最近の研究から

Bacillus cereus 由来スフィンゴミエリナーゼの X線結晶構造解析

独立行政法人理化学研究所 放射光科学総合研究センター
吾郷日出夫, 宮野雅司Hideo AGO and Masashi MIYANO: Structural Basis of the Phospholipase C Activity in Neutral Sphingomyelinase from *Bacillus cereus*.

Degradation of cell membrane and mucosa, of which phospholipids are major components, and production of lipid mediators are roles of phospholipases from pathogenic bacteria to grow, survive and spread in the host organism. The studies on the enzymes are important for the pathobiology of bacterial infectious disease. The crystal structure of Sphingomyelinase from *Bacillus cereus* revealed the structure basis of the phospholipase C and hemolysis activities in a divalent cation dependent manner. The water-bridged double divalent cations were concluded to be the catalytic architecture to the phospholipase C activity. In addition, the β -hairpin structure with aromatic amino acid residues was shown to be involved in the membrane binding of the enzyme as a part of the hemolysis activity.

1. はじめに

病原性細菌が生産する多様な種類のリン脂質分解酵素は、宿主生物への感染と定着、宿主生物の免疫機構からの回避と感染部位拡大へ関与するなど、病原性細菌の生存と繁殖に必要な蛋白質である。これはわれわれ宿主の側から見ると、その細菌のたちの悪さを決める要因の1つで、病原性の本質とすることができるかもしれない。例えばリステリア菌のリン脂質分解酵素は、宿主の免疫機構から免れるために免疫細胞の膜組織を壊すことに寄与するとされている。このような直接的な機能だけでなく、宿主生物の細胞の自然な生命活動の調子を狂わせてしまうような間接的な作用にもリン脂質分解酵素は関与している。例えば緑膿菌リン脂質分解酵素が作用して起こる肺炎では、炎症をより強くする働きのある蛋白質の生産が通常より増加している。リン脂質分解酵素が宿主生物の細胞膜を分解して作り出すリン脂質代謝物、例えばジアシルグリセロール、ホスファチジン酸、セラミドなどは、普段から細胞の働きの調節にかかわる小分子で、脂質性情報伝達物質と呼ばれている。^{2),3)} リン脂質分解酵素の細胞膜への直接的な影響や、その酵素活性によって生産される脂質性情報伝達物質の細胞への間接的な影響が、細菌の病原性の本質に深く関与していると考えられるので、病原性細菌が生産するリン脂質分解酵素の研究は、細菌感染症の理解と治療において重要な地位を占める。

この稿では、食中毒細菌であるセレウス菌 (*Bacillus*

cerus) が生産するスフィンゴミエリン特異的C型リン脂質分解酵素スフィンゴミエリナーゼ (SMase) のスフィンゴミエリン分解活性と細胞膜へ結合する際の分子機構について紹介する。

2. リン脂質

一般的なリン脂質は、グリセロールの3つの水酸基に、水溶液中で電荷をもつ極性基が1つと非極性基として脂肪酸が2つ結合した構造をもち、このグリセロールを骨格とするリン脂質をグリセロリン脂質と呼ぶ(図1)。グリセロールの3つの炭素の中の *sn*-3 位の炭素に結合する極性基の種類は多様性に富み、その違いによって名称が付けられている。例えば極性基にコリン、エタノールアミン、セリンを含むグリセロリン脂質はそれぞれ、フォスファチジルコリン、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルセリンと呼ばれる。グリセロールの *sn*-1 位と *sn*-2 位の位置に結合する脂肪酸の種類もグリセロリン脂質の種類に応じて決まっていて、ここで例に示した3つのグリセロリン脂質では、一般的には *sn*-1 位 (図中で R_1) には、炭素鎖中に二重結合をもたない飽和脂肪酸が結合し、*sn*-2 位 (図中で R_2) には二重結合をもつ不飽和脂肪酸が結合する。もちろんここで示さなかったグリセロリン脂質では、 R_1 に不飽和脂肪酸を結合している種類もある。

この稿で紹介する SMase が分解するスフィンゴミエリンは、極性基や非極性基が結合している骨格部分がスフィンゴシンでグリセロールではない。スフィンゴシンは1位

図1 リン脂質の分子構造。(Molecular architectures of phospholipids.) グリセロリン脂質の極性基部分の置換基Rが①はフォスファチジルコリン, ②はフォスファチジルセリン, ③はフォスファチジルエタノールアミンである。置換基Rに①をもつスフィンゴリン脂質をスフィンゴミエリンと呼ぶ。置換基R₁からR₃はそれぞれ脂肪酸に由来するアルキル鎖である。置換基を結合するグリセロール骨格とスフィンゴシン骨格部分を点線でそれぞれ囲って示す。リン脂質加水分解酵素のそれぞれの型が分解する結合をA1, A2, C, Dで示した。

と3位に水酸基, 2位にアミノ基をもつ長鎖アミノアルコールで, スフィンゴミエリンに含まれるスフィンゴシンは4位と5位の炭素の間がトランス型の二重結合になっている4E-スフィンゲニンである。スフィンゴミエリンでは, フォスフォコリンが極性基として一番端の1位炭素に結合している所は, グリセロリン脂質のフォスファチジルコリンと同じであるが, 2つの脂肪酸を結合しているグリセロリン脂質と異なり, スフィンゴミエリンに含まれる脂肪酸の数は1つだけである。脂肪酸はフォスファチジルコリンが結合している炭素の隣の2位炭素にあるアミノ基とアミド結合している。スフィンゴミエリンのように4E-スフィンゲニンを基本骨格とするリン脂質をスフィンゴリン脂質と呼んで, グリセロールを基本骨格とするグリセロリン脂質と区別している。

リン脂質は, 極性基と非極性基をもち両親媒性であるため, 水系にあると非極性部分を内側にしたミセルを形成したり, 2層構造をもつリン脂質二重膜を作る。この2層のリン脂質膜が細胞の内と外を区分ける細胞二重膜の主要な構成要素で, 病原性細菌の産するリン脂質分解酵素はこの細胞膜中のリン脂質を分解し, ささまざまな影響を細胞に与える。

3. セレウス菌由来スフィンゴミエリナーゼ

3.1 スフィンゴミエリン分解活性

本稿で扱うセレウス菌 (*Bacillus cereus*) 由来スフィンゴミエリナーゼ (*Bc-SMase*) は, 酵素としてはC型リン脂質分解酵素に分類される。一般的にリン脂質を分解する酵素蛋白質をリン脂質分解酵素フォスホリパーゼと呼び, リン脂質の中のどの部分を切断するのかによってA1, A2, B, C, D型の5種類に分類される (図1)。グリセロリン脂質から脂肪酸を遊離させる酵素がA型とB型で, *sn*-1位の脂肪酸とグリセロール骨格の間の結合を分解する酵素がA1型, *sn*-2位の脂肪酸の場合はA2型, 両方の場合をB型と言う。リン酸ジエステル結合をグリセロール側で切断する酵素がC型, リン原子を挟んで反対側で切断する酵素がD型である。*Bc-SMase* は, リン酸ジエステル結合をスフィンゲニン側, グリセロリン脂質で言えばグリセロール側で切断するので, C型リン脂質分解酵素になる。⁴⁾ スフィンゴミエリンのリン酸ジエステル結合をスフィンゲニン側で加水分解した産物はフォスフォコリンとセラミドで, 両方とも情報伝達物質として生体内で利用されている分子である。²⁾

3.2 溶血活性

Bc-SMase は溶血活性をもっていて, 赤血球に作用すると赤血球の細胞膜を壊し溶血を起こす。⁵⁾ *Bc-SMase* の赤血球に対する溶血作用の程度は, 赤血球のスフィンゴミエリン含量が多いほど顕著で, スフィンゴミエリン含量が全脂質の10%程度と低いイヌやウマの赤血球に比べ, 50%にもなるヒツジ赤血球に対する *Bc-SMase* の溶血活性はより顕著に表れる。また *Bc-SMase* による溶血はホット・コールド型⁶⁾ で, 37℃で作用させた後, 低温にすると溶血が促進される。溶血に至る分子機構は明らかではないが, 赤血球のスフィンゴミエリン含量にその効果が比例するので, *Bc-SMase* による赤血球細胞膜上のスフィンゴミエリンの認識と分解が赤血球の溶血の引き金になっていることは明らかである。

3.3 金属依存性

Bc-SMase がスフィンゴミエリン分解活性と溶血活性を発揮するためには, 2価金属イオンが共存する必要がある。さらに2価金属イオンの中にも強く活性化する種類とあまり影響を与えないイオンの2種類がある。⁷⁾

実際にスフィンゴミエリン加水分解活性を数種類の金属イオンに対して調べた結果を図2に示す。⁸⁾ 加水分解の飽和最大速度 V_{max} ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg enzyme}^{-1}$) は, Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} が共存すると大きな値 (Co^{2+} : 14.2, Mn^{2+} : 11.5, Mg^{2+} : 10.8) であるのに対し, Ca^{2+} と Sr^{2+} ではその10分の1以下である (Ca^{2+} : 1.0, Sr^{2+} : 0.2)。これは前者では加水分解活性の効率が後者に比べて圧倒的に高いことを示す。一方, *Bc-SMase* のスフィンゴミエリンに対する

ミカエリス定数 K_m (μM) は, $V_{\max}$ のように高い低いの極端な二分化が起こらず, Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+} のそれぞれで 14.2, 14.9, 16.1, 18.0, 19.1 と徐々に大きくなっていく. これはスフィンゴミエリンが緩やかに結合しにくくなっていくことを表している. これらのことから, 加水分解反応に注目すると Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} は高活性型のイオン, Ca^{2+} , Sr^{2+} は低活性型のイオンとなる.

溶血活性では, Mg^{2+} のようなスフィンゴミエリン分解活性を強く活性化する金属イオンのほかに, Ca^{2+} が共存する必要がある.⁹⁾ Mg^{2+} のようなスフィンゴミエリン分解活性を活性化する金属イオンだけでは, *Bc*-SMase は赤血球の細胞膜に移行できず, また Ca^{2+} だけでは細胞膜へ移行するが溶血は起こらない. *Bc*-SMase の金属イオン依存的な, さらにスフィンゴミエリン選択的な細胞膜への移行に

はどのような分子機構が働いているのだろうか.

4. *Bc*-SMase の全体構造

Bc-SMase のスフィンゴミエリン分解活性や溶血活性の金属イオン要求性の理由を調べるために, Mg^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} のそれぞれを結合した *Bc*-SMase の結晶構造を決定した (図 3).⁸⁾

Bc-SMase の分子中央では 2 枚の大きな β シートが相対し, そのうち SMase のアミノ末端とカルボキシル末端の両方がある β シート (β シート 1) は 7 本の β ストランドを含み, もう一方は 6 本の β ストランドを含む (β シート 2). また一対の β ストランドからなる β ヘアピンが分子の外側に向かって突出している. 中央の β シート 1 の外側上方に α ヘリックス 1, 2 と 5 が, また β シート 2 の外側上方に α ヘリックス 3 と 4 がある. α ヘリックスは中央の β シートの上方外側にせり出している, またさらに先ほどの β ヘアピンも分子から突出している, 相対する β シートの一端を底とする横に長い溝が分子の上側にある. 分子を上側から見ると, この溝は分子を横に長く横断しているだけでなく, β ヘアピンと α ヘリックス 1, 2 の間に向かって分岐している (図 3b). *Bc*-SMase と同じ C 型リン脂質分解活性をもつ SMase の結晶構造は, リステリア菌 (*Listeria ivanovii*) の構造が 2005 年に報告されている.¹⁰⁾ このリステリア菌由来 SMase (*Li*-SMase) の構造は, 金属イオンを含んでいないが *Bc*-SMase と重ね合わせたときの $\text{C}\alpha$ 原子位置の平均二乗差の値が $0.8 \text{ \AA}$ と小さく, 全体構造は種を超えてよく一致している.

Bc-SMase の全体構造は, ($\alpha + \beta$) クラスに含まれる DNaseI 様スーパーファミリー (DNaseI-like-superfamily) に分類される. このスーパーファミリーには DNA 鎖の分解や修復で働く蛋白質が含まれ, スーパーファミリーの

図 2 スフィンゴミエリン加水分解活性と金属イオン (文献 8) より). (Effects of divalent cations on sphingomyeline hydrolysis.) 2 価金属イオン依存的な K_m , $V_{\max}$ の変化をそれぞれ■と◆で示す. 各々の金属イオンのイオン半径を▲で示す.

図 3 *Bc*-SMase の結晶構造. (Crystal structure of *Bc*-SMase.) Co^{2+} イオン結合構造のリボン図 (a), 溶媒接触表面 (b), 二次構造図 (c). (b) 蛋白質表面の 3 つに分岐した溝を矢印で示す. (c) 黒丸に白抜きで A-C は結合した Co^{2+} イオン, 白抜きで W は Co^{2+} イオンの間で共有される水分子を表す. 黒丸に白抜き C の金属イオン結合部位に金属イオンが結合することで構造の柔軟性が変化すると考えられるループを鋳印 (▶) で示す.

名称にもなっている DNA 分解酵素 DNaseI がその一例である。¹¹⁾ DNaseI は、金属イオン依存的に DNA 鎖の中のリン酸ジエステル結合を加水分解する酵素活性をもち、切断する結合の種類が *Bc*-SMase と同じであること、アミノ酸配列が似ている点、また活性に役に立つ金属イオン結合構造ではないがすでにその結晶構造が決定されている点から、*Bc*-SMase の構造モデルとして扱われてきた蛋白質である。¹²⁾

5. 金属イオンの役割

5.1 2つの金属イオン結合部位

金属イオン結合部位は、分子を横断する溝の左端 (図 3b 中の (C)) と中央 (図 3b 中の (A) と (B)) の2カ所ある。金属イオン結合部位の水を含んだ配位構造は、左端の結合部位では金属イオンの種類に関係なくよく保存されていたのに対し、中央の金属イオン結合部位では高活性型の金属イオンと低活性型の金属イオンではまったく異なっていた。

左端の金属イオン結合部位に結合した Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} はいずれも 6 配位正 8 面体構造の配位構造で、配位子は Phe55 のカルボニル酸素、Asn57 の側鎖カルボニル酸素、Glu99 と Asp100 のカルボキシル酸素と 2 つの水分子であった (図 4)。この金属イオン結合部位を作るアミノ酸の中で、Asp100 は、変異体を用いた実験で、 Ca^{2+} 依存的な細胞膜への移行に関与するアミノ酸であると報告されている。¹³⁾ また *Bc*-SMase に比べ、金属イオンを含まない *Li*-SMase の β シート 4 からこの金属イオン結合部位までの蛋白質の最も外側に位置するループ構造は、構造の揺らぎが大きくモデルに含まれていない (図 3c)。 β シート 4 に続くループ構造は金属イオンの有る無しによって構造の固さに変化するように見える。これらのことを総合すると、この金属イオン結合部位が、 Ca^{2+} 依存的な *Bc*-SMase の細胞膜への移行に関与していることが強く示唆される。しかし、*Bc*-SMase のこの金属イオン結合部位の立体構造は、金属

イオンの種類に関係なく保存されており、金属イオンの種類に応じたこの部分の立体構造の変化が、*Bc*-SMase の細胞膜への移行に関与するのではないかという予想とは合わない。金属イオン依存的な細胞膜への移行の仕組みについては、さらなる研究が必要である。

中央の金属イオン結合部位では、高い加水分解活性を示す Co^{2+} は、Glu53 のカルボキシル酸素と His296 のイミダゾール窒素にそれぞれ結合していた (図 5a)。一方、低活性型の金属イオンである Ca^{2+} は Glu53 にだけ結合が見られた (図 5c)。先に述べた DNaseI とのアミノ酸配列比較から設計された変異体を使った実験から、この Glu53 と His296 は加水分解活性に関与するアミノ酸残基であることがわかっており、^{13),14)} この His296 に対する 2 つ目の金属イオンの結合の有る無しが、加水分解活性の効率の極端な差の原因と考えられたので、以下で詳しく述べる。

5.2 SMase 活性と金属イオンの結合様式

スフィンゴミエリン分解活性を強く亢進する Co^{2+} を結合した *Bc*-SMase の活性部位には、6 配位正 8 面体の配位構造の Co^{2+} が 2 つ結合し、その間で 1 つの水分子が配位子として共有されていた (図 5a)。それぞれの Co^{2+} が直接配位するアミノ酸残基は、Glu53 と His296 である。Glu53 に結合した Co^{2+} の 6 つの配位子座は、Glu53 の側鎖のカルボニル酸素と 5 つの水分子で占められていた。His296 に結合したもう 1 つの Co^{2+} の 6 つの配位子座は、His296 の側鎖のイミダゾール窒素と 3 つの水分子で占められ、残りの 2 つの配位子座は空であった。この 2 つの Co^{2+} は、直接結合する Glu53 と His296 だけでなく、配位子である水分子を介してほかのアミノ酸側鎖とも結びついている。具体的には Asn16、Asp195、Asn197、Asp295 である (図 5a)。

2 価の陽イオンである 2 つの Co^{2+} が、直線距離で 3.5 Å という近接した場所に結合するために、共通の配位子である水分子の存在は重要である。水分子を介することで静電反発を減じることができると考えられる。共通の配位子である水分子と 2 つの Co^{2+} の間の距離は双方とも 2.0 Å、

図 4 基質を結合する溝の左端にある金属イオン結合部位 (文献 8) より)。(The edge metal-binding site.) (a) Mg^{2+} 結合結晶、オミット電子密度図は 4.5σ レベル。(b) Co^{2+} 結合結晶。(c) Ca^{2+} 結合結晶。(b) と (c) の異常散乱差フリーエ図はそれぞれ 5σ と 3σ レベル。

図5 基質結合クレフト中央の金属イオン結合部位。(The central metal-binding site.) (a) Co^{2+} 結合結晶. (b) Co^{2+} 結合結晶と Mg^{2+} 結合結晶の重ね合わせ. 黒の球が Co^{2+} とそれに配位する水分子. 電子密度図は Mg^{2+} 結晶の 5.5σ レベルのオミット電子密度図. (c) Ca^{2+} 結合結晶と Co^{2+} 結合結晶の重ね合わせのステレオ図. 小さい球が Co^{2+} とそれに配位する水分子, 大きい球が Ca^{2+} とそれに配位する水分子. カゴモデルは Ca^{2+} 結合結晶の 4σ レベルの異常散乱差フーリエ図.

2つの水- Co^{2+} 結合のなす角はほぼ 120° であった. Co^{2+} の占有率は, Glu53のほうがHis296の結合部位よりも高い. これは銅の特性X線 ($\text{CuK}\alpha$: $1.5418 \text{ \AA}$) で測定した回折強度の異常散乱差フーリエ図中で前者が 28σ , 後者が 9σ であったことからわかる. このことは2つの Co^{2+} の結合する親和性に差があり, Glu53がHis296よりも親和性が高いことを示している.

Mg^{2+} も Co^{2+} の配位構造によく似た6配位正8面体の配位構造で結合していた(図5b). His296周辺の水分子の構造が Co^{2+} の配位構造と同じであるためHis296には Mg^{2+} が結合していると考えられるが, 波長 $1 \text{ \AA}$ のX線で測定した回折強度の差フーリエ図では電子密度が確認できず, その占有率はGlu53に比べてかなり低いと思われる. Co^{2+} の2つの結合部位での占有率の高低の傾向からわかるように, His296への金属イオンの親和性がもともと低いことに加え, 結晶化のpHが6.5とヒスチジン側鎖のpKaに近くHis296への金属イオンの結合は, 水素イオンと競合することも Mg^{2+} の電子密度が見えないことの原因であると思われる.

スフィンゴミエリン加水分解活性を弱くしか活性化できない Ca^{2+} は, Bc-SMaseの活性部位中央のGlu53に, 7配位8面体の配位構造で結合するのみで, His296には結合していなかった(図5c). Glu53に結合した Ca^{2+} の配位構造中では, Glu53のカルボキシル酸素と5つの水分子が配

位子で, 1カ所の配位子座の電子密度は空であった.

これらの観察から, スフィンゴミエリン分解活性の効率が高まっているBc-SMaseでは, 水分子を共通の配位子とする6配位正8面体の配位構造の金属イオン2個が, 活性部位中央のGlu53とHis296に結合していることが, 高活性型触媒部位の構造上の特徴であると考えられた. また活性化した状態では K_m よりむしろ $V_{\max}$ が大きくなっているので(図2), His296に結合している金属イオンは反応中間体の安定化に寄与していると考えられた.

Bc-SMaseの活性中心のGlu53とHis296の側鎖の位置関係は, Co^{2+} などの小さなイオン半径の2つの金属イオンが水分子を共有したときのイオン間距離に適合し, それらの金属イオンの結合を可能にしているが, Ca^{2+} のような大きなイオン半径の金属イオンが2つ結合するには短すぎる. 結晶構造中の Ca^{2+} と配位子の間の平均の距離は $2.5 \text{ \AA}$ であるのに対し, Co^{2+} と Mg^{2+} の配位構造では $2.2 \text{ \AA}$ であった. この $0.3 \text{ \AA}$ の差は, 7配位の Ca^{2+} のイオン半径 ($1.06 \text{ \AA}$) と6配位の Co^{2+} のイオン半径 ($0.72 \text{ \AA}$) の差, $0.34 \text{ \AA}$ とほぼ等しく, 配位構造の大きさは中心にあるイオンの半径に比例することを示している.¹⁵⁾ イオン半径が大きな Ca^{2+} の配位構造は Co^{2+} の配位構造より大きく広がっていて, その2つの構造を重ね合わせると Ca^{2+} の配位子の1つである水分子の位置はHis296の近傍に至り, His296はもう1つの Ca^{2+} の結合部位になることができない(図5c). Glu53とHis296の側鎖間の距離が, どの金属イオンを高活性型金属イオンとして結合するかを選別する, 言い換えると適当な大きさの金属イオンを選別する決定因子であると考えられた.

5.3 K_m と金属イオン

Bc-SMaseのスフィンゴミエリンに対する親和性は, 金属イオンのルイス酸としての強度にほぼ比例して緩やかに変化し, $V_{\max}$ のように結合する金属イオンの数によって大きな差が生まれることはなかった. 図2では「平均ルイス酸強度」の逆数が横軸である. この平均ルイス酸強度は, 多くの無機結晶で実測された配位子の数から算出された各イオンの平均の配位子数で, イオンの電荷数を割った値で valence unit (v.u.) で表される.¹⁶⁾ 文献に記載されている平均ルイス酸強度の値と, その値を算出する際に用いられた平均配位子数は, Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} の各イオンでそれぞれ, 0.351 v.u./5.70 個, 0.344 v.u./5.98 個, 0.334 v.u./5.98 個, 0.274 v.u./7.31 個, 0.233 v.u./8.57 個で, これらの金属イオンの中では Co^{2+} と Sr^{2+} がそれぞれ最強と最弱なルイス酸である. Bc-SMaseの触媒中心での金属イオンの配位構造は, Co^{2+} 結合結晶が6配位, Mg^{2+} 結合結晶も6配位, Ca^{2+} 結合結晶では7配位で, 文献に記載された各イオンで期待される配位の数と一致している. このことから, Bc-SMaseの触媒中心にある金属イオンのルイス酸としての強さは, 経験的な文献の値に近いとみなせ

図6 スフィンゴミエリン結合モデル(文献8より). (Sphingomyeline binding model.) (b) 加水分解で切断される結合を矢印で示す.

る. *Bc*-SMase がスフィンゴミエリンを結合する際の親和性の高低は, *Bc*-SMase の活性中心に結合している金属イオンのルイス酸としての強さにほぼ比例していて, 金属イオンはスフィンゴミエリンの中の電子供与性をもつ極性基と相互作用して, 結合に寄与していると考えると具合がよい.

5.4 加水分解活性の反応機構

高いスフィンゴミエリン加水分解活性を示す活性部位に2つの Co^{2+} を結合した結晶構造を使ったスフィンゴミエリン結合モデルは加水分解反応の反応機構を無理なく説明できる(図6). スフィンゲニン骨格のアルキル鎖は *Bc*-SMase の表面の疎水的な溝の中央から左側, 2位のアミノ基に結合した脂肪酸のアルキル鎖は中央から上方へ伸びる分岐した溝に結合し, また1位の炭素に結合したフォスホコリンは中央から右側に伸び, コリン部の正電荷は Asp156 と Glu250 の負電荷と相殺されている.

活性部位の2つの Co^{2+} は, スフィンゴミエリンの極性基を結合して, 図6b中の矢印で示した切断するリン酸エステル結合を正しく活性部位に固定する足場になっている. His296 に結合した Co^{2+} と Asn197 の側鎖アミノ基はリン酸の酸素と結合し, リン酸基の負電荷を中和するだけでなく, リン原子を通常より正に分極させて, 加水分解の際の求核子である水分子の攻撃を容易にしている. Glu53 に結合した Co^{2+} は, リン酸エステルの酸素(図6bの O4)を結合し, 加水分解反応の遷移状態でこの酸素上に生じると予想される負電荷を中和し, 遷移状態の活性化自由エネルギーを低下させ, 反応を容易にしている. また Lys131 や His151 とともに, 負の極性をもつ基, すなわちアミド結合した脂肪酸のカルボキシル酸素や3位の水酸基などを結合するのに寄与している. His296 に結合した Co^{2+} と Asp195 のカルボキシル酸素と Asn197 のカルボニル酸素は, 図6bで Wat1 と示された水分子と各々結合して水分子の pK_a を低下させて, 水分子を求核子としている. *Bc*-SMase は, 触媒中心の2つの金属イオンを利用して基

図7 基質結合クレフト中央の金属イオン結合部位を作るアミノ酸残基の重ね合わせ(文献8より). (Superimposition of the amino acid residues composing the central metal binding site.) *Bc*-SMase の基質結合クレフト中央の金属イオン結合部位を作るアミノ酸残基(太線)を立体構造が決定されている DNaseI 様スーパーファミリーに属する7種類のリン酸ジエステル加水分解酵素の対応するアミノ酸残基(細線)と重ね合わせた(DNaseI (PDB : 1DNK), DNA repair exonuclease III (PDB : 1AKO), DNA repair endonuclease HAP1 (PDB : 1BIX), inositol polyphosphate-5-phosphatase domain (PDB : 1I9Z), subunit B of cytolethal distending toxin (PDB : 1SR4), endonuclease domain of human Line-1 Orf2P (PDB : 1VYB), endonuclease domain from the telomere-specific long interspersed nuclear element (PDB : 1WDU)).

質であるスフィンゴミエリンを結合し, また反応に必要な水分子を活性化し, さらに反応の遷移状態を安定化していると考えられる.

この金属イオンの結合に関与するアミノ酸残基は, Asn16, Glu53, Asp195, Asn197, Asp295, His296 の6つで, これらのアミノ酸残基は立体構造が解析されている

図8 *Bc*-SMase 変異体の酵素活性試験 (文献8)より). (Enzyme assay of mutants of *Bc*-SMase.) 人工スフィンゴ脂質リポソーム分解活性 (a) と溶血活性 (b) の濃度依存性. $n=3$ の標準偏差を付記する. (a-b) で天然型は丸 (●), W284A は三角 (▲), F285A は四角 (■) で表す. 表面プラズモン共鳴法によるスフィンゴミエリンリポソームに対する天然型 *Bc*-SMase (c), W284A 変異体 (d), F285A 変異体 (e) の結合試験. (c-e) で使用した酵素濃度は, 10 μg/ml (●), 5 μg/ml (▲), 0 μg/ml (■) である. (f) ^{125}I で修飾した *Bc*-SMase のスフィンゴミエリンリポソームへの結合試験.

DNaseI 様スーパーファミリーに属しているリン酸ジエステル加水分解酵素でよく保存されている (図7).⁸⁾ さらにバクテリア由来だけでなくヒト由来の中性SMaseでもアミノ酸配列上保存されている.^{8),17),18)} これらの点は, 2つの金属イオンが結合してリン酸ジエステル結合を加水分解する反応機構が, DNaseI 様スーパーファミリーに属しているリン酸ジエステル加水分解酵素ですべて共通している可能性を強く示唆している.

6. 細胞膜との相互作用

βヘアピンの先端にあって, 溶媒中にその芳香族側鎖が突き出している Trp284 と Phe285 をそれぞれアラニンに置換した変異体は, スフィンゴミエリンリポソームの分解活性や溶血活性が天然型に比べて数桁も弱くなった (図8a-b). また表面プラズモン共鳴法 (図8c-e) やヨウ素125でラベルした *Bc*-SMase を使ったスフィンゴミエリンリポソームに対する結合試験 (図8f) でも同様である. これらの点から Trp284 と Phe285 は細胞膜への結合に必須な役割を担っていることがわかる.

さらに, Mg^{2+} 結合結晶では Trp284 は近傍の5つの芳香族アミノ酸残基, Tyr25, Trp28, Tyr242, Tyr288, Tyr290とともに緩衝液の成分である 2-morpholinoethansulfonic acid (MES) の結合部位を作っていた (図9a). またこのときβヘアピンの構造は, MESを結合していなかった Co^{2+} 結合結晶と比べてMES側にねじれ込んでいた (図9b). 大きさや分子の片方の端がリン酸と硫酸で負電荷をもって

いる点など, スフィンゴミエリンの親水性部分であるフォスホコリンとMES分子は, 形ばかりでなく分子表面の静電ポテンシャルの様相も含めて, お互いによく似ている. *Bc*-SMaseの細胞膜への結合が起るときには, βヘアピンの先端の Trp284 や Phe285 を含む芳香族アミノ酸の集まった部分が, MES分子の結合によく似た形式でスフィンゴミエリンのフォスホコリン部分を結合しているのかもしれない (図9c). しかしスフィンゴミエリナーゼ分子の中でもβヘアピンは, 結晶学的温度因子が高く, すなわち比較的構造が柔軟で, 結合した水分子や金属イオンをX線結晶構造解析で見つけることが難しい領域である. 現在の解析ではβヘアピンに関係するアミノ酸残基が金属イオンを結合していることを示す電子密度は見られておらず, 金属依存的な細胞膜への移行にβヘアピンが直接寄与しているかどうかは, まだよくわからない.

7. まとめ

食中毒の原因菌の1つであるセレウス菌が産するSMaseのスフィンゴミエリン加水分解活性と溶血活性は, それぞれに特徴的な金属イオン要求性があることが知られていたが, その金属イオン要求性を与える原因はこれまで不明であった. *Bc*-SMaseと各種金属イオンの複合体構造を比較検討することにより, 1つの水分子を共有した2つの2価金属イオンが活性中心に結合した構造が, 高い加水分解反応を発揮する触媒活性に必要な構造であることが判明した. 金属イオンは, 基質であるスフィンゴミエリン

図9 Mg^{2+} 結合結晶中での MES 分子結合. (Bound MES molecule in the Mg^{2+} bound crystal.) (a) 結晶中で観察された *Bc*-SMase に結合した MES 分子にフォスホコリンを重ねた. 2Fo-Fc 電子密度図は 2.8σ レベル. (b) MES 分子を結合していない Co^{2+} 結合結晶と MES 分子を結合した Mg^{2+} 結合結晶の間の β ヘアピンの構造変化を矢印 ($\Rightarrow$) で示した. (c) *Bc*-SMase の細胞膜への結合モデル. 基質結合クレフトの端の金属結合部位への金属イオンの結合の有無で柔軟性が変化すると考えられるループを鏝印 (►) で示す.

を, 触媒反応に適した様式で活性部位に結合する足場を提供し, またアミノ酸側鎖とともに水分子の活性化にも関与していると考えられる. この金属イオンの結合様式と触媒反応における役割は, DNaseI 様フォールディングスーパーファミリーに属するリン酸ジエステル加水分解酵素や高等動物の SMase の間で普遍的である可能性が示唆された.

謝 辞

本解析は徳島文理大学薬学部の櫻井 純教授, 小田真隆助手, 健康科学研究所の津下英明教授との共同研究の成果であり, 徳島文理大学の関係者の方々に謝意を表します.

本稿で使用した図の一部は, The American Society of Biochemistry and Molecular Biology の図表の再使用規定のもとで再加工して使用した.

文 献

- 1) J. E. Alouf and M. R. Popoff: The comprehensive sourcebook of bacterial toxins, p.516, Academic Press (2006).
- 2) S. Spiegel, D. Foster and R. Kolesnick: *Curr. Opin. Cell. Biol.* **8**, 159 (1996).
- 3) J. H. Exton: *J. Biol. Chem.* **265**, 1 (1990).
- 4) M. Tomita, R. Taguchi and H. Ikezawa: *J. Toxicol. Toxin Rev.* **10**, 169 (1991).
- 5) H. Ikezawa, M. Mori and R. Taguchi: *Arch. Biochem. Biophys.* **199**, 572 (1980).
- 6) C. J. Smyth, R. Möllby and T. Wadström: *Infect. Immun.* **12**, 1104 (1975).
- 7) H. Ikezawa, M. Matsushita, M. Tomita and R. Taguchi: *Arch. Biochem. Biophys.* **249**, 588 (1986).
- 8) H. Ago, M. Oda, M. Takahashi, H. Tsuge, S. Ochi, N. Katunuma, M. Miyano and J. Sakurai: *J. Biol. Chem.* **281**, 16157 (2006).
- 9) M. Tomita, R. Taguchi and H. Ikezawa: *Arch. Biochem. Biophys.* **223**, 202 (1983).

- 10) A. E. A. Openshaw, P. R. Race, H. J. Monzó, J. -A. Vázquez-Boland and M. J. Banfield: *J. Biol. Chem.* **280**, 35011 (2005).
- 11) S. A. Weston, A. Lahm and D. Suck: *J. Mol. Biol.* **226**, 1237 (1992).
- 12) Y. Matsuo, A. Yamada, K. Tsukamoto, H. O. Tamura, H. Ikezawa, H. Nakamura and K. Nishikawa: *Protein Sci.* **5**, 2459 (1996).
- 13) T. Obama, Y. Kan, H. Ikezawa, M. Imagawa and K. Tsukamoto: *J. Biochem.* **133**, 279 (2003).
- 14) T. Obama, S. Fujii, H. Ikezawa, K. Ikeda, M. Imagawa and K. Tsukamoto: *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 920 (2003).
- 15) R. D. Shannon: *Acta Cryst.* **A32**, 751 (1976).
- 16) I. D. Brown: *Acta Cryst.* **B44**, 545 (1988).
- 17) F. M. Goñi and A. Alonso: *FEBS Lett.* **531**, 38 (2002).
- 18) C. J. Clark, C. F. Snook, M. Tani, N. Matmati, N. Marchesini and Y. A. Hannun: *Biochemistry* **45**, 11248 (2006).

プロフィール

吾郷日出夫 Hideo AGO

独立行政法人理化学研究所 播磨研究所 放射光科学研究センター 宮野構造生物物理研究室
RIKEN SPring-8 Center, Structural Biophysics Laboratory
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1
1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148, Japan
e-mail: ago@spring8.or.jp
専門分野: 脂質代謝関連蛋白質の構造生物学

宮野雅司 Masashi MIYANO

独立行政法人理化学研究所 播磨研究所 放射光科学研究センター 宮野構造生物物理研究室
RIKEN SPring-8 Center, Structural Biophysics Laboratory
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1
1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148, Japan
e-mail: miyano@spring8.or.jp
専門分野: 脂質構造生物学. 蛋白質の物理化学