

平成21年 5月27日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770086

研究課題名（和文）病原細菌セラミダーゼの機能解析及び構造機能相関の解明

研究課題名（英文）Elucidation of structure and function of bacterial ceramidase

研究代表者

沖野 望 (NOZOMU OKINO)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：90363324

研究成果の概要：セラミドは表皮においてバリア機能や保湿機能を持つ機能性脂質として知られているが、生体内ではセカンドメッセンジャーとして機能している。本研究では病原細菌が生産するセラミド分解酵素（セラミダーゼ）の構造と機能を明らかにすることを目的とした。その結果、緑膿菌セラミダーゼの X 線結晶構造解析により、セラミダーゼの高次構造とその反応機構を解明した。また、細菌セラミダーゼが外毒素もしくは外毒素増強因子として働く可能性があることも分かった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、構造生物化学

キーワード：スフィンゴ脂質、セラミド、セラミダーゼ、スフィンゴミエリン、スフィンゴミエリナーゼ、緑膿菌、X線結晶構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質はスフィンゴシン塩基を持つ脂質の総称で、その代表的なものにスフィンゴ糖脂質、スフィンゴミエリン、セラミドがある。これまでの研究により、細胞膜の外層に存在するスフィンゴ脂質は細胞接着に重要であることや、これら脂質が形成するマイクロドメインが細胞内外のシグナル伝達に関与していることが明らかになっている。また、細胞表面に存在するスフィンゴ脂質は病原細菌やその毒素が感染する際にレセプターとなっていることが知られている。

さらに、多くの病原細菌がスフィンゴ脂質分解酵素を分泌する事が知られているが、その機能はスフィンゴミエリナーゼが溶血因子として作用する事以外はほとんど分かっていない。一方、真核生物においてスフィンゴミエリンは生体膜脂質として古くから知られているが、近年になってその分解産物であるセラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン1-リン酸に細胞の機能を制御する脂質メディエーターとしての生理機能があることが分かってきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が世界に先駆けて発見した緑膿菌セラミダーゼの生理機能解析を通して、(1)細菌感染における生体膜脂質を介した病原細菌遺伝子の発現機構を分子レベルで解析すること、(2)緑膿菌セラミダーゼ及び結核菌セラミダーゼの高次構造解析を通してそのユニークな反応機構を明らかにすること及び、(3)病原細菌セラミダーゼの生理的な条件下での反応を解析することで、その病原因子としての役割を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細菌感染における生体膜脂質による病原細菌遺伝子の発現機構の解明

これまでに緑膿菌セラミダーゼがスフィンゴミエリンなどの生体膜脂質によって誘導されることを見いだしている。そこで、緑膿菌セラミダーゼの遺伝子発現機構を解析するために緑膿菌セラミダーゼの遺伝子をβ-ガラクトシダーゼ遺伝子に置換した変異株の取得を試みた。具体的には緑膿菌セラミダーゼの遺伝子をβ-ガラクトシダーゼ遺伝子とテトラサイクリン遺伝子（選択マーカー）に置換したノックアウトベクターを作成して緑膿菌に導入し、テトラサイクリン耐性を指標にスクリーニングを行った。一方、生体膜脂質によって誘導される遺伝子の解析に関しては緑膿菌をスフィンゴミエリンを含む培地と含まない培地で培養し、total RNAを抽出後、DNA マイクロアレイによって遺伝子発現の解析を網羅的に行った。

### (2) 緑膿菌セラミダーゼ及び結核菌セラミダーゼの高次構造解析

緑膿菌セラミダーゼの大量発現にはセラミダーゼ遺伝子が大腸菌用の発現ベクター（pET23a）に組み込んだpETCMT7を使用し、大腸菌 BL21 (DE3)pLysS を用いて大量培養を行った。大腸菌の破碎液を Ni Sepharose 6 FF（ニッケルアフィニティー）と Superdex 200（ゲル濾過）に負荷することで緑膿菌セラミダーゼを精製した。結晶化を行うにあたり、緑膿菌セラミダーゼを 10 mg/ml になるように遠心濃縮し、ハンギングドロップ法にてスクリーニングを行った。また、結晶構造解析から推定した反応機構を明らかにするためにアミノ酸の変異体を作成し、セラミダーゼ活性を測定した。

結核菌セラミダーゼに関しては大量発現を行うために当該遺伝子が大腸菌用の発現ベクター（pET23a と pCold）に組み込んで、His タグを付加した結核菌セラミダーゼの発現ベクター（pETMtCD と pColdMtCD）を構築した。このベクターで大腸菌 BL21 (DE3)pLysS を形質転換して大量培養を試みた。また、酵

素の精製は緑膿菌セラミダーゼと同様に Ni Sepharose 6 FF（ニッケルアフィニティー）と Superdex 200（ゲル濾過）を用いて行った。

### (3) 病原細菌セラミダーゼの生理的な条件下での反応解析

緑膿菌セラミダーゼの生理機能の解析に関しては、ヒト肺由来の培養細胞を用いて検討を行った。具体的には緑膿菌スフィンゴミエリナーゼとセラミダーゼをそれぞれ単独、もしくは同時に作用させて、細胞の形態や数などの変化を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 細菌感染における生体膜脂質による病原細菌遺伝子の発現機構の解明

緑膿菌におけるスフィンゴ脂質応答遺伝子の探索に関しては、緑膿菌セラミダーゼ遺伝子をβ-ガラクトシダーゼ遺伝子に置き換えた緑膿菌の変異株を作成した。この変異株を用いて、スフィンゴ脂質に対する応答を調べたところ、スフィンゴミエリンを加えたときにβ-ガラクトシダーゼ活性が顕著に誘導された。我々はこれまでに、セラミダーゼがスフィンゴミエリンにより顕著に発現誘導されることを見いだしており、本変異株のβ-ガラクトシダーゼ活性を指標にしてセラミダーゼの発現解析並びに、スフィンゴ脂質応答遺伝子の探索が出来ると考えている。また、緑膿菌をスフィンゴミエリンを含む培地と含まない条件で培養した時の遺伝子発現を緑膿菌マイクロアレイにより探索した。その結果、セラミダーゼや溶血性ホスホリパーゼC（スフィンゴミエリナーゼ）などと共に、緑膿菌の病原性に関わる可能性がある幾つかの遺伝子がスフィンゴミエリンにより発現誘導されることが明らかになった。

### (2) 緑膿菌セラミダーゼ及び結核菌セラミダーゼの高次構造解析

緑膿菌セラミダーゼを大腸菌で発現させて、ニッケルカラムとゲル濾過で精製したところ、最終的に1リットルの培養液あたり、約2 mgの精製酵素を得ることができた。この酵素を用いて結晶化のスクリーニングを行ったところ、幾つかの条件下で結晶を得た。さらに、セレノメチオニンの置換体を作成することで位相を決定した。その結果、緑膿菌セラミダーゼはN末端側の活性部位を含む新奇ドメインとC末端側のイムノグロブリン様ドメインから構成されていることが分かった（図1）。また、N末端ドメインの中央に亜鉛イオン、N末端ドメインとC末端ドメインの間にマグネシウムイオンと思われる電子密度が観察された。N末端側の亜鉛イオンに

配位するアミノ酸の配置がこれまでに報告されている亜鉛酵素と酷似していたことから(図2)、これらの反応に関わると推定されるアミノ酸の変異体を作成し、セラミダーゼ活性を測定した。その結果、これら変異体セラミダーゼの活性はほとんど消失し、緑膿菌セラミダーゼは亜鉛酵素であることが明らかになった。これらのことから緑膿菌セラミダーゼは、亜鉛に配位する水分子がヒスチジンによりプロトンを引き抜かれることで活性化され、活性化された水分子が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アミド結合を加水分解すると考えられる(図2)。一方、今回明らかにした緑膿菌セラミダーゼの反応に関わるアミノ酸は他の起源の中性セラミダーゼにおいても完全に保存されていた。そこで、ラット中性セラミダーゼの保存されているアミノ酸に関して、変異体を作成したところ、セラミダーゼ活性がほぼ完全に消失した。さらに、結核菌や哺乳動物の中性セラミダーゼの立体構造モデルを作成したが、いずれのセラミダーゼも高次構造は非常に良く似ており、中性セラミダーゼの高次構造と触媒機能は細菌からヒトを含む哺乳動物に至るまで高度に保存されていることが証明された。

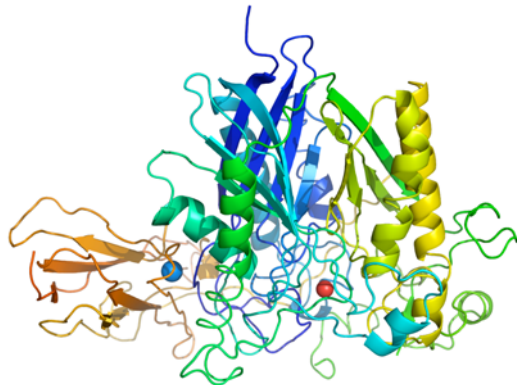


図1 緑膿菌セラミダーゼの高次構造

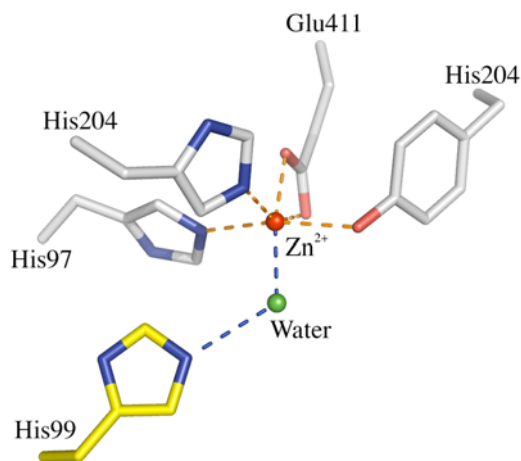


図2 緑膿菌セラミダーゼの活性中心

結核菌セラミダーゼに関しては、pET23aを用いたベクター(pETMtCD)では発現量が少なかったが、pColdベクターを使用した発現系(pColdMtCD)を用いたときに1リットルあたり、約2mgの精製酵素を得ることができた。精製した酵素を用いて金属イオンや界面活性剤に対する特異性を調べた。その結果、結核菌セラミダーゼは緑膿菌セラミダーゼと異なり、その活性はCa<sup>2+</sup>等の二価金属イオンに影響されないことが分かった。また、緑膿菌セラミダーゼと共にセラミドに対する詳細な基質特異性を検討したところ、どちらの酵素も緑膿菌や結核菌が主な病原とする肺に多く存在する長鎖脂肪酸や不飽和脂肪酸を含むセラミドを良く分解することが分かった。

### (3) 病原細菌セラミダーゼの生理的な条件下での反応解析

細菌セラミダーゼの生理機能解析に関しては、ヒト肺由来の細胞に対して緑膿菌のスフィンゴミエリナーゼ(溶血性ホスホリパーゼC)とセラミダーゼを作用させて細胞を観察した。その結果、スフィンゴミエリナーゼとセラミダーゼを単独で作用させても細胞に大きな変化はないが、同時に作用させると細胞増殖が顕著に抑制されることを見いだした。また、その際に細胞内外においてスフィンゴシンが増加していたことから、細胞増殖の抑制はセラミダーゼの作用によって生じたスフィンゴシンにより引き起こされていることが推察された。これらのことは緑膿菌が肺に感染したときに、スフィンゴミエリナーゼとセラミダーゼが協調して働き、感染部位の細胞に大きなダメージを与え得ることを示唆している。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

1. Inoue, T.\*, Okino, N.\*, Kakuta, Y., Hijikata, A., Okano, H., Goda, H. M., Tani, M., Sueyoshi, N., Kambayashi, K., Matsumura, H., Kai, Y., and Ito, M. Mechanistic insights into the hydrolysis and synthesis of ceramide by neutral ceramidase.

*J. Biol. Chem.* **284**(14), 9566-9577 (2009) 査読有り

\*equal contribution

2. 沖野 望、谷 元洋、光武 進、吉村 征浩、合田(問註所) 初美、伊東 信 構造から読み解く中性セラミダーゼの触媒機構、存在様式及び生理機能 細胞、**41**(5), 12-15, (2009) 査読無し

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 沖野 望、伊東 信、スフィンゴ脂質から脂肪酸を遊離する酵素の構造とその応用、日本農芸化学会2009年度大会、福岡、2009. 03. 28.
2. 沖野 望、伊東 信、緑膿菌セラミダーゼの構造と生理機能、第43回 緑膿菌感染症研究会、京都、2009. 02. 06.
3. 沖野 望、生体膜を構成する糖脂質の構造と機能～スフィンクスの謎に迫る～、香川大学機能糖鎖プロジェクトシンポジウム、香川、2008. 12. 19.
4. 沖野 望、井上 豪、角田佳充、土方敦司、岡野浩幸、上林浩二、合田(問註所)初美、谷 元洋、末吉紀行、松村浩由、甲斐 泰、伊東 信、緑膿菌由来の中性セラミダーゼのX線結晶構造解析と反応機構の解明、神戸、BMB2008、2008. 12. 09.
5. 沖野 望、井上 豪、岡野浩幸、上林浩二、合田(問註所)初美、谷 元洋1、末吉紀行、角田佳充、伊東 信、緑膿菌セラミダーゼの結晶化と高次構造の解析、日本農芸化学会 西日本支部大会、長崎、2008. 09. 20.
6. 沖野 望、細菌セラミダーゼの構造と機能に関する研究、平成20年度日本生化学会九州支部例会、福岡、2008. 05. 17
7. 沖野 望、池田理恵、伊東 信、結核菌セラミダーゼの大量発現系構築と諸性質の検討、日本農芸化学会2008年度大会、名古屋、2008. 03. 27
8. 沖野 望、井上 豪、岡野浩幸、上林浩二、合田(問註所)初美、谷 元洋、末吉紀行、角田佳充、伊東 信、緑膿菌セラミダーゼの構造と機能の解析、BMB2007、横浜、2007. 12. 12
9. Nozomu Okino and Makoto Ito, Functional analysis of *Pseudomonas* ceramidase, 48th International Conference on the Bioscience of Lipids, Finland, Turku, 2007. 09. 04~08
10. 沖野 望、伊東 信、緑膿菌セラミダーゼの生細胞に対する作用機構の解析、第 49

回 日本脂質生化学会、札幌、2007. 06. 05

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

沖野 望 (NOZOMU OKINO)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：90363324