

## スフィンゴ脂質分解酵素の高度利用を目指した機能改変

九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門 沖野 望

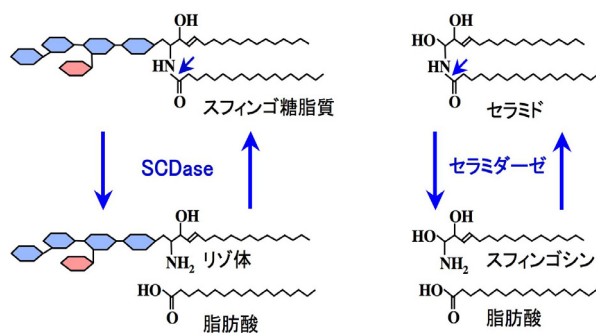


### はじめに

動物細胞の形質膜は脂質二重膜によって構成されており、その主な構成成分はグリセロ型リン脂質とスフィンゴ脂質である。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が細胞接着に重要な役割を果たしていることや、スフィンゴ脂質がコレステロールと共に形成する脂質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、スフィンゴミエリンの代謝産物であるセラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン-1リン酸に生理活性作用が見いだされ、スフィンゴ脂質と共にその代謝酵素の重要性も指摘されている。一方、細胞表面に存在するスフィンゴ糖脂質は、病原細菌（病原性大腸菌や淋菌など）や細菌毒素（コレラ毒素やペロ毒素など）の受容体になっており、その構造や存在様式に注目が集まっている。一方、これまでの研究で多くの病原細菌がスフィンゴ脂質分解酵素を分泌することも明らかにされているが、その機能はスフィンゴミエリン分解酵素（スフィンゴミエリナーゼ）が溶血因子として作用すること以外はほとんど分かっていない。

### スフィンゴ脂質分解酵素の発見とその遺伝子クローニング

我々はこれまでにスフィンゴ脂質の研究を進める上で有用な酵素を生産する微生物を探索し、幾つかの新規な細菌由来のスフィンゴ脂質分解酵素を見いだした。その中でも特筆すべきものとして、スフィンゴ脂質から脂肪酸を遊離させ、そのリゾ体を生成する スフィンゴ脂質セラミド N-デアシラーゼ (SCDase) やセラミドを脂肪酸とスフィンゴシンに加水分解する セラミダーゼ を発見したことが挙げられる。スフィンゴ脂質が SCDase やセラミダーゼにより分解されると新たにアミノ基を生じるので、セラミド部分の脂肪酸を RI 標識や蛍光標識したスフィンゴ脂質を作成することが可能になる。また、生成したリゾ体にアミノ基と反応する蛍光試薬を作用させることで、スフィンゴ脂質の高感度定量も可能となる。



SCDaseとセラミダーゼの作用様式

我々は SCDase やセラミダーゼの有効利用を行うにあたり、細菌の培養上清からこれら酵素を精製し、その部分アミノ酸配列情報を用いた遺伝子クローニングにより、一次構造を明らかにした。その結果、SCDase とセラミダーゼはこれまでに報告のない新規な一次構造を持つタンパク質であることが分かった。また、セラミダーゼに関しては、その遺伝情報が細菌からヒトに至るまで保存された新規ファミリーを形成していることを見いだした。さらに、セラミダーゼの生理機能の解析を進め、緑膿菌セラミダーゼは溶血因子として知られているスフィンゴミリナーゼの溶血反応を増強することで緑膿菌の病原性に関わっていることや、真核生物の中性セラミダーゼは細胞内外においてセラミドの分解に関わっていることを明らかにした。一方、我々は SCDase やセラミダーゼは加水分解のみならず、その逆反応（縮合反応）を効率よく触媒することを見だし、その縮合反応を利用して RI 標識や蛍光標識スフィンゴ脂質を簡単に調製する方法を開発した。SCDase とセラミダーゼは、それぞれスフィンゴ糖脂質やスフィンゴミエリンのセラミドおよび、遊離のセラミドに作用して加水分解反応により脂肪酸を遊離するが、その一次構造は全く異なっている。そこで、SCDase やセラミダーゼの反応メカニズムや基質特異性の違いを明らかにするために、SCDase と緑膿菌セラミダーゼの X 線結晶構造解析を試みた。

## 緑膿菌セラミダーゼの高次構造解析

緑膿菌セラミダーゼの高次構造解析を行うにあたり、C末端に His-tag を付加した発現コンストラクトを作成し、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 1L 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、セラミダーゼの高次構造を明らかにした。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規ドメインと 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。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は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、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、セラミダーゼの加水分解と逆反応の活性を測定した。その結果、これら変異体における両反応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。従来から、亜鉛酵素と言えばカルボキシペプチダーゼや炭酸脱水素酵素が良く知られている。緑膿菌セラミダーゼの場合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アミド結合が加水分解されるものと考えられる。一方、緑膿菌セラミダーゼの反応に関わる全ての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、結核菌や哺乳類の中性セラミダーゼの立体構造モデルを作成したところ、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類に至るまで高度に保存されていることが示された。

## SCDase の高次構造解析

SCDase に関しても C 末端に His-Tag を付加した発現ベクターを作成し、大腸菌を用いて大量発現させ、ニッケルアフィニティーとゲル濾過により精製した。得られた酵素を用いて結晶化のスクリーニングを行ったところ、PEG3350 を沈殿剤とする溶液中で結晶を得ることが出来た。次に、本結晶をシンクロトロンで解析することで分解能 2 Å の回折データを得て、SCDase の高次構造を決定することに成功した。その結果、SCDase は N 末端の beta-trefoil 構造と C 末端の活性部位を含む distorted (···)<sub>8</sub> barrel 構造から構成されていることが明らかになった。さらに、C 末端ドメインの中央に二つの亜鉛イオンを見いだしたが、これら亜鉛イオンに配位するアミノ酸の配置はメタロ・ラクタマーゼなどの二つの亜鉛イオンを活性中心に含む加水分解酵素とよく似ていた。そこで、亜鉛イオンに配位するアミノ酸と反応に関わると推定されるアミノ酸の変異体を作成して加水分解反応と逆反応の活性を測定したところ、どちらとも活性が大きく低下していた。これらのことは、加水分解と逆反応が同じ反応部位で行われていること、及び SCDase が亜鉛イオンを活性中心に持つ亜鉛酵素であることを示している。一方、SCDase は加水分解と逆反応が似た条件で起こることから、それぞれの反応の進行が途中で平衡に達してしまう。そこで、基質結合部位周辺に存在するアミノ酸の変異体を作成し、加水分解や逆反応を効率よく触媒できる酵素の探索を進めている。

## 参考文献

- Okino, N. *et al.*: *J. Biol. Chem.* **273**, 14368-14373 (1998)
- Okino, N. *et al.*: *J. Biol. Chem.* **274**, 36616-36622 (1999)
- Furusato, M. *et al.*: *J. Biol. Chem.* **277**, 17300-17307 (2002)
- Okino, N. and Ito, M.: *J. Biol. Chem.* **282**, 6021-6030 (2007)
- Inoue, T., Okino, N. *et al.*: *J. Biol. Chem.* **284**, 9566-9577 (2009)