

学位論文題名

ホスファチジル基転移反応における  
ホスホリパーゼ D の立体選択性に関する研究

学位論文内容の要旨

ホスホリパーゼD (PLD) はリン脂質のリン酸ジエステル結合を加水分解してホスファチジン酸と塩基を産生する加水分解酵素の一つであるが、第1級アルコールの存在下では、リン脂質のホスファチジル基をアルコールに転移する反応(ホスファチジル基転移反応)も触媒する。他の加水分解酵素にはみられないこの特異な性質を利用して、魚類細胞膜の主要成分であるホスファチジルコリン(PC)から、ホスファチジルグリセロール(PG)やホスファチジルセリンなど天然には少量しか存在しない有用なリン脂質を容易に合成できるため、有機合成化学の分野から大きな関心が寄せられている。PLDはキャベツなどの高等植物、放線菌などの微生物や酵母、脳などの動物組織から見出されているが、ホスファチジル基転移反応には専ら、調製の容易なキャベツまたは微生物由来のものが用いられている。

キャベツ PLD の有するホスファチジル基転移反応によって、PC (*R* 配置) とグリセロールから得られる PG は従来 *R,S* 体と *R,R* 体のジアステレオマーの等量混合物であると言われてきた(Fig. 1)。このことは、キャベツ PLD はプロキラルなグリセロールの2つの第1級水酸基を区別しないこと、すなわち立体選択性をもたないことを意味する。しかし、最近、キラル高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて市販の合成 PG (合成方法は不明) の立体構造を分析した結果、必ずしもジアステレオマーの等量混合物ではなく、*R,R* 体が高い割合で含まれる場合もあることが明らかにされた。この結果は、酵素反応の条件によっては、立体選択性の発現する場合のあることを示唆するが、これまでこの点については何も

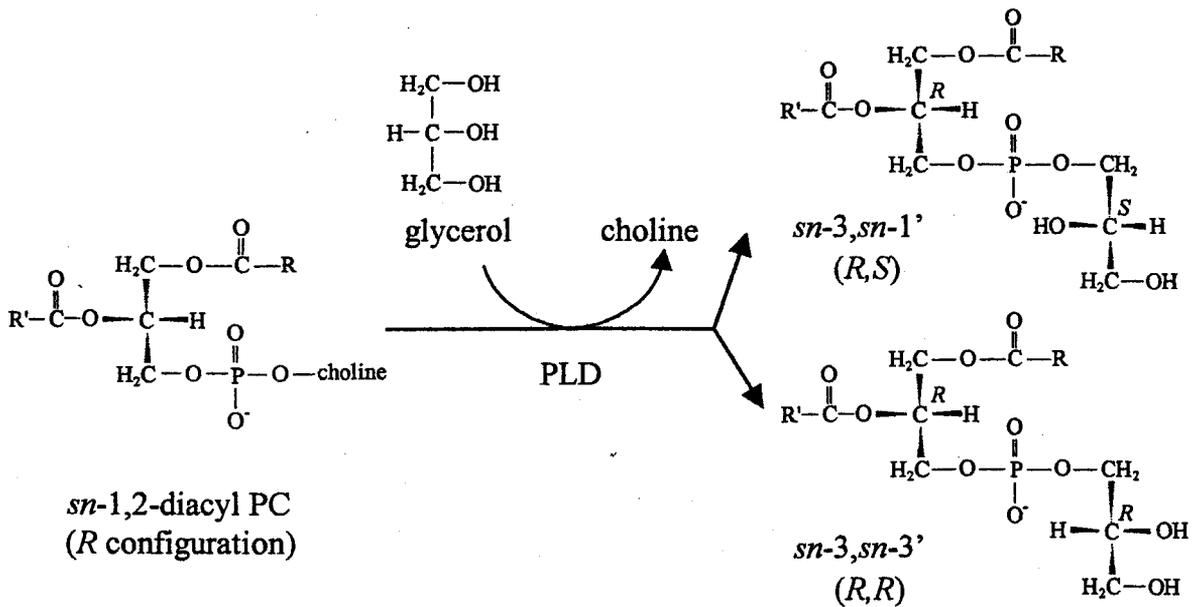


Fig. 1 Phospholipase D (PLD)-catalyzed transphosphatidylation of 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PC, *R* configuration) to phosphatidylglycerol (PG). *sn*-3,*sn*-1': 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-1'-*sn*-glycerol (*R,S* configuration); *sn*-3,*sn*-3': 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-3'-*sn*-glycerol (*R,R* configuration).

明らかにされていない。ホスファチジル基転移反応は生体でも起こると推測されるが、天然物由来の PG には従来 *R,S* 配置しか存在しないといわれてきた。キラル HPLC 法によって、最近、大腸菌 PG 中に約 10%の *R,R* 体が見出されたことから、他の生物、特に海洋生物における *R,R* 体の分布やその機能に興味をもたれている。しかしながら、生体における *R,R* 体の分布や *R,S* 体との物理的、化学的性質の違いや生理機能の差異についてはほとんど何も明らかにされておらず、解明されるべき課題となっている。

以上の観点から、本研究ではホスファチジル基転移反応における PLD の立体選択性の詳細を明らかにすることを目的として、以下の検討を行った。(1) 植物及び微生物由来 PLD の立体選択性、(2) PLD の立体選択性に及ぼす反応温度の影響、(3) 高度不飽和脂肪酸高含有 PG ジアステレオマー (*R,S* 体と *R,R* 体) の合成。

(1)植物及び微生物由来 PLD がホスファチジル基変換反応において、グリセロールの2つの第1級水酸基を識別するか否かを、基質に *R* 配置 (天然型) 及び *S* 配置 (非天然型) の PC を用いて詳細に検討した。放線菌 (*Streptomyces* TH2 株、K5 株、K6 株及び *Actinomadura* sp.) 由来 PLD を用いて様々なアシル基を有する PC (卵黄及びサケ卵 PC

を含む)から PG を合成し、これをキラル HPLC で分析することにより、PLD の立体選択性を決定した。その結果、得られたすべての PG は 30-40%の *R,S* 体と 60-70%の *R,R* 体のジアステレオマー混合物であったことから、放線菌 PLD はプロキラルなグリセロールの 2 つの水酸基をある程度区別すること、及び基質アシル基の炭素数と二重結合数によってその組成にわずかに差のあることが明らかになった。遺伝子組換え PLD (rK1、TH2/K6、K6/TH2) も野生株由来 PLD と同様の立体選択性を示した。一方、植物 (キャベツ及びピーナツ) 由来 PLD は従来報告されているように、*R,S* 体と *R,R* 体のほぼ等量混合物を生成したことから、立体選択性を示さないことが確認された。次に、基質に *S* 配置 (非天然型) の PC を用いて PLD の立体選択性を検討した結果、放線菌 PLD を用いて得られた PG は、約 70%の *S,R* 体と 30%の *S,S* 体の混合物で構成されており、*R* 配置 (天然型) の PC を基質に用いたときと同じくグリセロール部が *R* 配置となる PG を優先的に生成した。一方、キャベツ PLD を使用して合成した PG は、基質に *R* 配置の PC を用いた場合と異なり、40%の *S,R* 体と 60%の *S,S* 体の混合物であった。このことから、キャベツ PLD は基質の立体配置に依存して、立体選択性を発現することが明らかになった。

(2) PLD の立体選択性に及ぼす反応温度の影響について検討した。放線菌 PLD を用いて基質 PC (*R* 配置) から合成した PG は 30°C で 40%の *R,S* 体と 60%の *R,R* 体から構成されていたが、0°C では 30%の *R,S* 体と 70%の *R,R* 体となり、反応温度が低いほど *R,S* 体よりも *R,R* 体が優先的に生成した。これらの結果にアイリング式を適用したところ良好な直線関係が得られたため、放線菌 PLD の立体選択性は反応温度に依存して徐々に変わることが明らかになった。この結果を遷移状態理論を用いて考察し、*R,S* 体及び *R,R* 体を生成する反応における遷移状態の熱力学量から反応温度とジアステレオマーの生成比に相関関係のあることを明らかにした。一方、キャベツ PLD には温度の影響はほとんど認められなかった。従って、温度効果は微生物由来 PLD の有する特徴的な性質であると考えられる。

(3) PLD のホスファチジル基変換反応を利用して高度不飽和酸を多く含む PG ジアステレオマー (*R,S* 体と *R,R* 体) の簡易合成法を検討した。放線菌 PLD の存在下で、1,2- 及び

2,3-イソプロピリデン-*sn*-グリセロールと PC (*R* 配置) からホスファチジル-イソプロピリデン化合物を合成した後、ホウ酸を含むトリメチルホウ素中でイソプロピリデン基を分解して PG を調製した。その結果、高度不飽和脂肪酸を豊富に含むサケ卵 PC (エイコサペンタエン酸約 20%、ドコサヘキサエン酸 19%) から 95% 以上の純度で両ジアステレオマー (*R,S* 体と *R,R* 体) を高収率で合成することに成功した。

本研究で明らかにした PLD の立体選択性は、PLD の起源 (微生物と植物) によって異なっていたことから、PLD の構造との相関を明らかにする上で重要な知見となると考えられる。また、PLD の立体選択性の解析は海洋細菌を含む微生物リン脂質の生合成経路を検討する観点からも意義があると思われる。最近、高度不飽和脂肪酸を多く含む PG (*R,S* 体) には、レチノイン酸との併用により骨髄性白血病細胞に対して分化誘導効果を有することが報告された。本研究では、高度不飽和脂肪酸を豊富に含み入手の容易なサケ卵を用いて純度の高い PG ジアステレオマーの合成法を確立したことから、今後 *R,S* 及び *R,R* 間の生化学的性質の差異や生理活性の違いが明らかになるものと期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 板 橋 豊  
副 査 教 授 鈴 木 翼  
副 査 教 授 宮 下 和 夫  
副 査 助 教 授 安 藤 靖 浩

学 位 論 文 題 名

## ホスファチジル基転移反応における ホスホリパーゼ D の立体選択性に関する研究

ホスホリパーゼ D (PLD) はリン脂質のリン酸ジエステル結合を加水分解する酵素であるが、第 1 級アルコールの存在下では、ホスファチジル基をアルコールへ転移する反応(ホスファチジル基転移反応)をも触媒する特異な性質を有する。他の加水分解酵素にはみられないこの転位反応を利用して、魚類細胞膜の主要成分であるホスファチジルコリン(PC)から、ホスファチジルグリセロール(PG)やホスファチジルセリン(PS)など天然には少量しか存在しない有用なリン脂質を容易に合成できるため、近年食品や医薬品の分野から大きな関心が寄せられている。本研究は、この転移反応における PLD の立体選択性の解析とその応用を目的として行なわれたものである。得られた成果は以下のように要約される。

- (1) PC から PG への転位反応において、PLD はプロキラルなグリセロールの第1級水酸基を全く識別しないと従来言われてきた。しかし、本研究では、放線菌 (*Streptomyces* TH2, K5, K6 及び *Actinomadura* sp.) 由来 PLD を用いて、飽和 (14:0, 16:0, 18:0) 及び不飽和 (18:1, 18:2, 18:3, 20:5, 22:6) の脂肪酸を含む *sn*-1,2-ジアシル PC (*R*配置) とグリセロールから PG を合成し、これをビス-3,5-ジニトフェニルウレタン誘導体に変換してキラル HPLC で分析した結果、得られたすべての PG は、定説と異なり、30-40%の *R,S* 体と 60-70%の *R,R* 体のジアステレオマー混合物であったことから、PLD がプロキラルなグリセロールの第1級水酸基をある程度識別しながら 2 つのジアステレオマーを生成すること、すなわち、放線菌 PLD は、ホスファチジル基転移反応において立体選択性を発現することが明らかとなった。基質にホスファチジルエタノールアミン(PE)を用いた場合も同様であった。遺伝子組換え PLD (rK1, TH2/K6, K6/TH2) も同様の立体選択性を示したが、植物(キャベツ及びピーナツ)由来 PLD は従来報告されているように、*R,S* 体と *R,R* 体のほぼ等量混合物を生成したことから、立体選択性は微生物由来 PLD に特有の性質であると結論した。

(2) 実験に使用したすべての放線菌 PLD は、反応温度が低いほど *R,S* 体よりも *R,R* 体を優先的に生成することを見出した。すなわち、*R* 配置の PC から合成した PG は、たとえば 30°C では 40% の *R,S* 体と 60% の *R,R* 体から構成されていたが、0°C では *R,S* 体が減少し、その比率は 30% *R,S*、70% *R,R* であった。得られた結果にアレニウス式を適用したところ、すべての PLD について良好な直線関係が得られたことから、放線菌 PLD の立体選択性は反応温度に依存して徐々に変わることが明らかになった。また、アイリングの遷移状態理論を用いて考察し、*R,S* 体及び *R,R* 体を生成する反応における遷移状態の熱力学量から、反応温度とジアステレオマーの生成比に相関関係のあることを明らかにした。一方、キャベツ PLD には温度の影響はほとんど認められなかったことから、温度効果は微生物由来 PLD の有する特徴的な性質であると結論した。

(3) PG の両ジアステレオマー (*R,S* 体と *R,R* 体) を高純度で合成する方法を検討した。放線菌 (*Actinomadura* sp.) PLD の存在下で、光学活性 1,2- 及び 2,3-イソプロピリデン-*sn*-グリセロールと *sn*-1,2-ジアシル PC (*R* 配置) を反応させてホスファチジルイソプロピリデングリセロールを高収率で合成することに成功した。これをホウ酸を含むホウ酸トリメチル中でイソプロピリデン基を分解して (90°C で数時間加熱) PG を得た。その結果、飽和脂肪酸やモノエン脂肪酸から成る PC ばかりでなく、20:5 (EPA) や 22:6 (DHA) などの高度不飽和脂肪酸を豊富に含むサケ卵 PC からも 95% 以上の純度で両ジアステレオマーを高収率で合成することに初めて成功した。現在、*R,S* 及び *R,R* 間の生化学的性質の差異や生理活性の違いは不明であるが、合成法が確立したことから、その違いが今後明確になるものと期待される。

以上の成果は、ホスファチジル基転移反応における微生物 PLD のグリセロールに対する立体選択性の詳細を明らかにしたものであり、また EPA や DHA など高度不飽和脂肪酸を含む PG のジアステレオマーの簡易合成法を確立したものであり、審査員一同は本研究が博士 (水産科学) の学位を授与される資格のあるものと判定した。