

スフィンゴシンに特異的な転写制御因子を介した 緑膿菌セラミダーゼの発現誘導機構とその生理的意義

沖野 望, 伊東 信

1. はじめに

スフィンゴ脂質は長鎖アミノアルコールであるスフィンゴシンを基本骨格に持つ一群の脂質であり、真核生物の膜脂質（スフィンゴ糖脂質やスフィンゴミエリンなど）もしくは、脂質セカンドメッセンジャー（セラミドやスフィンゴシン1-リン酸など）として細胞間接着や細胞内外の情報伝達などさまざまな生命現象に関わっている。スフィンゴ脂質は一部の細菌（スフィンゴモナス科に属する細菌など）を除いて原核生物にはほとんど存在しないが、宿主のスフィンゴ糖脂質がコレラ毒素や志賀毒素などの細菌外毒素の受容体になっている例や、病原細菌が分泌するスフィンゴミエリン分解酵素が病原因子として働くなど、細菌感染との関わりは深い。

セラミダーゼはセラミドを脂肪酸とスフィンゴシンに加水分解する酵素であり、一次構造と最適pHが異なる3種類のファミリー（酸性・中性・アルカリ性セラミダーゼと呼称）が存在する。その中で、中性セラミダーゼの遺伝情報は細菌からヒトに至るまで進化を超えて保存されており、さまざまな生物において重要かつ多様な機能を担っている¹⁾。我々は、脊椎動物の中性セラミダーゼがII型の膜タンパク質もしくは可溶性タンパク質として存在し、スフィンゴシン1-リン酸の生成に関与していることを明らかにしているが²⁾、遺伝子破壊マウスの解析から本酵素は主として小腸でセラミドの分解を担っていることも示されている³⁾。また、キイロショウジョウバエの中性セラミダーゼが網膜の光受容細胞の機能に関わっていること⁴⁾や、シ

ロイヌナズナの中性セラミダーゼが酸化ストレス応答に関わっていること⁵⁾も報告されている。一方、我々は緑膿菌に中性セラミダーゼを初めて見いだして以来、“スフィンゴ脂質を持たない緑膿菌がなぜセラミダーゼを分泌するのか”という疑問に答えるべく、その生理機能に関する研究を行っている。その過程で、緑膿菌セラミダーゼがスフィンゴ脂質によって発現誘導されること、菌体外に分泌されて溶血性ホスホリパーゼC (PlcH) が引き起こす溶血反応を増強することを明らかにした^{6,7)}。本稿では、スフィンゴ脂質による緑膿菌セラミダーゼの発現誘導機構の分子基盤とその生理学的な意義について概説する。

2. セラミダーゼ遺伝子の発現に関与する因子の探索

緑膿菌が分泌する中性セラミダーゼの遺伝子発現に関与する因子を探索するために、公開されている緑膿菌ゲノムの構造を解析した。その結果、緑膿菌セラミダーゼ遺伝子 (PA0845, *cerN*) は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遺伝子 (PA0844, *plcH*) とそのアクセサリータンパク質遺伝子 (PA0843, *plcR*) の上流に位置していたが、これら遺伝子とはオペロンを形成しておらず、セラミダーゼ遺伝子の発現は単独で制御されていることが推測された (図1)。そこで、緑膿菌セラミダーゼ遺伝子の発現を簡便に測定するために、緑膿菌セラミダーゼ遺伝子を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子に置換した緑膿菌の変異株 (AN17-BGT株) を樹立した (図1)。AN17-BGT株にスフィンゴ脂質を加えて培養すると、菌体内で β -ガラクトシダーゼが発現し、発色基質の添加により、高感度にセラミダーゼ遺伝子の発現を解析することができる。次に、AN17-BGT株にカナマイシン耐性を付与するトランスポゾンを導入することでAN17-BGT株のトランスポゾンライブラリーを作製し、スフィンゴ脂質により発現誘導される β -ガラクトシダーゼ活性の消失を指標にして、スクリーニングを実施した。約1700株のトランスポゾンライブラリーをスクリーニングした結果、1株の β -ガラクトシダーゼ活性の欠損株を見いだすことができた。本株のゲノムDNAに挿入されたトランスポゾンの挿入位置を決定したところ、トランスポゾンが機能未知の転写制御因子 (PA5324) の遺伝子に挿入されていることが明らかになった。

九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門 (〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1)

Molecular mechanism for *Pseudomonas* ceramidase expression through sphingosine-specific transcriptional regulator and its biological roles

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)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900178

© 2018 公益社団法人日本生化学会

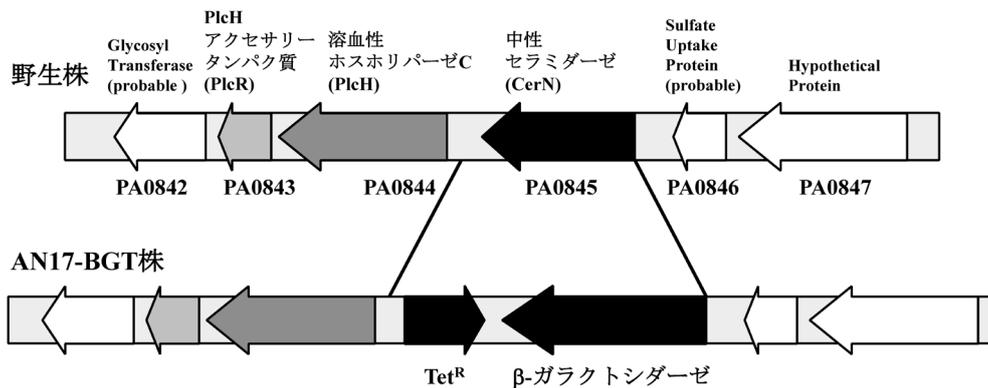


図1 緑膿菌中性セラミダーゼ遺伝子の周辺のゲノム構造
 緑膿菌中性セラミダーゼ遺伝子 (PA0845, *cerN*) は溶血性ホスホリパーゼC遺伝子 (PA0844, *plcH*) とPlcHのアクセサリータンパク質遺伝子 (PA0843, *plcR*) に隣接している。上段：野生株 (*P. aeruginosa* PAO1) のゲノム構造。下段：中性セラミダーゼ遺伝子を大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子に置換したAN17-BGT株のゲノム構造。Tet^R：テトラサイクリン耐性遺伝子。図は文献8を改変して引用した。

3. 緑膿菌セラミダーゼの発現におけるPA5324 (SphR)の機能

緑膿菌セラミダーゼの発現におけるPA5324の機能を明らかにするために、新たにPA5324の欠損株を作製した。まず、PA5324欠損株のセラミダーゼ生産能について検討したところ、緑膿菌の野生株では培養時にスフィンゴミエリンを添加するとセラミダーゼ活性の発現が顕著に誘導されたが、PA5324欠損株では同条件下でまったく発現誘導されなかった。また、緑膿菌の野生株をヒツジ赤血球と共培養すると、時間経過とともに溶血が引き起こされたが、PA5324欠損株では溶血反応が顕著に抑制された。以上の結果は、PA5324がスフィンゴミエリン (スフィンゴ脂質) によるセラミダーゼ発現と緑膿菌が引き起こす溶血反応の増強に関与していることを強く示唆している。次に、AN17-BGT株を用いて、セラミダーゼの遺伝子発現に関与するスフィンゴ脂質の特異性を解析したところ、スフィンゴミエリン、セラミドやパルミチン酸には誘導活性がみられず、スフィンゴシン (d18:1) にのみ強い誘導活性があることがわかった。また、その誘導活性にはヒト血清中と同程度の100nMのスフィンゴシンが存在すれば十分であった。以上の結果から、本転写制御因子をスフィンゴシン応答性転写制御因子 (sphingosine responsive regulator: SphR) と名づけた⁸⁾。

4. 緑膿菌セラミダーゼ遺伝子のプロモーター領域の解析とSphRの脂質に対する特異性

緑膿菌セラミダーゼ遺伝子のプロモーター解析を行うにあたり、転写開始点を5' RACE法により決定したところ、-80のAが転写開始点であることが明らかになった。

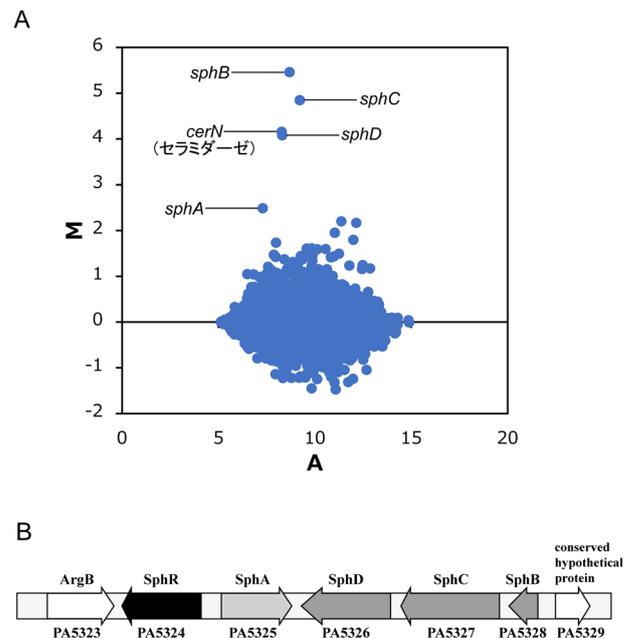


図2 スフィンゴミエリンによって発現誘導される遺伝子のDNAマイクロアレイ解析

(A) DNAマイクロアレイ解析。スフィンゴミエリンの存在下と非存在下で培養した緑膿菌 (野生株) からRNAを抽出し、緑膿菌のDNAマイクロアレイを用いて、スフィンゴミエリンの添加による遺伝子発現の変化を調べた。DNAマイクロアレイ解析から得られたシグナル値をlog₂変換し、発現量の変化をMAプロットにより表示した。また、スフィンゴミエリンの添加により、発現量が6倍以上に増加した5種類の遺伝子の名称を表示した。(B) *sphR* 遺伝子の周辺のゲノム構造。*sphR* (PA5324) はセラミダーゼ遺伝子以外にも隣接する *sphA* (PA5325) と *sphB*~*D* (PA5328~PA5326) の遺伝子発現を調節している。ArgB: acetylglutamate kinase。

そこで、セラミダーゼ遺伝子の5'非翻訳領域を β -ガラクトシダーゼ遺伝子に連結させたレポーターシステムを使用して、プロモーター領域の絞り込みを行った。その結果、セラミダーゼ遺伝子上流領域(-200~-100)にSphRの結合部位が存在することがわかった。続いて、この領域のオリゴヌクレオチドを用いたゲルシフトアッセイによりSphRの脂質に対する特異性を詳細に検討した。その結果、SphRはD-erythro-スフィンゴシン(d18:1)、ジヒドロスフィンゴシン(d18:0)、フィトスフィンゴシン(t18:0)には強く結合するが、L-threo-スフィンゴシンに対する結合力は弱く、セラミド、1-デオキシスフィンゴシンやスフィンゴシン1-リン酸には結合しないことが明らかになった。これらの結果は、SphRが長鎖塩基の構造を厳密に認識していることを示している。

5. スフィンゴ脂質によって発現誘導される遺伝子の解析

スフィンゴ脂質によって発現誘導される緑膿菌の遺伝子はセラミダーゼ以外にも存在すると考えられる。そこ

で、スフィンゴ脂質によって発現誘導される遺伝子を網羅的に探索するために、スフィンゴミエリンの存在下と非存在下で培養した緑膿菌からRNAを抽出し、緑膿菌のDNAマイクロアレイ解析を実施した。その結果、27種類の遺伝子の発現がスフィンゴミエリンの添加によって2倍以上($P < 0.01$)に上昇し、その中でも5種類の遺伝子の発現は6倍以上に上昇した(図2A)。これら5種類の遺伝子の中で、セラミダーゼ遺伝子(*cerN*, PA0845)を除く4種類の遺伝子(*sphA*~*D*, PA5325~PA5328)は緑膿菌ゲノムで*sphR*(PA5324)に隣接する遺伝子であり、ゲノムの構造から*sphA*は単独で、*sphB*~*D*はオペロンを形成して遺伝子発現が調節されていることが示唆された(図2B)。また、SphAは膜に存在するトランスポーターと推定され、SphB, C, Dはそれぞれ、cytochrome *c* oxidase, D-arabinono-1,4-lactone oxidase, alanine racemaseとホモロジーを有しており、スフィンゴシンの輸送や代謝に関わることが推測された。さらに、スフィンゴミエリンの存在下と非存在下で培養した野生株とSphR欠損株のDNAマイクロアレイ解析を行ったところ、SphR欠損株ではセラミダーゼ

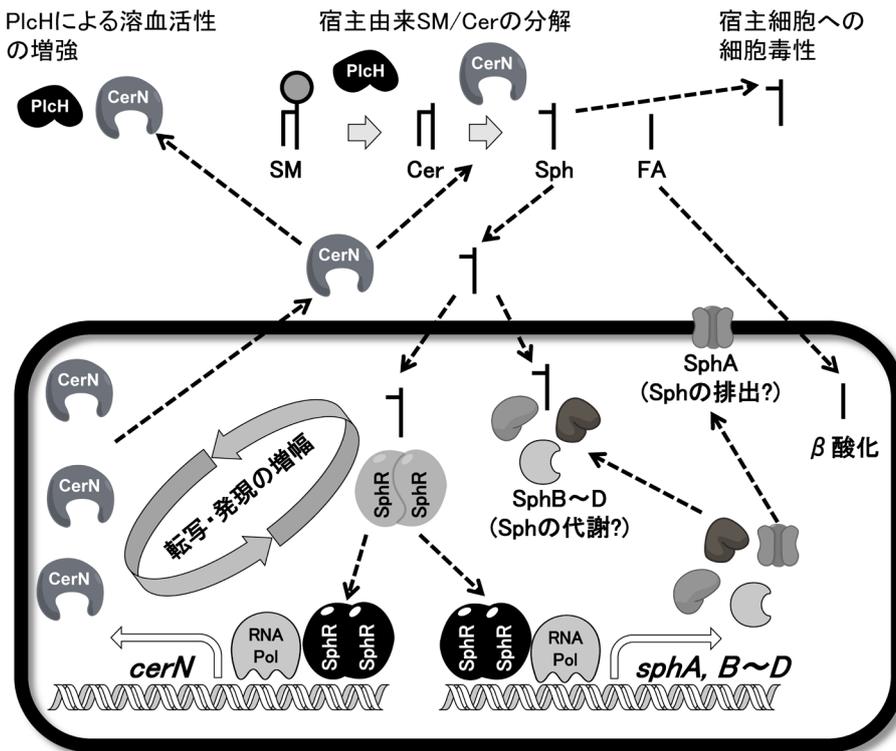


図3 SphRを介した遺伝子発現誘導機構とその生理的意義

緑膿菌が感染すると宿主由来のスフィンゴシンが菌体内に取り込まれる。スフィンゴシンがSphRに結合するとSphRを活性化し、中性セラミダーゼ遺伝子(*cerN*)と*sphA*~*D*の遺伝子発現を誘導する。その結果、緑膿菌はセラミダーゼを分泌して細胞毒性を発揮するとともに、生成したスフィンゴシンはSphRのシグナルを増強する。また、緑膿菌はSphA~Dの働きにより、スフィンゴシンに対する耐性を獲得する。Cer:セラミド, CerN:中性セラミダーゼ, FA:脂肪酸, PlcH:溶血性ホスホリパーゼC, RNA Pol:RNAポリメラーゼ, SM:スフィンゴミエリン, Sph:スフィンゴシン。図は文献8を改変して引用した。

遺伝子を含むこれら5種類の遺伝子の発現が特異的に抑制されていた。以上の結果は、SphRがセラミダーゼ遺伝子と *sphA*~*D* の遺伝子発現を調節する特異的な転写制御因子であることを示している。

6. SphR を介した遺伝子発現機構とその生理的意義

今回の研究によって得られた結果から、緑膿菌には宿主を含む環境由来のスフィンゴシンが引き金となる遺伝子発現系が存在することが明らかになった。我々は、スフィンゴシンによる緑膿菌セラミダーゼの発現誘導機構とその生理的意義を図3のように推測している。すなわち、緑膿菌は感染後に宿主由来のスフィンゴシンに反応してSphRを活性化させ、セラミダーゼ遺伝子と *sphA*~*D* の発現を誘導する。菌体外に分泌されたセラミダーゼは宿主セラミドを分解し、生じたスフィンゴシンはSphRの活性化を増強することで、さらにセラミダーゼの発現を促進する。このように緑膿菌セラミダーゼの発現は分解産物であるスフィンゴシンによって増幅され、緑膿菌PlcHの細胞毒性（溶血活性）を増強する。スフィンゴシン自身にも細胞毒性が知られているので、セラミダーゼによって生成したスフィンゴシンも緑膿菌の毒性を増強する。しかし、スフィンゴシンは宿主のみならず、緑膿菌にも毒性を示すので、緑膿菌はスフィンゴシンの作用から逃れる必要がある。SphRの欠損により緑膿菌のスフィンゴシン耐性が減弱することが報告されているので⁹⁾、SphRによって発現誘導されるSphA~Dはスフィンゴシンの排出や代謝に関わっている可能性が高い。一方、セラミドの分解によって生じた脂肪酸は栄養素として緑膿菌に取り込まれ、 β 酸化を経由してATPの生産に利用される。

7. おわりに

スフィンゴシンに抗菌活性あることは以前から報告されていたが、そのメカニズムはよくわかっていない^{10,11)}。我々はアトピー性皮膚炎患者の表皮からセラミダーゼ生産菌として緑膿菌を単離したが、アトピー性皮膚炎になると表皮のセラミドとともにスフィンゴシンが減少することが報告されている¹²⁾。また最近では、緑膿菌感染症が頻繁に起こる嚢胞性線維症患者の肺や気管において、酸性セラミダーゼ活性の低下によりスフィンゴシンの濃度が低下しており、このことが原因で緑膿菌に感染しやすくなることが示唆されている¹³⁾。これらの報告は、スフィンゴシンが皮膚や肺において細菌の増殖を抑制することで、生体防御の一部を担っていることを示唆している。

スフィンゴ脂質は真核生物に普遍的に存在しており、真核生物の細胞内で生じたスフィンゴシンはリン酸化されてスフィンゴシン1-リン酸になり、スフィンゴシン1-リン酸がスフィンゴシン1-リン酸リアーゼにより分解されて、最終的にはグリセロ型脂質へと変換される¹⁴⁾。原核生物の場合は、スフィンゴモノス科などの一部の細菌を除いてスフィンゴ脂質が存在しないことから¹⁵⁾、多くの細菌はスフィンゴシンを代謝（無毒化）することができないと考えられてきた。我々は、細菌がスフィンゴシン耐性を持つかどうかは、スフィンゴシンを代謝（無毒化）することができるかどうか依存していると考えている。緑膿菌に見いだしたSphRやSphA~Dのホモログは多数の細菌に見つかっており、これらタンパク質の存在と外来性スフィンゴシンに対する耐性の相関関係を調べることで、スフィンゴ脂質を生合成していない細菌におけるスフィンゴ脂質代謝機構の生理的意義を明らかにできると考えている。また、宿主側からみると、細菌感染における宿主スフィンゴシンの生体防御における役割が解明されることが期待できる。

文 献

- 1) Ito, M., Okino, N., & Tani, M. (2013) *Biochim. Biophys. Acta*, **1841**, 882–691.
- 2) Tani, M., Ito, M., & Igarashi, Y. (2007) *Cell. Signal.*, **19**, 229–237.
- 3) 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.
- 4) Acharya, J.K., Dasgupta, U., Rawat, S.S., Yuan, C., Sanxaridis, P.D., Yonamine, I., Karim, P., Nagashima, K., Brodsky, M.H., Tsunoda, S., & Acharya, U. (2008) *Neuron*, **57**, 69–79.
- 5) Li, J., Bi, F.C., Yin, J., Wu, J.X., Rong, C., Wu, J.L., & Yao, N. (2015) *Front. Plant Sci.*, **6**, 460.
- 6) Okino, N. & Ito, M. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 6021–6030.
- 7) 沖野 望, 伊東 信 (2009) 生化学, **81**, 911–916.
- 8) Okino, N. & Ito, M. (2016) *Sci. Rep.*, **6**, 38797.
- 9) LaBauve, A.E. & Wargo, M.J. (2014) *PLoS Pathog.*, **10**, e1003889.
- 10) Bibel, D.J., Aly, R., & Shinefield, H.R. (1992) *J. Invest. Dermatol.*, **98**, 269–273.
- 11) Fischer, C.L., Drake, D.R., Dawson, D.V., Blanchette, D.R., Brogden, K.A., & Wertz, P.W. (2012) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **56**, 1157–1161.
- 12) Arikawa, J., Ishibashi, M., Kawashima, M., Takagi, Y., Ichikawa, Y., & Imokawa, G. (2002) *J. Invest. Dermatol.*, **119**, 433–439.
- 13) Pewzner-Jung, Y., Tavakoli Tabazavareh, S., Grassme, H., Becker, K.A., Japtok, L., Steinmann, J., Joseph, T., Lang, S., Tuemmler, B., Schuchman, E.H., Lentsch, A.B., Kleuser, B., Edwards, M.J., Futerman, A.H., & Gulbins, E. (2014) *EMBO Mol. Med.*, **6**, 1205–1214.
- 14) Kihara, A. (2014) *Biochim. Biophys. Acta*, **1841**, 766–772.
- 15) Olsen, I. & Jantzen, E. (2001) *Anaerobe*, **7**, 103–112.

著者寸描

●沖野 望 (おきの のぞむ)

九州大学大学院農学研究院准教授、博士(農学)。



■略歴 1970年広島県に生る。93年九州大学理学部卒業。95年同大学院理学研究科修士課程修了。98年同大学院農学研究科博士後期課程退学。2001年米国マウントサイナイ医科大学人類遺伝学部門。03年より現職。

■研究テーマ 脂質・糖質代謝に関与する新規分子の探索と機能解析。

■抱負 オリジナリティーのある研究を続けることで、脂質や糖質が関わる生命現象を分子レベルで明らかにしたい。

■ウェブサイト <http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/kaishika/index.html>

■趣味 広島東洋カープの応援。