

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：11601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05557

研究課題名(和文) エーテル型リン脂質特異的ホスホリパーゼDの基質認識メカニズムと反応機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of substrate recognition of choline lysoplasmalogen-specific phospholipase D

研究代表者

杉森 大助 (Sugimori, Daisuke)

福島大学・共生システム理工学類・教授

研究者番号：40272695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：研究対象酵素のモデル構造と基質類似化合物のドッキングシミュレーション解析から基質認識に関与すると考えられるアミノ酸に飽和変異を導入し、基質特異性が変化した変異型酵素について速度論解析を行った。その結果、W282は反応生成物の遊離過程への関与が大きいこと、F211は基質分子中のsn-1位アルケニル/アルキルエーテル鎖の認識に関与し、基質結合段階より反応生成物遊離過程への関与が大きいことを示唆する結果を得た。さらに興味深いことにF211L変異体は本来の基質であるコリン型リゾプラズマローゲンに対する活性が大幅に低下し、Lyso-PAFに対する活性が著しく増加、その活性は約1.5倍以上増強された。

研究成果の概要(英文)：Choline lysoplasmalogen-specific phospholipase D (LyPlsCho-PLD) is an enzyme that catalyzes the hydrolytic cleavage of the phosphoester bond of LyPls, releasing choline and lysoplasmenic acid. LyPlsCho-PLD exhibited weak activity toward LysoPAF. Our goal is to elucidate the substrate recognition mechanism of LyPlsCho-PLD. Based on the homology-modeled structure of LyPls-PLD and the docking model with substrate analog, amino acid residues predicted to interact with the head group and sn-1-alkenyl ether chain were substituted by site-directed mutagenesis. The principal conclusions of the study by mutation analysis and kinetics were as follows: 1) M71, N173 and F211 of LyPlsCho-PLD may be involved in the recognition of sn-1 alkenyl ether chain of LyPlsCho. F211 and W282 may take part in substrate binding and reaction products release (=k+2). 2) F211A, I, L, and C variants remarkably altered in the substrate preference (LysoPAF >> LyPlsCho) while maintaining the high activity.

研究分野：酵素工学

キーワード：Phospholipase D ホスホリパーゼD (PLD) Lysoplasmalogen-PLD Choline lysoplasmalogen Lyso-PAF (リゾ型血小板因子) 基質認識メカニズム 基質特異性改変 構造活性(機能)相関

1. 研究開始当初の背景

生体膜の主成分であるリン脂質中のエステル結合を加水分解する酵素ホスホリパーゼには、A₁、A₂、B、C、D型の5タイプが知られている。これら酵素は生体膜リン脂質の代謝だけでなく、シグナル伝達や重大な疾患など様々な生理作用と深い関係があり、古くから医・薬学研究が進められてきた酵素である。生物が主に利用しているリン脂質はグリセリンの *sn*-1, 2 位にアシル基がエステル結合したエステル型である。一方、エステル結合の代わりに *sn*-1 位にアルケニル(ビニル)エーテル結合を持つ特殊なリン脂質「プラズマローゲン」(以下 PLS) が脳神経細胞や一部の細菌等において細胞膜に高含量存在することが知られている。最近になって、血中 PLS 濃度が重大疾患(アルツハイマー型認知症やガン、動脈硬化症)の発症と強い相関があることが報告され、その生理作用や生体内での役割が活発に研究され始めている。しかし、PLS の代謝経路と代謝酵素に関しては研究が遅れており、PLS 代謝酵素に至ってはほとんど未解明である。

申請者は、PLs 代謝酵素の一つと考えられるコリン型リゾプラズマローゲン (LyPLsCho) 特異的ホスホリパーゼ D (LyPLsCho-PLD) を好熱性放線菌の分泌性酵素として発見した。本酵素のような基質特異性を示す酵素は、申請者が知る限り世界で初めての発見であり、その触媒特性に興味を持たれた。

2. 研究の目的

本研究では、一般的な PLD とは全く異なる基質特異性を示す新規酵素 LyPLsCho-PLD の触媒作用と基質認識機構を明らかにすることを目標とした。そこで、部位特異的アミノ酸置換により LyPLsCho-PLD の基質特異性を改変し、その改変型酵素について速度論的解析を行い、基質認識メカニズム解明を進めることとした。

3. 研究の方法

LyPLsCho-PLD の立体構造が未解明であったため、既に X 線結晶構造が明らかにされている類縁酵素であるグリセロホスホコリンホスホジエステラーゼ (GDPD) の立体構造情報を基に本酵素のモデル構造を予測した。ドッキングシミュレーション解析によりモデル構造と基質類似化合物の結合状態予測から基質特異性に与える可能性が考えられたアミノ酸残基を推定し、アミノ酸置換を施した。得られた変異体のうち基質特異性が変化したものについてアフィニティークロマトグラフィー精製し、精製酵素を用いて速度論的解析を行うことで基質認識メカニズムを考察した。

具体的には、図1に示すようにドッキングシミュレーション解析の結果から、酵素の活性中心付近に位置し、基質の *sn*-1 位アルケニルエーテル鎖と相互作用すると考えられ

た Asn173 と基質のヘッドグループ認識に与ると考えられた Phe211、Tyr258、Trp282 に着目し、部位特異的にアミノ酸置換を行った。各変異体は発現ベクター pET24a と宿主大腸菌 BL21(DE3) を用いて菌体内に発現させ、基質特異性が顕著に変化した変異体に関しては HisTrap カラムで各変異体酵素を単一バンドまで精製し、速度論試験を行った。

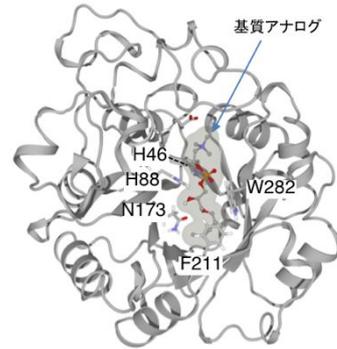


図1. ドッキングシミュレーション解析による LyPLsCho-PLD のモデル構造と基質類似化合物の結合予想

4. 研究成果

基質特異性試験の結果、図2に示すように W282A、R はいずれも Wild type (WT) の基質特異性とは大きく異なり、本来の基質である LyPLsCho に対する活性を完全に消失したが、アルキルエーテルリン脂質であるリゾ型血小板因子 (Lyso-PAF、図3) に対する活性はわずかに残存していた。一方、W282M、G 変異体の基質特異性は WT と同様の傾向を示したが、LyPLsCho と Lyso-PAF に対する活性が著しく低下した。

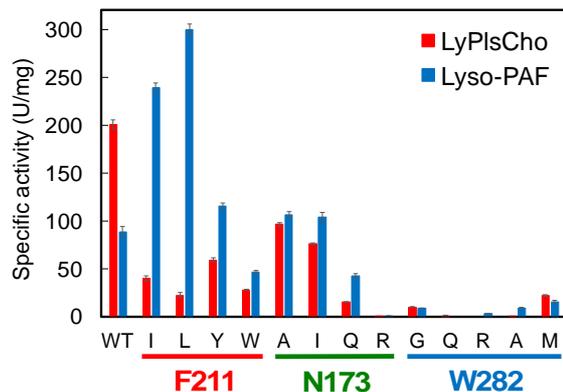


図2. 変異体の基質特異性

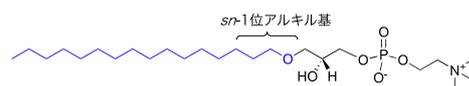


図3. リゾ型血小板因子 (Lyso-PAF) 構造

以上をまとめると、W282 変異体はいずれも顕著に活性が低下したことから、基質結合に

において W282 が重要な役割を果たすと結論づけた。この結果は、GDPD ファミリーあるいは PLD ファミリー内で高度に保存されている Trp が基質結合において重要なアミノ酸であるという報告例と良く一致する結果であった。

次に、N173A、I、Q 変異体に関しては、いずれも基質特異性が逆転する (Lyso-PAF>LyPIsCho) という結果が得られた。さらに、F211 変異体については WT が本来基質とする LyPIsCho に対する活性が大幅に低下し、アミノ酸側鎖の小さい Ile や Leu に置換すると Lyso-PAF に対する活性が著しく増加し、基質特異性が大きく逆転する (Lyso-PAF>>LyPIsCho) という興味深い結果が得られた。さらに、側鎖が嵩高い Tyr や Trp に置換すると Lyso-PAF に対する活性が低下することがわかった。速度論解析の結果、基質特異性を決定づける要因は K_m (基質 *sn*-1 位エーテル鎖の認識) よりむしろ k_{cat} (反応生成物の解離過程) の関与が大きいと結論づけた。

以上の結果を整理すると、N173 と F211 は *sn*-1 位アルケニルエーテル鎖の認識に強く関与することがわかった。特筆すべきは、変異体 F211I、L に関しては基質特異性が大きく逆転する (Lyso-PAF>>LyPIsCho) とともに、比活性も約 1.5 倍上昇させることに成功した。これにより、F211I、L 変異体を利用した血中 Lyso-PAF 濃度定量が可能となり、冠動脈疾患早期診断キットへの応用が期待できる。本研究では、構造機能相関に基づいた点変異 (rational design) により、基質特異性を大きく改変し、さらに比活性を増強させた点で注目に値すると言える。

最後に、本研究成果をまとめると、N173 と F211 は *sn*-1 位アルケニルエーテル鎖の認識、W282 は基質結合に関与していることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(下線: 研究代表者、点線: 連携研究者)
〔雑誌論文〕(計 7 件)

Saki Yamaura, Shin-ichi Sakasegawa, Emisa Koguma, Shigeru Ueda, Yuzo Kayamori, Daisuke Sugimori, Ken Karasawa, Novel enzymatic method for assaying Lp-PLA₂ in serum, *Clinica Chimica Acta*, 481, 184-188 (2018).
(査読有)

DOI:10.1016/j.cca.2018.03.012

Shuhei Hashiro, Koyu Fujiuchi, Daisuke Sugimori, and Hisashi Yasueda, A novel galactolipase from a green microalga *Chlorella kessleri*: purification, characterization, molecular cloning and heterologous expression, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102(4), 1711-1723

(2018). (査読有)

DOI:10.1007/s00253-017-8713-7

Yusaku Matsumoto, Nana Kashiwabara, Takayuki Oyama, Kazutaka Murayama, Hideyuki Matsumoto, Shin-ichi Sakasegawa, and Daisuke Sugimori, Molecular cloning, heterologous expression, and enzymatic characterization of lysoplasmalogen-specific phospholipase D from *Thermocrispum* sp., *FEBS Open Bio*, 6 (11), 1113-1130 (2016). (査読有)

DOI:10.1002/2211-5463.1213

Yoshitaka Hirano, Keisuke Chonan, Kazutaka Murayama, Shin-ichi Sakasegawa, Hideyuki Matsumoto, and Daisuke Sugimori, *Syncephalastrum racemosum* amine oxidase with high catalytic efficiency toward ethanolamine and its application in ethanolamine determination, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100 (9), 3999-4013 (2016). (査読有)

DOI:10.1007/s00253-015-7198-5

Shin-ichi Sakasegawa, Ryouta Maeba, Kazutaka Murayama, Hideyuki Matsumoto, and Daisuke Sugimori, Hydrolysis of plasmalogen by phospholipase A₁ from *Streptomyces albidoflavus* for early detection of dementia and arteriosclerosis, *Biotechnol. Lett.*, 38 (1), 109-116 (2016). (査読有)

DOI:10.1007/s10529-015-1955-5

Yusaku Matsumoto and Daisuke Sugimori, Substrate recognition mechanism of *Streptomyces* phospholipase D and enzymatic measurement of plasmalogen, *J. Biosci. Bioeng.*, 120 (4), 372-379 (2015). (査読有)

DOI:10.1016/j.jbiosc.2015.02.020

Shingo Mineta, Kazutaka Murayama, and Daisuke Sugimori, Characterization of glycerophosphoethanolamine ethanolaminephosphodiesterase from *Streptomyces sanglieri*, *J. Biosci. Bioeng.*, 119 (2), 123-130 (2015). (査読有)

DOI:10.1016/j.jbiosc.2014.07.005

〔学会発表〕(計 2 4 件)

小山 貴之 (杉森大助) コリン型リゾブラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D の基質特異性改変と基質認識機構の考察、日本農芸化学会 2018 年大会 (2018)

林 優花 (杉森大助) *Streptomyces* sp. NT1 株由来 L-グルタミン酸オキシダーゼの人工タンパク質設計による耐熱性の向上、日本農芸化学会 2018 年大会 (2018)

市川宏樹、セルラーゼ固定化スギ炭素化合物によるセルロース糖化、第 68 回日本木材学会大会 (京都大会) (2018)

D. Sugimori, Single amino acid substitution of choline lysoplasmalogen-specific phospholipase D resulted in LysoPAF-specific enzyme, *The 15th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering* (2018)

小山貴之 (杉森大助) 基質認識メカニズム解明を目指したリゾプラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D の部位特異的変異導入解析、日本農芸化学会 2017 年大会 (2017)

林 優花 (杉森大助) 進化工学的手法を用いた放線菌由来 L-グルタミン酸オキシダーゼの熱安定性の向上、2017 年酵素・補酵素研究会 (2017)

小山貴之 (杉森大助) コリン型リゾプラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D の基質認識メカニズム解明を目指した部位特異的変異解析、2017 年酵素・補酵素研究会 (2017)

林 優花 (杉森大助) 進化工学的手法を用いた放線菌由来 L-グルタミン酸オキシダーゼの熱安定性の向上、日本生物工学会 2017 年大会 (2017)

市川宏樹、セルラーゼ固定化スギ炭素化合物によるセルロースの糖化、第 44 回炭素材料学会年会 (2017)

小山貴之 (杉森大助) コリン型リゾプラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D の基質特異性改変、日本生物工学会 2017 年北日本支部福島シンポジウム (2017)

林 優花 (杉森大助) *Streptomyces* sp. NT1 株由来 L-グルタミン酸オキシダーゼの人工タンパク質設計による耐熱性の向上、日本生物工学会 2017 年北日本支部福島シンポジウム (2017)

藤内恒有 (杉森大助)、緑藻 *Parachlorella kessleri* 由来ガラクトリパーゼの異種組換え発現および触媒作用メカニズムの推定、2015 年度第 6 回学際的脂質創生研究部会講演会 (2016)

杉森大助、新規アミノオキシダーゼとホスホリパーゼ D を用いたエタノールアミン型リン脂質の定量、2015 年度第 6 回学際的脂質創生研究部会講演会 (2016)

杉森大助、リゾプラズマローゲン特異的

ホスホリパーゼ D の機能解析、日本農芸化学会 2016 年大会 (2016)

林 優花 (杉森大助) 高比活性 L-グルタミン酸オキシダーゼの異種発現と酵素学的性質、日本生物工学会 2016 年大会 (2016)

田所花菜 (杉森大助) *Exiguobacterium acetylicum* 由来ポリ乳酸分解活性を有するプロテアーゼの精製と諸特性解析、日本生物工学会 2016 年大会 (2016)

村山和隆、インターセクチン 2 のコンフォメーション解析、第 54 回日本生物物理学会年会 (2016)

D. Sugimori, Characterization and heterologous expression of a novel galactolipase from *Chlorella kessleri*, *2016 AOCs annual meeting* (25th Annual Biocatalysis Symposium) (2016)

羽城周平、*Chlorella vulgaris* の熱ストレスにより誘導される糖グリセロール生産、日本生物工学会 2015 年大会 (2015)

藤内恒有 (杉森大助) *Brevibacillus* Expression System を用いた *Chlorella kessleri* 由来ガラクトリパーゼの組換え発現およびドッキングシミュレーションによる触媒残基の推定、日本生物工学会 2015 年大会 (2015)

②1 大田淳平 (杉森大助) *Streptomyces sanglieri* A14 株由来ホスホリパーゼのキャラクタリゼーションならびにグリセロ糖脂質の加水分解特性、日本生物工学会 2015 年大会 (2015)

②2 長南圭介 (杉森大助) *Syncephalastrum racemosum* 由来エタノールアミノオキシダーゼの異種組換え発現ならびに機能解析、日本生物工学会 2015 年大会 (2015)

②3 酒瀬川信一、好熱性放線菌由来の新規酵素を使用する血清中プラスマローゲンの測定方法開発、2015 年度日本農芸化学会中四国支部若手シンポジウム (2015)

②4 D. Sugimori, Characterization of a lysoplasmalogen-specific phospholipase D and its application to diagnostic agent, *1st Asian Conference on Oleo Science* (2014)

〔図書〕(計 1 件)

Ryouta Maeba, Megumi Nishimukai, Shin-ichi Sakasegawa, Daisuke Sugimori and Hiroshi Hara, Plasma/Serum Plasmalogens, *Adv. Clin. Chem.* (ISBN: 978-0-12-803316-6), Elsevier, vol. 70, chapter 2, 31-94 (2015).

〔産業財産権〕

出願状況（計5件）

名称：炭素担持金ナノ粒子材料の製造方法、炭素担持金ナノ粒子材料、及び触媒
発明者：大橋弘範、貝沼修弥、浅田隆志、杉森大助、石田玉青
権利者：国立大学法人 福島大学、公立大学法人首都大学東京
種類：特許
番号：特願 2017-146699
出願年月日：平成 29 年 7 月 28 日
国内外の別：国内

名称：ポリ乳酸の分解方法、及びポリ乳酸分解剤
発明者：杉森大助、田所花菜
権利者：国立大学法人 福島大学
種類：特許
番号：特願 2017-33963
出願年月日：平成 29 年 2 月 24 日
国内外の別：国内

名称：Lp-PLA₂ 活性の測定
発明者：山浦沙樹、酒瀬川信一、杉森大助
権利者：国立大学法人 福島大学、旭化成ファーマ（株）
種類：特許
番号：特願 2016-123707
出願年月日：平成 28 年 6 月 22 日
国内外の別：国内

名称：Lp-PLA₂ 活性の測定
発明者：山浦沙樹、酒瀬川信一、杉森大助
権利者：国立大学法人 福島大学、旭化成ファーマ（株）
種類：特許
番号：PCT/JP2017/022051
出願年月日：平成 28 年 6 月 15 日
国内外の別：外国

名称：リパーゼ、ポリヌクレオチド、組換えベクター、形質転換体、リパーゼの製造法、グリセロ脂質を加水分解する方法及びグリセロ脂質の加水分解物を製造する方法
発明者：大田淳平、杉森大助
権利者：国立大学法人 福島大学
種類：特許
番号：特願 2015-187519
出願年月日：平成 27 年 09 月 24 日
国内外の別：国内

取得状況（計9件）

名称：認知機能検査法、及びそのキット
発明者：前場良太、荒木 厚、藤原佳典、小川貴志子、原 博、西向めぐみ、酒瀬川信一、松本英之、松本優作、杉森大助

権利者：学校法人帝京大学、地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター、国立大学法人北海道大学、旭化成ファーマ株式会社、国立大学法人福島大学
種類：特許
番号：特許第 6185466 号
取得年月日：平成 29 年 8 月 4 日
国内外の別：国内

名称：エタノールアミンオキシダーゼ
発明者：杉森大助、酒瀬川信一、松本英之
権利者：国立大学法人福島大学、旭化成ファーマ株式会社
種類：特許
番号：特許第 6144967 号
取得年月日：平成 29 年 5 月 19 日
国内外の別：国内

名称：油脂分解用微生物製剤及び廃液処理方法
発明者：杉森大助、牧孝昭、笹平俊
権利者：株式会社松本微生物研究所、国立大学法人福島大学
種類：特許
番号：特許第 6095152 号
取得年月日：平成 29 年 2 月 24 日
国内外の別：国内

名称：グリセロール - 3 - ホスホエタノールアミン（GPE）に対して加水分解作用を有する酵素及びその製造方法
発明者：杉森大助、峯田真吾
権利者：国立大学法人福島大学
種類：特許
番号：特許第 6080254 号
取得年月日：平成 29 年 1 月 27 日
国内外の別：国内

名称：グリセロール - 3 - ホスホコリン（GPC）などのグリセロール - 3 - ホスホジエステルに対して加水分解作用を有する酵素及びその製造方法
発明者：杉森大助、小笠原準季、奥田航輝
権利者：国立大学法人福島大学
種類：特許
番号：特許第 6063207 号
取得年月日：平成 29 年 1 月 18 日
国内外の別：国内

名称：プロテアーゼ、プロテアーゼ含有洗浄剤及びその製造方法
発明者：杉森大助
権利者：国立大学法人福島大学
種類：特許
番号：特許第 6043371 号
取得年月日：平成 28 年 11 月 18 日
国内外の別：国内

名称：ホスホリパーゼD、ポリヌクレオチド、ホスホリパーゼDの製造方法、コリン型プラ

ズマローゲンの測定方法、リゾホスファチジルコリンの測定方法、リゾホスファチジン酸の製造方法
発明者：杉森大助、松本優作
権利者：国立大学法人福島大学
種類：特許
番号：特許第 6013872 号
取得年月日：平成 28 年 9 月 30 日
国内外の別：国内

名称：プラスマローゲンの加水分解方法、プラスマローゲンの測定方法
発明者：酒瀬川信一、松本英之、杉森大助
権利者：国立大学法人福島大学、旭化成ファーマ株式会社
種類：特許
番号：特許第 5926801 号
取得年月日：平成 28 年 4 月 28 日
国内外の別：国内

名称：微生物製剤及び廃液処理方法
発明者：杉森大助、牧孝昭、笹平俊
権利者：株式会社松本微生物研究所、国立大学法人福島大学
種類：特許
番号：特許第 5900948 号
取得年月日：平成 28 年 3 月 18 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

教員総覧

<http://www.sss.fukushima-u.ac.jp/welcome/compendium/30>

研究室フェイスブック

<https://www.facebook.com/SugimoriLab>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉森大助 (SUGIMORI, Daisuke)
福島大学・共生システム理工学類・教授
研究者番号：40272695

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

村山和隆 (MURAYAMA, Kazutaka)
東北大学・大学院医工学研究科・准教授
研究者番号：40400452

(4) 研究協力者

なし