

機関番号：34413

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590075

研究課題名 (和文) スフィンゴミエリナーゼの触媒機構の分子論

研究課題名 (英文) Molecular mechanism for the catalysis by sphingomyelinase

研究代表者

藤井 忍 (FUJII SHINOBU)

大阪薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80218966

研究成果の概要 (和文) : *Bacillus cereus* 菌由来 SMase の分子内には、活性部位 (狭義の基質結合部位) とは別にアロステリック部位 (界面認識部位) が存在し、アロステリック部位に基質が協同的に集合すると、SMase は高次構造が変化して活性化されることが示唆された。また、界面の認識には Pro 26, Trp 28, および Asp 100 の関与が示唆された。さらに、SM のリン酸エステルをチオリン酸に置換した SM アナログは SMase の酵素活性を測定するための基質として有用であることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文) : We found that *Bacillus cereus* SMase has at least two bind sites for substrate, one at the active site and the other at the allosteric site (surface recognition site). The cooperative binding of substrate to the allosteric site induced the structure change for the activation of SMase. Pro 26, Trp 28, and Asp 100 of *B. cereus* SMase were found to be participate the surface recognition. Furthermore, we found that a thiophosphate analog of SM, in which the phosphate oxygen was replaced by sulfur atom, can be used for the substrate of the measurement of SMase activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：スフィンゴミエリナーゼ, 触媒機構, 基質認識

## 1. 研究開始当初の背景

スフィンゴミエリナーゼ(SMase)は、スフィンゴミエリン (SM) のリン酸エステル結合を加水分解し、セラミド (Cer) とホスホコリンを産生する酵素であり、古くから赤血球の溶血を引き起こす細菌の菌体外毒素として知られていた。

SMase の基質である SM は当初、生体膜の構成成分もしくは糖脂質の基本構成要素として一般的に認識されていたが、白血病細胞の分化誘導時に SM の加水分解産物として生

成される Cer が細胞内シグナル分子として働くことが示され、その後、TNF- $\alpha$  や Fas 抗体によるアポトーシス誘導時に細胞内 Cer 濃度が上昇すること、細胞外から添加した Cer がアポトーシスを誘導することなどが明らかになり、Cer によるアポトーシス誘導の知見が蓄積されるようになってきた。さらに、細菌由来の SMase を動物細胞に添加すると、分化やアポトーシスの誘導が見られることが報告されるにいたって、SMase は Cer の産生、さらにはアポトーシスの誘導に対して、

key enzyme になることが予想された。

SMase は、哺乳動物において至適 pH の違いから 3 つの分子種に分類される。

酸性 SMase (A-SMase) は、ヒトにおける遺伝的欠損症において、SM が神経細胞などに蓄積し、精神運動障害を引き起こす Niemann-Pick 病の原因酵素として知られている。最近、細胞外からの刺激に対して A-SMase が細胞膜上に移動して Cer 産生を促進することが報告され、A-SMase のシグナル伝達機構への関与が指摘されている。

中性 SMase (N-SMase) の遺伝子は、1998 年に、細菌由来 SMase の部分構造との相同性に基づき、データベースから見出された。その後、検索法の改良により、もうひとつの N-SMase がクローニングされ、先の酵素を N-SMase1、後の酵素を N-SMase2 と名づけられた。N-SMase1 はあらゆる組織に分布し、細胞内では小胞体に局在する。N-SMase2 は脳内に分布し、細胞内ではゴルジ体に局在すが、これらの酵素の役割については、いまだ解明されていない。

アルカリ性 SMase (Alk-SMase) は、2003 年にクローニングされ、ecto-nucleotide phosphodiesterase (ENPP) ファミリーと 30-36% のホモロジーのあることが報告された。Alk-SMase は小腸に局在することから、食物の消化に関与すると思われたが、近年、Alk-SMase の酵素活性は大腸癌において低下することが報告され、その関連性が注目されている。

一方、ある種の病原菌には触媒作用に  $Mg^{2+}$  を必要とする SMase が存在し、赤血球の溶血を引き起こす菌体外毒素として作用している。本酵素は前述の N-SMase と部分的に一次構造が類似しており、その触媒機構も類似していると考えられている。

このような酵素 SMase の触媒および界面認識機構の解明を行う基礎研究は、SMase の生体内調節機構の完全な解明や医薬品の開発などに直結するものではない。しかし、微視的な基礎研究によって、SMase の種々の分子種の触媒機構の共通性や相違点が明確になれば、特異的な阻害物質や活性化物質の開発が容易になり、それらは Cer が関与する細胞内情報伝達機構の解明や本酵素が関与する病態の早期解明に貢献できるとともに、医薬品の開発に繋がることが期待される。

## 2. 研究の目的

これまで私達は、*Bacillus cereus* 菌由来 SMase の触媒機構を解明すべく研究を行ってきた。その結果、触媒作用に必要な  $Mg^{2+}$  の結合部位は 2 ヶ所存在し、高親和性部位に対する結合は酵素の安定性に寄与し、低親和性部位に対する結合は触媒作用における反応中間体の安定化に寄与することを明

らかにした。さらに、これまで  $Zn^{2+}$  は本酵素の活性を強く阻害するとされてきたが、極端な低濃度では、触媒作用に関与する  $Mg^{2+}$  結合部位に結合して酵素を活性化するが、それよりも高濃度になると、新たな金属結合部位に結合し、酵素活性を阻害することを明らかにした。また、*in vitro* mutagenesis によるアミノ酸置換と酵素反応速度論を用いた実験結果から、この酵素の触媒機構は His 296 による一般塩基触媒であることを明らかにした。

SMase に限らず、リン脂質を加水分解する酵素は、基質となるリン脂質が膜を形成しているため、酵素活性はその膜（界面）を認識することが予想される。事実、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) は、基質であるリン脂質がミセルを形成するとその活性は 100 倍から 1000 倍に増大することが知られている。この作用は PLA<sub>2</sub> 分子内に界面認識部位が存在し、この部位に界面が結合すると PLA<sub>2</sub> の構造変化が誘起され、酵素活性が増大すると考えられている。本研究の一つ目の目的は、*B. cereus* 菌由来 SMase にも、PLA<sub>2</sub> と同じような界面認識機構があることを明瞭にすることと、酵素分子内における認識部位を明らかにすることである。

また、SMase のような加水分解酵素の基質の一部を置換し、加水分解されないようにデザインした化合物（基質アナログ）は、酵素と基質の相互作用を調べるための有益なツールとなる。さらに、酵素-基質アナログの複合体構造を明らかにすることは、触媒機構の解明に大きな進展をもたらす。そこで、本研究の二つ目の目的は、種々の SM アナログを合成し、その阻害機構を調べるとともに、*B. cereus* 菌由来 SMase と基質アナログとの複合体構造を明らかにし、SMase の触媒機構の全貌を解明することである。

他方、哺乳類由来 SMase の触媒機構に関しては、N-SMase では、部分構造が細菌由来 SMase と類似することと、*in vitro* mutagenesis によるアミノ酸置換の結果から、触媒基は His であることが示されており、その酵素活性に必要な  $Mg^{2+}$  は反応中間体の安定化に寄与すると言われている。一方、A-SMase と Alk-SMase はアミノ酸配列のホモロジーが高いホスファターゼとホスホジエステラーゼの触媒機構に基づき、活性中心として金属イオンが作用すると考えられている。しかしこれらの哺乳類由来の SMase については、酵素作用に重要な役割を果たす金属イオンの結合様式を含めた触媒機構の全容の解明には至っていない。本研究の三つ目の目的はこれら哺乳類由来 SMase の触媒機構を解明することである。

### 3. 研究の方法

#### ①ホスファチジルコリンを用いた相互作用の解析

*B. cereus* 菌由来 SMase の界面認識機構を調べるため、Decanoyl-LysoPC (C<sub>10</sub>-LysoPC) の cmc と SMase による加水分解速度を調べたところ、cmc の 1/3 付近の濃度で加水分解速度が急激に増大し、cmc 付近ではわずかな変化しか見られなかった。また、酵素反応速度-基質濃度曲線は一般的な飽和曲線ではなく S 字型を示したことから、SMase 分子内には活性部位の他にアロステリック部位が存在し、この部位に単分子分散状の LysoPC が協同的に集合することで SMase が活性化される可能性が示唆されたが、立証できなかった。

他方、*B. cereus* 菌由来 SMase は SM や LysoPC を加水分解できるが、PC は加水分解できない。そこで、アシル基の炭素鎖が短い PC を用い、SMase との相互作用について蛍光法や表面プラズモン共鳴を用いて調べ、単分子分散状態とミセル状態の PC との結合様式の違いを明らかにすることで、アロステリック相互作用の存在を明らかにする。

#### ②SM アナログを用いた相互作用の解析

SMase によって加水分解されない基質アナログ (SM のリン酸エステルの酸素原子を種々の原子に置換した化合物) と SMase の相互作用を調べることは、SMase の基質結合様式を明らかにするために、有益な情報を与える。そこで、種々の SM アナログを合成し、SMase に対する阻害を調べる。さらに、強く阻害を示す化合物については、SMase との複合体構造を明らかにするために、結晶化を行う。

#### ③in vitro mutagenesis によるアミノ酸置換体酵素を用いた酵素反応速度論的解析

私達はすでに、*B. cereus* 菌由来 SMase の *B. brevis* を宿主とする発現系を確立している。また、本酵素の立体構造は報告されているので、in vitro mutagenesis によって、分子表面に露出していると思われる疎水性のアミノ酸残基を置換し、アシル基の炭素鎖が短い LysoPC を基質に用いた加水分解反応などを調べることによって、界面認識に関与するアミノ酸残基の同定を行う。

#### ④哺乳類由来 N-SMase の発現系の構築

細菌由来 SMase の一次構造と一部相同性のある哺乳類由来 N-SMase の塩基配列は報告されており、私はすでに、マウスで本酵素の発現している臓器の cDNA から PCR により遺伝子を増幅し、発現ベクターに組み込んだ。そこで、発現用大腸菌に形質転換し、SMase の大量発現系を構築する。

### 4. 研究成果

#### ①ホスファチジルコリンを用いた相互作用の解析

SMase の表面に単分子分散状のリン脂質が集合することを確認するために、SMase によって加水分解されないアシル基の炭素鎖の短い PC である diC<sub>6</sub>PC を用いて、SMase の分子表面への凝集について調べた。微量の TNS が疎水表面の存在によって蛍光を放射することを利用して、diC<sub>6</sub>PC の凝集の始まる濃度を調べた結果、SMase が存在すると、diC<sub>6</sub>PC は、その cmc よりも低濃度で凝集することが明らかになった。しかし、この結果からは SMase と diC<sub>6</sub>PC との直接的な相互作用の存在を証明できない。そこで次に、Biacore を用いて SMase と diC<sub>6</sub>PC の直接結合を調べた。センサーチップ上に SMase を固定し、種々の濃度の diC<sub>6</sub>PC 溶液を添加することで得られる SPR の変化を測定したところ、diC<sub>6</sub>PC は単分子分散状態である 0.6mM 以下では濃度依存的に SMase と結合し、結合した diC<sub>6</sub>PC は解離しにくいことがわかった。また、0.6mM から cmc (1.0mM) までの濃度では濃度依存的に diC<sub>6</sub>PC の結合速度が速くなったが、解離しない diC<sub>6</sub>PC の量が減少した。cmc 以上では diC<sub>6</sub>PC の非常に速い結合と速い解離が見られた (図 1)。こ

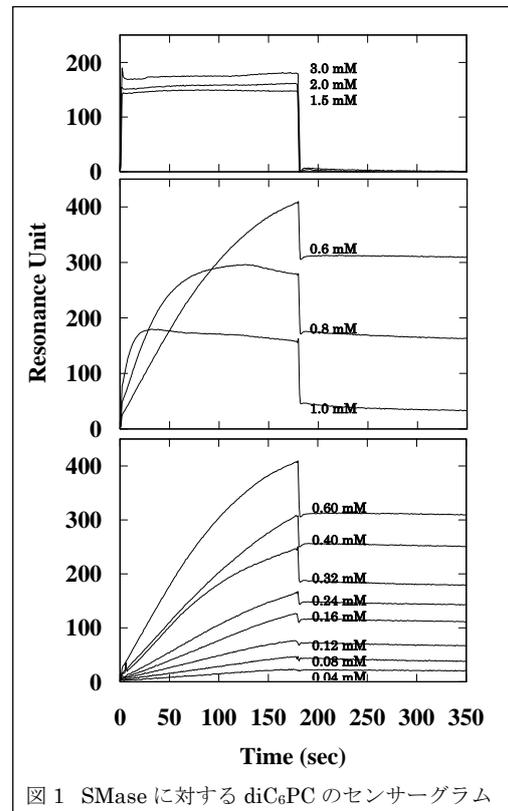


図 1 SMase に対する diC<sub>6</sub>PC のセンサーグラム

の結果から、単分子分散状の diC<sub>6</sub>PC は直接 SMase と結合することが明らかになった。また、diC<sub>6</sub>PC の濃度によって 3 つの異なるセンサーグラムが得られたことから、SMase

と diC<sub>6</sub>PC との結合様式は diC<sub>6</sub>PC の濃度によって変化することが明らかになった。以上の結果から、SMase 分子内には、活性部位(狭義の基質結合部位)とは別にアロステリック部位(界面認識部位)が存在し、一定濃度以上の単分子分散状の基質が存在すると、SMase のアロステリック部位に基質が協同的に集合し、酵素の高次構造の変化が誘発されることによって酵素が活性化されることが示唆された(図 2)。

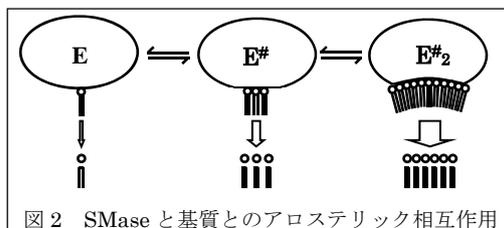


図 2 SMase と基質とのアロステリック相互作用

### ②SM アナログを用いた相互作用の解析

SMase は SM のリン酸エステル結合を加水分解する。そこで、SM のリン酸エステル結合の酸素原子をメチレン(-CH<sub>2</sub>-)、エチレン(-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)、硫黄(-S-)、アミン(-NH-)、およびジフルオロメチレン(-CF<sub>2</sub>-)に置換した SM アナログを合成し、*B. cereus* 菌由来 SMase の酵素活性に及ぼす影響を調べた。その結果、これらの化合物のすべては SMase の酵素活性を阻害し、阻害の強さは NH > CF<sub>2</sub> > CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> > CH<sub>2</sub> > S の順であった。次に、NH アナログと CH<sub>2</sub> アナログについて SMase の阻害様式を、真の基質である SM や C<sub>16</sub>-LysoPC と Triton X-100 との混合ミセル、および合成基質であるミセル状 2-*N*-Hexadecanoylamino-4-nitrophenylphosphocholine (HNP) を基質に用いて調べた結果、HNP を基質に用いた場合には不競合阻害を、SM を基質に用いた場合には混合型阻害を示したが、Lyso-PC を基質に用いた場合には逆に酵素活性を増大させた。

前述①の結果から、SMase 分子内には、活性部位とは別にアロステリック部位が存在し、アロステリック部位に基質が協同的に集合すると、SMase が構造変化を伴って活性化されることを示した。このことから、今回用いた基質アナログは、基質結合部に結合して活性阻害に寄与するとともに、アロステリック部位にも結合して活性化にも寄与することが考えられた。また、以上の結果から、SMase との複合体を作成するための良い SM アナログは得られなかったため、さらなる SM アナログの開発が必要であると考えられた。

他方、SM アナログの中で、酸素原子を硫黄に置換した化合物だけは SMase によって加水分解されることが明らかになった。この化合物は、SMase が作用すると遊離の SH 基を産生する。そこで、DTNB を用いて、産

した SH 基を比色定量し、経時的に連続測定可能な SMase の酵素活性測定法を開発することができた(図 3)

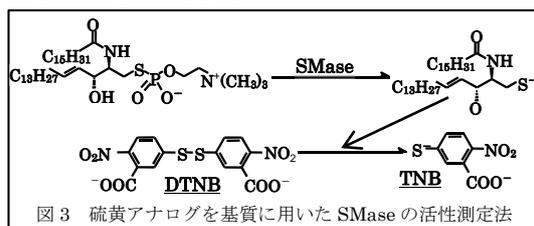


図 3 硫黄アナログを基質に用いた SMase の活性測定法

### ③in vitro mutagenesis によるアミノ酸置換体酵素を用いた酵素反応速度論的解析

以前我々は、*B. cereus* 菌由来 SMase の触媒作用は Mg<sup>2+</sup>を必要とし、H296 による一般塩基触媒であることを明らかにした。また、D126 と D156 のアミノ酸残基を N に置換することによって、D126 は触媒作用と基質結合の両方に関与し、D156 は触媒作用のみに関与することを示した。さらに、この 2 つのアミノ酸残基は金属イオンと相互作用しないことを明らかにした。最近、*B. cereus* 菌由来 SMase の立体構造を明らかにされ(図 4)、さらにアミノ酸残基を置換することで、W284 と F285 は細胞膜への結合に重要な役割を持つことが示された。

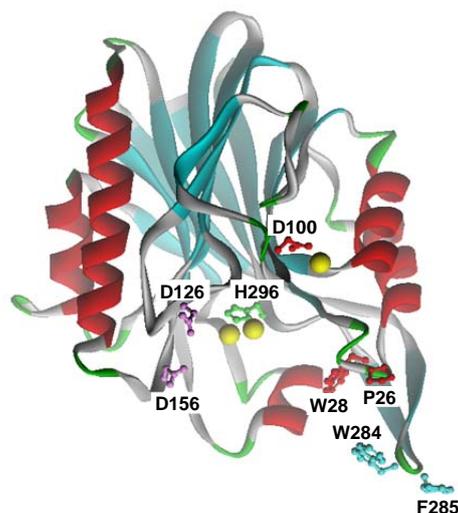


図 4 *B. cereus* 菌由来 SMase の立体構造

そこで、SMase の基質認識機構を詳細に調べるために、立体構造から基質結合または膜結合への関与が予想される P26 と W28、および、金属イオンとの配位を伴って膜結合への関与が予想される D100 をそれぞれ G (P26G), A (W28A), および N (D100N) に置換した酵素を調製し、3 種類の異なる基質を用いて、酵素反応パラメーターを測定した。

前述②で用いた 3 種類の基質を用いて、置換体の酵素反応パラメーターを測定し、WT の結果と比較した。SM を基質に用いた場合、

すべての置換体において  $V_{max}$  値は若干増大し  $K_m$  値は増大した。C<sub>16</sub>-LysoPC を基質に用いた場合、 $V_{max}$  値はすべての置換体で減少し、 $K_m$  値は W28A のみで増大した。さらに、HNP を基質に用いた場合、 $V_{max}$  値は P26G と D100N で減少し W28A で増大したが、 $K_m$  値はすべての置換体で大きく増大した。以上の結果、アミノ酸残基を置換したことによる影響は、 $V_{max}$  値に比べて  $K_m$  値の方が非常に大きく、その値は増加する傾向にあったことから、これら 3 つのアミノ酸残基は基質との結合を強めることがわかった。また、D100 は金属イオンと配位することから、D100N の加水分解作用に及ぼす金属イオン (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, および Zn<sup>2+</sup>) の影響を調べた結果、D100N の酵素活性は WT に比べて約半分に低下したものの、金属イオンの解離定数はほぼ同じ値になり、D100 と配位する金属イオンは酵素活性に影響しないことがわかった。

#### ④哺乳類由来 N-SMase の発現系の構築

哺乳類由来中性 Mg<sup>2+</sup> 依存性 SMase の full-length の遺伝子を挿入したプラスミドを用いて大腸菌で発現を試みたが、どのような条件で行っても発現出来なかった。そこで、N-SMase の膜結合ドメインを欠損させた遺伝子をプラスミドに挿入し、大腸菌に入れると発現出来るようになった。しかし、得られたタンパク質は不溶性画分に移行してしまった。現在発現タンパク質の再構成方法の検討している。今後、再構成した酵素を用いて酵素反応速度論に基づく実験を行う予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①Reiko Ueoka, Yoichi Nakao, Shinobu Fujii, Rob W. M. van Soest, and Shigeki Matsunaga, Aplysinopliques A-C, Cytotoxic Sesterterpenes from the Marine Sponge *Aplysinopsis digitata*. J. Nat. Prod., 査読有, Vol71, No.6, 2008, 1089-1091

[学会発表] (計 3 件)

①小林 加奈, 白井 僚一, 藤井忍, 林 恭三, 池田 潔, 井上 晴嗣, ハブ血漿から精製したロイシンリッチ  $\alpha$ 2-グリコプロテインの機能解析, 第 83 回日本生化学大会, 平成 22 年 12 月 7 日 (神戸)

②森本有紀子, 土橋祐子, 井上晴嗣, 塚本喜久雄, 池澤宏郎, 池田潔, 藤井忍, *Bacillus cereus* 菌由来スフィンゴミエリナーゼの界面認識機構に関わるアミノ酸残基, 日本薬学

会第 130 年会, 平成 22 年 3 月 30 日 (岡山)  
③西崎倫子, 井上晴嗣, 池田潔, 藤井忍, ニワトリ卵白由来リゾホスホリパーゼ D の精製と加水分解作用, 日本薬学会第 130 年会, 平成 22 年 3 月 30 日 (岡山)

[その他]

ホームページ等

<http://www.oups.ac.jp/kenkyu/kenkyuushitu/seika.html>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

藤井 忍 (FUJII SHINOBU)

大阪薬科大学・薬学部・講師

研究者番号 : 8 0 2 1 8 9 6 6

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし