

セラミド結合能を有する CERT START ドメインの凝集とその抑制

○藤井 汐美¹、児玉 高志²、杉木 俊彦²、花田 賢太郎³、藤原 敏道²、児嶋 長次郎^{1,2} (1. 横浜国立大学、2. 大阪大学、3. 国立感染研究所)

Aggregation of the CERT START domain and its prevention ○Shiomi Fujii¹, Takashi Kodama², Toshihiko Sugiki², Kentaro Hanada³, Fujiwara Toshimichi², Chojiro Kojima^{1,2} (1. Yokohama National University, 2. Osaka University, 3. National Institute of Infectious Diseases)

Ceramide is transported from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus, where it is converted to sphingomyelin. The ceramide transport protein CERT mediates non-vesicular transport of ceramide. Previous studies indicate that CERT is also associated with infectious diseases and cancer. However, the detailed mechanism of how CERT transports ceramide is not clear. The START domain of CERT is the ceramide binding site and tends to aggregate. The detailed mechanism of how ceramide is incorporated into and released from the START domain is not known. To study how CERT transports ceramide using NMR, here, we have tried to prevent the aggregation of the START domain of CERT. Non-reducing SDS-PAGE showed bands at the positions of dimer and trimer. Fluorescence depolarization experiments using DTT- or TCEP-containing buffer revealed that the anisotropy increased with increasing protein concentration in DTT-containing buffer, but no change in TCEP-containing buffer. These results suggest that the aggregation of the START domain of CERT is induced by oxidation and prevented by TCEP-containing buffer.

セラミドは小胞体からゴルジ体に輸送され、スフィンゴミエリンに変換される。このセラミドの非小胞性の輸送を介在しているのがセラミド輸送蛋白質 CERT である。先行研究では CERT は感染症やガンとも関連があることが示されている。しかし、CERT が実際どのようにセラミドを輸送しているのか、その詳細な機構は分かっていない。CERT の START ドメインはセラミド結合部位であり、凝集性を持つ。セラミドがどのように START ドメインに取り込まれるのか、反対にどのようにセラミドが放出されるのか、その詳細は解明されていない。そこで本研究では、NMR を用いてセラミド輸送機構の詳細を明らかにするため、START ドメインの凝集を抑制する条件を検討した。

START ドメインを単一バンドまで精製し、非還元条件下で SDS-PAGE を行ったら、START ドメインの二量体、および、三量体の位置にバンドが確認された。そこで2種の還元剤を加えて START ドメインの凝集性を蛍光偏光解消法によって評価した。DTT を含むバッファーでは蛋白質の濃度が上がるにつれて異方性が大きくなったが TCEP を含むバッファーでは異方性に変化が見られなかった。これらの結果は、START ドメインの凝集性が酸化によって誘導され、TCEP を含むバッファーで抑制できることを示唆している。