

30T-pm01

病原性細菌由来スフィンゴリエリナーゼの細胞膜結合領域の解析

○小田 真隆¹, 橋本 学¹, 吾郷 日出夫², 津下 英明³, 越智 定幸⁴, 宮野 雅司², 勝沼 信彦⁴, 櫻井 純¹ (¹徳島文理大薬, ²理化学研究所, ³徳島文理大健康科学研究所, ⁴藤田保健衛生大医)

【目的】我々は、*Bacillus cereus* 由来スフィンゴリエリナーゼ (*Bc*-SMase) の X 線結晶解析を行い、本酵素は、唯一存在する帯状のクレフトの中央部に酵素活性に重要な金属イオンを配位していると報告した。また、本酵素の結晶構造解析によりクレフトの端(サイドエッジ)に一個の金属イオンを認めているが、この金属イオンの役割は、不明である。そこで、サイドエッジの金属イオンに配位したアミノ酸残基 (Phe55, Asn57, Glu99, Asp100) をアラニンに置換した変異酵素 (F55A, N57A, E99A, D100A) を作製し、サイドエッジの金属イオンの役割について検討した。【方法】変異酵素の作製は、Quick-Change 法に従った。各々の変異酵素の活性は、ヒツジ赤血球、及び、カルボキシフルオレセイン (CF) 封入 SM-リポソームと 37°C、30 分間インキュベーションしたときのヘモグロビン、及び、CF の遊離量から測定された。【結果と考察】N57A、E99A、そして、D100A の酵素活性、さらに、生体膜への結合性は、ワイルドタイプ-SMase より著しく低下していることが判明した。一方、F55A は、ワイルドタイプとほぼ同様の酵素、及び、結合活性を示した。従って、Asn57, Glu99, Asp100 は、*Bc*-SMase の細胞膜への結合に極めて重要な残基であることが明らかとなった。さらに、N57A の結晶解析の結果、その構造内にはサイドエッジの金属イオンが認められないことから、Phe55, Asn57, Glu99, Asp100 に配位した金属イオンは、本酵素の細胞膜への結合に重要な役割を演じていることが明らかになった。今後、病原性細菌由来スフィンゴリエリナーゼに特有のこの領域に着目したペプチドを作製し、さらに解析を進める予定である。