

## 論文審査の結果の要旨および担当者

|      |   |   |   |
|------|---|---|---|
| 報告番号 | ※ | 第 | 号 |
|------|---|---|---|

氏 名 DAMNJANOVIĆ Jasmina

### 論文題目

Studies on thermostability and structure-function relationship in phosphatidylinositol-synthesizing *Streptomyces antibioticus* phospholipase D (*Streptomyces antibioticus* 由来ホスファチジルイノシトール合成型ホスホリパーゼ D の熱安定性と構造機能相関に関する研究)

### 論文審査担当者

|     |          |      |
|-----|----------|------|
| 主 査 | 名古屋大学准教授 | 岩崎雄吾 |
| 委 員 | 名古屋大学教授  | 中野秀雄 |
| 委 員 | 名古屋大学教授  | 吉村 徹 |
| 委 員 | 名古屋大学教授  | 黒田俊一 |
| 委 員 | 名古屋大学助教  | 兒島孝明 |

## 論文審査の結果の要旨

## 別紙 1-2

ホスファチジルイノシトール(PI)は脂質代謝改善機能等が知られており、機能性脂質として、食品・薬品分野で注目されている。従来、工業的な PI の製造法は、天然物からの抽出に限られていたが、放線菌由来のホスホリパーゼ D(PLD)を蛋白工学的に改変する事で、PI 合成活性を有する改変型 PLD が開発され、PI を安価なレシチンとイノシトールから酵素合成することが可能となった。しかし、開発された PI 合成型 PLD による合成では、その PI 収率が低いことが問題であった。イノシトールの水への溶解度は温度に大きく依存するため、高温下で反応を行うことでイノシトール濃度を高めれば、PI 収率の向上が期待される。そのためには酵素の耐熱性を高める必要があった。

そこでダムニャノビッチ ヤスミナは蛋白工学による PI 合成型 PLD の耐熱性向上を試みた。以下に論文審査の結果の要旨を示す。

### 1. リン脂質の高感度分析法の確立

本酵素の蛋白工学的改変に先立ち、リン脂質を正確に分離定量するための HPLC 分析条件を確立した。順相シリカゲルカラムを用い、検出器に荷電化粒子検出器(CAD)を用いる事で、高感度な分析法を確立した。類似の分析法は既報にも見られるものの、今回確立した分析法は、ダイナミックレンジや定量限界、検出限界において勝っていた。

### 2. 部位特異的コンビナトリアル変異導入による耐熱化

次に、蛋白工学による耐熱性向上を試みた。本酵素の結晶構造データからアミノ酸残基ごとの B-ファクターを算出し、値が高い領域を 7カ所選択した。B-ファクターの高い部分は構造的揺らぎが大きいことを意味し、不安定である事が予想される。選択した各領域にそれぞれランダム変異を導入したライブラリーを作製し、得られた変異酵素ライブラリーから耐熱性を指標としてスクリーニングを行った。その結果、耐熱性の向上した 3つの変異酵素、D40H、T291Y および R329G を獲得した。これらの変異酵素ならびに 3つの変異を重ねた二重、三重変異酵素を作製し、その酵素化学的な解析を行った。その結果、二重変異酵素 D40H/T291Y が安定性において最も優れていた。また、D40H/T291Y 変異酵素を用いた高温下での PI 合成では収率を改善することができた。

### 3. D40 ループ欠損による耐熱化

D40 は酵素分子表面のループ (D40 ループ) 上にあり、そのループは二本の  $\beta$  ストランドを分断している。また、D40 ループによる分断のため、 $\beta$  ストランドは捻れ、歪んだ構造をしている。この捻れのため、通常  $\beta$  ストランドでは隣り合うアミノ酸残

基の側鎖はストランドに対して互いに逆向きに配置されるのに対し、本酵素の W46 と L47 は同一方向に配向している。D40 ループを構成する 9 アミノ酸を酵素分子から欠損させ、分断された二本の  $\beta$  ストランドを一本に連結し、捻れを解消すれば本酵素の安定性をさらに向上できるのではないかと考えた。そこで D40 ループ欠損型変異酵素として  $\Delta$ D37-G45 と  $\Delta$ A38-W46 の二つを作製した。 $\Delta$ D37-G45 では W46 側鎖は元と逆向きに配向する事が予想され、 $\Delta$ A38-W46 では W46 は消失する。両変異酵素とも組換え大腸菌で可溶性蛋白として菌体外に発現し、PI 合成活性を維持していた。このことから D40 ループは組換え大腸菌での発現時のフォールディングや触媒活性には不要であることが示された。また、精製酵素を用いた酵素科学的解析から、二つの欠損型変異酵素は耐熱性が向上しており、特に  $\Delta$ D38-W46 変異体は 70° C での活性半減期が親酵素のそれと比較して 10 倍以上に延長された。分子ダイナミクス(MD)シミュレーションによっても  $\Delta$ D38-W46 変異体の耐熱性を裏付ける結果が得られた。さらに、60° C での PI 合成においても PI 収率は親酵素と比較して向上し、一方で副産物であるホスファチジン酸の生成は抑制されるという、応用的に望ましい結果が得られた。

#### 4. T291 ループ欠損による耐熱化

T291 を含む長いループ (T291 ループ, G273-T313) についても同様に欠損変異体を作製し、その機能評価を試みた。T291 ループ欠損変異酵素を作製するにあたっては、以下の二点を考慮した。(1)本酵素はモノマー酵素であるが、その構造は N ターミナルハーフドメインと C ターミナルハーフドメインより構成されており、二つのハーフドメインの立体構造は類似している。(2)T291 ループは C ターミナルハーフドメイン上に存在するが、それに対応する N ターミナルハーフドメイン上の領域は P51-R62 であり、T291 ループと比較して短く、構造揺らぎも低い。そこで、T291 ループの 41 アミノ酸を単純に欠損させた  $\Delta$ G273-T313、および本ループを欠損後に N ターミナルハーフドメイン上の対応するループである P51-R62 を「移植」(grafting)した変異体(grf 51-62)を作製した。これらの変異酵素の発現を組換え大腸菌で試みたが、可溶性での発現はできなかった。

その理由は、本来 C297-C343 間でジスルフィド結合を形成していたものが、T291 ループの除去により C297 を喪失し、孤立した C343 が正しいフォールディングを妨げているためではないかと予想した。そこで、 $\Delta$ G273-T313 および grf51-62 変異体の C343 をセリンに置換した変異体、 $\Delta$ G273-T313/C343S および grf51-62/C343S を作製したところ、両変異体とも可溶性蛋白として発現することを確認した。grf51-62/C343S 変異酵素では粗酵素の状態で一時的に酵素活性を検出できたが、酵素の精製途上で活性を失ったため、その耐熱性評価には至らなかった。T291 ループの一部はリン脂質結合時にアシル基を収納するための疎水性領域を提供しているため、

その欠損により酵素活性が失われたと考えられた。

#### 5. MD シミュレーションによる不安定領域の探索

本酵素をさらに安定化することを目的として、MD シミュレーションによる不安定領域の探索を行った。コンピュータの処理速度を稼ぐために、80-250° C という仮想的な温度において MD 計算を行い、安定性の低いホットスポットを新たに同定した。それらは、A57-L69, K161-S163, R226-W235, S243-D263, および T400-R414 であり、今後の耐熱化のターゲットとして期待できる。

#### 6. ドッキングシミュレーションによる基質結合に関わる残基の探索

さらに、本酵素のドッキングシミュレーションによって本酵素と基質との相互作用に関わる残基の同定を試みた。その結果、リン脂質の短鎖アシル基との相互作用部位として、L88, A123, Y126, W166, P462, G381 および A463 を、リン脂質グリセロール骨格との相作用部位として L465, Y461 を同定した。一方、長鎖アシル基は I125, V380, R385, N459, Y461, P462, L465, および D467 と相互作用する。さらに、ホスファチジル受容体であるアルコール化合物は N185, S382 と相互作用することが示された。これらのシミュレーション結果はこれまで得られた本酵素の変異体の解析結果とも良く一致した。同定された残基のいくつかは Y126 ループ(A123-V130)と G381 ループ(D373-I388)の構成残基である。この二つのループは「ゲート様構造」を形成し、基質であるリン脂質の結合に伴って開閉することが判明している。このゲート様構造が水中でミセルあるいはベシクル等のリン脂質凝集体から一分子のリン脂質を引き抜き、それを活性部位に留めておく機構を提唱した。

以上のようにダムニャノビッチ ヤスミナは蛋白工学的手法を用いて PI 合成型 PLD の耐熱化に成功し、有用物質である PI の合成効率を向上させる事に成功した。特に、D40 ループ除去のように不安定ループ除去による酵素の耐熱化・安定化というコンセプトは、酵素を安定化するための新しい戦略として他の酵素・タンパク質の安定化にも応用できる可能性がある。その意味で学術的意義は大きい。本研究で得られた知見は PLD の酵素科学のみならず、脂質化学や蛋白工学に寄与するところが大きい。よって、本委員会は本論文が博士（農学）の学位論文として十分価値あるものと認め、論文審査に合格と判定した。