

生物に対する防御タンパク質をプロテオーム解析にて同定してきた¹²⁻¹⁵⁾。その過程で確立した実験系を用い、解毒酵素群の異なる発現機構について現在解析中である。解毒酵素の発現機構や基質特異性の差異という観点から農薬を新たに検討することにより、少量で目的害虫に効果があり人体に影響が少ない農薬の開発が可能となる。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は文部科学省科学研究費補助金ならびに平成 20 年度九州大学教育研究プログラム・研究拠点形成プロジェクトの援助により得られたものである。

- 1) Li, X., Schuler, M.A., & Berenbaum, M.R. (2007) *Annu. Rev. Entomol.*, **52**, 231-253.
- 2) Yamamoto, K., Nagaoka, S., Banno, Y., & Aso, Y. (2009) *Comp. Biochem. Physiol.*, **149**, 461-467.
- 3) Awasthi, Y.C., Ansari, G.A., & Awasthi, S. (2005) *Methods Enzymol.*, **401**, 379-407.
- 4) Ranson, H. & Hemingway, J. (2005) *Methods Enzymol.*, **401**, 226-241.
- 5) Yamamoto, K., Zhang, P.B., Miake, F., Kashige, N., Aso, Y., Banno, Y., & Fujii, H. (2005) *Comp. Biochem. Physiol.*, **141 B**, 340-346.
- 6) Yamamoto, K., Zhang, P.B., Banno, Y., & Fujii, H. (2006) *J. Appl. Entomol.*, **130**, 515-522.
- 7) Yamamoto, K., Miake, F., & Aso, Y. (2007) *J. Appl. Entomol.*, **131**, 466-471.
- 8) Yamamoto, K., Fujii, H., Aso, Y., Banno, Y., & Koga, K. (2007) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **71**, 553-560.
- 9) Yamamoto, K., Miake, F., Aso, Y., & Teshiba, S. (2008) *J. Appl. Entomol.*, **133**, 278-283.
- 10) Vontas, J.D., Small, G.J., Nikou, D.C., Ranson, H., & Hemingway, J. (2002) *Biochem. J.*, **362**, 329-337.
- 11) 三田和英 (2009) 生化学, **81**, 353-360.
- 12) Zhang, P., Yamamoto, K., Aso, Y., Banno, Y., Sakano, D., Wang, Y., & Fujii, H. (2005) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **69**, 2086-2093.
- 13) Wang, Y., Zhang, P., Fujii, H., Banno, Y., Yamamoto, K., & Aso, Y. (2004) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **68**, 1821-1823.
- 14) Zhang, P., Aso, Y., Yamamoto, K., Banno, Y., Wang, Y., Tsuchida, K., Kawaguchi, Y., & Fujii, H. (2006) *Proteomics*, **6**, 2586-2599.
- 15) Zhang, P., Aso, Y., Jikuya, H., Kusakabe, T., Lee, J., Kawaguchi, Y., Yamamoto, K., Banno, Y., & Fujii, H. (2007) *J. Research Proteomics*, **6**, 2295-2303.

山本 幸治

(九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学部門)

Detoxification enzymes of the lepidopteran insects
Kohji Yamamoto (Faculty of Agriculture, Kyushu University Graduate School, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan)

細菌セラミダーゼの生理機能と高次構造の解明

1. はじめに

生体膜は脂質二重膜によって構成されているがその主な構成成分はグリセロ型のリン脂質とスフィンゴ脂質（スフィンゴミエリンやスフィンゴ糖脂質）である。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な役割を果たしていることや、これら脂質が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がスフィンゴミエリナーゼによって分解されて生じたセラミド、セラミドがセラミダーゼによって分解されて生じたスフィンゴシンにアポトーシス誘導能があることや、スフィンゴシンのリン酸化物であるスフィンゴシン-1 リン酸に細胞分裂促進作用があることが分かっており、スフィンゴ脂質とその代謝酵素の重要性が指摘されている。また、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）のレセプターになっており、その構造や存在様式に注目が集まっている。一方、多くの病原細菌が分泌するスフィンゴミエリナーゼやホスホリパーゼ A₂ は溶血活性を示す外毒素としても知られている。

2. 細菌セラミダーゼの発見

生体膜を構成する糖鎖や脂質の構造と機能を解明する上で、それらに特異的に作用する酵素が研究の発展に大きく貢献してきた。我々はこれまでに、スフィンゴ（糖）脂質の研究に役立つ新規な酵素を開発してきたが、その過程でアトピー性皮膚炎患者の表皮からスフィンゴミリナーゼ等を生産する細菌と共に、セラミダーゼを分泌する緑膿菌を発見した¹⁾。セラミダーゼは 1960 年代の始めにイスラエルの Shimon Gatt により、ラット脳の抽出液からその活性が見いだされ部分精製されていたが、その分子本体は長い間不明であった²⁾。その後、米国の Moser らによって、ファーマー病という重篤な遺伝病の原因遺伝子がリソソームでセラミドの代謝を担っている酸性セラミダーゼであることが報告された³⁾。しかし、その精製と遺伝子クローニングが行われたのは 1990 年代の中頃になってからである^{4,5)}。我々が緑膿菌セラミダーゼを発見した当時（1990

年代後半), 哺乳類にはリソソーム由来の酸性セラミダーゼ以外にも中性やアルカリ性セラミダーゼが存在し, サイトカインや成長因子によってその活性が調節されていることが報告されていたが, これらの酵素の精製や遺伝子クローニングは行われていなかった。

我々が発見した緑膿菌由来の中性セラミダーゼは微生物や植物を含めて哺乳類以外では初めて見いだされたセラミダーゼである。そこで, 緑膿菌セラミダーゼのアミノ酸配列を明らかにするために, 緑膿菌の培養上清からセラミダーゼの精製を行った¹⁾。精製したセラミダーゼを用いた実験から, 本酵素は活性の発現にカルシウムイオンなどの二価金属イオンを必要とすることや, 単一の酵素がセラミドの加水分解のみならずスフィンゴシンと脂肪酸からセラミドを生成する縮合反応も触媒することを明らかにした。さらに精製酵素の部分アミノ酸配列を決定して, 緑膿菌ゲノムからセラミダーゼをコードする DNA 断片を取得したところ, 緑膿菌セラミダーゼは 670 アミノ酸残基から構成され, N 末端に典型的なシグナルペプチド (24 残基) を持つことが分かった⁶⁾。また, 得られたアミノ酸配列から計算される成熟タンパク質の分子量は 70,767 で, これは精製酵素から推定した分子量 70 kDa と良く一致していた。

次に, 緑膿菌セラミダーゼのアミノ酸配列を用いてホモロジーサーチを行ったところ, 既にクローン化されていたヒト酸性セラミダーゼとは全く相同性を示さず, 結核菌, 細胞性粘菌, シロイヌナズナに機能未知であるが相同性の高いタンパク質を見いだした。そこで先ず, 結核菌のコスミドを入手し, PCR により相同遺伝子をクローン化し, 大腸菌を用いて発現させたところ, セラミダーゼの活性が確認され, 結核菌にもセラミダーゼが存在することが明らかになった⁶⁾。大腸菌で発現させた酵素を用いた実験から, 結核菌セラミダーゼの最適 pH は緑膿菌セラミダーゼと同じく 8.5 であるが, 緑膿菌セラミダーゼと異なりカルシウム等の二価金属イオンを活性の発現に必要としなかった。興味深いことに, 結核菌のセラミダーゼは緑膿菌と異なりシグナルペプチドを欠いており, 宿主から取り込んだセラミドを炭素源の一つとして利用するために機能していると推察される。結核菌は肺を主な病巣とし, 宿主の脂質を栄養源の一つとして利用することが知られているが, このことは今回のセラミダーゼのように結核菌ゲノムの中に脂質の代謝に関わる酵素の遺伝子が他の細菌と比較してたくさん見いだされたことと符合する。

3. 中性セラミダーゼファミリーの発見

緑膿菌セラミダーゼの精製と平行して我々はマウスやラットの中性セラミダーゼの精製を進めていたが, 最終的にマウス肝臓から可溶型, ラット腎臓から膜結合型の中性セラミダーゼを精製し, それらの cDNA クローニングにも成功した⁷⁻⁹⁾。驚いたことに, これらセラミダーゼの推定アミノ酸配列はリソソームの酸性セラミダーゼとは全く相同性がなく, 緑膿菌セラミダーゼと高い相同性を示した。つまり, 中性セラミダーゼの遺伝情報は細菌から哺乳類に至るまで高度に保存されていることが明らかになった。また, その後の研究で, 無脊椎動物や細菌の中性セラミダーゼと比較すると脊椎動物の中性セラミダーゼは N 末端のシグナルペプチド配列の後にセリン, トレオニンに富んだ配列があり, この部分にムチン型の糖鎖が付加することで, 主として II 型の膜タンパク質として細胞表面に局在することが分かった¹⁰⁾。我々は動物細胞やゼブラフィッシュを用いた実験から脊椎動物由来の中性セラミダーゼは形質膜や細胞外でスフィンゴシン-1 リン酸の生成に関わっていることを指摘しているが¹¹⁻¹³⁾, ノックアウトマウスの解析から小腸においては食事由来のセラミドの消化吸収にも関与していることが示唆されている^{14, 15)}。

4. 細菌セラミダーゼの生理機能

2000 年になって緑膿菌の全ゲノム配列が明らかにされた。セラミダーゼの緑膿菌ゲノムにおける位置を調べたところ, スフィンゴミエリナーゼ活性を持つ溶血性ホスホリパーゼ C (PlcH) と隣接することが判明した。PlcH は溶血活性を持つことから, 緑膿菌の病原因子の一つとして知られている。我々はセラミダーゼを精製する過程で, スフィンゴミエリンを含む培地で緑膿菌を培養した時にセラミダーゼとスフィンゴミエリナーゼの活性が同時に発現誘導されることを突き止めており, このゲノム構造と合わせて考えるとこれら二つの酵素は生理的・病理的にも関係があるのではないかと考えた。そこで, 緑膿菌を各種生体膜脂質を含む培地で培養し, 培養上清中のセラミダーゼ活性, スフィンゴミエリナーゼ活性, 及びヒツジ赤血球に対する溶血活性を調べた。その結果, セラミダーゼの活性はスフィンゴミエリン, セラミド, スフィンゴシン及び, ホスファチジルコリンを加えた時に顕著に誘導された。また, RT-PCR により, セラミダーゼの発現誘導は mRNA の転写レベルで起こっていることも判明した。一方, スフィンゴミエリナーゼの活性はスフィンゴミエリンやホス

ファチジルコリンによって誘導された。ヒツジ赤血球に対する溶血活性もこれらの脂質添加時にスフィンゴミエリナーゼ活性の上昇と比例して増大したが、セラミダーゼの活性とも相関関係があるように思えた。そこで、スフィンゴミエリナーゼが引き起こす溶血活性にセラミダーゼがどのような影響を与えているかを調べた。*Bacillus cereus* 由来のスフィンゴミエリナーゼで処理したヒツジ赤血球に対してセラミダーゼを作用させたところ、顕著な溶血の増強が観察された。また、反応後のヒツジ赤血球の脂質分析によって、スフィンゴミエリナーゼの作用で生じたセラミドがセラミダーゼによってスフィンゴシンに変換されていることが分かった。これらの実験結果は、赤血球膜のスフィンゴミエリンが分解されてセラミドになると溶血が起こるが、さらにセラミドが分解されてスフィンゴシンと脂肪酸になると溶血が顕著に増大することを示している¹⁶⁾。この現象はヒツジ赤血球のみならずヒト赤血球を用いても観察された。

次に、スフィンゴミエリナーゼやホスホリパーゼ A₂ が引き起こす溶血反応は血清アルブミンによって増強されることを踏まえて、スフィンゴミエリナーゼとセラミダーゼが引き起こす溶血に及ぼす血清アルブミンの影響を調べた。その結果、添加した血清アルブミンの濃度依存的にスフィンゴミエリナーゼ依存性の溶血が増強されたが、セラミダーゼが同時に存在するとその溶血反応がさらに促進された。溶血後の赤血球を遠心分離して上清に存在するスフィンゴシン量を定量すると、添加した血清アルブミン量に比例して上清のスフィンゴシン量が増加していることが分かった。つまり、血清アルブミンはセラミダーゼの作用で生じたスフィンゴシンを形質膜から引き抜く働きをしているものと考えられた (図 1)。このようにセラミダーゼの作用によって赤血球の形質膜は物理的にさらに脆弱化し、溶血が増強されることが示唆された¹⁷⁾。

5. 細菌セラミダーゼの高次構造と触媒機構

緑膿菌セラミダーゼを含めてこれまでに中性セラミダーゼの高次構造は明らかになっていない。我々はセラミダーゼによるセラミド分解のメカニズムを解明するために、緑膿菌セラミダーゼの大量発現と X 線結晶構造解析を行った。その結果、図 2A に示すように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¹⁸⁾。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 (図 2B, C)。また、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ることを見いだした。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類に至るまで高度に保存されていることが証明された。

6. お わ り に

セラミダーゼには最適 pH を酸性、中性、アルカリ性に持つ三種類のアイソフォームが存在する。これら三種のセラミダーゼの一次構造には相同性がなく、異なる祖先遺伝子から進化したものと考えられる。酸性セラミダーゼはリソソームでセラミドの代謝に関わっており、ノックアウトマウスは胎生致死となる¹⁹⁾。アルカリ性セラミダーゼは小胞体に存在し、細胞内のセラミド代謝に関わっていると考えられているが、その役割はよく分かっていない。酸性セラミダーゼとアルカリ性セラミダーゼはいずれも真核生物において同定されているが、現時点では細菌ゲノムの中に高い相同性を示す遺伝子は見つかっていない。今回我々が発見した中性セラミダーゼの遺伝情報は細菌から哺乳類に至るまで保存されており、スフィンゴ脂質を持たない細菌では外毒素として、真核生物では形質膜と細胞外においてセラミドの代謝に関わっていると考えられる。

近年、細菌ゲノムが次々に解読されて、緑膿菌セラミダーゼやスフィンゴミエリナーゼのオルソログが病原細菌ゲノムの中に見つかってきている。今回の研究でスフィンゴミエリナーゼの作用によって生じた形質膜のセラミドがセラミダーゼによりスフィンゴシンに変換されることで細胞膜に強いダメージが与えられ、赤血球の場合には溶血が

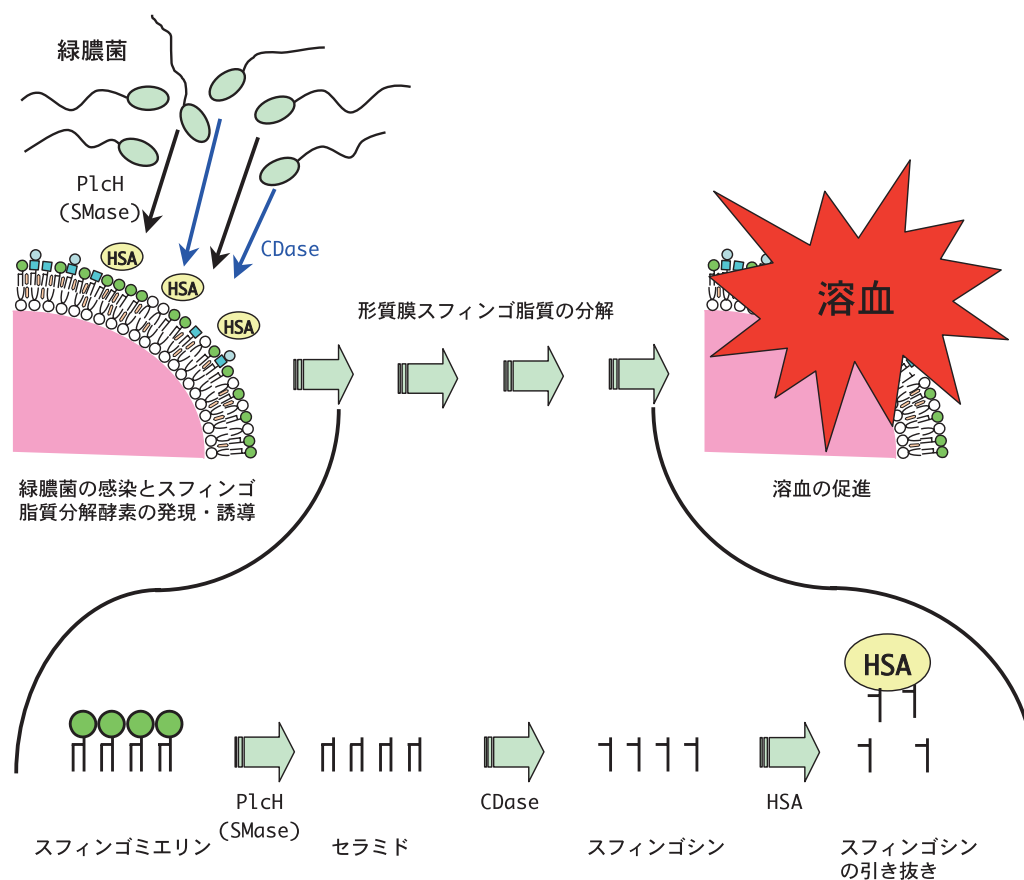


図1 緑膿菌セラミダーゼはスフィンゴミエリナーゼ依存性の溶血を促進する

これまでの研究では緑膿菌が分泌するスフィンゴミエリナーゼ (PlcH/SMase) により形質膜のスフィンゴミエリンとホスファチジルコリンが分解され、膜の構造が脆弱化することで溶血が引き起こされたと考えられていた。しかし、今回の研究で、緑膿菌が感染するとスフィンゴミエリナーゼと共にセラミダーゼ (CDase) が分泌されるので、形質膜のスフィンゴミエリンはスフィンゴシンにまで分解され、さらにスフィンゴシンが血清アルブミン (HSA) によって引き抜かれることで溶血が促進されることが明らかになった。

増強されることを指摘した。一方、緑膿菌が感染すると感染部位の細胞膜が損傷を受けると共に、生じたスフィンゴシンやスフィンゴシンが宿主細胞内でリン酸化されて生じるスフィンゴシン-1 リン酸が宿主細胞のシグナル伝達を攪乱することも十分に考えられる。これらのことを考え合わせると病原細菌のスフィンゴ脂質分解酵素はその病原性に深く関わっていることが強く推測される。

謝辞

本稿で紹介した緑膿菌セラミダーゼのX線結晶構造解析は大阪大学大学院工学研究科の井上豪教授、九州大学大学院農学研究院の角田佳充准教授との共同研究によって、またホモロジーモデリングは理化学研究所免疫アレルギー

センターの土方敦司研究員との共同研究によってなされたものである。この場を借りて深謝する。

- 1) Okino, N., Tani, M., Imayama, S., & Ito, M. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 14368–14373.
- 2) Gatt, S. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 3131–3133.
- 3) Sugita, M., Dulaney, J.T., & Moser, H.W. (1972) *Science*, **178**, 1100–1102.
- 4) Bernardo, K., Hurwitz, R., Zenk, T., Desnick, R.J., Ferlinz, K., Schuchman, E.H., & Sandhoff, K. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 11098–11102.
- 5) Koch, J., Gartner, S., Li, C.M., Quintern, L.E., Bernardo, K., Levran, O., Schnabel, D., Desnick, R.J., Schuchman, E.H., & Sandhoff, K. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 33110–33115.
- 6) Okino, N., Ichinose, S., Omori, A., Imayama, S., Nakamura, T., & Ito, M. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 36616–36622.

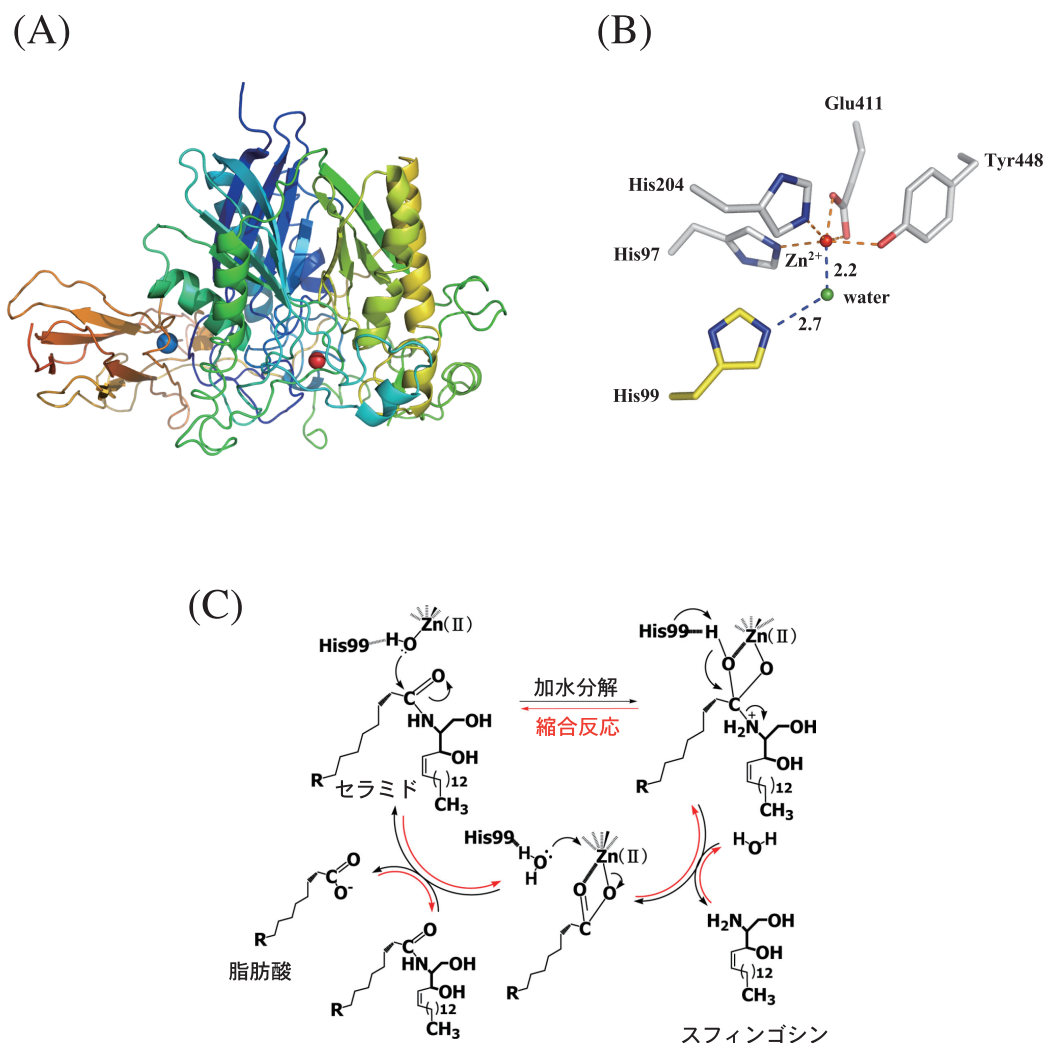


図2 緑膿菌セラミダーゼの結晶構造(A)、活性中心の構造(B)及び推定反応機構(C)

(A). 緑膿菌セラミダーゼはN末端側の新規なドメイン(約500残基)とC末端側のイムノグロブリン様ドメイン(約150残基)から構成されている。また、結晶中に二つの二価の金属イオン Zn^{2+} (赤色)と Mg^{2+} (青色)が観察された。 Zn^{2+} は触媒反応に直接関与し、 Mg^{2+} は酵素の安定化に寄与している。 Mg^{2+} は Ca^{2+} に置換され得る。

(B). N末端側ドメインに見いだした亜鉛イオン(赤色)周辺のアミノ酸の配置はカルボキシペプチダーゼに代表される亜鉛酵素と類似していた。また、亜鉛イオンに配位する水分子(緑色)を見いだした。点線は水素結合を示している。

(C). 緑膿菌セラミダーゼは亜鉛に配位した水が活性化され、セラミドのカルボニル基を求核攻撃することで酸アミド結合を加水分解すると推定される。図中の黒矢印は加水分解反応を示し、赤矢印は逆反応(縮合反応)を示している。図は文献18を改変して引用した。

- 7) Tani, M., Okino, N., Mitsutake, S., Tanigawa, T., Izu, H., & Ito, M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 3462–3468.
- 8) Tani, M., Okino, N., Mori, K., Tanigawa, T., Izu, H., & Ito, M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 11229–11234.
- 9) Mitsutake, S., Tani, M., Okino, N., Mori, K., Ichinose, S., Omori, A., Iida, H., Nakamura, T., & Ito, M. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 26249–26259.
- 10) Tani, M., Iida, H., & Ito, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 10523–10530.
- 11) Yoshimura, Y., Tani, M., Okino, N., Iida, H., & Ito, M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 44012–44022.
- 12) Tani, M., Igarashi, Y., & Ito, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 36592–36600.
- 13) Ito, M., Tani, M., & Yoshimura, Y. (2006) in *Sphingolipid Biology* (Hirabayashi, Y., Igarashi, Y., & Merrill, A.H. Jr. Eds.), pp. 183–196, Springer-Verlag, Tokyo.
- 14) Kono, M., Dreier, J.L., Ellis, J.M., Allende, M.L., Kalkofen, D. N., Sanders, K.M., Bielawski, J., Bielawska, A., Hannun, Y.A., & Proia, R.L. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 7324–7331.
- 15) Ohlsson, L., Palmberg, C., Duan, R.D., Olsson, M., Bergman, T., & Nilsson, A. (2007) *Biochimie*, **89**, 950–960.
- 16) 沖野 望 (2006) バイオサイエンスとインダストリー, **64**, 27–28.
- 17) Okino, N. & Ito, M. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 6021–6030.
- 18) Inoue, T., Okino, N., Kakuta, Y., Hijikata, A., Okano, H., Goda, H.M., Tani, M., Sueyoshi, N., Kambayashi, K., Matsu-mura, H., Kai, Y., & Ito, M. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 9566–9577.
- 19) Li, C.M., Park, J.H., Simonaro, C.M., He, X., Gordon, R.E., Friedman, A.H., Ehleiter, D., Paris, F., Manova, K., Hepbaldik-ler, S., Fuks, Z., Sandhoff, K., Kolesnick, R., & Schuchman, E. H. (2002) *Genomics*, **79**, 218–224.

沖野 望, 伊東 信

(九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門)

Structure and functions of bacterial ceramidase
Nozomu Okino and Makoto Ito (Department of Bioscience
and Biotechnology, Graduate School of Bioresource and
Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, 6-10-1
Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan)