報 文

ホスホリパーゼ D によるホスファチジルコリンへの
各種アミノアルコールの導入条件の最適化

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)

Optimization of the Reaction Conditions for the Introduction of
Various Aminoalcohols into Phosphatidylcholine with Phospholipase D

Masazumi KAMATA, Setsuko HARA, and Yoichiro TOTANI

Faculty of Engineering, Seikei University

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

Optimum conditions were determined for the preparation of phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidyl-*N*-methylethanolamine (PMME), and phosphatidyl-*N,N*-dimethylethanolamine (PDME) from phosphatidylcholine (PC) concentrated soy phospholipid (PC-90) by transphosphatidylation catalyzed by phospholipase D: PC-90 contaminated with PE (10 %); 100 mg, aminoalcohol; 3 M, phospholipase D; 1.5 IU, calcium ion; 1 M, diethyl ether; 5 mL, water content; 1~2 mL, pH; 4.8~5.2, and reaction time; 30 min. Under these conditions, conversion from PC-90 to PE, PMME, and PDME was 95, 83, and 74 %, respectively. Differences in these values are considered due to the specificity of phospholipase D for each aminoalcohol.

1 緒 論

ホスホリパーゼ D (EC 3.1.4.4) はグリセロリン脂質であるホスファチジルコリン (PC) を加水分解してホスファチジン酸 (PA) とコリンを生成する。さらに、反応系にアルコールが存在するとホスホリパーゼ D はコリン残基とアルコールの交換反応を触媒し、各種塩基を有するリン脂質を生成するものと考えられる。自然界から得られる代表的な弱酸性リン脂質の 1 つであり、膜結合性酵素の活性化作用¹⁾や魚油に対する酸化防止相乗剤など様々な機能²⁾を示すホスファチジルエタノールアミン (PE) はホスホリパーゼ D の作用により PC と 2-アミノエタノール (エタノールアミン) から調製されることも報告されている^{3)~5)}。山根らはキャベツ起源や数種の *Streptomyces* 起源のホスホリパーゼ D を用いて PE の調製を行い、反応系に必要なエタノールアミン量の比較を行っている⁵⁾。このようにエタノールアミンをアルコールとした PE 調製は行われているが、ホスホリパーゼ D の作用により 2-(*N*-メチルアミノ)エタノール (*N*-モノメチルエタノールアミン)、2-(*N,N*-ジメチルアミノ)エタノール (*N,N*-ジメチルエタノールアミ

ン) をリン脂質に導入したホスファチジル-*N*-モノメチルエタノールアミン (PMME)、ホスファチジル-*N,N*-ジメチルエタノールアミン (PDME) の調製に関する報告はない。また、PE から PC への生合成の中間体として PMME と PDME は生体内に存在する⁶⁾が、その生理的役割や機能は明らかにされていない。

筆者らは先に PC 濃縮大豆リン脂質からホスファチジルグリセリン (PG) を定量的に調製するための最適条件の決定を行い、PG 調製においてキャベツ起源のホスホリパーゼ D の加水分解作用とホスファチジル基交換作用を活性化する pH が各々異なることを明らかにした⁷⁾。本研究では、キャベツ起源のホスホリパーゼ D によるエタノールアミン、*N*-モノメチルエタノールアミン、*N,N*-ジメチルエタノールアミンの 3 種のアミノアルコールをリン脂質に導入し、PE, PMME, PDME を調製するための最適条件の検討を目的とした。

2 実 験

2.1 試料と試薬

反応基質であるリン脂質は日清製油 (株) から提供されたホスファチジルコリン濃縮大豆リン脂質 (PC-90) を用いた。なお PC-90 は TLC 分析により、約 90 %

連絡者: 鎌田正純

の PC と約 10 % の PE から構成されていることを確認した。

また、実験に使用したホスホリパーゼ D は前報⁷⁾と同様にキャベツから調製した。本実験においてはキャベツ 400 g から粗酵素粉末約 1 g が得られ、酵素活性は最適加水分解条件⁷⁾のもとで、約 17 IU/g の活性を示すことを確認した。

3 種のアミノアルコール (エタノールアミン, *N*-モノメチルエタノールアミン, *N,N*-ジメチルエタノールアミン) はすべて市販の特級試薬を用いたが、これらはいずれも強塩基性であるので反応に先立ちあらかじめ塩酸で中和し、所定濃度のアミノアルコール塩酸塩を調製した。

2・2 ホスホリパーゼ D を用いた各種リン脂質の調製

各種リン脂質の調製は下記のようにエーテル層と水層からなる 2 相系反応で行った。すなわち、基質となる PC-90 (100 mg, 1.26×10^{-4} mol) に所定量のジエチルエーテル、水分として緩衝液と塩化カルシウム水溶液、各種アミノアルコール塩酸塩溶液および粗酵素粉末を加え、37℃で回転振とう (250 rpm) した。ホスファチジル基交換反応はホルミ溶媒 (クロロホルム : メタノール = 2 : 1) を加えて停止した後、3000 rpm, 20 min の遠心分離によりクロロホルム層にリン脂質を回収した。なお、最適反応条件はまず、Fig.-1~3 に記載した条件下に最適 pH を決定し、続いてこの条件下で塩化カルシウム水溶液濃度、ジエチルエーテル量、アミノアルコール濃度、水分量、酵素量、反応時間の順に決定

●PE ▲PA ◆PC

PC-90 100mg
Diethylether 5mL
Buffer : 1M CaCl_2 (=4:1) 5mL
1M Ethanolamine hydrochloric acid 1mL
Phospholipase D 11U
Reaction time 2h

Fig.-1 Effect of pH on PE preparation using PC-90 and ethanolamine.

した。

2・3 TLC 分析

反応混合物のリン脂質の組成は二次元 TLC 法により分析した。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、1 次展開溶媒としてクロロホルム : メタノール : 28 % アンモニア水 = 65 : 35 : 8 を、2 次展開溶媒として

●PMME ▲PA ◆PC

PC-90 100mg
Diethylether 5mL
Buffer : 1M CaCl_2 (=4:1) 5mL
1M *N*-methylethanolamine hydrochloric acid 1mL
Phospholipase D 11U
Reaction time 2h

Fig.-2 Effect of pH on PMME preparation using PC-90 and *N*-methylethanolamine.

●PDME ▲PA ◆PC ▼PE

PC-90 100mg
Diethylether 5mL
Buffer : 1M CaCl_2 (=4:1) 5mL
1M *N,N*-dimethylethanolamine hydrochloric acid 1mL
Phospholipase D 11U
Reaction time 2h

Fig.-3 Effect of pH on PDME preparation using PC-90 and *N,N*-dimethylethanolamine.

クロロホルム：メタノール：酢酸：水=50：25：8：4を用いて展開した後、硫酸銅リン酸試薬で発色させた。また、各スポットは Dittmer 試薬を噴霧して、リン脂質に基づく青色の発色により確認した。各リン脂質クラスはクロマトスキャナ〔(株)島津製作所製 CS 9000 型〕を用いて、600 nm における分光反射吸収法により光学密度を測定し、二次元分光画像解析プログラムにより定量した。なお、本分析条件では、PC-90 に 10 % 程度含まれている PE と生成した PMME の分離が困難であったため、PMME 量は原料中に含まれる PE との合計量で示した。

3 結果と考察

3.1 各種リン脂質の調製における pH の影響

反応系に各アミノアルコール塩酸塩を加え PE, PMME, PDME を調製する際の最適 pH について、pH 3.6~6.5 の酢酸緩衝液と pH 7.0~8.0 Tris-HCl 緩衝液を用いて検討した。回収した反応混合物中のリン脂質の組成変化を Fig.-1~3 に示した。いずれのアミノアルコール塩酸塩を加えた場合も PE, PMME, PDME は pH 4.8~5.2 の時に多く生成し、PE は 73.7 %, PMME は 64.3 %, PDME は 43.6 % の収率で得られた。すなわち、PC から PE, PMME, PDME への変換は対応するアルコールのアミノ水素がメチル基に置換されるに伴い減少した。この実験結果よりエタノールアミン、*N*-モノメチルエタノールアミン、*N,N*-ジメチルエタノールアミンの塩酸塩を導入したリン脂質調製における最適 pH は 4.8~5.2 であることが明らかとなった。また、PDME 調製時の結果から判断して、PMME 調製時にも pH 5 以降では原料の PC-90 に含まれている PE はほとんど消失していると考えられた。一方、競争的な加水分解はアミノアルコール塩酸塩存在下に PE, PMME, PDME を調製する際の最適 pH 領域よりもアルカリ側の pH で優先的に進行した。しかし、アミノアルコールの種類により PA が生成する pH 領域は異なった。一般にキャベツ起源のホスホリパーゼ D を用いて各種リン脂質を調製する場合、PC の加水分解における最適 pH である 5.6 の酢酸緩衝液が利用されている⁸⁾。筆者らは先に PG 調製における緩衝液の pH について検討した結果、4.4~4.8 に調整することにより加水分解を抑制しつつ PG 調製を行うことのできる反応条件を見いだした⁷⁾が、PE, PMME, PDME 調製の最適 pH も PG 調製時と同様に PC 加水分解の最適 pH と異なった。また、PG 調製時の最適 pH ともわずかに異なり、アルコールの種類によって最適 pH 領域が存在すると考えられた。これらの実験結果から、キャベツ起源のホスホリパーゼ D のホスファチジル基交換活性を優位に発現する領域は加水分解最適 pH の 5.6 よりも、酸性

側の pH 4.8~5.2 の領域であることが判明した。従って以後の実験においては pH 4.8~5.2 の酢酸緩衝液を用いた。

3.2 最適試薬量の検討

まず、リン脂質 100 mg を基質とした pH 4.8~5.2 の反応系に加える塩化カルシウム水溶液の濃度を 0~3 M まで変化させた場合の各生成物の生成率の変化を Fig.-4 に示した。Fig.-4 から明らかなように塩化カルシウムが反応系に存在しない場合も PE, PMME, PDME は生成したが、カルシウム濃度の上昇に伴い PE と PMME の生成は急激に増加し、1 M の時に最大となった。しかし、PDME の生成は 0~1 M の間で幾分増加したにすぎなかった。また、いずれの反応系においても 1 M 以上のカルシウム濃度では基質が残存し PE, PMME, PDME の生成は抑制され、同時に PA の生成率も減少した。

次に塩化カルシウム濃度を 1 M としてジエチルエーテル量を 2.5~30 mL まで変化させた結果を Fig.-5 に示した。ジエチルエーテル量が 2.5 mL の場合は酵素活性が充分に発現されなかったが、5 mL に増加した場合に PE, PMME, PDME とともに最高生成率を示し、アミノアルコールの種類による違いはわずかであった。さらにジエチルエーテル量を増加すると加水分解反応による PA の生成がいずれの反応系においても顕著に観察された。従って以後の実験においてはジエチルエーテル量は 5 mL とした。

さらに、アミノアルコール塩酸塩溶液の濃度を 0.3~6 M まで変化させ、その結果を Fig.-6 に示した。アミノアルコール量の増加に伴い、PA の生成が抑制され PE, PMME, PDME の生成率が上昇した。各アルコー

Fig.-4 Effect of calcium ion concentration on PE, PMME, and PDME preparations using PC-90 and corresponding aminoalcohol.

Fig.-5 Effect of diethylether level on PE, PMME, and PDME preparations using PC-90 and corresponding aminoalcohol.

Fig.-7 Effect of water content on PE, PMME, and PDME preparations using PC-90 and corresponding aminoalcohol.

Fig.-6 Effect of aminoalcohol concentration on PE, PMME, and PDME preparations using PC-90.

Fig.-8 Effect of enzyme level on PE, PMME, and PDME preparations using PC-90 and corresponding aminoalcohol.

ル溶液濃度を 3 M まで増加させると、PE、PMME、PDME はそれぞれ 90.2 %、73.1 %、54.6 % の収率で得られた。

続いて、アルコール濃度を 3 M として水分量を 8 mL から徐々に減少した結果、Fig.-7 に示したように PE は 2 mL のとき 94.1 %、PMME と PDME は 1 mL のときにそれぞれ 76.1 % と 60.0 % の生成率を示した。

また、水分量を最適量として酵素量を 25~100 mg (0.5~2 IU) まで変化させて反応を行い、その結果を Fig.-8 に示した。Fig.-8 に示したように PE、PMME、PDME を調製するいずれの反応系でも、基質 100 mg

に対して 75 mg (1.5 IU) のホスホリパーゼ D を加えた場合に最高収率を得た。

3.3 最適反応時間の決定

3.1 と 3.2 で決定した条件下に PE、PMME、PDME を調製する場合の最適反応時間を検討し、その結果を Fig.-9 に示した。PE 調製の場合、反応開始と同時に生成率は急激に上昇し 15 min で 88.9 % に達し、30 min で最高の 95.3 % となった。PMME 調製の場合、反応時間 30 min で生成率は 81.0 % に達した。PDME 調製の場合、反応時間 30 min で 74.4 % となり、その後時間の経過とともに生成率は減少し、PA 量が増加した。すなわち、PE、PMME、PDME の最高生成率は反応時間 30 min の時に得られ、アミノ水素がメチル基に

Fig.-9 Time-course of PE, PMME, and PDME preparations using PC-90 and corresponding aminoalcohol.

Table-1 Optimum conditions for PE, PMME, and PDME preparations.

Condition	PE	PMME	PDME
PC-90 (mg)	100	100	100
Aminoalcohol (M)	3	3	3
Enzyme (IU)	1.5	1.5	1.5
Calcium ion (M)	1	1	1
Diethyl ether (mL)	5	5	5
Water content (mL)	2	1	1
pH	4.8~5.2	4.8~5.2	4.8~5.2
Reaction time (min)	30	30	30
Conversion ratio (%)	95.3	82.8	74.4

置換されたアルコールほど生成率が低いことが判明した。

本実験の結果から決定した PE, PMME, PDME を調製する最適条件は Table-1 に示したように、類似構造のアルコールを用いた場合はほぼ同一条件でリン脂質に導入できるものと考えられた。

従来、キャベツ起源のホスホリパーゼ D を用いた PE 調製では 2 h 程度の反応時間が必要とされてきた^{3),5)} が、本実験結果は短時間で効率的に PE が調製できることを明らかにした。また、PMME, PDME 調製も同様に 30 min という短時間で可能であることが判明した。これは反応系の pH をホスファチジル基交換活性に適した pH に制御したと同時に反応系の最適化を行うことにより酵素の活性を効果的に発現させたためと考えられる。

一方、Fig.-9 に示したように、いずれの反応系においても PA は反応の初期からわずかに生成し、時間の経過とともに増加したが、その生成率は PE, PMME,

PDME の生成率とは逆比例していた。なお、PA は主原料の PC から直接生成したか、PE, PMME, PDME を経由して生成したかは明らかではない。しかし、PE, PMME, PDME 調製のいずれの反応においても、反応時間 30 min で原料の PC-90 はほとんど消費されてしまうので、30 min 以降の PA の増加は生成した PE, PMME, PDME が加水分解されたものと考えられた。また、本実験結果から、PA 生成量が最も多い PDME 調製系では PDME がホスホリパーゼ D の作用を受けやすい基質であることを示している。一般にホスホリパーゼ D による加水分解は PE よりも PC が優先的に受けることが知られている⁹⁾。PDME は PC に類似した構造であるために加水分解されやすく、N-メチル基が減少するにつれて加水分解され難くなると考えられた。

さらに、キャベツ起源のホスホリパーゼ D は分子量が小さく、直鎖型のアルコールを比較的導入しやすいことが報告されている¹⁰⁾。本実験結果も N-メチル基の増加、すなわち分子量の増加に伴い、PE>PMME>PDME とその生成率は減少した。しかし、本実験に用いたアミノアルコールの場合、アルコールの分子量や立体的かさ高さよりも生成した PE, PMME, PDME の加水分解性の違いにより、基質特異性を生じるものと考えられた。

4 総 括

本実験では、エタノールアミン、N-モノメチルエタノールアミン、N,N-ジメチルエタノールアミンをホスホリパーゼ D のホスファチジル基交換作用により PC-90 に導入するための条件検討を行った。その結果、PE, PMME, PDME を調製する際の最適 pH は、4.8~5.2 であり、さらに反応系のカルシウム濃度、ジェチルエーテル量、アルコール濃度、水分量、酵素量の最適化を行った結果、30 min の反応で PE : 95.3 %, PMME : 82.8 %, PDME : 74.4 % の高収率で調製できることが判明した。反応に用いるアミノアルコールの N-メチル基の増加に伴い、対応するリン脂質の生成率が低下し、これはホスホリパーゼ D のアミノアルコールに対する特異性によるものと考えられた。

[平成 6 年 (1994 年) 1 月 27 日受理]

文 献

- 1) 日本生化学会編, “新生化学実験講座 4”, 東京化学同人 (1991) p. 117
- 2) 原 節子, 岡田規男, 日比野英彦, 戸谷洋一郎, 油化学, 40, 845 (1991)
- 3) P. Comfurius, R. F. A. Zwaal, *Biochim. Biophys. Acta*, 488, 36 (1977)

- 4) S. F. Yang, Sofia Freer, A. A. Benson, *J. Biol. Chem.*, 242, 477 (1967)
 - 5) L. R. Juneja, T. Kazuoka, N. Goto, T. Yamane, S. Shimizu, *Biochim. Biophys. Acta*, 960, 334 (1988)
 - 6) 日本生化学会編, “新生化学実験講座 4”, 東京化学同人 (1991) p. 341
 - 7) 鎌田正純, 原 節子, 戸谷洋一郎, 油化学, 42, 297 (1993)
 - 8) 日本生化学会編, “生化学実験講座 3”, 東京化学同人 (1974) p. 294
 - 9) F. M. Davidson, C. Long, *Biochem. J.*, 69, 458 (1958)
 - 10) 日本生化学会編, “続生化学実験講座 3”, 東京化学同人 (1986) p. 235
-

《新刊図書案内》

書 名 : Proceedings of the Third World Conference on Detergents:
A Global Perspective

編 集 : Arno Cahn

発行所 : AOCS Press, PO Box 3489, Champaign, IL 61826-3489, USA
(FAX: 217-351-8091)

発行年 : 1994年

書 式 : Hardbound, 228 pages

I S B N : 0-935315-52-7

価 格 : \$ 120(送料別), \$ 96(AOCS 会員)