

植物に見出されたグリコシルイノシトールホスホセラミド特異的ホスホリパーゼ D に関する研究

徳島大学 大学院医歯薬学研究部 衛生薬学分野

准教授 田中 保

## 目的

グリコシルイノシトールホスホセラミド (GIPC) は植物における主要スフィンゴリン脂質である。我々はキャベツ脂質に含まれる生理活性脂質を解析する過程で未知リン脂質を見出し、これをフィト型セラミド 1-リン酸 (PC1P) と決定した [1]。その後、PC1P は GIPC の加水分解によって生じることがわかった。その加水分解位置からこの酵素はホスホリパーゼ D に分類される。また、キャベツから部分精製したこの酵素活性はグリセロ型リン脂質やスフィンゴミエリンには全く作用せず、専ら GIPC のみを加水分解する [1]。我々はこの新規な酵素を GIPC-PLD と名付け、その性質や分布を調べた。その結果、この酵素活性が植物に普遍的で、成長点や根など細胞分裂可能な組織にのみ検出されることを見出した [2]。本酵素は未だにクローニングできていない。このため、この酵素の生理的な役割ははっきりわかっていない。また、基質特異性や至適 pH など基本的な性質は明らかにしたが [2]、リン脂質合成に有用なホスファチジル基転移反応を行うかどうかなどの点も未解明である。本研究では新規酵素 GIPC-PLD の酵素的性質についてこの転移反応性を中心として解析を行なった。

## 方法

- 酵素および基質の調製：市販のダイコン (*Raphanus sativus*) のホモジネートから数段階の遠心分離により得た沈渣 (膜画分) を酵素源とした。イソプロパノール / ヘキサン / 水 (110:40:50, v/v) の上清を抽出溶媒とし、この溶媒でキャベツをホモジナイズした後、上清を得た。この抽出液をシリカゲルカラムクロマトグラフィに供し、夾雑物を除去した。クロロホルム / メタノール / 7% アンモニア水 (45:35:10, v/v) を展開溶媒に用いる TLC を行い、GIPC を精製した。
- 酵素反応：GIPC 約 50 nmol に 0.5ml の Tris / HCl 緩衝液 (pH7.4)、2mg のデオキシコール酸ナトリウム、0.1ml のダイコン由来酵素溶液を加え、インキュベーションを行った。この混合液に終濃度 1%~20% となるようにアルコールを添加することで GIPC-PLD 反応を行なった。反応終了後、適量のクロロホルム、メタノールを加え、脂質の抽出を行った。得られた脂質抽出物より TLC を用いてトランスホスファチジレーション物を単離した。
- 生成物の構造解析：酵素反応によって生じたリン脂質はクロロホルム / メタノール / 28% アンモニア水 (60:35:8, v/v/v) を展開溶媒に用いる TLC によって単離した後、MALDI-TOF MS (Voyager DE STR mass spectrometer) を用いてその分子量を確認した。検出は陰イオンモードとし、マトリックスには 2,4,6-trihydroxy-acetophenon) を用いた。

## 結果と考察

### GIPC-PLD のホスファチジル基転移反応

メタノールの存在下あるいは非存在下、GIPC にダイコン由来 GIPC-PLD 画分を作用させた。その結果、メタノール濃度の上昇に伴い、PC1P 生成量が減少し、代わって TLC 上、新たなスポットが現れた。このスポットを単離して MALDI-TOF MS にて解析した結果、PC1P のメチルエステル体に相当する分子量を示すピークが観察された (図 1)。基質に用いた GIPC のセラミド部の構造はそれぞれ C22:0 ( $\alpha$ -OH)、C24:0 ( $\alpha$ -OH) および C24:1 ( $\alpha$ -OH) を *N*-アシル鎖に有するファイト型スフィンゲニン (t18:1) であることが判明している。検出したピークはこのセラミド構造を有するホスファチジル基のメタノールへの転移産物と帰属可能であった。このことから、GIPC-PLD はアルコールの存在下でホスファチジル基転移反応を触媒する酵素であることが示された (図 2)。

### ホスファチジル基転移反応の基質特異性

メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、*n*-ブタノールの存在下、GIPC-PLD 反応を行った。得られた生成物を TLC にて解析した結果、それぞれのアルコールへのホスファチジル基転移産物と思われるスポットが観察された (図 3)。MALDI TOF-MS による解析はこれらの物質がそれぞれの転移産物であることを示した (data not shown)。用いたアルコールの鎖長が長くなるに従って生成物の量は低下し、*n*-ブタノールではメタノールの約半分となり、*n*-ペンタノールではホスファチジル基転移産物は生成しなかった。また、2-メチル-1-プロパノールで転移産物が検出できるのに対し、2-メチル-2-プロパノール、2-ブタノール、2-プロパノールで検出できないことから、この反応は一級アルコールにしか作用できないと考えられた。

### 謝辞

本研究は杉山産業化学研究所からの助成金を用いて遂行されました。心よりお礼申し上げます。

### 参考文献

- 1) Tamotsu Tanaka, *et al.*, *FEBS J.*, 280, (2013) 3797-3809.
- 2) Takashi Kida, *et al.*, *J. Biochem.*, 161, (2017) 187-195.

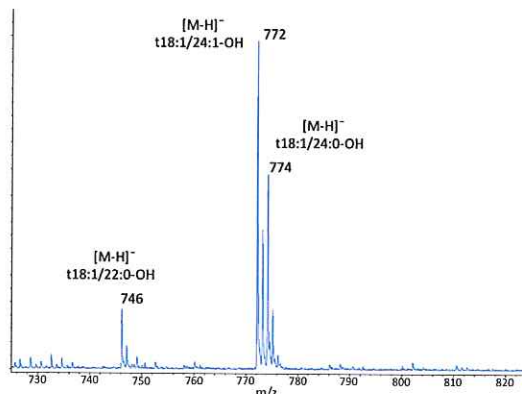


図1 メタノールの存在下で生じるGIPC-PLD反応産物のMALDI TOF-MS

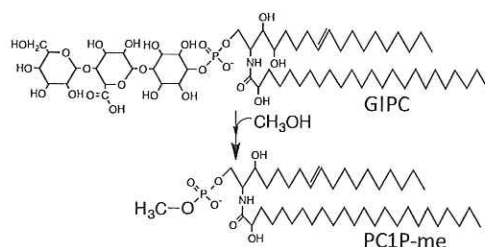


図2 メタノールの存在下、GIPC-PLD反応を行うことで生じるPC1P-メタノール

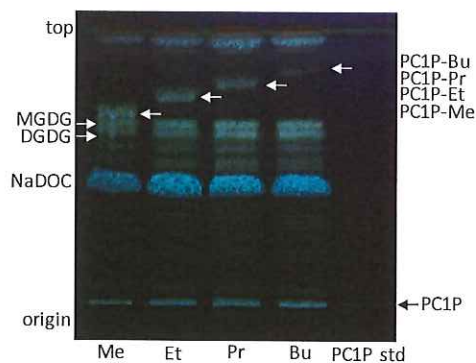


図3 種々のアルコールの存在下で生じるGIPC-PLD 反応産物のTLC

Me, メタノール; Et, エタノール; Pr, プロパノール; Bu, ブタノール; NaDOC, ナドキシコール酸Na; MGDG, モノガラクトシルジグリセリド; DGDG, ジガラクトシルジグリセリド