報 文

ホスホリパーゼ D による大豆リン脂質からの
ホスファチジルグリセリン調製

鎌田 正純・原 節子・戸谷洋一郎

成蹊大学工学部 (〒180 東京都武蔵野市吉祥寺北町 3-3-1)

Phosphatidylglycerol Preparation from Soy Phospholipid
with Phospholipase D

Masazumi KAMATA, Setsuko HARA, and Yoichiro TOTANI

Faculty of Engineering, Seikei University

(3-1 Kichijoji-Kitamachi 3, Musashino-shi, Tokyo 〒180)

The optimum conditions for quantitative conversions of phosphatidylcholine (PC) concentrated soy phospholipid into phosphatidic acid (PA) or phosphatidylglycerol (PG) were examined with crude phospholipase D prepared from fresh cabbages.

The results showed that the phospholipase D used had a pH-dependency in hydrolysis or transphosphatidyl-ation, that is, the complete hydrolysis from PC to PA and transphosphatidyl-ation from PC to PG occurred under pH 5.6 and 4.8, respectively. Therefore, the competitive hydrolysis could be inhibited effectively in PG preparation from PC by adjusting the pH with an acetate buffer solution (pH 4.8).

Under the optimum conditions determined, PC and PE were converted quantitatively into PA or PG by hydrolysis or transphosphatidyl-ation with the phospholipase D, respectively, although phosphatidylinositol (PI) did not change at all.

1 緒 論

グリセリン脂質は食品、医薬品、化粧品分野において広く利用され、生体内で膜の主要構成成分として広く分布し、生命機能に対して重要な役割を果たしている¹⁾。最近では、生体内の微量リン脂質の生理機能が注目され、ホスホリパーゼを用いて調製した種々の高純度リン脂質を用いた研究も盛んに行われている。特に各種の高等植物、微生物を起源とするホスホリパーゼ D (E.C. 3.1.4.4) によるリン脂質クラスの変換に関して、山根ら^{2)~5)}は、各種起源のホスホリパーゼ D を用いてホスファチジルコリン (PC) からホスファチジルグリセリン (PG)、ホスファチジエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS) を調製し、さらに酵素の固定化やバイオリアクターとしての利用など、より簡便にこれらの微量リン脂質を調製する研究を精力的に行っている。

本研究では、近年 PC に比較して優れた界面活性を示

連絡者：戸谷洋一郎

すこと、また肺機能の活性を高める作用を有することが報告されている^{6),7)} PG について注目し、キャベツ起源のホスホリパーゼ D を用いて大豆リン脂質から PG を簡便かつ高収率に調製する方法について検討した。なお、ホスホリパーゼ D を用いた反応においては、リン脂質のホスファチジル基変換反応とホスファチジン酸 (PA) を生成する加水分解反応が同時に進行するため、PG を高収率に得るためにはこの加水分解反応をいかに抑制するかが問題と考えられる。そこで反応系の pH、グリセリン量、水分量等の諸条件について、PA と PG 量に注目して検討した。

2 実 験

2-1 試料と試薬

反応基質であるリン脂質は、Table-1, 2 に示した組成をもつ日清製油(株)提供の PC 濃縮大豆リン脂質 (PC-90) と精製大豆リン脂質 (PC-50) を用いた。

また、実験に使用したホスホリパーゼ D はキャベツから松本らの方法⁸⁾を参考に調製した。本実験において

Table-1 Composition of sample phospholipids (%)

	PC	PE	PI	PA	Others
PC-90	89.3	9.0	—	—	1.7
PC-50	49.4	37.1	11.6	1.9	—

Table-2 Fatty acid composition of sample Phospholipids (%)

	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
PC-90	16.0	3.2	11.6	62.9	6.3
PC-50	15.9	3.4	11.6	62.4	6.7

はキャベツ 400 g から粗酵素粉末約 1 g が得られ、あらかじめ -15℃ の保存で約 2 か月、加水分解活性が安定であることを確認した。また、酵素活性は、最適化した反応条件のもとで、17 IU/g の活性であった。

2.2 ホスホリパーゼ D を用いた PA 及び PG の調製

リン脂質のホスホリパーゼ D を用いた加水分解による PA の調製は、基質となるリン脂質 (500 mg) をジエチルエーテルに溶解し、所定量の緩衝液、1 M 塩化カルシウム水溶液、粗酵素粉末を加え、37℃ で回転振とう (250 rpm) することで行った。また、ホスファチジル基変換反応に基づく PG の調製は、変換するアルコール基質であるグリセリンを加え、PA 調製に準じて行った。なお、最適反応条件は pH、水分量、塩化カルシウム水溶液濃度、ジエチルエーテル量、酵素量などの各条件を検討して決定した。

加水分解反応及びホスファチジル基変換反応は、反応系にホルミド溶媒を加えることにより停止した後、3,000 rpm、20 min の遠心分離によりクロロホルム層としてリン脂質回収物を得た。

2.3 TLC 分析

得られた反応物のリン脂質組成の分析に際しては二次元 TLC 分析法を用いた。すなわち、市販のプレコート TLC プレート (Merck 社製 Kieselgel G 60, 10×10 cm) に試料を負荷した後、一次展開溶媒 (クロロホルム : メタノール : 28 % アンモニア水 = 65 : 35 : 8)、二次展開溶媒 (クロロホルム : メタノール : 酢酸 : 水 = 50 : 25 : 8 : 4) を用いて展開し、乾燥後、Dittmer 試薬で発色させた。発色した各リン脂質クラスはクロマトスキャナー CS 9000 (島津製作所製) を用いて、600 nm における分光反射吸収法により測定した後、二次元分光画像解析プログラムによりパーソナルコンピュータを用いて解析し、発色スポットの位置から定性を、また各スポットの光学密度から定量を行った。

3 結 果

3.1 PA の調製

これまでの報告²⁾を参考にした pH 5.6 の条件下に、基質 500 mg、酵素 50 mg を用いた加水分解における緩衝液と塩化カルシウム水溶液の合計量である水分量を 5~45 mL まで変化させて検討した結果、25 mL が最適であった。ジエチルエーテル量については 4~20 mL まで変化させて検討した結果 8 mL が、また塩化カルシウム水溶液濃度は 1 M が最適であることが判明した。さらに酵素量を 50~500 mg まで変化させ、2 h の反応における基質中の PA 含量を検討した結果、基質に対して 60 wt % に相当する 300 mg を用いた場合に PA 含有率は 100 % になることが判明した。次に、これらの最適条件下に PC-50 と PC-90 を基質として加水分解反応を行い、反応混合物中の各リン脂質含有率の経時的変化を調べ、その結果を Fig.-1, 2 に各々示した。

Fig.-1 から明らかなように、PC-90 では反応開始直後から PC 及び PE ともに急激に減少し、2 h で PA が定量的に生成された。しかし、Fig.-2 に示したように PC-50 では PC と PE は Fig.-1 と同様に速やかに PA に変換されたのに対し、ホスファチジリノシトル (PI) は全く加水分解されず、反応系の PA 含有率は 90 % までしか上昇しなかった。これらの結果から、本実験で使用したキャベツ起源のホスホリパーゼ D は PC と PE に対しては同等の加水分解能を示すことが確認されたが、PI に対しては全く作用しないことが判明した。

Fig.-1 Preparation of PA from PC-90 with phospholipase D.

PA(●), PC(◆), PE(▼), PI(■)

PC-50 500mg Buffer(pH5.6) 23mL
 PL-D 300mg 1M CaCl₂ 2mL
 35°C.250rpm Diethyl ether 8mL

Fig.-2 Preparation of PA from PC-50 with phospholipase D.

3・2 PG の調製

反応系にグリセリンを加え、ホスファチジル基変換反応により PG を調製する際の最適条件について、PC-90 を基質として検討した。まずはじめに加水分解反応による PA の生成を抑制し、変換反応による PG 調製を優先的に行うため、反応系の pH について検討した。すなわち、反応に用いる緩衝液の pH を 2.0~7.0 の間で変化させ、反応生成物の組成を追跡した結果を Fig.-3 に示した。グリセリンを加えた反応系においても、PA は pH 5.6 付近で最大の含有率に達し、加水分解反応の最適 pH は 5.6 であることが確認された。しかし、PG 含有率は PA 調製のための最適 pH に比較して酸性側の pH 4.8 で最高の約 65 % を示し、pH により発現する酵素の作用に差を生ずることが明らかとなった。このことから、競争的な加水分解反応を抑制し、変換反応により PG を調製するためには加水分解時の最適 pH である 5.6 よりも酸性側の pH 4.4~4.8 が最適であると判断し、以後の実験はすべて pH 4.8 で行った。

次に、基質 100 mg に対してグリセリン量を 1~10 mL まで変化させて PG 含有率の変化を測定した結果、グリセリン量の増加に伴い PG 含有率は上昇し、6 mL (基質に対して約 600 倍のモル数) で 77.2 % の最高値を得た。また、水分量を 1~20 mL まで変化させた結果から、水分量が 1 mL の場合は酵素の活性が発現されず原料回収に終わったが、水分量の増加に伴い変換活性が上昇し、10 mL のときに PG 含有率 85.5 % を得た。しかし、さらに水分量が増加すると加水分解反応により PA が生成することが確認されたので、水分量としては基質 100 mg、酵素 50 mg に対して 10 mL が最適と判断した。塩化カルシウム水溶液濃度については

PG(●), PA(▲), PC(◆), PE(▼)

PC-90 100mg Buffer(pH4.8) 10mL
 PL-D 50mg 1M CaCl₂ 5mL
 37°C.250rpm Diethyl ether 20mL
 Glycerol 4mL

Fig.-3 Effect of pH on PG preparation from PC-90 and glycerol with phospholipase D.

0.1~2 M まで変化させて検討した結果、1 M が最適と判断された。3・1 の加水分解反応の最適条件においては基質 500 mg、酵素 300 mg に対して 2 mL の 1 M 塩化カルシウム溶液を用いたのに比較して、PG 調製においては基質 100 mg、酵素 50 mg に対して 1 M 塩化カルシウム溶液 3.3 mL と相対的にかなり過剰の塩化カルシウムを必要とすることが判明した。また、酵素量を 50~150 mg まで変化させて 2 h 反応を行った結果、基質 100 mg に対して 150 mg 加えた場合に PG 含有率は 94 % に達することが判明した。

これらの最適条件下に PC-90 及び PC-50 を用いて変換反応を行い、反応生成物の組成の経時の変化を Fig.-4, 5 に各々示した。Fig.-4 から明らかのように反応開始直後から PG 含有率は急激に上昇し、3 h で競争的に生成していた PA も完全に消失し、定量的に PG に変換されて回収率も 95 % 以上であることが判明した。従って、PC と PE の混合物は pH 4.8 でグリセリンとのホスファチジル基変換反応を 3 h 行うことにより、PG に 100 % 変換することが可能となった。すなわち、ホスホリパーゼ D によるエステル交換反応では従来高純度の PC が基質として用いられていたが、PE と PC の混合物でも同様の結果が得られることが確認された。

また、PC-50 を用いて同条件で PG 調製を行った結果、Fig.-5 に示したように PC と PE の含有率は反応直後から急激に減少した。一方、PI はほとんど変化せず、ホスホリパーゼ D は PI に対して加水分解作用と同様に、イノシトールをグリセリンと交換する反応も行わないことが判明した。また、PG 含有率は反応時間 1.5

PG(●), PA(▲), PC(◆), PE(▼)

PC-90 100mg Buffer(pH4.8) 6.6mL
 PL-D 150mg 1M CaCl₂ 3.3mL
 37°C.250rpm Diethyl ether 30mL
 Glycerol 6mL

Fig.-4 Preparation of PG from PC-90 and glycerol with phospholipase D.

PG(●), PA(▲), PC(◆), PE(▼), PI(■)

PC-50 100mg Buffer(pH4.8) 6.6mL
 PL-D 150mg 1M CaCl₂ 3.3mL
 37°C.250rpm Diethyl ether 30mL
 Glycerol 6mL

Fig.-5 Preparation of PG from PC-50 and glycerol with phospholipase D.

hで最高の約75%に達したが、その後はほとんど上昇せず、PAにわずかな増加が認められたにすぎなかった。なお、Fig.-4に示したPC-90を用いた場合と比較するとPAが多く生成し、加水分解が完全には抑制されず、また、生成したPAからのPGへの変換も起こらないものと考えられた。

4 考 察

キャベツから調製したホスホリパーゼDの粗酵素を用い、大豆リン脂質からPGを簡便かつ高収率に調製する方法を確立するため、まずPAを生成する加水分

解反応とPGを生成する変換反応の最適条件を比較した。また大豆リン脂質の主要な構成成分であるPC、PE及びPIの反応性の差についても検討した。

PA調製についてはPC-90を基質として用いた場合、基質500mgに対してジエチルエーテル8mL、緩衝液(pH 5.6)23mL、1M塩化カルシウム水溶液2mL、ホスホリパーゼD 300mgを加え、35°Cで2h、250rpmで反応することにより完全に加水分解され、定量的にPAが調製されることが判明した。しかしPIを含むPC-50を基質として用いた場合には、PCとPEはPC-90の場合と同様に加水分解されたのに対し、PIはほとんど変化しなかった。

また、ホスファチジル基変換反応によるPGの調製におけるpH依存性について検討した結果、従来ホスホリパーゼDの最適pHは5.6とされ、加水分解反応と変換反応のいずれにおいてもpHは5.6に調整されていたが^(2),3)、本実験から変換反応の最適pHは加水分解反応よりも、幾分酸性領域の4.8付近であることが判明した。従って、反応系のpHを4.8に調整することによりホスホリパーゼDの変換活性が加水分解活性に優先して発現され、従来PG調製時に課題とされていた競争的な加水分解反応の効果的抑制が可能となった。各種の微生物起源ホスホリパーゼDによるアスコルビン酸やヌクレオチドをPCへ導入する反応では、アルコール基質分子種のpK値に相当するpHが、反応の最適pHであると指摘されている⁹⁾。本研究の結果は、変換するアルコール基質のpK値の影響だけでなく、pHにより酵素機能に変化したと考えられる。また、ホスホリパーゼDの活性はアルコール基質濃度依存性を示し、グリセリン濃度が高い場合には変換反応が阻害されることが知られており、pH 5.6においてPGを高収率で得るためには、グリセリン濃度を30~50(vol/vol)%にすることが必要とされる^{3),10)}。なお、低グリセリン濃度領域においては一般的に加水分解反応が優先する傾向がみられ、PGを定量的に調製するためにはグリセリン量の厳密なコントロールが必要とされている。本実験では、加水分解時と異なるpHを用いてグリセリン濃度の影響について検討したが、従来の報告^{3),10)}と同等のグリセリン濃度37.5%でPC及びPEから定量的にPGが調製できた。従って、基質100mgをジエチルエーテル30mLに溶解し、ホスホリパーゼDを150mg、pH 4.8の緩衝液6.6mL、1M塩化カルシウム水溶液3.3mL、グリセリン6mLを加え、37°Cで3h、250rpmで反応することにより、PCとPEの混合物から定量的にPGを調製できることが判明した。

また、上記の最適条件においてPC-90とPC-50を基質とした場合を比較した。PC-90の場合にはPCとPEの変換速度に差は見られず、定量的にPGに変換さ

れた。一方、PC-50 では PC と PE は同様に交換されるが、PI は加水分解反応と同じく交換反応もほとんど受けなため、最終的な交換率は 75 % 程度であった。これらの結果から、PC と PE を含む PC 濃縮大豆リン脂質を基質として用いても、高純度 PC を用いた場合と同様に、ホスファチジル基交換反応により定量的に PG が得られることが確認された。しかし、PI はキャベツ起源のホスホリパーゼ D による加水分解反応及び交換反応のどちらの作用も受けなかった。これまでに多くの研究者が PI の交換作用について検討しているにもかかわらず好結果が得られていない¹¹⁾ ことについては、PI と他のリン脂質との構造及び性状の差などに注目して詳細に検討することが必要と考えられる。

5 総 括

キャベツ起源のホスホリパーゼ D 粗酵素 (17 IU/g) を用いて、大豆リン脂質から PG を定量的に調製するホスファチジル基交換反応条件について検討した。なお、ホスホリパーゼ D により競争的に起きる加水分解反応の抑制が PG の調製における課題となるため、交換反応に先立ち加水分解反応についても併せて検討した。その結果、加水分解反応においては従来ホスホリパーゼ D の最適条件とされている pH 5.6 で定量的に PA が生成したのに対し、交換反応においては加水分解反応に比較してやや酸性側の pH 4.8 を用いることにより、加水分解反応が効果的に抑制され、PC 及び PE が定量的に PG に交換されることが判明した。

また、基質としてリン脂質組成の異なる 2 種の大豆リン脂質を用いて検討した結果、PC と PE のみを含む

PC-90 では PA 及び PG が本実験で決定した最適条件において定量的に調製され、PC と PE の両反応に対する反応性はほぼ同様であることが確認された。しかし、PC と PE 以外に PI を 10 % 程度含む PC-50 を用いた場合、ホスホリパーゼ D の加水分解作用及び交換作用を PC と PE は受けるのに対し、PI は未反応のまま残存することが判明した。これらのリン脂質における反応性の差については今後さらに究明することが必要と考えられた。

[平成 4 年 (1992 年) 12 月 4 日受理]

文 献

- 1) 矢澤一良, 増沢康男, 油化学, 40, 845 (1991)
- 2) Sang Young Lee, N. Hibi, T. Yamane, S. Shimizu, *J. Ferment. Technol.*, 63, 37 (1985)
- 3) L.R. Juneja, T. Yamane, N. Hibi, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 146 (1987)
- 4) L. R. Juneja, T. Kazuoka, N. Goto, T. Yamane, S. Shimizu, *Biochim. Biophys. Acta*, 960, 334 (1988)
- 5) L.R. Juneja, T. Kazuoka, N. Goto, T. Yamane, S. Shimizu, *Biochim. Biophys. Acta*, 1003, 277 (1989)
- 6) Y.T. Michael, J.G. Marshall, *Clin. Chem.*, 25, 682 (1979)
- 7) P. C. Painter, *Clin. Chem.*, 26, 1147 (1980)
- 8) 日本生化学会編, “生化学実験講座 3”, 東京化学同人 (1975) p. 277
- 9) A. Nagao, N. Ishida, J. Terao, *Lipids*, 26, 390 (1991)
- 10) P. Comfurius, R. F. A. Zwaal, *Biochim. Biophys. Acta*, 488, 36 (1979)
- 11) 山根恒夫, 油化学, 40, 965 (1991)