スフィンゴミエリナーゼの構造と機能に関する研究

小田真隆

Structure and Function of Sphingomyelinase

Masataka ODA

Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Science, Tokushima Bunri University, 180 Yamashiro-cho, Tokushima 770–8514, Japan

(Received April 22, 2009)

Bacillus cereus is one that causes of opportunistic human infections. Sphingomyelinase produced by *B. cereus* is assumed a virulence factor for the infection. Sphingomyelinase from *Bacillus cereus* (*Bc*-SMase) is Mg²⁺-containing metalloenzyme. *Bc*-SMase is a family of neutral SMase (nSMase) and mimics the actions of the endogenous mammalian nSMase in causing differentiation, development, and apoptosis. *Bc*-SMase may be a good model for the poorly characterized mammalian nSMase. Activation of *Bc*-SMase by divalent metal ions was in the order $Co^{2+} > Mn^{2+} > Mg^{2+} \gg$ $Ca^{2+} > Sr^{2+}$. Crystal structure analysis of *Bc*-SMase bound to Co^{2+} , Mg^{2+} , or Ca^{2+} revealed that the water-bridged double divalent metal ions at the center of the cleft in both the Co^{2+} and Mg^{2+} -bound forms is the catalytic architecture required for sphingomyelinase activity. In contrast, the architecture of Ca^{2+} binding at the site showed only one binding site. A further single metal-binding site existed at one side edge of the cleft. Based on the highly conserved nature of amino acid residues of the binding sites, the crystal structure of *Bc*-SMase with Mg^{2+} or Co^{2+} provided a common structural framework applicable to phosphohydrolases belonging to the DNase I-like folding superfamily. In addition, our analysis provided evidence that β -hairpin containing the aromatic amino acid residues and the metal ion of the side-edge participate in binding to sphinogmyelin and membranes containing sphingomyelin. This article summarized current knowledge of characteristics and mode of action of *Bc*-SMase.

Key words-Bacillus cereus; sphingomyelinase; 3D structure; metal ion; hydrolysis

1. はじめに

生体膜を構成するリン脂質は、構造維持、そし て、細胞内のシグナル調節を行う重要な生体分子の 1つである.リン脂質としてはグリセロール骨格を 有するグリセロリン脂質とスフィンゴシン骨格を持 つスフィンゴリン脂質が存在する.特に、後者は、 脳や神経組織に大量に存在するスフィンゴミエリン (SM)が代表である.SMは、スフィンゴミエリ ナーゼ (SMase)によりセラミドとホスホリルコリ ンに加水分解される.SMaseは、酵素活性を発現 するときの至適 pH や金属要求性によっていくつか の種類に分類される.マグネシウム依存性の中性ス フィンゴミエリナーゼ (nSMase)は、セレウス菌

徳島文理大学薬学部微生物学教室(〒770-8514 徳島市 山城町西浜傍示 180)

e-mail: masa@ph.bunri-u.ac.jp

(*Bacillus cereus*), リステリア菌, 黄色ブドウ球 菌, さらには, ヒト, 及び, マウスなど, 細菌から 動物細胞まで広く存在し, これらの nSMase のアミ ノ酸配列は, 相同性が高く, 酵素反応に重要と推察 されるアミノ酸残基は, よく保存されている. 1989 年, 細胞分化のシグナル伝達機構における SM 代 謝の関与が報告されて以来, この約 20 年間におい て, SMase の生理的役割に関する多数の研究が報 告されてきた. しかしながら, nSMase は, 細菌や 動物細胞からの精製が困難であったため, 四半世紀 の研究の歴史があるにもかかわらず, 酵素分子中で の金属イオンの結合状態や酵素活性に対する役割が 不明であった. したがって, その触媒メカニズムの 詳細は未解明のままであった.

われわれは, nSMase の構造と機能を解明するため, セレウス菌の nSMase (*Bc*-SMase) に注目した. *Bc*-SMase 遺伝子は, 1988年, Johansen¹⁾ら, Yamada²⁾ らによってクローニングされた. この SMase 遺伝

本総説は、平成20年度日本薬学会中国四国支部奨励賞 受賞を記念して記述したものである。

子は、セレウス菌染色体上でホスファチジルコリン 特異的ホスホリパーゼ C 遺伝子の下流に tandem に 並んで存在している。セレウス菌における SMase の発現は、plcR と呼ばれる pleiotropic regulator の コントロール下にあり、同じ plcR でコントロール されるホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C 及びヘモリジン BL の発現とともにコントロール されている.³⁾ SMase 遺伝子は, 27 個のアミノ酸か らなるシグナルペプチドと306個のアミノ酸からな る成熟タンパク質をコードしている.^{1,2)} Bc-SMase の生化学的性質は、等電点 5.6 の易熱性タンパク質 であり、本酵素は、原子吸光分析により分子内にマ グネシウムイオンを含むことが知られている.40し かしながら、分子内マグネシウムイオン結合モル比 が 0.2 (nmol/nmol of protein) と小さいことから、 一般の金属酵素よりも金属(マグネシウムイオン) 結合力が弱く、分子内金属は、容易に遊離すると考

結合力が弱く、万丁内金属は、谷易に避離9 ると考えられている。⁴⁾
 Bc-SMase など細菌由来 nSMase の特徴的な作用

は、赤血球を破壊する溶血活性を示すことであり、 本酵素は、脂質メディエータ産生酵素である動物細 胞内在性 nSMase と同様、細胞の分化、老化、アポ トーシスも引き起こす.したがって、細菌由来の nSMase の触媒メカニズムは、生物種を超えて共通 であると考えられ、Bc-SMase 触媒メカニズムの研 究は、細菌だけでなく動物細胞内の nSMase の働き を解明する上で大きく貢献すると思われる.さらに、 Bc-SMase の構造と機能の研究は、黄色ブドウ球 菌⁵⁾やヘリコバクター・ピロリ菌⁶⁾など病原性の強い菌から nSMase が放出されることも知られていることから、胃炎や胃潰瘍、さらには、アトピー性皮膚炎などに対する nSMase の関与の解明にも貢献すると考えられる.

2. 酵素活性と二価金属イオンの関係

Bc-SMase は、酵素活性に Mg^{2+} など二価金属イ オンを要求することが知られている.⁴⁾ *Bc*-SMase の 酵素活性と二価金属イオンの関係をライン・ウェ バーバークプロット解析すると、 Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} による酵素の基質親和性 (K_m 値)の変化は認められないが、本酵素の最大反応速 度 (V_{max}) は、 Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} 存在下で高く、 Ca^{2+} , Sr^{2+} の場合、低い値である.また、各イオ ンの半径及びルイス酸強度と V_{max} の関係は、 V_{max} が高いと (Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}) と、イオン半径 が小さく、ルイス酸強度が強く、 V_{max} が低いと (Ca^{2+} , Sr^{2+})、イオン半径が大きく、ルイス酸強 度が弱い関係にある.したがって、酵素活性に二価 金属イオンのイオン半径が重要なファクターである と考えられる (Fig. 1).⁷

3. X 線結晶構造解析

Bc-SMase と Co²⁺, Mg²⁺, 及び, Ca²⁺の共結晶 を作成し, X 線解析により三次元構造を明らかに した (Fig. 2). その結果, (1) Bc-SMase の全体構 造は, α/β モチーフからなる β サンドウィチ構造で あること, (2) Bc-SMase は, 唯一の帯状のクレフ トとフレキシブルに稼働する露出した β ヘアピン



Fig. 1. Effect of Various Divalent Metal Ions on SM Hydrolysis



Fig. 2. The Overall Structure of Bc-SMase



Fig. 3. The Coordination of Metal Ions at the Central Site of *Bc*-SMase a) Co²⁺-bound form, b) Ca²⁺-bound form.

構造を有すること、(3) Co^{2+} は、二価金属イオン の中でクレフトの中央部に2個(セントラルサイト) とクレフトの端に1個(サイドエッジ)の計3個が 保持されているが、 Mg^{2+} と Ca^{2+} は、クレフトの 中央部に1個(セントラルサイト)とクレフトの端 に1個(サイドエッジ)の計2個保持されているこ と、(4) Co^{2+} と Mg^{2+} の場合、セントラルサイトに おける両者の金属イオンの配位状態が酷似している が、 Ca^{2+} の場合は、 Co^{2+} と Mg^{2+} の配位状態と全 く異なっていることが判明した.このセントラルサ イトは、Ikezawa らのグループの解析により触媒部 位であることが報告されている.^{8,9)}

4. 触媒反応と金属イオンの関係

Bc-SMase の結晶解析の結果から、Co²⁺の場合、 Fig. 3(a)に示すように、2 個の Co²⁺ がセントラル サイトにおいて 53 位グルタミン酸と 296 位ヒスチ

ジン残基にそれぞれ結合していること(Aサイト. Bサイト)、さらに、2個の Co²⁺の間を水分子1個 がブリッジしていることが判明した.次に、Co²⁺ と同様高い酵素活性を誘導する Mg²⁺の場合は、53 位グルタミン酸残基に1個のみの結合が認められる ことが明らかとなった. Tsukamoto らの報告⁹⁾のよ うに、Co²⁺に配位する 53 位グルタミン酸をアラ ニンに置換すると、酵素活性は、もちろん、ヒツジ 赤血球に対する溶血, SM-リポソーム分解活性も消 失することから、この Co²⁺は、活性中心に存在 し、酵素活性に重要な役割を演じていると考えられ る. Co²⁺ は, Co²⁺ と *Bc*-SMase との共結晶におけ るAサイトの配位状態から、アミノ酸残基と水分 子による六配位で保持され, B サイトも同様である (平均距離: 2.2Å) ことが判明した [Fig. 3(a)]. また, Co²⁺の場合, A と B サイトのそれぞれのア

ノマラス差フーリエ値が28と9σであり、Aサイ トが B サイトと比較して金属イオンの結合力が高 いことが推察された。一方、Mg²⁺のAサイトにお ける配位状態は、Mg²⁺ が Co²⁺ と同じ状態で保持 されているが、B サイトにおいては、Mg²⁺ が存在 せず Co²⁺ と同じ空間が保たれていた. Mg²⁺ との 共結晶において、Bサイトに検出されなかった理由 は、アノマラス差フーリエ解析において Mg²⁺ は、 Co²⁺ と比較して検出されにくいためであると考え られる. Mg²⁺ と Co²⁺ の酵素活性に与える影響 は、ほぼ同じ程度高いことから、基質が存在すると、 Co²⁺ と同様, Mg²⁺ も両サイトに強く結合すると 考えられる.一方、Ca²⁺は、53 位グルタミン酸残 基に結合し、Aサイトにおいて七配位で存在し、 Ca²⁺ と水分子の平均距離が 2.5Å と長く、広い空 間を占めるため B サイトには、Ca²⁺ が保持される 空間はないと推察される [Fig. 3(b)].

以上から,活性中心において 53 位グルタミン酸 残基と 296 位ヒスチジン残基にそれぞれ1 個の二価 金属イオンを結合し,その金属イオン間を水分子が ブリッジする構造が活性に重要と推察される.

5. 作用機構

Co²⁺ を配位した Bc-SMase と SM との三次元構 造の複合体モデルから、活性中心におけるスフィン ゴミエリン分解反応は、次の機構であると推察され る (Fig. 4). (1)1 分子の水分子が A サイトと B サ イトに配位した二価の金属イオンに架橋し、金属イ オン間の距離を保持していること、(2)Aサイトの Co²⁺は、ホスホリルコリン部位の O4 の酸素原子 にイオン結合すること、(3) B サイトの Co²⁺ と 197 位アスパラギン残基が SM のリン酸基の酸素原子 と相互作用することよりリン原子が正の電荷を帯び ること, (4) B サイトの Co²⁺, 197 位のアスパラギ ン残基、そして、195位アスパラギン酸残基は、水 分子(Wat1)の pK_a 値を下げて Wat1 を活性化す ること, (5)活性化した Wat1 は, 正に荷電したリ ン原子に対し求核攻撃してリン酸五価の反応中間体 を形成し、リン酸エステル部位が切断され、セラミ ドとホスホリルコリンが生成することが Bc-SMase による SM の分解機構と考える.⁷⁾

6. *β* ヘアピン構造の役割

Bc-SMase は、外側に露出したフレキシブルな β ヘアピン構造を有する (Fig. 2). この領域は、疎



Fig. 4. The Complex Model of Bc-SMase and SM

水性アミノ酸が豊富に含まれる領域で、黄色ブドウ 球菌やリステリア菌の産生する SMase にも、この 領域とアミノ酸配列において高いホモロジーを示す 領域が存在するが、哺乳動物由来 SMase には存在 しない. β ヘアピン構造の先端に存在する 284 位ト リプトファン.285 位フェニルアラニンをアラニン に置換した W284A, 及び, F285A は, 酵素活性が 消失し、ヒツジ赤血球に対する溶血活性、及び、 SM-リポソームの分解活性も著しく低下した. さ らに、各変異酵素の赤血球膜への結合能が著しく低 下していた、次に、ホスホリルコリンの類似体であ る 2- モルフォリノエタンスルホン酸(MES)と SMase との共結晶を作成し、立体構造を基に β へ アピンと基質との相互作用について検討すると,β ヘアピンに存在する284位トリプトファン残基とそ の周囲のチロシン残基が MES を抱え込む構造をと ることが判明した.したがって、Bc-SMaseのβへ アピン領域は、基質であるスフィンゴミエリンのホ スホリルコリン残基を認識して結合すると考えられ る.以上の結果と考え合わせると、このフレキシブ ルな β-ヘアピン構造は、ホスホリルコリン残基に 結合後、活性中心へ移行させるために重要な働きを 演じていると推察される."

7. クレフトのサイドエッジサイトの役割

Bc-SMase のサイドエッジサイトには、Co²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ のいずれの場合も、1 個の金属イオン が保持されている.サイドエッジ領域の金属イオン の近傍に存在するアミノ酸配列には、病原細菌由来 SMase において高い相同性が認められ、哺乳類由

来 SMase では認められない配列である. これらの 残基をアラニンに変異した N57A, E99A, D100A の溶血活性とリポソーム破壊活性は、著しく低下す るが, F55A においては, 活性の低下は, ほとんど 認められない、一方、分解活性は、各変異酵素にお いてほとんど低下が認められないことが判明した. 次に, N57A, E99A, 及び, D100Aは, ヒツジ赤 血球及び SM リポソームに対する結合能が著しく 低下し, F55Aは、ワイルドタイプとほぼ同様の結 合能を示す. したがって、この領域は、生体膜への 結合に重要であると考えられる. そこで、変異酵素 内の金属イオン数を測定すると、ワイルドタイプ, 及び、F55A では、1分子あたり約3 個の Mg²⁺ が 検出され、N57A、E99A、そして、D100A におい ては、約2個の Mg²⁺ が測定された. また、Co²⁺ の場合も同様の結果であった. さらに, N57A と Mg²⁺の共結晶化とX線結晶解析を行うと、N57A の全体構造は、ワイルドタイプとほぼ同様である が、ワイルドタイプで認められるサイドエッジの Mg²⁺の電子密度は、N57Aでは、検出されなかっ た (PDB: 2uyr). したがって、サイドエッジに存 在する N57, E99, D100 は, Mg²⁺の保持に重要で あること、さらに、この金属イオンは、膜への結合 に関与することが判明した.一方,F55Aは,3個 の Mg²⁺, Co²⁺ を有していることから、少なくと も、F55の側鎖、すなわち、ベンゼン環は、金属イ オンとの相互作用に関与しないと推察される. また. Bc-SMase の結合は、セラミドで特異的に阻害され ること、加えて、これらの化合物のアミド結合は、 二価金属イオンと結合する性状を有するので、サイ ドエッジサイトが生体膜中の SM, セラミドなどの アミド結合を有するリン脂質に結合して生体膜に作 用すると推察される.

以上より, *Bc*-SMase のサイドエッジ領域に存在 する Mg²⁺ は、細胞膜破壊、すなわち、脂質二重層 内のスフィンゴミエリンのアミド結合を認識、結合 し、SM 分解に重要な役割を演ずると考えられる.

おわりに

以上から, Bc-SMase は、少なくとも2つの細胞 膜結合領域を有すること、さらに、2個の金属イオ ンを配位した活性中心に SM を取り込み、リン酸 エステル結合を切断することが判明した.また、本 節では触れなかったが、DNase-1 ファミリーと BcSMase の活性中心におけるアミノ酸の立体配置が 類似しているため、^{10,11)}本リン酸エステル加水分解 機構は、これらファミリー全体に適用できるものと 考えられる。細菌が産生する SMase は、リステリ ア菌の場合、感染後の *in vivo* におけるエスケー プ、さらに、黄色ブドウ菌の場合、食食細胞に対す る作用、さらに、炭疽菌の場合、感染症への関与が 報告されている。したがって、細菌由来 SMase の 三次元構造が明らかになったことは、阻害剤設計に よる感染症治療薬開発へつながるものと推察され、 これらの研究で得られる成果は、基礎研究領域や学 際的領域に広く貢献できるものと考える。

謝辞 本研究を遂行するにあたり,多大なご指 導とご助言を賜わりました櫻井純先生(徳島文理大 学薬学部教授)に衷心より感謝申し上げます.ま た,構造解析においてご協力頂いた理化学研究所構 造生物学,吾郷日出夫先生,宮野雅司先生,並び に,徳島文理大学健康科学研究所,津下英明先生に 深謝いたします.最後に,教室員の皆様に御礼申し 上げます.

REFERENCES

- Johansen T., Holm T., Guddal P. H., Sletten K., Haugli F. B., Little C., *Gene*, 65, 293–304 (1988).
- Yamada A., Tsukagoshi N., Udaka S., Sasaki T., Makino S., Nakamura S., Little C., Tomita M., Ikezawa H., *Eur. J. Biochem.*, 175, 213 -220 (1988).
- Agaisse H., Gominet M., Okstad O. A., Kolsto A. B., Lereclus D., *Mol. Microbiol.*, 32, 1043-1053 (1999).
- 4) Tomita M., Taguchi R., Ikezawa H., *Biochim. Biophys. Acta*, **704**, 90–99 (1982).
- Projan S. J., Kornblum J., Kreiswirth B., Moghazeh S. L., Eisner W., Novick R. P., Nucleic. Acids. Res., 17, 3305 (1989).
- Chan E. C., Chang C. C., Li Y. S., Chang C.
 A., Chiou C. C., Wu T. Z., *Biochemistry*, 39, 4838–4845 (2000).
- Ago H., Oda M., Takahashi M., Tsuge H., Ochi S., Katunuma N., Miyano M., Sakurai J., J. Biol. Chem., 281, 16157–16167 (2006).
- 8) Obama T., Fujii S., Ikezawa H., Ikeda K., Ima-

gawa M., Tsukamoto K., Biol. Pharm. Bull., 26, 920-926 (2003).

- Obama T., Kan Y., Ikezawa H., Imagawa M., Tsukamoto K., J. Biochem., 133, 279–286 (2003).
- 10) Matsuo Y., Yamada A., Tsukamoto K.,

Tamura H., Ikezawa H., Nakamura H., Nishikawa K., *Protein Sci.*, **5**, 2459–2467 (1996).

Tamura H., Tameishi K., Yamada A., Tomita M., Matsuo Y., Nishikawa K., Ikezawa H., Biochem. J., 309, 757-764 (1995).