



細菌由来セリンパルミトイル転移酵素の 立体構造と触媒機構の解析

1. はじめに

セラミドに代表されるスフィンゴ脂質は情報伝達物質として、また、形質膜における脂質ラフトの構成成分として、多様な生理機能を有する脂質である¹⁾。スフィンゴ脂質合成の初発反応は、L-セリンとパルミトイル-CoAの縮合・脱炭酸による3-ケトジヒドロスフィンゴシン(3-ketodihydrosphingosine; KDS)の生成である。この反応はスフィンゴ脂質合成の律速段階であり、ピリドキサル5'-リン酸(pyridoxal 5'-phosphate; PLP)を補酵素とするセリンパルミトイル転移酵素(serine palmitoyltransferase; SPT; EC 2.3.1.50)によって触媒される²⁾。真核生物SPTは取り扱いの難しい膜結合型タンパク質であるために、立体構造解析や詳細な反応解析は現在でも困難である³⁾。一方、細菌SPTは水溶性ホモダイマーで機能する⁴⁻⁶⁾。一次構造上、真核生物SPTのN末端の膜貫通領域を除く部分に対して高い相同性を示し、補酵素PLPとSchiff塩基を形成するリシン残基をはじめ、酵素活性に関与すると想定されるアミノ酸残基が完全に保存されている。細菌SPTは真核生物SPTの原型であり、分子レベルでの詳細な研究を可能にする強力なモデル系である。本稿では細菌由来SPTを対象とした速度論的反応解析と立体構造解析から得られた知見をもとに、SPT活性発現の機構について述べる。

2. 野生型酵素(WT)を対象とした分光学的手法による SPT触媒反応の速度論的解析

Sphingomonas SPTの触媒過程の概略を述べる。図1に示すように、SPTの活性中心において、PLPはLys265のε-アミノ基との間に分子内Schiff塩基を形成している(内アルジミン internal aldimine, **I**)。一つめの基質であるL-

セリンの結合によってイミノ基交換反応が進行してPLP-L-セリンアルジミン(外アルジミン external aldimine, **IIa**)を生じる。二つめの基質であるパルミトイル-CoAの結合(**IIb**)後にα-脱プロトン化が進行してキノノイド中間体(**III**)を生じる。**III**のカルボアニオン性Cαは、パルミトイル-CoAを攻撃して縮合生成物(**IV**)を生じ(クライゼン型縮合反応)、この縮合生成物は脱炭酸反応によってカルバニオン中間体(**Va**)を生じる。**Va**のCα位にプロトンが付加してPLPとKDS間の外アルジミン(**VI**)が生じ、最終的に、KDSの解離によって内アルジミン(**I**)が再生される。

SPTは補酵素に由来する特徴的な吸収スペクトルを示し、その変化は活性中心における基質分子の化学的な状態変化を鋭敏に反映する。精製標品と基質の反応や、中間体を模した状態で反応停止するような基質アナログとの反応を様々な分光学的手法で解析することにより、SPT触媒反応の素過程を詳細に調べることが可能である。

2-1. L-セリンとの相互作用—外アルジミン中間体生成過程の解析

Sphingomonas SPTの活性部位においては、リシン残基のε-アミノ基とPLP間で分子内Schiff塩基(内アルジミン)が形成されており、図2-bの破線のような吸収スペクトルを示す。L-セリンを添加すると加えたL-セリン濃度に依存して426nmの吸収ピークが増加し、338nmのピークが減少した(図2-b, 赤点線)。円偏光二色性スペクトルは、L-セリンの添加の前後でコットン効果が正から負に変化し、活性部位におけるPLPの配向の変化を示唆した。SPTとL-セリンの結合過程について、ストップフロー法による遷移相の反応解析を行った結果、SPTにL-セリンが結合してミカエリス複合体を形成し、続くSchiff塩基の交換反応によってPLP-L-セリン外アルジミン中間体(図1; **IIa**)を生成することが速度論的に証明された⁷⁾。

2-2. パルミトイル-CoAアナログとの相互作用—キノノイド中間体生成過程の解析—

外アルジミン中間体生成以降の素過程を解析するために、パルミトイル-CoAの構造アナログを合成した⁸⁾。S-(2-オキソヘプタデシル)-CoAはパルミトイル-CoAのチオエステル部分にメチレン基を1個導入して求核置換反応が起こらないように設計した化合物である(図2-a)。

飽和量のL-セリンをSPTに加えて外アルジミン中間体(図1; **IIa**)として、これにS-(2-オキソヘプタデシル)-CoAを添加すると、新たな吸収ピークが493nmに出現し(図2-b, 青実線)、その吸収強度はアナログ濃度依存的に

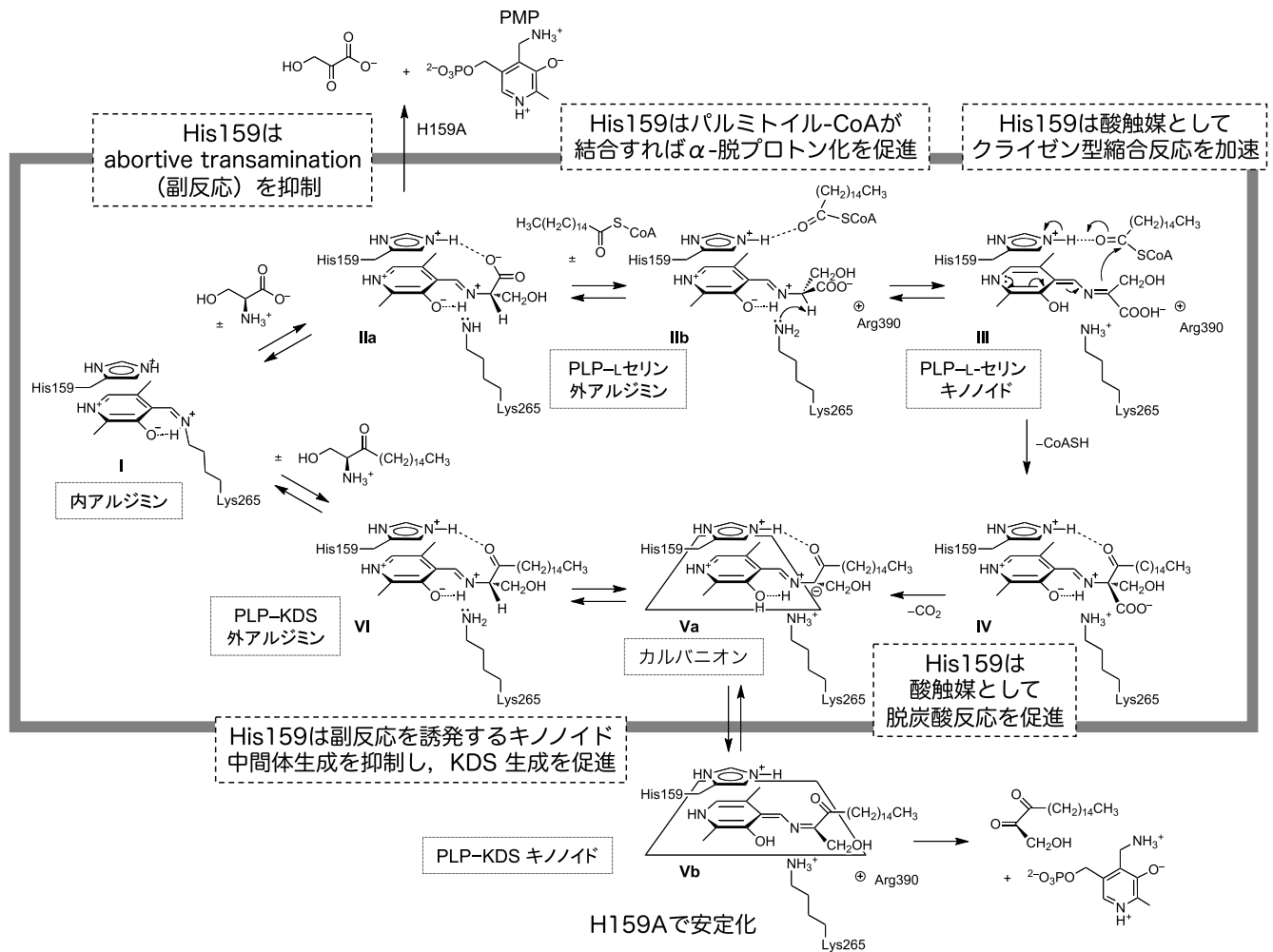


図1 精密化したSPTの反応機構とHis159の役割

本研究の結果明らかになったSPTの反応機構を示す。H159A変異が誘発した変化と共に、立体化学が明確になるよう図示した。VaおよびVbにおいては、同一の共役系に属する原子を平面で示した。

増加した。ストップフロー法で測定した時間分解スペクトルのデータから数値解析の収束解として中間体のスペクトルと速度定数を求めたところ（グローバル解析）、スペクトルの形状（極大波長，モル吸光係数）はキノノイド中間体のものであった。これらの現象は，S-(2-オキソヘプタデシル)-CoAの結合によってキノノイド中間体（図1；III）が生じるが，次の段階のクライゼン型縮合反応が進行せず，キノノイド中間体と外アルジミン中間体（図1；IIb）の平衡状態で反応停止していると解釈された。¹H-NMRを用いて，重水中のSPT活性中心におけるL-セリンのC α 位水素の重水素との交換速度を測定したところ（図2-c），S-(2-オキソヘプタデシル)-CoAの添加によって交換速度が100倍以上加速し，基質アナログの結合によ

てL-セリンの α 位脱プロトン化，即ちキノノイド中間体生成が促進されることが判明した（図2-d）。一方，SPT-L-セリン複合体にパルミトイル-CoAを加えると，KDS生成に際してL-セリンのC α 位水素の重水素との交換がほとんどないことが¹H-NMRによって判明した。これは，縮合反応の速度がキノノイド中間体の再プロトン化よりかなり速いことを示唆する。L-セリンとパルミトイル-CoAをSPTに添加したときにはキノノイド中間体の蓄積を示す吸収スペクトル変化が観測されない事実とも一致し，外アルジミンの α -脱プロトン化（図1；IIb \rightarrow III）がSPTの触媒反応全体を通しての律速段階であることを示す。

3. WTの立体構造決定と変異型酵素の解析から明らかになったSPT活性部位のヒスチジン残基の多機能な役割

2007年に *Sphingomonas* SPTの立体構造が報告され⁹⁾, 我々も *Sphingomonas* SPTと平行して進めてきた *Sphingobacterium multivorum* SPTのL-セリン複合体の結晶構造解析に成功した^{10,11)}. SPTの全体構造はその特徴からPLP酵素の中のフォルドタイプIに分類され, 活性部位は両サブユニットの会合面にある(図3-a). ほとんどのフォルドタイプI型PLP酵素では, PLP-リシン内アルジミンの*re*-面側(イミン炭素を中心としたプロキラル面の定義による. 図1ではピリジン環の上側)には芳香族アミノ酸が存在する¹²⁾. しかしSPTはこの位置にヒスチジン残基(*Sphingobacterium* SPTではHis138, *Sphingomonas* SPTではHis159(図1))を有し, これが触媒基としてSPTの反応機構上の重要な役割を担っていると予想された. そこで, *Sphingomonas* SPTのHis159をアラニンや芳香族アミノ酸残基に置換した変異型酵素(H159A, H159F, H159Y, H159W)を作製してその反応を解析した¹³⁾.

3-1. 変異型SPTの酵素活性と副反応, およびL-セリンに対する解離定数—His159はL-セリンの結合部位として機能し, 副反応を抑制する—

変異型SPT精製標品のうち, H159Aのみが酵素活性を維持していた. これは, His159の側鎖がSPTの酵素活性「それ自体」には必須ではないという意味で予想に反する結果であった. WTと比較してH159Aは V_{max} が16%に低下し, L-セリンに対する K_m は約10倍上昇していたが, パルミトイル-CoAに対する K_m はほとんど変化がなかった. 全ての変異型SPTにおいて, L-セリンに対する解離定数(K_d)はWTの数十倍であり, His159はL-セリンの結合に貢献していることが示された.

注目すべきことに, 全ての変異型SPTにおいて, SPT-L-セリン外アルジミン中間体は不安定で, 時間経過に伴ってPLPが当量のピリドキサミンリン酸(pyridoxamine 5'-phosphate; PMP)へ変化した. 本来ならSPTが触媒しないアミノ基転移反応が進行して酵素が不活化したのである. PLP酵素におけるこのようなアミノ基転移反応は, 目的の生成物を作らないことから, 「実を結ばないアミノ基転移反応」ということで“abortive transamination”と呼ばれる. ヒスチジン側鎖がないとL-セリンの α -カルボキシル基の固定が不十分になり, たまたま α -プロトンがイミんピリジン環平面に対して垂直になったときに α -脱プロ

トン化が起きてPMPを生じると考えられた. 実際, *Sphingobacterium* SPTのL-セリンとの複合体の結晶構造において, 活性中心ではL-セリンがアミノ基でPLPと外アルジミン中間体(図1, IIa)を形成し, L-セリンのカルボキシル基は2個の水分子に加えてHis138の側鎖と水素結合していた^{10,11)}(図3-b). この相互作用のためにL-セリンの $C\alpha$ 位水素の配向がPLPとSchiff塩基によって形成された平面に対して垂直になっていなかった. *Sphingomonas* SPTにおいてHis159は, L-セリンの α -カルボキシル基と水素結合することで結合を担い, また, パルミトイル-CoAの結合前には, α -脱プロトン化によるabortive transaminationの進行を防ぐようにL-セリンを適正な配向に固定していると考えられた.

3-2. パルミトイル-CoA結合による α -脱プロトン化とクライゼン型縮合反応における酸触媒としてのHis159の役割

H159AとL-セリン, およびパルミトイル-CoAの三者の反応の遷移相速度論的解析を行った. 時間分解スペクトルではWTにおいては見られないキノノイド中間体の顕著な蓄積が観測され(図2-e), グローバル解析の結果, 2種類のキノノイド中間体(図1; III, Vb)の存在が明らかとなった(図2-f). また, キノノイド中間体(図1; III)から縮合生成物(図1; IV)への変換過程(クライゼン型縮合)の速度定数が著しく低下していたことから, この過程においてHis159が一般酸触媒として機能することが速度論的にも示唆された. クライゼン型縮合の過程とはキノノイド中間体の $C\alpha$ (カルボアニオン)がパルミトイル-CoAのチオエステルを求核攻撃して新しい炭素-炭素結合を作ることである. このときHis残基のNe2の解離可能なプロトンが, アシルカルボニルの酸素原子に移動することによってパルミトイル-CoAのチオエステル結合を活性化する, つまりHis159が一般酸触媒として作用するのである(図1参照).

3-3. His159のもう一つの役割について —H159AとKDSとの反応—

酵素に生成物であるKDSを加えて逆反応を調べた. WTではPLP-KDSアルジミン中間体(図1; VI)が生じたが, H159AにおいてはPLP-KDSアルジミン中間体から派生するキノノイド中間体(図1; Vb)が一過性に蓄積し, 時間経過に伴ってabortive transaminationが進行した(図2-g). H159AではKDSのカルボニル酸素が固定されないためにアルジミン中間体に比べて, キノノイド中間体が相対的に安定化されたと考えられた. すなわち, His159

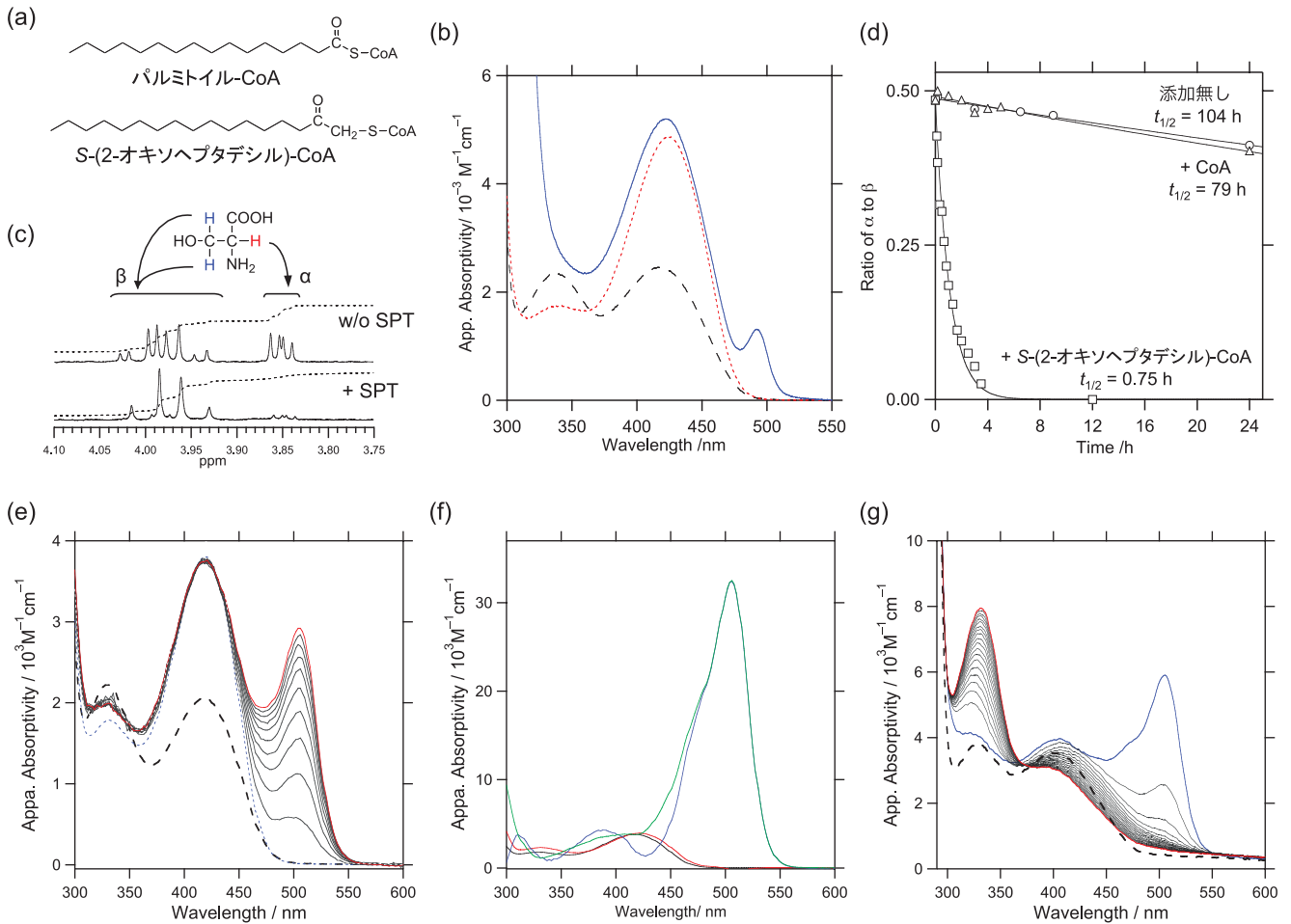


図2 SPT精製標品と基質、基質アナログ、生成物との反応

(a) パルミトイル-CoA と S-(2-オキソヘプタデシル)-CoA の化学構造。S-(2-オキソヘプタデシル) CoA は、パルミトイル-CoA においてチオエステルを形成しているアシルカルボニルと CoA 由来の硫黄原子の間にメチレン基を 1 個導入することにより、SPT の触媒する求核置換反応に対して不活性にした基質アナログである。(b) L-セリンと S-(2-オキソヘプタデシル)-CoA 存在下の野生型 SPT (WT) の吸収スペクトル。基質非存在下 (黒破線)、45 mM L-セリン存在下 (赤点線)、および、45 mM L-セリンと 0.958 μM S-(2-オキソヘプタデシル)-CoA 存在下 (青実線) における SPT の吸収スペクトル。(c) L-セリンの¹H-NMR スペクトル。5 μM SPT と 1.4 mM S-(2-オキソヘプタデシル)-CoA の存在下での 10 mM L-セリンの¹H-NMR スペクトル。上が酵素添加前、下が酵素添加後 210 分である。積分曲線を点線で示す。(d) L-セリンの α -プロトン交換反応の時間依存性。10 mM L-セリンの α -プロトンと β -プロトンの積分強度の比を、酵素添加後の時間に対してプロットした。実線は L-セリンのシグナル減衰の理論曲線を示す。○; 5 μM SPT 存在下。△; 5 μM SPT と 1.5 mM CoA 存在下。□; 5 μM SPT と 1.4 mM S-(2-オキソヘプタデシル) CoA 存在下。(e) H159A と L-セリンとパルミトイル-CoA の反応における時間依存的なスペクトル変化。45 μM H159A を 200 mM L-セリン、50 μM パルミトイル-CoA と反応させた。破線は基質非存在下での H159A のスペクトルを、青点線は H159A-L-セリン複合体のスペクトル。実線はパルミトイル-CoA との混合 1 秒後 (赤色) まで、0.1 秒毎に測定した時間分解スペクトルである。(f) パネル e で示したスペクトルのグローバル解析から算出した理論スペクトル。各スペクトルは図 1 の IIa (黒色)、IIb (赤色)、III (青色) および Vb (緑色) に対応する。(g) H159A と KDS の反応。破線は KDS 非存在下での H159A のスペクトル。実線は KDS (2.5 μM) の存在下での H159A (6 μM) のスペクトル変化を示す。スペクトルは KDS の添加直後と 30 分ごとに 600 分間測定した。505 nm の吸収ピークは徐々に減少し、326 nm の吸収が増加した (青線から黒線を経て赤線のスペクトルへ変化)。

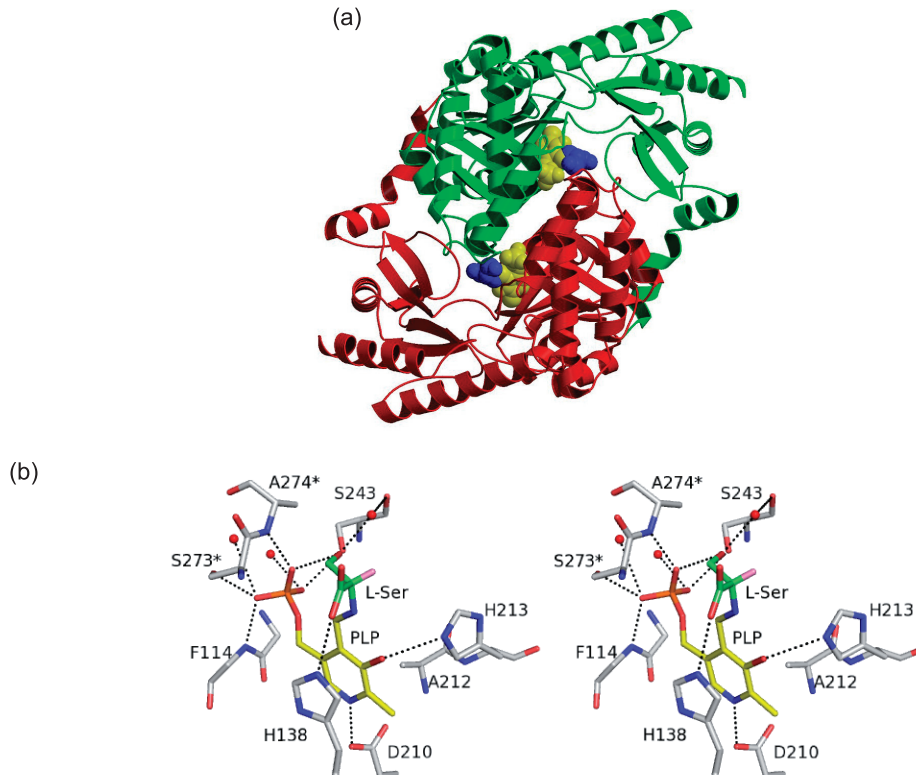


図3 *Sphingobacterium multivorum* SPTの結晶構造

(a) 全体構造. SPTの各サブユニットをリボンモデル(赤, 緑), 補酵素 PLP(黄色)と基質L-セリン(青)を球状モデルで示した. (b) 活性中心の構造. SPTの活性部位の構造をステレオ図で示した. 赤球は水分子. L-セリンの α -水素はマゼンタで示した. *Sphingobacterium* SPTのHis138は*Sphingomonas* SPTのHis159に対応する.

は PLP-KDS アルジミン中間体からのキノノイド中間体の生成を抑制することでこの段階での副反応の進行を抑え、酵素からの生成物の遊離を促進していることが示唆された.

4. 結 語

以上の実験結果に基づき, *Sphingomonas* SPTの反応制御機構についてまとめる. L-セリンがSPTに結合すると Schiff 塩基交換反応を経て外アルジミン中間体が生じる. SPTの外アルジミン中間体では, 他の一般的な PLP 酵素とは異なり, His159によってL-セリンのカルボキシル基が固定される結果, α 位水素の配向が PLP ピリジン環と Schiff 塩基が作る平面に対して垂直になれず, 結果として中間体の脱プロトン化による副反応進行が抑制されている. パルミトイル-CoAが結合すると, His159との水素結合の組換えによってL-セリンのコンフォメーションが変化し, 近傍の Lys265により α -プロトンが引き抜かれてキ

ノノイド中間体が生じる. パルミトイル-CoAの有無による外アルジミン中間体の α -脱プロトン化の制御は, 反応性の高いキノノイド中間体を無駄に作らない点で合目的である. 縮合反応, CoAの解離と脱炭酸反応が進行して KDSが生じ, これが酵素から解離すると分子内 Schiff 塩基が再生する. 全体を通して重要な役割を果たすのが His 159である. His159は, 活性部位における基質の配向だけでなく生成物の配向も酵素反応の進行に合わせて厳密に制御し, 両者からの副反応の進行を抑制する. また, His159は一般酸触媒としても働き, 炭素-炭素結合の形成および脱炭酸を促進している. 一つのアミノ酸残基による反応制御として実に絶妙である. ところが, これらは非律速段階であるために, 古典的な部位特異的変異解析では「変異による活性消失が認められないことから触媒性残基ではない」とされ, His159の真の役割が理解されない. しかし, SPT特異的な反応の進行を厳密に制御するためには His 159の多機能的役割は不可欠である. 酵素反応の本当の制

御機構を知るためには、触媒性残基のみならず反応特異性を司る残基を見出して解析することが重要であろう。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は多くの方々との共同研究によって得られたものである。この場を借りて関係者の方々に深謝する。

- 1) Futerman, A.H. & Hannun, Y.A. (2004) *EMBO Rep.*, 5, 777-782.
- 2) Hanada, K. (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, 1632, 16-30.
- 3) Ikushiro, H., Hayashi, H., & Kagamiyama, H. (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Vitamin B6 and PQQ-dependent Proteins* (Iriarte, A., Kagan, H.M., & Martinez-Carrion, M., Eds.), pp. 251-254, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- 4) Ikushiro, H., Hayashi, H., & Kagamiyama, H. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 18249-18256.
- 5) Ikushiro, H., Hayashi, H., & Kagamiyama, H. (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, 1647, 116-120.
- 6) Ikushiro, H., Islam, M.M., Tojo, H., & Hayashi, H. (2007) *J. Bacteriol.*, 189, 5749-5761.
- 7) Ikushiro, H., Hayashi, H., & Kagamiyama, H. (2004) *Biochemistry*, 43, 1082-1092.
- 8) Ikushiro, H., Fujii, S., Shiraiwa, Y., & Hayashi, H. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 7542-7553.
- 9) Yard, B.A., Carter, L.G., Johnson, K.A., Overton, I.M., Dorward, M., Liu, H., McMahon, S.A., Oke, M., Puech, D., Barton, G.J., Naismith, J.H., & Campopiano, D.J. (2007) *J. Mol. Biol.*, 370, 870-886.
- 10) Ikushiro, H., Okamoto, A., & Hayashi, H. (2006) *Sphingolipid Biology* (Hirabayashi, Y., Igarashi, Y., & Merrill, A., Eds.), Springer-Verlag Tokyo/Japan, pp. 483-492.
- 11) Ikushiro, H., Islam, M.M., Okamoto, A., Hoseki, J., Murakawa, T., Fujii, S., Miyahara, I., & Hayashi, H. (2009) *J. Biochem.*, 146, 549-562.
- 12) Schneider, G., Kack, H., & Lindqvist, Y. (2000) *Structure*, 8, R1-6.
- 13) Shiraiwa, Y., Ikushiro, H., & Hayashi, H. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 15487-15495.

生城 浩子, 林 秀行
(大阪医科大学医学部生化学教室)

Structural and kinetic study on bacterial serine palmitoyltransferase

Hiroko Ikushiro and Hideyuki Hayashi (Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Osaka Medical College, 2-7, Daigaku-machi, Takatsuki, Osaka 569-8686, Japan)

破骨細胞分化の制御機構

1. はじめに

骨はリン酸カルシウム的一种であるヒドロキシアパタイトとI型コラーゲンを主成分とした強固な組織であり、その内部では破骨細胞と骨芽細胞によって骨吸収と骨形成が絶え間なく繰り返されている。この営みは「骨リモデリング (bone remodeling)」とよばれ、骨の強度や血清カルシウム濃度を調節する重要な生体システムの一つである。しかし、閉経後の女性や、歯周病、リウマチ、骨転移を伴う乳がんの患者では、破骨細胞が異常に活性化して骨の破壊をきたす。したがって、この細胞の分化メカニズムを解明すれば、これら疾患の治療方法の開発に応用できる可能性がある。本レビューでは、破骨細胞分化制御システムについて、これまでの研究の流れや疾患との関係を含めて概説したい。

2. 破骨細胞分化を誘導する細胞外刺激

破骨細胞の前駆細胞は単球・マクロファージに由来し、骨の微小環境において外部から種々の刺激を受けることにより破骨細胞に分化する (図1)。刺激因子の一つであるM-CSF (macrophage colony-stimulating factor) は、破骨細胞前駆細胞の形成と、その後の破骨細胞分化において必須であり、M-CSF 遺伝子にフレームシフト変異をもつ *op/op* マウスは、破骨細胞形成不全による大理石骨病を発症する¹⁾。一方、*in vitro* における破骨細胞分化誘導系では、TGF (transforming growth factor)- β をブロックすると破骨細胞分化が阻害されることから、TGF- β シグナルが破骨細胞分化に密接に関わっていると考えられる²⁾。また、*in vitro* において破骨細胞の前駆細胞をメチルセルロース培地中で浮遊状態を維持しながら培養すると、前駆細胞は成熟した破骨細胞に分化できない。したがって、インテグリンを介した接着シグナルが必須であるといわれている³⁾。

これらの刺激因子は破骨細胞の分化に必要ではあるが、破骨細胞分化に特有ではなく、最終的に破骨細胞分化のトリガーとしての役割を担うのは、骨芽細胞が産生するRANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) とよばれる膜結合型の分子である⁴⁾。RANKLあるいはその受容体であるRANKを欠損したマウスは、破骨細胞形成不全による