

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19380061

研究課題名 (和文) 新しいエンド型・エキソ型グリコセラミダーゼの構造と機能及び応用に関する研究

研究課題名 (英文) Study on structures, functions and applications of novel endo-type and exo-type glycosphingolipid metabolism

研究代表者

伊東 信 (Ito Makoto)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：40253512

研究成果の概要：スフィンゴ脂質は、形質膜マイクロドメインに主として存在し、細胞内のシグナリングや細胞間の相互作用に重要な役割を演じている。本研究では、申請者らが発見した非リソソーム性スフィンゴ脂質代謝酵素の構造と機能について研究を行い、以下のような成果を上げた。まず、哺乳動物の細胞質に存在するグルコシルセラミド (GlcCer) 分解酵素 (エキソ型グリコセラミダーゼ) をクローニングした。本酵素は、老化関連タンパク質クロトーのホモログ (KLRP) であった。本酵素の活性を RNAi で抑制すると、細胞内の GlcCer 量および GlcCer 骨格を持つ糖脂質量が減少することを見出し、KLRP が細胞の糖脂質代謝に関わっていることを示した。本酵素を大腸菌で大量に発現させ、グルコース及びガラクトースとの共結晶を作製し、X 線結晶構造解析を行った。その結果、KLRP は α ヘリックスと β ストランドを 8 回繰り返す、典型的な TIM バレル構造を示すこと、 β -ストランド 4 および 7 の C 末に存在する E165 と E373 がそれぞれ酸/塩基触媒残基、求核残基であることを証明した。また、本研究においてリソソーム性の中性セラミダーゼの結晶構造解析に初めて成功した。その構造は今までに報告のない新しいものであり、その触媒機構は亜鉛を触媒中心とすることを明らかにした。構造を解くことで、スフィンゴ脂質シグナリングや食餌由来のセラミドの代謝・消化への関与等、本酵素の多彩な機能が合理的に説明できた。一方、放線菌から単離したエンド型グリコセラミダーゼ (EGALC) の基質特異性を詳細に調べ、本酵素は 6 ガラ系列糖脂質に特異的に作用することを明らかにした。また、EGALC は加水分解のみならず糖鎖の転移反応も効率よく触媒することも明らかになった。この特異性を利用した、6-ガラ系列糖脂質の蛍光標識法及び微量定量法を開発し、その方法を用いて、病原性の原虫、糸状菌、及び食用海藻等に 6-ガラ系列糖脂質が存在することを見出した。海藻から単離した 6-ガラ系列糖脂質の構造解析を行い、その構造を 1-phytyl-3-O-[α -D-galactopyranosyl-(1-6)- β -D-galactopyranosyl]- glycerol と同定した。このような構造の糖脂質は初めての報告である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2008 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：糖脂質、酵素、代謝、X線構造解析、セラミド、スフィンゴ脂質

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ糖脂質（以下糖脂質）は、親水性の糖鎖と脂溶性のセラミドを分子内に有する機能性分子で、主として形質膜マイクロドメインに存在し、細胞間認識、増殖、分化、接着等に関与している。エンド型グリコセラミダーゼ（EGCase）は、糖脂質の糖鎖とセラミド間のグリコシド結合を加水分解し、糖鎖とセラミドを遊離する酵素であり、糖脂質の構造と機能を解析するツールとして広く用いられている。現在までに報告のある全てのEGCaseは、ガングリオ系列、ラクト/ネオラクト系列の糖脂質（糖鎖がグルコースを介してセラミドに結合）には作用するが、ガラ系列の糖脂質（糖鎖がガラクトースを介してセラミドに結合）には全く作用しない。我々は、新たにガラ系列糖脂質に特異的に作用するEGCase（EGALC）をクローニングすることに成功した。近年、EGALCの基質であるガラ系列糖脂質は、病原性真菌類やエキノコックス等の病原性寄生虫の細胞膜構成成分であることが示され、その生合成系は抗生物質の標的としても注目を集めている。EGALCはガラ系列糖脂質の構造、生合成および機能を明らかにするツールとしても大変有望である。

我々は、最近、ほ乳動物の細胞質に新しい中性エキソ型グリコセラミダーゼが存在することを突き止め、そのクローニングにも成功した。この酵素は、意外なことに老化に関与するタンパク質クロトーのホモログ、klotho-related protein (KLRP)として同定されていたタンパク質であったが、KLRPが糖脂質を分解するという報告は我々の報告が初めてである。

非リソソーム性のセラミドの代謝酵素（中性セラミダーゼ）は、セラミドを介したシグナリング制御酵素として注目を集めている。しかし、リソソーム由来の酸性セラミダーゼを含めてその結晶構造は全く不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新しいエンド型・エキソ型グリコセラミダーゼ（EGALCとKLRP）及び中性セラミダーゼの構造と機能を解明するとともに、その触媒機能や本酵素から得られた知見を糖脂質・スフィンゴ脂質の研究に応用することである。

3. 研究計画と方法

(1) EGALC、KLRP及びセラミダーゼのX線結晶構造解析を行い、詳細な構造と触媒機構を明らかにする。

(2) KLRPの局在を明らかにするとともに、活性をsiRNAで抑制したときの細胞内の糖脂質量を調べ、KLRPが糖脂質代謝にどのような役割を担っているのかを明らかにする。

(3) EGALCの特異的な糖転移反応を利用して、ガラ系列糖脂質の蛍光標識及びガラ系糖脂質の微量検出法の開発を行う。

4. 研究成果

(1) KLRPを大腸菌で大量に発現させ、グルコース及びガラクトースとの共結晶を作製し、X線結晶構造解析を行った。その結果、本酵素は α -ヘリックスと β -ストランドを8回繰り返す、典型的なTIMバレル構造を示すこと、 β -ストランド4および7のC末に存在するE165とE373がそれぞれ酸/塩基触媒残基、求核残基であることを証明した。

非リソソーム性の中性セラミダーゼの結晶構造解析に初めて成功した。その構造は今までに報告のない新しいものであり、その触媒機構は亜鉛を触媒中心とすることを明らかにした。すなわち、His99の作用により亜鉛に配位した水分子が活性化され、セラミドのカルボニル基を求核攻撃することで隣接する酸アミド結合を加水分解すると考えられる。構造を解くことで、スフィンゴ脂質シグナリングや食餌由来のセラミドの代謝・消化への関与等、本酵素の多彩な機能を合理的に説明することが可能になった。

EGALCの結晶は幾つか得ることが出来たが、

X線結晶構造は期間内に解くことが出来なかった。しかし、既存のエンドグリコセラミダーゼ II を鋳型としたホモロジーモデリングにより全体構造を明らかにすることが出来た。今後は、ガラ系列糖脂質との共結晶を得ることで触媒機構の詳細を解明する必要がある。

(2) ヒト KLRP を HEK293 細胞に導入すると細胞質に特異的に発現することが分かった。KLRP の siRNA でグルコセレブロシダーゼ活性を抑制すると細胞内の糖脂質量が有意に増加した。このことから KLRP は細胞質で新奇の糖脂質代謝経路を構成していることが示唆された。

(3) 放線菌から単離した EGALC の基質特異性を詳細に調べ、本酵素は 6 ガラ系列糖脂質に特異的に作用することを明らかにした。また、EGALC は加水分解のみならず糖鎖の転移反応も効率よく触媒することも明らかになった。この特異性を利用した、6-ガラ系列糖脂質の蛍光標識法及び微量定量法を開発し、その方法を用いて、病原性の原虫、糸状菌、海藻等に 6-ガラ系列糖脂質が存在することを初めて見出した。海藻から単離した 6-ガラ系列糖脂質の構造解析を行い、その構造を 1-phytyl-3-O-[α -D-galactopyranosyl-(1-6)- β -D-galactopyranosyl]-glycerol と同定した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

T. Inoue, N. Okino, Y. Kakuta, M. Ito. (他 8 人)

Mechanistic insights into the hydrolysis and synthesis of ceramide by neutral ceramidase.

J. Biol. Chem. 284, 9566-9577, 2009

Y. Ishibashi, M. Ito (他 7 名)

Transglycosylation-based fluorescent labeling of 6-gala series glycolipids by EGALC

Glycobiology in press, 2009

K. Zama, M. Ito (他 6 名)

Simultaneous quantification of glucosylceramide and galactosylceramide by normal phase HPLC using O-phthalaldehyde derivatives prepared with sphingolipid ceramide N-deacylase.

Glycobiology in press, 2009

J. Noguchi, M. Ito, Y. Kakuta. (他 4 人)

Crystal structure of the covalent intermediate of human cytosolic β -glucosidase.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 374, 549-552, 2008

Y. Hayashi, M. Ito. (他 5 名)

A sensitive and reproducible fluorescent-based HPLC assay to measure the activity of acid as well as neutral β -glucocerebrosidase.

Analy. Biochem. 383, 122-129, 2008

Y. Hayashi, N. Okino, Y. Kakuta, M. Ito. (他 3 名)

Klotho-related protein is a novel cytosolic neutral β -glycosylceramidase.

J. Biol. Chem. 282, 30889-30900, 2007.

Y. Ishibashi, M. Ito (他 1 2 名)

A novel endoglycoceramidase hydrolyzes oligogalactosylceramides to produce galactooligosaccharides and ceramides.

J. Biol. Chem. 282, 11386-11396, 2007.

Y. Ishibashi, M. Ito. (他 2 名)

Synthesis of fluorescent glycosphingolipids and neoglycoconjugates which contain 6-gala oligosaccharides using the transglycosylation reaction of a novel endogalactosylceramidase (EGALC).

J. Biochem. 142, 239-246, 2007

X. Xu, M. Ito (他 7 名)

Fucosyl GM1a, an endoglycoceramidase-resistant ganglioside of porcine brain.

J. Biochem. 141, 1-7, 2007

[学会発表] (計 8 件)

M. Ito

Novel catabolic pathway of glycosphingolipids.

Gordon Research Congerence. Feb. 17-22, 2008, Lucca, Italy

M. Ito

Novel metabolic pathway of glucosylceramide involving Klotho-related protein: Insights into Gaucher disease.

Lysosomal Diseases and the Brain Confererence 2008, Sacramento, USA, May 29-31, 2008

伊東 信
スフィンゴ脂質代謝マシーナリーの解明と
その応用. 産業酵素国際シンポジウム, 2008
年 3 月 7 日、福岡

伊東 信
非リソソーム性のスフィンゴ脂質代謝酵素
の構造と機能. 酵素とタンパク質に関するシ
ンポジウム, 2008 年 7 月 11-13 日、熊本

伊東 信
セラミダーゼとグルコセレブロシダーゼの
構造と機能. セラミド研究会, 2008 年 11 月
21-22 日、札幌

伊東 信
新しいグルコセレブロシダーゼ KLRP の発見.
第 3 回スフィンゴセラピィー研究会, 2008
年 7 月 18-19 日、鳥取

吉村征浩、座間宏太、伊東 信
ゼブラフィッシュ初期発生におけるセラミ
ド代謝の機能解析. シンポジウム「モデル生
物を用いた脂質生物学」BMB2008, 2008 年
12 月 9-12 日、神戸

Y. Hayashi, Y. Kakuta, M. Ito (他 4 名)
A novel catabolic pathway of GSLs
mediated with a Klotho-related protein.
International Conference on the Bioscience
of Lipids, September 3-9, 2007, Finland.
Best poster award.

[図書] (計 2 件)
Comprehensive Glycoscience (Editor-in-
Chief, J. P. Kamerling)
M. Ito
Degradation of glycolipid
Elsevier

ベーシックマスター 生化学 (大山隆編)
伊東 信 (糖質) 2008、オーム社

6. 研究組織
(1) 研究代表者
伊東 信 (Ito, Makoto)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 40253512

(2) 研究分担者
野村 一也 (Nomura, Kazuya)
九州大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号: 30150395
角田 佳充 (Kakuta, Yoshimitsu)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 00314360

(2) 連携研究者
なし