

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月12日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380066

研究課題名（和文） スフィンゴ糖脂質代謝マシーナリ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 the Structures, Functions and Applications of Sphingolipid-metabolizing machinery

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（和文）：

報告者の研究室で同定、クローニングしたスフィンゴ脂質代謝に関わる新規酵素（セラミダーゼ、スフィンゴ脂質セラミド N-デアシラーゼ、Hex1、NgaP、EGCrP1、EGALC）の構造と機能を調べた。セラミダーゼとスフィンゴ脂質セラミド N-デアシラーゼは、金属酵素であり亜鉛が触媒中心であることが分かった。Hex1、NgaP はどちらも糖脂質に作用するエキソ型グリコシダーゼであるが、Hex1 は GlcNAc/GalNAc 残基に作用するヘキソサミニダーゼであるのに対して、NgaP は GalNAc 残基に特異的なβ-N-アセチルガラクトサミニダーゼであった。NgaP は、基質の GalNAc の C2 アセタミド基のカルボニル酸素が触媒求核基として機能する substrate-assisted catalysis 機構で糖脂質を分解することを示した。真菌類のグルコシルセラミド合成酵素として EGCrP1 を同定した。EGCrP1 が真菌類のグルコシルセラミドの品質管理に携わっていることを証明した。また、これらの酵素を用いた、糖脂質の微量同定法、標識法を開発した。さらに、マウスとゼブラフィッシュにおける GM4 合成の責任酵素を同定した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we explored the structures and functions of novel sphingolipid-metabolizing enzymes (ceramidase, sphingolipid ceramide N-deacylase, Hex1, NgaP, EGCrP1, EGALC), which had been identified and cloned in our laboratory. Interestingly, both ceramidase and sphingolipid ceramide N-deacylase are a zinc-dependent amidohydrolase. The cleavage of N-acyl linkage of ceramide by ceramidase follows a similar mechanism as observed for the zinc-dependent carboxypeptidases. Hex1 and NgaP were found to cleave the terminal β-N-acetylgalactosaminyl linkage of asialo GM1 and Gb4Cer. Hex1 hydrolyzed pNP-β-GalNAc as well as pNP-β-GlcNAc, however, NgaP hydrolyzed only pNP-β-GalNAc. NgaP adopts substrate-assisted catalysis. We identified EGCrP1 as a glucocerebrosidase in fungi and demonstrated that EGCrP1 eliminates immature GlcCer to control the quality of GlcCer in fungi. We also developed the methods for sensitive and quantitative analysis of glycosphingolipids using the specific reactions of EGALC and sphingolipid ceramide N-deacylase. Furthermore, we identified the enzyme responsible for synthesizing GM4 ganglioside in mice and zebrafish.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：糖鎖生物学、酵素利用学、スフィンゴ（糖）脂質、代謝、結晶構造

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ糖脂質（以下糖脂質）は、主として形質膜表層で脂質ラフトと呼ばれるマイクロドメインを形成し、様々な細胞機能を制御している。また、糖脂質やスフィンゴミエリンの代謝産物（セラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン-1-リン酸）は、種々のシグナル伝達系のメディエーターとして機能している。このような観点から、糖脂質・スフィンゴ脂質及びそれらの代謝酵素は医薬、機能性食品、化粧品、機能性素材の開発ターゲットとしても注目を集めている。報告者らは、糖脂質やセラミドの代謝に関与する多くの酵素を同定し、それらの遺伝子をクローニングして来た（*JBC* **274**, 36616-36622, 1999; *JBC* **275**, 11229-11234, 2000; *JBC* **275**, 31297-31304, 2000; *JBC* **277**, 17300-17307, 2002; *JBC* **279**, 33379-33389, 2004; *JBC* **282**, 11386-11396, 2007; *JBC* **282**, 30889-30900, 2007）。しかし、それらの結晶構造や原子レベルでの酵素反応様式はほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、報告者らが発見したスフィンゴ糖脂質代謝酵素のX線結晶構造、触媒機能、生理機能を解明するとともに、それらの触媒機能と特異性を利用した、糖脂質の新しい定量法、解析法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

当該酵素遺伝子は大腸菌あるいは放線菌の発現系で発現させた。精製リコンビナント酵素、酵素と基質あるいは産物との複合体について、それぞれX線構造解析を行った。反応様式を明らかにするために、アミノ酸の点変異体を作製し、酵素活性を測定した。糖脂質の同定は、TLC, TOF-MS/MS, FAB-MS, NMRを用いて行った。

4. 研究成果

セラミドに作用しスフィンゴシンと脂肪酸を遊離する酵素セラミダーゼおよび糖脂質とスフィンゴミエリンに作用して、それぞれのリゾ体と脂肪酸を遊離するスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼのX線結晶構造とその触媒機構を解明することが出来た。両酵素は、スフィンゴ脂質の酸アミド結合を加水分解する酵素であるが、興味深いことに、両酵素とも触媒部位に亜鉛を持つ金属酵素であった

。セラミダーゼの場合は、触媒部位の亜鉛によって水分子からプロトンが引き抜かれ、活性化されたヒドロキシオンがセラミドのカルボニル炭素を求核攻撃し、隣接する酸アミド結合を開裂する触媒機構を提案した（*JBC*, **284**, 9566-9577, 2009）。セラミダーゼの場合は、C2-セラミドとの共結晶から触媒機構が明らかにされることができたが、スフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼの詳細な反応機構を解くためには、さらに基質との共結晶の構造を明らかにする必要がある。

続いて、糖脂質に作用する2つの β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ（Hex1 とNgaP）の研究を進めた。Hex1はGH20に分類され、アジアロGM2やグロボシド（Gb4Cer）の非還元末端 β -N-アセチルガラクトサミン

（ β -GalNAc）に作用した。本酵素と β -GalNAcの複合体のX線結晶構造解析を行った結果、本酵素は典型的な $(\beta/\alpha)_s$ -barrel構造を示し、電子密度mapから β -GalNAc1分子が活性部位に見出された。また、本酵素とアジアロGM2のドッキングモデルを作ったところ、アジアロGM2オリゴ糖は本酵素の基質結合溝に良くフィットするがシアル酸残基を持つGM2オリゴ糖は収まらないことが示された。このモデルは本酵素の基質特異性を良く説明している（*JMB*, **392**, 87-99, 2009）。

一方、NgaPの一次構造は既知のタンパク質とは全く異なり、新たに Glycoside Hydrolase Family123 が創出された。本酵素は、アジアロGM2やGb4Cerに作用したが、Hex1と異なりpNP- β -GlcNAcには殆ど作用せず、酵素学的には β -ヘキソサミニダーゼではなく、 β -N-アセチルガラクトサミニダーゼであることが分かった。 β -GalNAcに特異的で β -GlcNAc残基に作用しない酵素は従来からその存在が示唆されていたが、NgaPのクローニングでその実体が初めて明らかになった。NgaPの触媒機構を詳細に検討したところ、Glu-608がプロトンドナーで、基質のGalNAcのC2アセタミド基のカルボニル酸素が nucleophile として機能する、いわゆる substrate-assisted catalysis 機構であることが明らかになった（*JBC*, **286**, 14065-14072, 2011）。

病原性の真菌類のグルコシルセラミドは感染や細胞分裂に重要であることが知られていた。このグルコシルセラミドの合成酵素は、ヒトから真菌に至るまでその一次構造が

保存されているが、真菌類のグルコシルセラミド分解酵素は未同定であった。本研究の対象である、エンドグリコセラミダーゼ (EGCase) は放線菌から報告者らによって初めて見出された糖脂質分解酵素である。EGCase は様々な糖脂質に作用し、糖鎖とセラミドを遊離する。しかし、グルコシルセラミドには作用しない。本研究で、EGCase の真菌オルソログ (EGCrP) がグルコシルセラミド分解酵素であることを見出した。また、クリプトコッカスにおいては、EGCrP の2つのパラログ (EGCrP1, EGCp2) が存在することも明らかにした。さらに、クリプトコッカスのEGCrP1 ノックアウト変異株を作製したところ、合成途上のグルコシルセラミドが蓄積することを見出した。つまり、本酵素は糖脂質合成の品質管理 (Quality control) を行っていることが初めて明らかになった (*JBC*, 287, 368-381, 2012)。細胞内の糖タンパク質の品質管理機構に関しては、多くの研究が行われているが、糖脂質の品質管理機構については、今回の報告が初めてである。一方、EGCrP2 のノックアウト変異株においては、グルコシルセラミド以外にも未知の糖脂質が蓄積し、細胞分裂が異常になることが分かった。構造解析の結果、この糖脂質はエルゴステロール- β -グルコシドと同定された。今回見出された糖脂質分解酵素遺伝子は、クリプトコッカスのみならず、四大真菌症と呼ばれるムコール症、アスペルギルス症、カンジダ症の原因菌にも存在することが分かった。今回の発見は、病原性真菌に共通する糖脂質代謝機構の解明、それを標的にした抗真菌剤の開発につながることを期待される。

また、従来から不明であった、GM4 (NeuAc α 2, 3Gal β 1, 1' Cer) 合成の責任酵素の同定にマウスとゼブラフィッシュで成功した (*JBC*, 284, 30534-30546, 2009)。

一方、当該研究室で開発された様々な糖脂質分解酵素を用いて、以下の様な応用研究を行った。まず、EGCase III (EGALC) が R-Gal β 1, 6Gal β 1, 1' Cer 構造に特異的で、かつ糖鎖転移反応も効率よく触媒することを利用して、6-ガラ系列糖脂質の蛍光標識法を開発した。この方法により *Rizopus oryzae* や *Taenia crassiceps* に 6-ガラ系列糖脂質が存在することを見出した (*Glycobiology*, 19, 797-807, 2009)。さらに、EGCase を用いた新しい糖脂質の細胞グリコミクス法を開発した (*JBC*, 286, 41669-41679, 2011)。本法によって、疾病や細胞分化の新しい糖鎖マーカーが得られる可能性がある。EGCase は、B細胞の極微量糖脂質の同定にも力を発揮した (*PNAS*, 107, 11900-11905, 2010) また、SCDase の特異性を利用した GlcCer と GalCer の同時微量定量法を開発した (*Glycobiology*, 19, 767-775,

2009)。

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)

- ① Ishibashi Y, Okino N (6 人中 4 番目), Ito M (6 人中 6 番目). Quality control of fungus-specific glucosylceramide in *Cryptococcus neoformans* by endoglycoceramidase-related protein 1 (EGCrP1). *J. Biol. Chem.* 287, 368-381, 2012. 査読有
- ② Fujitani N, Ito M (9 人中 8 番目). Qualitative and quantitative cellular glycomics of glycosphingolipids based on rhodococcal endoglycoceramidase-assisted glycan cleavage, glycoblotting-assisted sample preparation, and matrix-assisted laser desorption ionization tandem time-of-flight mass spectrometry analysis. *J. Biol. Chem.* 286, 41669-41679, 2011. 査読有
- ③ Sumida T, Fujimoto K, Ito M. Molecular cloning and catalytic mechanism of a novel glycosphingolipid-degrading β -N-acetylgalactosaminidase from *Paenibacillus* sp. TS12. *J. Biol. Chem.* 286, 14065-14072, 2011. 査読有
- ④ Togayachi A, Ito M (15 人中 11 番). Lack of lacto/neolacto-glycolipids enhances the formation of glycolipid-enriched microdomains, facilitating B cell activation. *PNAS* 107, 11900-11905, 2010. 査読有
- ⑤ Zama K, Okino N (8 人中 7 番), Ito M (8 人中 8 番). Simultaneous quantification of glucosylceramide and galactosylceramide by normal-phase HPLC using *O*-phthalaldehyde derivatives prepared with sphingolipid ceramide N-deacylase. *Glycobiology*, 19, 767-775, 2009. 査読有
- ⑥ Ishibashi Y, Okino N (9 人中 7 番), Ito M (9 人中 9 番). Transglycosylation-based fluorescent labeling of 6-gala series glycolipids by endogalactosylceramidase.

Glycobiology, **19**, 797-807, 2009. 査読有

- ⑦ Chisada S, Okino N (16人中14番目), Ito M (16人中16番目). Zebrafish and mouse $\alpha 2,3$ -sialyltransferases responsible for synthesizing GM4 ganglioside. *J. Biol. Chem.* **284**, 30534-30546, 2009. 査読有
- ⑧ Sumida T, Ishii R, Yanagisawa T, Yokoyama S, Ito M. Molecular cloning and crystal structural analysis of a novel β -N-acetylhexosaminidase from *Paenibacillus* sp. TS12 capable of degrading glycosphingolipids. *J. Mol. Biol.* **392**, 87-99, 2009. 査読有
- ⑨ Inoue T, Okino N (12人中2番目 First equal contribution), Kakuta Y (12人中3番目), Ito M (12人中12番目). Mechanical insights into the hydrolysis and synthesis of ceramide by neutral ceramidase. *J. Biol. Chem.* **284**, 9566-9577, 2009. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ① Ito M. Endoglycoceramidase and its related protein EGCrP1. 3rd Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology (2011年10月27日~10月29日、Shanghai, China) 招待講演
- ② Ito M. Biological significance of non-lysosomal degradation of glucosylceramide. 日蘭糖鎖科学シンポジウム (2011年10月8日~10月9日、名古屋大学、名古屋市) 招待講演
- ③ 伊東 信、石橋洋平、伊藤友治、池田和貴、沖野 望、合田初美、坂口圭史、田口良. グルコシルセラミドの品質管理と細胞分裂に関する2つのEGCrPパラログ. 第84回日本生化学会大会 (2011年9月21日(水)~24日(土)、国立京都国際会館). 招待講演
- ④ Okino N, Kakuta Y, Kato-Unoki Y, Sueyoshi N, Ito M. X-ray structure of

sphingolipid ceramide *N*-deacylase. The 31st Naito Conference. 糖鎖の発現と制御 [II] (2011年9月13日~9月16日、シャトレーゼ ガトーキングダム サッポロ、北海道札幌市)

- ⑤ 伊東 信. 全ての糖脂質から糖鎖を切り離す酵素の開発. 第8回 糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム (2010年11月30日、東京コンファレンスセンター、東京. 招待講演
- ⑥ Okino N, Kakuta Y, Kato-Unoki Y, Sueyoshi N, Ito M. The Crystal structure of sphingolipid ceramide *N*-deacylase that catalyzes the cleavage and creation of an *N*-acyl linkage of various glycosphingolipids. 25th International Carbohydrate Symposium; ICS2010 (August 1-6, 2010, Makuhari Messe International Convention Complex, Chiba, Japan)
- ⑦ Ishibashi Y, Okino N, Ito M. Endoglycoceramidase-related protein (EGrP) is a novel glucosylceramidase that participates in glucosylceramide metabolism in pathogenic fungi. 25th International Carbohydrate Symposium; ICS2010 (August 1-6, 2010, Makuhari Messe International Convention Complex, Chiba, Japan)
- ⑧ 石橋洋平、沖野 望、池田和貴、田口 良、伊東 信. 真菌の GlcCer 代謝を担う真菌特異的グルコシルセラミダーゼ EGrP. 第27回 内藤コンファレンス 生体膜ダイナミクスと脂質生物学 [I] (2010年6月29日-7月2日)、シャトレーゼ ガトーキングダム サッポロ、札幌市)
- ⑨ 坂口圭史、田村具博、田中 勲、沖野 望、伊東 信. *Rhodococcus erythropolis* を宿主としたエンドグリコセラミダーゼIIおよびその活性化タンパク質の発現と機能

の解析. 第52回 日本脂質生化学会 (2010年6月14-15日、伊香保温泉、群馬県)

- ⑩ Ito M. Structure and functions of sphingolipid-metabolizing enzymes. Gordon Research Conference (Feb. 10, 2010 Ventura, California, USA) 招待講演
- ⑪ 沖野 望, 角田佳充, 鶴木 (加藤) 陽子, 末吉紀行, 伊東 信 スフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼ (SCDase) のX線結晶構造解析. 第82回日本生化学会大会 (2009年10月21-24日、神戸ポートアイランド、神戸)
- ⑫ 石橋洋平, 沖野 望, 伊東 信. 病原性真菌より見出された新規グルコシルセラミド分解酵素. 第82回日本生化学会大会 (2009年10月21-24日、神戸ポートアイランド、神戸)
- ⑬ 伊東 信, 座間宏太, 菅田慎一, 吉村征浩, 松永尚之, 清水耕平, 沖野 望, 上村 聡, 郷 信二, 池田和樹, 田口 良, 井ノ口仁一, 平林義雄. ゼブラフィッシュを用いた糖脂質研究のインパクト. 第29回日本糖質学会年会 (2009年9月9日-11日、高山).
- ⑭ 石橋洋平, 小林宇太郎, 坂口圭史, 土方敦司, 沖野 望, 伊東 信 立体構造モデルに基づくエンドグリコセラミダーゼの特異性の解析と改変. 第29回日本糖質学会年会 (2009年9月9日-11日、高山).
- ⑮ Ishibashi Y, Nagamatsu Y, Meyer S, Okino N, Geyer G, Ito M. Transglycosylation-based fluorescent labeling of glycolipids by EGALC. 50th International Conference on the Bioscience of Lipids. (2007年9月1-5日、Regensburg, Germany)

[図書] (計1件)

セラミド: 基礎と応用 編集 セラミド研究会 伊東 信 セラミドの代謝

[産業財産権]

○ 取得状況 (計2件)

名称: 新規エンドグリコセラミダーゼ
発明者: 伊東 信、石橋洋平、沖野 望
権利者: 国立大学法人 九州大学
種類: 特許
番号: 特許第 4355810
取得年月日: 平成 21 年 8 月 14 日
国内外の別: 国内

名称: 新規タンパク質
発明者: 大森 滂、伊東 信
権利者: 三菱化学株式会社
種類: 特許
番号: 特許第 4385445
取得年月日: 平成 21 年 10 月 9 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/kaishika/institute/2010insti.html>

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

沖野 望 (OKINO NOZOMU)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 90363324

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

(3) 連携研究者

該当なし