

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570142

研究課題名(和文) 緑膿菌における新規脂質シグナルの解析とその生物機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a novel lipid signaling in *Pseudomonas aeruginosa*

研究代表者

沖野 望 (OKINO, NOZOMU)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90363324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：セラミダーゼはセラミドを脂肪酸とスフィンゴシンに分解する酵素である。我々はこれまでに、日和見感染菌として有名な緑膿菌がセラミダーゼを分泌することを見出すと共に、その精製や遺伝子クローニングを行ってきた。また、セラミダーゼがスフィンゴミエリナーゼと協調して働くことで、緑膿菌の病原性に関わることや、セラミダーゼの発現誘導には宿主のスフィンゴ脂質が重要な役割を果たすことを明らかにした。本研究では、我々が新たに見出した緑膿菌セラミダーゼの遺伝子発現に関わる新規転写制御因子の機能解析を行い、緑膿菌セラミダーゼが宿主由来のスフィンゴ脂質によって発現誘導されるメカニズムを解明した。

研究成果の概要(英文)：Ceramidase (EC3.5.1.23) is an enzyme that catalyses the hydrolysis of the N-acyl linkage of ceramide to generate fatty acid and sphingosine. We previously reported the purification, molecular cloning and characterization of a neutral ceramidase from *Pseudomonas aeruginosa*, which is a famous opportunistic pathogen that causes serious infectious diseases. Recently, we found that the simultaneous production of hemolytic phospholipase C (PlcH) and ceramidase was induced by plasma membrane lipids, and PlcH-induced hemolysis was significantly enhanced by the action of ceramidase. In the present study, we identified a novel transcriptional regulator, which is involved in the expression of *Pseudomonas* ceramidase and PlcH. We also revealed the mechanism of the ceramidase expression through the transcriptional regulator, which is activated by host-derived sphingolipid.

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：セラミダーゼ セラミド 転写制御因子 緑膿菌

## 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。我々は、スフィンゴ脂質の研究にブレークスルーをもたらす酵素を生産する微生物を探索してきたが、その過程で緑膿菌がセラミド分解酵素(セラミダーゼ)を生産することを発見した。また、緑膿菌が生産するスフィンゴミエリナーゼとセラミダーゼの遺伝子発現は宿主に存在する生体膜脂質(スフィンゴ脂質)によって発現誘導されることを見いだすと共に、スフィンゴミエリナーゼ依存性の細胞毒性をセラミダーゼが増強することを明らかにした。

従来から、糖や脂質に作用する酵素(グリコシダーゼやリパーゼ)を生産する細菌は、基質となる糖や脂質を培地に加えた時にその生産量を増大させることが報告されているが、そのメカニズムはよく分かっていない。また、黄色ブドウ球菌、セレウス菌、結核菌など多くの病原細菌が生体膜脂質の分解酵素を生産し、宿主に感染したときにこれら酵素が病原因子として働くことが知られているが、その発現誘導メカニズムはよく分かっていない。そこで、我々はこのメカニズムを明らかにするために、緑膿菌セラミダーゼにおいて、スフィンゴ脂質依存性の遺伝子発現機構を解明することを目的として研究を進めた。その結果、緑膿菌セラミダーゼのスフィンゴ脂質依存性の遺伝子発現には新規な転写制御因子(SpIR: Sphingolipid response regulator)が関与していることを見いだした。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が新に見出した新規転写制御因子の機能解析を行うことで、緑膿菌におけるスフィンゴ脂質依存性の遺伝子発現機構を分子レベルで明らかにする。スフィンゴ脂質は生体膜の表面に豊富に存在することから、本研究は細菌における新規な遺伝子発現機構を明らかにするだけでなく、病原細菌が宿主に感染したときの新規な遺伝子発現機構の解明にもつながる。

## 3. 研究の方法

### (1) スフィンゴ脂質応答性転写制御因子(SpIR)の機能解析

SpIRの機能を解析するにあたり、緑膿菌の標準株 *P. aeruginosa* PAO1 を用いて、SpIR欠損株( $\Delta$ SpIR株)を作成した。次に、野生株と $\Delta$ SpIR株をスフィンゴミエリン含有PY培地で培養し、培地中のセラミダーゼ活性とスフィンゴミエリナーゼ活性を蛍光基質であるC12NBDセラミドとC6NBDスフィンゴミエリンを使用してそれぞれ測定した。また、野生株と $\Delta$ SpIR株の溶血活性は、それぞれの菌株を羊赤血球と共培養することで評価した。一方、SpIRの生化学的な解析を行うこと

及び、SpIRの高次構造を明らかにすることを目的として、大腸菌用の発現ベクターを用いて、SpIRの大量発現系を構築した。大腸菌の可溶性画分に発現したタンパク質は、アフィニティーカラムとゲル濾過により精製した。

### (2) SpIRを介した遺伝子発現に關与するプロモーター領域の探索

緑膿菌セラミダーゼ遺伝子のプロモーター領域を特定するために、スフィンゴミエリンを加えたPY培地で培養した緑膿菌からRNAを調製し、5'RACE法により転写開始点を決定した。次に、決定した転写開始点の上流領域をクローン化し、ガラクトシダーゼ遺伝子に繋いで、レポーターベクターを作製した。本ベクターの推定プロモーター領域を順次欠失させた変異体をPCRにより作製した。作製したベクターを緑膿菌に導入し、スフィンゴミエリンの存在下で、ガラクトシダーゼの活性を測定することで、プロモーター領域を絞り込んだ。また、その領域において、プロモーター活性に關与する塩基を明らかにするために、当該領域の塩基を変異させたコンストラクトを作製し、緑膿菌に導入後、ガラクトシダーゼ活性を測定した。

上記の研究で決定したプロモーター領域にSpIRが結合することを明らかにするために、ゲルシフトアッセイを行った。具体的には、プロモーター活性に必要な領域をPCRで増幅させ、ビオチン化したDNA断片と大腸菌で発現させて精製したSpIRを用いた。また、スフィンゴシンとSpIRの結合を調べるために、ビオチン化したスフィンゴシンと大腸菌で発現させたSpIRを混合し、アビジンビーズで分離できるかどうか調べた。

### (3) SpIRによって発現調節される遺伝子の探索

SpIRによって転写制御を受ける遺伝子を探索するために、野生株と $\Delta$ SpIR株をPY培地とスフィンゴミエリンを含むPY培地で培養し、RNAを調製した。調製したRNAを鋳型としてcDNAを合成し、アフィメトリクス社製GeneChip *P. aeruginosa* Genome Arrayに対してハイブリダイゼーションを行うことで、それぞれの条件における遺伝子発現を解析・比較した。

## 4. 研究成果

### (1) スフィンゴ脂質応答性転写制御因子(SpIR)の機能解析

緑膿菌が病原性因子として分泌するセラミダーゼやスフィンゴミエリナーゼの発現誘導におけるSpIRの機能を明らかにするために、野生株と $\Delta$ SpIR株をPY培地並びにスフィンゴミエリンを含むPY培地で培養し、培養上清におけるセラミダーゼ活性とスフィンゴミエリナーゼ活性を測定した。その結果、セラミダーゼ活性とスフィンゴミエリナーゼ活性は野生株をスフィンゴミエリン含有

培地で培養したときに強く誘導されたが、 $\Delta$ SpIR 株ではスフィンゴミエリンの有無にかかわらず、これら酵素の発現誘導が起こらなかった。また、ヒツジ赤血球との共培養により、溶血活性を測定したところ、野生株では時間経過と共に溶血が増大したが、 $\Delta$ SpIR 株では溶血が顕著に抑制されていた。これらのことは、緑膿菌セラミダーゼやスフィンゴミエリナーゼの発現とこれら酵素によって引き起こされる溶血活性に SpIR が重要な役割を果たしていることを示している。

次に、SpIR の大量発現系を構築するために大腸菌を用いて、その発現系の構築に取り組んだ。その結果、SpIR 単独で発現を行うとその多くは封入体に移行し、可溶性タンパク質としては発現・精製することができなかった。そこで、細菌の転写制御因子の研究で良く使用されているマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質 (MBP-SpIR) として発現を試みた。その結果、発現させたタンパク質が可溶性になり、かつ大量に発現・精製することが可能になった。一方、大量に発現させた MBP-SpIR を用いて、結晶化のスクリーニングを行ったところ、幾つか微結晶を得ることができたが、これらの結晶から高次構造の決定には至らなかった。

## (2) SpIR を介した遺伝子発現に関与するプロモーター領域の探索

緑膿菌セラミダーゼの遺伝子発現機構を明らかにするために、緑膿菌セラミダーゼのプロモーター解析を行った。まず、5' RACE 法により転写開始点を決定したところ、-80 番目の A が転写開始点であることが分かった。次に、この転写開始点の上流領域をガラクトシダーゼ遺伝子に繋ぐことで作製したレポーターベクターを用いて、プロモーター領域を決定した。その結果、-100~-200 領域にプロモーター活性が存在し、特にこの中でも -135~-155 領域が重要であることが分かった。さらに、-80~-200 領域の DNA 断片と MBP-SpIR を使用してゲルシフトアッセイを行ったところ、SpIR はスフィンゴ脂質の一種であるスフィンゴシンの存在下で -80~-200 領域の DNA 断片と結合することが分かった。以上の結果は、SpIR がスフィンゴシンの存在下で、セラミダーゼ遺伝子の上流に存在するプロモーター領域に結合することで、セラミダーゼ遺伝子の発現を促していることを示している。

一方、SpIR とスフィンゴシンの結合を調べるために、ビオチン標識したスフィンゴシンと MBP-SpIR もしくは MBP を混合し、アビジン磁気ビーズで分離したところ、MBP-SpIR が特異的に検出された。このことは SpIR がスフィンゴシンと直接結合することを示している。

## (3) SpIR によって発現調節される遺伝子の探索

SpIR によって発現調節されている遺伝子の全貌を明らかにするために、緑膿菌の野生株と  $\Delta$ SpIR 株を PY 培地並びにスフィンゴミエリンを含む PY 培地でそれぞれ培養し、RNA を抽出後に、DNA マイクロアレイ解析により、遺伝子発現の変化を調べた。まず、野生株においてスフィンゴミエリンにより発現誘導される遺伝子を探索したところ、スフィンゴミエリンを添加するとセラミダーゼやスフィンゴミエリナーゼを含む 110 個の遺伝子の発現が有意 (Zscore が 2 以上) に増加し、37 個の遺伝子の発現が低下することが明らかになった。一方、 $\Delta$ SpIR 株ではスフィンゴミエリンを加えた時に発現誘導される遺伝子が野生株と比較して減少しており、これらの中にはセラミダーゼやスフィンゴミエリナーゼが含まれていた。これらのことから、スフィンゴミエリンを加えたときに発現誘導される遺伝子の一部は SpIR によって制御されていることが分かった。

スフィンゴ脂質は真核生物には普遍的に存在する脂質であるが、細菌においては存在が限られており、*Sphingobacterium* 属など一部の細菌にしか見出されていない。今回の研究対象である緑膿菌にもスフィンゴ脂質は存在していないが、緑膿菌はスフィンゴ脂質の分解酵素であるセラミダーゼやスフィンゴミエリナーゼ遺伝子を所有している。このことは緑膿菌が感染した宿主中で、宿主のスフィンゴ脂質を分解して生存に必要な炭素原を得ていることを想像させるが、その中でもセラミダーゼの遺伝子発現機構に関しては全く不明であった。今回の一連の研究で、セラミダーゼが宿主に存在するスフィンゴ脂質 (特にスフィンゴシン) と緑膿菌が持つ転写制御因子 SpIR によって発現制御を受けていることが明らかになった。SpIR によって発現制御を受けている遺伝子はセラミダーゼだけではないので、これら遺伝子と緑膿菌の病原性の関係にも興味を持たれる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

### 1. Ito M, Okino N, Tani M.

New insight into the structure, reaction mechanism, and biological functions of neutral ceramidase.

*Biochimica et Biophysica Acta*, **1841**, 682-691, 2014, 査読有り

doi: 10.1016/j.bbaliip.2013.09.008.

### 2. Oizumi A, Nakayama H, Okino N, Iwahara C, Kina K, Matsumoto R, Ogawa H, Takamori K, Ito M, Suga Y, Iwabuchi K.

*Pseudomonas*-derived ceramidase induces production of inflammatory mediators from human keratinocytes via sphingosine-1-phosphate.

*PLoS One*. **9(2)**, e89402, 2014, 査読有り

doi: 10.1371/journal.pone.0089402.

〔学会発表〕(計5件)

1. 沖野 望、伊東 信  
緑膿菌セラミダーゼの発現制御に関わる新規転写因子 SpIR の解析  
日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 27 日～30 日、明治大学生田キャンパス

2. 沖野 望  
スフィンゴ脂質分解酵素の反応マシーナリの解明  
第 49 回 化学関連支部合同九州大会、2012 年 6 月 30 日、北九州国際会議場□

3. 沖野 望、伊東 信  
緑膿菌セラミダーゼの遺伝子発現機構の解析  
第 53 回 日本脂質生化学会、2011 年 5 月 12 日～13 日、東京ガーデンパレス湯島会館

4. 沖野 望、伊東 信  
緑膿菌セラミダーゼの遺伝子発現機構の解明  
第 84 回 日本生化学会大会、2011 年 9 月 21 日～24 日、国立京都国際会館

5. 沖野 望  
細菌由来新規スフィンゴ脂質分解酵素の構造と機能解析  
第 35 回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2011 年 9 月 29 日～10 月 1 日、休暇村 志賀島

〔その他〕

ホームページ：  
<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/kaishika/index.html>

データベース：  
Nozomu Okino, Makoto Ito, 日本糖鎖科学統合データベース JCGGDB  
GlycoPOD (GlycoScience Protocol Online Database), 2012.03  
Hydrolysis of ceramide by ceramidase (CDase) and measurement of CDase activity.

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