

氏名	藤井 忍
学位(専攻分野)	博士 (薬学)
学位記番号	論薬博第623号
学位授与の日付	平成12年1月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	ホスホリパーゼ A <sub>2</sub> とスフィンゴミエリナーゼの触媒機構の解明 —— 酵素反応速度論によるアプローチ ——

論文調査委員 (主査) 教授 川寄敏祐 教授 半田哲郎 教授 市川 厚

### 論文内容の要旨

近年、ホスホリパーゼ類によるリン脂質の加水分解産物がセカンドメッセンジャーとして細胞内情報伝達に関与することが注目されている。本研究では、ホスホリパーゼ類の触媒機構の詳細を明らかにするため、グリセロリン脂質の2位の脂肪酸エステル結合の加水分解によりアラキドン酸などの脂肪酸を産生するホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) と、スフィンゴミエリンのリン酸エステル結合の加水分解によりセラミドを産生するスフィンゴミエリナーゼ (SMase) について、酵素反応速度論に基づく実験を行い、以下の成果を得た。

#### 第一章 ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) の触媒機構の解明

現在、PLA<sub>2</sub>として9種類の分子種が知られている。その中で、I型 PLA<sub>2</sub> (コブラ科やウミヘビ科のヘビ毒に存在、哺乳類の膵臓に存在して食物の消化などに関与) と II型 PLA<sub>2</sub> (マムシ科やクサリヘビ科のヘビ毒に存在、哺乳類の血小板に存在して炎症反応などに関与) はともに分子量約14 kDaのタンパク質であるが、両者はジスルフィド結合の位置の違いにより区別されている。両酵素の触媒基は His 48 であり、触媒活性には Ca<sup>2+</sup> が必須である。また、分子内には触媒部位に加えて油水界面を認識する部位が存在するため、基質がミセルを形成すると酵素活性は著しく増大する。これまでの研究から、両酵素の高次構造や触媒機能は互いに酷似していると考えられているが、生体内における分布や役割が異なるので、詳細な触媒機構は異なる可能性がある。本研究では、I型とII型 PLA<sub>2</sub> の触媒機構と低分子化合物による阻害機構に関する実験を行い、両酵素の共通点と相違点を明らかにした。ウシ膵臓由来 (I型) PLA<sub>2</sub> について、種々の pH における *p*-bromophenacyl bromide (BPB) (触媒基 His 48 を選択的に化学修飾する) による修飾反応の速度定数、単分子分散状基質とミセル状基質に対する酵素反応のパラメーター、および Ca<sup>2+</sup> の結合定数を調べ、以前に得られたヘビ毒由来 PLA<sub>2</sub> のデータと比較した。その結果、I型 PLA<sub>2</sub> の触媒活性と BPB による修飾反応には N 末端 α アミノ基が関与するが、II型 PLA<sub>2</sub> においては全く関与しないという I型と II型 PLA<sub>2</sub> の著しい違いが明らかになった。他方、Ca<sup>2+</sup> の結合定数は、Ca<sup>2+</sup> 結合部位近傍の解離基のイオン化状態を反映して PLA<sub>2</sub> の種類により著しく変動するが、アルカリ性 pH 領域においてはすべての PLA<sub>2</sub> で等しくなることから、I型と II型 PLA<sub>2</sub> に対する Ca<sup>2+</sup> の結合様式は基本的には共通であることがわかった。

次に、I型とII型 PLA<sub>2</sub> に対する基質および基質アナログの結合に及ぼす Ca<sup>2+</sup> の影響を調べた。真の基質であるホスファチジルコリン (PC) の場合、I型 PLA<sub>2</sub> との結合は Ca<sup>2+</sup> の存在に影響されないのに対し、II型 PLA<sub>2</sub> との結合は Ca<sup>2+</sup> の存在により著しく増大した。他方、真の基質の2位のエステル結合をアミド結合に置換した amide-PC の結合力は、どちらの酵素においても Ca<sup>2+</sup> に依存して増大した。なお、amide-PC は触媒基 His 48 との間に水素結合を形成することが知られているが、真の基質はアミドプロトンを持たないため水素結合を形成しない。以上の結果から、I型とII型 PLA<sub>2</sub> の触媒部位周辺の微視的なコンホメーションは互いに異なり、His 48 と水素結合できる amide-PC のような基質アナログが結合するに伴って、両者は同一化することが示唆された。

モノアライド (MLb) は PLA<sub>2</sub> を不活化させる化合物としてスクリーニングされた海綿由来のセスタテルペノイドである。そこで、化学的に安定な MLD の類縁化合物 (MLD-analog) を用いて種々の I型と II型 PLA<sub>2</sub> の不活性化機構について

調べた。その結果、MLD-analog による PLA<sub>2</sub> の不活性化は Lys 残基の化学修飾により起こること、また、PLA<sub>2</sub> の型の区別によらず、存在する Lys 残基の位置の違いにより不活性化の程度が異なることが明らかになった。ウシ膵臓由来 PLA<sub>2</sub> では Lys 56 が修飾されることがわかり、この Lys 残基は基質ミセルの界面認識に関与することがわかった。また、触媒部位や界面認識部位以外の場所に存在する Lys 残基が修飾されても不活性化が起こることが示唆された。

## 第二章 スフィンゴミエリナーゼ (SMase) の触媒機構の解明

SMase の高次構造は未だ決定されておらず、その詳細な触媒機構も不明である。本研究では、*Bacillus cereus* 菌由来 SMase の触媒機構を解明すべく酵素反応速度論に基づく実験を行った。

*B. cereus* 菌由来 SMase には親和性の異なる 2 つの Mg<sup>2+</sup> 結合部位が存在し、低親和性部位に対する Mg<sup>2+</sup> の結合は触媒活性に必須であるが、基質結合には関与しないことがわかった。次に、酵素反応パラメーターの pH 依存性データと DNaseI (タンパク質の立体構造データベース中で SMase のアミノ酸配列に最も良く適合したタンパク質) の高次構造から推定された SMase の構造モデルを比較した結果、SMase の触媒機構は His 296 (pK 5.85) による一般塩基触媒であることが示唆された。基質として、水溶性の合成基質である 2-hexadecanoylamino-4-nitrophenyl-phosphocholine (HNP) を用いた場合には、さらに、pK 値 7.6 の解離基のプロトン化が触媒活性に非常に重要であることが明らかになった。

アミノ酸残基の化学修飾や部位特異的置換の実験から、SMase の酵素活性には酸性のアミノ酸残基が関与することが示されている。そこで、Asp 126 と Asp 156 に注目し、それぞれの残基を Gly に置換した酵素 (D 126 G と D 156 G) を用いて実験を行った。その結果、これら 2 つの Asp 残基は Mg<sup>2+</sup> との結合や基質に対する立体選択性には影響を与えなかったが、Asp 126 (pK 6.81) のイオン化は基質との結合力を増大させ、触媒作用を低下させることが明らかになった。また、Asp 156 には親水性基質の加水分解を抑制する働きがあることがわかった。

以上の研究は、これまで同じと考えられてきた I 型と II 型 PLA<sub>2</sub> の触媒機構に相違があることを明らかにしたものであり、SMase の触媒機構については、その解明に向けた基礎データを示したものである。

## 論文審査の結果の要旨

ホスホリパーゼはリン脂質のエステル結合を加水分解する酵素の総称である。ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>) はグリセロリン脂質の 2 位の脂肪酸エステルを加水分解する酵素であり、食物中のリン脂質の消化および生体膜リン脂質の新生と代謝に関わるとともに、プロスタグランジン類などの脂質メディエーターの産生に至るアラキドン酸カスケードの開始酵素として機能している。最近、数多くの分子種が報告されているが、そのなかで、I 型および II 型 PLA<sub>2</sub> は、分子量 14 kDa のモノマータンパク質である。古くより研究されているが、その触媒機構に関しては依然として不明の点が多い。他方、スフィンゴミエリナーゼ (SMase) はスフィンゴミエリンのリン酸エステルを加水分解する酵素である。SMase の作用により産生されるセラミドは、プロテインキナーゼやホスファターゼを活性化し、アポトシスシグナル伝達因子として注目されている。

本研究は、I 型および II 型 PLA<sub>2</sub> の加水分解の触媒機構や低分子阻害物質による阻害機構の共通点や相違点を明らかにすることを目的として、ウシ膵臓由来の I 型 PLA<sub>2</sub> およびヘビ毒由来の II 型 PLA<sub>2</sub> 分子について酵素速度論的解析を行い、さらに、哺乳類由来酵素との一次構造上の類似点が見いだされているバクテリア由来の SMase について、触媒活性に関与するアミノ酸残基とそのイオン化状態を調べ次のような新しい知見を得た。

本研究では、まず、I 型と II 型 PLA<sub>2</sub> の触媒機構について酵素速度論的解析を行った。これまでの X 線結晶解析の結果では、両酵素の触媒部位を含む高次構造には明確な違いは見いだされていない。ところが、I 型 PLA<sub>2</sub> では、酵素の触媒基である His 48 を選択的に修飾する化学修飾試薬との反応、および、単分子分散状態およびミセル状態の基質の加水分解反応にはアミノ末端の α アミノ基が関与するのに対して、II 型 PLA<sub>2</sub> ではこれらの反応にはアミノ末端の α アミノ基は関与しないことが判明し、両者の作用機構に相違のあることが明らかとなった。

次に、I 型と II 型 PLA<sub>2</sub> について、種々の基質との結合に及ぼす Ca<sup>2+</sup> の影響を調べることにより、I 型と II 型 PLA<sub>2</sub> の触媒部位周辺の微視的なコンホメーションは互いに異なり、His 48 と水素結合出来るような基質が結合すると、両者は同一化することを明らかにした。

また、海綿より単離されたセスタテルペノイドであるモノアライドは抗炎症作用や鎮痛作用を示すが、これらの作用は PLA<sub>2</sub> 活性を阻害しアラキドン酸の産生を抑制することによると考えられていた。そこで、このモノアライドの反応機構を

調べ、69位の Lys が化学修飾されることが不活性化の原因であることを明らかにした。

さらに、SMase について酵素反応速度に基づく解析を行い、触媒機構は His 296 の関与する一般塩基触媒であることを示した。また、Asp 126 と Asp 156 の触媒活性への寄与について解析した。

以上の研究は、生理的に重要な役割をもつことが示されているが、不明な点の多いホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の酵素反応機構に関し、反応速度論の面より精細な検討を加え、いくつかの重要な新しい知見を得たものである。よって本論分は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。更に、平成 11 年 12 月 20 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。