薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
119 (7) 472-494 (1999)

細菌ホスホリパーゼ C の真核細胞膜への作用から GPI アンカー蛋白質の 分子生物学への展開

池澤宏郎

名古屋市立大学薬学部, 〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1

Development from Actions of Bacterial Phospholipases C on Eucaryotic Plasma Membranes to Molecular Biology of GPI-Anchored Proteins

Hiroh IKEZAWA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University,
3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8603, Japan

(Received March 26, 1999)

Bacterial phospholipases C are known to act on biomembranes, since they can cleave the phosphodiester linkage between the polar head and the hydrophobic moiety of each phospholipid in these membranes. These enzymes have been classified into three groups; phosphatidylcholine (PC)-, sphingomyelin (SM)- and phosphatidylinositol (PI)-degrading phospholipases C. Enzymatic properties and toxicities of these phospholipases C are reviewed, in relation to author's research. Studies on the hemolytic phospholipases of *Clostridium* sp., *Bacillus cereus* etc., revealed that hydrolysis of choline-containing phospholipids such as PC and SM was responsible for the hemolysis of mammalian erythrocytes by these enzymes in the presence of Ca^{2+} and/or Mg^{2+} . Also, the studies on a structure-activity correlation of SM-hydrolyzing phospholipase C from *B. cereus* disclosed the similarity of active sites between this enzyme and bovine pancreatic DNase I. By action of PI-degrading phospholipases C, several membrane proteins such as alkaline phosphatase, 5'-nucleotidase, VSG (protozoal surface glycoprotein) etc., were shown to be released from the plasma membranes of eucaryotic cells. From structural analysis, these proteins have been revealed to be glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins bound to the plasma membranes with carboxyl terminal-attached glycolipid. Biochemistry and molecular biology of GPI-anchored proteins, including the structures and biosynthetic routes of GPI glycolipids as well as the process of GPI attachment to proteins, requirements of C-terminal signal peptide for the protein modification by GPI, and distribution of GPI-anchored proteins in living world, are described in relation to our studies.

Key words—bacterial phospholipase C; hemolysis; GPI-anchored protein; plasma membrane

はじめに

地球上に生命が誕生し、生物の進化が始まって以来、異種の生物間の生存競争が種々の形で展開されて来た。多細胞の真核生物、特にヒトを頂点とする哺乳動物の細菌感染症は、これらの高等真核生物に対する寄生性原核生物の生存競争の1つの現れに他ならない。このような異種生物間での戦いにおいて、病原菌側が宿主細胞の蛋白質合成系や細胞膜などを攻撃する酵素を毒素として産生し、侵襲の武器として使用するケースが見られる。本稿の前半で述べる細菌ホスホリパーゼCは、当初正にそのような毒素の1つとして発見された。すなわち、Macfarlane, Knight は1941年の報告において、ガス壊疽の主要な病原菌であるウェルシュ菌 *Clostridium perfringens* (別名 *C. welchii*) の α -毒素が、ホスファチジルコリン (PC) を分解してジグリセリドとホスホコリンを生ずるホスホリパーゼCであると同定した。¹⁾ これは、実に酵素であることが示された最初の細菌毒素である。 α -毒素は、*C. perfringens* のすべての型の菌株で菌体外毒素として共通に産生されるが、ヒトのガス壊疽の病原菌であるA型菌では主要な毒素であり、致死、壊死、溶血の毒作用を示す。²⁾ その後、Slein, Logan は1965年に、セレウス菌 *Bacillus cereus* が菌体外酵素として産生するホスホリパーゼCには、PC分解型の酵素 (PCPLC)、スフィンゴミエリン (SM) 分解型の酵素 (SMPLC)、ホスファチジルイノシトール (PI) 分解型の酵素 (PIPLC) の3種があることを報告したが、³⁾ これは同時に、細菌には基質特異性が異なるホスホリパーゼCが3種類存在することを示す最初の報告となった。その少し前に Doery らは、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* の β -毒素 (溶血毒) が、SMPLCであることを証明した。⁴⁾ また後に詳述するが、*B. cereus* のPIPLCが真核細胞の細胞膜からアルカリ性ホスファターゼを遊離すること⁵⁾ から、GPI アンカー蛋白質の発見⁶⁾ が導かれた。これらの報告から明らかなように、細菌のホスホリパーゼCは、真核生物の細胞膜を構成するリン脂質を分解することにより、溶血や膜結合酵素遊離などを起こす毒素として機能していると思われる。真核生物において細胞のシグナル伝達に関与しているホスホリパーゼCとは異なる役割を担うものである。

1. 基質特異性に基づくホスホリパーゼCの分類と、各酵素の特徴

前述したように、細菌のホスホリパーゼCは、その基質特異性の差により、PCPLC, SMPLC, PIPLCの3つの群に分類される。それぞれの群に属する酵素の性状、基質特異性、生物活性については、Table 1に示す。これらのホスホリパーゼCは、Fig. 1に示すように、グリセロリン脂質やSMの疎水性部分 (ジグリセリド, セラミド) と親水性部分 (リン酸-X, ホスホコリン) との間の結合を切断する酵素であり、PCPLCはグリセロリン脂質、SMPLCはSMを主として加水分解するホスホジェステラーゼであるが、PIPLCはPIなどイノシトールリン脂質に特異的に作用し、Fig. 2に示すように動物の腓リボヌクレアーゼ型の反応過程をたどる。すなわち、まずホスホトランスフェラーゼ活性を示してミオイノシトール1,2-環状リン酸エステルを生成し、さらにヒドロラーゼ活性により、この環状リン酸エステルを極めて緩徐に加水分解して、ミオイノシトール1-リン酸を生ずる。^{5, 11, 12)} 3種のホスホリパーゼCの中では、PCPLCが最も作用する基質の範囲が広く、PI、リゾホスファチジルイノシトール (lysoPI) を除くほとんどのグリセロリン脂質に作用する上、*C. perfringens* の α -毒素やノービ菌 *Clostridium novyi* (別名 *C. oedematiens*) の γ -毒素のようにSMにまで作用するものがある。^{13, 14)} 一方、SMPLCは、SMのみならずモノアシル型グリセロリン脂質リゾホスファチジルコリン (lysoPC) も分解するが^{15, 16)} ジアシル型グリセロリン脂質であるPCやPIなどには作用しない。またPIPLCは、PIのみならずlysoPIも分解する^{17, 18)} が、真核生物のPIPLCと異

Table 1. Properties and Toxicity of Bacterial Phospholipases C⁷⁻¹⁰⁾

Classification, source	M. W.	Substrate specificity	Metal ion requirement	Toxicity
I. PC-PLC				
<i>Clostridium</i> sp.				
<i>C. perfringens</i> (α -toxin)	42500	PC, SM, PS, lysoPC, NPPC, PE (in the presence of PC or SM)	Zn ²⁺ , Ca ²⁺	Lethal, Dermonecrotic, Hemolytic
<i>C. novyi</i> Type A (γ -toxin)	30000	PC, SM, lysoPC	Zn ²⁺ , Ca ²⁺	Hemolytic
<i>C. bifermentans</i>	42746	PC	Mg ²⁺	Hemolytic
<i>Bacillus cereus</i>	28520	PC, PE, PS	Zn ²⁺ , Ca ²⁺	Insecticidal
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		PC, SM, PS, PE	Mg ²⁺	Hemolytic
<i>Pseudomonas</i> sp.				
<i>P. fluorescens</i>		PE, PC		
<i>P. aureofaciens</i>	35000	PE, PC, lysoPC	Zn ²⁺	Hemolytic
<i>P. schuylkilliensis</i>	23000	PC, PE		
<i>P. aeruginosa</i>				
PLC-H	78352	PC, SM, lysoPC		Hemolytic
PLC-N	73455	PC, PS		
<i>P. cepacia</i>	72000	PC, SM		Hemolytic
<i>Streptomyces hachijoensis</i>	18000	PC, SM, CL, PA, lysoPC (I, II)	Mg ²⁺	Weakly hemolytic (I)
<i>Listeria monocytogenes</i>	39000	PC, SM, PE, PS, PG	Zn ²⁺	
<i>Listeria pneumophila</i>	50000	PC		
	—54000			
II. SM-PLC				
<i>Staphylococcus aureus</i> (β -toxin)	33742	SM, lysoPC	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺	Hemolytic
<i>Bacillus cereus</i>	34255	SM, lysoPC, HNP, NPPC	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺	Hemolytic
<i>Leptospira interrogans</i>	63268	SM		Hemolytic
III. PI-PLC				
<i>Bacillus</i> sp.				
<i>B. cereus</i>	34466	PI, lysoPI, myo-inositol-1,2-cyclic phosphate, GPI		
<i>B. thuringiensis</i>	34255	PI, lysoPI, GPI		
<i>Clostridium novyi</i> Type A		PI, GPI		
<i>Staphylococcus aureus</i> (β -toxin)		PI, GPI		
<i>Listeria monocytogenes</i>		PI, GPI		
<i>Cytophaga</i> sp.		PI, GPI		
<i>Streptomyces antibioticus</i>		PI, GPI		

PC: phosphatidylcholine, PE: phosphatidylethanolamine, PI: phosphatidylinositol, lysoPC: lysophosphatidylcholine, lysoPI: lysophosphatidylinositol, SM: sphingomyelin, HNP: 2-hexadecanoylamino-4-nitrophenylphosphocholine, NPPC: *p*-nitrophenylphosphocholine, GPI: glycosylphosphatidylinositol.

なり、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PIP) やホスファチジルイノシトール 3,4-ビスリン酸 (PIP₂) には作用しない。

B. cereus や *Clostridium* 属の PCPLC は Zn²⁺ を結合する金属酵素であるが、^{14, 19, 20)} 赤血球などの膜に作用するときは Ca²⁺ により活性化される。²¹⁾ 細菌の SMPLC は Mg²⁺ を必要とする金属酵素で、Ca²⁺ により拮抗的に阻害される。¹⁶⁾ しかし、*B. cereus* の SMPLC を赤血球膜に作用させたとき、Mg²⁺ と Ca²⁺ の活性への影響は、後述するように相補的になることがあり、²²⁾ 単純に活性化-阻害の関係でとらえることは出来ない。一方、細菌の PIPLC には、金属イオ

Fig. 1. Cleavage Sites of Phospholipids by Phospholipases C

Phospholipases C split the arrow-indicated linkage between hydrophobic moiety and polar head of each phospholipid.

Fig. 2. Two-Step Degradation of Phosphatidylinositol (PI) by Bacterial PI-Specific Phospholipase C (PIPLC)^{5, 11)}

Usually, myo-inositol 1,2-cyclic phosphate tends to accumulate.

ン要求性は全く認められない。²³⁾

生物活性という面からみると、細菌のホスホリパーゼ C には、赤血球膜のリン脂質を分解して溶血を起こすものが多い。PCPLC では、*Clostridium* 属の酵素や *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* (PLC-H) などの酵素の溶血活性がよく知られている^{24, 25)} が、SMPLC では、現在までに詳細に研究が行われた 3 種の菌の酵素は、すべて溶血活性を示すことが報告されている。^{4, 22, 26)} しかし、PIPLC には、例外なく溶血活性が見られない。また、*B. cereus* の PCPLC には溶血活性は認められないが、この酵素は昆虫毒素の 1 つとして、ハチノスツヅリガ *Galleria mellonella* の蛹に対して致死作用を示すという報告²⁷⁾ がある。一般に、細菌の PIPLC には、真核生物の細胞膜から GPI アンカー蛋白質を遊離する作用がある。¹²⁾ た

だし、このような作用があっても、哺乳動物に対しては、毒素といわれるほど顕著な毒性を示さない。しかし、*Bacillus thuringiensis* の PIPLC は、ヒト口底癌由来の KBⅢや蛾 *Trichoplusia ni* の卵巣由来の TN-368 などの培養細胞に対して、発育阻害作用を示した。^{28, 29)} また、マウス腹腔内に Sarcoma 180 細胞を接種した後、*B. cereus* や *B. thuringiensis* の PIPLC を 5 日間連続投与すると、細胞の発育に対し用量依存的な阻害が認められた。²¹⁾

2. ホスホリパーゼ C (PCPLC 及び SMPLC) による赤血球の溶血作用の機序

細菌のホスホリパーゼ C による溶血は、膜リン脂質の分解によって起こるため、他の溶血毒による溶血とは異なる独特の経過をたどって進行する。2 価金属イオン (Ca^{2+} あるいは Mg^{2+}) の存在下で、酵素を赤血球に作用させると、膜リン脂質の分解が進む結果、赤血球膜が温度感受性になり、0—4°C に冷却することにより、lysis が起こって膜外にヘモグロビンが流出する。この温度感受性溶血を、hot-cold hemolysis (hot-cold 溶血) と呼んでいる。⁹⁾ この段階では、冷却しなければ溶血は起こらない。しかし、冷却せずに 37°C でさらに酵素を赤血球に作用させ続ければ、37°C の“hot”の状態でも溶血が起こる。これが hot hemolysis (hot 溶血) である。このような hot-cold → hot 溶血の進行過程は、PCPLC あるいは SMPLC いずれの酵素を赤血球に作用させても、共通のプロセスとして観察される。

上記のようなプロセス、すなわち 2 価金属イオン存在下で細菌ホスホリパーゼ C が引き起こすリン脂質分解 → 溶血の過程について、著者らは、いくつかの解析を行った。まず *C. perfringens* の PCPLC すなわち α -毒素による哺乳動物赤血球の溶血機構については、酵素反応速度論的な手法を準用し、

(M: Ca^{2+} , S: 赤血球膜上の基質リン脂質, E: 酵素 PCPLC, P: 生成物)

の反応により、基質であるリン脂質 S が PCPLC の作用で分解して生成物 P を生じ、比 (P)/(S) が一定に達したところで溶血が起こる^{30, 31)}という結論に達した。この研究は、1960 年代の初期のもので、その当時は、赤血球膜におけるリン脂質の分布に関する知見が欠けていた。その後 1972 年になって、Bretscher により、赤血球膜では PC と SM のようなコリン含有リン脂質は主として脂質二重層の外層に位置し、ホスファチジルセリン (PS) やホスファチジルエタノールアミン (PE) は内層に位置することが示された。³²⁾ これが脂質二重層におけるいわゆるリン脂質の不斉分布 (asymmetric distribution) である。また、Nelson による分析結果では、反芻動物と他の哺乳動物との間で赤血球膜リン脂質組成に差があり、ヒトやウマの赤血球では PC と SM の含量にさほど大きな差がないのに、ヒツジやウシのような反芻類の赤血球では SM の含量が圧倒的に高く、PC 含量はその 1/10 前後となる。³³⁾ このような背景の下で、著者らは *C. perfringens*, *C. novyi*, *P. aureofaciens* の 3 種の PCPLC による赤血球膜リン脂質と溶血反応の推移を、ウマ及びヒツジ赤血球を試料として用いて追跡した。²⁴⁾ その結果、まずこれらの PCPLC による溶血は、脂質二重層の外層を占めるコリン含有リン脂質の分解が直接的誘因となるもので、外層のほとんどの部分を SM が占めるとされるヒツジ赤血球では SM の分解が、PC 含量の方が SM 含量より高いウマ赤血球では PC 分解が、それぞれ溶血の原因となることが明らかとなった。*P. aureofaciens* の PCPLC は、PC を分解するが SM を分解しないので、ウマ赤血球では膜の外層 PC を分解して溶血を起こすが、ヒツジ赤血球には作用せず溶血を起こさない。一方、抽出精製したコリン含有リン脂質を共に PC > SM の順で分解する *Clostridium* 属の 2 つの PCPLC, *C. perfringens* の α -毒素と *C. novyi* の γ -毒素は、ウマ及びヒツジの

赤血球に対する作用の上で顕著な差が認められた。奇妙なことであるが、 α -毒素がヒツジ赤血球膜 SM を分解して溶血する速度は、ウマ赤血球 PC を分解して溶血する速度の約 10 倍に達した。ところが、 γ -毒素はウマ赤血球に 60 分間作用させて PC 分解により完全に溶血する酵素濃度を用いても、同じ時間内にヒツジ赤血球に対する作用が認められなかった。このような赤血球の感受性の差については、酵素の基質特異性によっては説明できない。 α -毒素及び γ -毒素に対して、ウマ及びヒツジの赤血球が示す感受性の差については、基本的には Macfarlane の報告³⁴⁾と一致する。しかし、Macfarlane は赤血球膜上のどのリン脂質が分解されることが溶血の原因になるかについては全く分析しておらず、このような感受性の差を単に “goodness of fit” (適合性の良さ) に帰している。これに対して著者らは、さらに踏み込んで赤血球膜への個々の酵素の accessibility (接近しやすさ) の差が、このような膜リン脂質分解と溶血における感受性の差を生んだものと考えている。

細菌の SMPLC は、PCPLC と同様に哺乳動物の赤血球に対して溶血作用を示すが、特に SM 含量が高い反芻動物の赤血球に対して強い活性を発揮する。³⁵⁾ この場合も、明らかに赤血球膜 SM の分解が溶血の直接の原因となる。著者らが、*B. cereus* の SMPLC による溶血の機構について解析したところでは、PCPLC の場合とやや異なる形で、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} などの 2 価金属イオンが反応の進行を左右する。^{22, 35)} ミセル状 SM を基質とした場合¹⁶⁾と同様、 Ca^{2+} 存在下では、SMPLC はウシ赤血球の膜 SM を分解せず、溶血を起こさないが、この条件で SMPLC はウシ赤血球膜に強く吸着される。²²⁾ すなわち、1 mM Ca^{2+} の存在下で、SMPLC をウシ赤血球懸濁液と 37°C で 5 分間インキュベートすると、酵素は赤血球膜に 60—80% 吸着された。この吸着は温度依存性で、反応系を冷却すると、吸着酵素は膜から遊離してくる。これに対し、 Mg^{2+} の存在下では SMPLC の赤血球膜への吸着は 60 分間インキュベートしても全く起こらないが、20 分以上という長い lag の時間を経て膜 SM 分解と溶血が起こった。ところが、等モルの Ca^{2+} 、 Mg^{2+} (各 1 mM) 共存下で SMPLC をウシ赤血球に作用させると、膜への酵素吸着、膜 SM 分解、hot-cold 溶血が劇的に促進された。このとき、膜 SM の分解が進むと、一旦吸着された酵素が膜から遊離し始め、膜 SM 含量がほぼ完全に失われると酵素の吸着は消える。これは SMPLC が赤血球膜 SM に吸着されることを示す。また、SM/Triton X-100 の混合ミセルを基質とするときは、 Ca^{2+} は Mg^{2+} と拮抗する形で SM 分解を阻害するのに対し、赤血球の膜 SM を基質とするときには、両イオンは協調的に SMPLC の SM への作用を促進することになる。この一見特異な現象は、次のような機構によると思われる。すなわち Fig. 3 に示した一連の反応過程で、酵素- Ca^{2+} -基質複合体 EMS は赤血球膜 SM への強い酵素吸着という形で形成されるが、分解して反応生成物 P を生じない。一方、酵素- Mg^{2+} -基質複合体 EM'S は通常 Mg^{2+} 単独のときには微量しかできないが、分解して生成物 P を生ずる。ところが Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 共存下では、 $\text{MS} \rightleftharpoons \text{M}'\text{S}$ 、 $\text{EMS} \rightleftharpoons \text{EM}'\text{S}$ の転換が容易に起こり、酵素- Ca^{2+} -基質複合体 EMS は酵素- Mg^{2+} -基質複合体 EM'S になることにより、反応生成物 P を速やかに生じ、hot-cold 溶血をひき起こす。 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 以外の 2 価金属イオンでは、 Mn^{2+}

Fig. 3. Participation of Ca^{2+} and Mg^{2+} in the Enzymatic Breakdown of Erythrocyte SM by *B. cereus* SMPLC²²⁾

M: Ca^{2+} , M': Mg^{2+} , S: Substrate SM, E: SMPLC, P: reaction products (ceramide + phosphocholine).

が SMPLC の赤血球膜への吸着、膜 SM 分解、溶血を促進する。³⁶⁾

細菌ホスホリパーゼ C を赤血球膜に作用させると、赤血球は形態変化を起こし、正常な biconcave disc (両面凹の円板) の形から内方に膜が陥没した形へ変化し、さらに球形に変化するが、これは PCPLC,³⁷⁾ SMPLC^{38,39)} の両方に共通する現象である。この場合、ホスホリパーゼ C の作用により、まず膜の脂質二重層の外層のコリン含有リン脂質が分解され始めると、外層が内層に比して密度が低くなり、膜が内側に引き込まれて陥没するが、外層がほぼ完全に分解されて消失すると、内層だけの単層になって球状になると思われる。^{37,38)} これはグラム陽性菌のペプチドグリカンのリゾチームで分解して除去してプロトプラストにすると、細胞の球状化が起こるのとよく似ている。

なお、コレステロール、PE は、*B. cereus* の SMPLC によるリポソーム、赤血球膜 SM の分解を促進する。⁴⁰⁾ また、コレステロール誘導体 22R-ヒドロキシコレステロール (膜攪乱物質) もウシ赤血球の膜 SM 分解と溶血を促進する。⁴¹⁾

3. *B. cereus* の SMPLC の構造-活性相関

前述のように、*B. cereus* は PCPLC, SMPLC, PIPLC の 3 種の細菌ホスホリパーゼ C をすべて生産する³⁾ が、これらの全部の酵素の遺伝子が 1980 年代末にクローニングされた。⁴²⁻⁴⁴⁾ このうち、PCPLC 遺伝子はノルウェーの Little らのグループ、⁴²⁾ SMPLC 遺伝子は著者らのグループ⁴³⁾ により、それぞれ 1988 年にクローニングされたが、Little と著者の文通によって Fig. 4 に示すように、これら 2 つの遺伝子が *B. cereus* の染色体上で tandem (隣接) の位置に並んで存在することが示された。^{35,43)} すなわち、クローニングで得られた PCPLC, SMPLC を含む 2 つの DNA 断片において、PCPLC 遺伝子の open reading frame (ORF) の塩基配列の下流に、SMPLC 遺伝子の ORF 配列の一部が存在し、また SMPLC 遺伝子の ORF の塩基配列の上流に PCPLC 遺伝子の ORF の配列の一部が存在することが明らかとなった。その後、この遺伝子クラスターの存在は、別に Gilmore ら⁴⁶⁾ によって確認された。これら 2 つの遺伝子は、それぞれにプロモーター様領域を有している。^{35,42,43)} PCPLC 遺伝子は、⁴²⁾ シグナルペプチド 24 アミノ酸残基、プロペプチド 14 アミノ酸残基、成熟蛋白質 245 アミノ酸残基をコードしているのに対し、SMPLC 遺伝子は、⁴³⁾ シグナルペプチド 27 アミノ酸残基、成熟蛋白質 306 アミノ酸残基のコードを担っている。これら 2 つの遺伝子及び酵素アミノ酸配列については、全くホモロジーは認められない上、SMPLC の成熟蛋白質は 1 個の S-S 結合に相当するシステイン 2 分子を含むのに対し、PCPLC の成熟蛋白質はシステインを全く含んでいない。

1990 年代に入り、著者らは *B. cereus* の SMPLC の構造-活性相関研究の第一歩として、各種蛋白質修飾試薬を用い、活性部位のアミノ酸の検索を行った。⁴⁷⁾ その結果、酸性アミノ酸 Asp, Glu を修飾する Woodward 試薬によって著しい活性低下が認められ、これら酸性アミノ酸が活性部位に含まれることが明らかになった。またジチオスレイトール (DTT) 処理によっても顕著な活性低下が見られたので、SMPLC に 2 残基だけ存在する Cys は、S-S 結合により二次以上の高次構造の形成に寄与し、活性部位を安定に保持するのに関与していると思われる。また、ウシ赤血球膜への酵素吸着も、Woodward 試薬処理や DTT 処理によって低下するので、酵素の吸着にも S-S 結合の安定な維持が必要であり、かつ酸性アミノ酸が膜吸着で主要な役割を演ずると期待された。これに前後して、著者らは蛋白を高生産する *B. brevis* のホストベクター系で、*B. cereus* の SMPLC 遺伝子を発現させ、本酵素を大量生産することに成功した。⁴⁸⁾ 一方、著者らの *B. cereus* の SMPLC 遺伝子のクローニングの後、他のグループによる *S. aureus*,⁴⁹⁾ *Leptospira interrogans*⁵⁰⁾ の SMPLC 遺伝子のクローニングが相次ぎ、各酵素のアミ

PCPLC

SMPLC

Fig. 4. Nucleotide Sequences and Deduced Amino Acid Sequences of the PCPLC, and SMPLC Genes in the Chromosome of *B. cereus*^{35, 43, 45)}

The underlined sequences marked -35 and -10 refer to the conserved RNA-polymerase-binding and recognition sites respectively. S.D. indicates a possible ribosome-binding site. The cleavage sites between the signal sequence and the *exo* PCPLC or *exo* SMPLC are indicated by arrows (↓) or arrowhead. The 30-residue N-terminal and 8-residue C-terminal amino acid sequences of SMPLC chemically and enzymatically determined are double-underlined. Sequences containing inverted repeat structures upstream and downstream of the SMPLC gene are indicated by → ←, and the stop codons are indicated by three asterisks.

SMPLC	1	:	EASTNQNDTL	KVMTHNVYML	STNLYPNWGQ	TERADLIGAA	DYI-KNQDVV	ILNEVFD--N	
			* * *		*	* *	* * *	***	
DNase I	1	:	-----L	KIAAFNIRTF	GETKMSN---	---ATLASYI	VRIVRRYDIV	LIQEVDRSHL	
							(1)-----		
S	58	:	SASDRLLGNL	KKEYPNQTAV	LGRSSGSEWD	KTILGNYSSST	PEDGGVAIVS	KWPPIAEKIQY	
			* * *	***	*	**		*	**
D	43	:	VAVGKLLDYL	NQDDPN-TYH	YVVS-----	EPLG-RNSYK	ERYLFLFRPN	KVSVLDITYQY	
			-----▶						
S	118	:	-VFAKGCYPD	NLSNKGfVYT	KIKKNDRFVH	VIGTHLQAED	SMCGKTSPAS	VRTNQLKEIQ	
			* * *	* *	*	*	*	* *	* *
D	95	:	DDGCESCGND	SFSREPAV--	-VKFSSHSTK	VKEFAIVALH	S---APSDAV	AEINSLYDVY	
S	177	:	DFIKNKNIPN	NEYVLIGGDM	NVNKINAENN	NDSEYASMFK	TLNASVPSYT	GHTATWDATT	
			* * *	***	**		* *	* *	
D	149	:	LDVQQKWHLN	--DVMLMGD-	----FNADCS	YVTSSQWSSI	RLRTSSTFQW	LIPDSADTTA	
S	237	:	NSIAKYNFPD	SPAELYDYII	ASKDHANPSY	IENKVLQPKS	PQWTVTSWFQ	KYTYNDYSDH	
			*	* *	* *			***	
D	202	:	TSTNCAYDRI	VVAGSLLQSS	VVPGSAAP--	-----	FDFQAAYGLS	NEMALAISDH	
							(2)-----		
S	297	:	YPVEATISMK						
			**** *						
D	250	:	YPVEVTILT						
			-----▶						

Fig. 5. Alignment of Amino Acid Sequences of *B. cereus* SMPLC and Bovine Pancreatic DNase I⁴⁵⁾

Identical residues are indicated by an asterisk. Broken lines under the sequences indicate two highly similar regions.

ノ酸配列が推定されたが、これらの配列は高い相同性を示した。そこで、著者らは、*B. cereus* の SMPLC の成熟蛋白質のアミノ酸配列の中から、他の 2 つの SMPLC と比較して保存性（相同性）の高い Asp126, Asp156, Asp233, Asp295 の 4 残基を選び、これらを Gly に置換した変異型酵素を、それぞれ *B. brevis* の SMPLC 大量生産⁴⁸⁾系で発現させ、野生株の酵素と対比して、SM, lysoPC, HNP, NPPC の 4 基質の全部あるいは一部に作用させたときの活性の変化を調べた。⁴⁵⁾ その結果、Asp295 が加水分解酵素の触媒活性に必須であること、Asp126, Asp156 が基質の認識に関与することが明らかとなった。さらに、西川、松尾らが確立した 3D-1D 法 (3D-1D compatibility method)⁵¹⁾ を用いて、既に X 線解析により三次元構造が判明した 325 個の蛋白質 (Protein Data Bank よりデータを入手) との間でアミノ酸配列を比較したところ、*B. cereus* の SMPLC はウシ膵 DNase I との間で最も高い相同性を示すことが明らかとなった (Fig. 5)。^{45, 52)} 特に注目すべきことは、2 つの酵素が C 末端に近い領域で、SDHYPVE の 7 アミノ酸からなる配列を共有していることで、この中に触媒反応に関与する Asp, His が含まれている。これは一見奇異にみえるが、両酵素はその基質特異性が異なるものの、共にリン酸ジエステルの C-O-P-O-C 結合の C-O-P を切断する酵素ホスホジエステラーゼであって、構造上の共通性が見られたり、触媒機構が類似していたりしても特に不思議ではない。実際に、*B. cereus* の酵素も含めた 3 種の細菌 SMPLC とウシ膵 DNase I のアミノ酸配列を比較すると、触媒活性や基質認識に関与する部分のアミノ酸残基は共通に保存されていると考えら

Table 2. Predicted Functional Roles of Amino Acid Residues in *B. cereus* SMPLC⁵²⁾

The prediction is based on the sequence comparison with DNase I, whose functional residues have been identified using the X-ray structure.

SMPLC residue ^{a)}	Predicted role
Glu 53	Metal ion binding; stabilization of pentacovalent transition state
Asp 100	Hydrogen bond to His 151
Asp 126	Substrate recognition ^{b)}
His 151	General acid in hydrolysis
Asp 156	Substrate recognition ^{b)}
Asp 195	Interaction with phosphate group
Asn 197	Interaction with phosphate group
Asp 233	Hydrogen bond to His 296
Asp 295	Stabilization of pentacovalent transition state
His 296	General base in hydrolysis

a) Residue numbering is based on the *B. cereus* mature SMPLC sequence (Yamada *et al.*, 1988).⁴³⁾

b) According to the mutational analysis by Tamura *et al.* (1995).⁴⁵⁾

れる。例えば、*B. cereus* の SMPLC 分子で基質認識に関与すると思われる Asp126, Asp156 に相当する DNase I の 2 つの Asp 残基は、その位置関係から、いずれも DNase I と基質との結合に関わる可能性が十分考えられる。また DNase のようなホスホジエステラーゼによる酵素反応は、基本的には acid-base catalysis の形をとる。ウシ臍 DNase I が加水分解反応を触媒するとき、His134, His252 がそれぞれ general acid, general base として働くが、これに相当する SMPLC の His 残基は His151 と His296 である。そこで、この 2 つの His 残基を Ala に変換した変異酵素を大腸菌でそれぞれ発現させ、野生型酵素と比較したところ、基質 SM, HNP に対する活性が完全に失われたので、His151, His296 が DNase I の場合と似た形でそれぞれ general acid, general base として、活性部位で働くという予測が裏付けられた。⁵²⁾ 以上に示したアミノ酸残基も含め、ウシ臍 DNase I と *B. cereus* の SMPLC の対応するアミノ酸残基の間の機能上の相同性を基盤として、SMPLC のアミノ酸残基の機能の予測が可能となった (Table 2)。また、既に確立した DNase I の三次構造の各部位の上に SMPLC の対応するアミノ酸を乗せ、DNase I-DNA 複合体の X 線結晶構造に基づいて、*B. cereus* の SMPLC-SM 複合体の三次元構造モデルを構築したものを Fig. 6 に示す。Trp28, Glu53, Phe55, Asn130, Gln153, Trp232, Asp295 は基質を認識する役割を担うと考えられ、他の残基と Glu53, Asp295 はリン酸ジエステルの加水分解に関与するものと推測される。

なお、上記のようなウシ臍 DNase I と *B. cereus* の SMPLC の間の相同性は、 α -ヘリックス、 β -シート、コイル (あるいはターン) などの二次構造の上にも現れている。⁴⁵⁾ また、ウシ臍 DNaseI と *B. cereus* の SMPLC との間の構造のホモロジーは、ホスホジエステラーゼが進化の過程で核酸からリン脂質に至るまで基質特異性を分化させて行ったことを物語り、興味深い。

4. 細菌の PIPLC の研究から GPI アンカー蛋白質の分子生物学への展開

前述したように、細菌のホスホリパーゼ C は、*C. perfringens* の α -毒素 (PCPLC) の例に見られるように、当初細菌毒素の 1 つとして発見されたため、その研究はまず毒素としての作用を調べるところから入って、酵素化学的・蛋白質化学的研究へと進んだ。その 1 つである PIPLC の研究も、実は *B. cereus* の培養濾液中のある生理活性因子を探索することから始まっ

Fig. 6. A Model for the Interaction between *B. cereus* SMPLC and SM⁵²)

These residues are all conserved among known bacterial SMPLC homologues. M²⁺ denotes the metal ion that is essential in the catalysis.

た。すなわち Slein, Logan は 1960 年に、炭疽菌 *Bacillus anthracis* の粗毒素を動物に静脈内投与すると、いわゆる alkaline phosphatasemia (血流中のアルカリ性ホスファターゼの増加) が直ちに現れることを報告した。⁵³⁾ 次に彼らは、同じ *Bacillus* 属の菌株や他の細菌の培養濾液を検索し、ウサギに phosphatasemia を起こす因子は *B. anthracis* の培養濾液ではわずかししか生産されず、むしろ *B. cereus* やその類縁菌 *B. thuringiensis* のようなレシチナーゼ (ホスホリパーゼ) 生産菌の方で大量に得られることを示した。⁵⁴⁾ さらに彼らは、phosphatasemia を起こす factor (PF) を *B. cereus* の培養から得ようと試み、培養濾液の硫酸塩析物を DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで分画し、ホスホリパーゼ C 画分と PF 活性の関係を調べた。³⁾ 既に述べたように、Slein, Logan らは、*B. cereus* の培養濾液中に 3 種のホスホリパーゼ C が存在することを発見したが、それは、この研究の副産物であった。培養濾液を硫酸塩析して得た粗酵素標品は、PC, PE, SM, PI をすべて分解するが、DEAE-セルロースカラムを通った段階では、PC 及び PE を共に分解する画分、SM を分解する画分、PI を分解する画分に分かれた。一方、PF 活性は *in vivo* の phosphatasemia ではなく、ウサギの骨組織、腎皮質ホモジネートから *in vitro* でアルカリ性ホスファターゼを遊離する活性として測定している。結局、PF 活性は PC と PE を分解する画分、SM を分解する画分にはなく、PI を分解する画分にあった。この研究は、もし正統的な研究手段を駆使していたら GPI アンカー蛋白質の先駆的な研究になり得たが、酵素活性の測定法に問題があった。ホスホリパーゼ C の基質として、精製リン脂質を使用せず、商品の大豆レシチン (PC, PE, PI の混合物) とウシ脳 SM を混和したエマ

ルジョンを用い、これにカラムクロマトグラフィーの各画分を作用させ、ペーパークロマトグラフィーによって各リン脂質の分解をチェックするもので、当時としても極めて異端的な方法であった。酵素の精製も1段階のクロマトグラフィーに過ぎず、純度の検定もなされていなかった。このような理由から、Slein, Logan らのこの研究は、約10年もの間軽視され、無視されていた。

一方、著者は1974年に *B. cereus* の PIPLC の研究を開始した時から、Slein, Logan らの1965年の研究³⁾が常に視野にあった。著者らは、この菌の培養濾液から出発し、精製リン脂質 PC, SM, PI を活性測定 of 基質に用いて PCPLC, SMPLC, PIPLC を相互に分離した上、PIPLC を均一に精製し、これをラット腎スライスに作用させてみた。その結果、PIPLC 濃度、作用時間、スライス量に比例してアルカリ性ホスファターゼが遊離することが明らかとなった。⁵⁾ 1976年のこの報告は、細胞膜結合酵素であるアルカリ性ホスファターゼが細菌の PIPLC により膜から遊離されるという事実を間違いのない形で初めて証明するものとなった。同じ菌が産生する他の2つのホスホリパーゼ C, PCPLC, SMPLC には、このような作用が見られなかった。^{5, 55)} この研究成果は国際的な反響を巻き起こした。1977年、Low, Finean は、*S. aureus* や *B. cereus* の PIPLC を用い、これらの酵素により、各種動物細胞の表面膜からアルカリ性ホスファターゼ、⁵⁶⁾ アセチルコリンエステラーゼ (赤血球膜)⁵⁷⁾ などが遊離することを示した。かくして、この問題に関する国際的な競争の幕が切って落とされた。これより後、1980年代の半ば頃までに *B. cereus* や *S. aureus* のみならず *C. novyi*, *B. thuringiensis* など各種細菌の PIPLC により、真核生物の細胞膜結合酵素 5'-ヌクレオチダーゼ、^{58, 59)} アルカリ性ホスホジエステラーゼ I, ⁶⁰⁾ トレハラーゼ⁶¹⁾ などが膜から遊離することが示された。また、1985年 Ferguson らは、原虫 *Trypanosoma brucei* に PIPLC を作用させると、コート蛋白質 variant surface glycoprotein (VSG) が遊離されると共にジミリストイルグリセロールを生じることを示し、その際遊離された蛋白質 VSG の C 末端に、PI の成分ミオイノシトールを含む糖鎖が結合していることから、蛋白質 VSG がグリコシル-sn-1, 2-ジミリストイルホスファチジルイノシトールと C 末端で共有結合し、この糖脂質をアンカー (錨) として膜につながれていることを明らかにした。⁶⁾ これがグリコシルホスファチジルイノシトール・アンカー (GPI anchor, GPI アンカー) という膜蛋白質のアンカー登場の始まりである。長い間、膜蛋白質は、その疎水性ペプチド領域によってのみ膜にアンカーされる (つながれる) と考えられてきたが、GPI アンカーの登場と前後して、種々の脂質が蛋白質と共有結合して膜へその蛋白質をアンカーすることが明らかとなり、従来の蛋白質の膜へのアンカー様式に関する考え方が一新された。

GPI アンカー蛋白質は、Fig. 7 に示されたような形で、C 末端アミノ酸に結合したエタノールアミンリン酸 (EtN-P⁻), マンノース3分子とグルコサミン1分子からなるオリゴ糖鎖を介して膜に結合している。直接膜へのアンカーとして機能するのは、末端イノシトールリン脂質の最後尾にある疎水性リピド部分である。矢印で示すように、細菌の PIPLC は、アルカリ性ホスファターゼのような GPI アンカー蛋白質のイノシトールリン脂質部に作用し、疎水性リピド部分とリン酸の間の結合を切断して、アンカーとして機能している部分を奪うことにより、膜から蛋白質を遊離させるのである。

著者らは、このような展開の中で、PIPLC によって可溶化される膜結合酵素 (GPI アンカー蛋白質) の探索を行う一方、PIPLC を大量に産生し、かつ他のホスホリパーゼ C (PCPLC, SMPLC) の産生量が少ない菌株を求めて、*B. cereus* と近縁の *B. thuringiensis* の4菌株をスクリーニングし、これらがすべて *B. cereus* より高い PIPLC 産生能を示した⁶²⁾ところか

Fig. 7. GPI-Anchoring of Ectoproteins to Plasma Membrane

EtN: ethanolamine, (P): phosphate, Man: mannose, GlcN: glucosamine, *myo*-Ino: *myo*-inositol, hydrophobic anchor region: monoacylglycerol, diacylglycerol (diacyl or 1-alkyl-2-acylglycerol), and ceramide, GPI-PLD: GPI-specific phospholipase D, GPI-PLC: GPI-specific phospholipase C.

ら、プロテアーゼを生産せず、他のホスホリパーゼ C の産生量の低い 1 菌株を選び、実用化した。⁶³⁾ 現在、生化学、分子生物学、免疫学の領域で、特定の膜蛋白質が GPI アンカー蛋白質か否かを検索するのに、トリパノソーマの GPI 特異的ホスホリパーゼ C (GPI-PLC)、動物の GPI 特異的ホスホリパーゼ D (GPI-PLD)、細菌の PIPLC を細胞膜に作用させて目的蛋白質が可溶化するかどうかを調べたり、あるいは細胞膜を界面活性剤で可溶化したものに上記ホスホリパーゼを作用させ、目的蛋白質が両親媒性から親水性に変わるかどうかを調べるということが、一般的に行われている (Fig. 7)。また、GPI アンカー蛋白質の糖脂質アンカー部の構造決定、GPI 糖脂質生合成系の中間体の同定などにも、これらのホスホリパーゼが使われている。全世界的に行われている GPI アンカー蛋白質及びその関連糖脂質の研究で、以上に述べた目的に現在最も繁用されているのが、*B. thuringiensis* の PIPLC である。

さて、現在 GPI アンカー蛋白質として知られているものは 200 以上にのぼるとされ、原虫、真菌、粘菌から軟体動物、節足動物、脊椎動物、植物に至るまで、広い範囲の真核生物でその存在が知られている。これらの生物において、GPI アンカー蛋白質は、酵素、受容体、細胞接着因子、分化抗原、コート蛋白質 (原虫) などとして、種々な生物学的機能を担っている。現在では、GPI アンカー蛋白質研究は、単に 1 つの膜蛋白質が GPI アンカーで膜に結合しているかどうかを調べるのにとどまらず、分泌型あるいは膜貫通型蛋白質を GPI 型に変えたり、又はその逆の改変を行ったりして、生物学的機能の変化を調べるなど、きわめて分子生物学的な展開へと進んでいる。次節では、GPI アンカー蛋白質について、アンカー部の構造と生合成、翻訳後修飾により蛋白質が GPI 化を受ける過程及び条件、GPI の起源と生物学的意義などを概説する。

Fig. 8. Representative GPI Anchor Attaching to Membrane Proteins⁶⁴⁻⁶⁶⁾

EtN: ethanolamine, (P): phosphate, Man: mannose, GlcN: glucosamine, *myo*-Ino: *myo*-inositol, Gal: galactose, GalNAc: *N*-acetylgalactosamine.

5. GPI アンカー蛋白質研究の最前線

GPI アンカー蛋白質の C 末端に結合する糖脂質アンカーの構造には、原虫トリパノソーマのような単細胞生物から哺乳動物のような多細胞生物に至るまで、真核生物に共通な直鎖の基本構造 (コア) が保存されている。コアの先端は、C 末端アミノ酸と酸アミド結合するエタノールアミン (EtN) で、以下 EtN-(P)-6Man α 1-2Man α 1-6Man α 1-4GlcN α 1-6*myo* Ino-(P)-X (P: リン酸, Man: マンノース, GlcN: グルコサミン, Ino: イノシトール) の形で続き、末端 X はジアシルグリセロール, 1-アルキル-2-アシルグリセロール, モノアシルグリセロール, セラミドなどの脂質である。Fig. 8 は、初期に決定された *Leishmania major* の表在性プロテアーゼ promastigote surface protease (PSP, gp63),⁶⁴⁾ トリパノソーマ *T. brucei* の VSG⁶⁵⁾ とラット脳 Thy-1⁶⁶⁾ の 3 つの蛋白質の GPI アンカーの全構造を示したもので、*L. major* の PSP のアンカーはコア構造そのものであるが、VSG のアンカーには側鎖としてグルコサミンの隣のマンノース (M1) にガラクトースのオリゴ糖鎖が入り、Thy-1 のアンカーには側鎖として M1 のエタノールアミンリン酸の他、マンノース (M4) が 1 残基余分に M3 に入っている。VSG のアンカーは側鎖のガラクトース残基数が ($\pm$ Gal の部分で) 異なる 4 種の同族体の混合物であるのに対し、Thy-1 のアンカーは M4 のマンノースを持つもの (71%) と欠くもの (29%) の混合物である。現在までに 10 種類以上の蛋白質の GPI アンカーの構造が明らかにされているが、その多くの場合、糖鎖に微不均一性 (microheterogeneity) が見られる。著者のグループは、

Liver 5'-nucleotidase

Erythrocyte 42 kDa protein

Fig. 9. Molecular Species of GPI Anchors of Bovine Proteins^{67, 68)}

EtN: ethanolamine, (P): phosphate, Man: mannose, GlcN: glucosamine, HexNAc: N-acetylhexosamine, GlcNAc: N-acetylglucosamine.

Fig. 9 に示したように、ウシ肝 5'-ヌクレオチダーゼ (5'-NT) とウシ赤血球 42 kDa 蛋白質のアンカー構造を報告しているが、^{67, 68)} 5'-NT のアンカーでは、M1 にエタノールアミンリン酸が 1 残基入った分子種が 4 種、M1, M2 の両方にエタノールアミンリン酸が 1 残基ずつ入った分子種が 1 種、計 5 種検出された。⁶⁷⁾ コアにはいっているものも含め、エタノールアミンリン酸が 2 残基入る主成分の 4 分子種の含量が 97%、3 残基入る 1 分子種の含量が 3% であった。現在までに構造決定された哺乳動物のすべての GPI アンカー蛋白質のアンカーでは、その M1 位のマンノースに必ずエタノールアミンリン酸が 1 残基含まれていて、原虫や酵母など他の真核生物の GPI アンカーの構造との差になっている。これは、生物間の GPI 糖鎖生合成系の相違に基づく。すなわち、哺乳動物の GPI 生合成系 (Fig. 10)⁶⁹⁾ は原虫や酵母の系と種々の点で異なるが、特に PE を供与体とする M1 マンノースへのエタノールアミンリン酸の導入 (図中の Step B) に相当する反応段階は、他の生物の系では見当たらない。また、この系の最後の段階に示すように、供与体 PE によりエタノールアミンリン酸が M1, M3 に入った前駆体 H7 と M1, M2, M3 に入った前駆体 H8 が蛋白質の C 末端に結合して GPI 化を起こす。これらは、Fig 9 に示したウシ 5'-NT のアンカーにおける 5 つの分子種と、エタノールアミンリン酸が入るマンノース残基の所在位置の点でよく一致している。一方、この生合成系の第 1 段階 (Step A) では、UDP-GlcNAc が PI に対する N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 供与体として働き、最初の中間体 GlcNAc-PI を生ずるが、この段階の反応に関与する遺伝子 *PIG-A* がヒトで後

Fig. 10. Biosynthesis of GPI in Mammals⁶⁹⁾

UDP-GlcNAc: UDP-*N*-acetylglucosamine, GlcN: glucosamine, acyl: mainly palmitoyl, GDP-Man: GDP-mannose, Dol-P-Man: dolichol phosphate-mannose, Man: mannose, PE: phosphatidylethanolamine (EtN-P donor), EtN: ethanolamine, P: phosphate.

天的に変異を起こして機能しなくなると、一種の GPI 欠損症として発作性夜間血色素尿症 (PNH) を発症することが示されている。⁷⁰⁾

さて、蛋白質が GPI 化される過程、すなわち上記のような生合成系により生じた GPI 前駆体と結合して蛋白質が翻訳後修飾される一連の経過については Fig. 11 のようなモデルが大筋において了解されている。⁷¹⁾ このプロセッシングにおいては、まず小胞体膜上のリボソームで合成された蛋白質のポリペプチド鎖は、N 末端リーダーペプチドを切断され、C 末端に位置する疎水性ペプチド (シグナルペプチドの一部) を介して小胞体膜内腔側に付着した形で、シャペロン BiP, ATP, GTP の関与の下に膜上を転位し、C 末端トランスアミダーゼ複合体及び GPI 前駆体に接近するとされる。⁷²⁾ そして、トランスアミダーゼ複合体の作用によって、蛋白

Fig. 11. Posttranslational Modification of Protein by GPI

質の C 末端シグナルペプチドが切断され、このペプチドを置換する形で、GPI 前駆体先端のエタノールアミン残基が新しい C 末端アミノ酸のカルボキシル基と酸アミド結合する。⁷¹⁻⁷³⁾ ここで GPI 化された蛋白質は、ゴルジ体で GPI 側鎖部の修飾を受け、細胞内輸送されて細胞膜外側に達し、いわゆる GPI アンカー型膜表面性蛋白質となる。

しかし、小胞体膜上のリボソームで合成される蛋白質がすべて GPI 化されるわけではなく、蛋白質がこのような GPI による翻訳後修飾を受けるためには、Fig. 12 に示すように、トランスアミダーゼ複合体によるペプチド切断の際に GPI 前駆体と結合する ω 位アミノ酸と、切り離されて置換される $\omega+1$ 位以降の C 末端ペプチド (C 末端シグナルペプチド) のアミノ酸配列が、必要な構造上の条件に合致していなければならない。⁷³⁾ C 末端シグナルペプチドは $\omega+1$, $\omega+2$ 位を含む短い親水性スパーサー領域と、それより長い疎水性領域とから構成される。但し、他の脂質アンカーの場合と異なり、これら 2 つの領域のアミノ酸配列は、一定のコンセンサスを持たない上、特定の短いモチーフ配列も含んでいない。しかし、Udenfriend らは、トランスアミダーゼ複合体が蛋白質を GPI 修飾する部位、すなわちペプチド切断/GPI 付着部位 ω とそれに続くシグナルペプチド N 末端 $\omega+1$, $\omega+2$ 位のアミノ酸に着目し、GPI アンカー蛋白質の試料としてヒト胎盤アルカリ性ホスファターゼ (PLAP) 及びその人工的短縮蛋白質 miniPLAP を用いて、これら 3 つの部位のアミノ酸を部位特異的変異 (site-directed mutagenesis) により他のアミノ酸に変えた変異酵素を COS 細胞で発現させ、GPI 化のための条件を調べた。^{72, 73)} その結果、蛋白質を効率的に GPI 化するアミノ酸は ω 位ではセリン>アスパラギン>アラニン、アスパラギン酸、グリシン>システインの順に 6 種、 $\omega+1$ 位はアラニン>セリン>アルギニン>アスパラギン酸>システイン、メチオニン、スレオニン>トリプトファンの順に 8 種、 $\omega+2$ 位はアラニン、グリシン>セリン>スレオニン>アスパラギン酸>バリンの順に 6 種であることが示された。⁷²⁾ これは、アミド基転位 (transamidation) 反応により、GPI を蛋白質へ導入する酵素トランスアミダーゼ複合体の基質特異性を反映するものと

Fig. 12. Characteristics of C-Terminal Signal Peptide in GPI-Anchored Protein

いえる。すなわち、蛋白質の GPI 化が起こるためには、 ω , $\omega+2$ 位を占めるアミノ酸にかなり高い特異性が要求されるが、 $\omega+1$ 位のアミノ酸に対する選択性は広く、特異性が低い。

著者らは、ウシ肝 5'-NT を GPI アンカー蛋白質の試料として、蛋白質 GPI 化のための C 末端シグナルペプチドの条件を調べた。^{74,75)} Fig. 13 に示すように、この酵素におけるペプチド切断/GPI 付着の ω 部位は Ser523 であることを既に同定している^{67,76)} C 末端シグナルペプチドは、 $\omega+1$ 位の Ala524 に始まって Gln548 に終わる 25 個のアミノ酸から成り、親水性スペーサー領域の 8 アミノ酸残基と疎水性領域の 17 アミノ酸残基とに区分される。一般に、C 末端シグナルペプチドの親水性スペーサー領域は長くても 17 残基程度で、疎水性領域に比べてかなり短いので、従来その意義についてはあまり検討されなかった。そこで著者らは、5'-NT の野生株の酵素から出発し、スペーサー領域のペプチド鎖 AGSHCCGS を C 末側から 2 残基ずつ削ってアミノ酸残基数を 0—6 とした短縮変異株と、この領域の C 末端 Ser531 と疎水性領域 N 末端 Phe532 との間にアラニンを 2—9 個挿入し、このアラニンを含めてスペーサー領域を 10—17 残基とした伸長変異株を作り、COS 細胞で発現させて GPI 化の程度を調べた。⁷⁵⁾ その結果、Fig. 13(a) に示すように、短縮によりスペーサー領域が 6 残基となるとウシ肝 5'-NT 活性の発現量が減り、0—4 残基のところではほぼゼロとなった。したがって、4 残基前後が、GPI 化のための臨界的なスペーサー領域の長さであると思われる。一方、スペーサー領域をアラニンにより伸長した場合は、酵素活性の発現量はアミノ酸残基数 8—10 個のとき最大となった。さらに伸長すると、12—14 残基のところまでは活性の発現がやや減少するが、15—17 残基まで伸ばすと、野生株並の発現レベルまで回復した。これらの結果より、GPI 化のために十分なスペーサー領域の長さは 6—14 残基あればよく、それを越えると ω , $\omega+2$ 位のアミノ酸残基が C 末端下流にシフトし、スペーサー領域が最適の長さ (8—10) に近づくよう短縮する形で調節すると思われる。要するに、トランスアミダーゼ複合体の触媒部位に、 ω — $\omega+2$ 位の C 末端アミノ酸配列が入りやすくなるような調節機構が働いていると考えるべきである。

(a) Requirement of Hydrophilic Spacer Region

(b) Requirement of Hydrophobic Region

Fig. 13. Requirement of C-Terminal Signal Peptide for GPI-Anchoring in Bovine Liver 5'-Nucleotidase (5'-NT)^{74, 75)}

GPI アンカー蛋白質の C 末端シグナルペプチドの疎水性領域は、本来 GPI による翻訳後修飾が行われるまで、ポリペプチド鎖を小胞体膜に保持する役割を担うものであるから、その疎水度と最小限のアミノ酸残基数が重要である。Coyne らは、短縮した蛋白質 CD46 の C 末端にロイシンのみから成る疎水性ペプチドを結合させたとき、細胞膜上に GPI アンカー蛋白質として発現するには、少なくとも 11 個のロイシン残基が必要であると報告している。⁷⁷⁾ しかし、天然の GPI アンカー蛋白質では、その疎水性領域にロイシンと共に他の疎水性アミノ酸が含まれる上、親水性アミノ酸も多少混在している。したがって、このロイシンでの例を直ちに最小限の長さとするには無理がある。Fig. 13(b) は、著者らのグループがウシ肝 5'-NT の疎水性領域を C 末端側から短縮した変異株を作り、COS 細胞で発現させて得られた結果を要約したものである。⁷⁴⁾ この酵素蛋白質の C 末端からアミノ酸残基を 2 個ずつ欠失させると、疎水性ペプチド領域 17 残基中で 4 残基まで欠失させても、5'-NT を GPI アンカー型で発現させることができた。すなわち、5'-NT の GPI 化に必要な疎水性領域の最小鎖長は 13 残基であった。さらにペプチド鎖を短縮して鎖長を 9—11 残基にすると、活性は細胞膜上に発現されず、細胞内に一部残存した。これは、おそらく細胞内で消化を受けたものとみられる。他の蛋白質の例と照合して計算すると、この領域の疎水度（構成アミノ酸の疎水度の総和）が 40 以上で GPI 化が起こるが、32 以下の場合には起こらないと推論される。また、5'-NT の C 末端シグナルペプチドの全疎水性領域 17 残基、又は全シグナルペプチド 25 残基を削った変異株では、酵素活性は細胞外へ分泌される形で発現した。

さて、GPI アンカー蛋白質は、前述したように広汎な真核生物の細胞表面膜に存在することが明らかとなっている。その中で最も多量に存在するのは、原虫などの単細胞生物で、コート蛋白質 VSG のように宿主の免疫系に対する防御・侵襲に寄与しているものが多い。一方、哺乳動物のような多細胞生物では、量的には少ないが、多彩な機能を担っており、進化の過程で GPI アンカー蛋白質の機能分化が起こったことを物語る。また、GPI アンカー蛋白質は、常に厳しい環境にさらされる単細胞生物のみならず、多細胞生物でも腎・腸の上皮細胞や白血球、赤血球のように、外界から流入する物質や微生物と接触するところに多い。著者らは、昆虫の GPI アンカー蛋白質に注目し、まずカイコ幼虫中腸の刷子縁膜に PIPLC を作用させ、アルカリ性ホスファターゼ、アミノペプチダーゼ N が可溶化されることを見出した。^{78, 79)} ついで、アミノペプチダーゼ N の精製と cDNA クローニングを行い、本酵素には 110, 100, 95, 90 kDa の 4 つのアイソザイムがあり、いずれも GPI アンカー蛋白質であることを明らかにした。⁸⁰⁻⁸²⁾ 現在、本酵素は昆虫病原菌 *B. thuringiensis* の芽胞内に産生される昆虫毒素 δ -endotoxin の受容体⁸³⁾であることが判明し、注目を浴びている。

GPI アンカー蛋白質は、原核生物である真正細菌では、その存在が認められていない。一方、16S 様リボソーム RNA の塩基配列の比較で、古細菌 *Sulfolobus* に最も近いとされる原虫 *Giardia lamblia* (ランブル鞭毛虫)⁸⁴⁾ は、GPI アンカー蛋白質 GP49 を持っている。⁸⁵⁾ *G. lamblia* はミトコンドリアを持たず、始原真核生物に近いと考えられているので、著者らは古細菌 *Sulfolobus* にも GPI アンカー蛋白質が存在するのではないかと考え、検索を行った。¹⁴C-標識したエタノールアミン、GlcNAc、イノシトール、メバロン酸を、GPI 前駆体として *Sulfolobus* の培地に加えて培養した結果、これら 4 種の前駆体により共通に代謝標識される上に PIPLC 感受性を示す蛋白質を見出し、GPI アンカー蛋白質が真核生物以外で古細菌にも存在することを示した。⁸⁶⁾ これは、古細菌あるいはそれに近い始原真核生物に、真正細菌が侵入して、ミトコンドリアや葉緑体となったという共生進化のプロセスで、蛋白質の GPI 化に関わる遺伝子が寄生者側でなく宿主側に存在したと理解することができる。

おわりに

本稿では、細菌ホスホリパーゼ C の研究から GPI アンカー蛋白質に到達した経緯について述べたが、特にコメントすべきこととしては、近い将来、病原性原虫と哺乳動物の GPI 生合成系の差を突いて、原虫に対し選択毒性を発揮する薬剤が開発され、アジア、アフリカ、中南米で睡眠病その他の原虫感染症に悩まされている人々を救うであろうと予言する。実際に著者は、欧米や国内のいくつかの研究室で、そのような目的で実験が進められていることを知っている。

本総説で触れた著者の研究において、ご協力頂いた名古屋市立大学薬学部微生物薬品学教室の現職員、田口 良、塚本喜久雄、小林とも子の諸氏、旧職員、奥山治美、中林利克、富田昌弘、小林洋子、田村悦臣の諸氏、共同研究者の諸氏に心から謝意を表する。

引用文献

- 1) Macfarlane M. G., Knight B. C. J. G., *Biochem. J.*, **35**, 884—902, (1941).
- 2) Glenny A. T., Barr M., Llewellyn-Jones M., Dalling T., Ross H. E., *J. Path. Bact.*, **37**, 53—74 (1933).
- 3) Slein M. W., Logan G. F. Jr., *J. Bacteriol.*, **90**, 69—81 (1965).
- 4) Doery H. M., Magnusson B. J., Cheyne I. M., Gulasekhharam J., *Nature (London)*, **198**,

- 1091—1092 (1963).
- 5) Ikezawa H., Yamanegi M., Taguchi R., Miyashita T., Ohyabu T., *Biochim. Biophys. Acta*, **450**, 154—164 (1976).
 - 6) Ferguson M. A. J., Low M. G., Cross G. A. M., *J. Biol. Chem.*, **260**, 14547—14555 (1985).
 - 7) 池沢宏郎, “生化学データブック I”, 日本生化学会編, 東京化学同人, 東京. 1979, pp. 978—990.
 - 8) 池沢宏郎, 生体の科学, **35**, 429—431 (1984).
 - 9) 池沢宏郎, 田口 良, 蛋白質核酸酵素, **31**, 455—462 (1986).
 - 10) Titball R. W., *Microbiological Reviews*, American Society for Microbiology, 1993, pp. 347—366.
 - 11) Volwerk J. J., Shashidar M. S., Kuppe A., Griffith O. H., *Biochemistry*, **29**, 8059—8062 (1982).
 - 12) Ikezawa H., “Membrane GPI Anchors,” ed. by Cardoso de Almeida M. L., Academic Press, London, 1992, pp. 260—275.
 - 13) Stahl W. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **154**, 47—55 (1973).
 - 14) Taguchi R., Ikezawa H., *Biochim. Biophys. Acta*, **409**, 75—85 (1975).
 - 15) Doery H. M., Magnusson B. J., Gulasekharam J., Pearson J. E., *J. Gen. Microbiol.*, **40**, 283—296 (1965).
 - 16) Tomita M., Taguchi R., Ikezawa H., *Biochim. Biophys. Acta*, **704**, 90—99 (1982).
 - 17) Sundler R., Alberts A. W., Vagelos P. R., *J. Biol. Chem.*, **253**, 4175—4179 (1978).
 - 18) Taguchi R., Asahi, Y., Ikezawa H., *Biochim. Biophys. Acta*, **619**, 48—57 (1980).
 - 19) Little C., Aurebekk B., Otnaess A.-B., *FEBS Lett.*, **52**, 175—179 (1975).
 - 20) Krug E. L., Kent C., *Arch. Biochem. Biophys.*, **231**, 400—410 (1984).
 - 21) Ikezawa H., Taguchi R., Asahi Y., Tomita M., *J. Toxicol.-Toxin Rev.*, **1**, 223—255 (1982).
 - 22) Tomita M., Taguchi R., Ikezawa H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **223**, 202—212 (1983).
 - 23) Ikezawa H. Taguchi R., “Methods in Enzymology,” Vol. 71, Part C, ed. by Lowenstein J. M., Academic Press, New York, 1981, pp. 731—741.
 - 24) Taguchi R., Ikezawa H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **173**, 538—545 (1976).
 - 25) Ostroff R. M., Vasil A. I., Vasil M. L., *J. Bacteriol.*, **172**, 5915—5923 (1990).
 - 26) Bernheimer A. W., Bey R. F., *Infect. Immun.*, **54**, 262—264 (1986).
 - 27) Lysenko O., *Folia Microbiol.*, **17**, 228—231 (1972).
 - 28) Ikezawa H., Kato T., Ohta S., Nakabayashi T., Iwata Y., Ono K., *Toxicon*, **23**, 145—155 (1985).
 - 29) Ikezawa H., Hashimoto A., Taguchi R., Nakabayashi T., Himeno M., *Toxicon*, **27**, 637—645 (1989).
 - 30) Ikezawa H., *J. Biochem.*, **42**, 301—311 (1963).
 - 31) Ikezawa H., Murata R., *J. Biochem.*, **55**, 217—224 (1964).
 - 32) Bretscher M. S., *Nature New Biol.*, **236**, 11—12 (1972).
 - 33) Nelson G. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **144**, 221—232 (1967).
 - 34) Macfarlane M. G., *Biochem. J.*, **47**, 270—279 (1950).
 - 35) Tomita M., Taguchi R., Ikezawa H., *J. Toxicol.-Toxin Rev.*, **10**, 169—207 (1991).

- 36) Ikezawa H., Matsushita M., Tomita M., Taguchi R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **249**, 588—595 (1986).
- 37) Fujii T., Tamura A., *J. Biochem.*, **86**, 1345—1352 (1979).
- 38) Ikezawa H., Mori M., Taguchi R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **199**, 572—578 (1980).
- 39) Taguchi R., Mizuno M., Inoue M., Ikezawa H., *J. Biochem.*, **93**, 403—412 (1983).
- 40) Tomita M., Sawada H., Taguchi R., Ikezawa H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **255**, 127—135 (1987).
- 41) Tomita M., Togami J., Fujimoto Y., Ikekawa N., Taguchi R., Ikezawa H., *Toxicon*, **30**, 801—813 (1992).
- 42) Johansen T., Holm T., Guddal P. H., Sletten K., Haugli F. B., Little C., *Gene*, **65**, 293—304 (1988).
- 43) Yamada A., Tsukagoshi N., Udaoka T., Sasaki S., Makino S., Nakamura S., Little C., Tomita M., Ikezawa H., *Eur. J. Biochem.*, **175**, 213—220 (1988).
- 44) Kuppe A., Evans L. M., McMillien D. A., Griffith O. H., *J. Bacteriol.*, **171**, 6077—6083 (1989).
- 45) Tamura H., Tameishi K., Yamada A., Tomita M., Matsuo Y., Nishikawa K., Ikezawa H., *Biochem. J.*, **309**, 757—764 (1995).
- 46) Gilmore M. S., Cruz-Rodz A. L., Leimeister-Wachter M., Kreft J., Goebbel W., *J. Bacteriol.*, **171**, 744—753 (1989).
- 47) Tomita M., Ueda Y., Tamura H., Taguchi R., Ikezawa H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1203**, 85—92 (1993).
- 48) Tamura H., Tameishi K., Yamagata H., Udaoka S., Kobayashi T., Tomita M., Ikezawa H., *J. Biochem.*, **1112**, 488—491 (1992).
- 49) Projan S. J., Kornblum J., Kreithwirth B., Moghazef S. L., Eiser W., Novick R. P., *Nucleic Acids Res.*, **17**, 3365 (1989).
- 50) Segers R. P. A. M., Van der Drift A., De Nijs A., Corcione P., Van der Zeijst B. A. M., Gaastra W., *Infect. Immun.*, **58**, 2177—2185 (1990).
- 51) Nishikawa K., Matsuo Y., *Protein Eng.*, **6**, 811—820 (1993).
- 52) Matsuo Y., Yamada A., Tsukamoto K., Tamura H., Ikezawa H., Nakamura H., Nishikawa K., *Protein Science*, **5**, 2459—2467 (1996).
- 53) Slein M. W., Logan G. F. Jr., *J. Bacteriol.*, **80**, 77—85 (1960).
- 54) Slein M. W., Logan G. F. Jr., *J. Bacteriol.*, **83**, 359—369 (1962).
- 55) Ikezawa H., Mori M., Ohyabu T., Taguchi R., *Biochim. Biophys. Acta*, **528**, 247—256 (1978).
- 56) Low M. G., Finean J. B., *Biochem. J.*, **167**, 281—284 (1977).
- 57) Low M. G., Finean J. B., *FEBS Lett.*, **83**, 143—146 (1977).
- 58) Taguchi R., Ikezawa H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **186**, 196—201 (1978).
- 59) Low M. G., Finean J. B., *Biochim. Biophys. Acta*, **508**, 565—570 (1978).
- 60) Nakabayashi T., Ikezawa H., *Cell Struct. Funct.*, **9**, 247—263 (1984).
- 61) Takesue Y., Yokota K., Nishi Y., Taguchi R., Ikezawa H., *FEBS Lett.*, **201**, 5—8 (1986).
- 62) Taguchi R., Asahi Y., Ikezawa H., *Biochim. Biophys. Acta*, **619**, 48—57 (1980).

- 63) Ikezawa H., Nakabayashi T., Suzuki K., Nakajima M., Taguchi T., Taguchi R., *J. Biochem.*, **93**, 1717—1719 (1983).
- 64) Schneider P., Ferguson M. A. J., MaConville M. J., Mehlert A., Homans S. W., Bordier C., *J. Biol. Chem.*, **265**, 16955—16964 (1990).
- 65) Ferguson M. A. J., Homans S. W., Dwek R. A., Rademacher T. W., *Science*, **239**, 753—759 (1988).
- 66) Homans S. W., Ferguson M. A. J., Dwek R. A., Rademacher T. W., Anand R., Williams A. F., *Nature*, **333**, 269—272 (1988).
- 67) Taguchi R., Hamakawa N., Harada-Nishida M., Fukui T., Nojima, K., Ikezawa H., *Biochemistry*, **33**, 1017—1022 (1994).
- 68) Taguchi R., Yamazaki J., Takahashi M., Hirano A., Ikezawa H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **363**, 60—67 (1999).
- 69) Mohny R. P., Knez J. J., Ravi L., Sevlever D., Rosenberry T. L., Hirose S., Medof M. E., *J. Biol. Chem.*, **269**, 6536—6542 (1994).
- 70) Takeda J., Miyata T., Kawagoe K., Iida Y., Endo Y., Fujita T., Takahashi M., Kitani T., Kinoshita T., *Cell*, **73**, 703—711 (1993).
- 71) 池沢宏郎, 日本細菌学雑誌, **52**, 435—459 (1997).
- 72) Udenfriend S., Kodukula K., *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 563—591 (1995).
- 73) Udenfriend S., Micanovic R., Kodukula K., “GPI Membrane Anchors,” ed. by Cardoso de Almeida M. L., Academic Press, London 1992, pp. 1—21.
- 74) Furukawa Y., Tamura H., Ikezawa H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1190**, 273—278 (1994).
- 75) Furukawa Y., Tsukamoto K., Ikezawa H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1328**, 185—196 (1997).
- 76) Suzuki K., Furukawa Y., Tamura H., Ejiri N., Suematsu H., Taguchi R., Nakamura S., Suzuki Y., Ikezawa H., *J. Biochem.*, **113**, 607—613 (1993).
- 77) Coyne J. E., Crisci A., Lubin D. M., *J. Biol. Chem.*, **268**, 6689—6693 (1993).
- 78) Takesue Y., Yokota K., Miyajima S., Taguchi R., Ikezawa H., *J. Biochem.*, **105**, 998—1001 (1989).
- 79) Takesue S., Yokota K., Miyajima S., Taguchi R., Ikezawa H., Takesue Y., *Comp. Biochem. Physiol.*, **102B**, 7—11 (1992).
- 80) Hua G., Tsukamoto K., Taguchi R., Tomita M., Miyajima S., Ikezawa H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1383**, 301—310 (1998).
- 81) Hua G., Tsukamoto K., Rasilo M.-L., Ikezawa H., *Gene*, **214**, 177—185 (1998).
- 82) Hua G., Tsukamoto K., Ikezawa H., *Comp. Biochem. Physiol.*, **121B**, 213—222 (1998).
- 83) Harvey W. R., Wolfersberger M. G., *J. Exp. Biol.*, **83**, 293—304 (1979).
- 84) Sogin M. L., Gunderson J. H., Elwood H. J., Alonso R. A., Pearrie D. A., *Science*, **243**, 75—77 (1989).
- 85) Das S., Traynor-Kaplan A., Reiner D. S., Meng T. C., *J. Biol. Chem.*, **266**, 21318—21325 (1991).
- 86) Kobayashi T., Nishizaki R., Ikezawa H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1334**, 1—4 (1997).