

改変型ホスホリパーゼDによる難合成性リン脂質の合成

岩崎 雄吾*・Jasmina Damnjanović

ホスホリパーゼD (PLD) は、リン脂質をホスファチジン酸 (PA) と極性塩基に加水分解する酵素である。本酵素はリン脂質の極性基を他の水酸化化合物と交換する活性を併せ持ち¹⁾、この活性を利用した種々のリン脂質合成は広く利用されている²⁾。筆者らは微生物PLDの応用範囲を拡張する目的で、タンパク質工学による基質特異性改変を行ってきた。本稿では、改変型PLDを用いた、従来型酵素では困難な「難合成性リン脂質」の高純度合成について、筆者らの研究を中心に紹介する。

化学構造が規定された高純度リン脂質

リン脂質の工業的供給源は製油時に副生するレシチンである（主に大豆レシチン）。レシチンの主成分はホスファチジルコリン (PC) であるが他の複数の成分も含んでいるので、極性基ごとの「リン脂質クラス」に分別・精製が行われる。しかし極性基が揃えられた各リン脂質クラスでも、それが天然材料に由来する以上、アシル基は一義的には定まらない。たとえば、精製大豆PCは構成脂肪酸として主にリノール酸、パルミチン酸およびオレイン酸を含むので、これらの脂肪酸が結合した複数のPC分子種の混合物となる。

リン脂質を生理機能解析やリボソーム基材に用いる場合、所望のアシル基と極性基が結合し、化学構造が明確な高純度リン脂質が必要になることがある。このような高純度リン脂質は天然リン脂質を脱アシル化してグリセロホスホコリンとし、所望の脂肪酸を再導入すること（半合成）で調製される³⁾。PCの半合成は極性部コリンの保護を必要としないが、PC以外の半合成では脱アシル化前に極性基（アミノ基や水酸基）を保護し、脂肪酸再導入後に脱保護する必要があり、その分の工程が増える。したがって、化学構造が規定された各種リン脂質の調製は、ま

ず所望の脂肪酸を結合したPCを半合成し、次いでPLDを用いて極性基を変換する方法が最短ルートとなる（図1）。

ホスファチジルイノシトール (PI)

PIには脂質代謝改善などの生理機能が認められ⁴⁾、これを簡便に合成することは意義がある。PIは大豆レシチンからも得られるが、結合脂肪酸は原料由来のものに限定される。また、大豆PIからの半合成はイノシトール環の保護・脱保護が必要で煩雑である。このような理由から、PLDによるPCとイノシトールからのPIの直接合成が望まれていた。

市販品も含めて野生型PLDはPIを合成する活性を持たない。これは嵩高いイノシトール分子の立体障害のためである。そこで立体障害の緩和を意図して、PLDのタンパク質工学的改変を試みた^{5,6)}。放線菌*Streptomyces antibioticus*由来PLDとPCとの複合体の立体構造から、基質結合ポケットを構成し、立体障害に関わると思われる3残基 (W187, Y191, Y385) をランダム置換したコンビナトリアルライブラリーを作製した。このライブラリーからPI合成活性を獲得した変異酵素のスクリーニングを行った。その原理は、生成したPIのイノシトール環を過ヨウ素酸酸化してアルデヒドとし、ニトロベンゾキサジアゾール (NBD) -ヒドラジンとの反応により蛍光性NBD-ヒドラゾンとして検出するものである。当然、ポジティブコントロールとなる酵素があるはずもなく（あればこの研究を行う意味がない）、半信半疑でスクリーニングを実施した。幸運にも、担当した大学院生が「お試し」で行ったわずか数百個のコロニーから3個のポジティブクローンを取得し、彼の引きの強さに驚きながら、これはイケるがやと安堵した。その後、約3万コロニーに対してスクリーニングを行い、94種のPI合成型変異PLD（第一世代）を取得した。8000通り（ 20^3 ）の組合せから94種のものポジティブクローン（1.2%）が得られたことは意外であった。その後の検討で、W187残基を他に置換する（一残基置換）だけでPI合成活性が生じることがわかった（ただし、後述するように位置選択性は低い）。

取得した第一世代変異PLD群を用いてPI合成を行うと、多くの変異PLDはイノシトールの6つの水酸基のいずれか1か所（主に1, 3, 4, 6位）と反応した、PI位置異

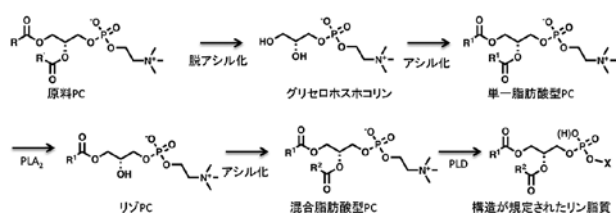


図1. 化学構造が規定されたリン脂質の半合成

* 著者紹介 名古屋大学大学院生命農学研究科応用生命科学専攻（准教授） E-mail: iwasaki@agr.nagoya-u.ac.jp

性体の混合物を与えた。筆者らの目的は1-PI (天然型PI)の高純度合成なのでこれは問題であった。しかし、詳細に分析すると、いくつかの変異PLDはイノシトールの1位または3位と反応した1-PIまたは3-PIを優先的に生成することがわかった。1-PIと3-PIは厳密には鏡像体ではないが、HPLCでの直接分離はできなかった(4-PIと6-PIも同様)。そこで、6種のPI位置異性体をフェニルエチルカルバメート誘導体とし、逆相LC-MSにて分離する分析法を確立し⁷⁾、各酵素の位置選択性を分析した。その結果、187H/191Y/385R (HYR)と187N/191Y/385R (NYR)型変異PLDは1-PIを約8割、3-PIを約2割の比率で生成し、それ以外の位置異性体はほとんど生じないことがわかった。

この結果を受け、NYR型変異PLDをさらに改変して1-PI選択性を向上させることを試みた⁸⁾。基質結合ポケットを構成する5アミノ酸残基を一つずつ他の19種に置換した変異酵素をすべて作製し、総当たりに位置特異性を分析した。その結果、186位のグリシンをトレオニンに置換したNYR-186T変異酵素は37°Cでの反応で1-PIを90%以上の異性体純度で与えた。さらに本酵素の位置選択性は温度依存性を示し、20°Cでは1-PI純度は95%以上に達した(図2)。

位置選択性が高い改変PLDを作り出すことができたが、PI収率が約10%と低いことが依然として問題であった。PLDによる反応は有機溶媒に溶解したPC(有機相)と、緩衝液に溶かした酵素・イノシトール(水相)を激しく混合して二相で行う。収率向上を反応条件の工夫で解決しようと試行錯誤していた時、卒論研究を始めたばかりの四年生が、高濃度食塩を含む水相を用いるとPI生成量が増加することを偶然見つけた。色々な無機塩類を添加して調べてみると、NaCl, NaBr, KCl, KBrの添加が濃度依存的に生成を向上させた。その後の解析により、高濃度の塩は酵素には阻害的であるが、同時に塩析効果・疎水性相互作用の増大により酵素が水相から「押し出され」、リン脂質との反応場である有機相-水相界面

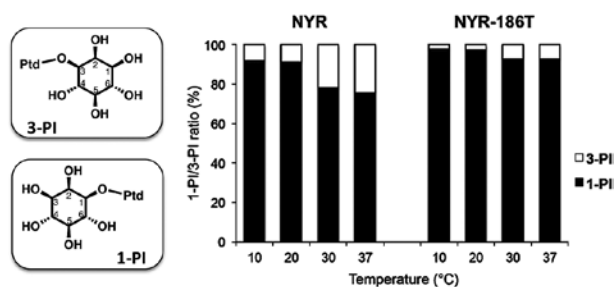


図2. PI異性体の構造(左)と改変PLDの位置選択性(右)(文献8より転載)

に局在し、収率向上をもたらしたと結論した(図3)。

こうして、①位置選択性の高い改変酵素を使用し、②低温(20°C)、③高塩濃度下(4.3 M NaCl)での反応により、無保護イノシトールとPCから生成収率約40%、単離収率約30%で純度95%以上の1-PIを合成することが可能になった⁹⁾。また、膜脂質研究に有用な蛍光標識リン脂質プローブであるNBD-PI(市販されていない)を、市販のNBD-PCから合成することもできた¹⁰⁾。

1-ホスファチジル-β-グルコース(1-PGlc)

1-PGlcは2001年に発見されたリン脂質である¹¹⁾。そのリゾ体がGPR55のリガンドとして神経回路構築を制御していることが報告され関心がもたれていた¹²⁾。1-PGlcもPLDを用いて簡便に合成できれば有用である。しかし、野生型PLDは一級水酸基に選択性をもつため、PCとグルコースにPLDを作用させるとグルコースの6位一級水酸基が特異的に反応して6-ホスファチジルグルコース(6-PGlc)を生成する。したがって、野生型PLDは1-PGlc合成には適さない。そこで、PI合成型として単離した第一世代変異PLD群の中に1-PGlc合成活性をもつものがあるかもしれないと考え、調べてみることにした¹³⁾。予想通り、数種の変異PLDは6-PGlc以外のPGlc異性体混合物を与えた。特に、187K/191W/185Y (KWY)変異体は1-PGlc生成量が他の酵素よりも多かった。

KWY型PLDによる反応生成物には目的物質である1-PGlcの他に、目的外の不要なPGlc異性体も含まれていた。目的外のPGlc異性体はグルコースの1位に由来するアルデヒド基を有するため、アニリンとの還元アミノ化反応により分離容易なアニリン誘導体に変換後、カラム精製により高純度1-PGlcを収率12.5%で単離した(図4)。得られた1-PGlcのNMR分析から、酵素合成し

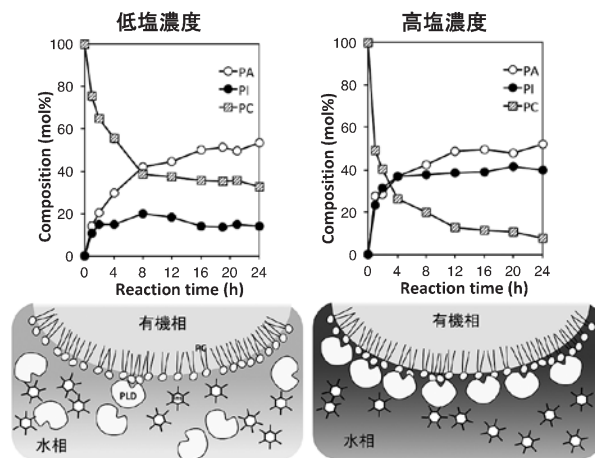


図3. 高塩濃度下でのPI合成(上)と塩による反応性向上のメカニズム(下)(文献9より転載)

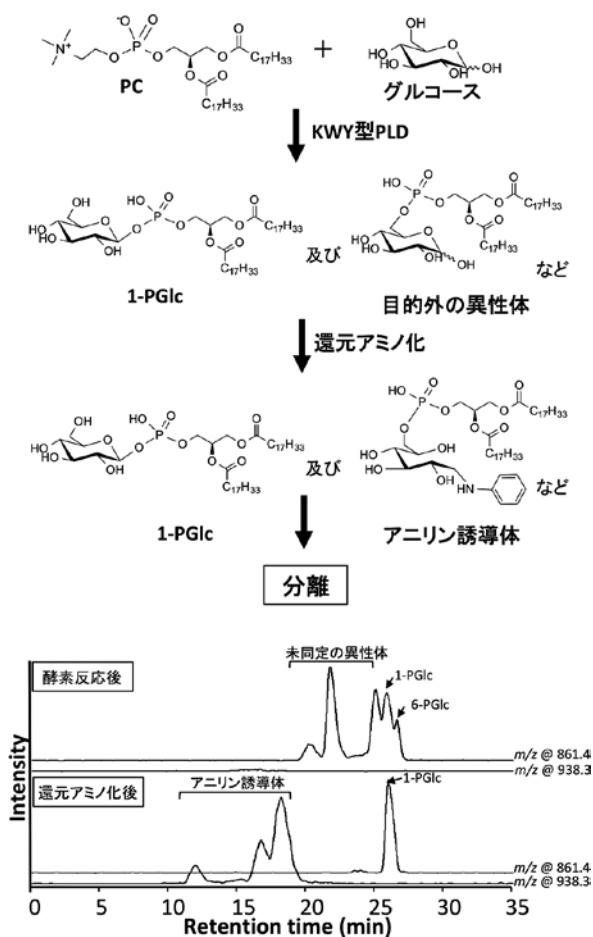


図4. 1-PGlcの酵素合成経路（上）と反応物のLC-MSクロマトグラム（下）（文献13より転載）

た1-PGlcのアノマー炭素の立体配座は完全にβ型であることが確認された。

ホスファチジルトレオニン (PT)

PTの存在は古くから知られていたが^{14,15)}、2000年以降になりPTやリゾPTにある種の生理活性が報告され^{16,17)}、その簡便な合成法が望まれる。前述のように野生型PLDはその一級水酸基選択性のため、PCとトレオニンからPTを合成することは難しい。これは容易に進行するPCとセリンからのホスファチジルセリン合成と対照的である。そこで、またしても第一世代変異PLD群からPT合成可能なものをスクリーニングしたところ、187F/191Y/385L (FYL) 変異酵素が良好なPT合成活性を示した¹⁴⁾。この酵素を用いて反応条件を検討し、有機相にトルエン、水相に高濃度食塩含有飽和トレオニン水溶液を用いる二相反応系で、PTを生成収率約30%で合成できた。しかしPTと副生物であるPAとの分離が難しく単離収率は約5%であった。

トレオニンは2つの不斉中心をもつため、4種の立体異

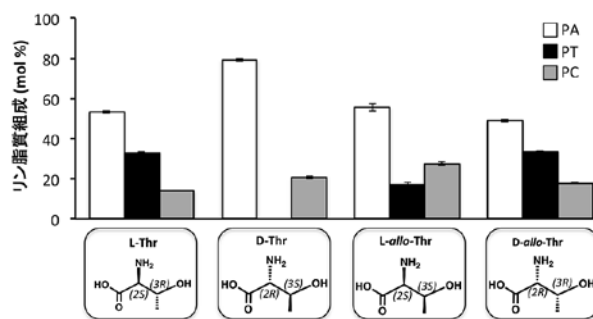


図5. 各種PTの酵素合成（文献18より転載）

性体 (L-, D-, L-allo- および D-allo- 体) が存在する。4種のトレオニン異性体がFYL型PLDの基質となるかを試したところ、D-トレオニン以外の3種は良好な基質となったが、D-トレオニンはまったく反応しなかった（図5）。ドッキングシミュレーションによる解析から、基質となる3種のトレオニン異性体は酵素反応が進行可能 (productive) な配向で基質結合ポケットに結合するが、D-トレオニンは反応点である水酸基が触媒残基に近接せず、反応が進行しない (non-productive) 配向で結合することが推定された。

アシル基認識の改変と環状ホスファチジン酸 (cPA) 合成

環状ホスファチジン酸 (cPA) は真正粘菌からDNAポリメラーゼの阻害剤として発見されたリン脂質である¹⁹⁾。その後、動物にも存在が確認され、細胞周期制御などの生理活性が認められている²⁰⁾。cPAは野生型PLDを用いてリゾPCから分子内環化で容易に合成できる。cPAの直接の原料となるリゾPCはジアシルPCをPLA₂処理して調製される。したがって、cPAの合成はPLA₂とPLDの2種の酵素による二段階反応である。この二段階反応はPLA₂とPLDの順次添加が必要である。なぜなら、2酵素を同時添加すると、両酵素ともジアシルPCに作用し、PAやリゾPAなどの副生物が生成するからである（図6）。そこで、PLDの基質2位アシル基に対する認識を変化させ、ジアシルPCには作用せず、リゾPCには作用する改変PLDの創出を試みた²¹⁾。

野生型PLDとPCとの複合体構造からPCの2位アシル基と相互作用するW166に着目した。これを他の19種に置換した変異PLDを調製し、ジアシルPCとリゾPCに対する活性を調べたところ、166Kおよび166R変異体はリゾPCには作用してcPAを生成するが、ジアシルPCには作用せず、狙い通りの性質を示した。2種の変異酵素をさらに解析したところ、PCの2位が水酸基 (リゾPC) やアセチル基などの短鎖脂肪酸の場合には活性を示すが、鎖長が長くなると活性を示さないという性質を示した。

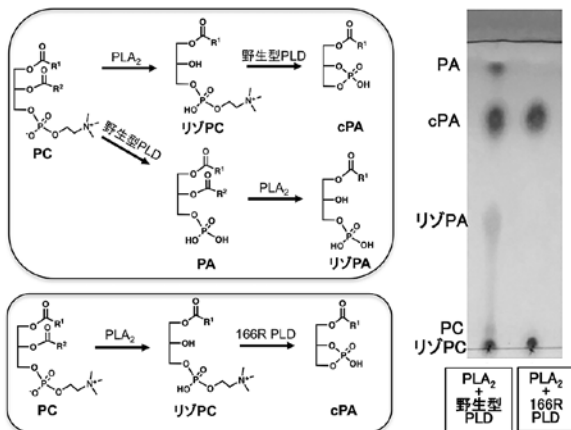


図6. PLA₂とPLDの同時添加によるcPAのワンポット合成(文献21より転載)

166R変異PLDを用いてPLA₂との同時添加によるジアシルPCからのcPAのワンポット合成を試したところ、期待通りにcPAが高収率で得られた(図6)。一方、野生型PLDとPLA₂を同条件で使用した場合には、cPA以外にPAやリゾPAなどの副生物が多く生成し、改変型PLD酵素の有用性が示された。

エーテル型リン脂質合成への応用

エーテル型リン脂質とはsn-1位にエーテル結合を持つリン脂質で、1-アルキル-2-アシル型(プラスマニルリン脂質)と1-アルケニル-2-アシル型(プラスマローゲン)に大別される。プラスマニル型リン脂質としては血小板活性化因子(PAF)として知られる1-アルキル-2-アセチル-3-グリセロホスホコリンが有名であるが、2位に長鎖アシル基をもつ各種のプラスマニル型リン脂質も存在する。また、プラスマニルリン脂質はプラマローゲン合成の直接の前駆体である。一方、プラマローゲンはアルツハイマー症との関連から、医療分野で関心を集めている²²⁾(本号特集 杉森の稿を参照)。

PLD応用の一環として、各種のプラスマニル型リン脂質の合成を試みた²³⁾。まず、グリセロホスホコリンを、環状スズアセタールを経由したsn-1位選択的アルキル化して1-アルキル-2-リゾリン脂質(リゾPAF)を合成し、続いて2位をアシル化してプラスマニルコリンを得た。これを野生型あるいは改変型PLDを用いた極性基変換反応に供し、各種プラスマニルリン脂質を合成できた(図7)。

おわりに

タンパク質工学で開発した改変PLDによるリン脂質合成について述べた。ここで紹介したリン脂質の多くは

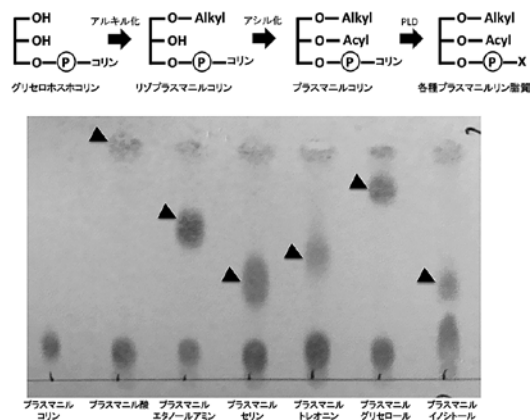


図7. 各種プラスマニルリン脂質の合成スキーム(上)と、TLCパターン(下)。矢印は目的化合物のスポット(文献23より転載)

生体に微量しか存在しないマイナーなものであるが、そのようなものこそ新規機能を示す可能性があり、研究する意義があろう。今後、リン脂質の機能解析や利用に筆者らの合成技術が貢献できることを期待したい。

文献

- 1) Yang, S. F. et al.: *J. Biol. Chem.*, **242**, 477 (1967).
- 2) Damnjanović, J. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 271 (2013).
- 3) Gupta, C. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4315 (1977).
- 4) Yanagita, T. and Nagao K.: *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, **17**, 189 (2008).
- 5) Masayama, A. et al.: *ChemBioChem.*, **9**, 974 (2008).
- 6) Masayama, A. et al.: *ChemBioChem.*, **10**, 559 (2009).
- 7) Iwasaki, Y. et al.: *J. Chromatogr. A.*, **1216**, 6077 (2009).
- 8) Damnjanović, J. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **113**, 62 (2016).
- 9) Muraki, M. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **122**, 276 (2016).
- 10) Wang, L. et al.: *J. Biol. Chem.*, **293**, 18318 (2018).
- 11) Nagatsuka, Y. et al.: *FEBS Lett.*, **497**, 141 (2001).
- 12) Guy, A. T. et al.: *Science*, **349**, 974 (2015).
- 13) Inoue, A. et al.: *ChemistrySelect.*, **1**, 4121 (2016).
- 14) Rhodes, D. N. and Lea, C. H.: *Biochem. J.*, **65**, 526 (1957).
- 15) Igarashi, H. et al.: *Nature*, **181**, 1282 (1958).
- 16) Iwashita, K. et al.: *J. Med. Chem.*, **52**, 5837 (2009).
- 17) Arroyo-Olarte, R. D. et al.: *PLoS Biol.*, **13**, e1002288 (2015).
- 18) Damnjanović, J. et al.: *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **120**, 1800089 (2018).
- 19) Murakami-Murofushi, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 21512 (1992).
- 20) Murakami-Murofushi, K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1582**, 1 (2002).
- 21) Damnjanović, J. et al.: *Protein Eng. Des. Sel.*, **32**, 1 (2019).
- 22) Su, X. Q. et al.: *Lipids Health Dis.*, **18**, 100 (2019).
- 23) Iwasaki, Y. et al.: *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, **26**, 101624 (2020).