



## 新規脂質代謝酵素および制御因子に関する生物横断的研究

九州大学大学院農学研究院 石橋 洋平

## はじめに

脂質は栄養素としての機能に加えて、生体膜の主要な構成成分やシグナル伝達・生理活性物質として、重要かつ多彩な役割を担う生体分子である。その構造により、脂質は脂肪酸、スフィンゴ脂質、グリセロ脂質、ステロールなどに大別され、さらに親水性頭部として糖鎖やリン酸基が付与されることで糖脂質やリン脂質となる。構成要素の組み合わせにより、膨大な数の分子種が存在するが、脂質構造の多様性がもたらす生命機能に関しては不明な点が多い。私は脂質の多様性を生み出す分子基盤として、脂質代謝酵素の機能に興味をもち、これまで研究を行ってきた。生物種によっても脂質組成は大きく異なる。様々な生物を対象とすることで、それぞれの生物に特有の新規脂質代謝酵素や新しい制御メカニズムを発見することができた。本講演では、得られた成果の概要を説明する。

## 1. 放線菌に由来する新規糖脂質分解酵素について

スフィンゴ糖脂質は糖鎖とセラミドからなる両親水性分子であり、細胞内外における情報伝達や細胞間相互作用など、様々な生命現象に関与する重要な生体膜分子である。Endoglycoceramidase (EGCase) はスフィンゴ糖脂質に作用し、糖鎖-セラミド間のβ-グリコシド結合を特異的に加水分解する酵素である。放線菌より見いだされたEGCaseは基質特異性の違いによりEGCase I, IIおよびIIIの3種に分別できる。私はこの内、EGCase IとIIIをコードする新規遺伝子を同定し、大腸菌や放線菌を用いた大量合成・精製系を確立した。EGCase Iは効率よく種々のスフィンゴ糖脂質から糖鎖を切り離せるため、質量分析計と組み合わせることによって細胞の糖脂質プロファイル化に威力を発揮し、多能性幹細胞やエクソソームの糖脂質組成の解明とその機能評価などに応用されている。現在では、有益な糖鎖解析ツールとして市販、活用されている。EGCase I及びIIは、β-グルコースを介して糖鎖とセラミドが結合した糖脂質に作用するが、EGCase IIIはβ-グルコースではなくβ-ガラクトースが結合した糖脂質のみを基質とする、世界で唯一の特異性を有する。本酵素(後にEndogalactosylceramidase, EGALCに改名)の機能解析を行う中で、糖鎖をアルカノール等の水酸基に転移させる糖転移反応を効率良く触媒することを見出した。さらに、EGALCの糖転移反応と蛍光標識アルカノールを用いて、β-ガラクトシド糖脂質の簡便・高感度な検出法を開発し、このような構造を持つ糖脂質が生物界に広く分布することを示すとともに、フィトールを分子内部に含む、新奇な糖脂質を発見した。このフィトール糖脂質は動物や陸上植物には存在せず、海洋に生育する光合成植物(海藻)にのみ存在し、進化的な興味のみならず、海洋環境で植物が生存するための機能に関与する可能性があり、その合成機構に興味を持たれる。

## 2. 真菌の糖脂質代謝に関与する新規酵素とその機能

EGCase IやEGALCの塩基配列が分かったことで、生物間におけるEGCaseの分布についてより詳細に調べることが可能となった。その結果、病原性真菌類を含む多くの真菌類からEGCaseに相同性を示す機能未知の遺伝子EGCase-related protein (EGCrP)を見出した。EGCrPの機能を追究した結果、EGCrPには2つの分子種EGCrP1とEGCrP2が存在し、EGCaseとは全く異なる性質を有する酵素であることが分かった。真菌類は糖脂質として、グルコースとセラミドから構成されるグルコシルセラミド(GlcCer)や、グルコースがステロールの3位に結合したステリルグルコシド(SG)を合成する。真菌類においてこれらの合成酵素は同定されていたが、分解に関与する酵素は未同定のため、真菌類における糖脂質の代謝機構の全貌は不明であった。我々はEGCrP1がGlcCerの分解酵素であり、EGCrP2がSGの分解酵素であることを突き止めた。つまり、EGCrPsは、真菌類糖脂質代謝機構のミッシングリンクの本体であり、偶然にもその分子実体が解明されたことで真菌類の糖脂質代謝機構の全貌が解明できた。クリプトコッカスは酵母様の病原性真菌で、AIDS、末期がん患者等の免疫不全患者を中心に世界では年間約22万人が本菌の感染で死亡している。クリプトコッカス症に対する有効な治療薬の開発が強く望まれている。感染実験の結果、EGCrP1およびEGCrP2欠損クリプトコッカスは病原性が顕著に低下することが明らかになった。両糖脂質分解酵素はクリプトコッカス症治療薬の有効な標的と考えられる。現在、阻害剤の開発など鋭意に研究を進めている。EGCrP1欠損クリプトコッカスは基質であるGlcCerが蓄積するが、その組成を詳細に解析した結果、興味深いことに特定のセラミド構造をもつGlcCerが顕著に蓄積することが明らかとなった。哺乳類では水酸基が2つ、2重結合が1つのスフィンゴシ

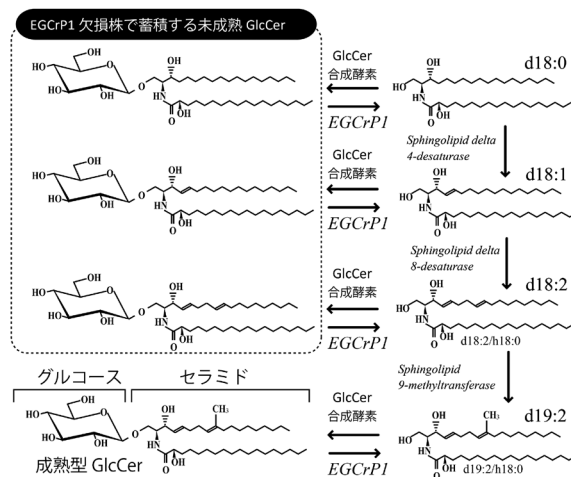


図1. EGCrP1によるGlcCerの品質管理機構

ン(d18:1)が主要なスフィンゴイド塩基である(図1)。一方、真菌類では2重結合が2つ、9位にメチル分岐のあるd19:2を合成することが知られている(図1)。このd19:2を合成する為には、d18:1が $\Delta$ 8不飽和化を受けd18:2になり、さらにメチル基が付与される必要がある(図1)。野生型のクリプトコッカスでは、d19:2を持つGlcCerが主要な分子種であるが、EGCrP1欠損株ではd19:2まで代謝されていない、d18:1やd18:2といった、いわば未成熟なセラミドをもつGlcCerが蓄積していた(図1)。つまり、EGCrP1はGlcCerの分子種を制御するための、いわば品質管理を担うユニークな酵素であることが明らかとなったのである。この品質管理機構はクリプトコッカスの病原性に関与する莢膜形成に関与しており、生理的にも重要だと考えられる。

### 3. 哺乳類における糖脂質合成の新規制御因子と阻害剤

GlcCerは真菌類のみならず、植物や哺乳類にも普遍的に存在する重要な糖脂質である。一方、ヒトにおいてGlcCerの過剰蓄積はゴーシェ病の主要因であり、他にもパーキンソン病など様々な疾患にGlcCer代謝が関与していることが報告されている。生体内でGlcCer代謝は厳密に制御されていると考えられるが、その制御機構の詳細は不明であった。そこで各種化合物、RNAiスクリーニングとリポドミクス解析を組み合わせて、細胞内のGlcCer合成量に影響を及ぼす因子を同定することを試みた。その結果、細胞内エネルギーセンサーとして知られるAMP活性化キナーゼ(AMPK)を見出した。AMPKはヘテロ3量体のセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞内のエネルギー環境に応じて活性が制御されることで知られている。AMPKを活性化する化合物によって細胞内のGlcCer量およびGlcCer合成活性が低下すること、AMPK阻害剤やRNAiによりGlcCer合成活性が回復することが分かった。その原因を追究した結果、AMPK活性化条件においてGlcCerの前駆物質である糖ヌクレオチドUDP-グルコースの量が顕著に低下することを見出した。また、UDP-グルコース分解酵素であるNudt14がAMPKによってリン酸化・活性化されることも分かった。本研究により、GlcCerおよび糖ヌクレオチドの合成制御機構の一端が解明できた。また、スクリーニングの過程でGlcCerの合成量を制御する新しい因子として、GlcCer合成の場であるゴルジ体に局在するホスホイノシチド、Phosphatidylinositol 4-phosphate [PtdIns(4)P]を見出した。ホスホイノシチドはシグナル伝達や小胞輸送において重要な役割を担うグリセロリン脂質であるが、それに加えてPtdIns(4)PがGlcCer合成を阻害することが明らかになった。その阻害機構の詳細を調べた結果、PtdIns(4)Pが存在すると、GlcCer合成酵素がUDP-グルコースを利用できなくなることが分かった。また、GlcCer合成酵素を阻害する新しい化合物として、元来Sirtuinの阻害剤として知られていたCambinolを見出した。GlcCer合成酵素の阻害剤は、GlcCerの過剰蓄積を原因とする病態の治療薬として利用される。本研究で見出したCambinolは既知のGlcCer合成酵素の阻害剤とは構造が全く異なるため、新しい阻害様式を有する新規阻害剤開発に繋がることが期待される。

### 4. ラビリンチュラ類から発見された新規脂質代謝酵素およびステロール代謝酵素

海洋に広く生息する原生物ラビリンチュラ類は、ユニーク

な脂質組成を持ち、DHA等の高度不飽和脂肪酸やステロール類を油滴と呼ばれる細胞内小器官に高度に蓄積する。この微生物は培養が容易でありながら増殖能力も高く、有用脂質やバイオ燃料の生産源として期待されている。ラビリンチュラ類とその近縁生物群との比較ゲノム解析を行った結果、ラビリンチュラ類に特有の機能未知遺伝子群を見出した。これらを詳細に解析した結果、従来のリパーゼとは配列上の相同性がない、新規Lipase/phospholipaseを発見した。この新規酵素は、トリアシルグリセロールに作用する場合は脂肪酸への位置特異性を示さないが、リン脂質に作用する場合はsn-1位の脂肪酸のみに特異的に作用する。このユニークな位置特異性は、環境中の中性脂質をランダムに分解して脂肪酸を遊離し栄養源として利用する際に有効であるばかりでなく、リン脂質に位置特異的に作用し抗菌作用のあるリゾリン脂質を生産する特性がある。つまり、この酵素のユニークな特異性は、環境下での栄養をめぐる異種間競争を有利に展開することに寄与していることが示唆された。

また、ラビリンチュラ類は、動物ステロール(コレステロール)、植物ステロール(ステイグマステロール等)、真菌ステロール(エルゴステロール)といった、多様なステロールを生合成することを明らかにし、それらの生成分岐点となる酵素遺伝子を単離・同定した。これらの分岐点酵素の特異的な破壊によって、コレステロールおよび植物ステロールを分別発酵生産する方法を開発した。さらに、従来の酵素とは全く異なる新規ステロールエステル化酵素を同定し、ステロール増産の道を切り開いた。

### おわりに

以上のように、様々な生物から脂質代謝に関連する新規酵素や制御因子を見つけることができた。自分の興味のおもむくまま対象生物を変えていったが、その過程で脂質研究の有用ツールや抗真菌薬の標的となるものが得られたことは望外の喜びである。近年、特に研究対象として注目しているラビリンチュラ類であるが、これまでに報告例のない全く新しい構造の脂質を複数見出しており、未知の脂質代謝酵素の宝庫であると考えている。今後も新たな脂質代謝酵素の探索と機能解析を行い、農芸化学分野の発展に寄与する研究に繋げていきたい。

**謝辞** 本研究は九州大学大学院生物資源環境科学府、理化学研究所 脳科学総合研究センター、そして九州大学大学院農学研究院にて実施されたものです。学生の頃から今に至るまで、熱意に溢れたご指導、ご鞭撻を賜り、研究者になるきっかけを与えて頂いた九州大学名誉教授の伊東 信先生、基礎科学特別研究員として自由に研究を行わせて頂き、今も折に触れて激励頂いている理化学研究所 開拓研究本部 平林 義雄先生、長年に渡り研究面における有益なご助言、ご支援を頂いております九州大学大学院農学研究院の沖野 望先生に心から御礼申し上げます。また、本研究は九州大学大学院薬学研究院 宮本 智文先生、宮崎大学農学部 林 雅弘先生、川崎医科大学 渡邊 昂先生、そして九州大学大学院 海洋資源化学分野の修了生との共同研究の成果であり、一緒に研究を行った全ての方々から感謝申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦下さいました日本農芸化学会西日本支部長・九州大学大学院農学研究院教授・酒井謙二先生に厚く御礼申し上げます。