

# ホスホリパーゼを利用した体外臨床診断用酵素の開発

杉森 大助

リン脂質は両親媒性物質であり、自己組織化によって脂質二重層を形成し生体膜の主要な構成要素としての役割を担っている。また、ホスホリパーゼ (PL, 図1) の加水分解作用によって生じるリゾリン脂質や脂肪酸がシグナル伝達分子として機能するなど、PLは生体内で重要な役割を担っている。近年、プラズマローゲンなどのエーテル型リン脂質 (図2) の血中濃度と各種疾患や病態との相関性が明らかにされつつあり、改めてリン脂質およびその代謝経路に関わるPLが注目されている。

PLは1960年代から生物毒との関連など生理・医学分

野において報告されはじめた酵素である。その後、微生物由来PLの産業利用を指向した研究も進められてきた。PLにはA<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C, D型があり (図1), これらのうちPLA<sub>1</sub>はマヨネーズ製造や脱ガム酵素として, PLA<sub>2</sub>はケーキやパンなどの加工, PLCは脱ガム酵素, PLDはリン脂質定量キットやホスファチジルセリン合成酵素として, すでに社会実装されているものもある。近年, PLの用途としてPOCT (Point Of Care Testing) キット\*への応用が注目されている。本稿では, POCTキット開発につながったPLA<sub>1</sub>, PLDに関する筆者らの研究について紹介する。

## PLA<sub>1</sub>とPLDを利用した軽度認知障害診断キット

認知症の6割を占めるアルツハイマー型認知症 (以下, 認知症) は現在世界で4000万人以上, 国内で400万人存在すると言われている。認知症に至る前段階として軽度認知障害 (Mild Cognitive Impairment: MCI) が現れ, 1年で10%, 5年で40%が認知症に移行するとされる一方で, 早期に適切な予防を行うことで一定程度認知機能が改善すると報告されている<sup>1)</sup>。したがって, MCI患者をできるだけ初期段階で見いだすことが重要となり, MCIを検出可能なPOCTキットの開発が期待されていた。MCIの初期段階を捉えるバイオマーカーとして血中エタノールアミン型プラズマローゲン (PlsEtn, 図2) レベルの低下が知られていたため<sup>2)</sup>, 筆者らは酵

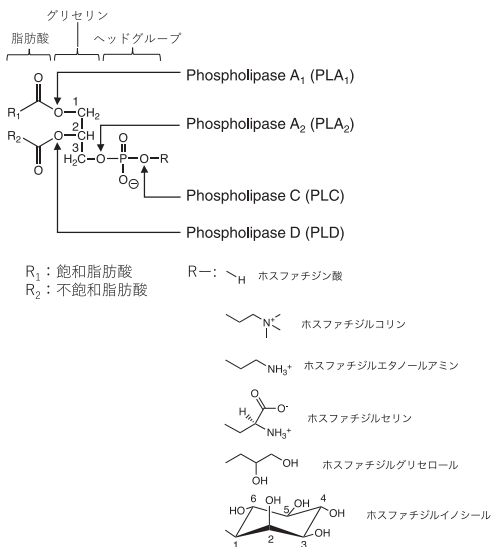


図1. リン脂質とホスホリパーゼ (PL) の加水分解作用部位。グリセリンの炭素原子の番号はsn表記番号を示す。ホスホリパーゼB (PLB) はsn-1, sn-2アシルエステル結合をどちらも加水分解する。

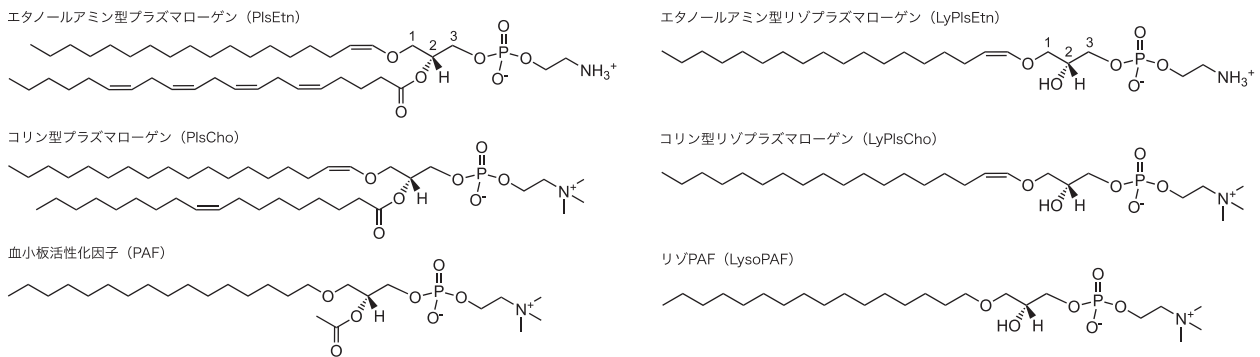


図2. エーテル型リン脂質およびそのリゾ体の構造

著者紹介 福島大学 理工学群 共生システム理工学類 物質科学コース (教授) E-mail: sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp

素を利用したPlsEtnのハイスループット分析法の開発に着手した。酵素法により比色・蛍光検出するためには酸化還元酵素や加水分解酵素を組み合わせれば良いわけだが、酵素の開発条件としては以下の3つが必須条件であった。

1. 測定対象物質のみを定量できる高い選択性をもつこと。
2. 測定感度、精度が十分高いこと。
3. できるだけ少ない酵素品目数で自動化分析に対応可能なこと。

まず、PlsEtnに選択的に作用するPLDを利用し、遊離するエタノールアミン (Etn) をアミノキシダーゼで過酸化水素を生じさせ、定法である発色基質とペルオキシダーゼにより比色・蛍光定量することがもっとも有効であろうと考えた。しかしながら、PlsEtn特異的PLDは報告例がなく、既存PLDでは基質選択性をクリアできないことが判明した。そこで、筆者らが別目的ですでに取得していたPLA<sub>1</sub> (PLA1<sub>297</sub>)<sup>3)</sup>をダメ元でPlsEtnに作用させてみることにした。その結果、思いがけず選択性良くPlsEtnのsn-2位脂肪酸エステル結合を加水分解し、リゾ型PlsEtn (LyPlsEtn) とアシル基を遊離させることができた (表1)<sup>4,5)</sup>。一方、市販PLA<sub>2</sub>と研究室で取得したPLBはほとんどPlsEtnを加水分解することができなかった。また、PLA1<sub>297</sub>は基質としてジアシル型リン脂質であるホスファチジルコリンを好んだが、エーテル型リン脂質であるコリン型プラズマローゲン (PlsCho) と血小板活性化因子 (platelet-activating factor: PAF) には作用せず、PlsEtnのみに作用することがわかった。その

表1. PLA1<sub>297</sub>の基質特異性 (文献4, 5より改変転載)

基質	相対活性 (%)
POPC (C16, C18-1)	100
POPE (C16, C18-1)	53.4
PlsEtn (C16, C18-1)	102 ± 17
PlsEtn (C18, C18-1)	19 ± 5
PlsEtn (C18, C20-4)	29.4 ± 13.0
PlsCho (C18, C20-4)	0
PAF	0
POPC (C16, C18-1), 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	
POPE (C16, C18-1), 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	
PlsPE (C16, C18-1), 1-Hexadecyl-2-(9Z-octadecenyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	
PlsEtn (C18, C18-1), 1-(1Z-Octadecenyl)-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	
PlsEtn (C18, C20-4), 1-(1Z-Octadecenyl)-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	
PlsCho (C18, C20-4), 1-(1Z-Octadecenyl)-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	
PAF, β-Acetyl-γ-O-hexadecyl-L-α-phosphatidylcholine	

理由については基質が結合する疎水性ポケットとクレフトの形状・サイズによるものであり、詳細は既報をご覧いただきたい<sup>5,6)</sup>。

次に、LyPlsEtnからEtnを遊離するPLD (LyPls-PLD)<sup>7)</sup>とEtnに対して高い活性を示すアミノキシダーゼ<sup>8,9)</sup> (Etnを酸化してH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を生成する酸化酵素)を探索した。両酵素とも運良く短期間で発見できたため、図3に示すようなPlsEtnの定量法を確立した<sup>10)</sup>。

### LyPls-PLDを利用した冠動脈性心疾患検査キット

リポタンパク質関連PLA<sub>2</sub> (Lp-PLA<sub>2</sub>) はPAFを加水分解する酵素であり、血清中のLp-PLA<sub>2</sub>量・活性測定は冠動脈性心疾患 (Coronary Heart Disease: CHD) のリスク評価に有用であるとして2000年にPackardらによって報告された<sup>11)</sup>。すでに、放射性同位元素やELISAなどを利用したさまざまなLp-PLA<sub>2</sub>測定法があり、測定キットも販売されている。ところが、血漿、血清中の

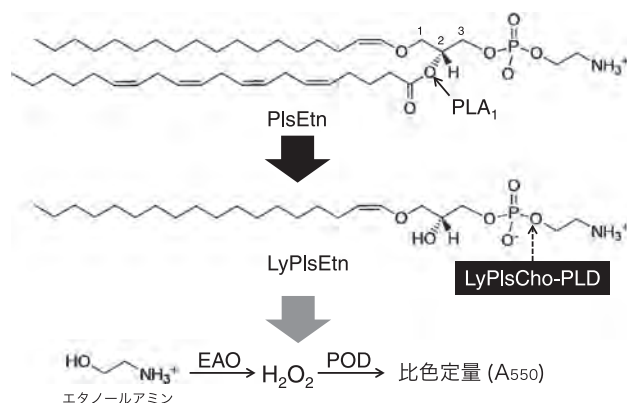


図3. PLA1<sub>297</sub>, LyPlsCho-PLDを利用したPlsEtnの定量法の反応スキーム。EAO: エタノールアミノキシダーゼ, POD: ペルオキシダーゼ。

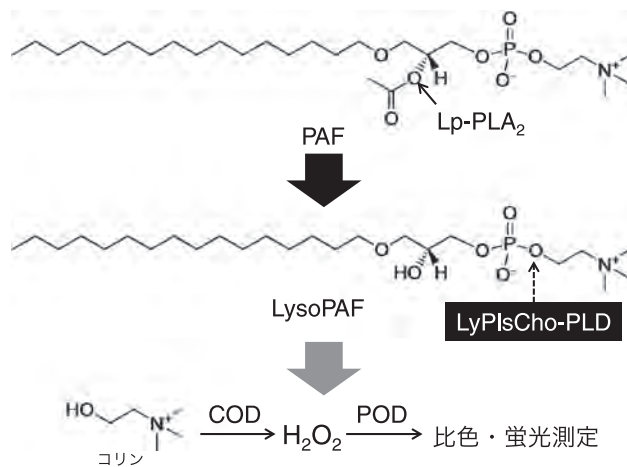


図4. PAFを基質としたLp-PLA<sub>2</sub>活性測定法の反応スキーム。COD: コリンオキシダーゼ, POD: ペルオキシダーゼ。

Lp-PLA<sub>2</sub>量とその活性には相関性が高くないことが報告されていた<sup>12)</sup>。

そこで筆者らは、新規Lp-PLA<sub>2</sub>活性測定法の開発に着手した。幸い先述したLyPls-PLDの基質特異性がコリン型リゾプラズマローゲン (LyPlsCho) >リゾ型血小板活性化因子 (LysoPAF) >>LyPlsEtnであったため、LyPls-PLDとコリンオキシダーゼを利用すれば、Lp-PLA<sub>2</sub>の作用で生じるLysoPAFを選択的に定量することは十分可能であると考えた (図4)。

### LyPls-PLDの基質特異性改変と基質認識メカニズム

LyPls-PLD親酵素 (WT) のLyPlsChoに対する活性を100%とした場合、LysoPAFに対する相対活性は53%であったため (図5A)<sup>13)</sup>、部位特異的のアミノ酸置換によりLyPlsChoに対する活性を低下させ、LysoPAFに対する活性を増強させることを目指した。加えて、本酵素と加水分解位置が同じで基質特異性がまったく異なる類縁酵素であるPLDと glycerophosphoryl diester phosphodiesterase (GDPD) との基質認識メカニズムの違いを解明することを目指し、変異体解析とX線結晶構造解析を進めることにした。X線結晶構造解析は現時点で完了していないため、LyPls-PLDの立体構造モデル予測と基質類似化合

物のドッキングシミュレーション解析を利用し、基質認識に関与すると予想されたアミノ酸に変異を導入していくことにした (図6)。詳細は割愛するが、5か所以上のアミノ酸残基に飽和変異導入を行った結果、211番フェニルアラニン (F211) を側鎖体積がより小さい疎水性アミノ酸に置換した変異体において良好な結果を示した (図5)。

なかでも、F211L変異体はもっとも良好な結果を示し、LysoPAFに対する活性がWTの3.4倍向上し、本来の基質であるLyPlsChoに対する活性を約1/13まで低下した。また、F211L変異体の両基質に対する比活性の比 (LysoPAF/LyPlsCho) は約13倍となり、LysoPAFに対する  $k_{cat}/K_m$  はWTの約6倍に達した (表2)。ここで強調しておきたいことは、F211L変異体の比活性は一切低下しておらず、LysoPAFに高い選択性を持つPLDに変貌したという点である。

以上の結果は、図6に示すようにF211が基質結合ポケットの入口に位置すると予想された点からも納得できるものである。ここで、基質であるLyPlsChoとLysoPAFの

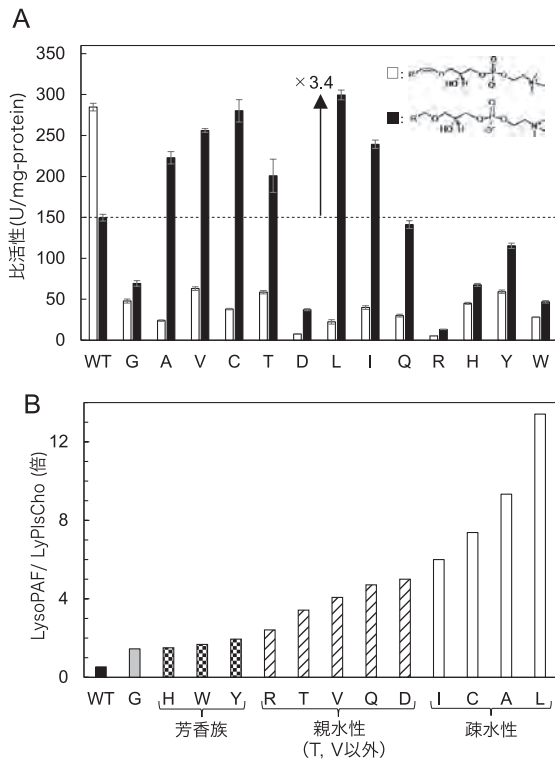


図5. LyPls-PLD (WT) と F211 変異体の基質特異性。A: LyPlsCho (□), LysoPAF (■) に対する比活性, B: 両基質に対する比活性の比 (LysoPAF/LyPlsCho)。 (文献13より改変転載)

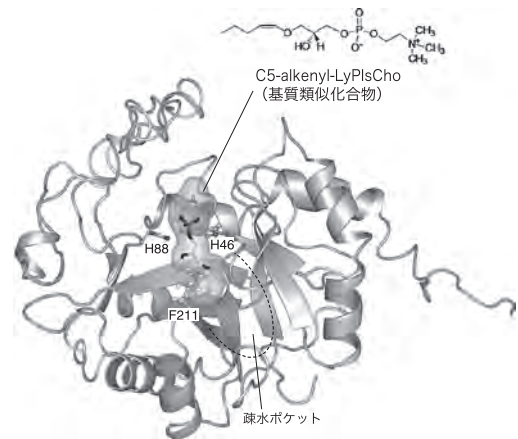


図6. LyPlsCho-PLDと基質類似化合物との酵素基質複合体予想モデル。構造予測に用いた鋳型タンパク質: *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis* (旧 *Thermoanaerobacter tengcongensis*) 由来 GDPD (PDB ID, 2pz0)。H46とH88は触媒残基と予想され、F211は基質分子の *sn*-1位アルケニルエーテル鎖が結合するポケット入口に存在すると予想された。基質類似化合物のサーフィス表示は各原子の van der Waals 半径を示している。

表2. LyPls-PLD (WT) と F211L 変異体の動力学定数 (文献13, 14より改変転載)

		$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
LyPlsCho	WT	88.9 ± 8.8	122 ± 4	1371 ± 141
	F211L	76.7 ± 12.6	21.0 ± 0.9	271 ± 46
LysoPAF	WT	56.4 ± 16.9	74.0 ± 4.9	1303 ± 400
	F211L	26.8 ± 8.6	187 ± 6	6970 ± 2239

構造の違いに注目すると、LyPlsChoのsn-1位は剛直なアルケニルエーテル結合のためアルキル鎖の回転を伴う屈曲が制限されるのに対し、LysoPAFはアルケニルエーテル結合のためそのアルキル鎖はLyPlsChoのそれよりも柔軟な回転・屈曲が許容される。結果として、LyPlsChoよりもLysoPAFは酵素の疎水ポケットに結合しやすく、その生成物はポケットから解離（ターンオーバー）しにくくと考えられる（表2）<sup>14</sup>。F211L変異体の速度論解析の結果から、F211L変異体ではPheよりもアミノ酸側鎖体積が小さいLeuに置換されたことによって触媒作用を受ける前に酵素基質複合体からLyPlsChoが解離してしまうと考えられる。一方、LysoPAFに関しては、よりいっそう酵素との親和性が上がり、生成物の解離も容易になるのではと考えている。今後、より詳細な解析を進め、これらについて明らかにしたい。

ここで、LyPls-PLDと類縁酵素（PLD, GDPD）の基質認識メカニズムの違いについて話を戻すと、まず3者の基質特異性はまったく異なっている。本酵素（LyPls-PLD）はGDPDの基質であるグリセロホスホコリン、PLDの基質であるホスファチジルコリンにはまったく作用しない。また、アミノ酸配列の分子系統樹解析からは、3者が共通祖先から進化したことは推定できるが、どのように基質特異性のバリエーションを獲得したかについては理解できない。次に、3者における立体構造を比較してみると、PLDは他2者のどちらとも立体構造が大きく異なっていると考えられる。一方、LyPls-PLD（予測モデル）とGDPDの構造を比較すると類似性を示す部分と異なっている部分があることは予想でき、基質

特異性がドラスティックに変化したLyPls-PLDのF211と同じ位置に相当するアミノ酸はGDPDにおいても約半数程度は保存されてPheとなっている。

最後に、3者の基質特異性の違いの要因を理解するには、やはり立体構造データが必要である。筆者らは3酵素のうち唯一構造解析が行われていないLyPls-PLDのX線結晶構造解析を急ぎ進めている。

## 謝 辞

構造学的考察についてアドバイスをいただいた東北大学大学院医工学研究科村山和隆准教授に感謝する。本稿で紹介した研究成果の一部はJSPS科研費（基盤研究（C）JP15K05557, JP20K05822）の助成を受けたものである。

## 文 献

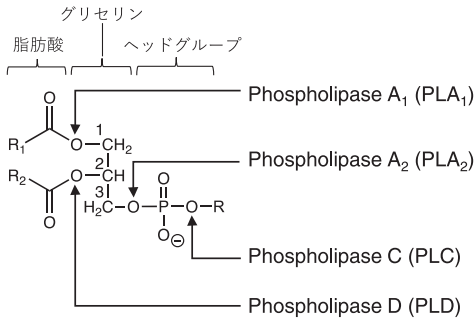
- 1) 阿野泰久：バイオサイエンスとインダストリー, **78**, 98 (2020).
- 2) Maeba, R. *et al.*: *Adv. Clin. Chem.*, **70**, 31 (2015).
- 3) Sugimori, D. *et al.*: *FEBS Open Bio*, **2**, 318 (2012).
- 4) Sakasegawa, S. I. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **38**, 109 (2016).
- 5) 杉森大助：オレオサイエンス, **13**, 15 (2013).
- 6) Murayama, K. *et al.*: *J. Struct. Biol.*, **182**, 192 (2013).
- 7) Matsumoto, Y. *et al.*: *FEBS Open Bio*, **6**, 1113 (2016).
- 8) Hirano, Y. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 3999 (2016).
- 9) 杉森大助ら：特許第6144967号 (2017).
- 10) 酒瀬川信一ら：特許第5926801号 (2016).
- 11) Packard, C. J. *et al.*: *N. Engl. J. Med.*, **343**, 1148 (2000).
- 12) 山浦沙樹ら：臨床化学, **47**, 116 (2018).
- 13) Sakasegawa, S. I. *et al.*: *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **122**, 1900227 (2020).
- 14) 杉森大助：酵素工学ニュース, **81**, 7 (2019).



## お詫びと訂正

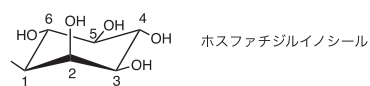
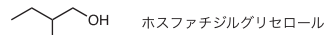
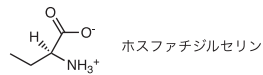
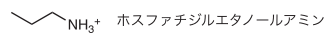
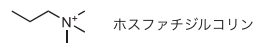
『生物工学会誌』98巻9号（2020年9月25日発行）の特集「ホスホリパーゼを利用した体外臨床診断用酵素の開発」（杉森大助 著, pp. 477–480）」の図1に誤りがありました。謹んでお詫び申し上げますとともに、下記の通り、訂正させていただきます。

### 【誤】

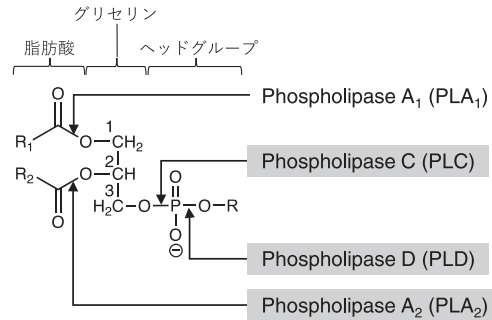


R<sub>1</sub>: 飽和脂肪酸  
R<sub>2</sub>: 不飽和脂肪酸

R:  $\text{H}$  ホスファチジン酸



### 【正】（下記、■部分等を修正しています）



R<sub>1</sub>: 飽和脂肪酸  
R<sub>2</sub>: 不飽和脂肪酸

R:  $\text{H}$  ホスファチジン酸

