

脂質代謝酵素ホスホリパーゼDの触媒設計と 大豆由来レシチンの機能改良

荻野千秋*

金沢大学大学院自然科学研究科

Investigation of Phospholipase D Catalytic Functions and Its Application for Improvement of Phospholipids

Chiaki OGINO

Department of Chemistry and Chemical Engineering, Kanazawa University,
Kanazawa 920-1192

ABSTRACT

Phospholipase D (PLD; EC 3.1.4.4) is an enzyme that occurs ubiquitously in various organisms including mammals, plants, yeast and bacteria. The enzyme catalyzes two types of reactions: hydrolysis of phosphatidylcholine (PC), a major substrate of PLD, to phosphatidic acid (PA) and choline (hydrolytic reaction), and transfer of polar head groups to others (transphosphatidylation reaction). By using transphosphatidylation reaction, PLD can convert to functional phospholipids from abundant phospholipid, PC. For example, PLD converts to phosphatidylserine (PS) from PC with serine molecule. Recently, PS is known to improve memory performance in patients suffering from age-associated memory impairment or Alzheimer's disease. Therefore, the transphosphatidylation activity of PLD is focused as phospholipid modification catalysis. However, PLD cannot recognize all type of substrate and it is limited some kind of substrates. Thus, the improvement of PLD substrate specificity should be necessary. In our laboratory, we have already identified the *Actionmycetes* strain, *Streptoverticillium cinnamoneum*, which showed the high PLD producing potential. Then, we have determined the gene encoding this strain's PLD, and constructed the recombinant expression system of PLD in *Escherichia coli*. In this research, PLD catalytic function was investigated by using this recombinant expression system. As a result, some mutants, that were substituted with serine amino acid at 215th and 216th, exhibited high transphosphatidylation activity compared to wild type PLD. Additionally, the small conformation change, which altered the catalytic properties, was observed by combining the structural prediction

*〒920-1192 金沢市角間町

software and these mutants library. This portion, which consisted of one flexible loop, is very closely related to the putative catalytic center, and behaves like the lid structure of catalytic center. From these observations, it seemed that the catalytic function was dominated by the loop structure conformation. Therefore, we will try to investigate relationship between the lid structure and the catalytic function in near future. *Soy Protein Research, Japan* **8**, 50-55, 2005.

Key words : Phospholipase D (PLD), transphosphatidylaton, phospholipid

Phospholipase D (PLD) は、全ての生物で存在が明らかになっているリン脂質代謝酵素である¹⁾。PLDはリン脂質に対して加水分解反応とリン酸基転移反応を触媒する (Fig. 1)。リン酸基転移反応を利用することで、天然に希少なリン脂質や、新規リン脂質の合成が可能となる。そこで放線菌 *Streptovorticillium cinnamomeum* から同定した高いリン酸基転移反応活性を有するPLDに対して、分子進化工学的手法を用いて反応特性が異なるPLDを創成し、リン脂質の高効率合成を提案する。

全ての生物種由来PLD酵素のアミノ酸配列には保存されているアミノ酸配列が4箇所存在している (Fig. 2: 領域 I ~ IV)²⁾。そしてそのうちの2箇所 (領域 I と IV) には共通したアミノ酸配列が存在している。その保存領域はヒスチジン、リジン、アスパラギン酸から構成され *HxKxxxxD* 配列 (HKDモチーフ) と呼ばれ、PLD酵素活性に必須であることが知られている³⁾。またそれぞれのHKDモチーフの下流にはグリシン・グリシン (GG) モチーフとグリシン・セリン (GS) モチーフが存在することも明らかになっている (以後 GG/Sモチーフと略) (Fig. 2)。

本研究室では現在までに、GG/Sモチーフにアミノ酸置換を行い、セリン残基を導入することで、リン酸基転移反応活性が野生型よりも向上した変異体を取得している^{4,5)}。そして、それら変異体の立体構造をいくつかの手法にて高次構造に関して予測を行った。CDスペ

クトル測定からはたん白質の二次構造を予測し比較を行った。同時に熱変性をかけ熱力学的パラメータである変性温度 (Tm) を算出し比較を行った。またコンピューターシミュレーションにより立体構造予測を行い比較を行った。その結果活性部位付近に存在する蓋様構造 (以下Lidと呼ぶ) が大きく変化していることが確認された。立体構造予測からこのLid部分は酵素の活性中心を覆うように位置していると推測される。本研究では、このLid領域内のヒドロキシル基を持つ3アミノ酸 (S413, Y416, S417 (Fig. 3)) 残基に注目し、この部分にランダムにアミノ酸置換を行い、触媒機能変換や活性向上といった有用なPLD酵素の作製を試みた。

方 法

CDスペクトルと熱変性曲線の測定

今回は野生型とこれまでに得られた活性が向上した変異体 (G215S, G216S, G216S-S489G) についてCDスペクトル測定にて二次構造を推定する。またサンプルの温度を変化させ変性温度 (Tm) を算出し、熱安定性に関して考察を行う。

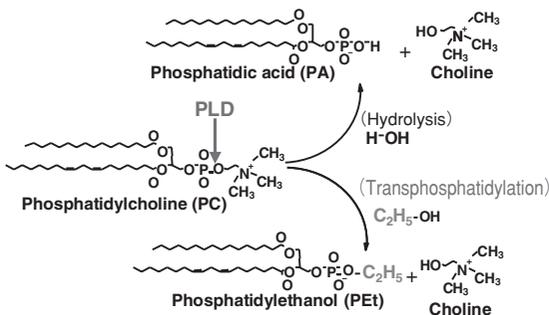


Fig. 1. Reaction scheme of PLD.

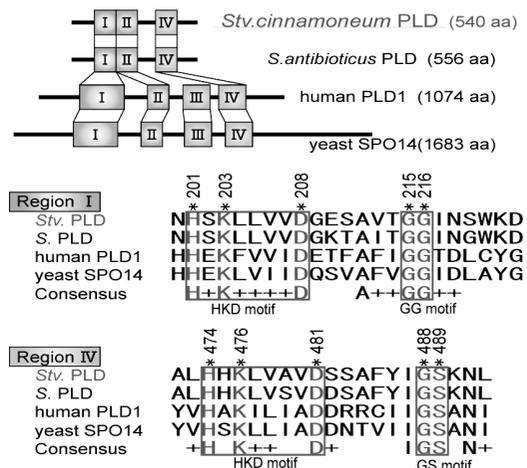


Fig. 2. Multiple alignment of various PLD sequence.

変異導入PLDプラスミドの取得

置換したいアミノ酸に相当するDNA配列の部分ランダムに合成し、その両側14塩基ずつを通常の配列にした一対のprimerを合成する。1st PCRより変異が導入された2つのPCR fragmentが作製される。その2つを混合してポリメラーゼ伸長反応を行い、2つのfragmentを結合させ、変異が導入された全長PLDを作製する。増幅PLD遺伝子には両端に制限酵素*EcoR* Iおよび*Hind*III認識部位を設計してあるため、制限酵素を用いて全長をpMAL-p2xベクターにクローニングできる (pMAL-PLD) (Fig. 4)。この変異導入プラスミドを用いて各変異体酵素を発現させる。

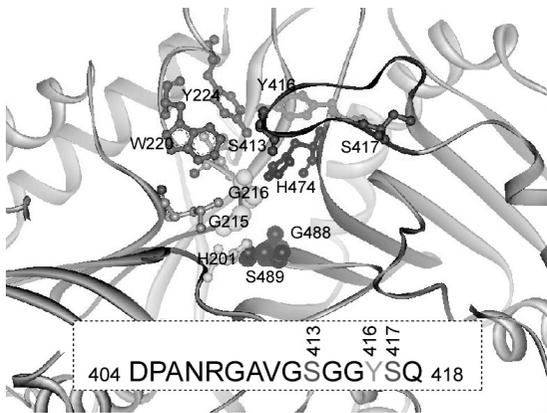


Fig. 3. 3D structure at around active site and lid region.

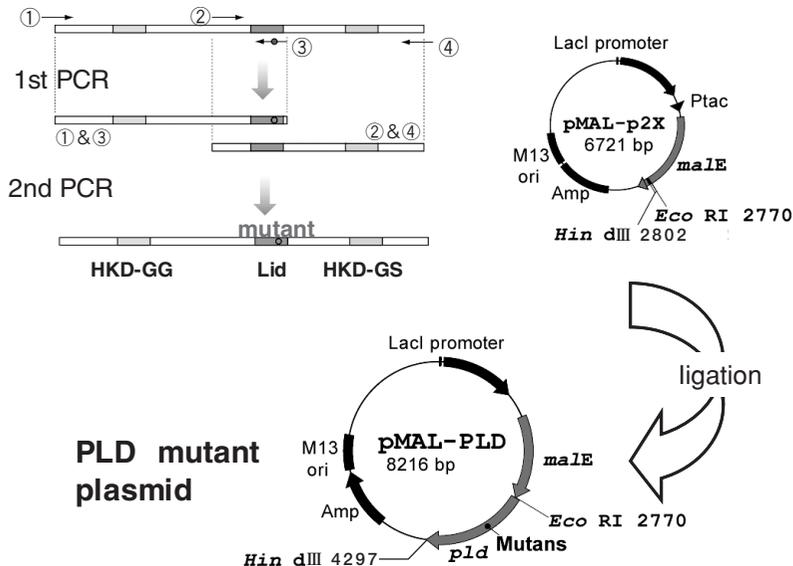


Fig. 4. Construction scheme of mutant pMAL-PLD plasmid.

変異体PLD酵素の取得および精製

作成した変異導入プラスミド (pMAL-PLD) を大腸菌TB-1株に形質転換し、定法にて組み換えPLD酵素を発現・精製回収する。本研究ではPLDはマルトースバインディングプロテイン (MBP) との融合たん白質として発現される。したがって特異的に結合するアミロースレジンをを用いることで容易に精製が可能である。平衡化したアミロースレジンをを用意し、超音波処理したPLD酵素液 (MBP-PLD) にアミロースレジン (1 mL程度) を加える。4℃で1 hr以上攪拌し、MBPとアミロースレジンを吸着させた後、洗浄し、溶出緩衝液を1 mL加えて攪拌し、MBP-PLDを溶出させる。上澄み (MBP-PLD含有) を回収し、PLD酵素の発現をSDS-PAGEにて確認する。

酵素活性の測定

二相反応実験により検討する。有機相としてジエチルエーテルに溶解した5 mM phosphatidyl- cholineを3 mL、水相として200 mM phosphate buffer (pH 5.8) を0.375 mL、0.533 M serineを1.125 mL、MBP-PLDを100 μ L加えて37℃で8 h攪拌する。その後生成されたphosphatidylserine (PS) 量を測定する。反応後有機相を回収し、TLC (薄層クロマトグラフィー) によってPSの生成を確認する。なお、リン酸基転移活性があることを確認された変異体は酵素活性をコリンエステラーゼ測定キットにて間接的に測定する。

触媒機能変換の測定

二相系反応実験により検討する。上記の水相の反応基質を0.925 M myo-Inositol に変えて実験を行う。反応後は有機相を回収しTLC（薄層クロマトグラフィー）によってPIの生成を確認する。展開液はクロロホルム：メタノール：酢酸：水=65：50：2：5を用いる。

立体構造予測

たん白質の立体構造を予測するソフトとしてMODELLER Ver 7.7 (Oxford University) を用いる。MODELLERは既存の相関しているたん白質のアミノ酸配列が存在する場合、自動的に立体構造を計算してくれる。放線菌*Streptomyces sp.* PMF株由来のPLD酵素の立体構造はすでに取得されている⁶⁾。そこで、PMF株のアミノ酸配列と本研究で用いているPLD酵素のアミノ酸配列の相同性を解析し、その相同性情報に基づき変異体PLDの立体構造を予測した。

結果と考察

CDスペクトルと熱変性曲線の測定

CDスペクトル測定と熱変性測定より、野生型と高活性変異体 (G215S, G216S, G216S-S489G) の構造解析を行った。CDスペクトル測定からはたん白質の二次構造を予測し比較を行った (Fig. 5)。ピークは α ヘリックス由来：209 nmと222 nm, β ストランド由来：218 nmで現れる。その結果、変異体と野生型の二次構造において、スペクトルの波形やピークの位置に大きな変化は無く、ほとんど差は見られなかった。また、熱をかけて変性させた場合での吸光度測定を行い、熱力学的パラメータである変性温度 (T_m) を算出し酵素の性質の変化を調べた (Table 1)。その結果、

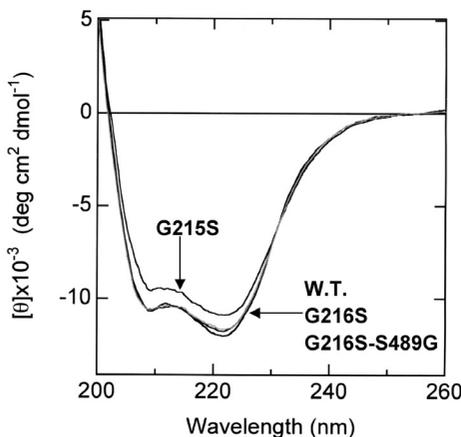


Fig. 5. CD spectra analysis.

いずれの変異体も野生型と比べて変性温度 (T_m) が1~2℃上昇していることが確認された。

本実験から、スペクトルには野生型と取得している高活性変異体 (G215S, G216S, G216S-S489G) に差は見られなかった。これより、高活性変異体にはPLD酵素の α ヘリックスや β ストランドが変化するという大きな変化が起こったのではなく、たん白質の活性中心の触媒に関与する一部分のアミノ酸の局所的な構造が変化したためであると考えられる。また、熱変性曲線から算出された変性温度 (T_m) より、高活性変異体はいずれも野生型よりわずかに高い温度を示した。変性温度 (T_m) が上昇したということはたん白質の安定性が向上したということである。高活性変異体 (G215S, G216S, G216S-S489G) の中で一番高い活性を持ったG215Sが一番高い変性温度 (T_m) を示したことから、高活性変異体は野生型と比べて酵素の安定性が向上したために酵素活性が向上したと考えられる。

変異導入PLDプラスミドの取得

変異導入PLDの挿入の確認は、pMAL-PLDプラスミドを増幅後、制限酵素EcoR I とHindIIIで処理しアガロース電気泳動で目的の場所にバンドが現れることを確認することで行った。アガロース電気泳動は、アガロースゲルにサンプルを流すと分子量が大きい長い分子ほど泳動移動度が遅くなることを利用しDNA鎖を長さで分離する方法である。これによって挿入が確認された変異導入型pMAL-PLDプラスミドはシーケンス確認を行い、アミノ酸置換を確認した。

PLD酵素の取得

PLD酵素の発現の確認はSDS-PAGEを用いた。PLD酵素はMBPたん白質と複合たん白質として発現するためその分子量は99 kDとなる。マーカー、野生型、変異体を共に流しPLD酵素の発現を確認した (Fig. 6)。

酵素活性の測定

シーケンスにより変異が認められた4種類の変異体PLDを用い、PS合成にてリン酸基転移反応活性を比較した。TLCの結果、そのうちの3つの変異体 (S413N, S417T, S417A) はリン酸基転移反応活性をもち、残りの1つ (S417H) はリン酸基転移反応が失活してい

Table 1. T_m value of W.T. and three mutants

	T_m (°C)
W.T.	60.8
G215S	63.0
G216S	62.0
G216S-S489G	61.9

ることが確認された。またコリンエステラーゼ測定より、野生型とリン酸基転移反応活性を有している3種類の変異体 (S413N, S417T, S417A)、高活性を有するG215Sの5種類について、酵素の活性値である国際単位 (U/l) を測定した (Table 2)。その結果、Lid領域に変異を導入した3種類はいずれも野生型よりも低い酵素活性を示した。

触媒機能変換の測定

二相系反応実験にてPIの生成を試みたが現時点ではどの変異体もPIを作成することはできなかった。

立体構造予測結果

取得した4種類の変異体についてMODELLER ver.7.7にて立体構造予測を行った (Fig. 7)。その結果、低いながらも活性を有した変異体 (S413N, S417T, S417A)、失活した変異体 (S417H) 共に、野生型と比べてLid領域が肥大していた。高活性変異体G215SはLid領域がわずかに縮小していることが確認された。

また失活した変異体 (S417H) と低活性変異体 (S413N, S417T, S417A) ではLid領域の肥大の大きさに大きな差は見られなかったが、酵素の全体図を比較すると失活した変異体は他の酵素に比べて左右に広がった立体構造をとることが示された。

そこで、GG/Sモチーフにセリン残基を導入し活性が向上した変異体G215S、本研究で作製した失活した変異体S418H、活性が低下した変異体S413N, S417T, S417Aと、さらに野生型 (W.T.) の立体構造をMODELLERにて解析し比較した。その結果、低いながらも活性を有した変異体 (S413N, S417T, S417A)、失活した変異体 (S417H) 共にLid領域が肥大していた。高活性変異体G215SはLid領域が野生型に比べて縮小していることが確認されている。これよりLid領域の肥大はわずかであっても酵素活性に悪影響を及ぼすといえる。これはLid領域が活性中心部位への基質の取り込みを阻害してしまうからだと考えられる。

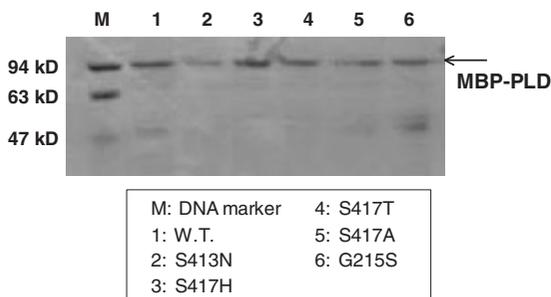


Fig. 6. SDS-PAGE analysis.

Table 2. Comparison of PLD activity

	Enzyme activity (U/l)	Protein concentration (mg)	Specific activity (U/l/mg-PLD)	Relative activity (%)
W.T.	49.65	9.78	5.08	100.00
S413N	18.33	9.46	1.94	38.19
S413T	19.06	7.84	2.64	51.97
S413A	45.81	9.37	4.89	96.26
Y416F	0.69	8.15	0.08	1.57
S417T	2.66	8.20	0.32	6.30
S417A	19.16	8.79	2.18	42.91
G215S	35.66	4.06	8.77	172.64

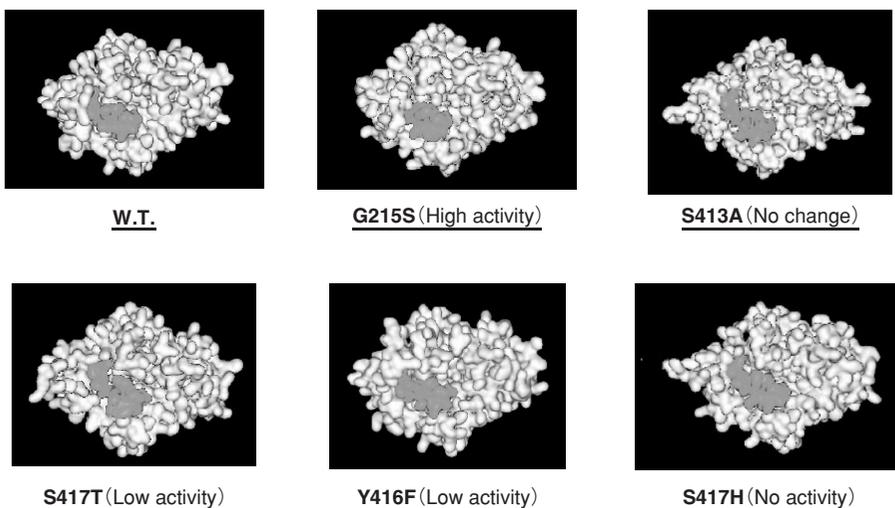


Fig. 7. Structure prediction of various PLD mutants.

また失活した変異体 (S417H) について, 原因として二つの可能性が示唆される. 一つ目はセリン残基と置換したヒスチジンの構造上の問題である. ヒスチジンはアミノ酸の中で唯一イミダゾール基を有する. イミダゾール基は $pK_a=6.8$ であり細胞質のpHと同じ値であるためわずかなpHの変化でヒスチジン側鎖の電荷が変わりやすい. これよりヒスチジンの置換でPLD酵素の立体構造を保つことが難しくなり, 失活したと考えられる. 立体構造予測でも失活した変異体 (S417H) は野生型, 低活性変異体 (S413N, S417T, S417A) と比べてLid領域の大きさに差は見られなかったが, 酵素の全体図を比較すると他の酵素に比べて左右に広がった立体構造をとっていることが示されている. 二

つ目はPLDの触媒機能メカニズム上の問題である. PLDの触媒機能は474番目のヒスチジンが201番目のヒスチジンに求核反応を行うことで起こると考えられている. このときリン脂質のリン酸基の存在下ではリン酸基が474番目のヒスチジンと共有結合をすることが明らかとなっており, リン酸基転移反応はリン脂質のリン酸基と474番目のヒスチジンの共有結合がはずれるときに起こると考えられている. しかし417番目にヒスチジンが置換されたことで, ごく近い範囲に求核電子を持つヒスチジンが2箇所存在することになった. そのため, 置換された417番目のヒスチジンがPLDの触媒機構を阻害して, 触媒機能が働かなくなったのではないかと考えられる.

要 約

我々は現在までにGG-GSモチーフに関して, 部位特異的アミノ酸置換を行い, セリン残基を導入することで, リン酸基転移反応活性が野生型よりも向上した変異体を得ている. そして, それら変異体の立体構造を立体構造予測する事で活性部位近辺に存在する蓋様構造が変化していることも確認している. そこで, 本研究ではこの蓋様構造内に存在する3つのヒドロキシル基を有するアミノ酸に着目し, その変異体を作成し, その触媒機構に与える影響を検討した. その結果, 蓋様構造内に変異を有する3つの変異体 (S413N, S417T, S417A) はリン酸基転移反応活性をもち, 残りの1つ (S417H) はリン酸基転移反応が失活していることが薄相クロマトグラフィー解析より確認された. またコリンエステラーゼ測定より, 野生型とリン酸基転移反応活性を有している3種類の変異体 (S413N, S417T, S417A), 高活性を有するG215Sの5種類について比較した. その結果, Lid領域に変異を導入した3種類はいずれも野生型よりも低い酵素活性を示した.

文 献

- 1) Servi S (1999): Phospholipases as synthetic catalysts. *Topics in Current Chemistry*, **200**, 127-158.
- 2) Morris AJ, Engebrecht J and Frohman MA (1996): Structure and regulation of phospholipase D. *Trends Pharmacol Sci*, **17**, 182-185.
- 3) Sung TC, Roper RL, Zhang Y, Rudge SA, Temel R, Hammond SM, Morris AJ, Moss B, Engebrecht J and Frohman MA (1997): Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *EMBO J*, **16**, 4519-4530.
- 4) Ogino C, Negi Y, Matsumiya T, Nakaoka K, Kondo A, Kuroda S, Tokuyama S, Kikkawa U, Yamane T and Fukuda H (1999): Purification, characterization, and sequence determination of phospholipase D secreted by *Streptovorticillium cinnamomeum*. *J Biochem*, **125**, 263-269.
- 5) Ogino C, Kanemasu M, Hayashi Y, Kondo A, Shimizu N, Tokuyama S, Tahara Y, Kuroda S, Tanizawa K and Fukuda H (2004): Over-expression system for secretory phospholipase D from actinomycete by *Streptomyces lividans*. *Appl Microbiol Biotech*, **64**, 823-828.
- 6) Leiros I, Secundo F, Zambonelli C, Servi S and Hough E (2000): The first crystal structure of a phospholipase D. *Structure, Fold Des*, **8**, 655-667.