また本研究に際し、適切な御教授、御助力をいただきました上村敬一助教授、原厚講師をはじめ教室の皆様併せて感謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第62回日本生化学会大会 (1989年11月, 京都), 第32回日本神経化学会大会 (1989年9月, 札幌), 13th International Society for Neurochemistry, Biennial Meeting (1991年7月, Sydney) において発表した。

文 献

- 1) Bell, R. M., Loomis, C. R. and Hannun, Y. A.: Protein kinase C regulation by sphingosine/lysosphingolipids. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, 53: 103-110, 1988
- 2) Strasberg, P. M. and Callahan, J. W.: Lysosphingolipids and mitochondrial function II. Deleterious effects of sphingosylphosphorylcholine. Biochem Cell Biol, 66: 1322-1332, 1988
- 3) Igisu, H., Hamasaki, N., Ito, A. and Ou, W.: Inhibition of cytochrome C oxidase and hemolysis caused by lysosphingolipids. Lipids, 23: 345-348, 1988
- 4) Svennerholm, L.: Chromatographic separation of human brain gangliosides. J Neurochem, 10: 613-623, 1963
- 5) Hanai, N., Nores, G. A., MacLeod, C., Torres-Mendez, C-R. and Hakomori, S.: Ganglioside-mediated modulation of cell growth. J Biol Chem, 263: 10915-10921, 1988
- 6) Taketomi, T. and Nishimura, K.: Physiological activity of psychosine. Jpn J Exp Med, 34: 255-265, 1964
- 7) Taketomi, T. and Yamakawa, T.: Immunochemical studies of lipids II. Antigenic properties of syn-

- thetic sphingosylphosphorylcholine-protein conjugate. Jpn J Exp Med, 37 : 423-432, 1967
- 8) Taketomi, T. and Kawamura, N. : Preparation of lysohematoside (neuraminyl-galactosyl-glucosylsphingosine) from hematoside of equine erythrocyte and hemolytic properties. J Biochem (Tokyo), 68 : 475-485, 1970
 - 9) Hara, A. and Taketomi, T. : Detection of D-*erythro* and L-*threo* sphingosine bases in preparative sphingosylphosphorylcholine and its N-acylated derivatives and some evidence of their different chemical configurations. J Biochem (Tokyo), 94 : 1715-1718, 1983
 - 10) Hara, A. and Taketomi, T. : Chemical properties and stereoisomerism of heterogenous long chain bases in lysosphingolipids by positive ion fast atom bombardment mass spectrometry and carbon-13 NMR spectroscopy. J Biochem (Tokyo), 100 : 415-423, 1986
 - 11) Taketomi, T., Hara, A., Kutsukake, Y. and Sugiyama, E. : New approach for characterization of lysosulfatide by TLC, fast atom bombardment mass spectrometry and NMR spectroscopy. J Biochem (Tokyo), 107 : 680-684, 1990
 - 12) Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem, 226 : 497-509, 1973
 - 13) Iwamori, M., Moser, H. W., McCluer, R. H. and Kishimoto, Y. : 3-Ketosphingolipids : application to the determination of sphingolipids which contain 4-sphingenine. Biochim Biophys Acta, 380 : 308-319, 1975
 - 14) Kaller, H. : Präparative Gewinnung von Sphingosin Phosphorylcholin. Biochem Z, 334 : 451-456, 1961
 - 15) Bligh, E. G. and Dyer, W. J. : A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol, 37 : 911-917, 1959
 - 16) Fewster, M. E., Burns, B. J. and Mead, J. F. : Quantitative densitometric thin-layer chromatography of lipids using copper acetate reagent. J Chromatogr, 43 : 120-126, 1969
 - 17) Svennerholm, L. : Quantitative estimation of sialic acid. Biochim Biophys Acta, 24 : 604-611, 1957
 - 18) Ando, S., Cang, N.-C. and Yu, R. K. : High-performance thin-layer chromatography and densitometric determination of brain ganglioside compositions of several species. Anal Biochem, 89 : 437-450, 1978
 - 19) Gaver, R. C. and Sweeley, C. C. : Methods for methanolysis of sphingolipids and direct determination of long-chain bases by gas chromatography. J Am Oil Chem Soc, 42 : 294-298, 1965
 - 20) Wadström, T. and Möllby, R. : Studies on extracellular Proteins from *Staphylococcus aureus* IV. Production and purification of β -haemolysin in large scale. Biochim Biophys Acta, 242 : 288-307, 1971
 - 21) Samuelsson, B. and Samuelsson, K. : Gas-liquid chromatography-mass spectrometry of synthetic ceramides. J Lipid Res, 10 : 41-46, 1969
 - 22) Bartlett, G. R. : Phosphorus assay in column chromatography. J Biol Chem, 234 : 466-468, 1959
 - 23) Zak, B. : Simple rapid microtechnic for serum total cholesterol. Am J Clin Pathol, 27 : 583-588, 1957
 - 24) Sonnino, S., Kirschner, G., Ghidoni, R., Acquotti, D. and Tettamanti, G. : Preparation of GM1 ganglioside molecular species having homogenous fatty acid and long chain base moieties. J Lipid Res, 26 : 248-257, 1985
 - 25) 原 厚, 北沢信子, 武富 保, Ammar, A. : グリオーマ細胞における sphingosylphosphorylcholine の代謝. 脂質生化学研究, 25 : 320-323, 1983
 - 26) Saito, M. and Saito, M. : Incorporation of very-long-chain fatty acids into sphingolipids of cultured neuronal cells. J Neurochem, 57 : 465-469, 1991
 - 27) Echten, V. G., Brik, R., Brenner-Weiss, G., Schmidt, R. R. and Sandhoff, K. : Modulation of sphingolipid biosynthesis in primary cultured neurons by long chain bases. J Biol Chem, 265 : 9333-9339, 1990
 - 28) Sribney, M. and Kennedy, E. P. : The enzymatic synthesis of sphingomyelin. J Biol Chem, 233 : 1315-1322, 1958

- 29) Sribney, M. : Stimulation and inhibition of sphingomyelin synthesis. Arch Biochem Biophys, 126 : 954, 1968
- 30) Brady, R. O., Bradley, R. M., Young, O. M. and Kaller, H. : An alternative pathway for the enzymatic synthesis of sphingomyelin. J Biol Chem, 240 : PC3963-PC3964, 1965
- 31) Fujino, Y. and Negishi, T. : Investigation of the enzymatic synthesis of sphingomyelin. Biochim Biophys Acta, 152 : 428-430, 1963
- 32) Ullman, M. D. and Radin, N. S. : The enzymatic formation of sphingomyelin from ceramide and lecithin in mouse liver. J Biol Chem, 249 : 1500-1512, 1974
- 33) Bernert, J. T., Jr. and Ullman, M. D. : Biosynthesis of sphingomyelin from *erythro*-ceramide and phosphatidylcholine by a microsomal cholinephosphotransferase. Biochim Biophys Acta, 666 : 99-109, 1981
- 34) Marggraf, W-D. and Kanfer, J. N. : The phosphocholine acceptor in the phosphatidylcholine : ceramide cholinephosphotransferase reaction. Is the enzyme a transferase or a hydrolase ?. Biochim Biophys Acta, 793 : 346-353, 1984
- 35) Stoffel, W. and Assmann, G. : On the metabolism of sphinganyl- and sphingenyl-1-phosphorylcholine. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 353 : 65-74, 1972
- 36) Demel, R. A., Jansen, J. W. C. M., van Dijk, P. W. M. and van Deenen, L. L. M. : The preferential interaction of cholesterol with different classes of phospholipids. Biochim Biophys Acta, 465 : 1-10, 1977
- 37) Gatt, S. and Bierman, E. L. : Sphingomyelin suppresses the binding and utilization of low density lipoproteins by skin fibroblasts. J Biol Chem, 255 : 3371-3376, 1980

(3. 9. 10 受稿)