

吉田 優¹⁾, 増田 充弘¹⁾²⁾, 藤島 佳未¹⁾, 西海 信¹⁾,
水野 成人²⁾, 久津見 弘¹⁾, 井口 秀人¹⁾, 東 健¹⁾

(¹ 神戸大学大学院医学研究科内科学講座

消化器内科学分野,

² 神戸薬科大学医療薬学研究室)

The intracellular traffic and the immune surveillance by neonatal Fcγ receptor for IgG

Masaru Yoshida¹⁾, Atsuhiko Masuda¹⁾²⁾, Yoshimi Fujishima¹⁾, Shin Nishiumi¹⁾, Shigeto Mizuno²⁾, Hiromu Kutsumi¹⁾, Hideto Inokuchi¹⁾, and Takeshi Azuma¹⁾ (Division of Digestive Diseases, Kobe University Graduate School of Medicine, 7-5-1 Kusunoki, Chuo, Kobe 650-0017, Japan, ²Department of Medical Pharmaceutics, Kobe Pharmaceutical University, 4-19-1 Motoyamakitamachi, Higashinada, Kobe 658-8558, Japan)

アサリ貝リゾチームの構造と機能

1. はじめに

リゾチーム (EC 3.2.1.17) は、グラム陽性菌の細胞壁の主要構成成分である NAG (*N*-acetyl glucosamine) と NAM (*N*-acetyl muramic acid) の間の β-1,4-グリコシド結合を切断する溶菌酵素である。細菌の感染を防ぐための第一の防波堤であり、ヒトにおいては、涙腺、唾液、汗などに常に含まれており、細菌感染時にはマクロファージ、好中球、好塩球などの免疫細胞から分泌され、細菌の感染を防ぐ。リゾチームは、ヒトを初めとするほ乳類、鳥類、は虫類、真菌、原核生物、ファージ、植物など様々な生物に存在し、様々な動物において抗菌酵素として働いている。また、リゾチームは細菌にも存在し、細胞壁の代謝に関わっているのではないかと考えられている。リゾチームは一次配列上のホモロジーから、いくつかの型に分類されており、現在、6種類の型 (ニワトリ型 (c-type), ファージ型, バクテリア型, ゲース型, 植物型, そして無脊椎動物型) が構築されている。五つの型, すなわちニワトリ型¹⁾, ファージ型²⁾, バクテリア型³⁾, ゲース型⁴⁾そして植物型⁵⁾に関しては、ひとつ又はそれ以上のリゾチームの立体構造が解析されている。ニワトリ卵白リゾチームの立体構造は、酵素タンパク質としては世界で初めて、1965年に Phillipsらの手によって、明らかにされた¹⁾。これまで解析された

リゾチームは、活性部位周辺の立体構造および一次配列上の保存性が高く⁶⁾、「新規のリゾチームが単離されても、そのアミノ酸配列を解析すれば、そのタンパク質の立体構造を高い信頼性で予想することができるであろう」と考えられていた。

Jollès らによって 1975 年に無脊椎動物であるヒトデから溶菌活性を指標として単離されたリゾチームは、一次配列がこれまでに単離されていたリゾチームのいずれとも配列相同性がなかった⁷⁾。その後、種々の無脊椎動物からリゾチームが単離され、それらの配列がヒトデから得られたリゾチームと高い配列相同性を持っていたことから、2002 年に無脊椎動物型 (invertebrate-type, i-type) リゾチームというファミリーが新たに構築された⁸⁾。以前、我々の研究室においてアサリ貝 (*Tapes japonica*) から溶菌活性に基づいて単離し、一次構造を決定したアサリ貝リゾチーム (以下、*Tapes japonica* lysozyme, 以下 TJL と略す) はこの無脊椎動物型リゾチームファミリーに属している⁹⁾。TJL は 90°C という高温条件下でも活性を保持する非常に安定な酵素であり、分子量約 14 kDa の塩基性タンパク質で、123 個のアミノ酸から構成されている。

筆者らは、最近、TJL と基質類似体 NAG の三量体 ((NAG)₃) との複合体の立体構造を X 線結晶構造解析により 1.6 Å 分解能で決定し、世界で初めて無脊椎動物型リゾチームの構造を明らかにした¹⁰⁾。

2. アサリ貝リゾチームの立体構造

今回解かれた TJL の立体構造は 6 本のヘリックスと 1 組の β シートから構成される α/β 型のタンパク質であった (図 1-A)。また、TJL の中には無脊椎動物型リゾチームの間でも高く保存されている 14 個の Cys があり、これらは全て S-S 結合を形成していた。TJL は熱安定性が非常に高く、わずか 14 kDa の酵素の中に 7 本の S-S 結合が存在することが、その安定性の高さの要因であると考えられる。

また、そのアミノ酸配列は保存されていないにもかかわらず、活性部位近傍における二次構造の立体構造上の配置はこれまでに同定されてきた他の型のリゾチームと非常に高い類似性を持っていた (図 1-B)。ニワトリ卵白リゾチーム (HEL) と TJL との構造の比較から、HEL の活性触媒基である Glu35 と基質 (NAG)₃ の位置関係は、TJL の Glu18 と (NAG)₃ の立体位置関係と同じであった。一方で TJL の Glu18, Asp30 は無脊椎動物型リゾチーム間での保存性が高く (図 1-C)、また、Glu18, Asp30 のアラニン変

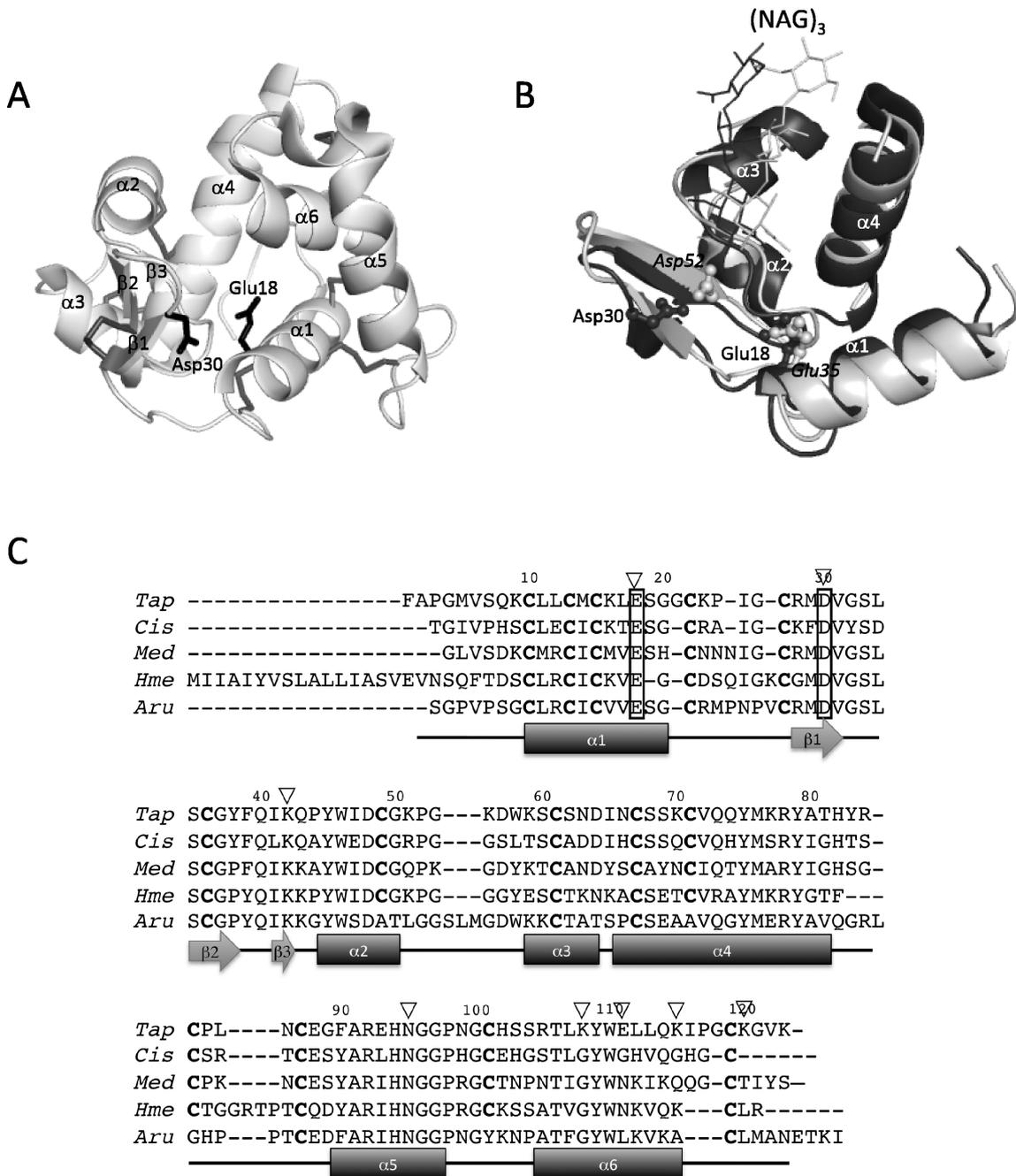


図1 アサリ貝リゾチームの構造

A. アサリ貝リゾチームのX線結晶解析構造のリボンモデル。活性触媒基を黒、S-S結合を灰色で示す。

B. ニワトリ卵白リゾチーム (Arg20-Met105, 白) とアサリ貝リゾチーム (Phe1-His82, 黒) の立体構造の重ね合わせ。各リゾチームの触媒基 (ニワトリ卵白リゾチームは斜文字で示す), (NAG)₃ をスティックモデルで示した。ヘリックスの番号はアサリリゾチームに由来する。

C. 無脊椎動物型リゾチームの一次配列のアラインメントと二次構造の位置。アサリ貝 (*Tap*), ニシキ貝 (*Cis*), ムラサキ貝 (*Med*), ヒル (*Hme*), ヒトデ (*Aru*) の配列を並べた。システインを太字で示し, 活性触媒基を線で囲んだ。▽は二量体の静電相互作用に関与するアミノ酸を示す。

異体では活性が消失したことから Glu18, Asp30 がその活性触媒を担っていることが強く示唆された。このように無脊椎動物リゾチームの活性クレフトの構造はニワトリ型リゾチームとよく似ていることが示された。

3. TJL リゾチームの触媒機構

リゾチームの活性触媒部位近傍の立体構造はアミノ酸配列の差異に関わらず保存されているようであるが、これまで以下の三つの触媒機構が報告されている (図 2-A)¹¹⁾。1) フェージ型やゲース型における、糖の切断により α -アノマーを生成する機構 (invertig mechanism), 2) ニワトリ型リゾチームにおけるオキソカルボニウム中間体を經由して糖鎖を切断して β -アノマーを生成する機構 (retaining mechanism), 3) 2) と同様、 β -アノマーを生成するが、酵素-基質中間体を經由して、糖鎖を切断する機構、である。3) においては 2001 年に、Withers らのグループが *N*-アセチル基の代わりにフッ素を導入した基質類似体と HEL の変異体 (E35Q) を用いて酵素-基質中間体の形成を検出している¹²⁾。また、Kuroki らは HEL の変異体 (D52E) は基質との中間体を生成して糖鎖の切断を行っていることを報告しており、その中間体の単離に成功している¹³⁾。しかしながら、天然体のリゾチームの酵素-基質中間体の生成はこれまで確認できていないなかった。

筆者らは、TJL において酵素-基質中間体を MALDI-TOF-MASS にて検証した。その結果、TJL では pH 3.0 において (NAG)₆ を消化後に、TJL 由来のピークと脱水化した (NAG)₄ の分子量相当 (推定分子量: 818) が増加したピークが検出できた (図 2-B)。また、Asp30 をアラニンに変換した変異体においては、このようなピークは見られなかった。すなわち無脊椎動物型リゾチームの活性触媒機構は図 2-A 下図に示すような酵素-基質中間体を經由して、加水分解が行われているものと考えられる。変異体ではなく天然のリゾチーム、および基質を用いて、酵素-基質中間体の形成を見いだしたのはこれが初めてである。今回解明した TJL の立体構造において、TJL の Asp30 は β シート構造における $\beta 1$ 上にあり、HEL の $\beta 2$ 上にある触媒基 Asp52 と側鎖の配置がずれていた (図 1-C)。従って、これらの触媒基の配置が酵素-基質中間体の形成に関与しているのではないかと考えている。

4. 塩による活性化機構

蠣やムール貝など二枚貝のリゾチームには、海水濃度による活性変化がいくつか報告されている^{14,15)}。すなわち、

塩濃度上昇につれて、活性の上昇が起こる現象が見つまっている。しかしその原因については明らかになっていなかった。

我々はこのような塩濃度が二枚貝リゾチーム活性に与える影響を、X 線結晶解析の結果から検証した。結晶解析の結果、TJL は結晶中において非対称単位中に 2 分子が存在することが明らかとなった。TJL 2 分子の相互作用部位を観察すると、二つの分子の間に数多くの静電相互作用が存在することが確認された (図 3-A)。この中には、活性触媒基と同定された Glu18 と Asp30 が含まれている。従って、結晶中において非対称単位中の 2 分子がそれぞれ相手の活性触媒基と相互作用していることが示唆された。種々のリゾチームは単量体で機能しているという報告は数多くあるが、TJL の結晶構造のような活性部位を覆い隠すような二量体はこれまで解析された種々のリゾチームの結晶構造では報告されていない。我々は結晶構造中の二量体構造が溶液中でも存在しているのか確認するためにゲルろ過クロマトグラフィーを行った。その結果、低塩濃度 (83 mM NaCl) において、TJL は二量体を形成し、一方で、高塩濃度 (500 mM NaCl) において、TJL は単量体であることが示唆された。また、二量体が活性にどのような影響を及ぼすのかを調べるために、TJL のキチナーゼ活性の塩濃度依存性を調べたところ、100 mM 付近の NaCl 濃度において、TJL の急激な活性上昇が見られることがわかった (図 3-B)。これは TJL が活性触媒基である Glu18, Asp30 を含んだ静電相互作用により、不活性な二量体と、活性化状態の単量体という二つの構造を形成することができる酵素であることを示唆している。

二枚貝は海水中に生息するバクテリアなどを栄養源として生存している。バクテリアが二枚貝内に入るときは海水 (約 500 mM の塩濃度) とともに入るため、TJL が機能を発揮するときは海水のように濃い塩濃度であることは理にかなっている。すなわち、TJL は通常不活性形態の二量体を形成しており、海水が体内に入ってくると、その中に生息しているバクテリアなどを殺傷するために、静電相互作用により誘起されている不活性形態の二量体が、海水の塩濃度の影響を受けて活性形態である単量体へと解離し、バクテリアなどからの感染を防いでいるのではないかと考えている。

TJL の二量体形成に関わるアミノ酸の一次配列が、同定された無脊椎動物型リゾチームの間で保存されているかどうか解析したところ、Glu18, Asp30, Lys42 は保存されていた (図 1-C)。また、C 末端領域の TJL において相互作

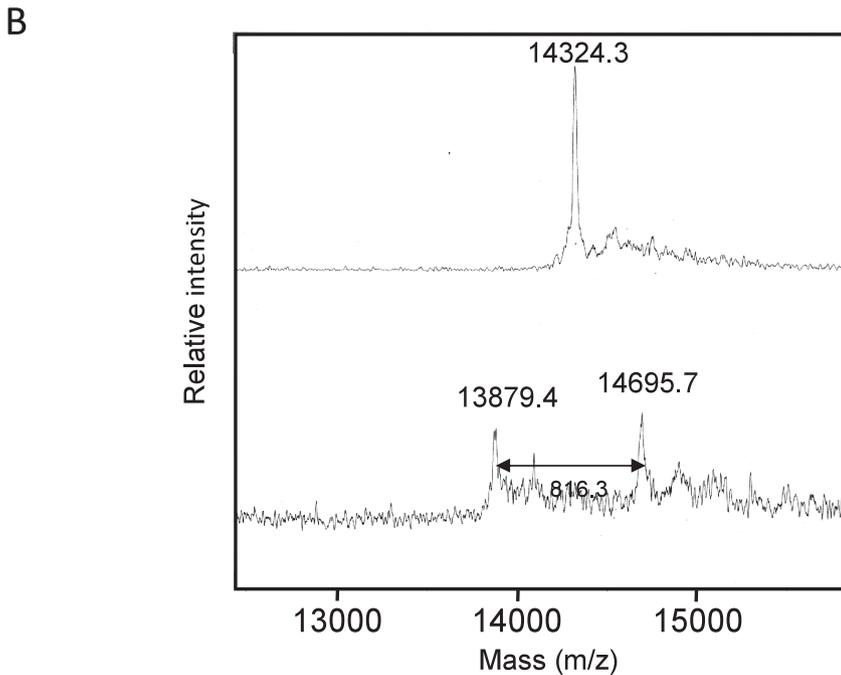
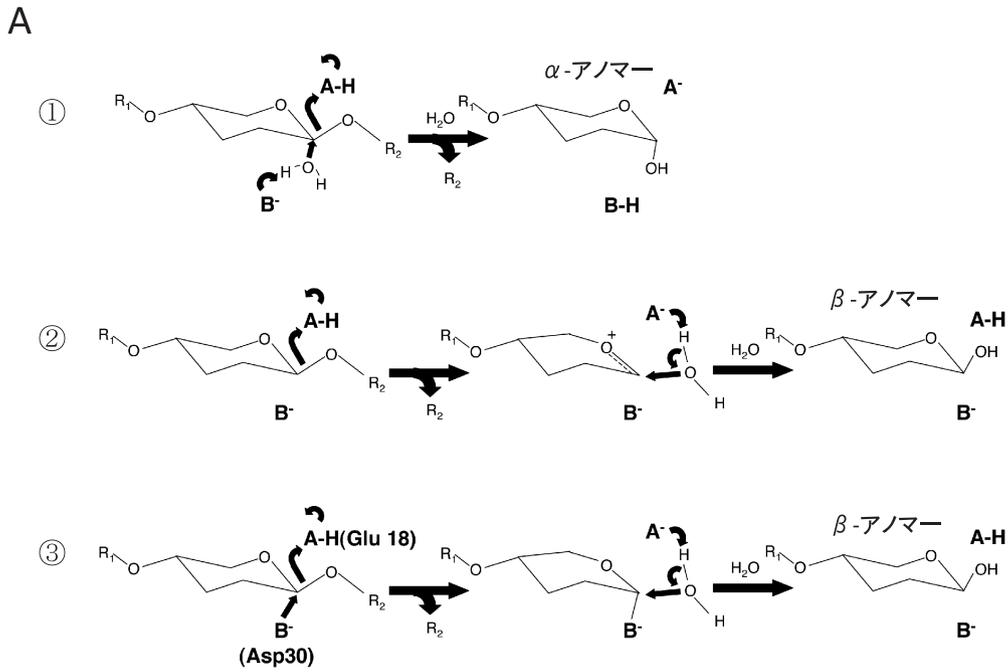


図2 アサリ貝リゾチームの活性触媒機構

A. リゾチームで提唱されている活性触媒機構を図に示した. 上から, ① α -アノマーを生成する inverting mechanism, ②オキシカルボニウム中間体を経由し, β -アノマーを生成する retaining mechanism, ③糖酵素共有結合中間体を経由し, β -アノマーを生成する retaining mechanism を示している.

B. 各リゾチームと (NAG)₆ の酵素消化後 (pH 3.0, 37°C, 4時間) の MALDI-TOF-MASS スペクトル. (上) ニワトリ卵白リゾチーム (推定分子量: 14313.1), (下) アサリ貝リゾチーム (推定分子量: 13860.1). アサリ貝リゾチームには, 消化後に脱水化した (NAG)₄ の分子量分 (推定分子量: 818) が増加したピークが検出できた.

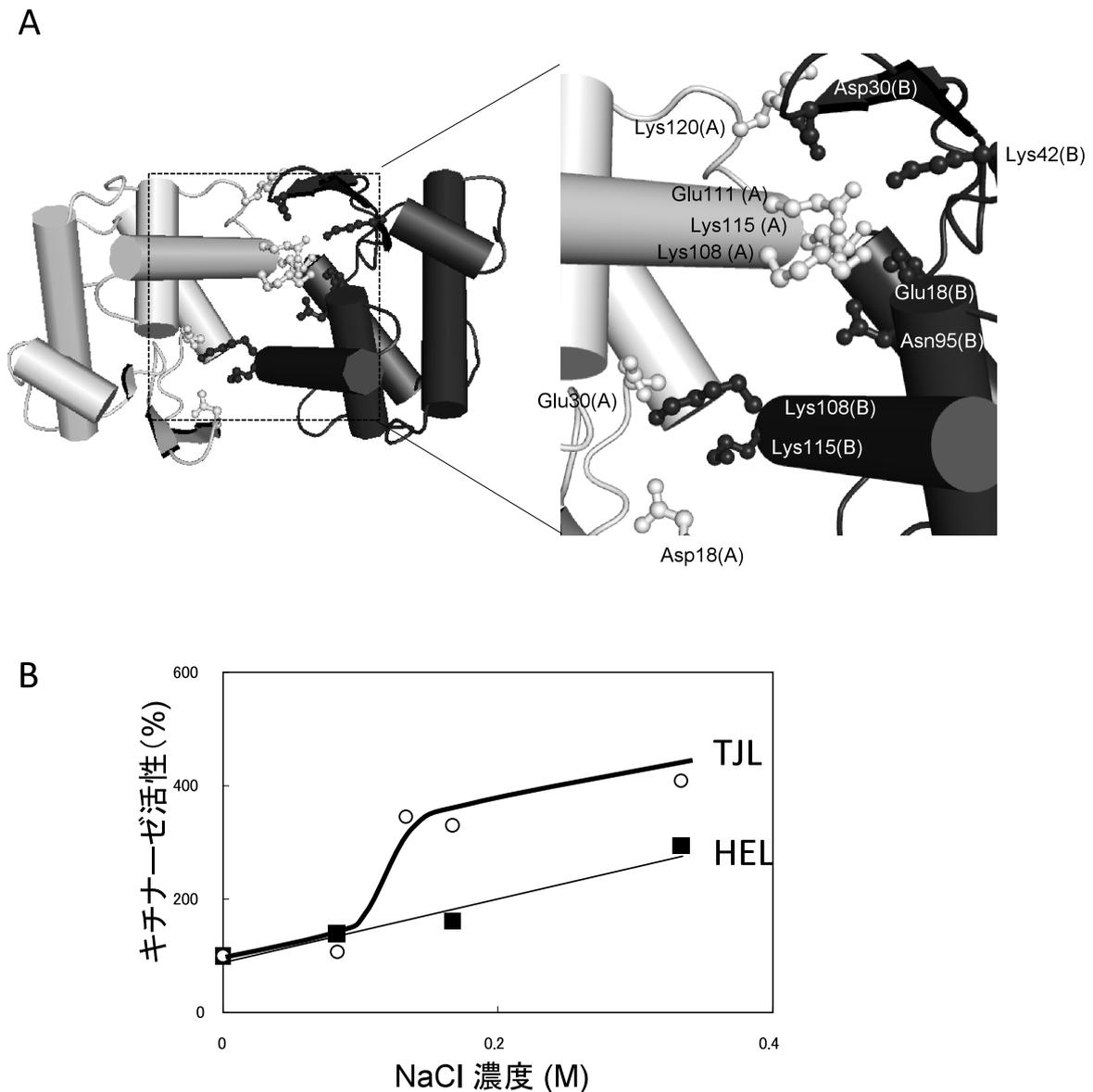


図3 アサリ貝リゾチームの二量体

A. 結晶構造に見られた二量体構造. 右はその二量体の界面を示している. 二量体の界面で静電相互作用に関与しているアミノ酸をスティックモデルで示した. アミノ酸名の後の () に A, B どちらの分子由来かを示している.

B. リゾチームのキチナーゼ活性と塩濃度依存性. ○がアサリ貝リゾチーム, ■がニワトリ卵白リゾチームを示している. 0 M NaCl の時の活性を 100% として表している.

用に関与する Lys108, Lys115, Lys120 に関しては, 他の二枚貝リゾチームでは, アミノ酸自体は保存されていないが C 末ヘリックスにおいて塩基性アミノ酸が多く分布している. 以上の結果から無脊椎動物型リゾチームにおいては C 末端領域が空間的に隣りの分子の活性触媒クレフトに近接し, 二量体を形成し, 活性制御を行っているのではな

いかと考えている.

5. おわりに

リゾチームは既に構造と機能の関係については, 議論し尽くされた感じのある酵素であるが, 調べれば調べるほど活性触媒機構, 塩による活性制御機構など, 新たな知見が

次々と現れてくる。まだまだ興味の尽きないタンパク質である。

今回紹介しましたアサリリゾチームのX線結晶構造解析は九州大学農学研究院の角田佳充先生、当研究室の後藤隆君によって行われました。リゾチームの構造と機能の研究に関しては崇城大学生物生命学部の井本泰治教授に多大なるご指導を承りました。この場をお借りして感謝いたします。

- 1) Blake, C.C., Koenig, D.F., Mair, G.A., North, A.C., Phillips, D.C., & Sarma, V.R. (1965) *Nature*, **206**, 757-761.
- 2) Matthews, B.W. & Remington, S.J. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **71**, 4178-4182.
- 3) Rau, A., Hogg, T., Marquardt, R., & Hilgenfeld, R. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 31994-31999.
- 4) Weaver, L.H., Grütter, M.G., & Matthews, B.W. (1995) *J. Mol. Biol.*, **245**, 54-68.
- 5) Marcotte, E.M., Monzingo, A.F., Ernst, S.R., Brzezinski, R., & Robertus, J.D. (1996) *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 155-162.
- 6) Monzingo, A.F., Marcotte, E.M., Hart, P.J., & Robertus, J.D. (1996) *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 133-140.
- 7) Jollès, J. & Jollès, P. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **54**, 19-23.
- 8) Bachali, S., Jager, M., Hassanin, A., Schoentgen, F., Jollès, P., Fiala-Medioni, A., & Deutsch, J.S. (2002) *J. Mol. Evol.*, **54**, 652-664.
- 9) Ito, Y., Yoshikawa, A., Hotani, T., Fukuda, S., Sugimura, K., & Imoto, T. (1999) *Eur. J. Biochem.*, **259**, 456-461.
- 10) Goto, T., Abe, Y., Kakuta, Y., Takeshita, K., Imoto, T., & Ueda, T. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 27459-27467.
- 11) Sinnott, M.L. (1990) *Chemical Reviews*, **90**, 1171-1202.
- 12) Vocadlo, D.J., Davies, G.J., Laine, R., & Withers, S.G. (2001) *Nature*, **412**, 835-838.
- 13) Kuroki, R., Ito, Y., Kato, Y., & Imoto, T. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 19976-19981.
- 14) Xue, Q.G., Itoh, N., Schey, K.L., Li, Y.L., Cooper, R.K., & La Peyre, J.F. (2007) *Cell Mol. Life Sci.*, **64**, 82-95.
- 15) Olsen, O.M., Nilsen, I.W., Sletten, K., & Myrnes, B. (2003) *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **136**, 107-115.

阿部 義人, 植田 正

(九州大学大学院薬学研究院

蛋白質創薬学 (旧免疫薬品学) 分野)

Structure and function of *Tapes japonica* lysozyme
Yoshito Abe and Tadashi Ueda (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Maidashi 3-1-1, Higashiku, Fukuoka, 812-8582, Japan)