

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 11 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2009～2011
課題番号：	21570149
研究課題名（和文）	酵素の立体構造に基づくスフィンゴ脂質代謝制御の分子機構に関する研究
研究課題名（英文）	Studies on the molecular mechanism of sphingolipid metabolism based on the crystal structure of the enzymes
研究代表者	
	生城 浩 (Ikushiro Hiroko)
	大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：	10280702

研究成果の概要（和文）：

セリンパルミトイル転移酵素については、L-セリン結合型酵素の結晶構造の解析と触媒基ヒスチジン変異型酵素の反応素過程を詳細に調べた。触媒基ヒスチジンは、活性中心内でL-セリンを正しい配向に固定して副反応を抑制するとともに、パルミトイル-CoA 結合後は酸触媒として縮合脱炭酸反応を促進するという触媒基としての重要性と多機能性を有していることを明らかにした。スフィンゴシン-1-リン酸リアーゼについては、大腸菌内大量発現に成功した。精製酵素標品と蛍光標識基質を用いた活性測定系を作成した。酵素タンパク質の結晶化に成功した。

研究成果の概要（英文）：

The crystal structural of serine palmitoyltransferase complexed with L-serine was determined. The multifunctional role of the catalytic residue, histidine, in the reaction mechanism was experimentally proposed by the analyses of the mutant SPTs, as follows; The histidine residue fixes the conformation of both of L-serine and reaction product preventing the unfavorable side reactions, and enhances the Claisen-type condensation and decarboxylation by its function as an acid catalyst. Sphingosine 1-phosphate was overproduced successfully in *E. coli*. Assay system using the purified recombinant enzyme and fluorescent labeled-substrate was developed and enzymatic property was analyzed in detail. Sphingosine 1-phosphate was also crystallized with good reproducibility.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：酵素の触媒機構，タンパク質，スフィンゴ脂質，セリンパルミトイル転移酵素，スフィンゴシン 1-リン酸リアーゼ

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質は真核生物に遍在する膜脂質であり、細胞の生存には必須である。代表的な代謝産物であるセラミドやスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は増殖・分化・アポトーシスなどに関わる脂質メディエーターであり、一方、形質膜に存在するスフィンゴミエリンはコレステロールとともに脂質ラフト (lipid raft) と呼ばれるマイクロドメインを形成し、種々の情報伝達や膜輸送を介する特定の物質輸送の場として機能する。細胞内におけるスフィンゴ脂質ホメオスタシスは生合成・代謝経路を通して厳密に制御されていると考えられるが、その分子機構はほとんど未解明である。スフィンゴ脂質生合成系の酵素群の多くは細胞内の発現量が微量で、オルガネラ膜に局在する膜結合型タンパク質である。そのため、分子生物学的方法により構造遺伝子が同定されていながら、酵素本体を対象とした研究は依然として手付かずの状況にある。近年は大型質量分析装置を駆使して、外界刺激に対する応答の前後での細胞内スフィンゴ脂質を網羅的に解析する試みが国内外で進んでいる。しかし、細胞内のスフィンゴ脂質の濃度や種類に直接影響する第一因子は個々の代謝酵素の活性変化であり、最終的には酵素レベルの研究が必要になることは自明のことである。

セリンパルミトイル転移酵素 (serine palmitoyltransferase ; SPT) はスフィンゴ脂質生合成系の初発酵素であり、L-セリンとパルミトイル-CoA を基質として、クライゼン型縮合脱炭酸反応を触媒し、全てのスフィンゴ脂質の共通前駆体である 3-ケトジヒドロスフィンゴシンを合成する。2001 年に SPT における点変異により常染色体優性の『遺伝性知覚障害 I 型 (HSN1)』が発症することが報告された。本疾患では、SPT 活性の異常により細胞内スフィンゴ脂質量が変化して神経細胞死を引き起こすと推測されていた。酵母や培養細胞を用いた実験から HSN1 型変異による“loss of function”が報告される一方で、HSN1 患者においてはスフィンゴ脂質合成活性が亢進しているという、相反する報告もあった。HSN1 変異型 SPT においては補酵素や基質分子の酵素に対する親和性が低下したために失活したと推測されてきたが、HSN1 型変異箇所は活性中心からかなり遠く、補酵素や基質分子とは直接相互作用していないと予想された。このことから、申請者は、HSN1 型変異が間接的に作用して酵素の基質特異性を変化させ、結果生じた異常代謝物が病気を引き起こしているという“gain of function”の仮説を想定していた。変異型 SPT の立体構造解析とそれに基づく反応機構の解析により、この仮説の是非を検証しようと考えた。この仮説が妥当で

あれば、異常スフィンゴ脂質の細胞内での作用機序という新たな学術的興味を誘起するのみならず、本疾患に対する予防・治療法開発の基盤を与えると期待された。

S1P は、細胞内情報伝達物質として作用する以外に、細胞外からの受容体アゴニストとして血管系や免疫系における細胞増殖・分化や細胞運動制御に関与する。胸腺や末梢リンパ系器官からの白血球の放出は S1P 濃度勾配に従うことから、これまでは白血球上に発現する S1P 受容体を標的として免疫抑制剤の開発が進んできた。ところが、2005 年に食品に含まれる 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール (THI) が、SPL 活性を阻害することによって S1P 濃度勾配をなくし、リンパ系器官からの白血球の遊離を抑制することが報告された。リンパ組織と循環系間の S1P 濃度勾配の維持を直接担っている SPL は免疫抑制剤の新規標的として注目され、立体構造解明の必要性が一段と高まっていた。本研究で SPL と THI の複合体の立体構造解析に成功すれば、本酵素に特異的な阻害剤の設計も可能となり、他の生理活性脂質やその受容体を標的にした創薬研究でも多に役立つと予想された。また、スフィンゴ脂質やその誘導体は化学合成が難しく、入手困難であり、細胞内スフィンゴ脂質の作用機序を解析する際の大きな制約である。酵素の基質特異性をタンパク工学的手法で改変して工業的に利用できれば、様々な種類のスフィンゴ脂質誘導体が合成可能になり、研究の新たな発展に貢献できると考えられた。

2. 研究の目的

申請者は、スフィンゴ脂質の生合成・分解の制御機構を、酵素タンパク質の立体構造に基盤をおいた分子レベルで明らかにすることを研究の最終目標とする。本申請では、生合成経路の初発律速酵素である『セリンパルミトイル転移酵素 (SPT)』と、最終代謝産物 S1P の分解反応を触媒する『スフィンゴシン-1-リン酸リアーゼ (SPL)』を実験対象として、酵素タンパク質の結晶化と立体構造解析、および詳細な酵素反応の解析により、両酵素の構造-機能相関を明らかにすることを研究目的とした。

3. 研究の方法

- ① 実験材料である組み換え酵素の精製標品を得るために、SPT と SPL の大腸菌内大量発現系を構築し、それらの精製法を確立した。
- ② SPT については、触媒機能の発現に重要なアミノ酸残基の機能や、疾患を誘発するような遺伝子変異によるアミノ酸残基の置換が酵素活性に及ぼす影響を解明する

ため、野生型酵素に関する実験方法に基づいて、変異型酵素の発現系を構築し、組み換え酵素の精製法を確立した。

- ③ SPL について精製酵素標品による反応生成物を、逆相 HPLC を搭載した質量分析装置を用いて分析し、その化学構造を同定した。
- ④ SPT について、経由する反応中間体を含めた酵素反応機構を想定し、それを模する化学構造を有する基質や反応生成物の誘導体を化学合成した。さらに、SPL については、現在市販されていない酵素反応阻害剤を化学合成した。
- ⑤ SPT, SPL について、精製酵素と基質、生成物、および誘導体との反応を、補酵素に起因する吸収スペクトルの変化を指標に追跡した。UV/vis 吸収スペクトル、円偏光二色性スペクトル、蛍光スペクトルなどによる静的反応解析にくわえて、ストップドフロー法で遷移相の反応を解析した。
- ⑥ SPT, SPL について、放射性同位元素で標識した基質を用いた活性測定法にくわえて、蛍光標識した基質を代謝させて逆相 HPLC あるいは TLC と FLA3000 で定性・定量分析する方法とカップリング酵素を用いて分光学的に連続測定する活性測定法を新たに開発した。
- ⑦ SPL について、市販のスクリーニングキットを用いて結晶化条件の検索をおこなった。結晶が得られた溶媒の条件を基本に、X線回折データの測定に耐えうる良質の結晶が得られるまで、結晶化条件の最適化をおこなった。
- ⑧ SPT について、結晶化の母液に用いた緩衝液のトリス塩が、酵素活性部位の、本来なら基質が結合する位置に結合していたので、ソーキングによってアミノ酸基質である L-セリンを結合させた。
- ⑨ SPT について、大型放射光施設 (SPring-8) にて X線回折データを測定し、分子置換法によって位相決定を行い、立体構造を決定した。
- ⑩ SPT について、酵素との複合体の結晶が得られなかった中間体については、実際に構造決定できた SPT-L-セリン複合体の立体構造を基に MOE プログラムを用いたエネルギー最小化計算を行い、構造モデルを作製した。

4. 研究成果

SPT-L-セリン (基質) 複合体の構造モデル解析の結果に基づき、“パルミトイル-CoA 結合により誘導される SPT の構造変化に伴って、活性中心の His 残基が L-セリンからパルミトイル-CoA へと水素結合の相手に移すことによって基質の結合が完了する。それまでは、反

応性の高いキノイド中間体の生成が抑制されている”という SPT 活性制御機構モデルを提出していた。 *Sphingobacterium* 菌由来 SPT について L-セリン結合型酵素の結晶化と立体構造決定に成功した。



SPT-セリン複合体の立体構造

パルミトイル-CoA 非存在下では基質 L-セリンのカルボキシル基と His138 間で水素結合が形成され、キノイド中間体生成には不利な配向であることが確認でき、上述の機構モデルに対する構造化学的な証明が得られた。さらに、His 残基変異型 SPT を作製し、酵素反応の素過程を詳細に調べた結果、活性中心内で L-セリンを正しい配向で認識することによって、酵素を不活化する副反応を抑制するとともに、パルミトイル-CoA 結合後は酸触媒として L-セリンとの縮合脱炭酸反応を促進するという His 残基の触媒基としての重要性和多機能が明らかとなった。

ヒト由来スフィンゴシン-1-リン酸リアーゼ (SPL) を GST 融合タンパク質として大腸菌内で大量発現させることに成功した。結晶化や詳細な酵素反応の解析をおこなうには、可溶性画分における酵素発現量が少ないため、発現宿主株や培養条件の検討を進めている。細菌由来 SPL については結晶化に成功し、再現性も良好である。X線回折データ収集するためには結晶の凍結に工夫が必要であることが判明したため、クライオプロテクタントの選択とクライオ条件検討を進めている。蛍光標識基質と蛍光検出 HPLC を用いた酵素活性測定法を開発し、質量分析法により反応生成物を直接同定することに世界で初めて成功した。この活性測定法を用いて定常態下の酵素反応の解析は一通り終了した。反応生成物であるホスホエタノールアミンと SPL との反応 (本来の SPL 反応を途中まで遡る反応) を調べた結果、 β -脱離反応によってホスホエタノールアミンからエナミンを生じ、これが非酵素的にアセトアルデヒドに変換されて反応系内に蓄積することを見出した。SPL とスフィンゴシン 1-リン酸との反応においては、長鎖アルデヒドとホスホエタノールアミンが順次酵素から解離する経路と、ホスホエタノールアミンに対して β -脱離反応を触媒してエナ

ミンとして酵素から解離する経路の二つが起こりうることを示唆された。

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 6 件)

- ① Ikushiro, H., Hayashi, H., Mechanistic enzymology of serine palmitoyltransferase. 査読有, Biochim Biophys Acta., Vol. 1814, No. 11, 2011, 1474-1480
 - ② Lowther, J., Charmier, G., Raman, M. C., Ikushiro, H., Hayashi, H., Campopiano, D. J., 査読有, Role of a conserved arginine residue during catalysis in serine palmitoyltransferase., FEBS Lett., Vol. 585, No. 12, 2011, 1729-1734
 - ③ 生城浩子, 林秀行, 細菌セリンパルミトイル転移酵素の構造と触媒機構解析, 生化学, 査読有, 83 巻, 2 号, 2011, 105-110
 - ④ 生城浩子, 白岩有桂, 林秀行, セリンパルミトイル転移酵素の触媒反応における His159 の多機能的役割, ビタミン, 査読有, 84 巻, 9 号, 2011, 423-431
 - ⑤ Ikushiro, H., Islam, M. M., Okamoto, A., Hoseki, J., Murakawa, T., Fujii, S., Miyahara, I., Hayashi, H., Structural insights into the enzymatic mechanism of serine palmitoyltransferase from *Sphingobacterium multivorum*., J. Biochem., 査読有, Vol. 146, No. 4, 2009, 549-562
 - ⑥ Shiraiwa, Y., Ikushiro, H., Hayashi, H., Multifunctional role of His159 in the catalytic reaction of serine palmitoyltransferase., 査読有, J. Biol. Chem., Vol. 284, No. 23, 2009, 15487-15495
- [学会発表] (計 13 件)
- ① 宮原郁子, セリンヒドロキシメチル基転移酵素の複合体結晶構造, 日本結晶学会年会, 2011 年 11 月 25 日, 北海道大学(北海道札幌市)
 - ② 生城浩子, 好熱性共生細菌 *Symbiobacterium thermophilum* スフィンゴシン 1-リン酸リアーゼの酵素化学的解析, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 23 日, 京都国際会館
 - ③ 湯川直樹, セリンヒドロキシメチル基転移酵素の基質認識, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 23 日, 京都国際会館
 - ④ 宮原郁子, Atomic Resolution Crystal Structures of Serine Hydroxymethyltransferase with Substrate Analogue., The 3rd International Conference on Cofactors (ICC-03), 2011 年 7 月 11 日, University of Turku (Turku, Finland)
 - ⑤ 生城浩子, Enzymatic Characterization of Sphingosine-1-phosphate Lyase from Obligately Symbiotic Thermophile Bacterium *Symbiobacterium thermophilum*, The 3rd International Conference on Cofactors (ICC-03), 2011 年 7 月 11 日, University of Turku (Turku, Finland)
 - ⑥ 生城浩子, ビタミン B6 依存性セリンパルミトイル転移酵素 - スフィンゴ脂質合成系の律速酵素の反応制御機構 -, 日本ビタミン学会第 63 回大会, 2011 年 6 月 5 日, 安田女子大学 (広島県広島市)
 - ⑦ 生城浩子, Structural Insights into the Enzymatic Mechanism of Serine Palmitoyltransferase from *Sphingobacterium multivorum*, 第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会・合同大会, JB 論文賞受賞ポスター発表, 2010 年 12 月 9 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
 - ⑧ 生城浩子, 細菌における putative スフィンゴシン 1-リン酸リアーゼ遺伝子産物の酵素化学解析, 第 52 回日本脂質生化学会, 2010 年 6 月 14 日, 伊香保会館, 森秋旅館 (群馬県渋川市)
 - ⑨ 宮原郁子, 高度好熱菌由来セリンヒドロキシメチル転移酵素の X 線構造解析, 日本ビタミン学会第 62 回大会, 2010 年 6 月 12 日, アイーナ岩手県民情報交流センター (岩手県盛岡市)
 - ⑩ 生城浩子, Stereochemical reaction mechanism of serine palmitoyltransferase - Multifunctional role of the His residue for the SPT catalysis -, Gordon Research Conference (Glycolipid & Sphingolipid Biology), 招待講演, 2010 年 2 月 8 日, アメリカ合衆国, カリフォルニア州, ベンチュラ
 - ⑪ 生城浩子, セリンパルミトイル転移酵素の反応制御機構 - 変異酵素の副反応から明らかになった立体化学的反応制御 -, シンポジウム発表, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 21 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
 - ⑫ 生城浩子, セリンパルミトイル転移酵素変異体の解析から明らかになった His159 の多機能的役割, 第 51 回日本脂質生化学会, 2009 年 7 月 30 日, ウィルあいち (愛知県名古屋市)
 - ⑬ 生城浩子, セリンパルミトイル転移酵素変異体の解析から明らかになった His159

の多機能的役割, 日本ビタミン学会第 61
回大会, 2009 年 5 月 30 日, 京都学園大学
(京都府 亀岡市)

[図書] (計 2 件)

- ① 生城浩子, 林秀行 (日本ビタミン学会 編
集), 朝倉書店, ビタミン総合事典, 2011,
212-214
- ② 林秀行, 生城浩子 (日本ビタミン学会 編
集), 朝倉書店, ビタミン総合事典, 2011,
220-225

[その他]

ホームページ等

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/med/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生城 浩子 (Ikushiro Hiroko)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10280702

(2) 連携研究者

林 秀行 (Hayashi Hideyuki)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00183913