

シロイヌナズナにおけるスフィンゴイドキナーゼ (LCBK1) の形質転換体の作製

柳川 大樹^{1,2}、田中 修¹、日下部岳広^{1,2}、本多 大輔^{1,2}、
後藤 彩子^{1,2}、今井 博之^{1,2}

¹ 甲南大学大学院 自然科学研究科、² 甲南大学 統合ニューロバイオロジー研究所

(受付日 2015 年 10 月 29 日、採択日 2015 年 11 月 3 日)

要旨

スフィンゴ脂質はスフィンゴイド塩基 (LCB) を基本骨格とし、生体膜の構築だけでなく、シグナル伝達分子として作用することがわかっている。スフィンゴ脂質代謝の分解系の代謝産物であるスフィンゴイド塩基 1-リン酸 (LCBP) は LCB キナーゼ (LCBK) によって合成され、アブシジン酸を介した気孔の開閉に関与するシグナル伝達物質として機能することがわかっている。本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナの LCBK のホモログである *LCBK1* に着目した。まず、我々は *LCBK* の植物における生理機能を調べるため、*LCBK1* を過剰発現、抑制した形質転換体を作製した。*LCBK1* 過剰発現株と抑制株の mRNA の発現量を RT-PCR 法で調べたところ、過剰発現株では野生株より発現量が上昇し、抑制株では野生株より発現量が低下した。次に、22℃、長日条件下で約 3 週間経った植物体の葉の形態を観察したところ、特に明白な違いは見られなかった。さらに、播種後 1 週間経った根の長さを測定したところ、*LCBK1* の抑制株 (KD1) の根において野生株に比べて短かったが、それ以外の系統ではほとんど変化は見られなかった。これらの結果から、*LCBK1* は葉、根の生育において何らかの影響を与えているというよりむしろ、他の器官での生理機能に重要な働きがあると考えられる。次に、植物、動物、菌類、ラビリンチュラ類を含む 33 種の *LCBK1* ホモログのアミノ酸配列を比較したところ、高い保存性を示した。このことから、広い分類群での *LCBK* ファミリーの機能的な重要性が示唆された。また、*LCBK1* がどのように進化してきたかを調べるために、これらの分子系統樹を作成した結果、*LCBK1* は植物系統で独立に進化したことが明らかとなった。

序論

スフィンゴ脂質とは、スフィンゴイド塩基を共通構成成分として含む複合脂質の総称であり、スフィンゴ脂質は真核生物と一部の原核生物に存在する。植物において、スフィン

ゴ脂質は細胞膜の構築だけでなく、細胞の分化と調節、プログラム細胞死といった様々な細胞内反応に関与する生理活性分子として重要であることが認識されている [1-4]。

植物におけるスフィンゴ脂質代謝経路の第一ステップは、L-セリンとパルミトイル CoA の縮合反応から始まり、スフィンゴ脂質の基本骨格であるスフィンゴイド塩基 (LCB) が合成される (図 1)。そして、LCB は *de novo* 合成経路と分解経路に供給される。*de novo* 合成では、LCB と脂肪酸がアミド結合してセラミド (Cer) となり、ヒドロキシセラミド (hCer) に変換された後、細胞膜の構成成分であるグルコシルセラミド (GlcCer) やグリコシルイノシトールホスホセラミド (GIPC) といった複合スフィンゴ脂質が合成される。一方、分解経路では LCB が LCB キナーゼ (LCBK) によってスフィンゴイド塩基 1-リン酸 (LCBP) が合成される。LCBP は、アブシジン酸 (ABA) を介した気孔の開閉に関与するシグナル伝達物質として機能することがわかっている [5]。また、LCBP は LCBP ホスファターゼ (SPP) により脱リン酸化されて LCB に分解される、もしくは LCBP リアーゼ (DPL) により C₁₆ アルデヒドとホスホエタノールアミンに分解されてグリセロ脂質代謝に利用される [6-8]。

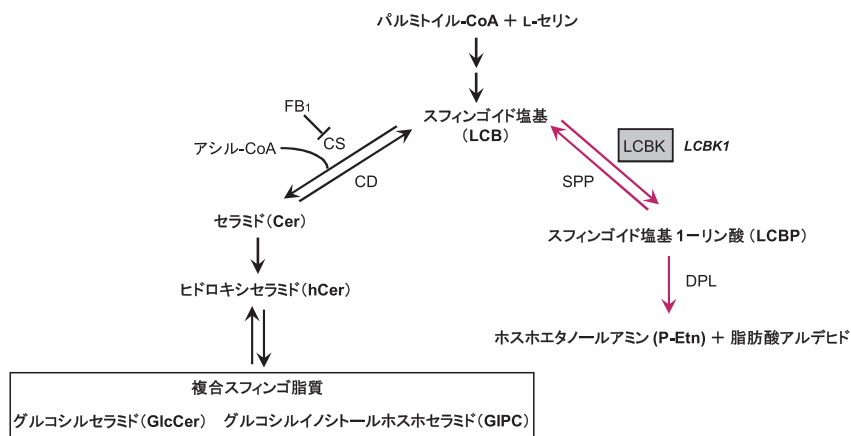


図 1 シロイヌナズナにおけるスフィンゴ脂質代謝経路

黒色の矢印はセラミド系経路 (*de novo* 合成経路)、赤色の矢印は LCBP の合成・分解経路を示す。

CS, ceramide synthase; CD, ceramidase; LCBK, long-chain base kinase; SPP, sphingoid base-1-phosphate phosphatase; DPL, sphingoid base-1-phosphate lyase; FB₁ fumonisin B₁ (CS の阻害剤)

我々は、LCB をリン酸化し、LCBP の合成を触媒する LCBK に着目した。シロイヌナズナにおいて、LCBK は *LCBK1* (At5g23450)、*LCBK2* (At2g46090)、*SPHK1* (At4g21450)、*SPHK2* (At4g21534) の 4 つのホモログが存在する。SPHK1 と SPHK2 は、気孔閉鎖におけるアブシジン酸の情報伝達系に関与することが報告されている [9-11]。LCBK2 は、有糸分裂活性化タンパク質キナーゼ (MPK) 遺伝子である *MPK6* を介してシグナル伝達され、植物の寒冷応答に関わっていることが報告されている [12]。一方、LCBK1 は当研究室の西

浦らによって大腸菌で組換えタンパク質を発現させることで特徴づけられたが、生理的な機能解析についてはほとんどわかっていない [13-14]。

植物におけるスフィンゴ脂質代謝に関わる酵素遺伝子の研究は、ここ 10 年間で急速に進み、葉の形態の異常だけでなく、雄性配偶体の発達や花粉管伸長シグナリングの調節に関わることがわかってきた [15-18]。さらに、スフィンゴ脂質代謝物の個々の分子種を高速液体クロマトグラフ-質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いた網羅的分析手法が開発されたことにより [19-21]、スフィンゴ脂質の特定の分子種が病原体感染によって誘導される過敏応答や防御関連遺伝子発現の調節などのような植物防御応答に重要な役割を担っていることがわかっている [22-38]。したがって、シロイヌナズナにおける植物の器官・組織での LCBK1 の役割やスフィンゴ脂質代謝における LCBK1 の重要性を明確にすることで、生理的役割を明らかにするための重要な手がかりとなり、植物のスフィンゴ脂質研究が進展すると考えられる。

そこで、本研究ではシロイヌナズナの生体内における LCBK1 の役割を調べるために、*LCBK1* を過剰発現、抑制させた 2 つの形質転換体 (AtLCBK1-OX, AtLCBK1-KD) を作製した。また、LCBK1 のホモログと予想される様々な生物の LCBK 遺伝子がどの程度保存され、どのように進化してきたかを調べるために、アミノ酸配列を用いた分子系統樹解析を行った。

実験材料と方法

1. *LCBK1* 過剰発現株、抑制株用コンストラクトの作製と植物の生育条件

実験で用いたシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生株はコロンビア株を用いた。*LCBK1* 過剰発現株は *LCBK1* ゲノム DNA を PCR により増幅させ、この PCR 断片を Gateway technology (Life technologies 社) を用いて pDONR221 に導入し、エントリークローンを作製した。続いて、35S プロモーター制御下で発現ベクターを作製するために、デステイネーションベクター (pFAST-G02) に導入した [39]。*LCBK1* 抑制株は人工的な miRNA を用いた遺伝子サイレンシング法 (WMD3 software) を利用した [40-41]。*LCBK1* 特異的な人工 miRNA 前駆体を pRS300 を用いて作製し、この PCR 断片を Gateway 法を用いて pDONR221 に導入し、エントリークローンを作製した。続いて、過剰発現株と同様に pFAST-G02 に導入して発現ベクターを作製した。次に、形質転換させたアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 株) をシロイヌナズナ野生株に感染させ、形質転換種子を得た。形質転換した種子は蛍光実顕微鏡 (LEICA M165FC) を用いて選別し、最終的に T3 種子を得た。実験で用いたシロイヌナズナ野生株、過剰発現株、抑制株は、土壌もしくは MS 寒天培地で生育させ、22°C、長日条件 (16 時間明期 (100 $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) / 8 時間暗期) に設定したインキュベーター (SANYO MIR-553)、恒温室で生育させた。

2. 遺伝子発現量の解析

LCBK1 の過剰発現株、抑制株の T3 世代のロゼット葉からトータル RNA を抽出し、トータル RNA 1 μg を cDNA 合成に使用した。cDNA は M-MLV reverse transcriptase

(Invitrogen) と oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (Invitrogen) を用いて合成した。LCBK1 過剰発現株、抑制株の mRNA 量は電気泳動で確認した。LCBK1 過剰発現株、抑制株における *LCBK1* の転写レベルの比較は *Act2* の転写レベルを標準化して行った。

3. 表現型解析

LCBK1 過剰発現株、抑制株の葉の表現型の解析は、デジタルカメラ (CASIO) で観察を行った。根の表現型の解析は、種子を MS プレート (2.3 mg ml⁻¹ MS 塩, 1% (w/v) スクロース, 3 μg ml⁻¹ チアミン塩酸塩, 5 μg ml⁻¹ ニコチン酸, 0.5 μg ml⁻¹ ピリドキシン塩酸塩, 0.2% (w/v) ゲランガム) に播種してから 1 週間後の根の長さを、実体顕微鏡 (OLYMPUS SZX16-3131) を用いて観察し、測定した。

4. LCBK のアミノ酸配列解析

LCBK ホモログのアミノ酸配列は NCBI、GenBank、JGI のデータベースから抽出した。アミノ酸配列は多重アラインメントプログラム (CLUSTAL W) を用いてアラインメントした [42]。アラインメントした LCBK ホモログのアミノ酸配列の類似性は、EsPript 3.0 プログラムを用いて確認した [43]。NCBI、GenBank、JGI のアミノ酸配列データの登録番号は以下の通りである: *Mus musculus* SPHK1, NP_001165944.1; *Mus musculus* SPHK2, NP_001166032.1; *Homo sapiens* SPHK1, AAF73423.1; *Homo sapiens* SPHK2, AAQ02408.1; *Oryzias latipes* SPHK1, XP_011476505.1; *Oryzias latipes* SPHK2, XP_011483655.1; *Danio rerio* SPHK1, XP_002667585.2; *Danio rerio* SPHK2, XP_009290770.1; *Ciona intestinalis* SPHK1, XP_009858111.1; *Apis mellifera* SPHK, XP_394823.3; *Linepithema humile* SPHK, XP_012228731.1; *Drosophila melanogaster* SPHK1, AAF48045.1; *Drosophila melanogaster* SPHK2, AAF47706.3; *Caenorhabditis elegans* SPHK1, NP_001022017.1; *Aurantiochytrium limacinum* SPHK, gm1.4070_g; *Aplanochytrium kerguelense* SPHK, estExt_Genewise1. C_40029; *Saccharomyces cerevisiae* LCB4, NP_014814.1; *Saccharomyces cerevisiae* LCB5, NP_013361.1; *Oryza sativa* LCBK1, AAP54628.1; *Oryza sativa* SPHK1, BAD30563.1; *Oryza sativa* LCBK2, NP_001048817.1; *Arabidopsis thaliana* LCBK1, BAB07787.1; *Arabidopsis thaliana* SPHK1, NP_193885.6; *Arabidopsis thaliana* SPHK2, NP_001190787.1; *Arabidopsis thaliana* LCBK2, NP_566064.1; *Arabidopsis lyrata* LCBK1, XP_002874132.1; *Lotus japonicas* LCBK1, BAD86587.1; *Glycine max* LCBK, XP_003524575.1; *Glycine max* SPHK, XP_003545841.1; *Solanum lycopersicum* LCBK, XP_004230034.1; *Solanum lycopersicum* SPHK, XP_004232808.1; *Cucumis sativus* LCBK, XP_004147089.1; *Cucumis sativus* SPHK, XP_004155653.1.

5. LCBK の分子系統解析

4 で用いたアミノ酸配列をもとに、MEGA6.0 を使用し、近隣結合法による分子系統樹を作成した [44-46]。

結果

LCBK1 の生理機能を明らかにするために、過剰発現株、抑制株の作製を試みた。過剰発

現株では Gateway 法を用いてクローニングを行い、最終的に 35S プロモーター制御下の発現ベクターである pFAST-G02 に導入し (図 2)、形質転換させたアグロバクテリウムをシロイヌナズナの野生株に感染させて T1 世代の種子を得た。抑制株は、人工的な miRNA を用いた遺伝子サイレンシング法 (WMD3 software) を利用した。作製した miRNA 前駆体を過剰発現株と同様にクローニングを行い (図 2)、シロイヌナズナの野生株に感染させて T1 世代の種子を得た。T1 世代の種子から形質転換した種子を得るために、蛍光実体顕微鏡 (LEICA M165FC) を用いて選別した。紫色で囲んだ種子は形質転換した T1 種子を示している (図 3)。過剰発現、抑制株それぞれの T1 種子の選別では、約 10000 粒観察して、約 50 粒の形質転換した T1 種子を回収した。これらの T1 種子を MS 寒天培地で生育させ、最終的に土壌に移して T1 植物を生育し、T2 種子を得た。T2 種子は緑色に蛍光を発している種子と無蛍光の種子の割合が 3 : 1 になっている系統を過剰発現、抑制株それぞれ約 20 ずつ選定した。橙色で囲んだ種子はホモと考えられる T2 種子を示している (図 3)。これらのホモと予想される種子を過剰発現株、抑制株それぞれ回収し、MS 寒天培地で生育させ、最終的に土壌に移して T2 植物を生育し、T3 種子を得た。T3 種子はもしホモ系統であるならば、すべての種子が緑色に蛍光を発しているはずなので、その条件に従った系統を過剰発現、抑制株それぞれ 3 ずつ選定した。すべてが緑色に蛍光を発している種子を図 3 に示

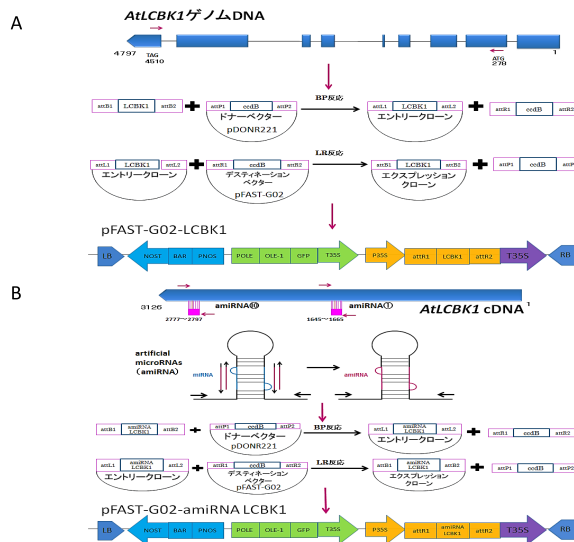


図 2 *AtLCBK1* 形質転換体の作製

LCBK1 の形質転換体を作製するために、Gateway 法を用いてクローニングした。

(A) *AtLCBK1* 過剰発現株用コンストラクトの作製

過剰発現用コンストラクトはゲノム DNA をテンプレートにして *LCBK1* の ORF を増幅し、デスチネーションベクター (pFAST-G02) を用いてコンストラクトを作製した。

(B) *AtLCBK1* 抑制株用コンストラクトの作製

抑制用コンストラクトは WMD3 による amiRNA 法を用いて *LCBK1* 特異的な 20 塩基の配列を増幅し、最終的にデスチネーションベクター (pFAST-G02) を用いてコンストラクトを作製した。

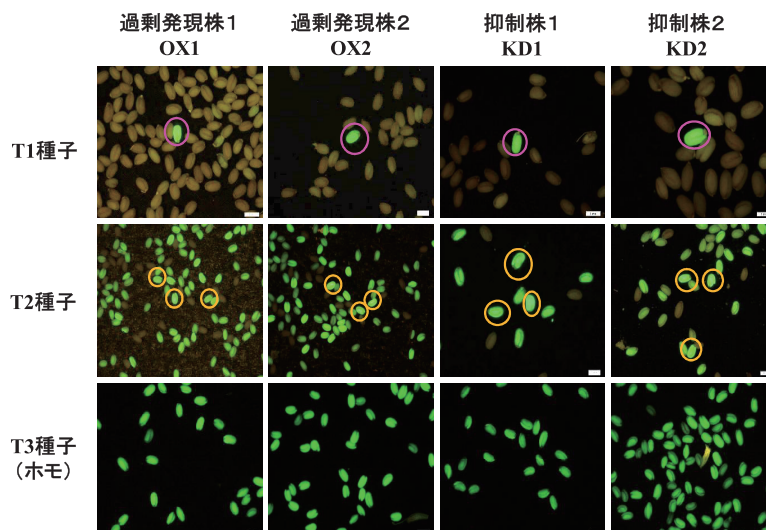


図3 AtLCBK1 形質転換種子の選別

形質転換種子を蛍光実体顕微鏡（GFP 観察用蛍光フィルターを使用）で観察した。紫色で囲んだ種子は形質転換した T1 種子、橙色で囲んだ種子はホモと考えられる T2 種子を示している。

した。AtLCBK1 形質転換体における mRNA の発現量の確認と植物体における表現型解析では、ホモ系統の T3 あるいは T4 世代の植物を用いて実験を行った。

LCBK1 過剰発現株、抑制株の mRNA 量を RT-PCR 法を用いて解析したところ、Act2 の発現量は野生株、過剰発現株、抑制株のどの系統においても変化は見られなかった（図4）。それに対して LCBK1 の発現量は過剰発現株 1（OX1）、過剰発現株 2（OX2）は野生株に比べて増加し、抑制株 1（KD1）、抑制株 2（KD2）では減少した。これらの結果から、LCBK1 を過剰発現、抑制された形質転換植物を作製できたと考えられる。

これらの形質転換植物を用いて葉と根における表現型の解析を行った。播種後 3 週間後の植物体を観察したところ、野生株、過剰発現株、抑制株間で明白な変化は見られなかった（図5）。さらに、根の観察を行ったところ、抑制株 1 において野生株に比べて根の長さが有意に短かった（ $P < 0.01$, Student's *t*-test）が、それ以外の系統ではほとんど変化は見られなかった（図6）。

LCBK ファミリーに属するタンパク質をコードする遺伝子配列は、植物以外にも動物、菌類、ラビリンチュラ類などの幅広い分類群でデータベース上に登録されており、ヒト、マウス、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエでは、シロイヌナズナと同様に SPHK1 と SPHK2 の 2 つのパラログが報告されている [47-51]。これまでに、LCBK ファミリーには 5 つの保存された機能ドメインがあることが報告されている [14,52]。今回、植物、動物、菌類、ラビリンチュラ類を含む 19 種の生物から 33 個の LCBK ファミリーのアミノ酸配列を取得し、配列を比較した。その結果、これらの機能ドメインの配列は、先行研究で報告されているように、よく保存されていることが示された（図7）。特に、C2 ドメインの ATP 結合

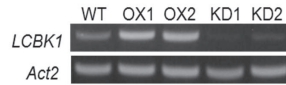


図4 *AtLCBK1* 形質転換体における mRNA の発現量

RT-PCR における LCBK1 の発現量の解析
 播種後、5週間経った植物のロゼット葉からトータル RNA を抽出し、RT-PCR 分析によって *LCBK1* の発現量を調べた。野生株と *LCBK1* 形質転換体は *LCBK1* 特異的プライマーを用いて分析した。Actin2 は内部標準として用いた。

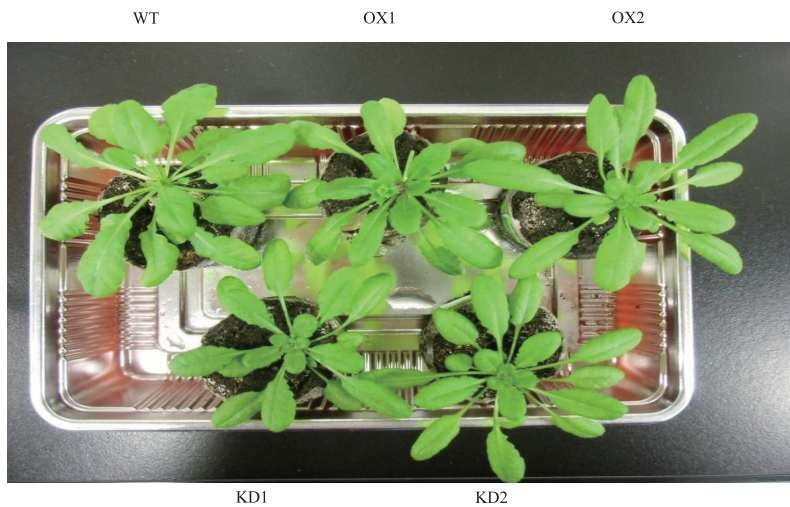


図5 *AtLCBK1* 形質転換体の植物体における表現型解析

約3週間経った植物体をデジタルカメラで撮影した。

部位と予想されている S/G-GDG モチーフは、33 タンパク質のすべてにおいて高度に保存されていることがわかった (図7)。C4 ドメインで基質の結合に重要とされているアミノ酸残基 (図7★印) は、動物、菌類、ラビリンチュラ類、陸上植物の SPHK ではアスパラギン酸であるのに対し、陸上植物の LCBK1 ではロイシンであった (図7)。これらの配列情報をもとに分子系統樹を作成した結果、LCBK ファミリーは、陸上植物 LCBK2、菌類 LCB、陸上植物 LCBK1、陸上植物 SPHK サブファミリー、ラビリンチュラ+動物 SPHK サブファミリーの5つに大きく分けられた (図8)。また、この系統樹からは、脊椎動物、シヨウジョウバエ、シロイヌナズナで知られている SPHK1、SPHK2 と名付けられたパラログは、それぞれの系統で独立に生じたものであることが示唆された。

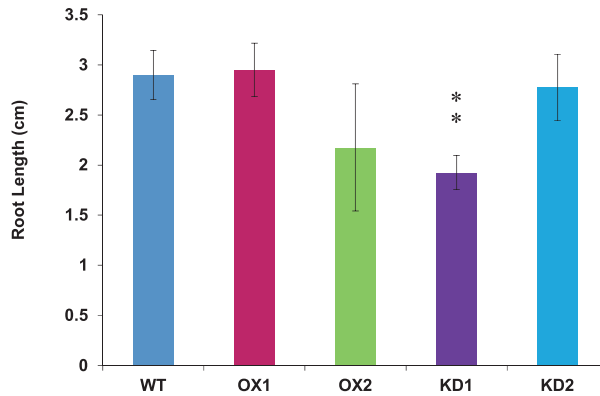


図6 *AtLCBK1* 形質転換体の根における表現型解析

1週間経った実生の根の長さを双眼実体顕微鏡を用いて測定した。各系統それぞれ4個体の根の長さを測定し、平均したものをグラフ化した。データは平均値±標準偏差 ($n=4$) で示した。アスタリスクは有意差を示す (**, $P < 0.01$ Student's *t*-test)。

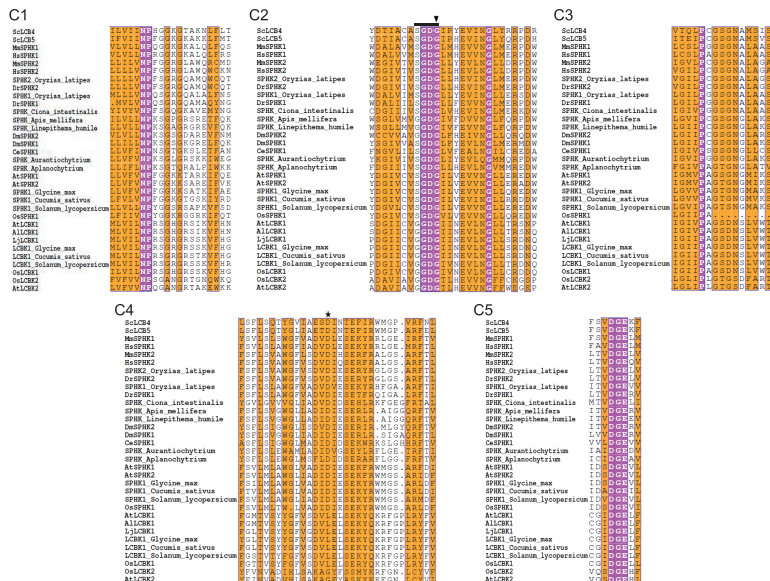


図7 LCBKファミリーにおける保存されたドメイン構造のアミノ酸一次配列

アミノ酸配列は多重アラインメントプログラム (CLUSTAL W) を用いて整列し、EsPrift 3.0 を用いて解析した。同一のアミノ酸はマゼンタ、類似のアミノ酸はオレンジで示している。C2ドメインの実線はATPと基質の結合部位を示しており、▼印はATP結合に重要な残基を示している。C4ドメインの★印は基質の結合に重要な残基を示している。略名は以下の通りである：

Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; *Mm*, *Mus musculus*; *Hs*, *Homo sapiens*; *Dr*, *Danio rerio*; *Dm*, *Drosophila melanogaster*; *Ce*, *Caenorhabditis elegans*; *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Os*, *Oryza sativa*; *Al*, *Arabidopsis lyrata*; *Lj*, *Lotus japonicus*.

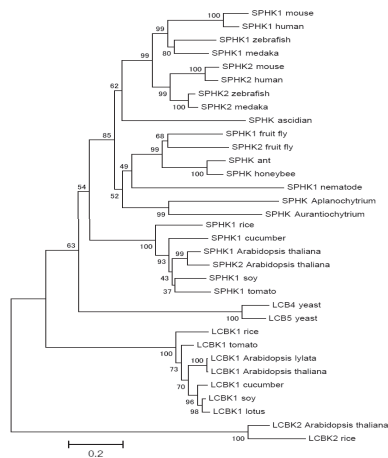


図8 LCBK ファミリーの分子系統樹

分子系統樹はMEGA6.0を使用し、CLUSTAL Wで整列させたアミノ酸配列のデータを用いて近隣結合法で作成した。分岐の信頼度はブートストラップ法を用いて検定した。節の上の数字は1000回の反復で得られたブートストラップ値を示す。部位あたり0.2回のアミノ酸置換に相当する枝の長さをスケールバーで示した。

考察

本研究では葉、根、花といったあらゆる組織で強発現させることができる35Sプロモーター制御下で*LCBK1*を過剰発現、抑制させた形質転換体の葉と根における表現型の解析を行った。最近のスフィンゴ脂質代謝に関わる酵素遺伝子の解析から、雄性配偶体の発達や花粉管伸長シグナリングの調節に関わることがわかってきた[15-18]。シロイヌナズナ eFP BrowserのDNAマイクロアレイデータによる遺伝子発現プロファイルによると、*LCBK1*は成熟した花粉に発現が高いことが示されている[53]。また、西浦らの研究で、*LCBK1*のmRNA量を植物の組織レベルで調べたところ、特に花において高い発現があることが示された[14]。しかし、35Sプロモーターは全組織で発現するわけではなく、花粉ではほとんど発現しないことがわかっている[54]。したがって、生殖器官で*LCBK1*がどのような役割を担っているか調べるために、おしべだけでなく、花粉に発現させることが可能であるユビキチンプロモーター(UBQ10)制御下での*LCBK1*の発現を調節する形質転換体を作製し、花粉の生存、発生ステージの観察、生殖器官でのmRNA量を定量することが課題である[55]。今後、35Sプロモーターとユビキチンプロモーター制御下で*LCBK1*を過剰発現、抑制させた形質転換体を用いて他の組織、器官に違いがあるかどうか詳細に解析する必要がある。

近年、スフィンゴ脂質代謝物の個々の分子種を網羅的に同定・定量するというスフィンゴリピドミクスと呼ばれる新しい研究フィールドが導かれており、高速液体クロマトグラフ-質量分析装置(LC-MS/MS)を用いて分析が行われている[56-58]。このような背景から、*LCBK1*が及ぼすスフィンゴ脂質代謝動態を調べるために、35Sプロモーター制御下で発現させた*LCBK1*の過剰発現および抑制株の葉をサンプルとし、LC-MS/MSを用いて脂質分析し、LCB、LCBP、Cer、hCer、GlcCer、GIPCといったスフィンゴ脂質代謝物の

分子種組成を野生株と比較し、網羅的に解析する予定である。また、UBQ10 プロモーター制御下での *LCBK1* の発現を調節する形質転換体の花を用いて同様に網羅的分析を行い、スフィンゴ脂質の分子種組成を葉と比較することで、それぞれの器官での *LCBK1* の役割を理解するのに重要な手がかりとなる。

最近の研究で、スフィンゴ脂質は細胞内シグナル伝達制御因子として知られており、病原体感染によって誘導される過敏応答や防御関連遺伝子発現の調節などのような植物防御応答に重要な役割を担っていることがわかってきた [22-38]。その中で、研究が進められているのがセラミド合成酵素阻害剤であるフモニシン B₁ (FB₁) に対する研究であり、FB₁ を植物組織に処理すると、LCB が蓄積されるとともに、過敏細胞死が誘導される [59-62]。例えば、スフィンゴ脂質合成の初発酵素であるセリンパルミトイルトランスフェラーゼ (SPT) が欠損したシロイヌナズナのノックアウト株 (*lcb2a-1*) は、LCB が蓄積されないため、フモニシン B₁ (FB₁) に対して感受性を示さないが、シロイヌナズナの野生株においては FB₁ に感受性を示し、LCB (主にジヒドロスフィンゴシン, d18:0) が蓄積されることで過敏細胞死を引き起こすことが報告されている [61]。一方、FB₁ 処理の際は、LCB の蓄積を回避するために、LCBK による LCBP の合成と、DPL による LCBP の分解というスフィンゴ脂質の異化経路の反応が強くと考えられるが、そのメカニズムについては、まだ不明な点が多い。そこで、シロイヌナズナ *LCBK1* の過剰発現株および、*LCBK1* ノックダウン株を用いて LC-MS/MS による LCB および LCBP の組成の分析を行うことで、植物防御応答メカニズムの解明につながると考えられる。

シロイヌナズナにおけるスフィンゴ脂質代謝に関わる酵素遺伝子の多くは、小胞体、ゴルジ装置に局在していることがわかっている [63]。ところが、*LCBK* のホモログである *SPHK1*、*SPHK2* の細胞内局在性をタバコ (*Nicotiana benthamiana*) あるいはシロイヌナズナを用いて解析したところ、液胞膜に局在することが示唆された [63,64]。これらの知見から、*LCBK1* も細胞膜もしくは液胞膜に局在すると考えられることから、*LCBK1* のオープンリーディングフレームの上流または下流に GFP を連結させたコンストラクトをクローニングして作製し、アグロバクテリウムに形質転換し、タバコの表皮細胞を用いた一過性発現法により [65]、細胞内局在を確認する。また、シロイヌナズナの葉から細胞成分分画を抽出し、イムノプロットすることで細胞内局在を確認し、一過性発現法の結果と比較することで、*LCBK1* の細胞内局在を明らかにすることが可能となる。今後、質量分析装置を用いたスフィンゴリピドミクス、細胞内局在、生理的な機能解析を行うことで、スフィンゴ脂質代謝の *LCBK1* の重要性が明らかになり、スフィンゴ脂質研究の進展につながる。

これまでに、*LCBK* ファミリーが幅広い分類群で見つかっており、今回の研究でそのアミノ酸配列が高度に保存されていることから、*LCBK* ファミリーの機能の重要性が示唆された。陸上植物+ラビリンチュラ+動物 *SPHK* サブファミリーでは、これらの分岐は生物の系統関係を反映していた。そのため、*SPHK* サブファミリーが幅広い分類群で共通した機能をもつことが考えられる。また、脊椎動物とショウジョウバエ、シロイヌナズナの *SPHK1* と *SPHK2* はオーソログではなく、それぞれの分類群で遺伝子重複により独立に生じたことが示された。これらのうち、ショウジョウバエとシロイヌナズナの *SPHK1* と *SPHK2* は、それぞれ昆虫、陸上植物の他種の *SPHK* に対するよりも、同種のパラログ間で最も近縁であることが示されており、比較的最近の遺伝子重複により生じたものであるこ

とが推測される。一方、脊椎動物の SPHK1 と SPHK2 は、ホヤと脊椎動物の分岐後に脊椎動物の初期進化の過程で生じたものであると考えられる。脊椎動物の進化の過程で SPHK1 と SPHK2 がよく保存されていることは、各パラログに特有の機能の重要性を示唆している。

これまでに、マウスの *SPHK1* と *SPHK2* のダブルノックアウトミュータントは血管と神経の発生異常のために胚性致死になることがわかっている [66]。また、キロショウジョウバエの *SPHK1* と *SPHK2* のダブルノックアウト個体は致死になることがわかっており、*SPHK2* のシングルミュータントでは飛行能力の減少と排卵の異常をもたらす [50,67]。一方、マウス、ショウジョウバエにおける *SPHK1* あるいは *SPHK2* のシングルミュータントは生存できることから、この2つの遺伝子はいくつかの機能的な重複性をもっていることが示唆されている。ゼブラフィッシュでは、母系性と接合子性の両方に供給されない *SPHK2* ノックアウトミュータント胚では二又心臓になることから、*SPHK2* は心臓の発生に不可欠であることが示唆された [68]。このように、*SPHK1* と *SPHK2* が多様な分類群や組織で、発生過程や生殖など様々な機能に関与していることから、*SPHK* サブファミリーがそれぞれの分類群で機能分化していることがわかる。

LCBK1 と *LCBK2* の2つのサブファミリーは、陸上植物+ラビリンチュラ+動物 *SPHK* サブファミリーよりも系統樹上で離れており、これまでに陸上植物以外で見つかっていないことから、これらは陸上植物の系統で独立に進化したといえる。分子系統樹上で他のサブファミリーから最も遠く離れている *LCBK2* は、シロイヌナズナの研究で低温ストレス (22℃から4℃) にさらすとファイトスフィンゴシン 1-リン酸 (t18:0-P) が合成され、一過的に蓄積することがわかっている [12]。この低温応答における t18:0-P の変換にどの *LCBK* のホモログが関与するか調べたところ、野生株と *sphk1* ミュータントでは t18:0-P の一過的な合成がみられた。しかし、*lcbk2* ミュータントでは合成能力が損なわれたことから、*LCBK2* は低温応答における t18:0-P の生産に必要であることが示唆された [12]。したがって、*LCBK2* は低温にさらしたときのみ発現する遺伝子であり、その機能がシロイヌナズナで知られている他のホモログには見られないことから、陸上植物が低温環境に適応する過程で独自に獲得された遺伝子の1つであると考えられる。したがって、*LCBK* は陸上植物における脂質代謝調節の機能、および多様性を考える上で重要な遺伝子といえる。*LCBK2* と同様に、*LCBK1* の進化も大変興味深いですが、その機能は本研究で用いられたシロイヌナズナ以外での植物ではあまり知られていない。今後、様々な植物種で *LCBK1* の機能解析が進むことで、その重要性と進化的な背景が理解できるだろう。

マウス *SPHK1* 遺伝子を用いた *in vitro* 実験で、基質認識の場所として予想されている C4 ドメインの 177 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換して *SPHK* アッセイをしたところ、*SPHK1* 活性が減少したことから、177 番目のアスパラギン酸が基質認識に関与することが報告されている [69]。しかし、177 番目を置換しただけでは *SPHK* 活性は完全に消失しないことから、C4 ドメインだけでなく、それ以外のドメインの基質認識に重要な部位が存在することが示唆された [69]。以前の研究で、このモチーフの 82 番目のグリシンは ATP の結合に関与することが報告されているが、81 番目のアスパラギン酸の触媒作用がわかっていない [70]。最近、ヒト *SPHK1* における結晶構造解析の研究で、アスパラギン酸をアラニンに置換して活性を解析したところ、ATP の加水分解とリン酸基の転移に対する活性が著しく減少することから、81 番目のアスパラギン酸は基質へのリン酸基の転移反応に重

要であることが示され、SPHK1の触媒作用に決定的な残基であることが明らかになった。したがって、C2ドメインのS⁷⁹GDG⁸²モチーフがATPと基質の結合の両方の役割を有することが示唆された[71]。実際に、33種のLCBKファミリーのアミノ酸配列を比較したところ、C2ドメインのS/G-GDGモチーフは、これらすべてのLCBKファミリータンパク質において保存されていることがわかった。一方、C4ドメインで基質の結合に重要とされている部位が、動物、菌類、ラビリンチュラ類、陸上植物SPHKではアスパラギン酸であるのに対し、陸上植物LCBK1ではロイシンである。植物におけるLCBK1の基質カイネチクスについてはほとんど解析が進んでおらず、アミノ酸の違いが基質認識にどのように影響をもたらすかは不明である。今後、LCBK1の結晶構造解析と保存されたモチーフに存在するアミノ酸置換による動態解析を組み合わせることで、LCBK1の機能解明につながるだろう。

本研究の一部は、私立大学等経常費補助金特別補助事業（大学院等の機能の高度化）の支援を受けて行った。

参考文献

1. Lynch, DV., Chen, M., and Cahoon, EB. (2009) Lipid signaling in Arabidopsis: no sphingosine? No problem! *Trends Plant Sci.* **14**, 463–466
2. Zäuner, S., Ternes, P., and Warnecke, D. (2010) Biosynthesis of sphingolipids in plants (and some of their functions). *Adv Exp Med Biol.* **688**, 249–263
3. Pata, MO., Hannun, YA., and Ng, CK (2010) Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *New Phytol.* **185**, 611–630
4. Markham, JE., Lynch, DV., Napier, JA., Dunn, TM., and Cahoon, EB. (2013) Plant sphingolipids: function follows form. *Curr Opin Plant Biol.* **16**, 350–357
5. Coursol, S., Le, Stunff, H., Lynch, DV., Gilroy, S., Assmann, SM., and Spiegel, S. (2005) Arabidopsis sphingosine kinase and the effects of phytosphingosine-1-phosphate on stomatal aperture. *Plant Physiol.* **137**, 724–737
6. Tsegaye, Y., Richardson, CG., Bravo, JE., Mulcahy, BJ., Lynch, DV., Markham, JE., Jaworski, JG., Chen, M., Cahoon, EB., and Dunn, TM. (2007) Arabidopsis mutants lacking long chain base phosphate lyase are fumonisin-sensitive and accumulate trihydroxy-18:1 long chain base phosphate. *J Biol Chem.* **282**, 28195–28206
7. Nishikawa, M., Hosokawa, K., Ishiguro, M., Minamioka, H., Tamura, K., Hara-Nishimura, I., Takahashi, Y., Shimazaki, K., and Imai, H. (2008) Degradation of sphingoid long-chain base 1-phosphates (LCB-1Ps): functional characterization and expression of AtDPL1 encoding LCB-1P lyase involved in the dehydration stress response in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **49**, 1758–1763
8. Nakagawa, N., Kato, M., Takahashi, Y., Shimazaki, K., Tamura, K., Tokuji, Y., Kihara, A., and Imai H. (2012) Degradation of long-chain base 1-phosphate (LCBP) in Arabidopsis: functional characterization of LCBP phosphatase involved in the dehydration stress response. *J Plant Res.* **125**, 439–449

9. Guo, L., Mishra, G., Markham, JE., Li, M., Tawfall, A., Welti, R., and Wang, X. (2012) Connections between sphingosine kinase and phospholipase D in the abscisic acid signaling pathway in Arabidopsis. *J Biol Chem.* **287**, 8286–8296
10. Guo, L., and Wang, X. (2012) Crosstalk between Phospholipase D and Sphingosine Kinase in Plant Stress Signaling. *Front Plant Sci.* **3**, 51
11. Worrall, D., Liang, YK., Alvarez, S., Holroyd, GH., Spiegel, S., Panagopoulos, M., Gray, JE., and Hetherington, AM. (2008) Involvement of sphingosine kinase in plant cell signalling. *Plant J.* **56**, 64–72
12. Dutilleul, C., Benhassaine-Kesri, G., Demandre, C., Rézé, N., Launay, A., Pelletier, S., Renou, JP., Zachowski, A., Baudouin, E., and Guillas, I. (2012) Phytosphingosine-phosphate is a signal for AtMPK6 activation and Arabidopsis response to chilling. *New Phytol.* **194**, 181–191
13. Nishiura, H., Tamura, K., Morimoto, Y., and Imai, H. (2000). Characterization of sphingolipid long-chain base kinase in Arabidopsis thaliana. *Biochem Soc Trans.* **28**, 747–748
14. Nishiura, H., and Imai, H. (2005) Phosphorylation of sphingoid long-chain bases in Arabidopsis: functional characterization and expression of the first sphingoid long-chain base Kinase gene in plants. *Plant Cell Physiol.* **46**, 375–380
15. Chen, LY., Shi, DQ., Zhang, WJ., Tang, ZS., Liu, J., and Yang, WC. (2014) The Arabidopsis alkaline ceramidase TOD1 is a key turgor pressure regulator in plant cells. *Nat Commun.* **6**, 6030
16. Wu, J., Qin, X., Tao, S., Jiang, X., Liang, YK., and Zhang, S. (2014) Long-chain base phosphates modulate pollen tube growth via channel-mediated influx of calcium. *Plant J.* **79**, 507–516
17. Teng, C., Dong, H., Shi, L., Deng, Y., Mu, J., Zhang, J., Yang, X., and Zuo, J. (2008) Serine palmitoyltransferase, a key enzyme for de novo synthesis of sphingolipids, is essential for male gametophyte development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **146**, 1322–1332
18. Dietrich, CR., Han, G., Chen, M., Berg, RH., Dunn, TM., and Cahoon, EB. (2008) Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of Arabidopsis LCB2 genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *Plant J.* **54**, 284–298.
19. Markham, JE., and Jaworski, JG. (2007) Rapid measurement of sphingolipids from Arabidopsis thaliana by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **21**, 1304–1314
20. Markham, JE., Li, J., Cahoon, EB., and Jaworski, JG. (2006) Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J Biol Chem.* **281**, 22684–22694
21. Markham, JE. (2013) Detection and quantification of plant sphingolipids by LC-MS.

- Methods Mol Biol.* **1009**, 93–101
22. Lachaud, C., Da, Silva, D., Cotelle, V., Thuleau, P., Xiong, TC., Jauneau, A., Brière, C., Graziana, A., Bellec, Y., Faure, JD., Ranjeva, R., and Mazars, C. (2010) Nuclear calcium controls the apoptotic-like cell death induced by d-erythro-sphinganine in tobacco cells. *Cell Calcium*. **47**, 92–100
 23. Lachaud, C., Da, Silva, D., Amelot, N., Béziat, C., Brière, C., Cotelle, V., Graziana, A., Grat, S., Mazars, C., and Thuleau, P. (2011) Dihydro-sphingosine-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells is independent of H₂O₂ production. *Mol Plant*. **4**, 310–318
 24. Michaelson, LV. (2011) New insights into cell death induced by long chain bases in Arabidopsis. *New Phytol.* **191**, 909–911
 25. Da, Silva, D., Lachaud, C., Cotelle, V., Brière, C., Grat, S., Mazars, C., and Thuleau, P. (2011) Nitric oxide production is not required for dihydro-sphingosine-induced cell death in tobacco BY-2 cells. *Plant Signal Behav.* **6**, 736–739
 26. Thuleau, P., Aldon, D., Cotelle, V., Brière, C., Ranty, B., Galaud, JP., and Mazars, C. (2013) Relationships between calcium and sphingolipid-dependent signalling pathways during the early steps of plant-pathogen interactions. *Biochim Biophys Acta*. **1833**, 1590–1594
 27. Rivas-San, Vicente, M., Larios-Zarate, G., and Plasencia, J. (2013) Disruption of sphingolipid biosynthesis in *Nicotiana benthamiana* activates salicylic acid-dependent responses and compromises resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Planta*. **237**, 121–136
 28. Brodersen, P., Petersen, M., Pike, HM., Olszak, B., Skov, S., Odum, N., Jørgensen, LB., Brown, RE., and Mundy, J. (2002) Knockout of Arabidopsis accelerated-cell-death11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev.* **16**, 490–502
 29. Liang, H., Yao, N., Song, JT., Luo, S., Lu, H., and Greenberg, JT. (2003) Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev.* **17**, 2636–2641
 30. Wang, W., Yang, X., Tangchaiburana, S., Ndeh, R., Markham, JE., Tsegaye, Y., Dunn, TM., Wang, GL., Bellizzi, M., Parsons, JF., Morrissey, D., Bravo, JE., Lynch, DV., and Xiao, S. (2008) An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 3163–3179
 31. König, S., Feussner, K., Schwarz, M., Kaever, A., Iven, T., Landesfeind, M., Ternes, P., Karlovsky, P., Lipka, V., and Feussner, I. (2012) Arabidopsis mutants of sphingolipid fatty acid α -hydroxylases accumulate ceramides and salicylates. *New Phytol.* **196**, 1086–1097
 32. Mortimer, JC., Yu, X., Albrecht, S., Sicilia, F., Huichalaf, M., Ampuero, D., Michaelson, LV., Murphy, AM., Matsunaga, T., Kurz, S., Stephens, E., Baldwin, TC., Ishii, T., Napier, JA., Weber, AP., Handford, MG., and Dupree, P. (2013) Abnormal glycosphingolipid

- mannosylation triggers salicylic acid-mediated responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 1881-1894
33. Simanshu, DK., Zhai, X., Munch, D., Hofius, D., Markham, JE., Bielawski, J., Bielawska, A., Malinina, L., Molotkovsky, JG., Mundy, JW., Patel, DJ., and Brown, RE. (2014) Arabidopsis accelerated cell death 11, ACD11, is a ceramide-1-phosphate transfer protein and intermediary regulator of phytoceramide levels. *Cell Rep.* **6**, 388-399
 34. Bi, FC., Liu, Z., Wu, JX., Liang, H., Xi, XL., Fang, C., Sun, TJ., Yin, J., Dai, GY., Rong, C., Greenberg, JT., Su, WW., and Yao, N. (2014) Loss of ceramide kinase in Arabidopsis impairs defenses and promotes ceramide accumulation and mitochondrial H₂O₂ bursts. *Plant Cell* **26**, 3449-3467
 35. Berkey, R., Bendigeri, D., and Xiao, S. (2012) Sphingolipids and plant defense/disease: the "death" connection and beyond. *Front Plant Sci.* **3**, 68
 36. Sánchez-Rangel, D., Rivas-San, V., Torre-Hernández, ME., Nájera-Martinez, M., and Plasencia, J. (2015) Deciphering the link between salicylic acid signaling and sphingolipid metabolism. *Front Plant Sci.* **6**, 125
 37. Bruggeman, Q., Raynaud, C., Benhamed, M., and Delarue, M. (2015) To die or not to die? Lessons from lesion mimic mutants. *Front Plant Sci.* **6**, 24
 38. Alden, KP., Dhondt-Cordelier, S., McDonald, KL., Reape, TJ., Ng, CK., McCabe, PF., and Leaver, CJ. (2011) Sphingolipid long chain base phosphates can regulate apoptotic-like programmed cell death in plants. *Biochem Biophys Res Commun.* **410**, 574-580
 39. Shimada, TL., Shimada, T., and Hara-Nishimura, I. (2010) A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **61**, 519-528
 40. Ossowski, S., Schwab, R., and Weigel, D. (2008) Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *Plant J.* **53**, 674-690
 41. Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., and Weigel, D. (2006) Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 1121-1133
 42. Thompson, JD., Higgins, DG., and Gibson, TJ. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
 43. Robert, X., and Gouet, P. (2014) Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* **42**, (Web Server issue):W320-324.
 44. Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
 45. Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
 46. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*

- 30, 2725-2729.
47. Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, MM., Dickson, R., and Spiegel, S. (1998) Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J Biol Chem.* **273**, 23722-23728.
 48. Liu, H., Sugiura, M., Nava, VE., Edsall, LC., Kono, K., Poulton, S., Milstien, S., Kohama, T., and Spiegel, S. (2000) Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J Biol Chem.* **275**, 19513-19520.
 49. Nava, VE., Lacana, E., Poulton, S., Liu, H., Sugiura, M., Kono, K., Milstien, S., Kohama, T., and Spiegel, S. (2000) Functional characterization of human sphingosine kinase-1. *FEBS Lett.* **473**, 81-84.
 50. Herr, DR., Fyrst, H., Creason, MB., Phan, VH., Saba, JD., and Harris, GL. (2004) Characterization of the Drosophila sphingosine kinases and requirement for Sk2 in normal reproductive function. *J Biol Chem.* **279**, 12685-12694.
 51. Kihara, A., Anada, Y., and Igarashi, Y. (2006) Mouse sphingosine kinase isoforms SPHK1a and SPHK1b differ in enzymatic traits including stability, localization, modification, and oligomerization. *J Biol Chem.* **281**, 4532-4539.
 52. Liu, H., Chakravarty, D., Maceyka, M., Milstien, S., and Spiegel, S. (2002) Sphingosine kinases: a novel family of lipid kinases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **71**, 493-511.
 53. Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, GV., and Provart, NJ. (2007) An 'Electronic Fluorescent Pictograph' Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets *PLoS ONE* **2**, e718
 54. Wilkinson, JE., Twell, D., and Lindsey, K. (1997) Activities of CaMV 35S and nos promoters in pollen: Implications for field release of transgenic plants. *J Exp Bot.* **48**, 265-275
 55. Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., and Blatt, MR. (2010) A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant J.* **64**, 355-365.
 56. Chao, DY., Gable, K., Chen, M., Baxter, I., Dietrich, CR., Cahoon, EB., Guerinot, ML., Lahner, B., Lü, S., Markham, JE., Morrissey, J., Han, G., Gupta, SD., Harmon, JM., Jaworski, JG., Dunn, TM., and Salt, DE. (2011) Sphingolipids in the root play an important role in regulating the leaf ionome in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **23**, 1061-1081
 57. Michaelson, LV., Zäuner, S., Markham, JE., Haslam, RP., Desikan, R., Mugford, S., Albrecht, S., Warnecke, D., Sperling, P., Heinz, E., and Napier, JA. (2009) Functional characterization of a higher plant sphingolipid Delta4-desaturase: defining the role of sphingosine and sphingosine-1-phosphate in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **149**, 487-498
 58. Li, M., Markham, JE., and Wang, X. (2014) Overexpression of patatin-related phospholipase AIII β altered the content and composition of sphingolipids in Arabidopsis. *Front Plant Sci.* **5**, 553

59. Spassieva, SD., Markham, JE., and Hille, J. (2002) The plant disease resistance gene Asc-1 prevents disruption of sphingolipid metabolism during AAL-toxin-induced programmed cell death. *Plant J.* **32**, 561-572
60. Abbas, HK., Tanaka, T., Duke, SO., Porter, JK., Wray, EM., Hodges, L., Sessions, AE., Wang, E., Merrill, AH, Jr., and Riley, RT.. (1994) Fumonisin- and AAL-Toxin-Induced Disruption of Sphingolipid Metabolism with Accumulation of Free Sphingoid Bases. *Plant Physiol.* **106**, 1085-1093
61. Saucedo-García, M., Guevara-García, A., González-Solis, A., Cruz-García, F., Vázquez-Santana, S., Markham, JE., Lozano-Rosas, MG., Dietrich, CR., Ramos-Vega, M., Cahoon, EB., and Gavilanes-Ruiz, M. (2011) MPK6, sphinganine and the LCB2a gene from serine palmitoyltransferase are required in the signaling pathway that mediates cell death induced by long chain bases in Arabidopsis. *New Phytol.* **191**, 943-957
62. Kimberlin, AN., Majumder, S., Han, G., Chen, M., Cahoon, RE., Stone, JM., Dunn, TM., Cahoon, EB. (2013) Arabidopsis 56-amino acid serine palmitoyltransferase-interacting proteins stimulate sphingolipid synthesis, are essential, and affect mycotoxin sensitivity. *Plant Cell* **25**, 4627-4639
63. Marion, J., Bach, J.L, Bellec, Y., Meyer, C., Gissot, L., and Faure, JD. (2008) Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of Arabidopsis seedlings. *Plant J.* **56**, 169-179
64. Guo, L., Mishra, G., Taylor, K., and Wang, X. (2011) Phosphatidic acid binds and stimulates Arabidopsis sphingosine kinases. *J Biol Chem.* **286**, 13336-13345
65. Sparkes, IA., Runions, J., Kearns, A., and Hawes, C. (2006) Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat Protoc.* **1**, 2019-2025.
66. Mizugishi, K., Yamashita, T., Olivera, A., Miller, GF., Spiegel, S., and Proia, RL. (2005) Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol.* **25**, 11113-11121.
67. Yonamine, I., Bamb, T., Nirala, NK., Jesmin, N., Kosakowska-Cholody, T., Nagashima, K., Fukusaki, E., Acharya, JK., and Acharya, U. (2011) Sphingosine kinases and their metabolites modulate endolysosomal trafficking in photoreceptors. *J Cell Biol.* **192**, 557-567.
68. Hisano, Y., Inoue, A., Okudaira, M., Taimatsu, K., Matsumoto, H., Kotani, H., Ohga, R., Aoki, J., and Kawahara, A. (2015) Maternal and Zygotic Sphingosine Kinase 2 Are Indispensable for Cardiac Development in Zebrafish. *J Biol Chem.* **290**, 14841-14851.
69. Yokota, S., Taniguchi, Y., Kihara, A., Mitsutake, S., and Igarashi, Y. (2004) Asp177 in C4 domain of mouse sphingosine kinase 1a is important for the sphingosine recognition. *FEBS Lett.* **578**, 106-110.
70. Pitson, SM., D'andrea, RJ., Vandeleur, L., Moretti, PA., Xia, P., Gamble, JR., Vadas, MA., and Wattenberg, BW. (2002) Human sphingosine kinase: purification, molecular cloning and characterization of the native and recombinant enzymes. *Biochem J.* **350**,

429-441.

71. Wang, Z., Min, X., Xiao, SH., Johnstone, S., Romanow, W., Meininger, D., Xu, H., Liu, J., Dai, J., An, S., Thibault, S., and Walker, N. (2013) Molecular basis of sphingosine kinase 1 substrate recognition and catalysis. *Structure*. 21, 798-809.