

活性発見後半世紀以上遺伝子不明の哺乳類ホスホリパーゼ C 酵素群の同定と機能解析

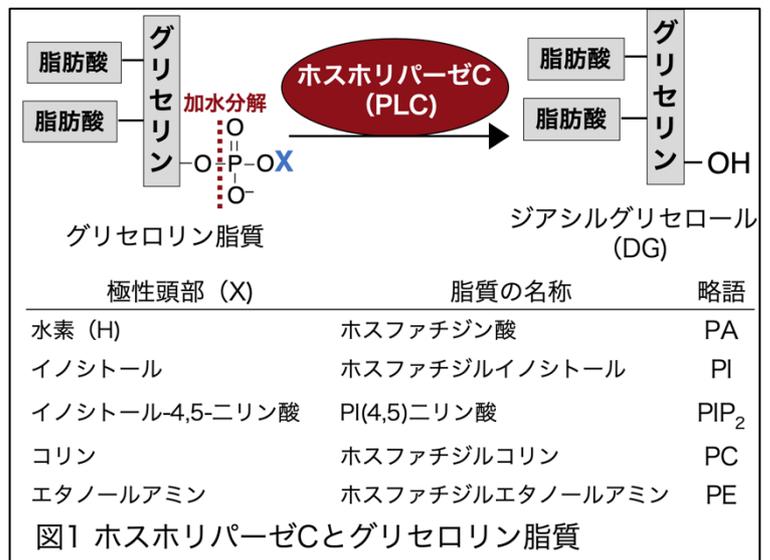
千葉大学 国際高等研究基幹 村上 千明

【略歴】

2016年3月 千葉大学 理学部 化学科 卒業
2018年3月 千葉大学大学院 理学研究科 基盤理学専攻 修士課程修了
2018年4月 日本学術振興会 特別研究員 DC1
2021年3月 千葉大学大学院 融合理工学府 先進理化学専攻 博士課程修了・博士（理学）
2021年4月 日本学術振興会 特別研究員 PD
2022年5月 千葉大学 国際高等研究基幹（兼任：大学院理学研究院化学研究部門）特任助教
2024年 McMaster University, Department of Chemistry and Chemical Biology, Visiting Professor (Hamilton, Canada), 兼任：日本学術振興会 国際共同研究加速基金 研究者

はじめに

天野エンザイム（旧称：天野製薬）のロングセラーの消化酵素剤(胃腸薬)「ビオヂアス」は、脂肪分解酵素のリパーゼが多分に含まれている。リパーゼの1種にホスホリパーゼC (PLC)がある(図1)。PLCはグリセロリン脂質を加水分解し、生理活性脂質のジアシルグリセロール (DG)を産生する。哺乳類 PLCはホスファチジルイノシトール (PI) (4,5)ニリン酸 (PIP₂) 特異的 PLC (PIP₂-PLC) の1種のみ同定されている。PIP₂-PLCはPI代謝回転の一部として多価不飽和脂肪酸 (PUFA) のアラキドン酸含有 DGを選択的に産生し、protein kinase Cの活性化をはじめとする



種々のシグナル伝達に関与する。一方、飽和脂肪酸 (SFA) 含有 DGは、生体膜主要成分のホスファチジルコリン (PC) やホスファチジルエタノールアミン (PE) の加水分解によって生じるが、その責任酵素である PC-PLC および PE-PLC は哺乳類にて活性発見後半世紀以上分子実体 (遺伝子) が不明であった。

なぜ哺乳類 PC-PLC, PE-PLC は半世紀以上もクローニングできなかったのか？

PC-PLC は生体膜、特に脂質ラフト (界面活性剤不溶性膜画分) に活性が強く検出されることから¹、生体試料からの脂質ラフトの抽出・精製が難しく、精製途中で PC-PLC が失活するリスクが高い。従って、古典的な生化学的手法 (いわゆる「モノとり」) による分子実体の同定は困難であったと考えられる。また、ホモロジーサーチによる PC-PLC, PE-PLC の報告例がないことから、当該酵素は従来の哺乳類 PLC (PIP₂-PLC) と配列類似性が低いと考えられる。すなわち、既知のリパーゼを指標とした探索では PC-PLC の同定は困難であったと考えられる。以上より、哺乳類 PC-PLC は典型的な酵素探索法では発見できず、「新たな指標」が求められていた。

ジアシルグリセロールキナーゼδアイソザイム (DGKδ) は未知の PC-PLC と相互作用する

我々はこれまで、主に哺乳類 DGK に注目した研究を展開してきた。現在までに 10 種の哺乳類 DGK アイソザイムが報告され、全ての DGK が PI 代謝回転の一部としてのみ機能する (PUFA 含有 DG のみリン酸化する) と、漠然と考えられていた。最近、DGK δ が細胞内で SFA-DG を選択的にリン酸化することを発見した。さらに、DGK δ の免疫沈降物中に PC-PLC 活性が検出された。すなわち、DGK δ は PC-PLC と相互作用し、PC-PLC 由来の SFA-DG を基質とする可能性がある²。そこで、「DGK δ との相互作用」という今ま

でない独自の指標によってPC-PLCを同定することを着想した。

スフィンゴミエリン合成酵素 (SMS) 関連タンパク質 (SMSr) は新タイプの哺乳類 PLC である

我々は DGK δ 中のタンパク質間相互作用モジュールの sterile α motif domain (SAMD) に注目し, SAMD が保存されたタンパク質中から PC-PLC 候補を探索した。その候補として SMSr を見出した。SMSr は細胞内で SAMD を介して DGK δ と直接相互作用し (図 2A), 細胞内で SFA-DG を産生することを発見した (図 2B) ³。しかし, 6 回膜貫通タンパク質の SMSr は, 精製困難で, 酵素学的性質に関して不明点が多かった。そこで, SMSr を高純度に精製し, *in vitro* で酵素学的性質を調べた。その結果, 本酵素は *in vitro* で SFA 含有 PC をはじめとするグリセリン脂質を選択的に水解し SFA-DG を産生する Multi-glycerophospholipid PLC hydrolase (MG-PLC) 活性を示すことを発見した (図 2D) ⁴。すなわち, SFA-DG を選択的に産生する PC-PLC の分子実体の一つを同定した。

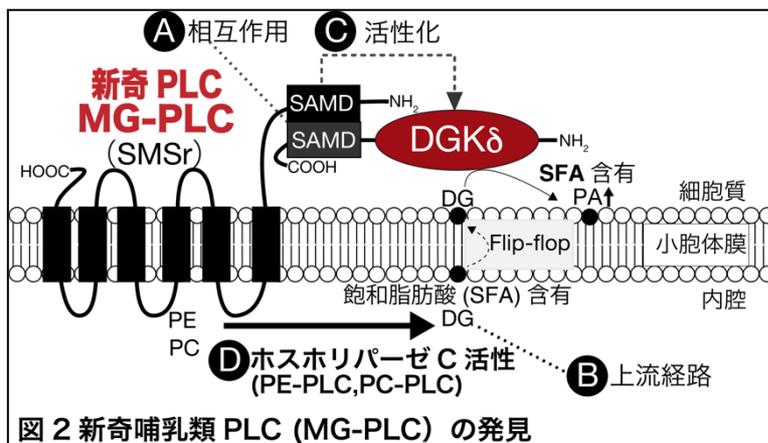


図 2 新奇哺乳類 PLC (MG-PLC) の発見

今後の展望 一新奇 PLC 酵素群と DGK の織り成す「脂質新大陸」は存在するのか？

上述の成果は, 半世紀も停滞した哺乳類 PLC 研究の突破口となった。現在, SMSr のアミノ酸配列を指標に, さらに他の哺乳類 PC-PLC の同定に挑んでいる。最近, SMSr と最も配列類似性の高い 2 種の SMS (SMS1, SMS2) も PC-PLC 活性を有し, SFA-PC に対して選択性を示すことを発見した ⁵。また, 全ての SMS isoform は脂質リン酸ホスファターゼの触媒部位が保存されていることに注目し, 哺乳類ホスファターゼ中から新奇 PLC (orphan phosphatase の PHOSPHO1 と PHOSPHO2) を見出した。さらに, 新奇 PLC 酵素群の一部が SFA-DG を選択的にリン酸化する DGK δ や DGK ζ アイソザイムと相互作用することを発見した ⁶。すなわち, 半世紀以上不明だった哺乳類 PC-PLC/PE-PLC を複数種, 一挙に発見し, PI 代謝回転 (PUFA-DG 代謝) と独立した, 新奇 PLC 酵素群が形成する「脂質新大陸 (SFA-DG 代謝)」が存在する可能性が浮上した (図 3)。今後は脂質新大陸が存在するのか否か, その可能性を検証していきたい。

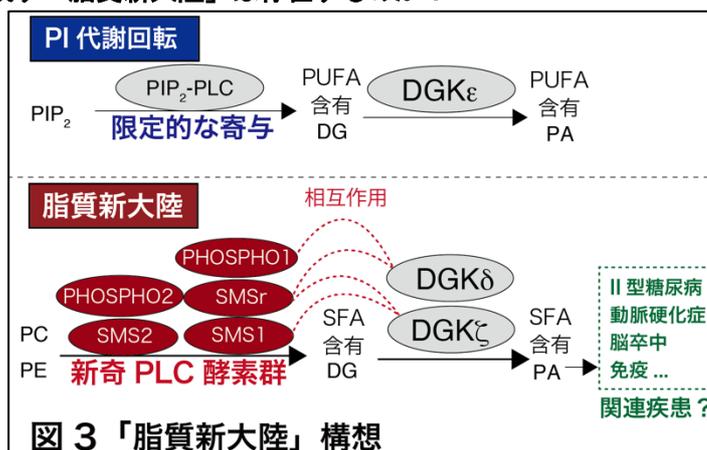


図 3 「脂質新大陸」構想

謝辞

本研究は坂根郁夫博士 (千葉大学名誉教授, 特別研究員 DC1 受入研究者), 堺弘道博士 (島根大学助教, 特別研究員 PD 受入研究者) の指導の下に実施しました。指導を賜りました先生方, 角田 (熱田) 京子氏, Kamila Dilimulati 博士をはじめとする共同研究者の皆様に心より感謝いたします。

本研究の遂行において, 私の健康 (胃腸) を常に支えてきた「ビオダス」にも深謝いたします。

引用文献

1. Murakami, C. *et al. Anal. Biochem.* **526**, 43–49 (2017)
2. Sakai, H. *et al. J. Biol. Chem.* **289**, 26607–17 (2014)
3. Murakami, C. *et al. J. Biol. Chem.* **295**, 2932–2947 (2020)
4. Murakami, C. *et al. J. Biol. Chem.* **296**, 100454 (2021)
5. Suzuki, R. # Murakami, C. #* *et al. FEBS Letters* **597**, 2672 (2023) (#: 筆頭著者 *: 責任著者)
6. Furuta, M. #, Murakami, C. #* *et al. FEBS Open Bio* **13**, 1333 (2023) (#: 筆頭著者 *: 責任著者)