

29【P2】Ⅲ-400

ウエルシュ菌 α 毒素の 57 および 65 位チロシン残基の酵素活性に対する役割
○櫻井 純¹, 大塚 晶子¹, 永浜 政博¹ (¹徳島文理大薬)

【目的】ウエルシュ菌 α 毒素は、溶血、致死活性、そして、ホスホオリパーゼ C (PLC) 活性を有している。我々は、 α 毒素の結晶構造から触媒クレフトの入口付近に存在する 57 と 65 位チロシン (Y) 残基が基質への結合や溶血活性に関与していると推察、これら残基をアミノ酸置換した変異毒素を作製しその残基の役割を検討した。

【方法】 α 毒素遺伝子から部位特異変異法で作製した Y57F、Y57L、Y57A、Y57C、Y65F、Y65L、Y65A を枯草菌で発現、精製した。ヒツジ赤血球溶血活性、ホスファチジルコリン (PC) リポソーム破壊作用、そして、可溶化した PC に対する PLC 活性は、常法に従い測定した。Y57C の SH 基を蛍光色素アクリロダンを標識し、リポソームとインキュベーション後この残基の膜内への侵入を蛍光の変化から分析した。

【結果と考察】Y57F、Y57L、Y57A、Y65F、Y65L、Y65A の溶血活性と PC リポソーム破壊作用を測定した結果、血球、そして、リポソーム、いずれの場合もアミノ酸残基の側鎖が小さくなるにしたがい活性が低下した。一方、コール酸ナトリウムで可溶化した PC に対する PLC 活性を測定した結果、膜破壊作用をほとんど示さない Y57A や Y65A は、ワイルドタイプ毒素と同様の PLC 活性を示した。さらに、ロイシンに置換した場合、ワイルドタイプ毒素と比較して、有意に PLC 活性が増加し、57 と 65 位が芳香環の残基より、脂肪鎖の残基の方が触媒活性は上昇すると考えられる。アクリロダンをラベル Y57C をリポソームとインキュベーションすると蛍光が左にシフトしたことから、Y-57 は膜の 2 重層内に挿入されると推察される。以上の結果から、 α 毒素の 57 と 65 位チロシン残基は、膜破壊作用において、触媒クレフトの入口が膜二重層へ侵入するのに重要な残基であると推察される。