

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：11601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05822

研究課題名（和文）プラズマローゲン異性体の分別・高感度・ハイスループット酵素定量法の開発

研究課題名（英文）Development of high-throughput analysis of plasmalogens using enzyme

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー型認知症や動脈硬化症の早期発見バイオマーカーとして有望なコリン型およびエタノールアミン型プラズマローゲンの簡易・迅速定量法の開発が望まれている。本研究では、この定量法開発に不可欠な酵素を2種類発見し、その組換え生産法の検討を行った。生産には課題が残っているが、大腸菌を用いた生産を可能にし、定量が可能であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、コリン型およびエタノールアミン型プラズマローゲンに選択的に作用する酵素を見出した。この特徴は、新規なものであり、その特徴を発揮するメカニズムが今後解明されれば、これまで未解明であった分子認識機構の理解につながる点で重要な発見といえる。本酵素を応用し、将来血液1滴あれば簡単かつ短時間でアルツハイマー型認知症や動脈硬化症の早期発見が可能になることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Development of simple and rapid assay of choline-type and ethanolamine-type plasmalogens, which are attracting attention as biomarkers for early detection of Alzheimer's dementia and arteriosclerosis, has attracted attention. We have found two types of enzymes, and studied their recombinant production. Although there are still issues with the production, we have confirmed that production using E. coli was possible and that quantification of the plasmalogens was possible.

研究分野：生物学

キーワード：ホスホリパーゼD プラズマローゲン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー型認知症(AIz)や動脈硬化症の早期発見バイオマーカーとしてエーテルリン脂質(EthPI)の一種プラズマローゲン(PIs)が有効であると報告されている。ところが、放射性¹²⁵I-HPLCとLC-MS法以外にPIs分析法がないためPIsの簡易迅速分析法の開発が強く望まれている。申請者はPIs簡易分析に有用な酵素としてPIs特異的ホスホリパーゼD(PIs-PLD)を放線菌から見出し、本酵素の諸特性解析を進めてきた。PIsには、コリン型とエタノールアミン型の2種類(PIsCho, PIsEtn)が存在し、さらにsn-2位アシル鎖の組成(炭素数、二重結合数)が異なる異性体が存在するため、これら分子種に対応した定量法の実用化が必要となる。

2. 研究の目的

本研究では、PIsChoおよびPIsEtn特異的ホスホリパーゼD(PIsCho-, PIsEtn-PLD)の2種類のPLDについて異種組換え発現系を確立し、各酵素の諸特性解析を行うことを目的とした。さらに、各分子種の異性体を個別定量可能な変異型酵素を創製し、多種多様なPIs分子種に対応可能な簡易定量法の確立を目指した。

3. 研究の方法

放線菌 *Streptomyces* sp. AK461 株が分泌生産する PIsEtn-PLD の遺伝子と *Streptomyces* sp. A746 株が分泌生産する PIsCho-PLD の遺伝子を、それぞれ大腸菌あるいは放線菌を宿主とする異種組換え発現系の検討を行った。次に、活性型酵素の発現量向上を目的とし、可溶性タグ導入やシャペロン共発現システムの検討、物理化学的可溶化およびリフォールディング、HiSol 法による人工配列設計を試みた。十分な純度と活性を持つ組換え生産酵素を調製した後、研究目的である機能解析、続いて機能改良、定量法への応用研究に進める計画を立てた。

4. 研究成果

(1) PIsEtn-PLD の発現には、ベクター pET24a と宿主 *E. coli* BL21(DE3) の系が適していることがわかった。しかしながら、発現した酵素 rPIsEtn-PLD のほとんどが不溶性封入体(インクージョンボディ)として細胞内に凝集沈殿し、活性は微弱であった。そこで、変性剤を用いた rPIsEtn-PLD のリフォールディングによる可溶化を検討したが、目的酵素の可溶化は認められたものの、活性は確認できなかった。本酵素は立体構造形成で重要となるシステイン(Cys)残基を8個有していることから、Cys間で形成されるジスルフィド結合を正しく形成させる必要があるため、本酵素のリフォールディングは難易度が高いタンパク質と予想される。そこで、HiSol法¹⁾により rPIsEtn-PLD にアミノ酸置換を導入することで可溶性発現の向上とともに、機能改変を試みた。その結果、R395G 変異体において活性が2倍以上に向上した。このことから、R395が立体構造形成と酵素活性発現において重要な役割を担うと考えた。そのほかにも活性向上が見られた点変異体を多数取得し、複数のアミノ酸置換を導入した多重変異体を作成したが、活性の相乗効果は見られなかった。最終的に、R395G 変異体は親株に比べ活性が約6倍(0.027 U/mL → 0.150 U/mL)増加した。R395G 変異体を用いて最適 pH、温度、各種化学物質の影響について評価した後、基準基質である PIsEtn22:6 を用いてタイムコース試験を行い、さらに蛍光色素を利用することにより高感度分析も可能であることを確認し、PIsEtn 定量法への応用の可能性を見出した。

(2) PIsCho-PLD の発現に関しては放線菌発現系および大腸菌を宿主とした10種類の発現系に

より PlsCho-PLD の発現を試みた。類縁酵素である放線菌ホスホリパーゼ D の Tat 分泌シグナルを用いた放線菌分泌発現系(構成発現)および可溶性タグであるマルトースバインディングドメイン(MBD)等を利用した大腸菌発現系では活性型 PlsCho-PLD を生産できないことがわかった。pET24a、pET22b、pET22b (*pe/B*)およびシャペロン共発現プラスミドを用いた形質転換体を用いた発現検討では全ての発現系から PlsCho-PLD 活性を確認することができ、特に pET22b ベクターから *pe/B* シグナルを除去したプラスミド (pET22b(*pe/B*))に *plscho-pld* を導入した組換えプラスミドと、シャペロン共発現プラスミドである pGTf2 を宿主大腸菌 BL21(DE3)に形質転換した形質転換体 BL21(DE3):pGTf2/pET22b(*pe/B*):*plscho-pld* を用いて発現させた結果、宿主大腸菌細胞質中に 1.3 U/mL (比活性 1.74 U/mg-protein) の PlsCho-PLD 活性を確認することができた。この CFE から His タグを利用したアフィニティーカラムクロマトグラフィー (HisTrap) を利用して精製を試みた結果、非吸着画分から目的酵素が回収された。このことから、His タグ配列部分を酵素内側に巻き込みながら立体構造を形成している可能性があると考えた。精製には至らなかったものの、組換え酵素は親株に比べ活性が約 1.7 倍(0.766 U/mL 1.3 U/mL)の活性を示したことから、本サンプルを用いて最適 pH、温度、各種化学物質の影響について評価した。途中、本組換え酵素は 37 加温により活性が 0.13 から 0.19 U/mL まで向上するという熱成熟現象が観察された。しかしながら、熱成熟酵素を用いた基質特異性試験を行った結果、熱成熟酵素では基質特異性が悪化することがわかった。そこで、熱成熟なしの組換え酵素クルードサンプルを用いて基準基質である PlsCho18:1 を用いてタイムコース試験を行い、さらに蛍光色素を利用することにより高感度分析も可能であることを確認し、PlsCho 定量法への応用の可能性を見出した。

以上、本研究成果をまとめると、PlsEtn および PlsCho を選択的に定量可能な 2 種類の酵素を取得し、組換え生産を可能にした。さらに、組換え生産酵素を用いて簡易・高感度・ハイスループット分析が可能であることを確認した。しかしながら、当初の目標であった多様な分子種の分別定量に対応可能な酵素への機能改変までは着手できなかった。

<参考文献>

1. Daisuke Matsui, Shogo Nakano, Mohammad Dadashipour, and Yasuhisa Asano, Rational identification of aggregation hotspots based on secondary structure and amino acid hydrophobicity, *Sci. Rep.*, **7** (1), 1-12 (2017).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takayuki Oyama, Kazutaka Murayama, and Daisuke Sugimori	4. 巻 11
2. 論文標題 Switching the substrate specificity of lysoplasmalogen-specific phospholipase D	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1132-1143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yuka Hayashi, Masaya Nakamura, Shogo Nakano, Sohei Ito, Yasuhisa Asano, and Daisuke Sugimori	4. 巻 133
2. 論文標題 Thermostability enhancement of l-glutamate oxidase from Streptomyces sp. NT1 by full consensus protein design	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Biosci. Biotechnol.	6. 最初と最後の頁 309-315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2021.12.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 杉森大助、酒瀬川信一、山浦沙樹	4. 巻 78
2. 論文標題 エーテルリン脂質特異的加水分解酵素の発見と臨床検査キット開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 392～395
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 杉森大助	4. 巻 98
2. 論文標題 ホスホリパーゼを利用した体外臨床診断用酵素の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物工学会誌（特集）	6. 最初と最後の頁 477～480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujisawa Ikuhide, Hamana Hiroaki, Tomita Yu, Matsumoto Yusaku, Murayama Kazutaka, Sugimori Daisuke	4. 巻 131
2. 論文標題 Structural basis for the high thermal stability and optimum pH of sphingomyelinase C from <i>Streptomyces griseocarneus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 8~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.09.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oyama Takayuki, Murayama Kazutaka, Sugimori Daisuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Switching the substrate specificity of lysoplasmalogen specific phospholipase D	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1132~1143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 薄井翔太, 齋藤高典, 杉森大助
2. 発表標題 コリン型ブラズマローゲン特異的ホスホリパーゼDの探索, 精製, 諸特性解析
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部第156回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 薄井翔太, 黄友征, 齋藤高典, 杉森大助
2. 発表標題 コリン型ブラズマローゲン特異的ホスホリパーゼDの異種組換え発現と諸特性解析
3. 学会等名 2021年度第3回脂質駆動学術産業創生研究部会講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野澤俊貴, 川村柚葉, 王 澤, 杉森大助
2. 発表標題 エタノールアミン型プラズマローゲン特異的ホスホリパーゼDの異種組換え発現
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度東北支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川村柚葉, 野澤俊貴, 王 澤, 杉森大助
2. 発表標題 組換え発現エタノールアミン型プラズマローゲン特異的ホスホリパーゼDの諸特性解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度東北支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野澤俊貴, 川村柚葉, 王 澤, 杉森大助
2. 発表標題 Streptomyces sp. AK461 由来エタノールアミン型プラズマローゲン特異的ホスホリパーゼDの異種組換え発現と諸特性解析
3. 学会等名 第2回脂質駆動学術産業創生研究部会講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川村柚葉, 野澤俊貴, 王 澤, 杉森大助
2. 発表標題 組換えエタノールアミン型プラズマローゲン特異的ホスホリパーゼDの基質特異性と反応pH, 金属イオンの関係
3. 学会等名 第2回脂質駆動学術産業創生研究部会講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野澤俊貴, 川村柚葉, 王 澤, 杉森大助
2. 発表標題 エタノールアミン型ブラズマローゲン特異的ホスホリパーゼDの異種組換え発現および機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川村柚葉, 野澤俊貴, 王 澤, 杉森大助
2. 発表標題 エタノールアミン型ブラズマローゲン特異的ホスホリパーゼDの基質特異性に及ぼす反応pH, 金属イオンの影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ホスホリパーゼD, 及びコリン型ブラズマローゲンの定量方法	発明者 藤野武彦, 馬渡志郎, 本庄雅則, 杉森大助, 薄井翔太	権利者 株式会社レオロ ジー機能食品研 究所, 福島大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-136632	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 ホスホリパーゼD、及びエタノールアミン型ブラズマローゲンの定量方法	発明者 杉森大助、川村柚 葉、野澤俊貴、藤野 武彦、馬渡志郎、山	権利者 株式会社レオロ ジー機能食品研 究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-036298	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------