

## ウエルシュ菌イオタ毒素ia成分の立体構造と触媒活性の関係

- 永浜政博<sup>1</sup>、久恒順三<sup>1</sup>、小林敬子<sup>1</sup>、阪口義彦<sup>2</sup>、津下英明<sup>3</sup>、勝沼信彦<sup>3</sup>、櫻井 純<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>徳島文理大・薬・微生物、<sup>2</sup>岡大・医・病原細菌、<sup>3</sup>徳島文理大・健康科学研

ウエルシュ菌イオタ毒素は、イオタa(ia)とイオタb(ib)よりなる2成分毒素で、iaは、 $\text{NAD}^+$ を $\text{NAD}^+$ -グリコヒドロラーゼ活性(NADase)でニコチンアミドとADP-リボースに加水分解し、ADP-リボース部をアクチンに転位させるADP-リボシルトランスフェラーゼ活性(ARTase)を有している。一方、ibは、iaの細胞内への侵入に関与することが知られている。我々は、iaの結晶化に成功し、その立体構造を明らかにした。その構造から、iaは、N末側のNDメインとC末側のCDメインより成ることが判明し、CDメイン中のcavity中には、NADHが結合し、ADP-リボシル化毒素ファミリーの共通モチーフもcavity内に存在することが判明した。まず、iaのNDメインとCDメインの役割を明らかにするため、ia遺伝子からNDメインとCDメインを別個に発現、単離し、それぞれのドメインのイオタ毒素のラウンディング活性に対する影響から、NDメインがIbとの結合に関与することが判明した。次に、CDメインの酵素活性に関与する残基を解析するため、ADP-リボシル化毒素ファミリーで共通の残基、そして、立体構造から酵素活性に重要であると推察されるアミノ酸残基、それぞれを置換し、NADaseとARTaseのカイネティック分析を行った。以上から、ADP-リボシル化の反応機構は、まず、 $\text{NAD}^+$ は、380位Glu、269位と352位Arg、そして、349位Pheで固定され、 $\text{NAD}^+$ がリング状構造となり、その結果、ニコチンアミドリングのアミノ基の水素原子が $\alpha$ 位のリン酸基にひっぱられて、電子の偏りが生じN-グルコシド結合が切断される $\text{S}_{\text{N}}1$ 反応で進行する事が判明した。次に、生じたADP-リボースのオキシニウムイオンが、378位Gluと相互作用して、遷移状態となり、これに、アクチンの177位Argが接近し、電子が押し出され、ADP-リボシル化される事が明らかとなった。さらに、触媒Cavityの入口に存在する255位Asnはアクチンの認識に関与する残基であることが判明した。