

研究課題名	スフィンゴミエリナーゼのリン脂質認識機構の解析
研究者名	藤井 忍

研究経過・成果の概要

【目的】

生活習慣病の多くは脂質代謝異常に起因する場合が多い。リン脂質加水分解酵素はこのような脂質代謝異常に関わる代表的な酵素であり、その過剰発現や欠損によって、肥満、動脈硬化、高血圧などが引き起こされる。スフィンゴミエリナーゼ (SMase) は、生体膜リン脂質の主要な構成成分であるスフィンゴミエリン (SM) を加水分解してセラミドを産生する酵素である。近年、動脈硬化症患者の体内に存在するリポタンパクは、ホスファチジルコリン (PC) に対する SM の割合が大きく、動脈内皮から分泌される SMase は、マクロファージの泡沫細胞化や動脈硬化の発症に関与すると考えられている。そのため、SMase の阻害剤は動脈硬化の改善薬として期待される。しかし、リン脂質加水分解酵素は生体膜のような脂質集合体の中の特定のリン脂質を加水分解するため、その作用には酵素と膜リン脂質界面との相互作用が重要な役割を果たす。本研究では、SMase と膜リン脂質界面との分子間相互作用を詳細に調べるとともに、阻害剤を開発するための基礎データを得ることを目的とした。

【結果・考察】

以前我々は、*Bacillus cereus* 菌由来 SMase の触媒作用は Mg^{2+} 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も明らかにした。最近、吾郷らは *B. cereus* 菌由来 SMase の立体構造を明らかにし (図1)、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果たすことを示した。

そこで今回、SMase による膜リン脂質界面の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、種々の基質を用いて、酵素反応パラメーターを調べた。

真の基質であるスフィンゴミエリン (SM) と Triton X-100 との混合ミセル、合成基質であるミセル状 2-*N*-Hexadecanoylamino-4-nitrophenylphosphocholine (HNP)、および SM に比べて加水分解されにくい種々の炭素鎖長を持つものが入手できるリゾホスファチジルコリン (C₁₆-LysoPC) と Triton X-100 との混合ミセルを基質に用いて、3 種類の置換体と

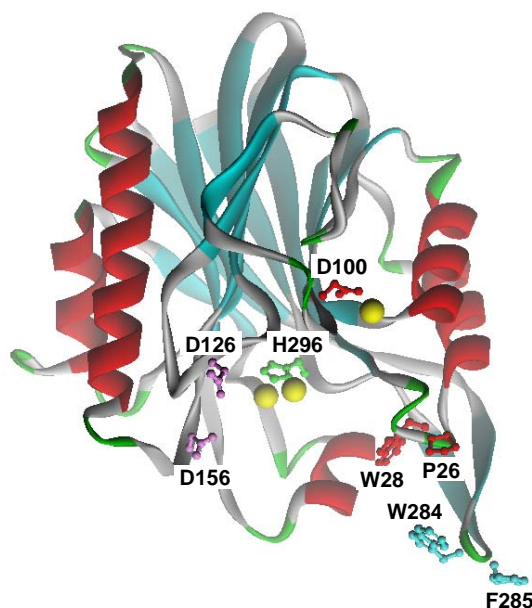


図1 *B. cereus* 菌由来 SMase の立体構造

WT の酵素反応パラメーターを比較した (表 1)。その結果、SM を基質にした場合、 V_{\max} 値は WT に比べてすべての置換体で若干増大したが、 K_m 値は P26G と W28A で増大し、D100N ではあまり変化しなかった。HNP を基質に用いた場合、 V_{\max} 値は W28A で増大したが P26G と D100N で減少し、 K_m 値はすべての置換体で大きく増大した。さらに、 C_{16} -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たが、 K_m 値は W28A のみで増大し、そのほかの置換体ではあまり変化しなかった。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結合に関与し、SMase の基質集合体に対する結合力を強めていることがわかった。

表1 置換体とWTの酵素反応パラメーターの比較

SMase	V_{\max} (mmol/min/mg)			SMase	K_m (mM)		
	SM	HNP	C_{16} -LysoPC		SM	HNP	C_{16} -LysoPC
WT	20.4 ± 0.5	0.145 ± 0.003	0.0639 ± 0.0041	WT	0.0548 ± 0.0065	0.0607 ± 0.0066	0.300 ± 0.042
P26G	26.9 ± 0.7	0.0779 ± 0.0044	0.0157 ± 0.0007	P26G	0.147 ± 0.012	0.383 ± 0.043	0.204 ± 0.022
W28A	42.0 ± 1.7	0.528 ± 0.058	0.0198 ± 0.0027	W28A	0.340 ± 0.029	1.36 ± 0.22	0.860 ± 0.189
D100N	30.3 ± 0.6	0.0662 ± 0.0031	0.0118 ± 0.0004	D100N	0.0816 ± 0.0066	0.374 ± 0.035	0.238 ± 0.018

一方、多くのリン脂質加水分解酵素の活性は、単分子分散状態の基質に比べてミセル状態の基質の方が非常に高く、短鎖レシチンの加水分解反応は臨界ミセル濃度 (cmc) 前後において急激に変化し、cmc 以上で非常に増大する。この現象は、リン脂質加水分解酵素の分子表面に、膜リン脂質界面を認識する部位が存在し、その部位へのミセルの結合が、酵素の活性化を引き起こすと考えられている。

以前我々は、*B. cereus* 菌由来 SMase による C_{11} -LysoPC の加水分解反応を調べた結果、 C_{11} -LysoPC がミセルを形成する濃度 (cmc=1.8mM) よりも低い濃度で酵素活性が急激に上昇することを明らかにした。この原因は、SMase の分子表面に単分子分散状態の LysoPC が結合すると、酵素の構造変化が起こり、酵素活性が増大することに由来することを明らかにした。そこで、今回調製した置換体について同様の実験を行った結果 (図 2)、W28A は WT と異なり、cmc 付近で酵素活性が急激に増大した。この結果から、W28 は単分子分散状態の基質と相互作用すると、酵素の構造変化を誘起して、酵素活性を増大させる作用のあることが示唆された。

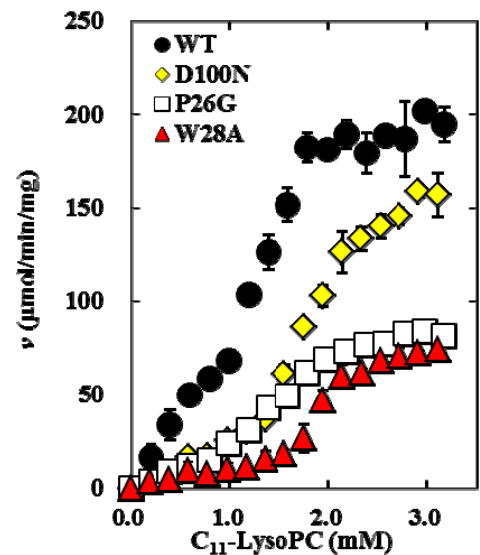


図2 置換体酵素による LysoPC の加水分解